



Specyficzność substratowa oraz wrażliwość monooksygenazy fenolowej ze szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 a jej potencjalne zastosowanie w bioremediacji środowiska

Danuta Wojcieszńska, Izabela Greń, Sylwia Łabużek,
Monika Respondek

Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice

Substrate specificity and sensitiveness of phenol monooxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 versus their potential application to bioremediation of the environment

Summary

Phenol monooxygenase, isolated from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2, was sensitive to sodium azide, metals salts except for iron (II) sulfate at concentration of 1 mM, chelate compounds, sulfhydryl agents, lauroylsarcosine Na-salt, SDS and hydrogen peroxide. Slight increase of the enzyme activity was observed in the presence of hexane and ether. The presence of ascorbic acid caused an increase of the enzyme activity. Phenol monooxygenase activity changed significantly depending on the tested aromatic substrate in the reaction mixture and the type of the applied inductor.

Key words:

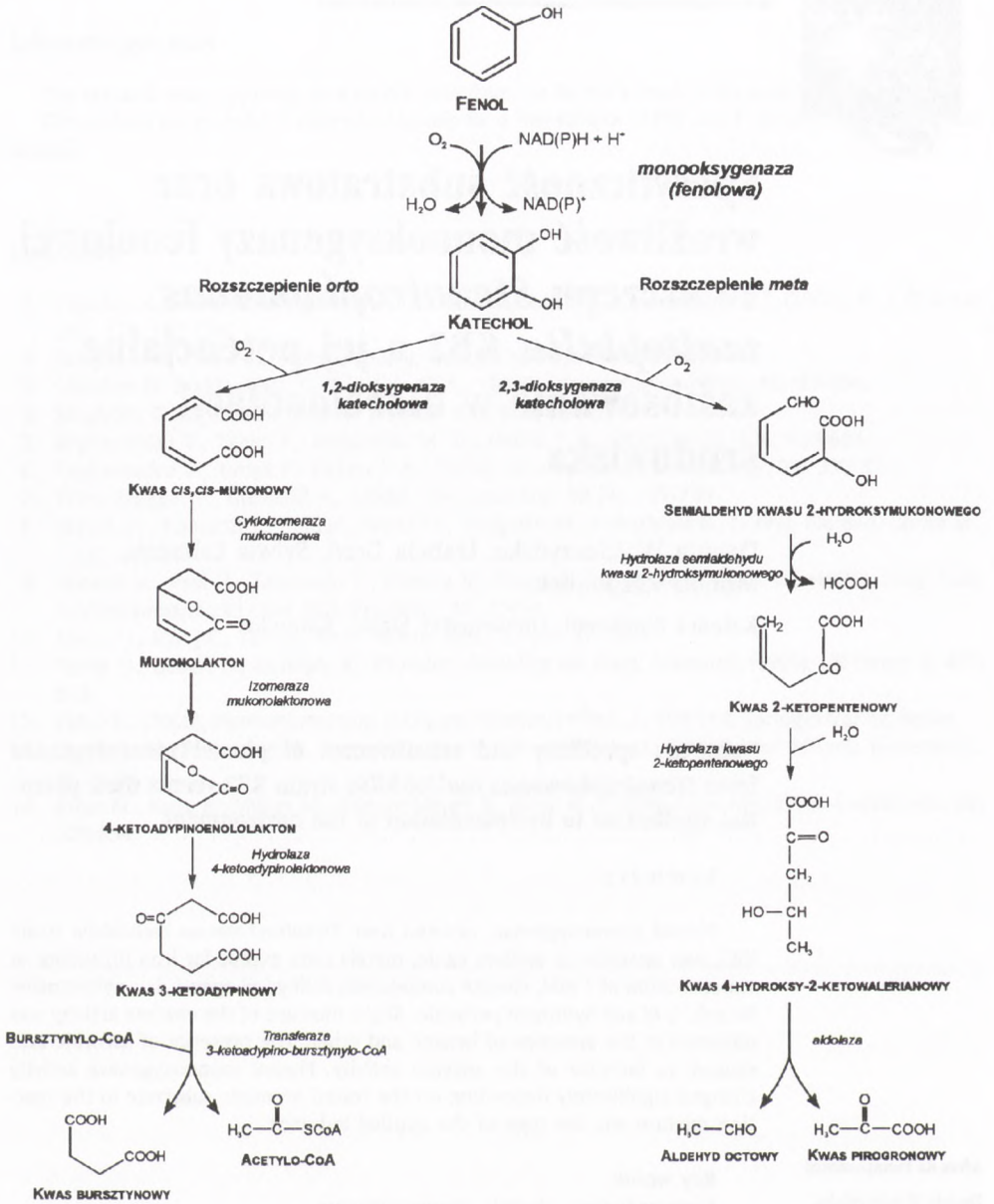
bioremediation, phenols, monooxygenase.

Adres do korespondencji

Danuta Wojcieszńska,
Katedra Biochemii,
Uniwersytet Śląski,
ul. Jagiellońska 28,
30-032 Katowice;
e-mail:
dmanka@us.edu.pl

1. Wprowadzenie

Związki fenolowe należą do niebezpiecznych, szeroko rozpowszechnionych zanieczyszczeń środowiska. Powstają głównie jako produkty uboczne przemysłu oraz w wyniku działalności



Rys. Szlak degradacji fenolu drogą orto i meta (3).

rolniczej. Liczne gatunki bakterii oraz grzybów mikroskopowych wykazują zdolność do metabolizowania związków o strukturze aromatycznej, wykorzystując je jako źródło energii i węgla (1,2). Monoooksygenaza fenolowa [EC 1.14.13.7] bierze udział w podstawowym etapie rozkładu fenoli (rys.). Odpowiada za hydroksylację pierście-

nia w taki sposób, że dwie grupy hydroksylowe zostają usytuowane w pozycji *para* lub *orto* względem siebie. Enzymy tej grupy są zwykle enzymami indukcyjnymi, zawierającymi w swym centrum aktywnym jony żelaza na różnych stopniach utlenienia. Są pochodnymi cytochromu P-450 i wykorzystują NAD(P)H do aktywacji i rozbięcia cząsteczki tlenu (4). Cechą charakterystyczną monoooksygenaz fenolowych jest ich duża regio- i stereospecyficzność (5). Ponadto wykazano, że enzymy te mają, w zależności od swych specyficznych właściwości, różną wrażliwość na inne związki chemiczne. Dlatego obecność niektórych inhibitorów w środowisku może ujemnie wpływać na procesy degradacyjne.

Celem pracy było określenie specyficzności substratowej monoooksygenazy w stosunku do różnorodnych związków fenolowych oraz zbadanie, jak pozycja i rodzaj podstawników wpływają na aktywność tego enzymu. Równocześnie podjęto próbę oceny wpływu innych związków chemicznych, uchodzących za potencjalne inhibitory lub aktywatory monoooksygenaz, a towarzyszących, jako zanieczyszczenia, związkom fenolowym w środowisku, na aktywność badanego enzymu.

2. Materiały i metody

W badaniach użyto szczep *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 [GenBank DQ230920] (poprzednio *Acinetobacter* sp.) z kolekcji szczepów Katedry Biochemii UŚ. Hodowle szczepu prowadzono w pożywce mineralnej o składzie: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ 3,78 g; KH_2PO_4 0,50 g; NH_4Cl 5,00 g; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,20 g; ekstrakt drożdżowy 0,10 g; fenol 12 mM; woda destylowana 1000 ml, wzbogaconej roztworem mikroelementów o składzie: $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 3,82 g; $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 295 mg; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 82 mg; $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 141 mg; H_3BO_3 6 mg; $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 40 mg; $\text{NiSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 82 mg; $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 2,9 mg, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}$ 148 mg; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 6 mg; 32% HCl 10 ml; woda destylowana 1000 ml, dodawanym w ilości 1 ml/1000 ml hodowli. Namnażanie szczepu prowadzono w warunkach napowietrzania przez wytrząsanie (130 rpm), w temperaturze 30°C. Oznaczenie gęstości optycznej hodowli bakterii prowadzono przy długości fali $\lambda = 600 \text{ nm}$. Stężenie fenolu oznaczano metodą kolorymetryczną z dwuazowaną *p*-nitroaniliną (6).

Do izolacji białek enzymatycznych metodą Hegemana (7) wykorzystywano jednodniową hodowlę szczepu *S. maltophilia* prowadzoną w pożywce mineralnej, wzbogaconej roztworem mikroelementów, z dodatkiem 5 mM odpowiednich izomerów chloro-, nitro-, metylo- lub aminofenoli albo fenolu, jako induktorów. Otrzymany w wyniku wirowania supernatant zawierał surową frakcję białek enzymatycznych, w której oznaczano aktywność enzymu metodą Lechnera (8). Wykorzystuje ona właściwość absorbowania światła o długości fali $\lambda = 340 \text{ nm}$ przez NADH. W trakcie reakcji z udziałem monoooksygenazy, NADH zostaje utleniony do NAD^+ , w wyniku czego zmienia się absorbancja przy $\lambda = 340 \text{ nm}$. Szybkość zmiany absorbancji jest proporcjonalna do aktywności monoooksygenazy. W celu oznaczenia ak-

tywności enzymu sporządzano mieszaninę reakcyjną, o składzie: 40 mM bufor fosforanowy, pH 7,0 620 μ l; 44 μ M FAD 450 μ l; 4 mM NADH 120 μ l; 10 mM pochodna fenolowa 10 μ l; woda destylowana 300 μ l; surowa frakcja białek enzymatycznych 300 μ l. Jako substraty dla monoooksygenazy stosowano fenol oraz wszystkie izomery: monochloro- (CP), monoamino- (AP), monometylo- (MP) i mononitrofenoli (NP). Podczas badań nad wpływem potencjalnych inhibitorów i aktywatorów na aktywność enzymu, do mieszaniny reakcyjnej wprowadzano różne stężenia tych związków. Jako kontrolę stosowano próbę pozbawioną inhibitorów lub aktywatorów. Oznaczenie stężenia białka w surowej frakcji białek enzymatycznych prowadzono metodą Bradforda (9).

3. Wyniki badań i dyskusja

We wcześniejszych badaniach wykazano, że szczep *S. maltophilia* KB2 odznaczał się zdolnością do rozkładu fenolu występującego w wysokich stężeniach, wszystkich metylofenoli oraz niektórych pochodnych chloro- i nitrofenoli (10). Stąd zasadne byłoby wykorzystanie tego szczepu do enzymatycznej degradacji zanieczyszczeń fenolowych. Wiadomo jednak, że ścieki nie są jednorodne, gdyż niosą w swoim składzie wiele innych substancji toksycznych, m.in. takich, które są inhibitorami monoooksygenazy, odpowiadającej za główny etap rozkładu fenoli. W badaniach sprawdzono wpływ wybranych substancji na aktywność monoooksygenazy, wyizolowanej z komórek badanego szczepu.

Jednym z inhibitorów enzymów flawinowych, do których zalicza się monoooksygenazy fenolowe, jest metimazol (11). Hamuje on aktywność hydroksylaz poprzez interakcje z utlenionymi produktami *o*-dihydroksyfenoli, a obecność grupy tiolowej powoduje, że może on działać jako czynnik redukujący (12). Po wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej metimazolu w niskich stężeniach (0,5 i 1 mM) zaobserwowano jedynie 10% inhibicję aktywności monoooksygenazy, natomiast metimazol w stężeniu 10 mM powodował prawie 60% hamowanie reakcji (tab. 1). Monoooksygenaza prawdopodobnie nie należy do typowych monoooksygenaz flawinowych, gdyż hamujące ją stężenie metimazolu było 20-krotnie wyższe niż typowo stosowane do hamowania reakcji z udziałem monoooksygenaz i wykazuje niską wrażliwość na badany związek.

Niektóre monoooksygenazy fenolowe należą do grupy cytochromu P-450. Aktywność tych enzymów ulega hamowaniu pod wpływem znanych inhibitorów cytochromu P-450, takich jak: azydek sodu, naftoflawon, mikonazol, metyrapon i CO (11,13). Zaobserwowano, że po wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej azydku sodu w niskich stężeniach (1 i 2 mM) następował tylko nieznaczny spadek aktywności enzymu. Natomiast po zastosowaniu azydku sodu w stężeniu 5 mM wykazano prawie 50% spadek aktywności monoooksygenazy fenolowej (tab. 1). Hamowanie reakcji hydroksylacji po podaniu azydku sodu może wskazywać, że badana monoooksygenaza

fenolowa należy do enzymów grupy cytochromu P-450, w związku z czym, w obecności wyższych stężeń jego inhibitorów, może dojść do zahamowania degradacji związków fenolowych.

Tabela 1

Aktywność monooksygenazy fenolowej po zastosowaniu potencjalnych inhibitorów

Inhibitor	Stężenie inhibitora [mM]	Aktywność monooksygenazy fenolowej [%]	Inhibitor	Stężenie inhibitora [mM]	Aktywność monooksygenazy fenolowej [%]
kontrola	—	100,00 ± 0,04	kontrola	—	100,00 ± 0,04
tiron	1	74,81 ± 1,85	tiomocznik	0,5	97,02 ± 1,67
	2	65,16 ± 0,28		1	99,46 ± 0,37
	5	58,64 ± 0,23		2	57,92 ± 1,71
	10	54,30 ± 0,56		5	29,49 ± 1,30
o-fenantrolina	1	73,79 ± 1,78	merkaptoetanol	1	73,79 ± 0,00
	2	59,23 ± 1,06		2	60,93 ± 1,23
	5	38,59 ± 0,59		5	49,64 ± 0,51
2,2-dipirydył	1	62,26 ± 0,28	azydek sodu	1	87,20 ± 0,74
	2	54,30 ± 0,55		2	83,01 ± 0,04
	5	55,02 ± 0,93		5	54,41 ± 0,84
EDTA	1	114,74 ± 1,61	azotan srebra	1	149,98 ± 0,67
	2	85,56 ± 0,60		2	94,87 ± 0,07
	5	76,50 ± 0,56		5	50,92 ± 1,16
H ₂ O ₂	1	73,12 ± 0,69	siarczan miedzi (II)	1	55,41 ± 0,14
	2	58,88 ± 1,06		2	51,45 ± 0,11
	5	49,23 ± 1,34		5	48,74 ± 0,46
metimazol	0,5	89,36 ± 3,44	siarczan żelaza (II)	1	133,24 ± 0,95
	1	90,03 ± 4,26		2	101,15 ± 0,18
	2	83,26 ± 3,31		5	0,00 ± 0,35
	5	74,80 ± 2,46	chlorek żelaza (III)	1	53,31 ± 0,46
	10	38,92 ± 0,72		2	41,29 ± 0,18
				5	28,43 ± 0,46

Monooksygenazy do swojej aktywności wymagają obecności jonu metalu w centrum aktywnym, którego zadaniem jest redukcja tlenu cząsteczkowego do nadtlenu i/lub formowanie reaktywnych intermedatów odpowiednich dla określonej reak-

cji utlenienia (2,14). Ze względu na istotną rolę jonu metalu w procesie katalizy, podjęto próbę identyfikację jonu w centrum aktywnym enzymu, pośrednio poprzez zbadanie wpływu soli różnych metali na aktywność badanej monoooksygenazy zakładając, że jonem występującym w centrum aktywnym badanego enzymu będzie ten, w obecności soli którego nastąpi wzrost aktywności. Zaobserwowano, że siarczan (VI) żelaza (II) w stężeniu 1 mM powodował wzrost aktywności enzymu w stosunku do kontroli (tab. 1), co może sugerować obecność jonu żelaza (II) w centrum aktywnym badanej monoooksygenazy. Tym bardziej, że zaobserwowano wyraźną inhibicję aktywności enzymu po dodaniu siarczanu (VI) miedzi (II) i chlorku żelaza (III) (tab. 1), co wyklucza te jony jako bezpośrednio zaangażowane w katalizę z udziałem monoooksygenazy wyizolowanej ze szczepu *S. maltophilia* KB2 oraz sugeruje ich interakcję z białkiem enzymatycznym, w konsekwencji której aktywność enzymu spada.

Enzymy zawierające jony Fe^{2+} w centrum aktywnym ulegają silnej inhibicji pod wpływem związków utleniających (15), w związku z tym uzasadnione, jak się wydawało, było sprawdzenie aktywności badanej monoooksygenazy w obecności H_2O_2 . Nadtlenek wodoru powodował spadek aktywności enzymu we wszystkich zastosowanych stężeniach (tab. 1), prawdopodobnie w wyniku utlenienia jonu Fe^{2+} w centrum aktywnym enzymu.

W badaniach nad wpływem soli metali zastosowano również azotan (V) srebra. Z danych literaturowych wynika, że związek ten niszczy strukturę enzymu poprzez interakcję jonu srebra z białkiem, powodując całkowite zahamowanie reakcji (16). W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano jednak, że azotan srebra w niskim stężeniu (1 mM) nie tylko nie hamował aktywności monoooksygenazy, ale powodował nawet 50% wzrost jej aktywności (tab. 1). Zjawisko to jest trudne do wyjaśnienia i wymaga dalszych badań.

Ze względu na występowanie jonu żelaza (II) w centrum aktywnym monoooksygenazy fenolowej istotne stało się sprawdzenie wpływu chelatorów na aktywność tego enzymu. W przeprowadzonych badaniach wykazano, że zarówno tiron, *o*-fenatrolina, jak i 2,2-dipirydył hamowały aktywność monoooksygenazy fenolowej (tab. 1), co może sugerować słabe powiązanie jonu centralnego z białkiem enzymatycznym, stąd ich obecność w środowisku może osłabiać procesy degradacyjne, szczególnie tam, gdzie wprowadza się chelatory w celu remediacji środowisk zanieczyszczonych nierozpuszczalnymi solami metali ciężkich.

Często stosowanymi inhibitorami monoooksygenaz są czynniki sulfhydrylowe, oddziałujące z wolnymi grupami tiolowymi białek, w wyniku czego następują zmiany konformacyjne w obrębie enzymów (17). W przeprowadzonych badaniach zastosowano EDTA, który wykazuje podwójne działanie, jako chelator i jako czynnik sulfhydrylowy, tiomocznik oraz merkaptetoetanol. Wykazano, że EDTA w stężeniu 1 mM aktywował badany enzym, natomiast EDTA w stężeniach 2 i 5 mM powodował 20-25% inhibicję enzymu w stosunku do próby kontrolnej (tab. 1), co potwierdzono w danych literaturowych o wrażliwości monoooksygenazy na wersenian sodu (18).

Merkaptoetanol hamował aktywność badanej monooksygenazy, przy czym stopień inhibicji zależał od stosowanego stężenia (tab. 1). Natomiast po zastosowaniu tiomocznika w niskich stężeniach nie obserwowano hamowania reakcji z udziałem monooksygenazy, natomiast po zastosowaniu inhibitora w stężeniu 2 i 5 mM stwierdzono, odpowiednio, 43 i 70% spadek aktywności enzymu (tab. 1).

W środowisku naturalnym jako substancje towarzyszące związkom aromatycznym występują często rozpuszczalniki organiczne. W badaniach przeprowadzonych przez Wieser i wsp. wykazano, że ich obecność powoduje aktywację monooksygenazy, zwiększając tym samym szybkość pierwszego etapu degradacji fenoli (19). Wykazano, że z zastosowanych rozpuszczalników jedynie eter w stężeniach 1 i 2 mM oraz heksan w stężeniu 1 mM, powodowały wzrost aktywności enzymu (tab. 2). Pozostałe związki hamowały aktywność monooksygenazy wyizolowanej z komórek szczepu *S. maltophilia* KB2.

Tabela 2

Aktywność monooksygenazy fenolowej po zastosowaniu potencjalnych aktywatorów

Aktywator	Stężenie aktywatora [mM]	Aktywność monooksygenazy fenolowej [%]
1	2	3
kontrola	–	100,00 ± 0,15
heksan	1	117,92 ± 1,19
	2	90,39 ± 0,31
	5	79,49 ± 0,95
eter	1	135,06 ± 0,12
	2	123,63 ± 1,04
	5	96,27 ± 1,59
alkohol etylowy	1	90,39 ± 0,49
	2	86,75 ± 1,31
	5	61,30 ± 0,79
alkohol metylowy	1	64,93 ± 0,49
	2	52,99 ± 0,73
	5	43,64 ± 1,07
kwas askorbinowy	1	135,06 ± 0,06
	2	136,10 ± 0,25
	5	131,94 ± 1,71
siarczan dodecylosarkozyny	1	88,31 ± 0,12
	2	59,22 ± 0,98
	5	39,48 ± 0,97

1	2	3
SDS	1	85,19 ± 0,92
	2	43,29 ± 0,15
	5	25,28 ± 0,49

W literaturze jako aktywatory monoooksygenazy wymieniane są również kwas askorbinowy, dodecylosarkozyna i SDS (2,20). W przeprowadzonych badaniach wykazano, że jedynie kwas askorbinowy aktywował monoooksygenazę fenolową (tab. 2). Prawdopodobnie związek ten, jako antyoksydant, chroni enzym przed samoutlenieniem jonu metalu w centrum katalitycznym.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, że monoooksygenazy flawinowe odznaczają się dużą specyficznością substratową i regiospecyficznością (1). Ze względu na ich potencjalne wykorzystanie, zarówno w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, jak i w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych, szczególnie cenne jest, jak się wydaje, poznanie ich zdolności do przekształcania związków chemicznych, będących analogami ich pierwotnego substratu. W środowisku, gdzie gromadzą się związki fenolowe pochodzące z różnych źródeł, istotne będzie zastosowanie hydroksylaz zdolnych do przekształcania różnych związków aromatycznych, czyli enzymów cechujących się niską specyficznością substratową. Z danych literaturowych wynika jednak, że hydroksylazy izolowane z różnych mikroorganizmów, cechują się wysoką specyficznością substratową i są zdolne do hydroksylacji zaledwie kilku (2-5) substratów (1). Przykładem takiego enzymu jest 3-hydroksylaza 4-hydroksybenzoesu (PHBH) ze szczepu *Pseudomonas fluorescens*, odpowiedzialna za przekształcenie 4-hydroksybenzoesu do 3,4-dihydroksybenzoesu oraz 6-hydroksylaza 3-hydroksyfenylooctanu, wyizolowana ze szczepu *Flavobacterium*, katalizująca reakcje hydroksylacji kwasu 3-hydroksyfenylooctowego do kwasu 2,5-dihydroksyfenylooctowego oraz przekształcenie kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego do kwasu 2,4,5-trichlorofenylooctowego (1). W związku z tym istotne są, jak się wydaje, poszukiwania enzymów, charakteryzujących się zdolnością do hydroksylacji dużej grupy związków aromatycznych.

W wyniku przeprowadzonych badań nad określeniem specyficzności substratowej monoooksygenazy wyizolowanej z komórek szczepu *S. maltophilia* KB2 po zastosowaniu różnych induktorów zaobserwowano, że gdy induktorem był fenol, enzym ten wykazywał aktywność w stosunku do wszystkich badanych substratów. Najwyższą aktywność obserwowano, gdy zastosowanym substratem był fenol, co wyraźnie wskazuje, że badana monoooksygenaza wykazywała preferencję w stosunku do niepodstawionego substratu. Spośród podstawionych związków fenolowych najlepszymi substratami okazały się izomery z zajęta pozycją *para*. Prawdopodobnie było to spowodowane tym, że przy takim układzie podstawników możliwa jest hydroksylacja pozycji *orto* bez konieczności równoczesnego uwalniania podstawników (13,21). Najniższą aktywność enzym wykazywał, gdy zastosowanymi substratami były 3-NP

i 3-MP (tab. 3). Niską aktywność hydroksylazy w stosunku do *meta* podstawionych związków można wyjaśnić pojawieniem się efektu sterycznego przy takim układzie podstawników i brakiem miejsca dla działania monoooksygenazy (22).

Najlepszymi induktorami monoooksygenazy ze szczepu *S. maltophilia* KB2 okazały się 2- i 3-metylofenol (tab. 3). Enzym po indukcji tymi związkami wykazywał wysoką aktywność w stosunku do wszystkich zastosowanych substratów. Metylofenole były nie tylko dobrymi induktorami dla badanego enzymu, ale również dobrymi substratami (tab. 3). Wysoka aktywność monoooksygenazy w stosunku do metylofenoli wynika z aktywującego wpływu podstawników I grupy na procesy substytucji elektrofilowej w pierścieniu (22,23). Spostrzeżenie to, jak się wydaje, potwierdza również wyniki uzyskane po zastosowaniu aminofenoli jako substratów. Zaobserwowano, że monoooksygenaza po indukcji 2-CP, 4-CP i 4-AP wykazywała najwyższą aktywność, gdy zastosowanym substratem był 2-aminofenol, natomiast po zastosowaniu fenolu, 2-CP, 2-NP, 4-NP, 2-MP i 3-MP jako induktorów obserwowano wysoką aktywność monoooksygenazy, gdy badanym substratem był 4-aminofenol (tab. 3). Jednak w odróżnieniu od metylofenoli, aminofenole okazały się słabymi induktorami monoooksygenazy (tab. 3), co wynika z ich wysokiej toksyczności dla organizmów żywych (24,25).

Tabela 3

Specyficzność substratowa monoooksygenazy fenolowej po zastosowaniu różnych induktorów

Substrat	Aktywność właściwa monoooksygenazy fenolowej po zastosowaniu różnych induktorów [mU/mg białka]												
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP	2-NP	3-NP	4-NP	2-MP	3-MP	4-MP	2-AP	3-AP	4-AP
fenol	7,08	2,82	0,50	2,91	1,71	0,83	0,00	13,00	12,60	3,50	1,57	1,06	0,00
2-CP	2,41	4,33	0,21	2,15	1,46	0,27	0,00	9,50	13,84	3,28	5,16	1,54	0,13
3-CP	2,56	2,17	0,33	2,79	0,00	0,15	1,74	12,92	12,91	2,26	4,49	0,00	0,39
4-CP	2,92	2,17	0,09	1,05	1,75	0,00	0,00	11,31	12,39	1,94	0,22	4,59	0,26
2-NP	2,36	0,00	0,89	0,00	0,33	1,02	0,00	8,02	8,64	1,61	0,34	0,03	0,00
3-NP	1,33	0,00	0,71	1,27	1,28	0,64	0,05	10,36	9,87	3,93	5,83	0,00	0,00
4-NP	3,07	2,37	0,00	0,00	1,75	0,00	1,88	8,88	9,50	0,00	8,30	0,00	0,00
2-MP	2,82	0,00	0,86	0,51	1,68	0,00	0,48	11,25	15,87	3,07	3,14	0,82	0,00
3-MP	2,05	3,9	0,44	1,27	2,88	0,00	1,79	13,80	17,92	3,44	0,67	3,39	1,81
4-MP	5,07	1,73	0,47	1,69	0,69	0,38	0,82	10,34	10,50	2,48	1,35	0,72	0,00
2-AP	2,51	13,87	0,00	3,38	0,55	0,80	0,00	10,18	14,58	1,78	3,93	1,03	2,98
3-AP	2,66	2,167	0,77	0,00	0,00	0,00	1,21	12,13	13,26	1,94	0,00	0,82	0,00
4-AP	3,38	12,57	0,27	0,00	2,47	0,00	1,64	10,82	11,88	1,88	0,00	0,86	1,46

Najsłabszymi zarówno induktorami jak i substratami badanej monooksygenazy okazały się nitrofenole (tab. 3). Niska aktywność monooksygenazy fenolowej po zastosowaniu tych pochodnych fenolu wynika nie tylko z ich wysokiej toksyczności, ale także z dezaktywującego wpływu podstawnika nitrowego na reakcję elektrofilowego podstawienia w pierścieniu aromatycznym (15,22,26).

W wyniku przeprowadzonych badań nad indukcją monooksygenazy fenolowej ze szczepu *S. maltophilia* KB2 przez chlorofenole wykazano, że 2-CP był dobrym induktorem monooksygenazy fenolowej. Szczególnie wysoką aktywność obserwowano, gdy jako substraty stosowano aminofenole, chlorofenole oraz fenol (tab. 3). Najsłabszym, zarówno induktorem jak i substratem, spośród chlorofenoli, był 3-CP. Potwierdza to doniesienie, że chlorofenol podstawiony w pozycji *meta* charakteryzuje się największą stabilnością chemiczną wśród monopodstawionych izomerów chlorofenolowych, a także jest zwykle bardziej toksyczny dla mikroorganizmów (27).

4. Podsumowanie

Różnorodność chemiczna zanieczyszczeń pojawiających się każdego dnia w środowisku naturalnym jest tak ogromna, że nie można wykluczyć wpływu zarówno prostych, jak i złożonych związków organicznych i nieorganicznych na aktywność biodegradacyjną mikroorganizmów, naturalnie występujących w środowisku. Etap hydroksylacji pierścienia aromatycznego fenolu lub jego pochodnych jest podstawową reakcją w rozkładzie tlenowym tej grupy zanieczyszczeń organicznych. Dlatego intensywność procesów bioremediacyjnych terenów skażonych z udziałem szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 będzie szczególnie zależeć od obecności, dostępności i stężenia związków towarzyszących zanieczyszczeniom fenolowym. Obserwowana częściowa aktywność monooksygenazy fenolowej w obecności potencjalnych inhibitorów, w stężeniach używanych w praktyce laboratoryjnej do blokowania reakcji katalizowanych przez monooksygenazy, sugeruje duże możliwości aplikacyjne szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 do oczyszczania środowisk skażonych związkami aromatycznymi.

Literatura

1. Moonen M. J. H., Fraaije M. W., Rietjens I. M. C. M., Laane C., van Berkel W. J. H., (2002), Adv. Synth. Catal., 344, 1023-1035.
2. Pessione E., Divari S., Griva E., Cavaletto G., Rossi L. G., Gilardi G., Giunta C., (1999), Eur. J. Biochem., 265, 549-555.
3. Harwood C. S., Parales E. P., (1996), Annu. Rev. Microbiol., 50, 553-590.
4. Otto K., Hofstetter K., Röthlisberger, Witholt B., Schmid A., (2004), J. Bacteriol., 186, 5292-5302.
5. Cafaro V., Notomista E., Capasso P., Di Donato., (2005), Appl. Environ. Microbiol., 71, 4736-4743.

6. Lurie Yu. Yu., Rybnikova, A. N., (1974), *Khimicheskii analiz proizvodstvennykh stochnykh vod*, Khimiya, Moscow.
7. Hegeman G. D., (1966), *J. Bacteriol.*, 91, 1140-1154.
8. Lechner U., Baumach R., Becker D., Kitunen V., Auling G., Salkinoja-Salonen M., (1995), *Biodegradation*, 6, 83-92.
9. Bradford M. M., (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248-258.
10. Wojcieszńska D., Greń I., Dziuba A., Łabużek S., (2005), *Biotechnologia środowiskowa*, VIII Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-Techniczne, Wisła-Jarzębata, 115-122.
11. Tomasi I., Artaud I., Bertheau Y., Mansuy D., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 307-311.
12. Andrawis A., Kahn V., (1986), *Biochem J.*, 235, 91-96.
13. Kadiyala V., Spain J. C., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2479-2484.
14. Leahy J. G., Batchelor P. J., Morcomb S. M., (2003), *FEMS Microbiol. Rev.*, 770, 1-31.
15. Schenzle A., Lenke H., Spain J. C., Knackmuss H. J., (1999), *J. Bacteriol.*, 181, 1444-1450.
16. Beadle C. A., Smith A. R.W., (1982), *Eur. J. Biochem.*, 123, 323-332.
17. Takeguchi M., Okura I., (2000), *Catalysis Surveys from Japan*, 4, 51-63.
18. Gurujeyalakshami G., Oriel P., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3505-3508.
19. Wieser M., Wagner B., Eberspacher J., Lingens F., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 202-208.
20. Zeyer J., Kocher H. P., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 1789-1794.
21. Hollender J., Dott W., Hopp J., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4567-4572.
22. Boyd R. N., Morrison R. T., (1994), *Chemia organiczna*, 61-62, PWN, Warszawa.
23. Neujahr H. Y., Kjellen K. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 8835-8841.
24. Takenaka S., Okugawa S., Kadowaki M., Murakami S., Aoki K., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5410-5413.
25. Yoshida R., Oikawa S., Ogawa Y., Miyakoshi Y., Ooida M., Asanuma K., Shimizu H., (1998), *Mutat. Res.*, 415, 139-150.
26. Zhao J. S., Ward O. P., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1388-1391.
27. Annachhatre A. P., Gheewala S. H., (1996), *Biotechnol. Advances*, 14, 35-56.