

Amanda Pacholak, Wojciech Smulek, Ewa Kaczorek

Wpływ stresu metabolicznego na biodegradację chloropochodnych toluenu i modyfikację właściwości powierzchniowych komórek szczepu *Raoultella planticola* SA2

Obecność toksycznych zanieczyszczeń w ekosystemach wymaga podejmowania różnorodnych działań, przede wszystkim w zakresie gospodarki odpadami oraz kontroli stanu zanieczyszczenia wody, gleby i powietrza [1]. W związku z szerokim wykorzystywaniem izomerów chlorotoluenu (rozpuszczalniki, produkty pośrednie wielu syntez chemicznych), ryzyko zanieczyszczenia nimi środowiska naturalnego jest wysokie. W 2000 r. światowa produkcja izomerów chlorotoluenu wyniosła 130 tys. ton, z których 55–65 tys. ton stanowiła mieszanina izomerów, a resztę czysty 2-chlorotoluen [2]. Izomer o największym znaczeniu przemysłowym – 2-chlorotoluen – jest stosowany między innymi jako środek zmniejszający palność lub rozcieńczalnik do farb, a także w produkcji barwników, lakierów, pigmentów, substancji klejących, żywic i polimerów, odświeżaczy powietrza, preparatów do udrażniania rur, rozjaśniaczy optycznych czy smarów przewodzących ciepło [2, 3].

Wprowadzenie atomu halogenu do cząsteczki związku aromatycznego istotnie wpływa na zmianę jego właściwości fizykochemicznych, prowadząc między innymi do zmniejszenia lotności i podwyższenia temperatury wrzenia, a także wzrostu polarności cząsteczki w stosunku do jej analogu niezawierającego halogenu [4]. Trzy izomery chlorotoluenu (2-chlorotoluen, 3-chlorotoluen oraz 4-chlorotoluen) są związkami o masie cząsteczkowej 126,59 g/mol. To bezbarwne ciecze o charakterystycznym aromatycznym zapachu. W szeregu 2-, 3-, 4-chlorotoluen nieznacznie wzrastają temperatura wrzenia, punkt zapłonu i punkt topnienia tych związków, maleje natomiast ich gęstość. Izomery chlorotoluenu charakteryzują się małą rozpuszczalnością w wodzie, która wynosi 47 mg/dm³ w przypadku 2-chlorotoluenu oraz 40 mg/dm³ w przypadku 3- i 4-chlorotoluenu. Dane te pokazują, że położenie atomu chloru w cząsteczce związku aromatycznego ma wpływ na jego właściwości fizykochemiczne.

Wysoka toksyczność chloropochodnych benzenu, w tym izomerów chlorotoluenu, w stosunku do organizmów żywych [5] sprawia, że konieczne jest ich wydajne i szybkie usuwanie z zanieczyszczonych gleb i wód gruntowych. Wśród metod fizykochemicznych usuwania zanieczyszczeń organicznych z roztworów wodnych obecnie najczęściej wykorzystuje się metody adsorpcyjne [6].

Do likwidacji skażeń wykorzystywane są także techniki membranowe, które mogą być łączone z innymi metodami, takimi jak koagulacja, utlenianie lub adsorpcja [7, 8]. Często stosowane są też takie zabiegi, jak płukanie gruntu [1], desorpcja termiczna [9, 10], wytrącanie elektrostatyczne, ozonowanie, fotokataliza [1] lub utlenianie termokatalityczne [11]. Podstawową wadą fizykochemicznych metod usuwania zanieczyszczeń jest ich wysoki koszt, a także późniejsze zagospodarowanie odpadów. Pod tym względem przewagę mają metody biologiczne, które opierają się na wykorzystaniu zdolności mikroorganizmów do degradacji związków organicznych. Podczas biodegradacji drobnoustroje wykorzystują zanieczyszczenia obecne w środowisku jako źródło węgla i energii [12]. Bioremediacja ma szereg istotnych zalet, które czynią ją jedną z najbardziej atrakcyjnych metod oczyszczania środowiska naturalnego. Do najważniejszych z nich należą prostota procesu, niski koszt i wysoka skuteczność oraz brak wtórnych strumieni odpadowych [13]. Metoda ta umożliwia usunięcie większości ksenobiotyków organicznych ze środowiska poprzez wykorzystanie naturalnych szlaków degradacji [14], które zarazem są wysoce specyficzne – często tylko jeden z izomerów ulega degradacji przez dany szczep bakterii [3, 13].

Wzrost liczby atomów halogenu oraz ich położenie w cząsteczce należą do istotnych parametrów wpływających na toksyczność związku, a także na przebieg jego biodegradacji [15]. W badaniach [16], prowadzonych nad biodegradacją halogenowanych fenoli, ich podatność na biologiczny rozkład wzrastała w kolejności: 4-bromofenol, 4-chlorofenol, 4-fluorofenol. Potwierdzili to również autorzy prac [17, 18], opisując różne szlaki metaboliczne mineralizacji 4-chlorotoluenu prowadzonej przez mikroorganizmy z rodzaju *Pseudomonas*. Z kolei badania nad biodegradacją halogenowanych fenoli przez bakterie należące do rodzaju *Arthrobacter* wykazały występowanie różnych produktów pośrednich w zależności od rodzaju halogenu [19, 20].

Poza budową chemiczną, szczególną rolę w procesie biodegradacji zanieczyszczeń można przypisać bioróżnorodności mikroorganizmów, jak również specyficzności substratowej enzymów produkowanych przez szczepy bakteryjne zdolne do degradacji ksenobiotyków. Ponadto czynniki biologiczne, takie jak właściwości powierzchniowe mikroorganizmów, również wpływają istotnie na przebieg procesu biodegradacji węglowodorów. W pracach [21–24] zaobserwowano, że wysoka hydrofobowość powierzchni komórek drobnoustrojów wiązała się z ich zwiększoną

adhezją do węglowodorów, co miało bezpośredni wpływ na przebieg biodegradacji tych związków – drobnoustroje charakteryzujące się hydrofobową powierzchnią miały większe powinowactwo do węglowodorów, a zatem prowadziły cały proces szybciej i bardziej skutecznie niż te o powierzchni hydrofilowej.

Rozważając możliwie szeroko procesy biodegradacji ksenobiotyków w środowisku naturalnym należy również odnieść się do stresu metabolicznego, spowodowanego długotrwałym kontaktem komórek z zanieczyszczeniami środowiskowymi i wykorzystywaniem ich przez komórki jako źródła węgla i energii. Zachodzące zmiany w fizjologii komórek mogą silnie wpływać na metabolizm ksenobiotyków przez drobnoustroje. Ponadto złożone procesy adaptacyjne mikroorganizmów przyczyniają się do istotnych zmian w budowie komórek, w tym ich właściwości powierzchniowych [25,26].

Cel i zakres badań

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu długotrwałego kontaktu szczepu *Raoultella planticola* SA2 z izomerami chlorotoluenu na biodegradację tych związków oraz towarzyszące temu zmiany w strukturach powierzchniowych komórek. Zakres badań obejmował:

- ocenę biodegradacji izomerów chlorotoluenu przez drobnoustroje niepoddane stresowi metabolicznemu oraz po długotrwałym kontakcie z izomerami chlorotoluenu,
- analizę zmian właściwości powierzchniowych komórek, przez pomiar hydrofobowości ich powierzchni, wartości potencjału dzeta (ζ) oraz przepuszczalności błon komórkowych, jakie zachodzą podczas biodegradacji izomerów chlorotoluenu.

Materiały i metody

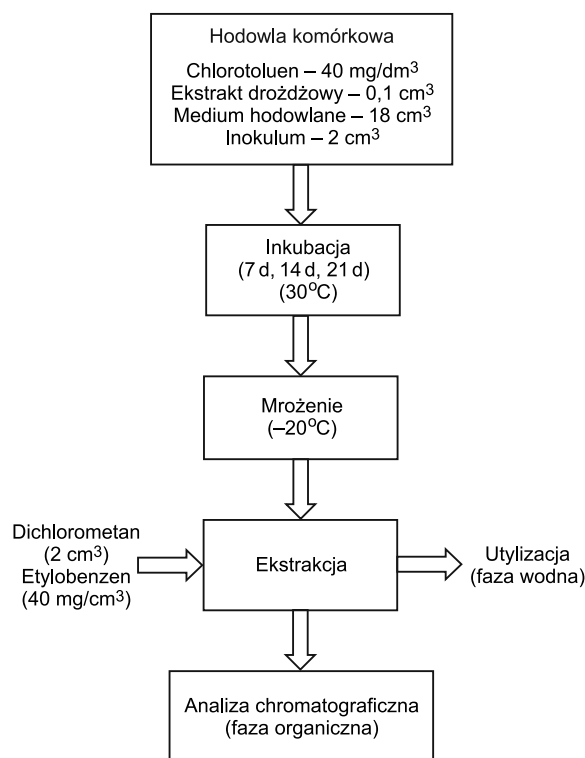
Materiały

Materiał badawczy stanowił szczep środowiskowy *Raoultella planticola* SA2 (numer akcesyjny w bazie GenBank NCBI: KP096517), który pochodził z gleby zanieczyszczonej pochodnymi toluenu. Wyizolowany szczep poddano identyfikacji genetycznej i biochemicznej. Badania przeprowadzano ze szczepem przechowywanym przez 12 miesięcy na podłożu agarowym z dodatkiem mieszaniny izomerów chlorotoluenu, która stanowiła jedyne źródło węgla (szczep oznaczany jako stresowany) oraz ze szczepem przechowywanym na wzbogaconym podłożu agarowym (szczep niestresowany). Bakterie przechowywane na płytkach agarowych pasażowano co 21 d na świeże podłoże zawierające nową porcję mieszaniny chlorotoluenów (linia komórek poddanych stresowi metabolicznemu) lub pasażowano na świeże podłoże – wzbogacony agar (linia komórek niepoddanych stresowi metabolicznemu). W celu oceny skuteczności biodegradacji oraz zmian właściwości powierzchniowych komórek prowadzono hodowle płynne, które zawierały źródło węgla (jeden z izomerów chlorotoluenu w ilości 40 mg/dm³ lub glukozę), ekstrakt drożdżowy oraz medium hodowlane z mikroelementami (Na₂HPO₄ – 2,79 g/dm³, KH₂PO₄ – 1,0 g/dm³, (NH₄)₂SO₄ – 1,0 g/dm³, MgSO₄·H₂O – 0,2 g/dm³, Ca(NO₃)₂·7H₂O – 10 mg/dm³, cytrynian żelazowo-amonowy – 10 mg/dm³, H₃PO₃ – 0,3 mg/dm³, CoCl₂·6H₂O – 0,2 mg/dm³, ZnSO₄·7H₂O – 0,1 mg/dm³, Na₂MoO₄·2H₂O – 0,03 mg/dm³, MnCl₂·4H₂O – 0,03 mg/dm³, NiCl₂·6H₂O – 0,02 mg/dm³ oraz

CuCl₂·2H₂O – 0,1 mg/dm³). Medium hodowlane przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w pracy [2]. Składniki medium hodowlanego oraz pozostałe związki chemiczne zostały zakupione w firmie Merck Millipore.

Metody badawcze

Biodegradację 2-chlorotoluenu, 3-chlorotoluenu oraz 4-chlorotoluenu prowadzono w wyjałowionych, szczelnie zakręconych, szklanych butelkach laboratoryjnych o pojemności 100 cm³ zawierających 18 cm³ medium hodowlanego, 0,1 cm³ ekstraktu drożdżowego oraz odpowiednie źródło węgla (2-chlorotoluen, 3-chlorotoluen lub 4-chlorotoluen) wprowadzone w takiej ilości, aby jego zawartość w hodowli wynosiła 40 mg/dm³. Hodowle zaszczipiono 2 cm³ inokulum bakteryjnego zawierającego szczep *R. planticola* SA2 (około 10⁸ jtk/cm³) o gęstości optycznej (OD) równej 1,0 (λ =600 nm). Kontrolę stanowiły próbki biotyczne – pozbawione izomerów chlorotoluenu oraz abiotyczne – niezawierające mikroorganizmów. Przygotowane hodowle oraz próbki kontrolne inkubowano w temperaturze 30°C przez 7 d, 14 d lub 21 d. W tym celu próbki zamrożono, a następnie pozostałość izomerów chlorotoluenu w hodowlach ekstrahowano dichlorometanem. Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano etylobenzen. Analizę ilościową degradowanych związków przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas Pegasus 4D GCxGC-TOFMS (LECO, USA) w trybie pracy z jedną kolumną BPX-5 (28 m, 250 μ m, 0,25 μ m). Jako gaz nośny wykorzystano hel – 1 cm³/min przez 13,5 min w warunkach programowanego wzrostu temperatury (50°C przez 3 min, następnie narost temperatury 12°C/min do 140°C, końcowa temperatura przez 3 min). Schemat procedury badawczej przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat procedury pomiaru biodegradacji izomerów chlorotoluenu

Fig. 1. Schematic diagram of measuring procedure for chlorotoluene isomers biodegradation

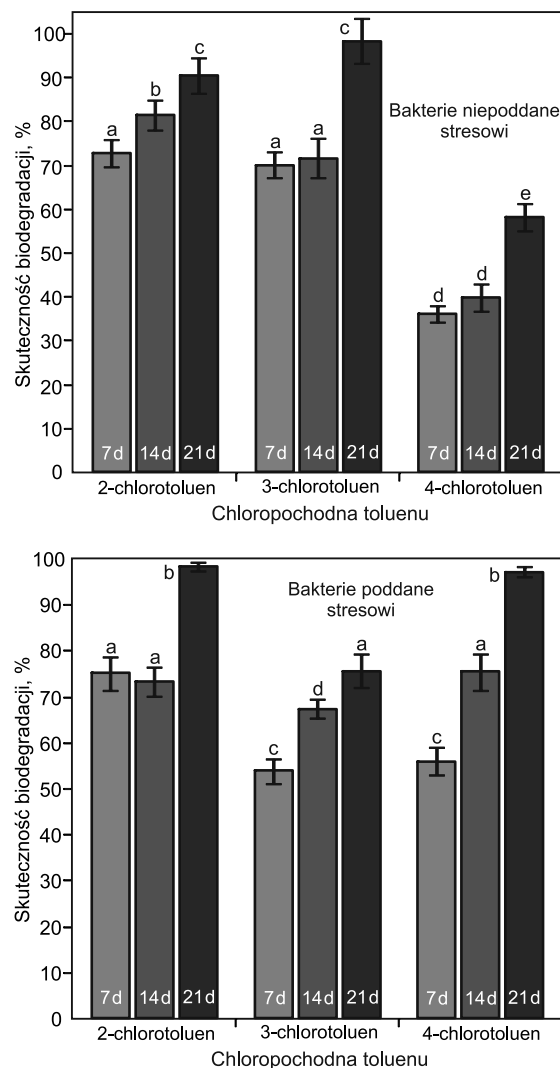
Kolejny etap badań obejmował ocenę zmian właściwości powierzchniowych komórek, wywołanych kontaktem badanego szczepu bakteryjnego z izomerami chlorotoluenu oraz łatwiej przyswajalnym źródłem węgla – glukozą. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem szczepów przed i po ich długotrwałym kontakcie z izomerami chlorotoluenu. Pomiarom poddawano hodowle komórek, których gęstość optyczna wynosiła 1,0.

Hydrofobowość powierzchni komórek oznaczono metodą mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów (microbial adhesion to hydrocarbons – MATH), która pozwala na ocenę, jaka część populacji komórek w hodowli wykazuje zwiększoną adhezję do węglowodorów. Przepuszczalność błon komórkowych oznaczono stosując test z orto-nitrofenylo- β -galaktozydem. Związek ten, podczas reakcji hydrolizy katalizowanej przez β -galaktozydazę (zewnątrzkomórkowy enzym syntetyzowany przez komórki mikroorganizmów), daje barwny produkt, którego ilość można zmierzyć spektrofotometrycznie i jest ona proporcjonalna do przepuszczalności błony badanych komórek. Z kolei pomiar potencjału dzeta mikroorganizmów, określający stabilność zawiesiny komórek podczas biodegradacji izomerów chlorotoluenu, przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Wielka Brytania). Badania dotyczące zmian właściwości powierzchniowych komórek, ich hydrofobowości oraz potencjału dzeta wykonano zgodnie z procedurą opisaną w pracy [27]. Dane uzyskane w trakcie badań poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statistica wersja 10.0.

Wyniki badań

Biodegradacja izomerów chlorotoluenu

Biodegradację 2-, 3- i 4-chlorotoluenu w hodowlach szczepu *R. planticola* SA2 sp. (poddaną oraz niepoddaną stresowi metabolicznemu związkami biodegradowanymi) mierzono po 7 d, 14 d oraz 21 d. Maksymalną i jednocześnie najszybszą biodegradację 3-chlorotoluenu i 2-chlorotoluenu obserwowano w hodowlach niepoddanych stresowi metabolicznemu (rys. 2 – górny wykres). Po 7 d biodegradacji stwierdzono 70% i 73% ubytek odpowiednich pochodnych węglowodorów, przy czym wartości te po 21 d prowadzenia hodowli zwiększyły się odpowiednio do 98% i 91%. Najmniejszą skuteczność biologicznego rozkładu stwierdzono natomiast w przypadku 4-chlorotoluenu – po 7 d hodowli wyniosła 36%, a po 21 d zwiększyła się do 58%. Na dolnym wykresie przedstawiono natomiast wyniki pomiarów uzyskane w hodowli komórek *Raoutella* sp. poddanej stresowi metabolicznemu. Stwierdzono, że w tym przypadku najskuteczniej przebiegała biodegradacja 2-chlorotoluenu i 4-chlorotoluenu – po 21 d zanotowano odpowiednio 99% i 98% ubytek badanych węglowodorów, przy czym po 7 d prowadzenia procesu najmniej skutecznie były rozkładane 3-chlorotoluen i 4-chlorotoluen (55%). Porównując wyniki przedstawione na rysunku 2 można zauważyć, że zastosowanie komórek bakterii poddanych długotrwałemu kontaktowi z izomerami chlorotoluenu znacznie zwiększyło biodegradację 4-chlorotoluenu, prowadząc do całkowitego usunięcia tego związku z hodowli. Po 7 d prowadzenia procesu zaobserwowano wzrost skuteczności biodegradacji o 20 punktów procentowych przez szczep poddany stresowi metabolicznemu, natomiast po 14 d i 21 d różnica ta wyniosła około 40 punktów procentowych.



Rys. 2. Skuteczność biodegradacji izomerów chlorotoluenu przez szczep *Raoutella planticola* SA2 niepoddany oraz poddany stresowi metabolicznemu (różne litery oznaczają wartości różniące się statystycznie)
Fig. 2. Effectiveness of chlorotoluene isomers biodegradation by *Raoutella planticola* SA2 strain not exposed and exposed to metabolic stress (different letters correspond to statistically different values)

Właściwości powierzchniowe komórek bakteryjnych

Jednym z czynników decydujących o przyswajaniu przez komórki hydrofobowych źródeł węgla jest ich biodostępność. Zanieczyszczenia hydrofobowe, do których należą izomery chlorotoluenu, są tylko w nieznacznym stopniu rozpuszczalne w wodzie i w związku z tym ich biodostępność jest ograniczona. Stąd istotnym uzupełnieniem badań biodegradacji izomerów chlorotoluenu była analiza właściwości powierzchniowych komórek bakterii zaangażowanych w proces biologicznego rozkładu [28, 29]. Ich modyfikacje mogą być związane ze zmianami biodostępności węglowodorów dla komórek mikroorganizmów. Może to w istotny sposób decydować o skuteczności procesu biodegradacji hydrofobowych źródeł węgla. Jednocześnie zmiany w metabolizmie i budowie komórek bakteryjnych stanowią istotny element adaptacji mikroorganizmów do przeżycia w obecności niespecyficznych, toksycznych i hydrofobowych źródeł węgla. Długotrwały kontakt szczepów

bakterii z węglowodorami może prowadzić do znaczących zmian przepuszczalności błony komórkowej, hydrofobowości powierzchni komórek oraz ich potencjału elektrokinetycznego [30].

Analiza wyników badań przedstawionych w tabeli 1 wykazała, że każde z zastosowanych źródeł węgla w odmienny sposób wpływało na przepuszczalność błony komórkowej testowanych dwóch linii szczepu. Z jednej strony zmniejszenie przepuszczalności błony może być odpowiedzią obronną komórki na pojawienie się w jej otoczeniu toksycznego zanieczyszczenia. Z drugiej zaś węglowodory mogą penetrować fosfolipidowe warstwy błony, prowadząc do zmian jej właściwości. Ponadto błona odpowiada za transport cząsteczek asymilowanego źródła węgla do wnętrza komórki, gdzie jest ono metabolizowane. Pomiar przepuszczalności błony może dać odpowiedź na to, który z tych procesów dominuje w komórkach badanego szczepu biodegradowego związku aromatyczne. Wyraźny wzrost przepuszczalności błony komórek niepoddanych stresowi metabolicznemu, w porównaniu do hodowli na glukozie, stwierdzono wówczas, gdy źródłem węgla był 3-chlorotoluen (wzrost z około $0,3 \mu\text{M}/\text{min}$ do $0,6 \mu\text{M}/\text{min}$). W przypadku komórek poddanych stresowi metabolicznemu wartość przepuszczalności błony komórkowej była największa ($0,96 \mu\text{M}/\text{min}$), gdy jako źródło węgla dla bakterii zastosowano 4-chlorotoluen. Porównując wartości przepuszczalności błony komórek poddanych i niepoddanych stresowi stwierdzono istotny wzrost płynności błon komórek długotrwale przechowywanych w obecności mieszaniny izomerów chlorotolenu jako jedyne źródła węgla i energii. Największe różnice zanotowano w przypadku hodowli bakterii zawierającej 2-chlorotoluen, gdzie zaobserwowano wzrost przepuszczalności z około $0,1 \mu\text{M}/\text{min}$ do $0,7 \mu\text{M}/\text{min}$. Wynikało stąd, że transport izomerów chlorotolenu przez błonę wymagał zwiększenia jej płynności. Jednak porównując wartości biodegradacji przez szczep poddany i niepoddany stresowi metabolicznemu można przypuszczać, że zmiana płynności nie była głównym parametrem do oceny zmian skuteczności procesu biodegradacji.

Hydrofobowość powierzchni komórek, nazywana również mikrobiologiczną adhezją do węglowodorów, pozwala ocenić, w jakim stopniu komórki wykazują powinowactwo do węglowodorów hydrofobowych. Zmiany wartości tego parametru odzwierciedlają tym samym modyfikacje powierzchni komórek, które pozwalają komórce na regulację stopnia asymilacji przez nią rozproszonych kropeł nierozpuszczalnego źródła węgla. Badania hydrofobowości

powierzchni komórek bakteryjnych wykonano również, aby stwierdzić, czy wartość tego parametru zależała w istotny sposób od położenia atomu chloru w cząsteczce analizowanego związku. W przypadku szczepu niestresowanego wartość hydrofobowości powierzchni komórek wykazywała znaczne różnice w każdej hodowli, w zależności od zastosowanego źródła węgla (tab. 1). Porównując hydrofobowość komórek hodowanych na glukozie (13%) z hodowanymi na chlorowanych pochodnych toluenu, największą wartość odnotowano podczas biodegradacji 2-chlorotolenu (48%), natomiast hydrofobowość powierzchni komórek szczepu stresowanego wyniosła 1%, gdy drobnoustroje hodowano na glukozie oraz 2- i 4-chlorotolenu. Dużo większą wartość stwierdzono wówczas, gdy jedynym źródłem węgla był 3-chlorotoluen (63%). Ponadto w większości przypadków komórki – zarówno hodowli stresowanej, jak i niestresowanej – miały cechy hydrofilowe. Cechami hydrofobowymi charakteryzowały się jedynie bakterie w hodowli niepoddanej stresowi, hodowane wcześniej na 2-chlorotolenu oraz komórki w hodowli poddanej stresowi, hodowane na 3-chlorotolenu. Ich hydrofobowość wynosiła odpowiednio 48% oraz 63%. Pomimo hydrofilowego charakteru powierzchni większości komórek, wyniki wskazały na istotne różnice w wartościach hydrofobowości pomiędzy tymi hodowlami, co w niektórych przypadkach korelowało z wynikami badań dotyczącymi przepuszczalności błony komórkowej. W wyniku stresu metabolicznego przepuszczalność błon komórek hodowanych wcześniej na 2-chlorotolenu istotnie wzrosła, natomiast hydrofobowość powierzchni uległa znaczącemu obniżeniu. W przypadku hodowli zawierającej 3-chlorotoluen zaobserwowano wzrost przepuszczalności błony i towarzyszący mu znaczny wzrost hydrofobowości powierzchni spowodowany stresem metabolicznym. W tym układzie zaobserwowano również znaczny wzrost skuteczności procesu biodegradacji, co pozwala przypuszczać, że bardziej hydrofobowa powierzchnia komórek wykazywała większe powinowactwo do węglowodorów, skutkujące równoczesnym wzrostem przepuszczalności błony komórkowej oraz szybkości biodegradacji węglowodorów.

Kolejny z analizowanych parametrów, potencjał dzeta, był związany z tworzeniem się gradientu stężenia jonów wokół komórki mikroorganizmu znajdującej się w roztworze elektrolitu – medium hodowlanego. Gromadzenie się jonów wokół komórki było skorelowane z ilością i rodzajem grup funkcyjnych związków chemicznych tworzących jej zewnętrzne warstwy. Analiza wyników pomiarów

Tabela 1. Właściwości powierzchniowe komórek szczepu *Raoutella planticola* SA2
Table 1. Cell surface characteristics of *Raoutella planticola* SA2 strain

Szczep <i>Raoutella planticola</i> SA2	Parametr, jednostka	Źródło węgla			
		glukoza	2-chlorotoluen	3-chlorotoluen	4-chlorotoluen
Poddany stresowi metabolicznemu	przepuszczalność błony komórkowej, $\mu\text{M}/\text{min}$	$0,26 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,02$
	hydrofobowość powierzchni komórki, %	13 ± 2	48 ± 3	6 ± 2	11 ± 2
	potencjał dzeta (ζ), mV	$-23,3 \pm 0,4$	$-18,0 \pm 0,6$	$-20,8 \pm 0,5$	$-19,8 \pm 0,6$
Niepoddany stresowi metabolicznemu	przepuszczalność błony komórkowej, $\mu\text{M}/\text{min}$	$0,61 \pm 0,05$	$0,71 \pm 0,05$	$0,78 \pm 0,08$	$0,96 \pm 0,06$
	hydrofobowość powierzchni komórki, %	1 ± 0	1 ± 1	63 ± 4	1 ± 1
	potencjał dzeta (ζ), mV	$-1,7 \pm 0,2$	$-1,7 \pm 0,5$	$-1,8 \pm 0,4$	$-1,9 \pm 0,3$

potencjału dzeta przedstawionych w tabeli 1 wykazała, że komórki w hodowli niepoddanej stresowi metabolicznemu charakteryzowały się względnie wysoką wartością bezwzględną potencjału dzeta, w porównaniu do komórek poddanych stresowi. Wartości potencjału dzeta mieściły się w przedziale od -23 mV do -18 mV w przypadku komórek niestresowanych hodowanych na izomerach chlorotoluenu, natomiast w przypadku komórek poddanych stresowi wartość potencjału wzrosła do ok. -2 mV. Nie zaobserwowano wpływu rodzaju źródła węgla na wartość tego parametru. Odpowiedź komórek na kontakt z biodegradowanymi węglowodorami, mierzona wartością parametru dzeta, była więc złożona i nie wykazywała prostej korelacji ze skutecznością procesu biodegradacji. Mając na względzie bardzo znaczące zmiany wartości mierzonych parametrów, charakteryzujących właściwości powierzchniowe komórek, należy jednak stwierdzić, że mogły one mieć istotny wpływ na skuteczność biodegradacji, nawet jeśli nie były z nią bezpośrednio skorelowane.

Dyskusja wyników

Wyniki badań wykazały istotny wpływ położenia atomu chloru w cząsteczce chlorotoluenu na przebieg procesu jego biodegradacji. Potwierdziły to również badania opisane w pracy [2], dotyczące biodegradacji izomerów chlorotoluenu oraz ksylenu przez szczep *Rhodococcus* sp. OCT 10. Wśród chloropochodnych toluenu najbardziej intensywny wzrost komórek obserwowano wówczas, gdy źródłem węgla był 2-chlorotoluen, przy czym nie obserwowano tego wzrostu w hodowlach prowadzonych z 3- i 4-chlorotoluenem. Podobne wyniki uzyskano stosując izomery ksylenu – gdy źródłem węgla w hodowlach badanego szczepu był *o*-ksylen, miał miejsce znaczący wzrost populacji komórek szczepu *Rhodococcus* sp. OCT 10, w przypadku *p*-ksylenu wzrost ten był nieznaczny, natomiast nie zaobserwowano go, gdy szczep hodowano na *m*-ksylenie [2]. Również długotrwałe oddziaływanie zanieczyszczeń na komórki bakteryjne może przyczynić się do istotnych zmian w ich możliwościach biodegradacyjnych, co wykazali autorzy pracy [30]. Po 12-miesięcznym stresie metabolicznym biodegradacja węglowodorów oleju napędowego przez szczep *Achromobacter* sp. 4(2010) była dwukrotnie bardziej skuteczna niż biodegradacja tego samego źródła węgla przez komórki niepoddane stresowi metabolicznemu. Również badania nad biodegradacją chlorowych pochodnych benzenu przez szczep *Pseudomonas* sp. JS21 wykazały jego zdolność do rozkładu szeregu związków aromatycznych, między innymi 1,4-dichlorobenzenu, chlorobenzenu, benzenu, toluenu, fenolu i etylobenzenu, w tym także wszystkich trzech izomerów chlorotoluenu [17]. Biodegradacji izomerów chlorotoluenu poświęcono kilka innych prac [31–34], których autorzy zajęli się analizą szlaków metabolicznych oraz genów kodujących enzymy uczestniczące w biodegradacji jego izomerów, natomiast skuteczność biodegradacji tych związków i modyfikacje właściwości powierzchniowych komórek, zachodzące w wyniku ich kontaktu z tą grupą związków, nie były przedmiotem zainteresowań autorów tych publikacji.

Analizując zmiany zachodzące w obrębie powierzchni komórek należy uwzględnić między innymi strukturę zewnętrznych warstw ściany komórkowej. Stąd komórki bakterii Gram-dodatnich charakteryzują się większą hydrofobowością niż komórki Gram-ujemne, ze względu na obecność na ich powierzchni większej ilości ugrupowań

o charakterze hydrofobowym [35]. Hydrofobowość powierzchni komórek zależy również od źródła węgla wykorzystywanego w hodowlach bakterii. Wskazują na to badania własne oraz wyniki przedstawione w pracy [36], podczas których oceniono wartości hydrofobowości komórek, dla których źródłem węgla były odpowiednio – glukoza, olej napędowy, mieszanina dodekanu i heksadekanu, toluen, kumen lub *tert*-butylobenzen. W przypadku każdego z zastosowanych źródeł węgla otrzymano inne wyniki hydrofobowości powierzchni komórek, które przyjmowały wartości od 4% do 61% [36]. Z kolei autorzy pracy [35] badali hydrofobowość komórek *Rhodococcus* sp. CN6 podczas biodegradacji 4-nitrofenolu, której wartość wzrastała wraz ze stężeniem w hodowli biodegradowanej pochodnej fenolu. Hydrofobowość może także ulec zmianie na skutek wprowadzenia do hodowli związków powierzchniowo czynnych, przy czym zmiany te zależą przede wszystkim od stężenia surfaktantu oraz jego rodzaju. Potwierdzają to badania opisane w pracy [37], w której określono zmiany hydrofobowości komórek *Bacillus subtilis* WU-3 hodowanych w obecności różnych surfaktantów wprowadzanych do hodowli w różnych ilościach.

Analogicznie, jak w prezentowanej pracy, wyniki pomiarów potencjału elektrokinetycznego uzyskano także w badaniach własnych [26], określając wpływ naturalnych związków powierzchniowo czynnych, ramnolipidów i saponin na biodegradację oleju napędowego i właściwości powierzchniowe mikroorganizmów prowadzących ten proces. Również podczas badań opisanych w pracy [36] zaobserwowano, że wartości potencjału elektrokinetycznego komórek trzech szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, hodowanych na oleju napędowym bądź mieszaninie dodekanu i heksadekanu, mieściły się w zakresie od -6 mV do -11 mV. Wartości te nieznacznie różniły od wartości potencjału dzeta prezentowanych w tabeli 1, które dotyczą szczepu niepoddanego stresowi [36].

Długotrwałe przechowywanie mikroorganizmów w obecności węglowodorów, jako jedyne źródła węgla i energii, jest tylko jednym z czynników, które mogą być przyczyną zmian w przepuszczalności błon komórek bakteryjnych. Autorzy pracy [38] badali wpływ organicznych pestycydów i antybiotyków na przepuszczalność błon komórek *Escherichia coli* ML35. W zależności od zastosowanego źródła węgla, przepuszczalność błon komórek tego szczepu ulegała istotnej zmianie. Wyniki uzyskane przez autorów publikacji [38], podobnie jak zaprezentowane w niniejszej pracy wskazują, że zastosowane źródło węgla w różny sposób wpływało na przepuszczalność błony komórkowej. Ponadto może ona ulegać modyfikacji w obecności związków powierzchniowo czynnych, co potwierdzają doświadczenia przeprowadzone przez autorów pracy [39], którzy stwierdzili, że przepuszczalność błon komórek *Pseudomonas aeruginosa* wzrastała w hodowlach zawierających sferolipidy. W trakcie badań opisanych w pracy [40] udowodniono również, że surfaktanty mogą zwiększać przepuszczalność błon komórkowych, natomiast w pracy [41] wykazano wzrost przepuszczalności komórek *Escherichia coli* DH5a spowodowany obecnością cieczy jonowej – chlorku 1-oktylo-3-metyloimidazoliowego. Jakkolwiek w cytowanych pozycjach literaturowych podejmowana była tematyka zmian właściwości powierzchniowych komórek w obecności różnych źródeł węgla, to nie sposób jednak wykazać bezpośredniej zależności między tymi parametrami a skutecznością procesu biodegradacji, co potwierdzają także wyniki prezentowanych badań.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że położenie atomu chloru w cząsteczce chloropochodnych toluenu miało istotny wpływ na biodegradację tych związków. Również hydrofobowość oraz przepuszczalność błony komórek szczepu *Raoultella planticola* SA2 zależały od położenia atomu chloru w cząsteczce chlorotoluenu, co nie miało jednak wpływu na potencjał dzeta hodowli komórek, którego wartość była porównywalna w obrębie danej hodowli. Stwierdzono, że po długotrwałym stresie metabolicznym właściwości powierzchniowe komórek bakterii uległy istotnym zmianom, zmieniała się również skuteczność biodegradacji chloropochodnych toluenu.

Obserwowane różnice między biodegradacją poszczególnych izomerów chlorotoluenu wykazały, że związki te – mimo podobnych właściwości fizycznych – w różnym stopniu ulegały biodegradacji oraz bardzo różnie oddziaływały na komórki mikroorganizmów. Oddziaływanie tych związków dotyczyło nie tylko aktywacji czy inhibicji odpowiednich szlaków metabolicznych, ale również budowy komórkowych struktur powierzchniowych, powiązanych z modyfikacją biodostępności degradowanych izomerów chlorotoluenu, co wskazuje na złożony wpływ tej grupy związków aromatycznych na mikroorganizmy obecne w środowisku gruntowo-wodnym.

Badania zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2015/19/N/NZ9/02423.

LITERATURA

1. C. TRELLU, E. MOUSSET, Y. PECHAUD, D. HUGUENOT, E.D. van HULLEBUSCH, G. ESPOSITO, M.A. OTURAN: Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: A critical review. *Journal of Hazardous Materials* 2016, Vol. 306, pp. 149–174.
2. D. DOBSLAW, K. H. ENGESSER: Degradation of 2-chlorotoluene by *Rhodococcus* sp. OCT 10. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, Vol. 93, pp. 2205–2214.
3. G. EIBES, G. FEIJOO, J. M. LEMA, M. T. MOREIRA: Enzymatic technologies for remediation of hydrophobic organic pollutants in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015, Vol. 99, No. 21, pp. 8815–8829.
4. M. ROSSBERG, W. LENDLE, G. PFLEIDERER, A. TÖGEL, E.-L. DREHER, E. LANGER, H. RASSAERTS, P. KLEINSCHMIDT, H. STRACK, R. COOK, U. BECK, K.-A. LIPPER, T. R. TORKELSON, E. LÖSER, K. K. BEUTEL, T. MANN: Chlorinated hydrocarbons. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, 2006.
5. I. MALISZEWSKA, J. URBANIAK: Zastosowanie pleśni z rodzaju *Penicillium* do biodegradacji związków chloroorganicznych (Biodegradation of chloroorganic compounds by mildew of the *Penicillium* genus). *Ochrona Środowiska* 1999, vol. 21, nr 2, ss. 25–28.
6. M. B. NINKOVIC, R. D. PETROVIC, M. D. LAUSEVIC: Removal of organochlorine pesticides from water using virgin and regenerated granular activated carbon. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2010, Vol. 76, No. 4, pp. 565–573.
7. P. BATTISTONI, E. COLA, F. FATONE, D. BOLZONELLA, A. L. EUSEBI: Micropollutants removal and operating strategies in ultrafiltration membrane systems for municipal wastewater treatment: preliminary result. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 2007, Vol. 46, pp. 6716–6723.
8. M. BODZEK: Przegląd możliwości wykorzystania technik membranowych w usuwaniu mikroorganizmów i zanieczyszczeń organicznych ze środowiska wodnego. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 2013, vol. 16, nr 1, ss. 5–37.
9. P. KIM, J. LLOYD, J. W. KIM, N. ABDOULMOUMINE, N. LABB: Recovery of creosote from used railroad ties by thermal desorption. *Energy* 2016, Vol. 111, pp. 226–236.
10. O. BRAASS, C. TIFFERT, J. HÖHNE, X. LUO, B. NIEMEYER: Decontamination of polyaromatic hydrocarbons from soil by steam stripping: mathematical modeling of the mass transfer and energy requirement. *Environmental Science and Technology* 2003, Vol. 37, pp. 5001–5007.
11. A. ŻARCZYŃSKI, A. STOPCZYK, M. ZABOROWSKI, Z. GORZKA, M. KAŻMIERCZAK: Usuwanie związków chloroorganicznych ze ścieków przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem metody termokatalitycznego utleniania (Removal of chloroorganic compounds from industrial effluents using various methods: Advantages of thermocatalytic oxidation). *Ochrona Środowiska* 2010, vol. 32, nr 1, ss. 49–54.
12. C. S. KARIGAR, S. S. RAO: Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Research* 2011, Vol. 2011, pp. 1–11.
13. M. FARHADIAN, D. DUCHEZ, C. LARROCHE: In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology* 2008, Vol. 99, No. 13, pp. 5296–5308.
14. J. R. JEON, K. MURUGESAN, I. H. NAM, Y. S. CHANG: Coupling microbial catabolic actions with abiotic redox processes: A new recipe for persistent organic pollutant (POP) removal. *Biotechnology Advances* 2013, Vol. 31, No. 2, pp. 246–256.
15. S. E. HEID, M. K. WALKER, H. I. SWANSON: Correlation of cardiotoxicity mediated by halogenated aromatic hydrocarbons to aryl hydrocarbon receptor activation. *Toxicological Sciences* 2001, Vol. 61, No 1, pp. 187–196.
16. E. KACZOREK, W. SMULEK, A. ZDARTA, A. SAWCZUK, A. ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK: Influence of saponins on the biodegradation of halogenated phenols. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2016, Vol. 131, pp. 127–134.
17. B. E. HAIGLER, J. C. SPAIN: Degradation of *p*-chlorotoluene by a mutant of *Pseudomonas* sp. strain JS6. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, Vol. 55, No 2, pp. 372–379.
18. U. BRINKMANN, W. REINEKE, B. U. WUPPERTAL, C. M. WUPPERTAL: Degradation of chlorotoluenes by in vivo constructed hybrid strains: Problems of enzyme specificity, induction and prevention of *meta*-pathway. *FEMS Microbiological Letters* 1992, Vol. 96, No 1, pp. 81–87.
19. K. NORDIN, M. UNELL, J. K. JANSSEN: Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, Vol. 71, No 11, pp. 6538–6544.
20. M. I. M. FERREIRA, J. R. MARCHESI, D. B. JANSSEN: Degradation of 4-fluorophenol by *Arthrobacter* sp. strain IF1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008, Vol. 78, No. 4, pp. 709–717.
21. Q. ZHAO, J.-Y. ZHANG, L.-Z. CHEN, J.-X. ZHENG, L. ZHAO, H.-M. YIN: Cell-surface hydrophobicity and degradation characteristics of hydrophobic hydrocarbon degrading bacteria. *Huanjing Kexue/Environmental Science* 2005, Vol. 26, No 5, pp. 132–136.
22. C. O. OBUEKWE, Z. K. AL-JADI, E. S. AL-SALEH: Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment, *International Biodeterioration and Biodegradation* 2009, Vol. 63, No 3, pp. 273–279.
23. H. TEBYANIAN, S. H. MIRHOSSEINY, O. SARRAFI, E. ALIAKBARI, M. HASSANSHAHIAN: Relationship between cell surface hydrophobicity and degradation of hexadecane. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2014, Vol. 2, No. 5, pp. 1613–1619.
24. Z. ZHAO, A. SELVAM, J. WOON-CHUNG WONG: Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. *Bioresource Technology* 2011, Vol. 102, No. 5, pp. 3999–4007.

25. S. JORDAN, M. I. HUTCHINGS, T. MASCHER: Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2008, Vol. 32, No 1, pp. 107–146.
26. W. SMULEK, A. ZDARTA, U. GUZIK, B. DUDZIŃSKA-BAJOREK, E. KACZOREK: *Rahnella* sp. strain EK12: Cell surface properties and diesel oil biodegradation after long-term contact with natural surfactants and diesel oil. *Microbiological Research* 2015, Vol. 176, pp. 38–47.
27. W. SMULEK, A. ZDARTA, A. PACHOLAK, A. ZGOŁA-GRZESKOWIAK, Ł. MARCZAK, M. JARZĘBSKI, E. KACZOREK: *Saponaria officinalis* L. extract: Surface active properties and impact on environmental bacterial strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017, Vol. 150, pp. 209–215.
28. D. C. BRESSLEER, M. R. GRAY: Transport and reaction processes in bioremediation of organic contaminants. 1. Review of bacterial degradation and transport. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 2003, Vol. 1, No. 1, pp. 1–16.
29. K. SALEK, A. ZGOŁA-GRZESKOWIAK, E. KACZOREK: Modification of surface and enzymatic properties of *Achromobacter denitrificans* and *Stenotrophomonas maltophilia* in association with diesel oil biodegradation enhanced with alkyl polyglucosides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013, Vol. 111, pp. 36–42.
30. E. KACZOREK, K. SALEK, U. GUZIK, B. DUDZIŃSKA-BAJOREK, A. OLSZANOWSKI: The impact of long-term contact of *Achromobacter* sp. 4(2010) with diesel oil – changes in biodegradation, surface properties and hexadecane monooxygenase activity. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2013, Vol. 78, pp. 7–16.
31. K. POLLMANN, V. WRAY, D. H. PIEPER: Chloromethylmuconolactones as critical metabolites in the degradation of chloromethylcatechols: Recalcitrance of 2-chlorotoluene. *Journal of Bacteriology* 2005, Vol. 187, No 7, pp. 2332–2340.
32. K. POLLMANN, S. BEIL, D. H. PIEPER: Transformation of chlorinated benzenes and toluenes by *Ralstonia* sp. strain PS12 *tecA* (tetrachlorobenzene dioxygenase) and *tecB* (chlorobenzene dihydrodiol dehydrogenase) gene products. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, Vol. 67, No 9, pp. 4057–4063.
33. M. A. HARO, V. de LORENZO: Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: Construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene. *Journal of Biotechnology* 2001, Vol. 85, No 2, pp. 103–113.
34. A. LEHNING, U. FOCK, R. M. WITTICH, K. N. TIMMIS, D. H. PIEPER: Metabolism of chlorotoluenes by *Burkholderia* sp. strain PS12 and toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida* F1: Evidence for monooxygenation by toluene and chlorobenzene dioxygenases. *Applied and Environmental Microbiology* 1997, Vol. 63, No 5, pp. 1974–1979.
35. J. ZHANG, Z. SUN, Y. LI, X. PENG, W. LI, Y. YAN: Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity. *Journal of Hazardous Materials* 2009, Vol. 163, pp. 723–728.
36. H. GÓRNA, Ł. ŁAWNICZAK, A. ZGOŁA-GRZESKOWIAK, E. KACZOREK: Differences and dynamic changes in the cell surface properties of three *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-polluted soil as a response to various carbon sources and the external addition of rhamnolipids. *Bioresource Technology* 2011, Vol. 102, pp. 3028–3033.
37. W. TIAN, J. YAO, R. LIU, M. ZHU, F. WANG, X. WU, H. LIU: Effect of natural and synthetic surfactants on crude oil biodegradation by indigenous strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2016, Vol. 129, pp. 171–179.
38. K. GUVEN, M. YOLCU, R. GUL-GUVEN, S. ERDOGAN, D. D. POMERAI: The effects of organic pesticides on inner membrane permeability in *Escherichia coli* ML35. *Cell Biology and Toxicology* 2005, Vol. 21, pp. 73–81.
39. H. B. SHEN, X. Y. YONG, Y. L. CHEN, Z. H. LIAO, R. W. SI, J. ZHOU, S. Y. WANG, Y. C. YONG, P. K. OU YANG, T. ZHENG: Enhanced bioelectricity generation by improving pyocyanin production and membrane permeability through sophorolipid addition in *Pseudomonas aeruginosa* – inoculated microbial fuel cells. *Bioresource Technology* 2014, Vol. 167, pp. 490–494.
40. S. LIU, C. GUO, X. LIANG, F. WU, Z. DANG: Nonionic surfactants induced changes in cell characteristics and phenanthrene degradation ability of *Sphingomonas* sp. GY2B. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2016, Vol. 129, pp. 210–218.
41. C. JING, L. MU, T. REN, B. LI, S. CHEN, W. NAN: Effect of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride on cell replication and membrane permeability of *Escherichia coli* DH5a. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2014, Vol. 93, pp. 60–63.

Pacholak, A., Smulek, W., Kaczorek, E. Impact of Metabolic Stress on Biodegradation of Chlorotoluene Derivatives and Modification of *Raoultella planticola* SA2 Surface Characteristics. *Ochrona Srodowiska* 2018, Vol. 40, No. 2, pp. 23–29.

Abstract: Chlorotoluene isomers are used in a number of industries and their wide application results in the uncontrolled release of these compounds to the environment. Therefore, their removal is required primarily from the soil-water environment. Numerous physicochemical methods are in use to remove organic compounds from the ecosystem. However, their primary disadvantage is a question of further utilization of substances removed. Therefore, biological methods that employ microbial ability to degrade toxic organic compounds become increasingly popular. In the study, effect of a long-term contact between the *Raoultella planticola* SA2 strain and chlorotoluene isomers on biodegradation of these compounds was determined. Impact evaluation of each isomer on surface characteristics of microorganisms involved in the biodegradation process was another significant component of the research. Therefore,

changes in the membrane permeability, zeta potential and bacterial cell surface hydrophobicity were measured. Further, effect of prolonged contact with the microorganisms (so-called metabolic stress) on susceptibility of selected isomers to biodegradation was examined. The observed differences between biodegradation of individual chlorotoluene isomers demonstrated that despite similar physical characteristics, a degree of their biodegradation varied as well as their effects on the microbial cells. The long-term contact of chloroaromatic compounds with the microorganisms was an important factor during their biodegradation. Moreover, the results indicated that the chlorine atom position had a strong impact on the chlorotoluene isomer biodegradation and the bacterial surface properties. Bacteria under the long-term stress conditions were able to degrade the chlorotoluene isomers faster and more effectively. Their surface characteristics changed as well.

Keywords: Soil-water environment, toxic organic compounds, chlorotoluene isomers, biodegradation, *Raoultella planticola* SA2 strain, zeta potential, membrane permeability, cell surface hydrophobicity, metabolic stress.