

Urszula Guzik, Danuta Wojcieszynska, Izabela Greń, Katarzyna Hupert-Kocurek

Badania aktywności dioksygenaz katecholowych w obecności jonów wybranych metali ciężkich w aspekcie bioremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami aromatycznymi

Akumulacja trudno degradowalnych związków ksenobiotycznych w środowisku spowodowała zwiększone w ostatnich latach zainteresowanie metodami ich biologicznego usuwania z wody i gleby. Wśród nich dużą grupą, cechującą się wysoką toksycznością, są związki aromatyczne. Potencjalnym rozwiązaniem problemu degradacji środowiska wydaje się być bioremediacja, czyli oczyszczanie zanieczyszczonego środowiska przez mikroorganizmy [1]. Znanych jest wiele gatunków bakterii wykazujących zdolność metabolizowania związków o charakterze aromatycznym. Są to głównie bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Flavobacterium* czy *Mycobacterium* [2–6]. Proces degradacji struktury pierścienia aromatycznego prowadzi do powstania ważnego metabolitu pośredniego – katecholu i jego pochodnych. Najczęściej jego pierścień aromatyczny ulega rozszczepieniu katalizowanemu przez dioksygenazy [7, 8]. Ponieważ rozerwanie pierścienia aromatycznego sprawia, że związek staje się łatwiej biodegradowalny, dioksygenazy zostały uznane za główne enzymy szlaków rozkładu arenów [8, 9].

Wiele toksycznych związków ksenobiotycznych o charakterze aromatycznym występuje w środowisku w obecności jonów metali, które mogą wpływać zarówno pozytywnie, jak i negatywnie na procesy degradacyjne z udziałem oksygenaz. Jest to związane z budową centrum aktywnego dioksygenaz katecholowych. W zależności od typu dioksygenaz w centrum aktywnym zlokalizowany jest jon metalu na drugim (2,3-dioksygenaza katecholowa) lub trzecim stopniu utlenienia (1,2-dioksygenaza katecholowa). Najczęściej jest to atom żelaza połączony koordynacyjnie z łańcuchami bocznymi aminokwasów w centrum aktywnym enzymu. Jon metalu trójwartościowego jest bezpośrednio zaangażowany w proces katalizy rozszczepienia intradiolowego (1,2-dioksygenaza katecholowa). Odpowiada on za atak na tlen, w wyniku czego dochodzi do redukcji żelaza z trzeciego na drugi stopień utlenienia i powstania Fe^{2+} -semichinonu, który reaguje bezpośrednio z dwoma atomami tlenu. Prowadzi to do powstania struktury nadtlenu ($C-O-O-Fe$), który następnie ulega przegrupowaniu Criegee'a, w konsekwencji którego powstaje nietrwała struktura laktonowa. Skutkiem hydrolizy układu laktonowego jest

powstanie końcowego produktu rozszczepienia intradiolowego – kwasu *cis,cis*-mukonowego [8, 10, 11]. Warunkiem ekstradiolowego rozszczepienia katecholu z udziałem 2,3-dioksygenazy katecholowej jest utworzenie kompleksu pomiędzy dwuwartościowym żelazem lub innym jonom dwuwartościowego metalu a substratem, w wyniku czego dochodzi do zmian konformacyjnych wokół centrum aktywnego enzymu. Jedną z grup hydroksylowych substratu ulega wówczas deprotonacji, a następnie – poprzez wiązania wodorowe – oddziałuje z tyrozyną miejsca aktywnego, co prawdopodobnie stabilizuje połączenie substratu z enzymem. Następnie w wyniku przegrupowań w obrębie centrum aktywnego enzymu dochodzi do połączenia tlenu z jodem żelaza, co prowadzi do utworzenia semichinonowego intermediatu, a następnie rozszczepienia wiązania O-O podczas przegrupowania Criegee'a, w konsekwencji czego powstaje nienasycony lakton oraz jon żelaza (Fe^{2+}) z przyłączonym anionem wodorotlenowym. W wyniku hydrolizy laktonu powstaje końcowy produkt rozszczepienia – semialdehyd hydroksymukonowy [8, 9, 12]. Ze względu na specyficzną budowę i mechanizm reakcji z udziałem dioksygenaz katecholowych enzymy te będą wykazywały zmiany aktywności pod wpływem obecności metali. Można spodziewać się wpływu metali na enzymy degradacyjne na dwóch płaszczyznach. Pierwszym skutkiem, jaki mogą powodować jony metali oddziałujące na białka jest dobrze opisany w literaturze efekt zmiany konformacji całego białka związany z reagowaniem jonu metalu z grupami sulfhydrylowymi aminokwasów siarkowych, powodując tym samym zmiany struktury drugo- i trzeciorzędowej białka. W konsekwencji może to prowadzić nawet do całkowitej i nieodwracalnej utraty aktywności enzymatycznej. Drugim skutkiem, który można obserwować podczas badania wpływu jonów metali na aktywność dioksygenaz, może być aktywacja enzymu poprzez wprowadzenie do układu jonów metali niezbędnych w reakcji rozszczepienia pierścienia aromatycznego. Takiego efektu można spodziewać się w obecności między innymi jonów Fe^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} . Jednak jest grupa metali, która może konkurencyjnie wypierać jony z centrum aktywnego enzymu, wpływając tym samym na zmniejszenie aktywności enzymatycznej dioksygenaz [13, 14]. Mając to na uwadze, celem pracy było określenie wpływu obecności metali ciężkich na aktywność dioksygenaz, gdyż można przypuszczać, że sole tych metali obecne w ściekach przemysłowych zawierających związki aromatyczne będą istotnie wpływać na szybkość procesów biodegradacyjnych pochodnych benzenu.

Metodyka badań

W badaniach wykorzystano szczepy *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (wyizolowany przez Hupert-Kocurek z osadu czynnego oczyszczalni ścieków w Bytomiu) oraz *Pseudomonas putida* N6 (wyizolowany przez Greń z osadu czynnego oczyszczalni ścieków przy Fabryce Mebli Giętych w Jasienicy). Hodowle badanych szczepów bakterii prowadzono w pożywce mineralnej Kojima [15] zawierającej 3,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 dm³ wody destylowanej (pH=7,1÷7,3), z fenolem o stężeniu 3 mmol/dm³ oraz zmniejszoną ilością ekstraktu drożdżowego do 0,01 g/dm³. Pożywkę mineralną wzbogacono roztworem mikroelementów TMS (10 cm³TMS/dm³) zawierającym 3,82 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 295 mg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 82 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 141 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 mg H_3BO_3 , 40 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 82 mg $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,9 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 148 mg $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ i 6 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczonych w 10 cm³ HCl (32%) i uzupełniono wodą destylowaną do objętości 1 dm³ [16]. Hodowle przeprowadzono w temperaturze 30 °C w warunkach wytrąsania (130 1/min). Stężenie fenolu w hodowlach bakteryjnych oznaczono metodą chromatografii cieczowej (HPLC) w odwróconym układzie faz z użyciem chromatografu firmy Merck, wyposażonego w kolumnę kapilarną LiChrospher® RP-18 (250×4 mm) i prekolumnę LiChroCARTTM, Nucleosil® 5C18 oraz detektor UV/VIS typu DAD. Wzrost hodowli bakteryjnych oznaczono metodą spektrofotometryczną poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm. W celu sprawdzenia wrażliwości 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Pseudomonas putida* N6 na wybrane jony metali, do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono 300 µl roztworu CuSO_4 , ZnCl_2 , CoCl_2 , AlCl_3 , CdSO_4 , NiCl_2 lub MnSO_4 o stężeniu 10 mmol/dm³ Układ kontrolny stanowiły mieszaniny reakcyjne bez jonu metalu.

Do oznaczenia aktywności dioksygenaz katecholowych zastosowano metodę Hegemana [17], która polega na spektrofotometrycznym oznaczeniu pierwszego produktu rozkładu katecholu. Tworzący się kwas *cis,cis*-mukonowy ($\epsilon=16800 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$) świadczy o aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej, natomiast obecność semialdehydu 2-hydroksymukonowego ($\epsilon=36000 \text{ dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$) świadczy o aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej. W celu oznaczenia aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej sporządzono mieszaninę reakcyjną o objętości 1 cm³ zawierającą 893 µl buforu fosforanowego (50 mmol/dm³) o pH=7,4, 67 µl Na_2EDTA (0,02 mol/dm³), 20 µl katecholu (50 mmol/dm³) i 20 µl surowej frakcji enzymatycznej. Przyrost absorbancji światła zmierzono przy długości fali 260 nm, co odpowiadało maksimum absorbancji tworzącego się kwasu *cis,cis*-mukonowego [18]. Do oznaczenia aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej przygotowano mieszaninę reakcyjną o objętości 1 cm³ zawierającą 960 µl buforu fosforanowego (50 mmol/dm³) o pH=7,4, 20 µl katecholu (50 mmol/dm³) i 20 µl surowej frakcji enzymatycznej. Przyrost absorbancji światła zmierzono przy długości fali 375 nm wobec próbki ślepej niezawierającej frakcji enzymatycznej, co odpowiadało maksimum absorbancji tworzącego się semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Pomiar aktywności dioksygenaz katecholowych przeprowadzono wobec próbki ślepej, niezawierającej surowej frakcji enzymatycznej, przez 5 min w temperaturze 35 °C w odstępach 30-sek. od momentu zmieszania

reagentów. Pomiar wykonano przy użyciu spektrofotometru dwuwiązkowego CECIL 8000 z wykorzystaniem opcji Time Plot, która umożliwia ciągłą rejestrację absorbancji w trakcie trwania pomiaru. Pomiar absorbancji rozpoczęto po 10 s od wprowadzenia surowej frakcji enzymatycznej, który to czas był potrzebny do ustabilizowania się badanego roztworu. Aktywność właściwą dioksygenaz wyrażono w U/mg białka, przy czym stężenie białka w surowej frakcji enzymatycznej oznaczono metodą Bradforda [19]. Izolację dioksygenaz katecholowych wykonano metodą Hegemana [17] używając 48-godz. hodowlę bakteryjną. Zawiesiny bakterii wirowano przez 30 min (4500×g) w temperaturze 4 °C, a uzyskany osad rozpuszczono w buforze fosforanowym o pH=7,2. Rozpuszczony osad poddano następnie działaniu ultradźwięków (20 kHz) w temperaturze 4 °C (6-krotnie po 15 s w odstępach 30-sek.) z użyciem dezintegratora Vibre Cell. W celu oddzielenia nierozbitych komórek zawiesiny wirowano przez 20 min (9000×g). Uzyskany w ten sposób roztwór z nad osadu stanowił surową frakcję enzymatyczną wykorzystaną w badaniach.

Omówienie wyników badań

W wyniku wieloletnich prac przeprowadzonych w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Śląskiego zgromadzono kolekcję szczepów zdolnych do degradacji związków aromatycznych. Na szczególną uwagę zasługują szczepy *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz *Pseudomonas putida* N6 wykazujące wzrost, zwiększoną tolerancję oraz zdolność do degradacji różnych związków aromatycznych (tab. 1). Szczepy te wykorzystano w badaniach nad właściwościami enzymów zaangażowanych w degradację jednopierścieniowych związków aromatycznych. Z wcześniejszych badań wiadomo, że monoooksygenaza szczepu KB2 cechuje się szeroką specyficznością substratową w stosunku do dużej grupy związków aromatycznych oraz wysoką opornością na toksyczne działanie innych zanieczyszczeń obecnych w ściekach zawierających areny (metale, chelatory, rozpuszczalniki organiczne) [20]. Wynikają stąd duże możliwości praktycznego zastosowania tego enzymu w procesach bioremediacji. Jednak procesy degradacji zależą nie tylko od pierwszego etapu degradacji związków aromatycznych – hydroksylacji, ale również od intensywności reakcji rozszczepiania pierścienia katalizowanego przez dioksygenazy. Z wcześniejszych badań wiadomo, że szczep KB2 wykazuje wysoką aktywność 2,3-dioksygenazy katecholowej [21], natomiast szczep N6 charakteryzuje się obecnością 1,2-dioksygenazy katecholowej po indukcji fenolem [22]. Obecność jonów metali w środowisku reakcji enzymatycznej wpływa na aktywność enzymów, co przekłada się również na zdolności degradacyjne mikroorganizmów. Dlatego uzasadnione było sprawdzenie wrażliwości badanych dioksygenaz na różne jony metali poprzez pomiar aktywności enzymatycznej w obecności tych jonów. W tym celu oba szczepy hodowano w obecności fenolu (3 mmol/dm³) (rys. 1). Po indukcji oznaczono aktywność badanych dioksygenaz w obecności jonów metali (tab. 2).

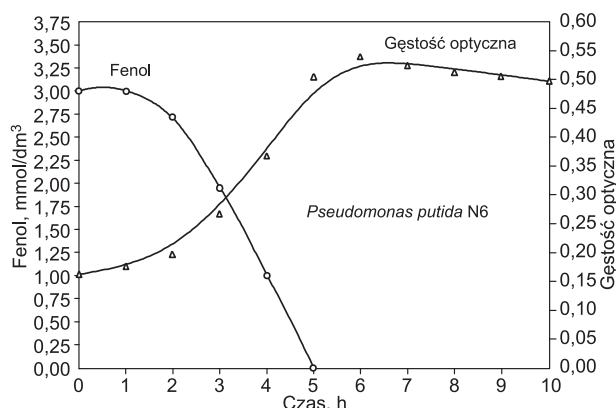
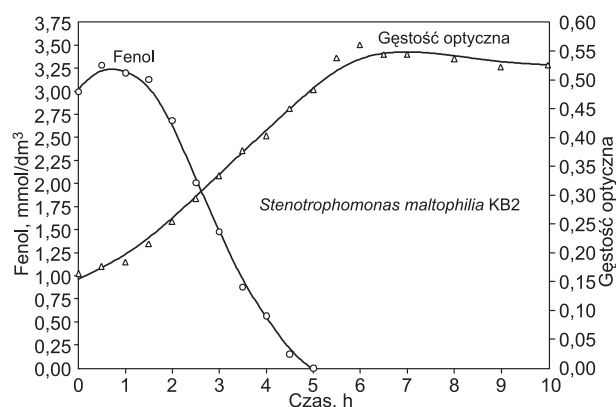
Spośród badanych jonów tylko w obecności Zn^{2+} zaobserwowano 18% wzrost aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. Wszystkie pozostałe jony spowodowały większe lub mniejsze obniżenie aktywności tej dioksygenazy. Najsilniejszą inhibicję 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu KB2 spowodowały jony Cu^{2+} , Ni^{2+} i Mn^{2+} , zmniejszające jej aktywność odpowiednio o 99,5%, 86% i 54%. Podobne

Tabela 1. Zdolność szczepów KB2 oraz N6 do rozkładu związków aromatycznych
Table 1. Capacity of the KB2 and N6 strains for degradation of aromatic compounds

Związek aromatyczny	Stopień degradacji	
	szczep KB2	szczep N6
Fenol	+++	+++
2-Chlorofenol	+/-	-
3-Chlorofenol	+/-	+/-
4-Chlorofenol	+/-	+/-
2-Metylofenol	++	-
3-Metylofenol	++	-
4-Metylofenol	++	-
2-Nitrofenol	-	-
3-Nitrofenol	-	-
4-Nitrofenol	-	-
2,3-Dichlorofenol	+/-	-
2,4-Dichlorofenol	+/-	-
2,5-Dichlorofenol	+/-	+/-
2,6-Dichlorofenol	+/-	+/-
3,4-dichlorofenol	+/-	-
3,5-dichlorofenol	+/-	-
Katechol	++	++
Rezorcyna	+/-	-
Hydrochinon	+	++
Kwas waniliowy	++	++
Kwas syringowy	+/-	+/-
Kwas protokatechowy	+++	+++
Kwas benzoesowy	+++	+++
Kwas 4-hydroksybenzoesowy	++	++
Kwas o-ftalowy	+/-	+/-
Kwas cynamonowy	-	+/-
Kwas salicylowy	+/-	-

+++ degradacja 10+15mmol/dm³
 ++ degradacja 5+9mmol/dm³
 + degradacja 1+4mmol/dm³
 +/- degradacja <1mmol/dm³
 - brak degradacji

zjawisko zaobserwowano w przypadku 1,6-dioksygenazy aminofenolowej szczepu *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45, gdzie jony Mn²⁺, Cu²⁺ i Ni²⁺ zmniejszyły aktywność enzymu odpowiednio o 100%, 61% i 50%. Ponadto stwierdzono inhibicję tego enzymu w obecności Mg²⁺, Ca²⁺, Fe³⁺, Co²⁺ oraz Cd²⁺ [23]. Zmniejszenie aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej, wyizolowanej ze szczepu *Pseudomonas* sp. FK-8-2, w obecności jonów Cu²⁺ (wynoszące 85%) zaobserwowano także w badaniach opisanych w pracy [24]. Również w pracy [25] stwierdzono spadek aktywności ekstradiolowego enzymu szczepu *Pseudomonas putida* GJ31 w obecności dwuwartościowych jonów kobaltu, niklu i manganu. 1,2-Dioksygenaza katecholowa szczepu *Pseudomonas putida* N6 była aktywowana przez jony Al³⁺, natomiast miedź, cynk, kadm i mangan okazały się jej inhibitorami. Największy, bo 60% spadek aktywności 1,2-dioksygenazy stwierdzono w obecności jonów Cu²⁺. Znacznie słabsze działanie dwuwartościowej miedzi, jako inhibitora dioksygenazy intradiolowej, wykazano w pracy [26], stwierdzając spadek aktywności 1,2-dioksygenazy



Rys. 1. Dynamika rozkładu fenolu (3 mmol/dm³) przez *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 i *Pseudomonas putida* N6 oraz gęstość optyczną hodowli bakterii ($\lambda=600$ nm)
Fig. 1. Phenol degradation (3 mmol/dm³) by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 and *Pseudomonas putida* N6 and optical density of the bacterial culture ($\lambda=600$ nm)

Tabela 2. Aktywność enzymatyczna 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu KB2 oraz 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu N6 w obecności jonów wybranych metali
Table 2. Enzymatic activity of catechol 2,3-dioxygenase isolated from the KB2 strain and catechol 1,2-dioxygenase isolated from the N6 strain in the presence of the metal ions chosen

Jon metalu	Związek	Aktywność właściwa, U/mg białka (%)	
		2,3-dioksygenaza katecholowa szczepu KB2	1,2-dioksygenaza katecholowa szczepu KB2
Próbka kontrolna		29,52 (100)	4,55 (100)
Cu ²⁺	CuSO ₄	0,14 (0,5)	1,82 (40)
Zn ²⁺	ZnCl ₂	34,87 (118)	3,76 (82)
Co ²⁺	CoCl ₂	19,54 (66)	4,90 (107)
Al ³⁺	AlCl ₃	21,26 (72)	6,22 (136)
Cd ²⁺	CdSO ₄	22,16 (75)	3,16 (69)
Ni ²⁺	NiCl ₂	3,99 (14)	4,67 (102)
Mn ²⁺	MnSO ₄	13,53 (46)	4,35 (95)

katecholowej szczepu *Rhodococcus* sp. AN-22 w obecności tego jonu tylko o 11%. Silnymi inhibitorami tego enzymu okazały się natomiast jony Hg²⁺ i Ag²⁺, powodujące odpowiednio 100% i 88% dezaktywację 1,2-dioksygenazy katecholowej [24]. W pracy [27] wykazano spadek aktywności 1,2-dioksygenazy chlorokatecholowej również w obecności jonów Cu²⁺, Hg²⁺ i Ag²⁺, wynoszący odpowiednio 97%, 79% i 52%. Obniżenie aktywności enzymatycznej w obecności jonów metali stwierdzono również

w badaniach [28]. Najsilniejszymi inhibitorami 1,2-dioksygenazy chlorokatecholowej szczepu *Pseudomonas cepacia* CSV90 okazały się Hg^{2+} i Zn^{2+} , w obecności których zanotowano odpowiednio 90% i 57% spadek aktywności badanego enzymu. Do słabszych inhibitorów zaliczono dwuwartościowe jony miedzi i kobaltu, w obecności których nastąpił 17% spadek aktywności enzymatycznej oraz jony Mn^{2+} , w przypadku których stwierdzono spadek aktywności enzymu o 8% [28].

Podsumowanie

Badania nad wrażliwością 1,2-dioksygenazy katecholowej szczepu *Pseudomonas putida* N6 na obecność jonów metali wykazały znaczący spadek aktywności badanego enzymu w obecności jonów Cu^{2+} . W mniejszym stopniu również jony Zn^{2+} , Cd^{2+} i Mn^{2+} hamowały aktywność 1,2-dioksygenazy katecholowej, natomiast jedynie jon Al^{3+} był jej aktywatorem. Z kolei zwiększenie aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 stwierdzono jedynie w obecności jonu Zn^{2+} . Najsilniejszą inhibicję tego enzymu spowodowały jony Cu^{2+} , Ni^{2+} i Mn^{2+} .

Uzyskane wyniki potwierdziły przypuszczenia, że obecność jonów metali w środowisku reakcji może wpływać zarówno pozytywnie, jak i negatywnie na aktywność dioksygenaz katecholowych, co ma znaczenie w przebiegu procesów bioremediacyjnych. Mikrobiologiczna rekultywacja środowisk zanieczyszczonych związkami aromatycznymi będzie bowiem zależeć nie tylko od potencjału degradacyjnego mikroorganizmów, ale również od obecności, dostępności i stężenia w środowisku innych związków, między innymi jonów metali ciężkich, które zwykle towarzyszą ściekom przemysłowym. Utrzymująca się aktywność dioksygenaz katecholowych szczepów *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 oraz *Pseudomonas putida* N6 w obecności jonów metali wskazuje na ich potencjalny charakter aplikacyjny w bioremediacji środowisk skażonych związkami aromatycznymi.

LITERATURA

1. B. KOŁWZAN: Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntu metodą pryzmowania. *Ochrona Środowiska* 2009, vol. 31, nr 2, ss. 3–10.
2. F.M. DUFFNER, U. KIRCHNER, M.P. BAUER, R. MULLER: Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: Cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene* 2000, Vol. 256, pp. 215–221.
3. D. EULBERG, L.A. GOLOVLEVA, M. SCHLOMANN: Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. *Journal of Bacteriology* 1997, Vol. 179, pp. 370–381.
4. N.M. LEYS, A. RYNGAERT, L. BASTIAENS, P. WATTIAU, E.M. TOP, W. VERSTRAETE, D. SPRINGAEL: Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* 2005, Vol. 51, pp. 375–388.
5. G. PANDEY, J. PANDEY, R.K. JAIN: Monitoring *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 in a "tag and chase" method during *p*-nitrophenol bio-remediation in soil microcosms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, Vol. 70, pp. 757–760.
6. B. KOŁWZAN: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 3–14.
7. A. ALFREIDER, C. VOGT, W. BABEL: Expression of chlorocatechol 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in chlorobenzene contaminated subsurface samples. *Applied and Env. Microbiol.* 2003, Vol. 69, pp. 1372–1376.
8. U. GUZIK, I. GREŃ, D. WOJCIESZYŃSKA, S. ŁABUŻEK: Dioksygenazy – kluczowe enzymy degradacji związków aromatycznych. *Biotechnologia* 2008, vol. 3, nr 82, ss. 71–88.
9. F.H. VAILLANCOURT, J.T. BOLIN, L.D. ELTIS: The ins and outs of ring cleaving dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 2006, Vol. 41, pp. 241–267.
10. A.M. ORVILLE, J.D. LIPSCOMB, D.H. OHLENDORF: Crystal structures of substrate and substrate analog complexes of protocatechuate 3,4-dioxygenase: Endogenous Fe^{3+} ligand displacement in response to substrate binding. *Biochemistry* 1997, Vol. 36, pp. 10052–10066.
11. R. YAMAHARA, S. OGO, H. MASUDA, Y. WATANABE: (Catecholo)iron(III) complexes: Structural and functional models for the catechol-bound iron(III) form of catechol dioxygenases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002, Vol. 88, pp. 284–294.
12. N. SATO, Y. URAGAMI, T. NISHIZAKI, Y. TAKAHASHI, G. SAZAKI, K. SUGIMOTO, T. NONAKA, E. MASAI, T. FUDSENDA: Crystal structures of the reaction intermediate and its homologue of an extradiol-cleaving catecholic dioxygenase. *Journal of Molecular Biology* 2002, Vol. 321, pp. 621–636.
13. L.Z. WU, B.L. MA, D.W. ZOU, Z.X. TIE, J. WANG, W. WANG: Influence of metal ions on folding pathway and conformational stability of bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure* 2008, Vol. 877, pp. 44–49.
14. I. MATERA, M. FERRARONI, S. BURGER, A. SCOZZAFAVA, A. STOLZ, F. BRIGANTI: Salicylate 1,2-dioxygenase from *Pseudaminobacter salicylatoidans*: Crystal structure of a peculiar ring-cleaving dioxygenase. *Journal of Molecular Biology* 2008, Vol. 380, pp. 856–868.
15. Y. KOJIMA, N. ITADA, O. HAYAISHI: Metapyrocatechase a new catechol cleaving enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 1961, Vol. 236, pp. 2223–2229.
16. The Source for Discovery – Protocols and Applications Guide. Promega (USA) 1996.
17. G.D. HEGEMAN: Synthesis of enzymes of the mandelate pathways by *Pseudomonas putida*. Synthesis of enzyme by the wild type. *J. of Bacteriology* 1966, Vol. 91, pp. 1140–1154.
18. E. DORN, H.J. KNACKMUSS: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenase from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochemical Journal* 1977, Vol. 174, pp. 73–84.
19. M.M. BRADFORD: A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976, Vol. 72, pp. 248–258.
20. D. WOJCIESZYŃSKA, I. GREŃ, S. ŁABUŻEK, M. RESPONDEK: Specyficzność substratowa oraz wrażliwość monooksygenazy fenolowej ze szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 a jej potencjalne zastosowanie w bioremediacji środowiska. *Biotechnologia* 2007, vol. 2, nr 77, ss. 181–191.
21. U. GUZIK, I. GREŃ, S. ŁABUŻEK, I. KULA, K. HUPERT-KOCUREK: Amplification of 2,3-(chloro)catechol dioxygenase's gene of *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *Acta Biochimica Polonica* 2006, Vol. 53, Suppl. 1, p. 184.
22. U. GUZIK, I. GREŃ, A. WIECHETEK, D. WOJCIESZYŃSKA, S. ŁABUŻEK: Characterization of (chloro)catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* N6. *Acta Biochimica Polonica* 2007, Vol. 54, Supl. 1, p. 81.
23. U. LENDENMANN, J.S. SPAIN: 2-Aminophenol 1,6-dioxygenase: A novel aromatic ring cleavage enzyme purified from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *Journal of Bacteriology* 1996, Vol. 178, pp. 6227–6232.
24. Y. NAKANISHI, S. MURAKAMI, R. SHINKE, K. AOKI: Induction, purification, and characterization of catechol 2,3-dioxygenase from aniline assimilating *Pseudomonas* sp. FK-8-2. *Agricultural and Biol. Chem.* 1991, Vol. 55, pp. 1281–1289.

25. S.R. KASCHABEK, T. KASBERG, D. MULLER, A.E. MARS, D.B. JANSSEN, W. REINEKE: Degradation of chloroaromatics: Purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. *Journal of Bacteriology* 1998, Vol. 180, pp. 296–302.
26. E. MATSUMURA, S. OOI, S. MURAKAMI, S. TAKENAKA, K. AOKI: Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus* sp. AN-22. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004, Vol. 98, pp. 71–76.
27. C.B. MIGUEZ, C.W. GREER, J.M. INGRAM: Purification and properties of chlorocatechol 1,2-dioxygenase from *Alcaligenes denitrificans* BRI 6011. *Canadian Journal of Microbiology* 1992, Vol. 39, pp. 1–5.
28. M.A. BHAT, A.T. ISHID, K. HORIIKE, C.S. VAIDYANATHAN, M. NOZAKI: Purification of 3,5-dichlorocatechol 1,2-dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase and a key enzyme in the biodegradation of a herbicide, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993, Vol. 300, pp. 738–746.

Guzik, U., Wojcieszynska, D., Gren, I., Hupert-Kocurek, K. Activity of Catechol Dioxygenases in the Presence of Some Heavy Metal Ions: Bioremediation of an Environment Polluted with Aromatic Compounds. *Ochrona Srodowiska* 2010, Vol. 32, No. 1, pp. 9–13.

Abstract: The strains of *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 and *Pseudomonas putida* N6 are characterized by an enhanced capacity for degrading aromatic compounds: within five hours of incubation both the strains were found to provide a complete degradation of phenol (3 mmol/dm³). Upon induction with phenol, catechol 2,3-dioxygenase, an enzyme responsible for the meta-cleavage of aromatic compounds, was detected in the *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 strain, whereas in the *Pseudomonas putida* N6 strain the presence was revealed of catechol 1,2-dioxygenase, an enzyme characteristic of the pathway for the ortho-fission of the aromatic ring. Tests on the sensitivity

of the enzymes to metal ions have demonstrated that Zn²⁺ ions activated catechol 2,3-dioxygenase in the KB2 strain. The other metal ions were found to be inhibitors of this enzyme. Among the metal ions tested, the Cu²⁺ ion was the strongest inhibitor of the two isolated dioxygenases. Slightly weaker was the inhibition of catechol 1,2-dioxygenase induced by Cd²⁺ and Zn²⁺ ions in the N6 strain. The activity of this enzyme increased in the presence of Co²⁺ ions. The other ions had no significant influence on the activity of the catechol 1,2-dioxygenase isolated from the N6 strain. The partial activity of both dioxygenases observed upon the application of metal salts suggests that both the strains, *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 and *Pseudomonas putida* N6, may contribute much to the remediation of an environment polluted with aromatic compounds.

Keywords: Biodegradation, bioremediation, *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Pseudomonas putida* N6, metal ions.