

ŻANETA SWĘDZIOL, AGNIESZKA MROZIK

Katedra Biochemii
Uniwersytet Śląski w Katowicach

PROFILE KWASÓW TŁUSZCZOWYCH DZIKIEGO I MODYFIKOWANEGO GENETYCZNIE SZCZEPU *PSEUDOMONAS VESICULARIS* W CZASIE ROZKŁADU FENOLU W GLEBIE

Streszczenie. Celem pracy była analiza metylowych estrów kwasów tłuszczowych (FAMES) dzikiego szczepu *Pseudomonas vesicularis* i modyfikowanego genetycznie *P. vesicularis* (pBR322) w czasie rozkładu fenolu w glebie. Na podstawie badań biodegradacyjnych stwierdzono, że oba szczepy rozkładały fenol w dawce 1,7 mg/g gleby w ciągu 20 dni. Jednocześnie nie obserwowano różnic między aktywnością degradacyjną komórek obu szczepów oraz przeżywalnością inokulantów w glebie. Analiza FAMES w czasie rozkładu fenolu przez wprowadzone do gleby szczepy wykazała stopniowy wzrost w niej zawartości kwasów nasyconych. Ich największy udział oznaczono w dniu, w którym ubytek fenolu w glebie wynosił 76-91% wprowadzonej dawki. Na szczególną uwagę zasługuje kwas 19:0cy ω8c, który może być markerem stopnia rozkładu fenolu w glebie.

Słowa kluczowe: *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas vesicularis* (pBR322), gleba, fenol, degradacja, przeżywalność, kwasy tłuszczowe

Wstęp

Do monitorowania przeżywalności wprowadzanych do gleby mikroorganizmów oraz oceny zmian zachodzących w ich komórkach w czasie degradacji związków aromatycznych wykorzystuje się liczne techniki biologii molekularnej oraz metody klasyczne. Do metod molekularnych, opartych na analizie DNA lub RNA, należą: *in situ* FISH, PCR-DGGE, ARDRA, T-RFLP i RISA (WIĘCKIEWICZ 2009). Z kolei analizy metylowych estrów kwasów tłuszczowych (FAMES) oraz fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PFLAs) są przydatne do badania stanu fizjologicznego komórek oraz śledzenia zmian w zespołach mikroorganizmów glebowych w warunkach stresu środo-

wiskowego (PIOTROWSKA-SEGET i MROZIK 2003, URUNG-DEMIRTAS i IN. 2006). Z danych literaturowych wynika, że związki o strukturze aromatycznej wpływają na skład i chemiczne modyfikacje kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych bakterii. W odpowiedzi na pojawienie się tych związków w środowisku bakterie uruchamiają szereg mechanizmów, które mają na celu utrzymanie płynności i przepuszczalności błony na stałym poziomie (DIEFENBACH i IN. 1992, HEIPIEPER i IN. 1992, GUTIERREZ i IN. 1999, MROZIK i IN. 2002).

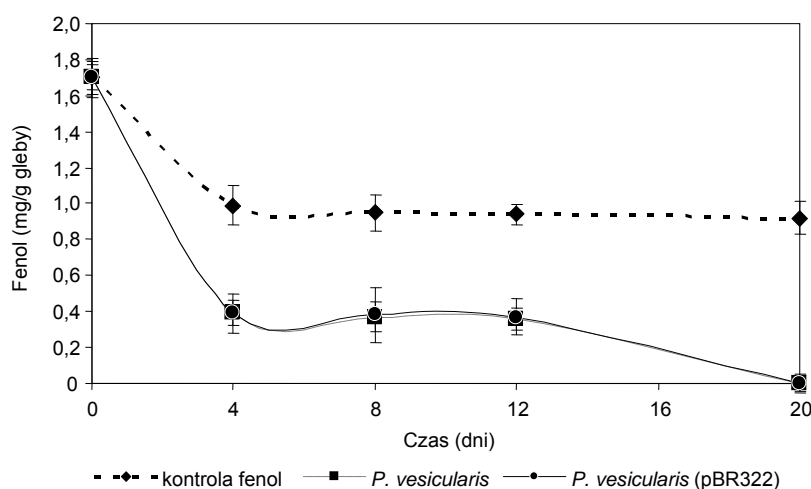
Celem pracy była analiza FAMES dzikiego i modyfikowanego genetycznie szczepu *Pseudomonas vesicularis* w czasie rozkładu fenolu w glebie.

Materialy i metody

W badaniach wykorzystano dziki szczep *P. vesicularis* oraz modyfikowany genetycznie *P. vesicularis* (pBR322) (MROZIK i SWĘDZIÓŁ 2010). Gleba do badań pochodziła z podmokłej łąki w Sosnowcu i była wolna od zanieczyszczeń fenolowych. W świeżej glebie oznaczono wilgotność (22,11% w 1 g s.m. gleby) i zawartość materii organicznej (23,55%). Gleba miała odczyn kwaśny (pH 5,70), a liczebność bytujących w niej mikroorganizmów wynosiła $6,20 \times 10^7$ w 1 g gleby. Świeżą glebę suszono w temperaturze pokojowej, przesiewano, które porcjowano po 150 g do szklanych naczyń, sterylizowano czterokrotnie w odstępach 24-godzinnych, a następnie wprowadzono do nich fenol w dawce 1,7 mg/g gleby (170 mg na 100 g gleby). Do sterylnej gleby dodawano pojedynczo szczepy o wyjściowej liczbie komórek $4,45 \times 10^7$ na 1 g gleby i $4,93 \times 10^7$ na 1 g gleby odpowiednio dla *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322). Taką liczbę komórek uzyskiwano w 6. godzinie hodowli szczepów w bulionie odżywczym. Kontrole w badaniach stanowiły gleby bez dodatku fenolu zawierające bakterie (kontrole przeżywalności szczepów) oraz gleba skażona fenolem niezawierająca bakterii (kontrola stężenia fenolu). Wszystkie gleby inkubowano w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła, utrzymując stałą wilgotność na poziomie 50% ich pojemności wodnej. Stężenie fenolu wyekstrahowanego z gleb metanolem oznaczano kolorymetryczną metodą z *p*-nitroaniliną w 1., 4., 12. i 20. dniu inkubacji (LURE i RYBNIKOVA 1968). W tych samych odstępach czasu oznaczano przeżywalność bakterii metodą płytkową na agarze odżywczym (MROZIK i SWĘDZIÓŁ 2010). Wszystkie oznaczenia laboratoryjne wykonywano w trzech powtórzeniach. Izolacje kwasów tłuszczowych z komórek bakterii hodowanych w bulionie odżywczym przed introdukcją do gleb prowadzono zgodnie z procedurą opracowaną przez SASSERA (1990), a z gleby – metodą zmodyfikowaną przez KOZDROJA (2000). Otrzymane FAMES rozdzielano z użyciem chromatografu gazowego Hewlett-Packard 6890 i identyfikowano z wykorzystaniem oprogramowania Sherlock firmy MIDI Inc. (wersja 3.9). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu nieparametrycznego Wilcoxon (Statistica 8,0 firmy StatSoft Inc.).

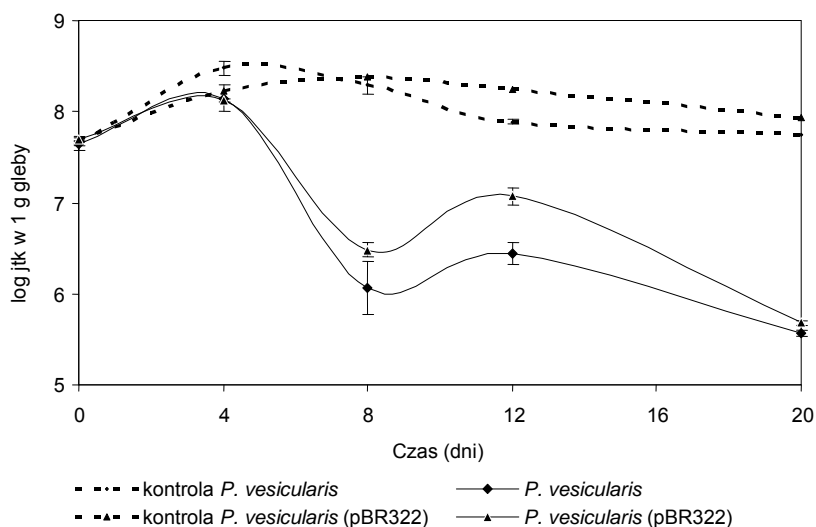
Wyniki

Z danych literaturowych wynika, że dziki szczep *P. vesicularis* ma zdolność rozkładu szeregu różnych związków aromatycznych w glebie, np. fenolu, *p*-krezolu, naftalenu oraz fluorantrenu (MROZIK i ŁABUŻEK 2002, CHERIAA i IN. 2008). Nie prowadzono dotąd badań nad rozkładem związków aromatycznych przez ten szczep zawierający plazmid pBR322. W celu zbadania, jak przebiega rozkład fenolu przez preadaptowane do rozkładu tego związku szczepy *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322), introdukowano je pojedynczo do sterylnej gleby skażonej dawką fenolu 1,7 mg/g. Na podstawie obserwacji dynamiki rozkładu fenolu stwierdzono, że oba szczepy degradowały go w ciągu 20 dni. Największy ubytek fenolu, wynoszący 77% wyjściowej dawki, oznaczono w 4. dniu inkubacji. W glebie kontrolnej niezawierającej bakterii ubytek fenolu w tym czasie wynosił 42%. Równoległe badano przeżywalność obu szczepów w glebie nieskażonej i skażonej fenolem. W 4. dniu inkubacji w glebie z dodatkiem fenolu oznaczono o 6% więcej komórek *P. vesicularis* i o 5% więcej *P. vesicularis* (pBR322) niż do niej wprowadzono. W tym czasie w glebie bez dodatku fenolu liczba komórek obu szczepów wzrosła odpowiednio o 11% i 7%. W ostatnim, 20. dniu dokonywanych oznaczeń stwierdzono, że liczba komórek obu szczepów w glebie skażonej fenolem znacznie się zmniejszyła i stanowiła 79% wprowadzonej liczby komórek *P. vesicularis* i 84% *P. vesicularis* (pBR322). Z kolei w glebach kontrolnych od 4. do 20. dnia liczba komórek obu szczepów utrzymywała się na podobnym poziomie. Dynamikę rozkładu fenolu w dawce 1,7 mg/g gleby oraz przeżywalność szczepów *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) w glebach skażonych tym związkiem oraz w glebie kontrolnej ilustrują rysunki 1 i 2.



Rys. 1. Dynamika rozkładu fenolu w dawce 1,7 mg/g gleby przez szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) oraz zmiany stężenia fenolu w glebie kontrolnej

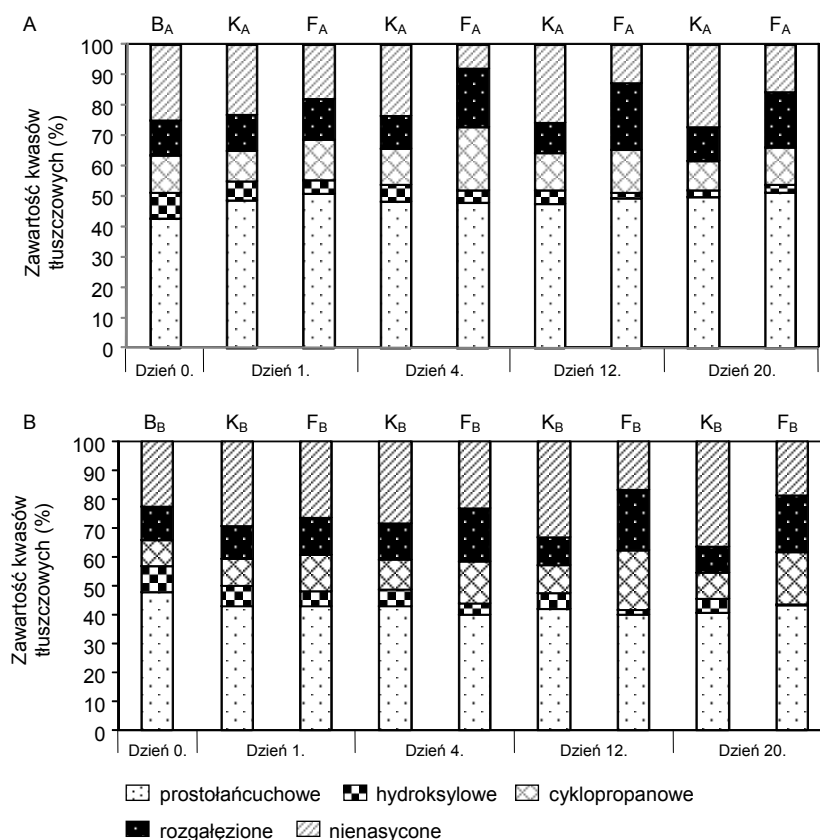
Fig. 1. Dynamics of phenol degradation in soil at the concentration of 1.7 mg/g of soil by *Pseudomonas vesicularis* and *P. vesicularis* (pBR322) strains and changes of phenol concentration in control soil



Rys. 2. Przeżywalność szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) w glebie skażonej fenolem w dawce 1,7 mg/g gleby oraz w glebie kontrolnej
 Fig. 2. The survival of *Pseudomonas vesicularis* and *P. vesicularis* (pBR322) strains in soil contaminated with phenol at the concentration of 1.7 mg/g of soil and in control soil

Przeprowadzone analizy FAMES wykazały, że udział kwasów nasyconych i nienasyconych w glebach stanowiących kontrole przeżywalności szczepów *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) był zbliżony do tego, jaki oznaczono w profilu tych bakterii hodowanych w bulionie odżywczym przed introdukcją do gleby. Z kolei w ekstraktach FAMES uzyskanych w czasie rozkładu fenolu z gleby skażonej tym związkim z introdukowanymi pojedynczo szczepami stwierdzono wzrost zawartości kwasów nasyconych, głównie cyklopropanowych i rozgałęzionych. Największą zawartość kwasów nasyconych, wynoszącą 92,11%, oznaczono w glebie zawierającej szczep *P. vesicularis* w 4. dniu inkubacji. W kolejnych dniach udział kwasów nasyconych malał i w 20. dniu wynosił w tej glebie 84,51% wszystkich izolowanych FAMES. Z kolei w komórkach *P. vesicularis* (pBR322) wprowadzonych do gleby skażonej fenolem następował wzrost udziału tych kwasów z 73,62% w 4. dniu do 83,03% w 12. dniu. Wśród kwasów nasyconych największy udział miały kwasy prostołańcuchowe. Największą ich zawartość, wynoszącą 50,67% i 43,02%, stwierdzono w profilach FAMES uzyskanych z gleby z introdukowanymi szczepami *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) w 20. dniu inkubacji. Zawartość kwasów cyklopropanowych w ekstraktach FAMES pochodzących z gleby skażonej fenolem z introdukowanym dzikim szczepem była największa – 20,98% – w 4. dniu, a z introdukowanym szczepem modyfikowanym genetycznie – 20,58% – w 12. dniu. Po tym czasie zawartość kwasów z pierścieniem cyklopropanowym malała i w 20. dniu eksperymentu wynosiła w komórkach tych szczepów – odpowiednio – 12,26% i 17,98%. Na szczególną uwagę wśród kwasów z pierścieniem cyklopropanowym zasługuje kwas 19:0cy ω8c. Udział tego kwasu był największy w ko-

mórkach *P. vesicularis* w glebie skażonej fenolem w 4. dniu (12,64%), a w komórkach *P. vesicularis* (pBR322) w tej samej glebie w 12. dniu (14,44%). Inną zmianą w profilach kwasów tłuszczowych badanych szczepów w czasie rozkładu fenolu w glebie był wzrost zawartości kwasów rozgałęzionych mniej więcej o 8% do 12. dnia. W ostatnim, 20. dniu ich udział był mniejszy i wynosił odpowiednio w komórkach *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) 18,29% i 19,44% ogólnej zawartości wszystkich izolowanych FAMES. Zawartość wyodrębnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z komórek szczepu dzikiego i modyfikowanego genetycznie z gleby skażonej fenolem i zaszczipionej tymi bakteriami oraz z kontroli przeżywalności obu szczepów ilustruje rysunek 3.



Rys. 3. Zawartość wyodrębnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z bakterii *Pseudomonas vesicularis* (A) i *P. vesicularis* (pBR322) (B) przed introdukcją do gleby (BA, BB), izolowanych z gleby skażonej fenolem i zawierającej wprowadzone szczepy (FA, FB) oraz z gleb kontrolnych (KA, KB)

Fig. 3. The proportions of selected fatty acid groups isolated from *Pseudomonas vesicularis* (A) and *P. vesicularis* (pBR322) (B) before introduction into soil (BA, BB), isolated from soil contaminated with phenol and containing both strains (FA, FB) and from control soil (KA, KB)

Dyskusja

Z przeprowadzonych badań wynika, że szczep dziki *P. vesicularis* i modyfikowany genetycznie *P. vesicularis* (pBR322) nie różniły się dynamiką rozkładu w glebie zastosowanej dawki fenolu. Stwierdzono także, że przeżywalność obu szczepów w obecności fenolu była podobna. Lepsza ich przeżywalność w glebach niezawierających substratu fenolowego wskazuje na znaczną toksyczność zastosowanej dawki tego związku. Również mniejszą przeżywalność bakterii *P. stutzeri* po ich wprowadzeniu do dwóch różnych gleb, próchniczej i gliniastej, skażonych fenolem w ilości 1,7 mg/g gleby obserwowały w swoich badaniach MROZIK i IN. (2008). Stwierdziły, że liczba introdukowanych do tych gleb bakterii w ciągu pierwszych czterech dni eksperymentu zmniejszyła się pod wpływem fenolu o 20-36% w stosunku do kontroli. Kolejny spadek liczby bakterii, o 36% i 6% odpowiednio w glebie próchniczej i gliniastej, zaobserwowały w dniu, w którym stwierdziły całkowity rozkład wprowadzonej dawki fenolu.

Przeprowadzone analizy FAMES wykazały, że w glebie nieskażonej fenolem z introdukowanymi pojedynczo szczepami w kolejnych dniach oznaczeń zawartość kwasów nasyconych i nienasyconych była zbliżona. Na tej podstawie można stwierdzić, że udział poszczególnych grup kwasów tłuszczowych w kolejnych dniach inkubacji w nieskażonej fenolem glebie był typowy i charakterystyczny dla badanych szczepów. Z kolei w ogólnym profilu FAMES uzyskanych z gleb skażonych fenolem z dodatkiem inokulantów wraz z postępującym rozkładem tego związku w glebie zwiększał się udział kwasów rozgałęzionych i cyklopropanowych. Wzrost zawartości kwasów rozgałęzionych może wskazywać na ich istotny udział w mechanizmach adaptacji bakterii do obecności związków fenolowych. Taką zależność wykazali m.in. TSITKO i IN. (1999) w czasie badań nad wpływem benzenu, fenolu i toluenu na skład i modyfikacje chemiczne komórkowych kwasów tłuszczowych u bakterii *Rhodococcus opacus*. Grupa kwasów cyklopropanowych w ekstraktach FAMES pochodzących ze skażonej fenolem gleby i zawierającej badane szczepy była reprezentowana przez dwa rodzaje kwasów: 17:0cy i 19:0cy ω8c. Pierwszy z nich występował w wyjściowym profilu obu szczepów przed introdukcją do gleby oraz w profilu FAMES uzyskanych z gleb kontrolnych przeżywalności obu szczepów, drugi natomiast był nowym kwasem cyklopropanowym, który izolowano od 1. dnia wyłącznie z gleb z dodatkiem fenolu, zawierających oba szczepy. Jednocześnie stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości kwasu 19:0cy ω8c w ogólnym profilu kwasów malała zawartość nienasyconego kwasu 18:1 ω7c, co może wskazywać na jego postsyntetyczną modyfikację do kwasu cyklopropanowego. Z danych literaturowych wynika, że kwasy cyklopropanowe powstają w błonie komórkowej na skutek reakcji cyklizacji podwójnego wiązania w jednonienasyconych łańcuchach acylowych fosfolipidów, którą przeprowadza enzym syntaza cyklopropanowa. Pierścień cyklopropanowy powstaje w celu zabezpieczenia wiązania podwójnego przed utlenieniem, przez co stabilizuje lipidy (GROGAN i CRONAN 1997, MROZIK i IN. 2002). Na podkreślenie zasługuje także to, że kwas 19:0cy ω8c został uznany przez MROZIK i IN. (2008) za markerowy w ocenie stopnia skażenia gleb fenolem. Na podstawie analizy statystycznej z użyciem testu Wilcoxon stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic między profilami obu szczepów w czasie rozkładu fenolu w glebie.

Wnioski

1. Na podstawie badań biodegradacyjnych stwierdzono, że oba szczepy *P. vesicularis* i *P. vesicularis* (pBR322) rozkładały zastosowaną dawkę fenolu 1,7 mg/g gleby w ciągu 20 dni i ich przeżywalność w skażonych glebach była zbliżona.
2. Modyfikacja genetyczna polegająca na wprowadzeniu do komórek *P. vesicularis* plazmidu pBR322 nie miała wpływu na aktywność degradacyjną bakterii.
3. Analiza profili FAMES umożliwiła monitorowanie procesu degradacji fenolu zachodzącego z udziałem tych bakterii w glebie.
4. Wykorzystane w badaniach szczepy mogą być przydatne w usuwaniu fenolu ze środowiska glebowego.

Literatura

- CHERIAA J., MOSRATI R., LADHARI N., BAKHROUF A., 2008. Acclimated biomass that degrades sulfonated naphthalene formaldehyde condensate. *Pak. J. Biol. Sci.* 11, 12: 1588-1593.
- DIEFENBACH R., HEIPIEPER H.J., KEWELOH H., 1992. The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 3: 382-387.
- GROGAN D.W., CRONAN J.E., 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 4: 429-441.
- GUTIERREZ J.A., NICHOLS P., COUPERWHITE I., 1999. Changes in whole cell-derived fatty acids induced by benzene and occurrence of the unusual 16:1 ω 6c in *Rhodococcus* sp. 33. *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 1: 213-218.
- HEIPIEPER H.J., DIEFENBACH R., KEWELOH H., 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 6: 1847-1852.
- KOZDRÓJ J., 2000. Microflora of technogenous wastes characterised by fatty acid analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 155, 3: 149-156.
- LURE JU., RYBNIKOVA I., 1968. *Chimičeskij analiz proizvodstvennyh stočnyh vod.* Gazchimizdat, Moskva.
- MROZIAK A., ŁABUZEK S., 2002. A comparison of biodegradation of phenol and homologous compounds by *Pseudomonas vesicularis* and *Staphylococcus sciuri* strains. *Acta Microbiol. Pol.* 51, 4: 367-378.
- MROZIAK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., ŁABUZEK S., 2002. Kwasy tłuszczowe błon komórkowych bakterii jako wskaźniki toksyczności związków aromatycznych. *Post. Mikrobiol.* 41, 2: 185-197.
- MROZIAK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., ŁABUZEK S., 2008. FAMES profiles of phenol-degrading *Pseudomonas stutzeri* introduced into soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62, 3: 319-324.
- MROZIAK A., SWĘDZIÓŁ Ż., 2010. Bioaugmentacja gleby skażonej fenolem z użyciem szczepu *Pseudomonas vesicularis* (pBR322). *Ekol. Tech.* 18, 2: 87-93.
- PIOTROWSKA-SEGET Z., MROZIAK A., 2003. Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Pol. J. Environ. Stud.* 12, 6: 669-675.
- SASSER M., 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *MIDI Tech. Note* #101.
- TSITKO I.V., ZAITSEV G.M., LOBANOK A.G., SALKINOJA-SALONEN M.S., 1999. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2: 853-855.

Swędziół Ż., Mrozik A., 2010. Profile kwasów tłuszczowych dzikiego i modyfikowanego genetycznie szczepu *Pseudomonas vesicularis* w czasie rozkładu fenolu w glebie. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #96.

URUNG-DEMIRTAS M., STARK B., PAGILLA K., 2006. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 3: 145-164.

WIĘCKIEWICZ M., 2009. Molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach. *Post. Mikrobiol.* 46, 1: 67-73.

FATTY ACID PROFILES OF WILD AND GENETICALLY MODIFIED STRAIN *PSEUDOMONAS VESICULARIS* DURING PHENOL DEGRADATION IN SOIL

Summary. The aim of this study was to analyze FAMES profiles of wild *Pseudomonas vesicularis* strain and genetically modified *P. vesicularis* (pBR322) strain during phenol degradation in soil. It was found that the complete degradation of phenol at the concentration of 1.7 mg/g in soil inoculated with single strains *P. vesicularis* and *P. vesicularis* (pBR322) proceeded within 20 days. Simultaneously, no difference between their degradative activity and survival of inoculants in soil was observed. Under phenol exposure significant alterations in FAMES profiles of both strains inoculated into contaminated soil were connected with the content of saturated fatty acids. Their percentages increased significantly when 76-91% of the initial dose of phenol was removed. Other noticeable change included the increase of cyclopropane fatty acid 19:0cy ω8c content during phenol elimination from soil.

Key words: *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas vesicularis* (pBR322), soil, phenol, degradation, survival, fatty acids

Adres do korespondencji – Corresponding address:

Żaneta Swędziół, Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland, e-mail: zswedziol@us.edu.pl

Zaakceptowano do druku – Accepted for print:

18.10.2010

Do cytowania – For citation:

Swędziół Ż., Mrozik A., 2010. Profile kwasów tłuszczowych dzikiego i modyfikowanego genetycznie szczepu *Pseudomonas vesicularis* w czasie rozkładu fenolu w glebie. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #96.