

Urszula Guzik<sup>1\*</sup>, Danuta Wojcieszynska<sup>1</sup>, Katarzyna Hupert-Kocurek<sup>1</sup>

Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 576, email: biochem@us.edu.pl

Wpłynęło w lipcu 2010

1. Wprowadzenie. 2. Akceptory elektronów w beztlenowej degradacji arenów. 3. Mechanizmy degradacji związków aromatycznych w warunkach anoksji. 4. Podsumowanie

#### Microbiological degradation of aromatic compounds in anoxic conditions

**Abstract:** Microbiological degradation of aromatic compounds occurs via aerobic or anaerobic pathways. In anaerobic environments, arenes such as benzene, toluene, xylene, naphthalene, anthraquinone, phenols and its derivatives are degraded. In anoxic conditions ions of metals, sulphate, nitrate or simple organic compounds are final electron acceptors in arene degradation. Key intermediate in these processes is benzoyl-CoA, which can be transformed to acetyl-CoA. The obtained acetyl-CoA is included in central metabolism. Degradation of aromatic compounds is also observed in methanogenic conditions. The products fermentation of aromatic compounds are acetate, butyrate, carbon dioxide and hydrogen, which can be degraded in syntrophic bacterial consortium.

1. Introduction. 2. Electron acceptors in anoxic degradation of arenes. 3. Mechanisms of degradation of aromatic compounds in anoxic conditions. 4. Summary

---

**Słowa kluczowe:** enzymy, immobilizacja, mikroorganizmy, związki aromatyczne

**Key words:** enzymes, immobilisation, microorganisms, aromatic compounds

---

## 1. Wprowadzenie

Węglowodory aromatyczne są grupą związków szeroko rozpowszechnionych w środowisku. Ich źródłem są rośliny, reakcje geochemiczne, działalność wulkaniczna, przede wszystkim jednak działalność człowieka, objawiająca się wzmożonym spalaniem węgla, ropy naftowej, rozwojem przemysłu farmaceutycznego, chemicznego czy stosowania nawozów sztucznych. Działalność ta przyczyniła się w ostatnich dziesięcioleciach do gwałtownego wzrostu obecności tych związków w środowisku. Rozwój zainteresowań mechanizmami biodegradacji związków aromatycznych przeprowadzonymi przez mikroorganizmy, wynika z faktu wzrastającego zanieczyszczenia środowiska oraz stwierdzonego mutagennego i kancerogennego ich działania [6, 19, 23, 25, 33, 42, 49, 62].

Głównym problemem w degradacji węglowodorów aromatycznych jest przewyższenie chemicznej stabilności struktury pierścienia aromatycznego. Przez długi okres czasu katabolizm węglowodorów aromatycznych uważany był za proces wyłącznie tlenowy, gdyż we wszystkich znanych szlakach tlenowej degradacji związków aromatycznych to właśnie molekularny tlen jako kosubstrat służy mikroorganizmom do początkowego ataku na pierścień aromatyczny i do rozerwania jego struktury. Jednak w ostatnich latach zaobserwo-

wano, że istnieją mikroorganizmy zdolne do metabolizowania węglowodorów aromatycznych w warunkach beztlenowych. Mikroorganizmy takie musiały zatem rozwinąć alternatywne, tlenowo niezależne szlaki metaboliczne [1]. Jednakże należy zaznaczyć, że większość wielocyklicznych i wysoko spolimeryzowanych związków aromatycznych może być degradowana tylko w warunkach tlenowych [25, 35, 39, 41, 44, 62].

Degradacja jednopierścieniowych związków aromatycznych w warunkach beztlenowych, w większości przypadków, przebiega poprzez benzoilo-CoA, który następnie ulega przekształceniu do acetylo-CoA [6, 20, 35, 39, 49]. Dla rozkładu policyklicznych węglowodorów aromatycznych kluczową reakcją jest karboksylacja [43].

Ponieważ węglowodory aromatyczne są związkami bardziej zredukowanymi niż produkty ich rozkładu, podczas ich utlenienia wymagana jest obecność akceptorów elektronów o wyższym potencjale redox, co pozwala mikroorganizmom na przekształcanie energii niezbędnej do wzrostu. Wszystkie wyizolowane dotychczas szczepy bakterii zdolne do rozkładu tych związków w warunkach beztlenowych należą do bakterii denitryfikacyjnych, żelazowych, siarczanowych, beztlenowych bakterii fotosyntetyzujących oraz bakterii fermentujących. Spośród grzybów zdolnych do rozkładu policyklicznych węglowodorów aromatycznych

---

\* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii; ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009 576; e-mail: urszula.guzik@us.edu.pl

(PAHs), o niskich masach cząsteczkowych, w warunkach anoksji należą *Aspergillus* sp., *Trichocladium canadense* oraz *Fusarium oxysporum*. Ponadto *T. canadense*, *Aspergillus* sp. oraz *Verticillum* sp. i *Acremonium* sp. degradują PAHs o dużych masach cząsteczkowych [62]. Beztlenowe oddychanie w środowisku naturalnym zachodzi tylko w głębokich warstwach, które pozbawione są tlenu, akceptora elektronów o najwyższym potencjale redox ( $E_0' = +818$  mV) [25, 39, 42, 43, 52, 62]. Wysokość tego potencjału niejako narzuca kolejność wykorzystywania przez bakterie ostatecznych akceptorów elektronów. W środowisku beztlenowym jest nim ten dostępny jon, którego wartość potencjału redox jest najwyższa [25, 42, 52].

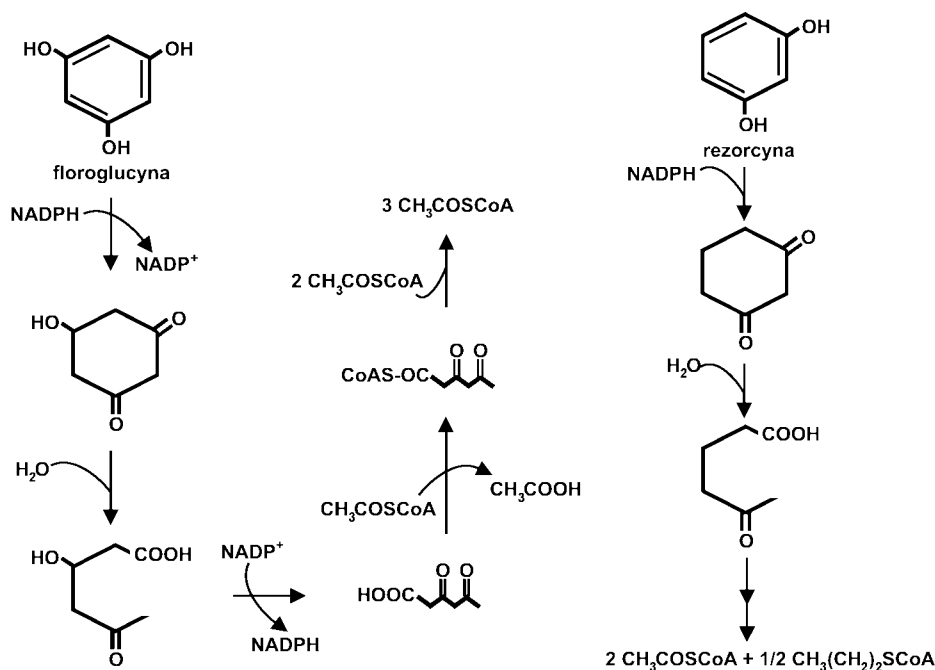
## 2. Akceptory elektronów w beztlenowej degradacji arenów

Bakterie denitryfikujące są często spotykanymi mikroorganizmami zdolnymi do rozkładu związków aromatycznych [1, 2, 25, 30, 52, 58]. Do niedawna uważano, że wszystkie one należą do  $\beta$ -podklasy proteobakterii, gdyż większość wyizolowanych gatunków należy do rodzaju *Thauera* i *Azoarcus* [7, 29, 31, 35, 39, 61]. Ponadto opisano również jeden gatunek, spoza rodzajów *Thauera* i *Azoarcus*, zdolny do rozkładu kwasu benzoowego – *Alcaligenes xylosoxidans* należący jednak do tej samej podklasy. Wyjątkiem jest szczep *Bacillus cereus* zdolny do rozkładu benzenu w warunkach redukcji azotanów [30]. Bakterie denitryfikujące przeprowadzają rozkład większości jednopierścieniowych związków aromatycznych poprzez

benzoilo-CoA. Jednakże kilka aromatycznych substratów, które posiadają dwie lub więcej grup hydroksylowych w pozycji *meta*, degradowane są do acetylo-CoA z pominięciem etapu aktywacji pierścienia aromatycznego [7, 33, 35, 39]. Drogi takie opisano dla rozkładu rezorcyny i floroglucyny, co przedstawiono na rys. 1.

Niektóre związki aromatyczne, wśród nich uchlорowane pochodne benzenu, są bardzo odporne na biodegradację przez bakterie denitryfikujące. Chociaż wydaje się, że związki te podlegają rozkładowi w warunkach denitryfikacji, to do tej pory nie udało się wyizolować czystych kultur zdolnych do ich rozkładu. Możliwym jest, że związki te do rozkładu wymagają obecności syntroficznych konsorcji bakteryjnych [39, 41].

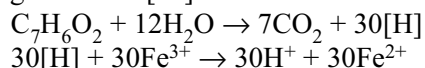
W warunkach oddychania azotanowego może zachodzić również biodegradacja policyklicznych węglowodorów aromatycznych. Wyizolowane szczepy NAP-3-1 oraz NAP-4 posiadają zdolność biodegradacji naftalenu. Szczep NAP-3-1, należący do  $\gamma$ -podklasy proteobakterii, jest filogenetycznie blisko spokrewniony z *Pseudomonas* sp. U przedstawicieli tej rodziny stwierdzono już wcześniej zdolność degradacji antracenu, fenantrenu, pirenu, naftalenu, a wyizolowane szczepy przeprowadzające te reakcje zidentyfikowano jako *P. stutzeri*, *P. putida* oraz *P. fluorescens* [53]. Wyniki te sugerują, że inni przedstawiciele *Pseudomonadaceae* są również zdolni do biodegradacji policyklicznych węglowodorów aromatycznych w warunkach beztlenowych. Wyizolowany NAP-4 należy również do podklasy  $\gamma$ -proteobakterii, jednak filogenetycznie jest blisko spokrewniony z *Vibrio* spp. Na podstawie tych danych można przypuszczać, że filogenetycznie różne bakterie z  $\gamma$ -podklasy proteobakterii mogą przeprowa-



Rys. 1. Drogi beztlenowej degradacji floroglucyny i rezorcyny

dzać degradację naftalenu i innych związków aromatycznych w warunkach beztlenowych [59].

Redukcja jonów żelaza (III), manganu (IV), wana-du (V), chromu (VI) czy uranu (VI) jest ważnym alternatywnym szlakiem oddychania beztlenowego i może łączyć się z jednoczesnym utlenieniem związków aromatycznych [18, 42]. Znanych jest obecnie wiele bakterii oddychania żelazowego. *Geobacter metallireducens* jest bakterią zdolną do całkowitego utleniania toluenu, fenolu, *p*-krezolu, benzoenu, aromatycznych aldehydów i alkoholi z jednoczesną redukcją jonów żelaza (III) [9, 16, 17, 33, 39, 52]. Utlenienie benzoenu w obecności jonów Fe(III) przebiega według równania [39]:

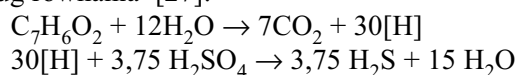


Stwierdzono również, że liczni przedstawiciele rodziny *Geobacteraceae* w osadzie o dużej zawartości związków aromatycznych są w stanie przeprowadzać biodegradację benzenu [3]. Zdolność do całkowitego utlenienia fenolu i kwasu benzoowego stwierdzono również u przedstawiciela termofilnych archebakterii *Ferroglobus placidus*. Szczep ten przeprowadza także redukcję jonów żelaza (III), gdy źródłem elektronów jest benzaldehyd, kwas 4-hydroksybenzoowy, *p*-hydroksybenzaldehyd czy kwas cynamonowy [63].

Osady mangrowe są źródłem konsorcjum bakteryjnego zdolnego do rozkładu takich PAHs jak fluoren, fenantren, fluorofenantren i piren w obecności jonów żelaza (III) [23, 50]. Ch a n g i wsp. wykazali jednak, że w osadach mangrowych następuje szybsza degradacja w obecności siarczanów, słabsza w warunkach metanogenezy, a w obecności azotanów dochodzi do inhibicji rozkładu m.in. nonylofenolu [23].

Bakterie redukujące siarczany są grupą organizmów przeprowadzających biodegradację bardzo szerokiej gamy związków aromatycznych. Stwierdzono zdolność do utleniania przez mieszane kultury bakterii siarczanowych tak opornych na rozkład związków jak benzen, fenol, ksyleny, naftalen, 2-metylonaftalen, kwasy 1- i 2-naftalenokarboksylowe czy fenantren [4, 5, 8, 13, 23, 25, 26, 39, 50, 52, 54, 56, 57, 60, 64]. Intermediatem w degradacji związków monoaromatycznych przez bakterie oddychania siarczanowego jest benzoilo-CoA. Gatunki przeprowadzające procesy rozkładu arenów z siarczanami, jako ostatecznymi akceptorami elektronów, należą do *Desulfobacteriaceae* z podklasy  $\gamma$ -proteobakterii lub do Gram dodatnich *Desulfotomaculum* [49].

Degradację benzoenu opisano dotychczas tylko u szczepu *Desulfonema magnum* i przebiega ona według równania [27]:



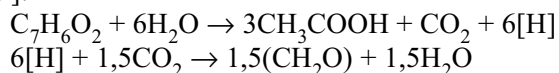
*Desulfobacterium* (*Db.*) *aniline* degraduje anilinę i fenol, *Db.* *phenolicum* fenol, 4-hydroksybenzoenu

i *p*-krezol, *Db.* *catecholicum* katechol, a *Db.* *indolicum* indol. *Desulfococcus multivorans* i *Desulfosarcina variabilis* mogą rozkładać fenyloctan, a szczepy z rodzaju *Desulfobacterium* i *Desulfococcus* 3-aminobenzoenu i hydrochinon. *Desulfotomaculum* sp., jako źródło węgla i energii, wykorzystuje katechol, fenol, *p*- i *m*-krezol, alkohol benzylowy i wanilinę [39, 51]. Toluenu degradowany jest przez *Desulfobacula toluolica* [9, 39]. Stwierdzono również, że bakterie oddychania siarczanowego rozkładają *o*- i *m*-ksylen [55, 57]. Z kolei Galushko i wsp. wyizolowali z morskiego osadu szczep NaphS2, filogenetycznie blisko spokrewniony z rodziną *Desulfobacteriaceae* i przeprowadzający degradację naftalenu [36].

Jako akceptory elektronów w procesach degradacji struktury aromatycznej mogą występować związki o podobnej strukturze do rozkładanego związku. Przykładem może być redukcja dechlorynacja polichlorowanych bifenyli, podczas której dochodzi do redukcji takich związków jak: inne bifenyly, 2,6-dibromobifenyl, halo benzoenu, chlorobenzenu i chlorofenole [42, 44].

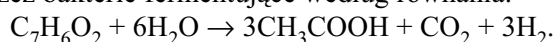
Fotosyntetyzujące bakterie purpurowe do wzrostu wykorzystują światło i anaerobiozę. W tych warunkach nie uzyskują one energii z utleniania związków organicznych, które stanowią dla nich źródło protonów. Są one uzyskiwane podczas degradacji związków aromatycznych do acetylo-CoA, który następnie służy im jako źródło węgla.

Utlenienie benzoenu przebiega według równania [39]:

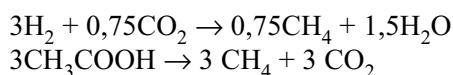


Zdolność do fotoorganotroficznego utleniania związków aromatycznych stwierdzono u *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodospirillum fulvum*, *Rhodocyclus purpureus*, *Rhodocyclus gelatinosus*. U *Rhodospseudomonas palustris* i *Rhodomicrobium vannielii* stwierdzono zdolność do rozkładu benzoenu, 4-hydroksybenzoenu, protokatecholu, niektórych fenylowych i hydroksyfenylowych kwasów tłuszczowych, a nawet uchlorowcowanych pochodnych benzenu [39, 41].

Bakterie fermentujące związki aromatyczne są filogenetycznie heterogenne i należą do dwóch grup. Bakterie te wykorzystują węglowodory aromatyczne jako źródło węgla i energii, przekształcając je w produkty fermentacji, takie jak octan lub maślan, dwutlenek węgla i wodór, które następnie są dalej degradowane w syntroficznych konsorcjach bakteryjnych [6, 24]. Na przykład całkowita mineralizacja benzoenu przebiega w dwóch etapach. Pierwszy prowadzony jest przez bakterie fermentujące według równania:



Dalsze reakcje przeprowadzają metanogeny według reakcji [39]:



Procesy degradacji węglowodorów aromatycznych w warunkach metanogenezy często przebiegają intensywnie w obecności dodatkowych źródeł węgla, np. glukozy, celulozy czy kwasów huminowych [6, 23, 42, 52].

W metanogennych warunkach stwierdzono również ograniczoną biodegradację wielopierścieniowych związków aromatycznych takich jak naftalen, 1- i 2-metylnaftalen, bifenyl, 2,6-dimetylnaftalen, antrachinon, heksadekan [28, 37]. Opisano również czyste kultury bakterii fermentujących związki aromatyczne. Szczepy z rodzaju *Clostridium* i *Coprococcus* sp., *Eubacterium oxidoreducens*, *Pelobacter acidigallici* i *Pelobacter massiliensis* fermentują aromatyczne substraty zawierające dwie lub trzy grupy hydroksylowe w pozycji *meta*, takie jak rezorcyna czy floroglucyna. Związki te są tak silnie utlenione, że mogą być fermentowane do kwasów organicznych [35, 39].

### 3. Mechanizmy degradacji związków aromatycznych w warunkach anoksji

Większość mikroorganizmów nie jest zdolna do całkowitej degradacji jednopierścieniowych związków aromatycznych, ale katalizują one tlenowo niezależne reakcje biotransformacji tych związków. Podczas tych procesów pierścień aromatycznych nie podlega rozszczepieniu, a przekształceniom ulegają jedynie podstawniki pierścienia. W ten sposób związki te są przekształcane do kilku podstawowych produktów, takich jak benzoesan, hydroksybenzoesan, fenol, krezol czy toluen. Produkty te stanowią dalej substraty dla organizmów przeprowadzających degradację pierścienia aromatycznego. Reakcje biotransformacji obejmują utlenienie i redukcję podstawników pierścienia, rozerwanie wiązania węgiel-węgiel pomiędzy pierścieniem aromatycznym a podstawnikiem, reakcje dekarboksylacji, usunięcia grup O-metylowych oraz usunięcia z podstawników atomów siarki i azotu [30, 33, 39, 41, 49].

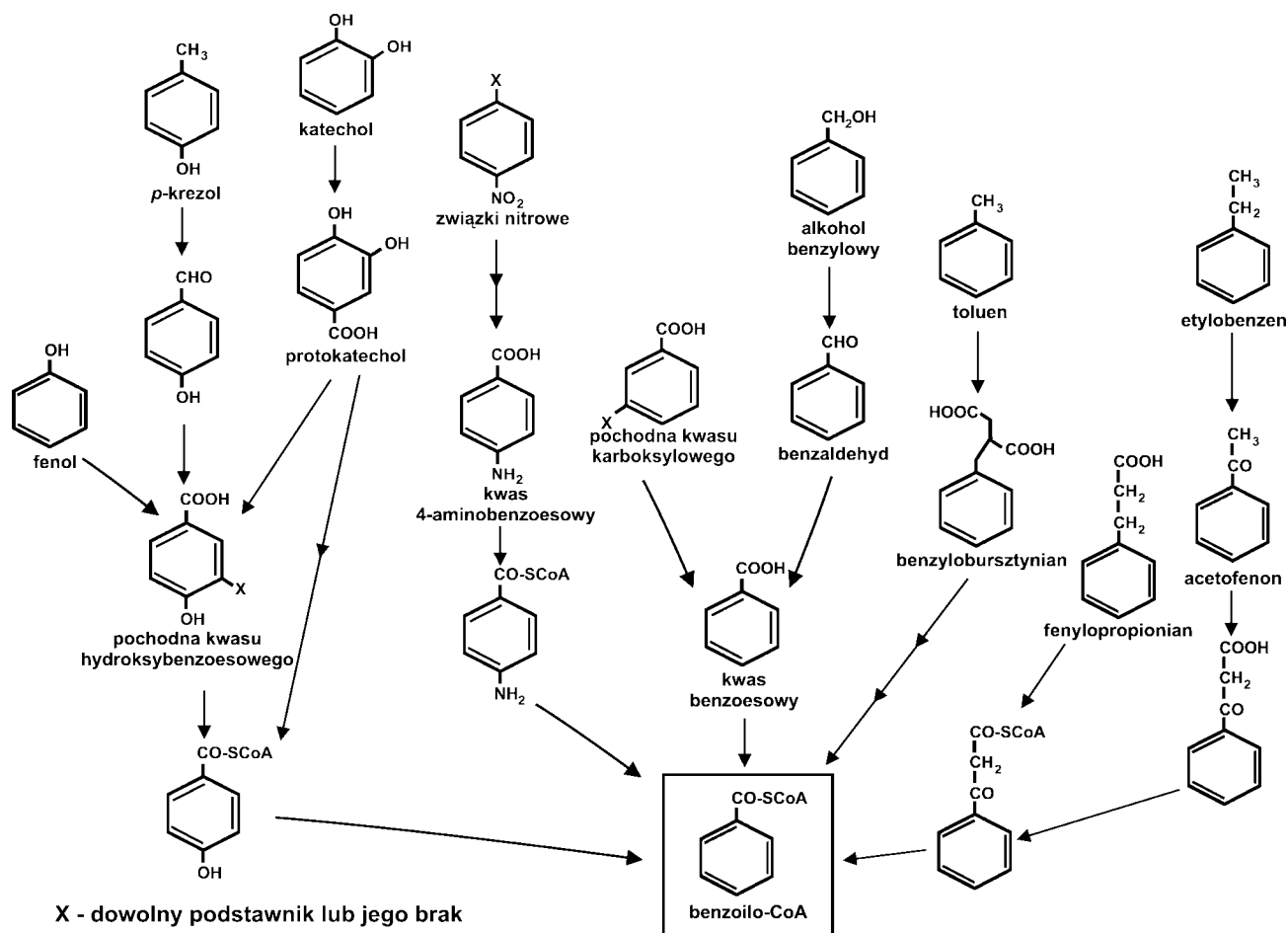
Beztlenowa degradacja jednopierścieniowych związków aromatycznych przebiega w dwóch etapach. W fazie pierwszej aromatyczne substraty są przekształcane do jednego centralnego intermediatu, który następnie podlega redukcijnej dearomatyzacji. Dla większości węglowodorów aromatycznych tym centralnym intermediatem jest benzoilo-CoA, a tylko dla kilku hydroksylowanych arenów są to floroglucyna i rezorcyna [6, 13, 39, 49]. Reakcje łączące rozkład związków aromatycznych z głównym intermediatem benzoilo-CoA przedstawia rysunek 2 [19, 20]. Druga faza beztlenowej degradacji polega na redukcji tych intermediatów do acyklicznych związków, które następnie degrado-

wane są do acetylo-CoA i dwutlenku węgla. Znany jest przypadek, opisany u bakterii denitryfikującej *Alcaligenes* sp., bezpośredniej dearomatyzacji i hydrolytycznego rozcięcia pierścienia aromatycznego [39].

Jednopierścieniowe związki aromatyczne z trzema grupami hydroksylowymi w pozycji *meta* są degradowane bez aktywacji z udziałem CoA. Ponieważ substraty te są bardziej utlenione niż związki aromatyczne pozbawione podstawników, mogą one być degradowane przez bakterie oddychania beztlenowego lub też bakterie fermentujące, np. *Pelobacter*, *Eubacterium* czy *Clostridium*. Bakterie fermentujące nie mineralizują związków aromatycznych całkowicie, a tylko akumulują octan lub maślan jako ostateczny produkt. Związkami przekształcanymi do floroglucyny i rezorcyny są di-, tri- i tetrahydroksybenzoesan oraz kwas trihydroksygalowy. Degradacja floroglucyny jest inicjowana przez NADPH-zależną reduktazę floroglucynową, enzym wrażliwy na tlen wyizolowany z komórek szczepu *Eubacterium oxidoreducens* i prowadzi do powstania 1,3-dioksy-5-hydroksycykloheksanu, co przedstawiono na rysunku 1. Pierścień tego związku podlega hydrolytycznemu otwarciu przez hydrolazę dihydrofloroglucynową do kwasu 3-hydroksy-5-oksoheksanowego, który następnie ulega utlenieniu do trójoctanu przez NADP<sup>+</sup> zależną dehydrogenazę. Trójoctan aktywowany przez transferazę CoA zależną od acetylo-CoA podlega tiolitycznemu rozcięciu na trzy cząsteczki acetylo-CoA [20, 35, 38, 39].

Degradacja rezorcyny może być inicjowana przez bezpośrednią redukcję pierścienia aromatycznego do 1,3-dioksycykloheksanu, który hydrolizowany jest do alifatycznego kwasu 5-oksoheksanowego. Podlega on dalszej degradacji do acetylo-CoA i butyrylo-CoA szlakiem  $\beta$ -oksydacji [39]. Przebieg reakcji przedstawia rysunek 1.

Fenol może być degradowany beztlenowo przez większość denitryfikujących, siarkowych oraz żelazowych bakterii oraz metanogenne konsorcja. Metaboliczny szlak rozkładu tego związku został zbadany i opisany u szczepu *Thauera aromatica*. Szczep ten wykorzystuje fenol jako substrat wzrostowy, wymaga jedynie obecności w środowisku dwutlenku węgla, gdyż prowadzony przez niego szlak inicjowany jest karboksylacją w pozycji *para* pierścienia, co prowadzi do powstania kwasu 4-hydroksybenzoesowego. Przemianę tą przedstawiono na rysunku 2. Kwas 4-hydroksybenzoesowy jest aktywowany przez specyficzną ligazę koenzymu A, opisaną dla szczepów *Thauera aromatica* i *Rhodopseudomonas palustris*. 4-hydroksybenzylo-CoA jest następnie redukowany do benzylo-CoA przez reduktazę 4-hydroksybenzylo-CoA, enzym silnie wrażliwy na tlen i otrzymany z komórek *Thauera aromatica*, *Azoarcus evansii* oraz *Rhodopseudomonas palustris* [7, 29, 39, 61]. Oba te enzymy obecne są



Rys. 2. Benzoilo-CoA jako centralny intermediat beztlenowej degradacji arenów

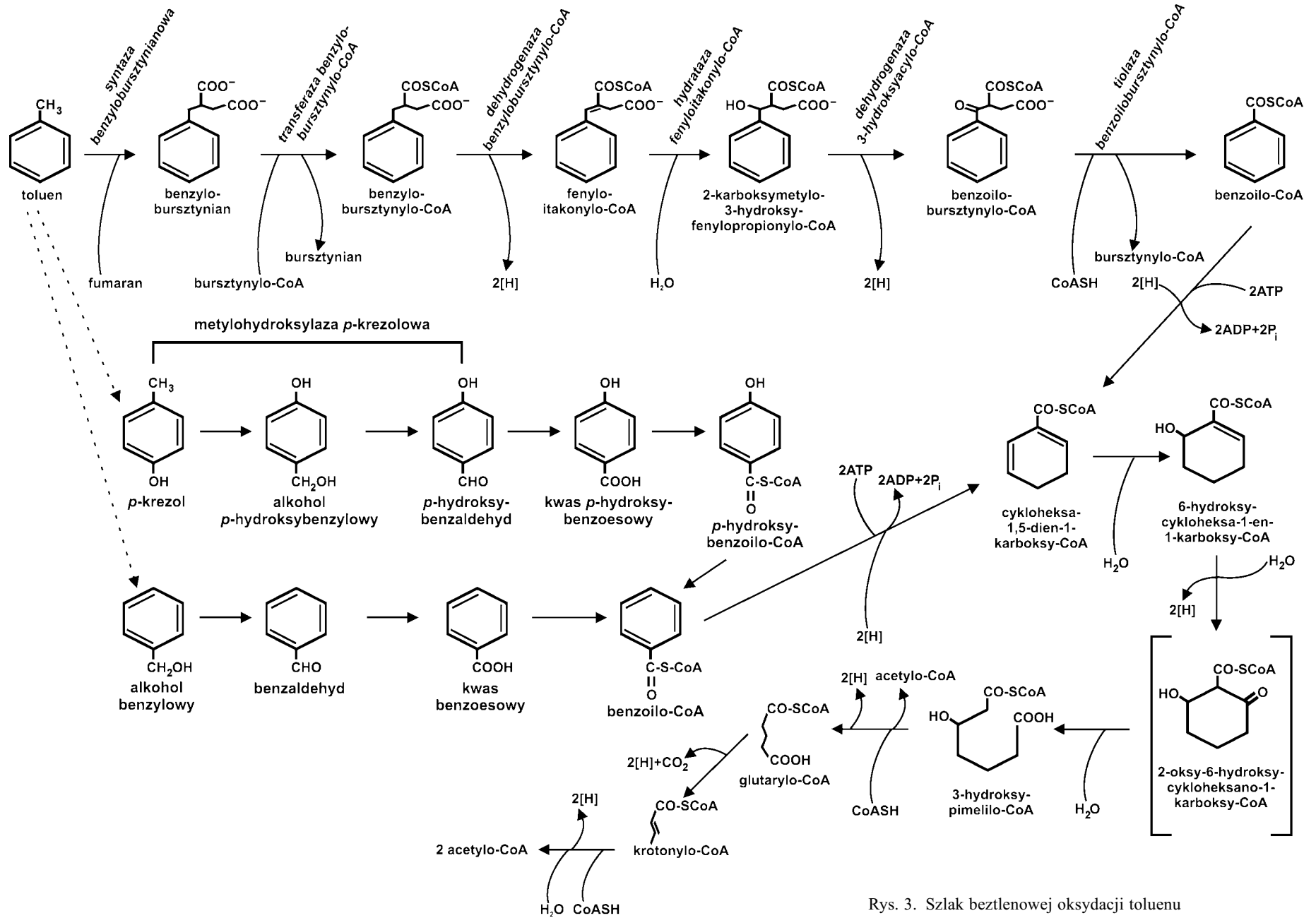
wyłącznie w komórkach rosnących beztlenowo, dla których substratem wzrostowym jest kwas 4-hydroksybenzoesowy lub inne związki aromatyczne, których rozkład przebiega przez ten intermediat.

Do rozkładu toluenu zdolne są bakterie siarczane, żelazowe i denitryfikacyjne należące do  $\beta$  i  $\gamma$  podklas proteobakterii oraz metanogenne konsorcja [4, 9, 10, 45]. Mineralizacja toluenu polega na przekształceniu go do benzoesu lub benzoilo-CoA, który podlega reakcjom dearomatyzacji, a następnie degradacji acyklicznych intermedatów. Badania nad szlakiem rozkładu toluenu przez bakterie, zostały przeprowadzone na szczepach *Thauera aromatica* i *Azoarcus* sp. Pierwszą reakcją tego szlaku jest reakcja addycji fumaranu do toluenu, prowadząca do powstania benzylobursztynianu [4, 10, 22, 45, 48]. Reakcję tę katalizuje syntaza benzylobursztynianowa, enzym silnie wrażliwy na tlen i podlegający odwracalnej inhibicji przez analogi substratu takie jak alkohol benzylowy, benzaldehyd czy fenylohydrazynę. Enzym ten zawiera w centrum aktywnym rodnik glicynowy i katalizuje powstanie rodnika benzylowego poprzez odłączenie atomu wodoru od grupy metylowej toluenu. Rodek ten przyłącza się do podwójnego wiązania węgiel-węgiel fumaranu,

w wyniku czego tworzy się rodnik benzylobursztynianowy [41]. Syntaza benzylobursztynianowa jest dawcą wodoru dla tego rodnika, w wyniku czego powstaje benzylobursztynian z jednoczesnym odtworzeniem rodnikowej formy enzymu. Na podstawie badań przeprowadzonych na *T. aromatica* stwierdzono, że transferaza benzylobursztyniło-CoA jest enzymem indukowanym obecnością benzylobursztynianu [47]. Utlenienie benzylobursztynianu do benzoilo-CoA przebiega szlakiem analogicznym do  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych, co przedstawiono na rysunku 3 [41, 48].

Niektórzy autorzy uważają, że intermediaty tego szlaku, kwas benzylobursztynianowy, jak również fenyloitakonylo-CoA, są metabolitami toksycznymi dla komórek bakteryjnych [27]. Podczas procesu biodegradacji toluenu może dochodzić do reakcji acetylo-CoA z grupą metylową tego związku, w wyniku czego powstaje fenylopropionilo-CoA. Jest on przekształcany w szlaku  $\beta$ -oksydacji do benzoilo-CoA [10, 27].

Proponuje się również istnienie szlaków rozkładu toluenu poprzez jego *para*-hydroksylację do *p*-krezolu lub hydroksylację jego grupy metylowej z alkoholem benzylowym jako intermediatem, co przedstawiono na rysunku 3 [10, 34]. Prawdopodobnie grupa



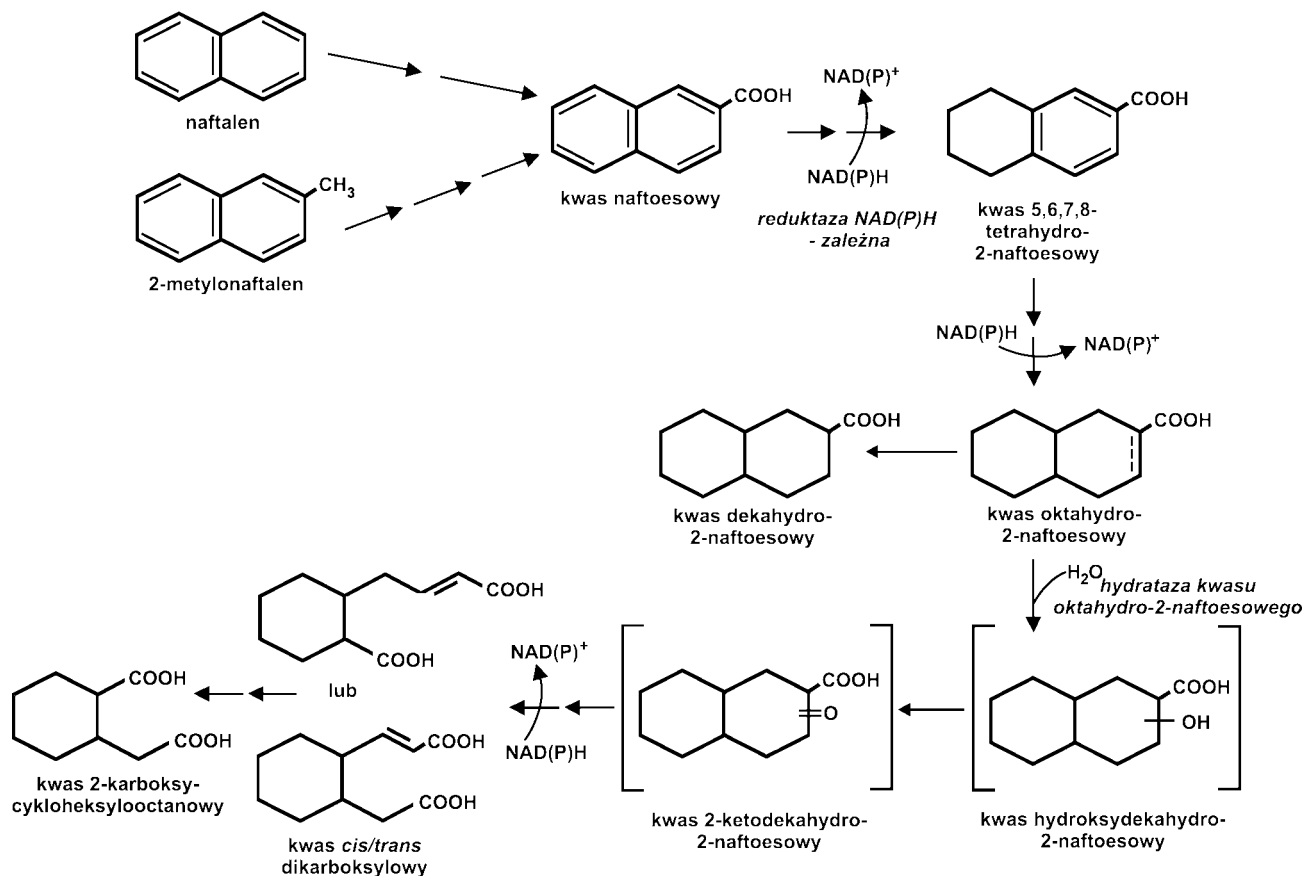
Rys. 3. Szlak beztlenowej oksydacji toluenu

hydroksylowa wbudowywana w procesie hydroksylacji pochodzi z wody. Zaobserwowano u szczepu *Geobacter metallireducens* GS-15 *para*-hydroksylację oraz hydroksylację grupy metylowej, podczas gdy bakterie siarczanowe i de nityfikujące przeprowadzają jedynie drugą reakcję, w której kluczowymi intermediatami są alkohol benzylový oraz benzaldehyd, a dla jej funkcjonowania niezbędna jest aktywność czterech enzymów, to jest metylohydroksylazy toluenowej, dehydrogenazy alkoholu benzylového oraz benzaldehydu i syntetazy benzoilo-CoA [27, 34].

Benzoilo-CoA jest głównym i ostatnim aromatycznym intermediatem w procesach beztlenowej biodegradacji większości jednopierścieniowych związków aromatycznych. Istnieją dwa alternatywne szlaki rozkładu benzoilo-CoA, opisane u fototroficznej bakterii *Rhodospseudomonas palustris* oraz denityfikującej bakterii *T. aromatica*. Reakcja dearomatyzacji pierścienia w warunkach anoksji polega na jego redukcji do cykloheksa-1,5-dien-1-karboksy-CoA przez reduktazę benzoilo-CoA [14, 15, 19, 33, 38]. Reduktaza benzoilo-CoA jest enzymem silnie wrażliwym na tlen. Jest to heterotetramer zawierający w swojej budowie dwa centra żelazowo-siarkowe typu ( $Fe_4S_4$ ), dwa centra żelazowo-siarkowe typu ( $Fe_2S_2$ ) oraz FAD. Redukcja wszystkich substratów prowadzona przez ten enzym

jest ściśle powiązana z hydrolizą dwóch cząsteczek ATP do ADP i  $P_i$  na mol substratu [13, 39]. Produkt redukcji benzoilo-CoA podlega następnie hydratacji i dehydrogenacji u *Thauera aromatica* przypuszczalnie do 2-okso-6-hydroksycykloheksano-1-karboksy-CoA [39, 46]. Natomiast szczep *R. palustris* przeprowadza dodatkową redukcję cyklicznego dienu do cykloheks-1-en-1-karboksy-CoA [32, 38, 46]. 2-oksy-6-hydroksycykloheksano-1-karboksy-CoA podlega hydrolitycznemu otwarciu pierścienia aromatycznego i prowadzi do powstania 3-hydroksypimelino-CoA. Ulega on dalej  $\beta$ -oksydacji do acetylo-CoA oraz glutarylo-CoA. Dehydrogenaza glutarylo-CoA, opisana u *Azoarcus evansii*, katalizuje utlenienie i dekarboksylację glutarylo-CoA do dwutlenku węgla i krotonylo-CoA, który następnie utleniany jest do dwóch cząsteczek acetylo-CoA (rys. 3) [11, 19, 29, 38, 39, 40, 46].

Aromatyczne węglowodory pozbawione podstawników, takie jak naftalen czy fenantren, są ekstremalnie trudnymi związkami w procesach biodegradacji. Wykazano jednak, że mogą ulegać degradacji przez beztlenowe mikroorganizmy oddychania żelazowego, azotanowego i siarczanowego oraz konsorcja metanogenne [24]. Kluczową reakcją rozpoczynającą degradację naftalenu i fenantrenu jest karboksylacja. Prowadzi ona do utworzenia analogów kwasu benzoesowego,



Rys. 4. Redukcyjny szlak kwasu naftoesowego

odpowiednio kwasu 2-naftoesowego oraz kwasu fenantrenowego, które są idealnymi substratami dla reakcji aktywacji cząsteczką CoA oraz ich dalszych przemian [1, 4, 21, 54, 64]. Stwierdzona obecność naftalenolu w niektórych hodowlach bakterii siarczanych może świadczyć, że organizmy te mogą przeprowadzać biodegradację naftalenu również innym szlakiem, w którym pierwszą reakcją jest hydroksylacja, a nie karboksylacja [8, 21].

Beztlenowa degradacja metylonaftalenu jest procesem analogicznym do rozkładu toluenu i innych metylowanych pochodnych benzenu. Pierwsza reakcja katalizowana przez syntazę 2-naftylobursztynianową podobnie polega na addycji fumaranu do grupy metylowej 2-metylnaftalenu [4, 12, 21]. Powstały w jej wyniku 2-naftylobursztynian ulega aktywacji przez transferazę bursztynylo-CoA zależną od CoA prowadząc do utworzenia 2-naftylobursztynylo-CoA. Kolejne reakcje prowadzą przez szlak  $\beta$ -oksydacji aż do utworzenia centralnego intermediatu, to jest naftalenoilo-CoA.

Ostatnie doniesienia wskazują, że naftalen i kwas 2-naftoesowy mogą być redukowane do kwasu 5,6,7,8-tetrahydro-2-naftoesowego, który jest także metabolitem degradacji tetraliny. Kwas ten może podlegać dalszej redukcji do kwasu oktahydro-2-naftalenokarboksylowego. W wyniku jego hydratacji powstaje kwas hydroksydekahydro-2-naftoesowy, który to ulega utlenieniu do kwasu 2-oksodekahydro-2-naftoesowego. Tiolityczne rozszczepienie pierścienia, a następnie reakcje  $\beta$ -oksydacji prowadzą do powstania kwasu *cis*-2-karboksycykloheksylooctowego [5]. Proponowany przebieg tego szlaku przedstawiono na rysunku 4.

#### 4. Podsumowanie

Wzrastające zanieczyszczenie środowiska naturalnego wpłynęło pozytywnie na rozwój badań związanych z degradacją związków aromatycznych zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. W warunkach anoksji rozkład arenów przebiega zarówno w procesach związanych z przekazywaniem elektronów na ostateczny akceptor, którym mogą być jony metali, siarczany, azotany, czy też proste związki organiczne, jak i w procesach fermentacji metanowej. Najczęściej w mikrobiologiczne procesy rozkładu w warunkach beztlenowych zachodzą poprzez benzoilo-CoA jako kluczowy metabolit, którego dalsze przekształcenia prowadzą do utworzenia metabolitów centralnych przemian komórkowych. Dokładne poznanie procesów biodegradacji węglowodorów aromatycznych w warunkach anoksji może być lekarstwem dla zdegradowanych środowisk, które mają ograniczony dostęp powietrza lub których napowietrzanie jest trudne i nieekonomiczne, może przyczynić się do ich szybszej bioremediacji.

#### Piśmiennictwo

1. Ambrosoli R., Petruzzelli L., Minati J.L., Marsan F.A.: Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions. *Chemosphere*, **60**, 1231–1236 (2005)
2. An Y., Joo Y., Hong I., Ryu H., Cho K.: Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 611–619 (2004)
3. Anderson R.T., Rooney-Varga J.N., Gaw C.V., Lovley D.R.: Anaerobic benzene oxidation in the Fe(III) reduction zone of petroleum-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1222–1229 (1998)
4. Annweiler E., Materna A., Safinowski M., Kappler A., Richnow H.H., Michaelis W., Meckenstock R.U.: Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5329–5333 (2000)
5. Annweiler E., Michaelis W., Meckenstock R.U.: Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphthalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 852–858 (2002)
6. Bajaj M., Gallert C., Winter J.: Treatment of phenolic wastewater in an anaerobic fixed bed reactor (AFBR) – Recovery after shock loading. *J. Hazard. Mater.* **162**, 1330–1339 (2009)
7. Barragan M.J.L., Blaquez B., Zamarro M.T., Mancheno J.M., Garcia J.L., Diaz E., Carmona M.: BzdR, a repressor that controls the anaerobic catabolism of benzoate in *Azoarcus* sp. CIB, is the first member of a new subfamily of transcriptional regulators. *J. Biol. Chem.* **280**, 10683–10694 (2005)
8. Bedessem M.E., Swoboda-Colberg N.G., Colberg P.J.S.: Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 213–218 (1997)
9. Beller H.R., Spormann A.M., Sharma P.K., Cole J.R., Reinhard M.: Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1188–1196 (1996)
10. Beller H.R., Spormann A.M.: Anaerobic activation of toluene and *o*-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.* **179**, 670–676 (1997)
11. Blaquez B., Carmona M., Garcia J.L., Diaz E.: Identification and analysis of a glut aryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environ. Microbiol.* **10**, 474–482 (2008)
12. Boll M., Fuchs G., Heider J.: Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 604–611 (2002)
13. Boll M., Fuchs G.: Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**, 921–933 (1995)
14. Boll M.: Dearomatizing benzene ring reductases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 132–142 (2005)
15. Boll M.: Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalyzing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1701**, 34–50 (2005)
16. Botton S., Parsons J.R.: Degradation of BTEX compounds under iron-reducing conditions in contaminated aquifer microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 2630–2638 (2006)



17. Butler J.E., He Q., Nevin K.P., He Z., Zhou J., Lovley D.R.: Genomic and microarray analysis of aromatic degradation in *Geobacter metallireducens* and comparison to a *Geobacter* isolate from a contaminated field site. *BMC Genomics*, **8**, 180 (2007)
18. Carmona M., Diaz E.: Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Mol. Microbiol.* **58**, 1210–1215 (2005)
19. Carmona M., Zamarro M.T., Blazquea B., Durante-Rodriguez G., Juarez J.F., Valderrama J.A., Barragan M.J.L., Garcia J.L., Diaz E.: Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 71–133 (2009)
20. Chakraborty R., Coates J.D.: Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 437–446 (2004)
21. Chakraborty R., Coates J.D.: Hydroxylation and carboxylation – two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5427–5432 (2005)
22. Chakraborty R., O'Connor S.M., Chan E., Coates J.D.: Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8649–8655 (2005)
23. Chang B.V., Lu Z.J., Yuan S.Y.: Anaerobic degradation of nonylphenol in subtropical mangrove sediments. *J. Hazard. Mater.* **165**, 162–167 (2009)
24. Chang W., Um Y., Holoman T.R.P.: Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnol. Lett.* **28**, 425–430 (2006)
25. Chen K.F., Kao C.H.M., Chen C.H.W., Surampalli R.Y., Lee M.S.: Control of petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater by intrinsic and enhanced bioremediation. *J. Environ. Sci.* **22**, 846–871 (2010)
26. Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philp P., Lovley D.R.: Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3589–3593 (1997)
27. Coschigano P.W., Young L.Y.: Identification and sequence analysis of two regulatory genes involved in anaerobic toluene metabolism by strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 652–660 (1997)
28. de Vasconcellos S.P., Angolini C.F.F., Garcia I.N.S., Dellagnezze B.M., da Silva C.C., Marsaioli A.J., dos Santos Neto E.V., de Oliveira V.M.: Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from Brazilian petroleum reservoirs. *Org. Geochem.* **41**, 675–681 (2010)
29. Ding B., Schmeling S., Fuchs G.: Anaerobic metabolism of catechol by the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* – a result of promiscuous enzymes and regulators? *J. Bacteriol.* **190**, 1620–1630 (2008)
30. Dou J., Ding A., Liu X., Du Y., Deng D., Wang J.: Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. *J. Environ. Sci.* **22**, 709–715 (2010)
31. Duldhardt I., Nijehuis I., Schauer F., Heipieper H.J.: Anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Desulfococcus multivorans*, *Geobacter sulfurreducens* are more sensitive towards organic solvents than aerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 705–711 (2007)
32. Eglund P.G., Pelletier D.A., Dispensa M., Gibson J., Harwood C.S.: A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Microbiology*, **94**, 6484–6489 (1997)
33. Foght J.: Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospect. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 93–120 (2008)
34. Frazer A.C., Coschigano P.W., Young L.Y.: Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*, **1**, 293–303 (1995)
35. Fuchs G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *N.Y. Acad. Sci.* **1125**, 82–99 (2008)
36. Galushko A., Minz D., Schink B., Widdel F.: Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulphate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **1**, 514–420 (1999)
37. Genthner B.R.S., Townsend G.T., Lantz S.E., Mueller J.G.: Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**, 99–105 (1997)
38. Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 439–458 (1999)
39. Heider J., Fuchs G.: Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*, **3**, 1–22 (1997)
40. Heider J., G. Fuchs i wsp.: Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Arch. Microbiol.* **170**, 120–131 (1998)
41. Heider J., Spormann A.M., Beller H.R., Widdel F.: Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 459–473 (1999)
42. Hong Y., Gu J.D.: Bacterial anaerobic respiration and electron transfer relevant to the biotransformation of pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**, 973–980 (2009)
43. Karthikeyan R., Bhandari A.: Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. *J. Hazard. Subst. Res.* **3**, 1–19 (2001)
44. Krumins V., Park J.W., Son E.K., Rodenburg L.A., Kerkhof L.J., Haggblom M.M., Fennell D.E.: PCB dechlorination enhancement in Anacostia River sediment microcosms. *Water Res.* **43**, 4549–4558 (2009)
45. Kube M., Heider J., Amann J., Hufnagel P., Kuhner S., Beck A., Reinhardt R., Rabus R.: Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch. Microbiol.* **181**, 182–194 (2004)
46. Laempe D., Jahn M., Fuchs G.: 6-hydroxycyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA dehydrogenase and 6-oxocyclohex-1-ene-1-carbonyl-CoA hydrolase, enzymes of the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Eur. J. Biochem.* **263**, 420–429 (1999)
47. Leuthner B., HeiDER J.: Anaerobic toluene catabolism of *Thauera aromatica*: the *bbs* operon codes for enzymes of  $\beta$  oxidation of the intermediate benzylsuccinate. *J. Bacteriol.* **182**, 272–277 (2000)
48. Leutwein Ch., Heider J.: Anaerobic toluene-catabolic pathway in denitrifying *Thauera aromatica*: activation and  $\beta$ -oxidation of the first intermediate, (R)-(+)-benzylsuccinate. *Microbiology*, **145**, 3265–3271 (1999)
49. Leven L., Schnurer A.: Molecular characterization of two anaerobic phenol-degrading enrichment cultures. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* (2010), doi: 10.1016/j.ibiod.2010.04.009
50. Li C.H.H., Wong Y.S., Tam N.F.Y.: Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with amendment of iron(III) in mangrove sediment slurry. *Bioresour. Technol.* (2010), doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.005

51. Li T., Bisailon J.-G., Villemur R., Letourneau L., Bernerd K., Lepine F., Beaudet R.: Isolation and characterization of a new bacterium carboxylating phenol to benzoic acid under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* **178**, 2551–2558 (1996)
52. Luo H., Liu G., Zhang R., Jin S.: Phenol degradation in microbial fuel cells. *Chem. Eng. J.* **147**, 259–264 (2009)
53. McNally D.L., Mihelcic J.R., Lueking D.R.: Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 2633–2639 (1998)
54. Meckenstock R.U., Annweiler E., Michaelis W., Richnov H.H., Schink B.: Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2743–2747 (2000)
55. Morasch B., Annweiler E., Warthmann R.J., Meckenstock R.U.: The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: degradation of naphthalene, *o*-, and *m*-xylene by sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, **44**, 183–191 (2001)
56. Morasch B., Meckenstock R.U.: Anaerobic degradation of *p*-xylene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Curr. Microbiol.* **51**, 127–130 (2005)
57. Morasch B., Schink B., Tebbe C.C., Meckenstock R.U.: Degradation of *o*-xylene and *m*-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. *Arch. Microbiol.* **181**, 407–417 (2004)
58. Rabus R.: Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 580–587 (2005)
59. Rockne K.J., Chee-Sanford J.C., Sanford R.A., Hedlund B.P., Staley J.T., Strand S.E.: Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1595–1601 (2000)
60. Safinowski M., Meckenstock R.U.: Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environ. Microbiol.* **8**, 347–352 (2006)
61. Schie van P.M., Young L.Y.: Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2432–2438 (1998)
62. Silva I.S., Grossman M., Durrant L.R.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under micro aerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**, 224–229 (2009)
63. Tor J.M., Lovley D.R.: Anaerobic degradation of aromatic compounds couples to Fe(III) reduction by *Ferroglobus placidus*. *Environ. Microbiol.* **3**, 281–287 (2001)
64. Zhang X., Young L.Y.: Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4759–4764 (1997)