

Występowanie i biodegradacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w osadach dennych

Katarzyna Klimaszewska
Instytut Systemów Inżynierii Środowiska
Politechnika Warszawska
Warszawa

1. Wstęp

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) należą do jednych z najbardziej toksycznych zanieczyszczeń środowiska. Są to związki o dużej masie cząsteczkowej składające się z kilku lub kilkunastu skondensowanych pierścieni benzenowych.

WWA powstają w wyniku niecałkowitego spalania materiałów organicznych oraz metabolizmu niektórych organizmów żywych. Mogą być one zarówno pochodzenia naturalnego (pożary lasów, działalność wulkaniczna) jak i antropogenicznego (przemysł, komunikacja, spalanie odpadów miejskich).

Są to związki hydrofobowe o słabej lub złej rozpuszczalności w wodzie. W zależności od budowy cząsteczki wykazują różną aktywność mutagenną i kancerogenną. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (U.S. EPA) wytypowała szesnaście wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, które powinny być oznaczane przy ocenie stopnia zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Za najbardziej toksyczny, wśród nich, został uznany benzo[α]piren.

Badania dotyczące dynamiki przemian WWA, migracji z jednego elementu środowiska do drugiego oraz wpływu na organizmy żywe będą punktem wyjścia do rozpoczęcia działań mających na celu ochronę zdrowia i życia człowieka.

2. Występowanie WWA w środowisku

Policykliczne węglowodory aromatyczne występują we wszystkich elementach środowiska jako naturalne zanieczyszczenia oraz jako zanieczyszczenia pochodzenia antropogenicznego (1).

Na skutek emisji z przeróżnych źródeł WWA dostają się do atmosfery. Tam ulegają transportowi oraz przemianom chemicznym i fotochemicznym

(2). W atmosferze WWA mogą być adsorbowane przez cząstki stałe, zawieszone w powietrzu. Ze względu na swoją dużą masę cząsteczkową WWA opadają na ziemię i wody powierzchniowe. Do wód węglowodory te dostają się również dzięki opadom atmosferycznym, które wymywają zawieszony w powietrzu cząstki zawierające WWA. Wymywanie przez opady zachodzi także z powierzchni gruntów i zanieczyszczonych ulic (3).

Duże ilości tych węglowodorów, które dostają się do wód powierzchniowych, adsorbowane są na materii organicznej rozproszonej w wodzie lub ulegają sedimentacji i adsorpcji w osadach dennych (4,5).

Z przeprowadzonych badań (6,3,7) wynika, że największe stężenia WWA w środowisku występują w osadach dennych wód powierzchniowych oraz w glebach. Przykładowe stężenia i zakresy stężeń w osadach dennych czterech przykładowych WWA z listy U.S. EPA (8) podano w tabeli 1.

TABELA 1
STĘŻENIA WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH W OSADACH DENNYCH

Miejsce poboru	Data poboru	Stężenia WWA [$\mu\text{g}/\text{kg sm}$]			
		antracen	fluoranten	piren	benzo[α]piren
Polska zb. Tresna cz. wlot. (1)	1979	3,2 - 216,9	13,2 - 758,0	20,9 - 741,0	30,0 - 429,0
Polska zb. Dzierżno Duże cz. wlot. (1)	1979	1288 - 6390	2444 - 5532	2359 - 5863	295 - 1750
Polska, Warszawa Potok Służewiecki (3)	(10) 1988	-	2,47	-	0,62
Polska, Warszawa Potok Służewiecki (3)	(03) 1989	-	781,5	-	109,3
Włochy, Wenecka Łaguna Canale Grande (7)	lato 1992	2700	-	-	9300
Włochy, Wenecja otwarte morze (7)	lato	5,2	-	-	17
Niemcy, Lobitch Ren (9)	1994	-	500 - 2800	-	300 - 1200

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zaadsorbowane przez materię organiczną zawartą w osadach dennych są trudniej dostępne dla mikroorganizmów zdolnych do rozkładu wielkocząsteczkowych związków organicz-

nych (10), jakkolwiek stwierdzono, że w środowisku glebowym i osadach dennych mogą występować wyspecjalizowane szczepy mikroorganizmów, które rozkładają te związki (11).

3. Biodegradacja WWA

Biodegradacja jest podstawowym procesem usuwania szkodliwych związków organicznych ze środowiska naturalnego. Może ona zastąpić inne sposoby detoksykacji szkodliwych odpadów, jak np. spalanie (12).

Na skutek ciągłego dostarczania zanieczyszczeń do ekosystemów obecne w nich mikroorganizmy wyspecjalizowują się w transformacji tych związków, traktując je jako źródło węgla niezbędnego do własnych procesów metabolicznych (7). W wyniku wieloletnich eksperymentów zaobserwowano, że do przemian WWA niezbędna jest obecność tlenu cząsteczkowego (13,14), aczkolwiek przeprowadzane są również badania dotyczące anaerobowych przemian tych związków.

Biodegradacja WWA podlega ogólnej zasadzie, że im mniej pierścieni benzenowych w cząsteczce węglowodoru tym szybciej zachodzi rozkład. Węglowodory o większej masie cząsteczkowej takie jak piren, benzo[α]piren, znajdujące się w osadach dennych są bardziej odporne na działanie mikroorganizmów niż niskocząsteczkowe policykliczne węglowodory aromatyczne, jak np. antracen (15).

W wyniku wieloletnich badań udało się wyodrębnić bakterie i grzyby odpowiedzialne za rozkład WWA w osadach dennych. Przykładowe mikroorganizmy zamieszczono w tabeli 2.

TABELA 2
PRZYKŁADY ORGANIZMÓW ODPOWIEDZIALNYCH ZA ROZKŁAD WWA W ŚRODOWISKU

Związek	Bakterie	Grzyby
antracen	<i>Pseudomonas</i> sp. (6)	<i>Cunninghamella elegans</i> (21) <i>Rhizoctonia solani</i> (13)
fluoranten	<i>Alcaligenes denitrificans</i> (16) <i>Mycobacterium</i> sp. (17) <i>Pseudomonas putida</i> (18) <i>Pseudomonas paucimobilis</i> (19) <i>Pseudomonas</i> sp. (6)	<i>Cunninghamella elegans</i> (22)
piren	<i>Mycobacterium</i> sp. (17) <i>Rhodococcus</i> sp. (14)	<i>Cunninghamella elegans</i> (23)
benzo[α]piren	<i>Mycobacterium</i> sp. (17) <i>Beijerinckia</i> sp. (20)	<i>Cunninghamella elegans</i> (15) <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (24)

Biodegradacja WWA w dużym stopniu zależna jest od warunków środowiskowych. Do czynników wpływających na przemiany tych związków przez

mikroorganizmy należą: temperatura, pH, rodzaj osadu, dostępność tlenu oraz poprzednie narażenie osadów na wpływ WWA. Zauważono, że w glebach i osadach dennych narażonych na ciągłe zanieczyszczenie policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi biodegradacja zachodzi znacznie lepiej niż w środowisku, które nie było uprzednio poddane ich wpływowi. Wynika to z większego namnażania się mikroorganizmów zdolnych do rozkładu tych związków w środowiskach o podwyższonych stężeniach WWA (11).

Podatność policyklicznych węglowodorów aromatycznych na rozkład zależy również od fizycznych i chemicznych właściwości tych związków oraz od składu osadów (12). Odporność na biodegradację rośnie proporcjonalnie do wzrostu masy molowej związku i współczynnika podziału oktanol — woda, a odwrotnie proporcjonalnie do rozpuszczalności w wodzie (4). Lepsza rozpuszczalność wpływa na gorszą sorpcję w osadach dennych, a co za tym idzie, lepszą biodostępność (20).

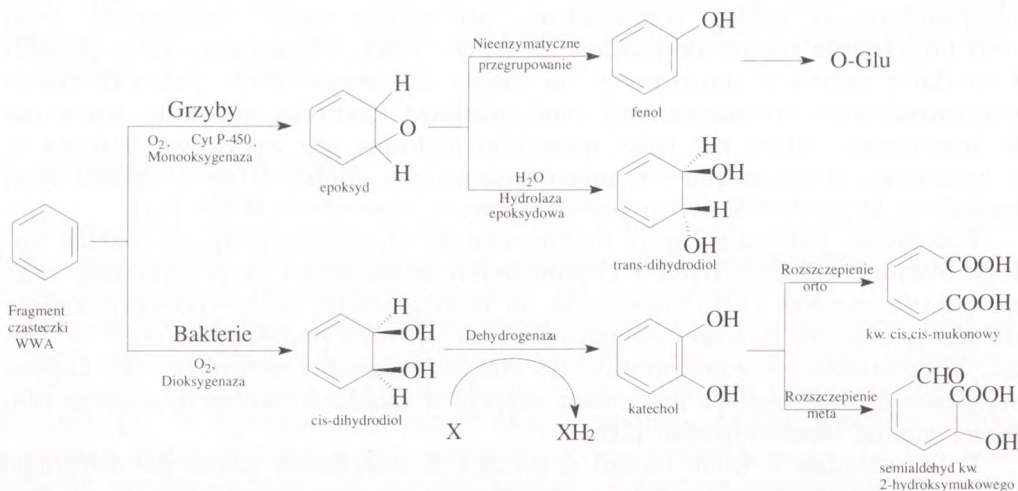
Przeprowadzono wiele badań dotyczących określenia czasu połowicznego rozpadu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w osadach dennych. Otrzymane wartości różniły się znacznie między sobą w zależności od warunków w jakich ten rozkład zachodził i w jakich elementach środowiska był rozpatrywany (25). Wyniki tych badań potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia, że rozkład związków niskocząsteczkowych jest szybszy, a także, iż uprzedni kontakt mikroflory z WWA zwiększa prędkość rozpadu tych związków. Zebrane przez Wilda (25) czasy połowicznego rozpadu antracenu, fluorantenu, pirenu i benzo[α]pirenu podano w tabeli 3.

TABELA 3
CZASY POŁOWICZNEGO ROZPADU WWA PODANE W TYGODNIACH

Związek	Antraceni	Fluoranteni	Piren	Benzo[α]piren
czas połowicznego rozpadu	0,5 – 26	5,3 – 26	0,4 – 90	0,3 – 300

Niewiele można powiedzieć, jak dotąd, na temat mechanizmów rządzących procesem biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych o trzech lub więcej pierścieniach aromatycznych w cząsteczce. Z dostępnych danych wynika, że mikroorganizmy mogą transformować wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne do ich pochodnych (23,26) lub całkowicie je mineralizować do dwutlenku węgla i wody (27).

W pierwszym etapie metabolizmu tych związków następuje utlenianie cząsteczki węglowodoru przy udziale obecnych w mikroorganizmach: cytochromu P-450, monooksygenaz i dioksygenaz. Prokariota utleniają WWA przy wykorzystaniu dioksygenazy. W cząsteczkę węglowodoru wbudowywane są dwa atomy tlenu, a następnie powstaje dihydrodiol o konfiguracji cis (23). Eukariota natomiast przetwarzają WWA w epoksydy przy wykorzystaniu cytochromu P-450 i monooksygenazy (26). Utlenione wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne podlegają dalszym przemianom, które prowadzą do po-



Rys. 1. Proponowane drogi przemian WWA pod wpływem mikroorganizmów.

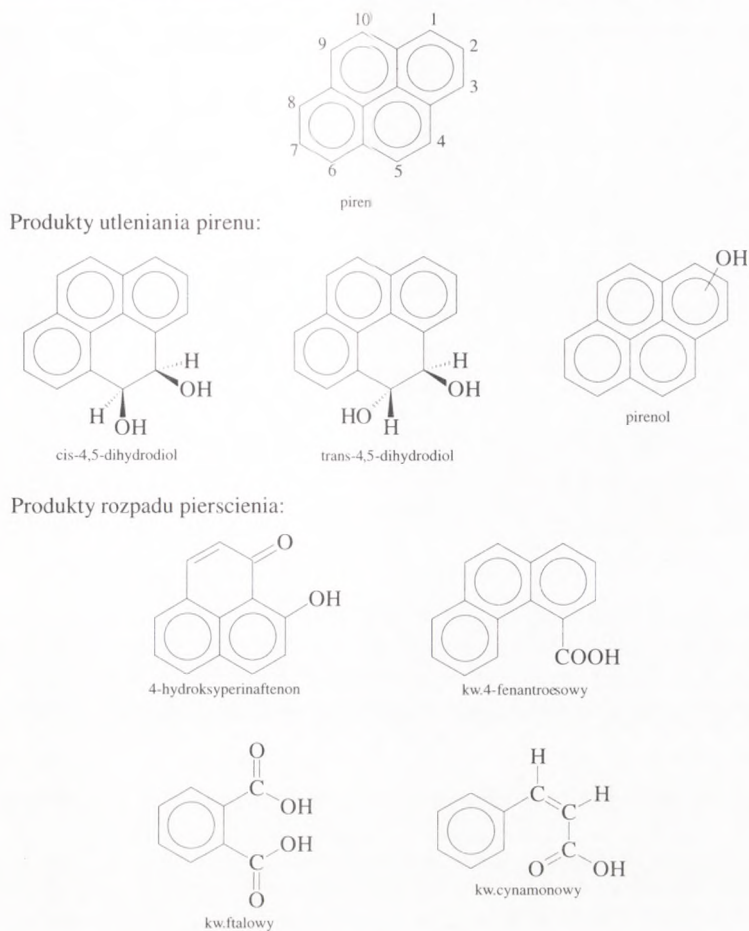
wstawania bardziej polarnych związków o mniejszej liczbie pierścieni benzenowych w cząsteczce, co w konsekwencji prowadzi do całkowitej ich mineralizacji lub są przekształcane w formy mniej toksyczne.

Cis-dihydrodiol, powstałe w wyniku działania bakterii ulegają dehydratacji pod wpływem dehydrogenazy do katecholi (28). Forma katecholowa węglowodoru ulega następnie reakcjom rozszczepienia pierścienia. Dokonywane jest to przez dioksygenazy katecholowe. W trakcie tego procesu wbudowany jest tlen cząsteczkowy. Rozzerwanie następuje między dwiema grupami hydroksylowymi sąsiadującymi między sobą (rozszczenie orto) lub między hydroksylowanym i sąsiadującym z nim niehydroksylowanym atomem węgla (rozszczenie meta).

Utleniona forma epoksydowa WWA powstała w wyniku działania grzybów przekształcana jest przy wykorzystaniu hydrolazy epoksydowej do hydrodiolu o konfiguracji trans lub w skutek nienenzymatycznego przegrupowania w pochodną hydroksylową, która ulega sprzęganiu z glukozydem i glukuronidem, co znacznie zmniejsza toksyczność związku (26). Proponowane drogi przemian WWA pod wpływem grzybów i bakterii przedstawiono na rysunku 1.

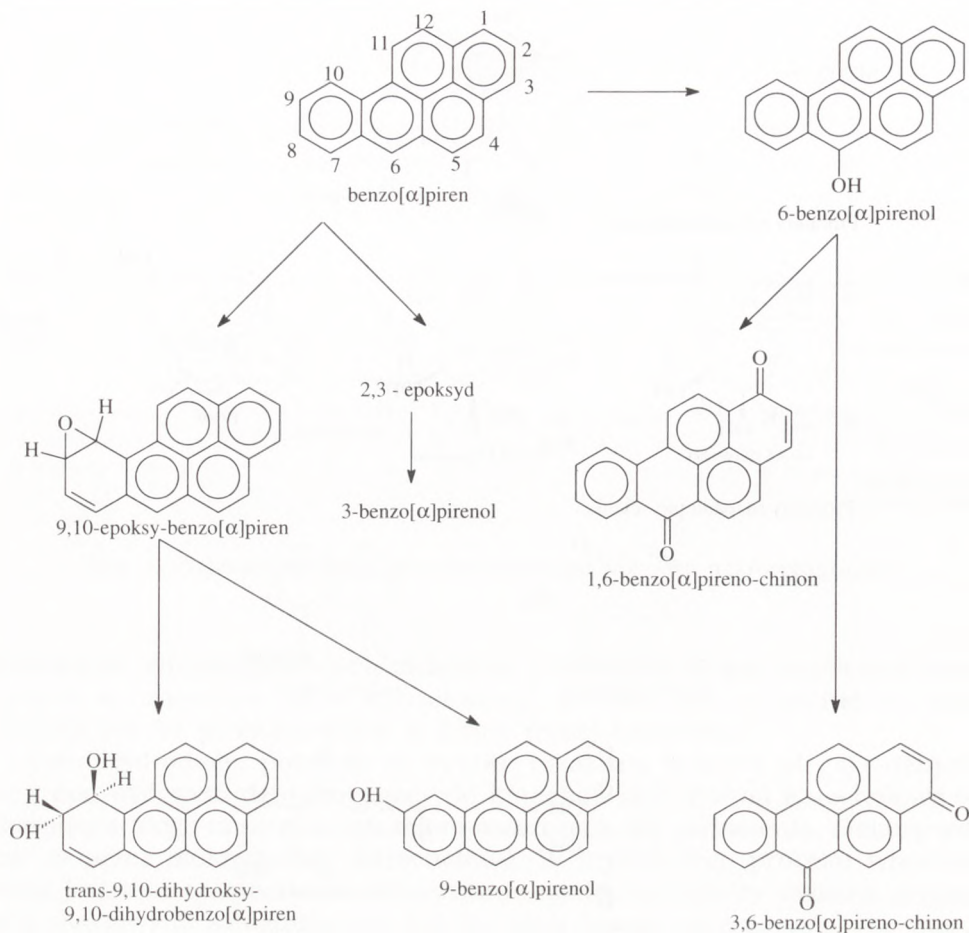
Powstawanie utlenionych form WWA pod wpływem mono i dioksygenaz ma charakter regioselektywny.

Z przeprowadzonych badań wynika, że niektóre organizmy zdolne są do przeprowadzania wszystkich etapów biotransformacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, inne natomiast tylko utleniają związek pomagając współwystępującym mikroorganizmom w dalszym jego przetwarzaniu (6). Okazało się, że bakterie *Mycobacterium* sp. obecne w osadach dennych w znacznym stopniu przyspieszają mineralizację benzo[α]pirenu poprzez tworzenie łatwo rozkładalnych pochodnych tego związku (17).

Rys. 2. Produkty rozkładu pirenenu pod wpływem *Mycobacterium* sp.

Bardzo ciekawe wyniki badań uzyskał Heitkamp (23), który wykrył zarówno izomery cis jak i transdihydrodioli wśród produktów utleniania pirenenu przez *Mycobacterium* sp. Świadczyć to może o tym, że metabolizmem tych bakterii rządzą różne mechanizmy uwarunkowane aktywnością zarówno mono- jak i dioksygenaz. Produkty przemian pirenenu pod wpływem *Mycobacterium* sp. przedstawiono na rysunku 2. Powstawanie utlenionych form pirenenu ma charakter regioselektywny i odbywa się w pozycji 4,5. Mimo że zidentyfikowano produkty rozkładu pirenenu niestety nie udało się określić, który z kwasów, cynamonowy czy ftalowy jest produktem przemian 4-hydroxypereinafenonu, a który kwasu 4-fenantroesowego.

Grzyby *Cunninghamella elegans* mają zdolność do metabolizowania WWA (21). Antracen przekształcany jest przez te mikroorganizmy do trans-1,2-dihydroksy-1,2-dihydroantracenu, co świadczy o stereo- i regioselektywności



Rys. 3. Proponowane drogi przemiany benzo[α]pirenu przez *Curinghamella elegans*.

reakcji katalizowanych przez cytochrom P-450, monooksygenazę i hydrolazę epoksydową. Po porównaniu produktów utleniania antracenu przez *C. elegans* z produktami utleniania przez mikrosomy wątroby szczurów okazało się, że powstają inne enancjomery dihydrodioli o tej samej konfiguracji trans. Metabolitem *C. elegans* jest enancjomer S,S, podczas gdy u ssaków powstaje trans-1R,2R-dihydrokso-1,2-dihydroantracenu.

Również fluoranten może być przekształcany przez te mikroorganizmy. W wyniku biotransformacji powstaje trans-2,3-dihydrokso-2,3-dihydrofluoranten (26). Wśród produktów zaobserwowano także sprzężone z glukozydem pochodne, co może świadczyć o powstawaniu 3-hydroksofluorantenu, aczkolwiek jego istnienie nie zostało potwierdzone doświadczalnie. Reakcje sprzężania z glukozydem odgrywają ważną rolę w detoksykacji fluorantenu w środowisku.

Badania przeprowadzone przez Cerniglię i Gibsona (15) świadczą o powstawaniu wielu różnych pochodnych benzo[α]pirenu w trakcie metabolizmu *C. elegans* (rys. 3).

Wśród produktów przemian B[α]P znajdują się zarówno transdihydrodiolę, pochodne hydroksylowe oraz chinony. Obecność pochodnych hydroksylowych może sprzyjać zachodzeniu reakcji sprzęgania, a co za tym idzie, detoksykacji tego związku.

4. Podsumowanie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne należą do jednych z najbardziej toksycznych związków dostających się do środowiska. Największe ich stężenia występują w osadach dennych wód powierzchniowych, ściekach i glebach. WWA występujące w osadach dennych są gorzej dostępne dla mikroorganizmów niż ma to miejsce w wodzie. Wskutek dużej koncentracji tych związków w osadach dennych wzrasta namnażanie się mikroorganizmów odpowiedzialnych za degradację policyklicznych węglowodorów aromatycznych.

Mechanizmy przemian WWA pod wpływem tych organizmów są różne. Bakterie przekształcają wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, wykorzystując do tego celu dioksygenazy. Produktami biodegradacji są bardziej polarne związki o mniejszej liczbie pierścieni benzenowych w cząsteczce. Grzyby natomiast przekształcają WWA za pomocą cytochromu P-450 i monoooksygenaz, a biotransformacja prowadzi głównie do powstawania mniej toksycznych, sprzężonych z glukozylem i glukuronidem pochodnych tych związków.

Wszystkie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne ulegają biodegradacji, jednak prędkość rozkładu zależy od liczby pierścieni benzenowych w cząsteczce. Im większa masa cząsteczkowa związku tym wolniejsza degradacja.

Mechanizm rozkładu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych o większej niż trzy liczbie pierścieni w cząsteczce nie został do końca poznany i wymaga przeprowadzenia jeszcze wielu badań.

Literatura

1. Dutkiewicz T., Lebek G., Masłowski J., Mielżyńska D., Ryboż S., (1988), *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w środowisku przyrodniczym*, PWN, Warszawa.
2. Barałkiewicz D., Zawadzka H., Zerbe J., (1980), *Gosp. Wodna*, 80, 262-266.
3. Osmulka-Mróz B., (1992), *Prognozowanie i ochrona jakości wód powierzchniowych na terenach miejskich*, IOŚ, Warszawa.
4. Karickhoff S. W., Brown D. S., (1979), *Water Res.*, 13, 241-248.
5. Voice T. C., Weber W. J., (1983), *Water Res.*, 17, 1433-1441.
6. Foght J. M., Westlake D. W. S., (1988), *Can. J. Microbiol.*, 34, 1135-1141.
7. Rocca C., Conti L., Crebelli R., (1996), *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 33, 236-245.
8. Miroń M., (1995), *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w odpadach i innych elementach środowiska*, IGO, Katowice.
9. *Zahlentafeln der physikalisch-chemischen untersuchungen des Rheinwassers und des schwebstoffes*, (1994), Internationale Kommission zum Schutze des Rheins, Raport.

10. Guha S., Jaffe P. R., (1996), *Environ. Sci. Technol.*, 30, 605-611.
11. Maliszewska — Kordybach B., (1991), *Arch. Ochr. Środ.*, 2, 139-149.
12. Wang X., Yu X., Bartha R., (1990), *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1086-1089.
13. Sutherland J. B., Selby A. L., Freeman J. P., Fu P. P., (1992), *Mycol. Res.*, 96, 509-517.
14. Walter U., Beyer M., Klein J., Rehm H. J., (1991), *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 34, 671-676.
15. Cerniglia C. E., Gibson D. T., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 12174-12180.
16. Weissenfels W. D., Beyer M., Klein J., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 479-484.
17. Heitkamp M. A., Cerniglia C. E., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1968-1973.
18. Mueller J. G., Chapman P. J., Pritchard P. H., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3085-3090.
19. Mueller J. G., Chapman P. J., Blattman B. O., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1079-1086.
20. Gibson D. T., Mahadevan V., Jerina D. M., Yagi H., (1975), *Science*, 189, 295-297.
21. Cerniglia C. E., Yang S. K., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 119-124.
22. Pothuluri J. V., Heflich R. H., Fu P. P., Cerniglia C. E., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 937-941.
23. Heitkamp M. A., Franklin W., Cerniglia C. E., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2556-2565.
24. Bumps J. A., Tien M., Wright D., Aust S. D., (1985), *Science*, 228, 1434-1436.
25. Wild S. R., Obbard J. P., Munn C. I., (1991), *Sci. Total. Environ.*, 101, 235-253.
26. Pothuluri J. V., Freeman J. P., Evans F. E., Cerniglia C. E., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2974-2983.
27. Kelley I., Freeman J. P., Evans F. E., Cerniglia C. E., (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 636-641.
28. Schlegel H. G., (1996), *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa, 528-532.

Biodegradation and Occurrence of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aquatic Sediments

Summary

This review outlines microbial degradation conditions of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic sediments. Microorganisms able to decompose these compounds are discussed. Concentrations of four polycyclic aromatic hydrocarbons in various sediments are presented. Bacteria and fungi decompose PAH's in different ways. Eucariota use monooxygenase, cytochrom P-450 and epoxide hydrolase to produce trans-dihydrodiols. Biodegradation of PAH's by procariota is due to dioxygenase activity. Bacteria transform these compounds to cis-dihydrodiols and then to more polar compounds with fewer aromatic rings in the molecule.

Key words:

aquatic sediments, biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons.

Adres do korespondencji:

Katarzyna Klimaszewska, Zakład Chemii Środowiska, Instytut Systemów Inżynierii Środowiska, Inżynieria Środowiska, Politechnika Warszawska, ul. Nowowiejska 20, 00-653 Warszawa.