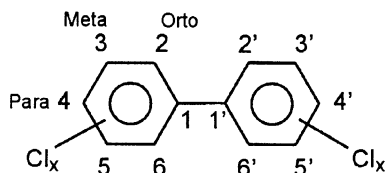


Katarzyna Piekarska

Biodegradacja polichlorowanych bifenyli przez zespół mikroorganizmów wyizolowanych z wody i gleby

Polichlorowane bifenyle (PCB) są związkami chemicznymi, których wytwarzanie na skalę przemysłową, w postaci mieszanin technicznych, rozpoczęto w 1929 r., przy czym znalazły one szerokie zastosowanie głównie jako płyny hydrauliczne, płyny chłodząco-izolujące w transformatorach i plastyfikatory w farbach. Częsteczką chlorobifenylu zbudowana jest z dwóch pierścieni fenylowych, w których jeden lub wszystkie dziesięć atomów wodoru zostały podstawione atomami chloru (rys. 1) [1].



Rys. 1. Wzór strukturalny polichlorowanych bifenyli

W latach 70. ubiegłego stulecia w wielu krajach rozpoczęto wprowadzanie ograniczeń w stosowaniu tych związków. Skala zagrożeń wynikająca z obecności tych związków w środowisku naturalnym spowodowała powstanie narodowych i międzynarodowych programów dotyczących zakazu ich produkcji, odzyskiwania oraz ich bezpiecznej utylizacji [2]. Odkryto niezwykle trwałość polichlorowanych bifenyli oraz ich zdolność do rozprzestrzeniania, w skali globalnej, w poszczególnych elementach środowiska naturalnego. Obecność PCB stwierdzono w żywności oraz w organizmach wielu gatunków zwierząt zajmujących końcowe ogniwa łańcucha pokarmowego, z organizmem człowieka włącznie [3]. PCB są wchłaniane z przewodu pokarmowego lub przez skórę i mogą się gromadzić w tkance tłuszczowej, wątrobie i tkance mięśniowej. Te silnie toksyczne związki zakłócają pracę układu immunologicznego, wewnątrzwydzielniczego i nerwowego. Ponadto zostały sklasyfikowane jako substancje rakotwórcze przez Agencję Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (US EPA) i Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC). Chlorobifenyle mogą także stymulować aktywność enzymów, głównie monoooksygenaz, metabolizujących ksenobiotyki, powodując tym samym zjawisko obniżania lub potęgowania kancerogenności znanych kancerogenów w momencie gdy oba te związki zostały wprowadzone do organizmu w tym samym czasie [4].

Polichlorowane bifenyle są związkami bardzo opornymi na rozkład zarówno pod wpływem czynników fizycznych, chemicznych jak i biologicznych. Od pewnego czasu coraz więcej uwagi poświęca się degradacji tych związków na drodze

mikrobiologicznej. Proces ich biodegradacji w środowisku naturalnym jest niezwykle złożony, a o jego przebiegu decyduje wiele czynników biotycznych i abiotycznych. Zależny jest w pierwszym rzędzie od dostępności chlorobifenylu dla mikroorganizmów i ich metabolicznych możliwości [5].

Zdolność do rozkładu chlorowanych związków organicznych jest szeroko rozpowszechniona wśród bakterii i niektórych grzybów. Jednakże niewielka ilość mikroorganizmów zdolna jest do całkowitej mineralizacji PCB. Wśród mikroorganizmów, które włączają w swoje szlaki metaboliczne polichlorowane bifenyle znajdują się między innymi bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* oraz grzyby *Phanerochaete chrysosporium* [6]. Biodegradacja chlorobifenylu może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Systemy enzymatyczne uczestniczące w rozkładzie chlorobifenylu kodowane są w tych mikroorganizmach na poziomie chromosomalnego i plazmidowego DNA. Wydajność tego procesu zależy od wysycenia cząsteczek chlorem. Związki silnie zchlorowane są bardzo słabo rozkładane na drodze mikrobiologicznej. Bardzo często w warunkach beztlenowych, np. w osadach dennych, dochodzi do procesów odchlorowania, a następnie już w warunkach tlenowych do biodegradacji związków o mniejszej zawartości chloru w cząsteczce [7]. W ten sposób dzięki kolejno po sobie następującym reakcjom, katalizowanym przez różne grupy drobnoustrojów, może nastąpić pełny rozkład tych związków. Ponadto związki słabo rozpuszczalne w wodzie, do których należą PCB, mogą być wykorzystywane przez mikroorganizmy jedynie w stanie zdyspergowanym, gdyż proces biodegradacji zachodzi na granicy fazy wodnej i chlorobifenylowej [8].

Biodegradacja chlorowanych związków aromatycznych polega na przetworzeniu szkieletu węglowego w metabolity pośrednie, z jednoczesnym przetworzeniem chlorowca organicznego w mineralny. Kluczowym momentem w degradacji takiego związku jest usunięcie podstawnika chlorowego. Może ono nastąpić we wczesnym stadium rozkładu, w warunkach beztlenowych (zastąpienie w pierścieniu aromatycznym chlorowca przez wodór) lub później – w warunkach tlenowych, po rozerwaniu pierścienia aromatycznego. Pierwszym etapem aerobowej biodegradacji PCB jest wprowadzenie grup hydroksylowych do pierścienia katalizowane przez dioksygenazy. Pierwszy etap tego szlaku metabolicznego, w którym uczestniczą dioksygenazy, dehydrogenazy i hydrolazy, przekształca chlorowane bifenyle, poprzez odpowiednie chlorowane hydroksybifenyle, do kwasu chlorobenzoowego. Pozostałe etapy rozkładu przypominają biodegradację aromatycznych węglowodorów [9–11].

Badania wykazały, że szlaki kataboliczne związków aromatycznych znacznie różnią się zarówno sposobami rozszczepienia pierścienia, jak i reakcjami wstępnymi prowadzącymi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego. W wypadku niektórych bakterii nawet faza wzrostu oraz warunki hodowli mogą decydować o tym, czy powstaną enzymy katalizujące rozszczepienie typu orto, czy typu meta. Dlatego bardzo ważną sprawą jest dobór odpowiednich warunków (napowietrzanie, temperatura, pH, zasolenie, dostępność substratów węglowych i PCB, współzawodnictwo z innymi mikroorganizmami i obecność zanieczyszczeń toksycznych), w jakich przeprowadza się proces biodegradacji PCB [12]. Ponadto, powstałe metabolity procesu rozkładu mogą stanowić zagrożenie, gdyż możliwa jest zmiana ich właściwości toksykodynamicznych w stosunku do związków wyjściowych. Dlatego wskazane jest śledzenie obecności i aktywności biologicznej powstających w środowisku produktów biodegradacji [13].

Cel i metodyka badań

Celem pracy była izolacja aktywnych szczepów drobnoustrojów z zanieczyszczonych środowisk oraz badania nad możliwością tlenowej biodegradacji przez nie polichlorowanych bifenyli zawartych w preparacie technicznym Aroclor 1242. Wyniki badań posłużą w przyszłości do konstrukcji szczepionek mikrobiologicznych, złożonych z wysokoaktywnych mikroorganizmów, mających zastosowanie w biologicznych procesach oczyszczania wód i gruntów z PCB.

Przedmiotem badań był preparat Aroclor 1242, zawierający w swoim składzie najwięcej, bo aż 45% (wag.) trichlorobifenyli, następnie 31% tetrachlorobifenyli, 13% dichlorobifenyli, 10% pentachlorobifenyli oraz 1% monochlorobifenyli.

Mikroorganizmy rozkładające PCB wyizolowano z gleby i wody zanieczyszczonej tymi substancjami. Do 90 cm³ roztworu fizjologicznego dodano 10 g gleby i wytrząsano przez 30 min. Następnie, po sedymentacji, dokonano posiewu cieczy nadosadowej na agar odżywczy i na zagaryzowane podłoże mineralne Śiškiny-Trocenko pokryte cienkim filmem preparatu Aroclor 1242. Próbkę wody posiano bezpośrednio na te same podłoża. Agar zastosowano w celu izolacji jak największej ilości drobnoustrojów, a podłoże mineralne z dodatkiem preparatu Aroclor 1242 do izolacji mikroorganizmów zdolnych do wykorzystywania chlorobifenyli jako jedyne źródła węgla i energii. Wyizolowane szczepy wielokrotnie pasażowano używając na przemian wyżej wymienionych podłoży. W ten sposób uzyskano kultury bakteryjne zaadaptowane do rozkładu PCB. Wyizolowane szczepy mikroorganizmów poddano dalszym badaniom morfologicznym, fizjologicznym i biochemicznym w celu określenia ich przynależności taksonomicznej [14].

Ocenę zdolności drobnoustrojów do rozkładu PCB przeprowadzono na płynnym podłożu mineralnym Śiškiny-Trocenko z dodatkiem preparatu Aroclor 1242, jako jedyne źródła węgla i energii. Hodowle przeprowadzono w sterylnych kolbach o pojemności 500 cm³. Do kolb wprowadzono 200 cm³ podłoża mineralnego, 0,4 mg preparatu Aroclor 1242 oraz 2 cm³ zaszczepu bakteryjnego o absorbancji równej 0,4, zmierzonej przy długości fali 460 nm. Kolby umieszczono na wytrząsarce i prowadzono hodowlę przez 47 dób w temperaturze pokojowej. Kontrolę przebiegu procesu chemooksydacji przeprowadzono w kolbach zawierających te same składniki, lecz pozbawionych mikroorganizmów.

W toku badań laboratoryjnych w hodowlach oznaczono ogólną liczbę bakterii, gęstość optyczną przy długości fali 460 nm [15], aktywność dehydrogenazową biomasy [16], zużycie tlenu przy pomocy bezręciowego systemu pomiaru Oxi Top [17], stężenie jonów chlorkowych (wobec podłoża mineralnego stosowanego w badaniach) [18] i absorpcję promieniowania UV przy długości fali 254 nm.

Równolegle przeprowadzono także eksperyment mający na celu określenie stopnia ubytku PCB. Eksperyment ten przeprowadzono w hodowlach zawierających takie samo stężenie PCB i taką samą ilość zaszczepu, jak w próbkach opisanych powyżej. Kontrolę stanowiły pożywki zawierające preparat Aroclor 1242 nie zaszczepione bakteriami. Po zakończeniu doświadczenia wszystkie hodowle ekstrahowano 2 cm³ n-heksanu, który zawierał wzorzec wewnętrzny – kongener 209. Następnie zbierano frakcję heksanową i po jej odwodnieniu bezwodnym siarczanem sodu podawano w ilości 2 µl ręcznie mikrostrzykawką do dozownika chromatografu gazowego 504 M firmy ELWRO z selektywnym względem związków chloroorganicznych detektorem ECD. W analizach posłużono się zmodyfikowaną metodyką analityczną opisaną w normie EPA 608, opierającą się na analizie podobieństw sygnałów analitycznych badanej próbki i próbek wzorcowego preparatu Aroclor 1242 o określonym stężeniu. Oznaczenie ilościowe PCB, według tej metody, polega na odniesieniu sumarycznego stężenia sygnałów w badanej próbce do sumy sygnałów wzorca o określonym stężeniu. W oznaczeniach ilościowych wykorzystano tylko część sygnałów pochodzących od tej części kongenerów (nr 28, 52, 101, 118, 153, 138 i 180), których udział procentowy w preparacie Aroclor 1242 był największy.

Po 20 i 47 dobach inkubacji mikroorganizmów z PCB zbadano potencjalne właściwości mutagenne produktów pobiodegradacyjnych metodą testu Ames [19]. Metoda testu Ames opiera się na sprawdzeniu, czy badany materiał powoduje mutację powrotną (rewersję) specjalnych, histydynozależnych szczepów testowych bakterii *Salmonella typhimurium*. Za mutagenne uznaje się próby, które wywołują reversję przynajmniej dwukrotnie wyższą od reversji spontanicznej, czyli gdy wskaźnik mutagenności – MR (stosunek liczby rewertantów indukowanych do liczby rewertantów spontanicznych) jest większy lub równy 2. Do badań zastosowano szczepy testowe *Salmonella typhimurium* TA98 i TA 100 (Ames Laboratory Department of Biochemistry of California). Test wykonano z dodatkiem i bez dodatku aktywatora metabolicznego, czyli frakcji S-9 otrzymywanej z homogenatu wątroby szczura, stosowanej do przemiany promutagenów w mutageny. Na płytkę wprowadzono próbki pochodzące z hodowli uprzednio ekstrahowane heksanem i po odparowaniu rozpuszczalnika zawieszono w DMSO tak, że 1 cm³ DMSO zawierał produkty pobiodegradacyjne z 0,3 mg PCB. Badaniom testem Ames poddano także próbki pochodzące z kontroli przebiegu chemooksydacji oraz wyjściowy preparat Aroclor 1242.

Dyskusja wyników badań

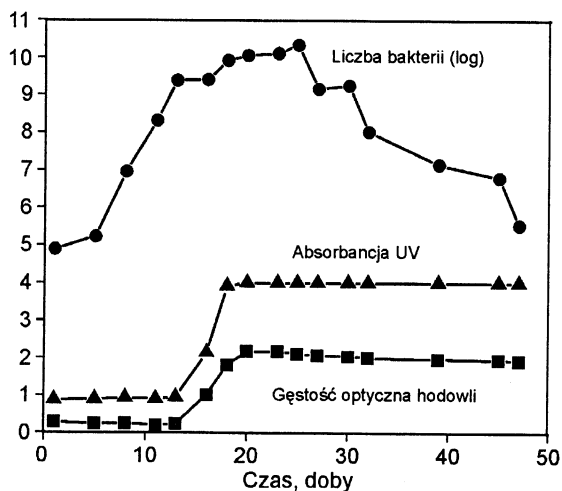
Z zanieczyszczonej chlorobifenyłami wody i gleby wyizolowano 9 szczepów drobnoustrojów. Badania diagnostyczne wykazały przynależność szczepów do rodzajów *Micrococcus* (1 szczep), *Alcaligenes* (2 szczepy), *Arthrobacter* (2 szczepy), *Pseudomonas* (2 szczepy), *Rhodotorula* (1 szczep) i *Candida* (1 szczep). Wszystkie wyżej wymienione szczepy wykazywały zdolność do wzrostu na podłożu stałym mineralnym z dodatkiem preparatu Aroclor 1242, jako jedyne źródła węgla i energii. Najlepszym wzrostem na tym podłożu odznaczały

się cztery szczepy, tj. *Micrococcus* 1, *Arthrobacter* 2 i 5' oraz *Pseudomonas* 3. Z tego też względu one zostały wybrane do dalszych badań.

Następnym etapem była ocena zdolności do rozmnażania, w warunkach hodowli płynnej stacjonarnej, mieszananej kultury bakterii złożonej z czterech szczepów odznaczających się dobrym wzrostem na podłożu stałym mineralnym z dodatkiem chlorobifenyli, jako jedynej źródła węgla i energii. Pozostałe hodowle zawierały pojedyncze te same drobnoustroje. I tak w hodowli drugiej znajdował się szczep *Micrococcus* 1, w trzeciej *Arthrobacter* 2, w czwartej *Pseudomonas* 3, a w piątej *Arthrobacter* 5'.

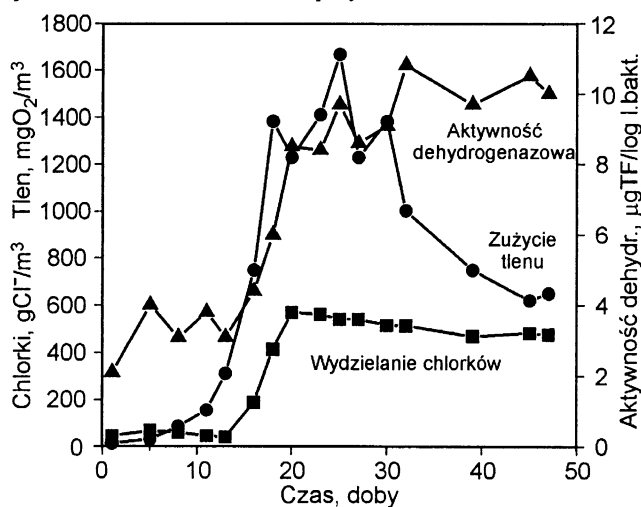
Rysunki 2, 4, 6, 8 i 10 obrazują przebieg krzywych dotyczących wzrostu wybranych szczepów i ich mieszaniny w postaci pomiaru gęstości optycznej i logarytmu liczby bakterii w 1 cm³ hodowli, jak również zmieniającą się w czasie absorpcję promieniowania UV (świadcząca o pojawianiu się związków aromatycznych w płynach hodowlanych), natomiast rysunki 3, 5, 7, 9 i 11 przedstawiają aktywność dehydrogenazową biomasy, zużycie przez nią tlenu oraz jej właściwości dehalogenujące wyrażone jako stężenie jonów chlorkowych w płynie hodowlanym.

Dla większości badanych kultur nie zaobserwowano negatywnego wpływu preparatu Aroclor 1242 na ich liczebność. Jedynie w początkowej fazie badań obserwowano w hodowli szczepu *Micrococcus* 1 znaczny spadek liczby drobnoustrojów (rys. 4). Zmniejszenie liczby komórek drobnoustrojów, choć już nie tak duże, było widoczne także w hodowli z *Pseudomonas* 3 (rys. 8), jak również w hodowli z *Arthrobacter* 5' (rys. 10), po początkowym rozmnożeniu się szczepu. We wszystkich hodowlach obserwowano przebieg rozwoju drobnoustrojów typowy dla hodowli statycznej. Z wykresów widać, że mikroorganizmy w większości przypadków po pięciu dobach trwania doświadczenia weszły w fazę logarytmicznego wzrostu, jedynie w hodowli z *Arthrobacter* 5' (rys. 10) zjawisko to miało miejsce po około 10 dobach. Faza względnej równowagi trwała od 10÷15 doby do 30÷35 doby. Największy spadek liczby komórek po tym czasie był widoczny w hodowli z *Micrococcus* 1 (rys. 4). Największą zdolność do rozmnażania się w obecności badanych związków obserwowano w przypadku mieszaniny szczepów oraz w hodowlach z *Arthrobacter* 2 (rys. 6) i *Pseudomonas* 3 (rys. 8), a najmniejszą w hodowli z *Micrococcus* 1 (rys. 6).

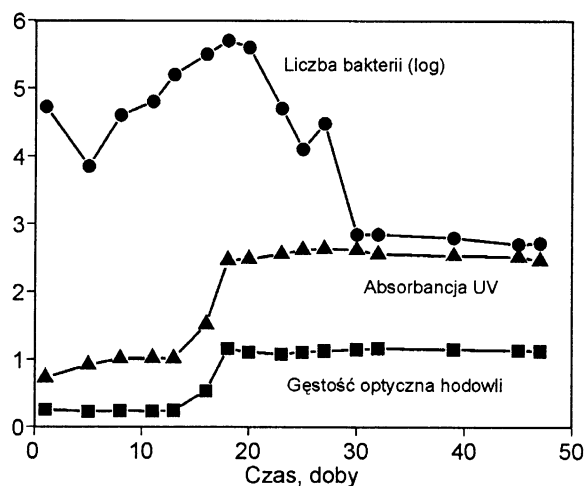


Rys. 2. Wzrost mieszanej kultury bakterii w obecności preparatu Aroclor 1242

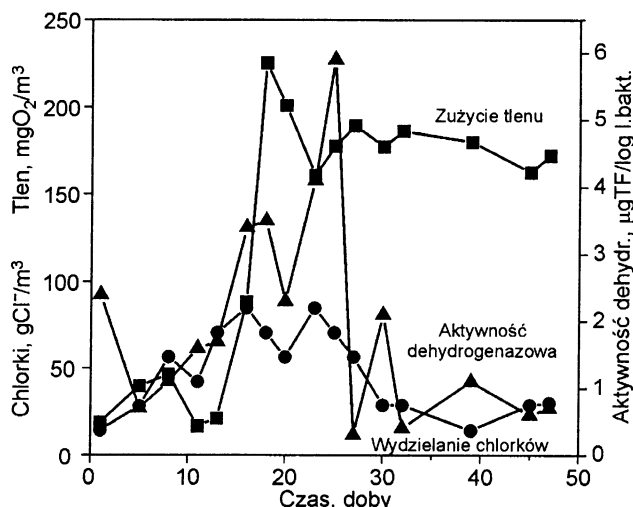
Przebiegi krzywych obrazujących zmianę gęstości optycznych płynów hodowlanych były bardzo podobne w każdym przypadku i potwierdzały powyższe spostrzeżenia. Po początkowym utrzymywaniu się stałej wartości ekstynkcji obserwowano jej wzrost około 15÷20 doby badań, a następnie stały jej poziom do końca trwania eksperymentu.



Rys. 3. Zmiany parametrów podczas wzrostu mieszanej kultury bakterii w obecności preparatu Aroclor 1242

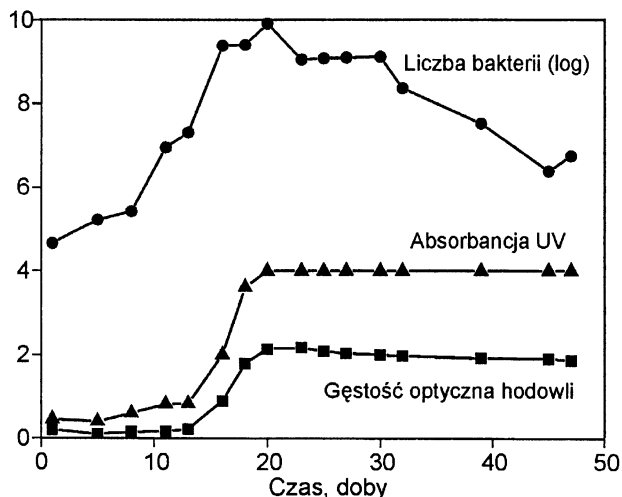


Rys. 4. Wzrost szczepu *Micrococcus* 1 w obecności preparatu Aroclor 1242

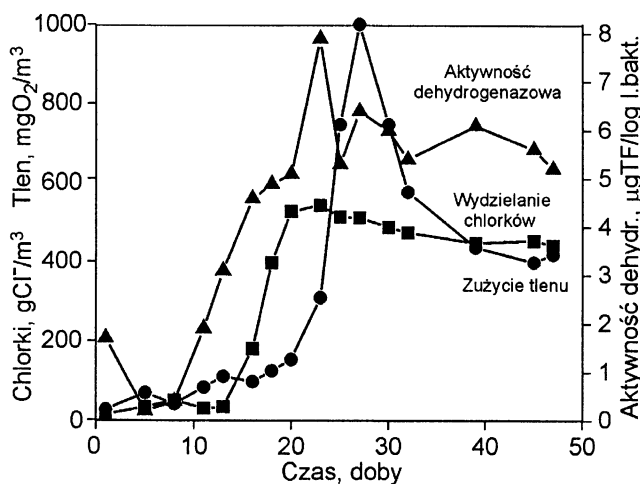


Rys. 5. Zmiany parametrów podczas wzrostu szczepu *Micrococcus* 1 w obecności preparatu Aroclor 1242

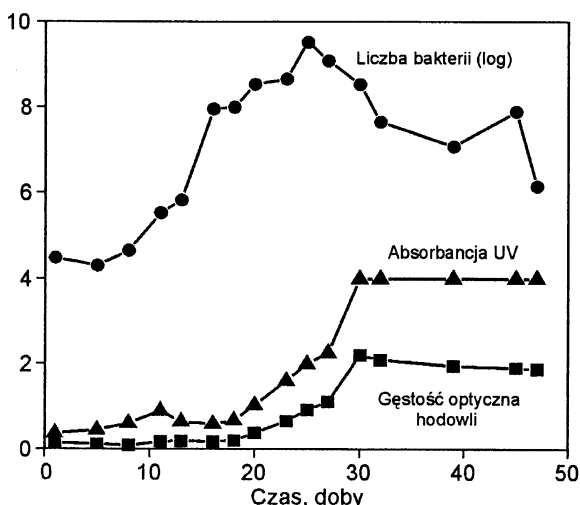
W wypadku tych badań nie obserwowano znacznych wahań wartości, bowiem metodą tą mierzy się zarówno zawartość żywych jak i martwych komórek w hodowlach. Największe wartości gęstości optycznej zaobserwowano dla mieszanej kultury mikroorganizmów, a najmniejsze dla hodowli z *Micrococcus* 1.



Rys. 6. Wzrost szczepu *Arthrobacter* 2 w obecności preparatu Aroclor 1242

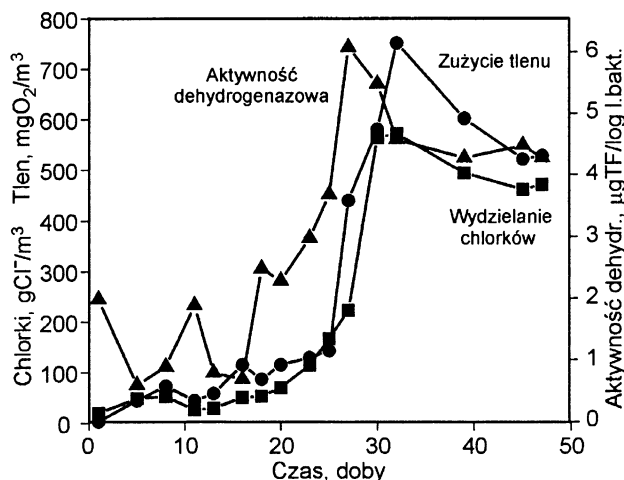


Rys. 7. Zmiany parametrów podczas wzrostu szczepu *Arthrobacter* 2 w obecności preparatu Aroclor 1242

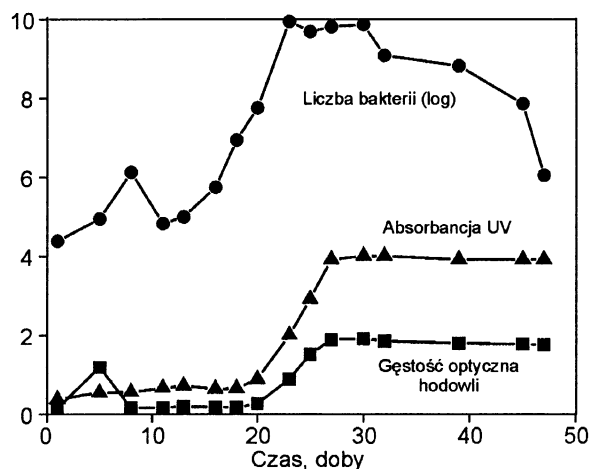


Rys. 8. Wzrost szczepu *Pseudomonas* 3 w obecności preparatu Aroclor 1242

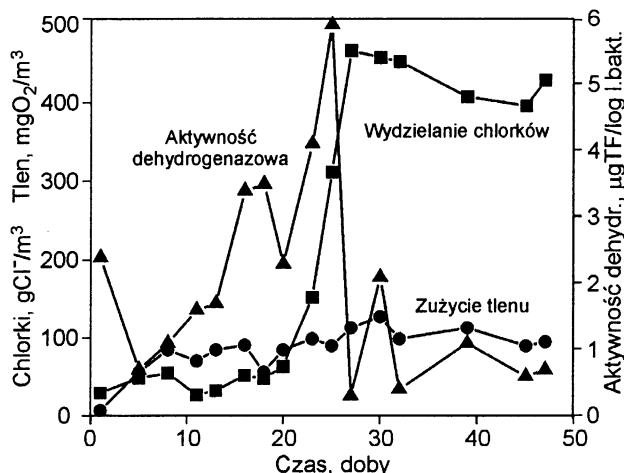
Bardzo podobnie kształtowały się wartości absorpcji promieniowania UV. We wszystkich hodowlach widoczny był wzrost wartości ekstynkcji, przy długości fali 254 nm, utrzymujących się na mniej więcej stałym poziomie we wszystkich hodowlach do końca badań. Taki przebieg krzywych może świadczyć o pojawieniu się w hodowlach związków aromatycznych, które są metabolitami pośrednimi w biodegradacji polichlorowanych bifenyli.



Rys. 9. Zmiany parametrów podczas wzrostu szczepu *Pseudomonas* 3 w obecności preparatu Aroclor 1242



Rys. 10. Wzrost szczepu *Arthrobacter* 5' w obecności preparatu Aroclor 1242



Rys. 11. Zmiany parametrów podczas wzrostu szczepu *Arthrobacter* 5' w obecności preparatu Aroclor 1242

Tabela 1. Ubytek PCB w hodowlach po 47 dobach (oznaczony metodą chromatografii gazowej)

Rodzaj próbki	Stężenie wzorcowych kongenerów, µg/100 cm ³							
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180	Ubytek, %
Kultura mieszana	8,855	2,393	1,943	0,583	0,621	0,086	0,033	72,0
<i>Micrococcus</i> 1	29,324	8,542	8,314	1,021	1,207	0,150	0,084	5,4
<i>Arthrobacter</i> 2	13,022	3,548	2,725	0,511	0,801	0,079	0,000	60,0
<i>Pseudomonas</i> 3	17,493	3,864	2,305	0,618	0,743	0,512	0,044	50,6
<i>Arthrobacter</i> 5'	20,288	7,559	8,068	0,562	0,702	0,275	0,039	27,5
Aroclor 1242 (kontrola chemooksydacji)	31,516	8,976	8,463	1,117	1,411	0,158	0,096	0,0

Dynamika wzrostu mikroorganizmów w poszczególnych hodowlach znalazła swoje odzwierciedlenie w ich właściwościach dehalogenujących, w zużyciu tlenu oraz w poziomie aktywności dehydrogenazowej (rys. 3, 5, 7, 9 i 11).

Wszystkie badane szczepy wykazały się zdolnością do odłączania atomów chloru od badanych substratów. W większości hodowli po okresie niskiego stężenia jonów chlorkowych w płynach hodowlanych, około 15–20 doby badań, następował intensywny wzrost stężenia tych jonów, który następnie utrzymywał się na mniej więcej tym samym, wysokim poziomie do końca badań. Jedynie w przypadku hodowli z *Micrococcus* 1 (rys. 5) zaobserwowano niskie wartości tego parametru oraz jego znaczne wahania. Około piątej doby zanotowano wzrost stężenia jonów chlorkowych, następnie spadek oraz ponowny duży wzrost około 15 doby i ponowny spadek około 18 doby trwania eksperymentu. Od 25 doby stężenie jonów chlorkowych w tej hodowli ustabilizowało się na mniej więcej jednakowym poziomie. Wyjaśnienie zaobserwowanych znacznych wahań wartości stężeń jonów chlorkowych wymaga dalszych badań. Najlepszymi właściwościami dehalogenującymi wykazała się mieszanina drobnoustrojów (rys. 3) oraz szczepy *Arthrobacter* 2 (rys. 7), *Pseudomonas* 3 (rys. 9), *Arthrobacter* 5' (rys. 11).

Wyniki badań respirometrycznych oraz enzymatycznych przedstawiały się podobnie. Także w tych badaniach odnotowano znaczący wzrost wartości po 10+15 dobach. W wypadku badań respirometrycznych zaobserwowano stały wzrost zużycia tlenu przez mikroorganizmy od początku trwania eksperymentu. Inaczej sytuacja przedstawiała się w badaniach enzymatycznych. Wartości aktywności dehydrogenazowej kultury mieszanej uległy większym zmianom, a w wypadku hodowli pojedynczych szczepów odnotowano znaczny spadek ich wartości na początku badań. Po około 30 dobach zużycie tlenu i aktywność dehydrogenazowa spadała we wszystkich hodowlach, jedynie w wypadku mieszanej kultury poziom aktywności badanego enzymu utrzymywał się dalej na wysokim poziomie. Największe zużycie tlenu oraz najwyższy poziom aktywności dehydrogenazowej obserwowano dla mieszaniny bakterii (rys. 3) oraz dla hodowli z *Arthrobacter* 2 (rys. 7) i *Pseudomonas* 3 (rys. 9). Najniższe wartości zanotowano dla hodowli z *Arthrobacter* 5' (rys. 11) oraz z *Micrococcus* 1 (rys. 5). Dla tej ostatniej obserwowano także znaczne fluktuacje omawianych wartości w ciągu całego czasu trwania badań.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki badań dotyczących skuteczności rozkładu PCB przez mieszaną kulturę bakterii oraz przez pojedyncze wybrane szczepy, w odniesieniu do próbki zawierającej Aroclor 1242 nie zaszczipionej bakteriami (kontrola chemooksydacji). Badania wykonano przy pomocy

Tabela 2. Wyniki testu Ames na szczepach TA 98 i TA 100 dla preparatu Aroclor 1242

Masa próbki na płytkę mg	Współczynnik mutagenności (MR)			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
1	0,62	0,52	0,4	0,76
0,5	0,71	0,68	0,8	0,89
0,25	0,94	0,96	0,92	1,0
0,125	0,95	1,05	1,10	0,98

Tabela 3. Wyniki testu Ames na szczepie TA 98 dla preparatu Aroclor 1242

Objętość próbki na płytkę cm ³	Masa próbki na płytkę mg	Współczynnik mutagenności (MR)	
		-S9	+S9
0,1	0,6	0,67	0,79
0,01	0,06	0,52	0,9
0,001	0,006	3,45	1,31
0,0001	0,0006	0,64	0,96
0,00001	0,00006	0,85	1,44
0,000001	0,000006	0,64	1,2

chromatografu gazowego z selektywnym względem związków chloroorganicznych dedektorem ECD.

Największy ubytek PCB (ok. 72,0%) odnotowano dla mieszanej kultury drobnoustrojów i 60,0% dla hodowli szczepu *Arthrobacter* 2. Najniższą aktywnością biodegradacyjną wykazał się szczep *Micrococcus* 1 – 5,4%. Pozostałe szczepy biodegradowały polichlorowane bifenyle na poziomie 27,5% (*Arthrobacter* 5') i 50,6% (*Pseudomonas* 3).

W trakcie przemian metabolicznych tak wielu związków wchodzących w skład badanej serii preparatów mogą powstać substancje o charakterze mutagennym i toksycznym. Dlatego też bardzo ważnym zagadnieniem, które wiąże się z procesem biodegradacji Arocloru, jest ocena genotoksyczności i toksyczności jego składników, oraz produktów jego biologicznego rozkładu. Powstanie związków o takim charakterze uniemożliwia bowiem zastosowanie badanego szczepu w praktyce.

Właściwości genotoksyczne preparatu Aroclor 1242 oraz metabolitów powstających w procesie biodegradacji analizowano testem Ames. Wyniki tych badań przedstawiono w tabelach 2, 3 i 4 w postaci współczynnika mutagenności. W przeprowadzonym teście nie wykazano obecności związków o charakterze mutagennym i rakotwórczym w preparacie handlowym Aroclor 1242 (tab. 2 i 3). Jest to wynik zgodny z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Do tej pory

Tabela 4. Wyniki testu Amesa na szczepie TA 98 dla ekstraktów pobiodegradacyjnych preparatu Aroclor 1242

Próbka	Objętość próbki na płytkę cm ³	Masa próbki na płytkę mg	Współczynnik mutagenności (MR)			
			po 20 dobach		po 47 dobach	
			-S9	+S9	-S9	+S9
Kultura mieszana	0,1	0,03	0,07	1,62	1,68	1,54
	0,01	0,003	0,21	1,15	0,76	1,25
	0,001	0,0003	0,81	1,29	0,9	1,08
	0,0001	0,00003	0,21	1,23	0,96	1,29
	0,00001	0,000003	0,74	1,37	0,63	1,31
	0,000001	0,0000003	0,64	-	-	-
<i>Micrococcus</i> 1	0,1	0,03	0,33	1,21	1,06	1,21
	0,01	0,003	0,27	1,25	1,07	1,58
	0,001	0,0003	0,73	1,1	0,4	1,77
	0,0001	0,00003	0,99	1,37	1,07	1,25
	0,00001	0,000003	0,76	1,13	0,63	1,56
	0,000001	0,0000003	0,96	-	-	-
<i>Arthrobacter</i> 2	0,1	0,03	0,39	1,21	0,57	2,31
	0,01	0,003	1,15	1,67	0,69	1,4
	0,001	0,0003	0,69	1,1	0,87	1,35
	0,0001	0,00003	0,81	1,81	0,76	1,42
	0,00001	0,000003	0,82	1,75	0,76	1,5
<i>Pseudomonas</i> 3	0,1	0,03	0,82	1,19	0,9	1,9
	0,01	0,003	0,72	0,87	0,75	1,56
	0,001	0,0003	0,91	0,83	0,64	1,65
	0,0001	0,00003	0,82	1,46	0,9	1,58
	0,00001	0,000003	0,88	1,27	0,82	2,02
<i>Arthrobacter</i> 5'	0,1	0,03	1,19	1,02	2,7	1,69
	0,01	0,003	0,75	1,12	0,85	2,04
	0,001	0,0003	0,58	0,88	0,94	1,23
	0,0001	0,00003	0,7	1,15	0,66	1,38
	0,00001	0,000003	1,06	0,88	0,79	1,31
Aroclor 1242 (kontrola chemooksydacji)	0,1	0,03	-	-	0,97	1,13
	0,01	0,003	-	-	0,8	0,81
	0,001	0,0003	-	-	0,9	1,33
	0,0001	0,00003	-	-	1,13	1,33
	0,00001	0,000003	-	-	1,13	0,98

brak jest bowiem przekonywujących dowodów na indukcję przez chlorobifenyle mutacji punktowych u *Salmonella typhimurium* [1]. Podobny efekt uzyskano w przypadku ekstraktów pobiodegradacyjnych (tab. 4). Testem Amesa przebadano produkty pobiodegradacyjne po 20 i 47 dobach prowadzenia eksperymentu. Jedynie w czterech wypadkach, po 47 dobach hodowli, wynik testu okazał się pozytywny. Dla ekstraktu pochodzącego z hodowli szczepu *Arthrobacter* 5' uzyskano dwa wyniki dodatnie zarówno dla testu prowadzonego bez frakcji jak i z frakcją S9 (ilość próbki na płytkę 0,03 mg oraz 0,003 mg). Dwa następne wyniki pozytywne odnotowano w testach przeprowadzonych z frakcją dla produktów pobiodegradacyjnych szczepu *Arthrobacter* 2 (ilość próbki na płytkę 0,03 mg) i szczepu *Pseudomonas* 3 (ilość próbki na płytkę 0,000003 mg). Wartości współczynnika mutagenności uzyskane w teście wykonywanym bez frakcji były zwykle niższe lub dużo niższe od wyników uzyskanych w testach z frakcją, często poniżej wartości 0,5 dla dużego

zateżenia próby wprowadzanej na płytkę. Wyniki takie sugerują możliwość toksycznego działania substancji zawartych w próbach na organizmy testowe.

Wnioski

♦ Z wody i gleby zanieczyszczonej chlorobifenylami wyizolowano szczepy drobnoustrojów zdolnych do rozkładu składników preparatu Aroclor 1242, zawierającego polichlorowane bifenyle. Szczepy te należały do rodzajów *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Rhodotorula* i *Candida*. Największą wydajność rozkładu PCB (72,0%) uzyskano w wypadku zastosowania mieszanej kultury składającej się ze szczepów *Micrococcus* 1, *Arthrobacter* 2 i 5' oraz *Pseudomonas* 3. Pojedyncze, wyizolowane szczepy mikroorganizmów rozkładały PCB z wydajnością od 5,4% do 60,0%.

◆ Najwyższą zdolnością biodegradacyjną odznaczały się szczepy *Arthrobacter* 2 (60,0% ubytku PCB z hodowli) oraz *Pseudomonas* 3 (50,6% ubytku PCB z hodowli), natomiast najniższą zdolność biodegradacyjną zaobserwowano dla szczepu *Micrococcus* 1 (5,4% ubytku PCB z hodowli).

◆ Badania mikrobiologiczne (ogólna liczba bakterii oraz gęstość optyczna płynów hodowlanych), biochemiczne (aktywność dehydrogenazowa biomasy oraz zużycie tlenu) i chemiczne (stężenie jonów chlorkowych w płynach hodowlanych i absorbancja UV płynów hodowlanych) potwierdziły wysoką aktywność biodegradacyjną badanych szczepów w stosunku do polichlorowanych bifenyli. Najwyższe wartości badanych parametrów uzyskano dla mieszanej kultury mikroorganizmów oraz szczepów *Arthrobacter* 2 i *Pseudomonas* 3, a najniższe wartości odnotowano dla hodowli ze szczepem *Micrococcus* 1.

◆ Badania genotoksyczności powstających metabolitów biodegradacji wykazały w większości ekstraktów pobio-degradacyjnych brak związków o charakterze mutagennym i rakotwórczym. Wyniki pozytywne uzyskano jedynie w czterech wypadkach, co dowodzi konieczności monitorowania produktów rozkładu PCB pod tym kątem, gdyż powstawanie w trakcie procesu biodegradacji związków o działaniu genotoksycznym uniemożliwia zastosowanie szczepów w procesach bioremediacji.

Praca została sfinansowana przez Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska.

LITERATURA

1. J. FALANDYSZ: Polichlorowane bifenyle (PCBs) w środowisku. Chemia, analiza, toksyczność, stężenie i ocena ryzyka. Wyd. Fundacji Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 1999.
2. P. MASTALERZ: Organiczne związki fluorowców w biosferze. Wiadomości chemiczne, 1995, nr 49, ss. 117–135.
3. S. SAFE, L. SAFE, M. MULLIN: Polychlorinated Biphenyls. Environmental Occurrence and Analysis, Environmental Toxin Series, Springer-Verlag, Berlin 1987.
4. A. SADOWSKA, G. OBIDOSKA, M. RUMOWSKA: Ekotoksykologia. Toksyczne czynniki środowiskowe i metody ich wykrywania. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2000.
5. F. KASTANEK, K. DEMNEROVA, J. PAZLAROVA, J. BURKHARD, Y. MALETEROVA: Biodegradation of polychlorinated hydrocarbons in contaminated soils and ground water in field condition. International Biodegradation and Biodegradation, 1999, No. 44, pp. 39–47.
6. I. SINGLETON: Microbial metabolism of xenobiotics. Fundamental and Applied Research. J. Chem Tech Biotechnol, 1994, No. 59, pp. 9–23.
7. W. R. ABRAHAM, B. NOGALES, P. N. GOLYSHIN, D. H. PIEPER, K. N. TIMMIS: Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soil and sediments. Current Opinion in Microbiology, 2002, No. 5, pp. 246–253.
8. K. A. BILLINGSLEY, S. M. BACKUS, O. P. WARD: Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB400. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, No. 52, pp. 255–260.
9. S. ŁABUŹEK: Biodegradacja struktury aromatycznej fenoli przez drobnoustroje. Biotechnologia, 1991, nr 3–4(13–14), ss. 90–101.
10. C. MHIRI, N. TANDEAU DE MARSAC: Rehabilitation par les microorganismes de sites contenant du pyralene: problematique et perspectives d'étude. Bull. Inst. Pasteur, 1997, No. 95, pp. 3–28.
11. J. WIEGEL, Q. WU: Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls: mini review. FEMS Microbiology Ecology, 2000, Vol. 32, pp. 1–15.
12. M. SEEGER, K. N. TIMMS, B. HOFER: Bacterial pathways for the degradation of polychlorinated biphenyls, Marine Chemistry, 1997, No. 58, pp. 327–333.
13. L. C. HANSEN: Environmental Toxicology of Polychlorinated Biphenyls. Environmental Toxin Series. Springer-Verlag, Berlin 1987.
14. BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology. Eighth Edition, R. E. Buchanan and N. E. Gibbons co-Editors, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1974.
15. M. PAWLACZYK-SZPIŁOWA: Ćwiczenia z mikrobiologii wody i ścieków. PWN, Warszawa 1980.
16. A. KLAPWIJK, J. DRENT, J. H. A. STEENVOORDEN: A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated sludge. Water Research, 1974, No. 8, pp. 121–125.
17. Instrukcja obsługi bezręciowego systemu pomiarowego Oxi Top firmy WTW. P.H.U. POL-EKO-APARATURA, Wodzisław Śląski.
18. J. G. BERGMAN, J. SANIK: Amounts of chloride in naphtha. Anal. Chem., 1957, No. 54, pp. 241–243.
19. D. M. MARON, B. N. AMES: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 1983, No. 113, pp. 173–215.

Piekarska, K. Biodegradation of Polychlorinated Biphenyls with Microorganisms Isolated from Water and Soil. *Ochrona Środowiska* 2003, Vol. 25, No. 2, pp. 21–27.

Abstract: Owing to their high toxicity, strong bioaccumulation and low degradability, chloroorganic compounds raise serious ecological problems. The objective of the study reported in this paper was to degrade polychlorinated biphenyls (PCBs), the components of the commercial Aroclor 1242 mixture, with microorganism cultures isolated from chloroorganic-contaminated water and soil. There were nine strains, the majority of which belonged to the genera *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula* and *Candida*. The taxonomic status of the isolated strains and their ability to degrade PCB congeners

were determined. The biodegradation of the Aroclor 1242 components was monitored using microbiological, biochemical and chemical methods. PCB concentrations were determined by gas chromatography (GC-ECD). Potential mutagenic and carcinogenic properties of the biodegradation products were examined with the Ames test. The PCB congeners were degraded by selected bacterial strains with an efficiency which ranged from 5% to 60%. The highest efficiency (72%) was achieved with a mixed culture. Bioindication studies showed that, in the majority of instances, no mutagenic metabolites were produced in the course of the biodegradation process.

Keywords: Polychlorinated biphenyls, PCBs biodegradation, Ames test, mutagenic properties.