



Mikrobiologiczna degradacja związków fosforoorganicznych zawierających wiązanie C-P

Magdalena Klimek-Ochab, Agnieszka Obojska, Barbara Lejczak
Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii
Politechnika Wrocławska, Wrocław

Microbiological degradation of organophosphorous compounds containing C-P bond

Summary

Phosphonates constitute a class of biogenic and xenobiotic compounds characterized by the presence of a direct carbon-to-phosphorus linkage. The C-P bond is extremely stable and resistant to degradation. Phosphonates are of widespread use these days and much interest has been paid over the past years to their environmental fate and possible eco-toxicity. This review is devoted to the processes of microbial degradation of phosphonates, covering various aspects of metabolic pathways and regulation.

Key words:

organophosphonates, biodegradation, P-C bond, glyphosate, ciliatine, phosphonoacetic acid.

Adres do korespondencji

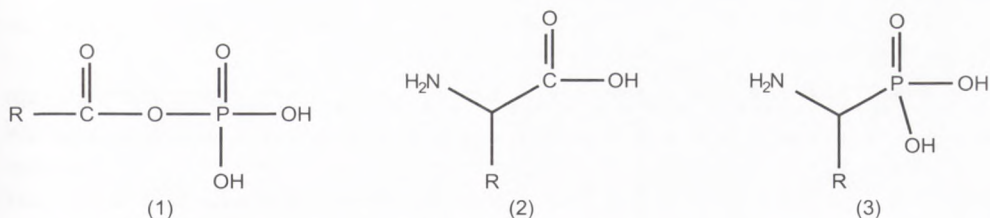
Magdalena Klimek-Ochab,
Instytut Chemii
Organicznej,
Biochemii
i Biotechnologii,
Politechnika Wrocławska,
ul. Wybrzeże
Wyspiańskiego 27,
50-370 Wrocław.

biotechnologia

1 (64) 68-84 2004

1. Wstęp

Fosfor jest jednym z podstawowych pierwiastków biogenych, który występuje we wszystkich organizmach żywych i warunkuje prawidłowe ich funkcjonowanie. Naturalne związki fosforoorganiczne są głównie estrami kwasu fosforowego. Istnieje również wyjątkowa grupa zarówno biogenych jak i syntetycznych organicznych połączeń fosforu, których cechą charakterystyczną jest obecność w cząsteczce bezpośredniego, kowalen-



Rys. 1. Struktura cząsteczki estru kwasu fosforowego (1), aminokwasu (2) oraz kwasu aminofosfonowego (3).

cyjnego wiązania pomiędzy atomami fosforu i węgla – są to kwasy fosfonowe. Energia aktywacji wiązania między atomem węgla i fosforu jest bardzo wysoka – wyższa niż wiązań typu O-P, N-P, S-P, a co za tym idzie jest to połączenie trudne do rozerwania i metody chemiczne, takie jak hydroliza kwasowa i zasadowa, fotoliza czy termoliza są nieskuteczne (1).

Pierwszym opisanym w literaturze, naturalnym związkiem posiadającym w cząsteczce wiązanie C-P, jest kwas 2-aminoetylofosfonowy (ciliatyna) – odkryty u większości organizmów żywych, gdzie może występować w formie niezwiązanej, a także wchodzić w skład fosfolipidów błon komórkowych oraz białek (2). Inne naturalne fosfoniany to antybiotyki syntetyzowane przez bakterie z grupy *Streptomyces*, np. fosfomycyna (kwas 1,2-*cis*-epoksypropanofosfonowy), która hamuje biosyntezę peptydoglikanu (3), oraz fosfinitricyna ((kwas *L*-2-amino-4-(metylofosfinylo)butanowy)), która działa jako silny inhibitor syntetazy glutaminowej u bakterii i roślin (2,4).

Szczególną grupą fosfonianów są te, które zawierają w cząsteczce dodatkowo grupę aminową przy atomie węgla α . Są one uważane za strukturalne analogi aminokwasów, w których grupa karboksylowa została zastąpiona grupą fosfonową lub podobną (fosfinową, fosfonawą itp.) (rys. 1).

Teoria analogii strukturalnej pozwala na tłumaczenie biologicznej aktywności aminofosfonianów podobieństwem do naturalnych substratów reakcji enzymatycznych. W większości przypadków fosfoniany są inhibitorami enzymów, a wyraża się to ich konkurencyjnością o centrum aktywne enzymu lub innego komórkowego receptora w stosunku do strukturalnego karboksylowego odpowiednika. Udało się znaleźć fosfonowe inhibitory około sześćdziesięciu enzymów należących do każdej z sześciu klas. Wśród nich znajdują się inhibitory enzymów proteolitycznych, takich jak np. leucyloaminopeptydaza [EC 3.4.11.1] i aminopeptydaza A [EC 3.4.11.7]. Zmiana aktywności leucyloaminopeptydazy jest związana z chorobami nowotworowymi (4), kataraktą (5), a nawet zakażeniem wirusem HIV (6). Badając strukturę kompleksu tego enzymu z fosfonowym analogiem leucyny, udało się poznać nie tylko sposób wiązania tego związku, ale również zaprojektować inne fosfonowe inhibitory o dużo większej skuteczności (7). Aminopeptydaza A bierze udział w przemianach angiotensyny II i cholecystokininy w mózgu. Poznanie tego enzymu stało się możliwe dzięki dostępności specyficznego inhibitora – fosfonowego analogu

kwasy glutaminowego, który służył jako sonda umożliwiająca określenie roli poszczególnych aminokwasów miejsca aktywnego aminopeptydazy A (8).

Związki fosfonowe są silnymi inhibitorami tych enzymów proteolitycznych, które katalizują reakcje hydrolizy z bezpośrednim atakiem wody na wiązanie peptydowe substratu, natomiast aktywność peptydaz, dla których mechanizm katalizy wymaga utworzenia kowalencyjnego wiązania między enzymem a substratem, jest słabiej hamowana przez inhibitory tego typu (9).

Liczną grupą enzymów, dla których opisano fosfonowe inhibitory są syntetazy (np. syntetaza glutaminy, asparaginy itp.), których koenzymem jest ATP, a produktem pośrednim reakcji enzymatycznej jest fosforanowa pochodna substratu, której analogiem mogą być właśnie fosfoniany (10).

Kwasy fosfonowe mogą być analogami nie tylko aminokwasów, ale także innych związków naturalnych i odgrywać znaczącą rolę w leczeniu wielu chorób. Przykładem może być fosfonowy analog fosfolipidów, który jest inhibitorem fosfolipazy A i B, enzymów, których nadprodukcja powoduje defekty płuc u nowo narodzonych dzieci (11). Wiele uwagi poświęcono również bisfosfonianom, które stosuje się w leczeniu osteoporozy i innych chorób kości (12), a także kompleksom kwasów fosfonowych z metalami, które stosuje się z powodzeniem jako leki antynowotworowe (13).

Nie zawsze jednak fosfoniany mają tak „subtelne” zastosowanie. Pierwsze syntetyczne związki tego typu powstały pod koniec XIX w., a ich przemysłowa synteza jest możliwa od roku 1905. Obecnie stanowią one dużą grupę substancji ksenobiotycznych, które uwalniane są do środowiska w ogromnych ilościach. Wśród nich znajdują się pestycydy (14,15), środki antykorozyjne (16), gazy bojowe (17), dodatki do polimerów, proszków do prania itp. (18).

W 1994 r. doszło do tragedii w tokijskim metrze – grupa terrorystów zabiła ponad 20 osób i raniła około 500 innych, używając gazu bojowego Sarin (GB). Gaz ten wprawdzie nie jest produkowany już od 1968 r., ale siły zbrojne wielu krajów posiadają zmagazynowane ogromne ilości tego środka w różnej postaci. W 1993 r. 132 państwa podpisały umowę (Chemical Weapons Convention), w której zobowiązują się zniszczyć tego typu związki w sposób nieodwracalny. Neutralizacja Sarinu może być prowadzona za pomocą NaOH, ale reakcja ta wymaga bardzo drastycznych warunków termicznych i ciśnienia, a w jej wyniku powstają związki, które także są problemem dla środowiska. Analogiczną reakcję neutralizacji Sarinu można przeprowadzić w łagodnych warunkach temperatury i ciśnienia, używając hydrolaz fosfonianów (enzymów OPH) – 1 mg takich enzymów katalizuje całkowitą hydrolizę 1 g Sarinu w czasie krótszym niż 1h i w wyniku tej reakcji powstają związki, które również mogą być całkowicie rozłożone (19). Wyniki te sugerują, że warto brać pod uwagę metody biologiczne przy likwidacji Sarinu i jemu podobnych związków (20).

Niewątpliwie najliczniejszą grupą ksenobiotyków fosfonowych są pestycydy. Począwszy od lat pięćdziesiątych XX w. zaczęto wprowadzanie tych środków do rol-

nictwa. Ich skuteczność powodowała, że z roku na rok wzrastała produkcja tych związków, przynosząc ogromne korzyści finansowe wielkim koncernom chemicznym. Najlepszym przykładem jest sukces komercyjny fosfonowej pochodnej N-metyloglicyny (glifozat), wprowadzonej na światowy rynek przez koncern Monsanto pod nazwą handlową Roundup®. Jest to nieselektywny, powschodowy herbicyd o szerokim spektrum działania, stosowany na ogromną skalę ze względu na doskonałe właściwości fitotoksyczne (14).

2. Biodegradacja kwasów fosfonowych

Skoro związki fosfonowe, obok fosforanów, diestrów, bezwodników i tym podobnych, wchodzą w skład naturalnie występujących w organizmach żywych substancji zawierających fosfor, a dodatkowo trafiają do środowiska na skutek działalności człowieka, można założyć istnienie szlaków biodegradacji tych związków. W ciągu ostatnich lat badania nad właściwościami mikroorganizmów zdolnych do degradacji fosfonianów zostały znacznie zintensyfikowane.

Główne ich nurty to:

- badanie zdolności mikroorganizmów do wykorzystywania fosfonianów jako jedyne źródła fosforu dla wzrostu i określanie struktury powstałych produktów rozkładu,
- badanie możliwości wykorzystywania fosfonianów jako jedyne źródła węgla i energii (oraz fosforu, bądź fosforu i azotu w przypadku związków aminofosfonowych) prowadzącego do całkowitej mineralizacji tych związków,
- poznanie enzymów szlaków degradacji fosfonianów i wykorzystanie tej wiedzy w celu otrzymania, np. transgenicznych roślin odpornych na herbicydy fosfonowe.

2.1. Genetyczna kontrola biodegradacji kwasów fosfonowych – regulon *pho*

Dla większości badanych dotąd mikroorganizmów fosforan nieorganiczny stanowił preferowane źródło fosforu i jego obecność hamowała transkrypcję zespołu genów regulatorowych odpowiedzialnych za transport i wykorzystanie alternatywnych związków fosforowych, takich jak inne fosforany, fosforyny oraz fosfoniany (21). Fosforan nieorganiczny jest transportowany do komórki bakteryjnej przez tzw. przenośnik niskiego powinowactwa Pit (*phosphate inorganic transporter*), wówczas gdy występuje w nadmiarze, czyli w stężeniu powyżej 4 μM . Dopiero w warunkach, gdy stężenie zewnątrzkomórkowego fosforanu spada poniżej tej wartości (nazywamy to warunkami głodu fosforanowego) indukowane są geny kodujące fosforanowy przenośnik wysokiego powinowactwa (Pst) oraz geny odpowiedzialne za funkcje metaboliczne umożliwiające wykorzystanie innych form fosforu, między innymi fosfonianów. Zespół tych genów, nazywany regulonem *pho*, znajduje się w całości pod

kontrolą tych samych warunków genetycznych i fizjologicznych i stanowi podstawowy element warunkujący wykorzystywanie kwasów fosfonowych i innych rodzajów związków fosforu w warunkach laboratoryjnych i najprawdopodobniej również w środowisku (22,23).

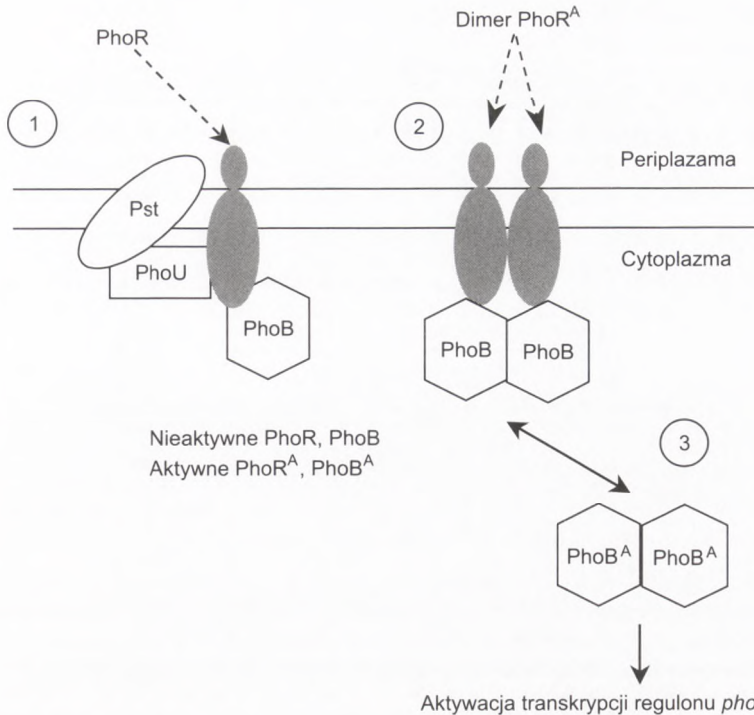
Strukturę regulonu *pho* poznano u *Escherichia coli*. Zbudowany jest on z co najmniej 31 genów składających się na osiem jednostek transkrypcyjnych, z których każda poprzedzona jest genem promotorem zawierającym miejsce aktywacji z konsensusową sekwencją *pho box* aktywowaną przez białko PhoB (24).

Do inicjacji ekspresji genów będących pod kontrolą regulonu *pho* konieczna jest aktywacja genów *phoR* (gen sensorowy) i *phoB* (gen regulatorowy) przez białka PhoB i PhoR należące do dużej rodziny dwuskładnikowych czynników regulatorowych odpowiedzialnych za reakcje na różnorodne bodźce środowiskowe u bakterii (23). PhoR jest białkiem transmembranowym, syntezowanym oraz ulegającym autofosforylacji, gdy fosforan nieorganiczny staje się czynnikiem limitującym wzrost. Pod wpływem autofosforylacji białko PhoR przekształcane jest z formy represora (PhoR^R) w aktywator (PhoR^A), który posiada właściwości białkowej kinazy histydynowej i przeprowadza transfosforylację białka aktywującego transkrypcję, PhoB, które również indukowane jest w warunkach fizjologicznego głodu fosforanowego (26).

Ufosforylowana forma aktywatora PhoB (fosfoPhoB) rozpoznaje osiemnastonukleotydową sekwencję konsensusową *pho box*, stanowiącą część promotora wielu genów (24). W przekazywanie sygnału zaangażowane są białka PstS, PstC, PstA, PstB (białko transportowe dla fosforanu), PhoU, PhoR (sensor), PhoB (aktywator) i polimeraza RNA. W przypadku występowania nadmiaru zewnątrzkomórkowego fosforanu, PhoR przeprowadza defosforylację fosfoPhoB i transkrypcja jest zatrzymana. Mechanizm i natura fizykochemiczna przekazywania sygnałów na białko PhoR nie są dotąd znane, wiadomo jedynie, że stężenie zewnątrzkomórkowego fosforanu odbierane i przekazywane jako sygnał dla represji regulonu *pho* wynosi około 4 μM (24). Uważa się, że zablokowana forma regulonu *pho* to kompleks składający się z nieaktywnego białka PhoR^R, białka PhoU i czterech białek transportujących (PstS, C, A i B). Warunkiem utworzenia tego kompleksu białkowego jest wysycenie białka PstS fosforanem nieorganicznym.

Odwroćenie represji regulonu *pho* jest najprawdopodobniej procesem trzyetapowym (rys. 2). Spadek stężenia fosforanu zewnątrzkomórkowego powoduje zmiany konformacyjne w systemie białek Pst, umożliwiając interakcje z domeną PhoR w periplazmie, co powoduje oddysocjowanie PhoR od białka PhoU w obrębie kompleksu represora i utworzenie dimeru PhoR. Oznacza to przekształcenie tego białka z formy represora (PhoR^R) w formę aktywatora (PhoR^A). Białko PhoR w formie dimeru nie oddziałuje z systemem białek Pst i zachowuje się jak autofosforylaza, mogąca przeprowadzić fosforylację białka PhoB, czyli jego przekształcenie z formy represora w aktywator transkrypcji genów regulonu *pho* (27).

Pierwszorzędowa kontrola regulonu *pho* odbywa się zatem poprzez rozpoznawanie poziomu zewnątrzkomórkowego fosforanu przez system białek receptoro-

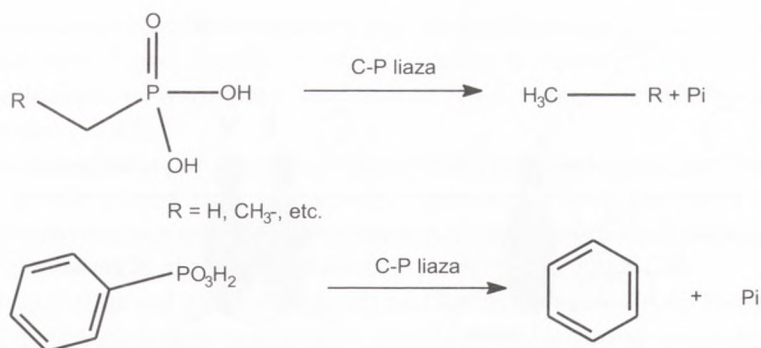


Rys. 2. Uproszczony schemat aktywacji regulonu *pho* w komórce bakteryjnej w warunkach głodu fosforanowego.

wych Pst zlokalizowanych na powierzchni komórki. System Pst razem z białkiem PhoU, w sposób dotąd niecałkowicie jasny, reguluje aktywność białka PhoR w procesie najprawdopodobniej polegającym na asocjacji i dysocjacji białkowych mono- i dimerów (26).

2.2. C-P liaza – rozkład związków alkilo- i fenylofosfonowych

Zdolność mikroorganizmów do degradacji kwasów fosfonowych jest doskonale udokumentowana (28-32). Większość badanych mikroorganizmów izolowanych ze środowiska w warunkach laboratoryjnych zdolna była jedynie do wykorzystywania fosfonianów jako jedynego źródła fosforu dla wzrostu, pod warunkiem niewystępowania fosforanu nieorganicznego w podłożu hodowlanym. Poznanie mechanizmu działania regulonu *pho* oraz fakt, że dla wystąpienia warunków głodu fosforowego stosunek zawartości węgla do fosforu w komórce musi wynosić minimum 200:1, stanowiło przez długi czas podstawę założenia, że ksenobiotyki fosfonowe wręcz nie mogą stanowić źródła węgla i energii dla wzrostu komórek mikroorganizmów,



Rys. 3. Reakcja enzymatycznego rozszczepienia wiązania między atomami węgla i fosforu w cząsteczce kwasu fosfonowego przeprowadzana przez zespół enzymatyczny C-P liazę.

gdyż nadmiar fosforanu uwalniany z cząsteczek fosfonianów, rozkładanych by zaspokoić głód węglowy, skutecznie hamuje transport oraz aktywność enzymów rozkładających wiązanie C-P.

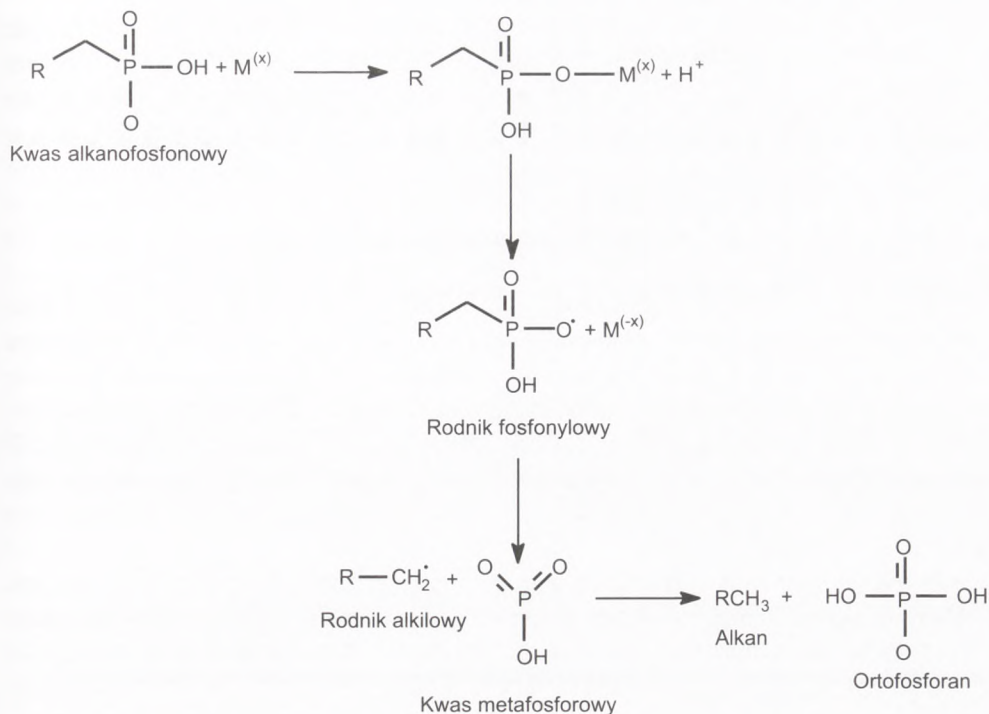
Badania produktów rozkładu fosfonianów alifatycznych i aromatycznych będących źródłem fosforu dla mikroorganizmów wskazywały na zdolność mikroorganizmów do rozkładu stabilnego wiązania pomiędzy atomami węgla i fosforu w cząsteczce fosfonianu, czego konsekwencją było uwalnianie odpowiedniego węglowodoru (33-35). Wraz z doniesieniami o istnieniu mikroorganizmów takich jak *Agrobacterium radiobacter*, zdolnych do rozkładu wiązania C-P szeregu różnych strukturalnie fosfonianów (alkilo-, winylo-, propylo-, propenylo-, chlorometylofosfonianów) powstała hipoteza o istnieniu w komórkach mikroorganizmów enzymu, bądź raczej zespołu enzymów, zapewniających zdolność do wykorzystywania tak szerokiego spektrum strukturalnie różnych związków fosfonowych. Enzymom tym nadano nazwę C-P liazę. Termin ten określa enzymy katalizujące rozcięcie wiązania C-P w obrębie cząsteczki fosfonianu z uwolnieniem fosforanu nieorganicznego wykorzystywanego przez komórkę i stosownej reszty organicznej (rys. 3) (36).

Do dziś, mimo intensywnych starań wielu zespołów badawczych, nie udało się uzyskać aktywnych preparatów enzymatycznych C-P liazę (37,38). Zastosowanie metod modelowania chemicznego pozwoliło jednak zaproponować trzy prawdopodobne modele mechanizmu rozkładu wiązania C-P:

- mechanizm rodnikowej defosfonylacji, oparty na modelu reakcji alkilofosfonianów z czteroocianem ołowiu (33).

- przemianę kwasu fosfonowego w formę kationową kolejno przekształcaną w rodnik fosforanylowy i ostatecznie rozcięcie tego produktu pośredniego z utworzeniem fosforynu i odpowiedniego węglowodoru (34).

- defosfonylację następującą jako reakcja na łańcuchu bocznym związku powstałego w wyniku kondensacji cząsteczki aminofosfonianu z cząsteczką pirydoksału lub fosforanu pirydoksału (34).



Rys. 4. Proponowany mechanizm działania C-P liazy.

Proponowane mechanizmy są oparte wyłącznie na modelowaniu i nie znalazły dotąd potwierdzenia w systemach biologicznych. W wyniku przeprowadzenia badań genetycznych dostarczono jednak pewnych informacji o funkcjonowaniu enzymów C-P liazy *in vivo*. Wykazano, że szczepy zmutowane tak, iż straciły zdolność wykorzystywania fosfonianów jako źródła fosforu, równocześnie straciły zdolność przyswajania fosforynu (22). Na tej podstawie zaproponowano dwuetapowy przebieg reakcji katalizowanej przez C-P liazę. Pierwszy krok miałby polegać na redukcyjnym rozcięciu wiązania C-P z utworzeniem fosforynu jako związku przejściowego. W następującej kolejno reakcji kompleks enzymatyczny C-P liazy utleniałby fosforyn do fosforanu, z uwodnieniem następującym po rozszczepieniu wiązania (rys. 4).

Przy założeniu słuszności tej koncepcji byłby to pierwszy przykład cyklu oksydacyjno-redukcyjnego w obiegu fosforu. Jest to również wyjaśnienie przyczyn trudności z uzyskaniem aktywnych preparatów C-P liazy z ekstraktów komórkowych, bowiem enzymy przeprowadzające reakcje redox są najczęściej zlokalizowane w błonie komórkowej i rozbitcie komórki najczęściej niszczy ich aktywność (22).

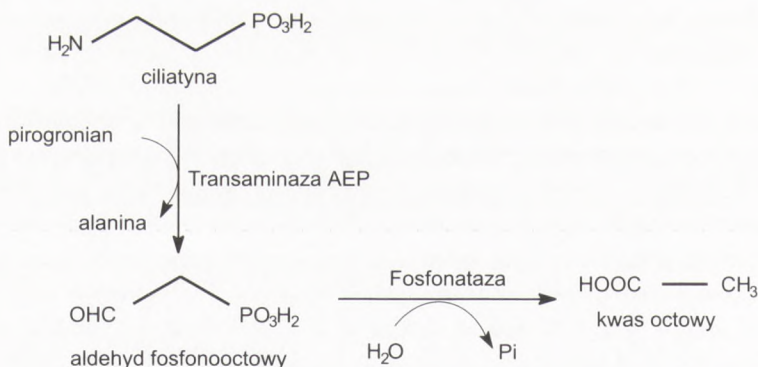
Rozkład alkilo- i fenylofosfonianów prowadzą przede wszystkim bakterie gramujemne (29). Spośród bakterii gramododatnich zdolność tę udokumentowano tylko dla *Arthrobacter* sp. GLP-1 (37,38) i *Bacillus megaterium* 2BLW (39). Podjęto również

próby badania rozkładu alkilo- i fenylofosfonianów przez grzyby i zdolność tę, jak się wydaje, posiadają *Penicillium citrinum* (32), *Penicillium notatum* (30), *Trichoderma harzanium*, *Aspergillus niger*, *Scopularopsis* sp. (31) i *Cladosporium resinae* (40). Także w tym przypadku nie udało się uzyskać aktywnych preparatów enzymatycznych C-P liazy.

2.3. Rozkład kwasu 2-aminoetylofosfonowego (ciliatyny)

Pierwszym związkiem z grupy kwasów aminofosfonowych, którego mikrobiologiczną degradację poznano dokładnie zarówno na poziomie regulacji transportu i rozkładu, jak i powstających metabolitów pośrednich, był kwas 2-aminoetylofosfonowy (2-AEP, naturalnie występująca ciliatyna). Transport ciliatyny do komórki bakteryjnej został poznany i opisany u *Bacillus cereus* oraz *Pseudomonas aeruginosa* A237 jako specyficzny wobec fosfonowego substratu i indukowany jego obecnością (41). Rozkład cząsteczki ciliatyny wewnątrz komórki bakteryjnej przebiega dwuetapowo (rys. 5).

Pierwszą przemianą zachodzącą podczas enzymatycznej degradacji ciliatyny jest reakcja transaminacji prowadząca do powstania aldehydu fosfonoctowego, gdzie akceptorem grupy aminowej jest kwas pirogronowy. Reakcja ta wymaga obecności fosforanu pirydoksalu. Enzym katalizujący tę reakcję [EC 2.6.1.37] został wyizolowany z *P. aeruginosa* (42), a ostatnio także z *Salmonella typhimurium* (43) i okazał się wysoce specyficzny zarówno wobec substratu, jak i kwasu pirogronowego. Kolejnym etapem jest hydrolityczny rozkład wiązania C-P w cząsteczce aldehydu fosfonoctowego z uwolnieniem fosforanu nieorganicznego i powstaniem aldehydu octowego. Enzym – hydrolaza aldehydu fosfonoctowego [EC 3.11.1.1] – nazwany fosfonatazą, został oczyszczony z obu badanych szczepów, *B. cereus* i *P. aeruginosa* (44,45), co pozwoliło na określenie mechanizmu jego działania. Enzymatyczne rozcięcie wiązania C-P polega na oddziaływaniu pomiędzy lizyną centrum aktywnego fosfona-



Rys. 5. Szlak biodegradacji kwasu 2-aminoetylofosfonowego.

tazy a grupą karbonylową w cząsteczce aldehydu fosfonooctowego prowadzącym do procesu β – eliminacji (46).

Oba enzymy biorące udział w rozkładzie cząsteczki ciliatyny są syntetyzowane w komórce bakteryjnej jedynie w warunkach ograniczonego dostępu fosforanu nieorganicznego i hamowane przez jego obecność, a geny je kodujące znajdują się w obrębie zespołu genów wcześniej opisanego regulonu *pho*. Cechy te zawężają katabolityczne możliwości mikroorganizmów do pobierania i rozkładu ciliatyny do sytuacji, gdy ta stanowi jedyne źródło fosforu dla wzrostu. Uniemożliwiają one natomiast wykorzystywanie tego związku jako źródła węgla czy węgla i fosforu jednocześnie, gdyż nadmiar fosforanu uwalniany z cząsteczki ciliatyny rozkładanej w stopniu zapewniającym odpowiednią ilość węgla hamuje transport i reakcje degradacji.

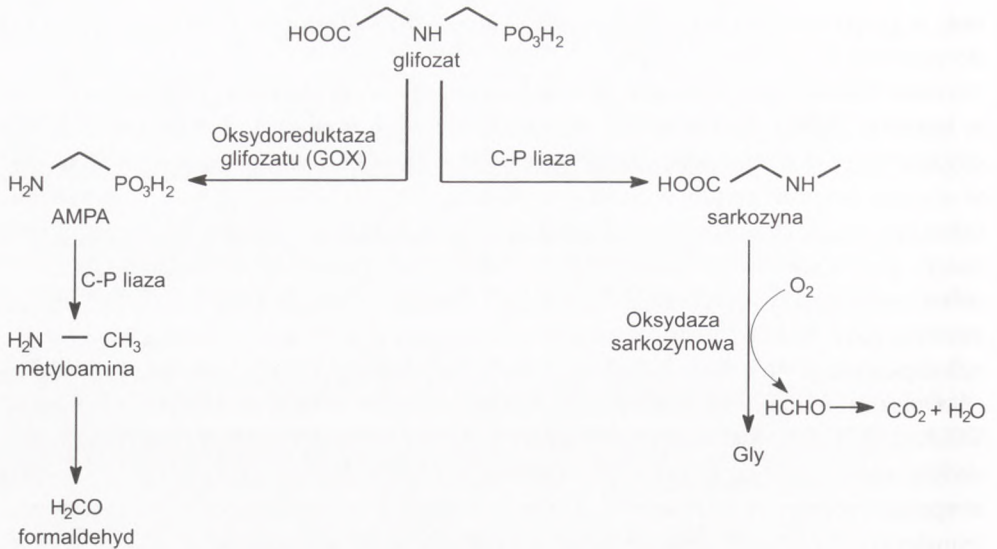
Opisano jednak również występowanie enzymów szlaku degradacji ciliatyny w nowo wyizolowanym szczepie *Pseudomonas putida* NG2, charakteryzującym się zdolnością wykorzystywania tego aminofosfonianu jako źródła węgla, azotu i fosforu w sposób niezależny od obecności fosforanu nieorganicznego (47). Enzymy – aminotransferaza 2-AEP: pirogronian oraz fosfonataza, których obecność została potwierdzona badaniami aktywności ekstraktu komórkowego *P. putida* NG2, były indukowane obecnością kwasu 2-aminoetylofosfonowego niezależnie od kontroli regulonu *pho*.

Szczep grzybowy *Penicillium purpurogenum* N1 zdolny był do wykorzystywania tego naturalnego aminofosfonianu stosowanego jako źródło azotu w podłożu również na drodze niezależnej od statusu fosforanowego komórki (48)

2.4. Mikrobiologiczny rozkład N-fosfonometyloglicyny (glifozat)

Biodegradacji tego związku poświęcono najwięcej badań ze względu na jego masowe zastosowanie jako składnika popularnego herbicydu Roundup®. Wykazano, że glifozat ulega szybkiej detoksyfikacji w środowisku, zarówno dzięki właściwości wiązania go przez glebę jak i w wyniku degradacji prowadzonej przez mikroorganizmy glebowe. Do dziś poznano dwa szlaki mikrobiologicznego rozkładu tego związku, oba angażujące zespół enzymatyczny C-P liazy i znajdujące się pod kontrolą regulonu *pho*.

Cząsteczka N-fosfonometyloglicyny jest pobierana przez komórkę bakteryjną w warunkach ograniczenia innych źródeł fosforu i poddana bezpośrednio działaniu C-P liazy degradującej wiązanie C-P. Powstały aminokwas – sarkozyna jest łatwo włączana w ogólny metabolizm komórki i cząsteczka glifozatu jest całkowicie mineralizowana (49). Alternatywnie, inny enzym, oksydoreduktaza glifozatu (GOX), przeprowadza wstępne rozcięcie wiązania pomiędzy atomami węgla i azotu, w wyniku czego powstają cząsteczki kwasu aminometylofosfonowego (AMPA) oraz glioksalanu (50). AMPA kolejno podlega działaniu C-P liazy, reszta fosforanowa wykorzystywana jest przez komórkę jako źródło fosforu, a glioksalan włączany jest w cykl kwasów trikarboksylowych (rys. 6) (51).



Rys. 6. Szlaki mikrobiologicznej degradacji N-fosfonometyloglicyny.

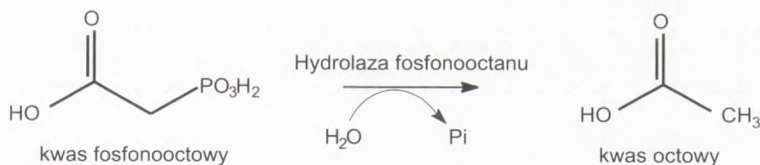
Rozprzestrzenienie enzymów opisanych szlaków biodegradacji glifozatu w populacjach mikroorganizmów zasiedlających środowiska ekspozowane na ten związek jest, jak dotąd, kwestią kontrowersyjną. Badania składu chemicznego ekstraktów glebowych z terenów, na których stosowano herbicyd Roundup[®] wykazywały obecność metabolitu pośredniego degradacji glifozatu czyli kwasu aminometylofosfonowego (AMPA), co sugerowało obecność enzymu oksydoreduktazy glifozatu (GOX) w mikroorganizmach glebowych. Wszystkie opisane, jak dotąd, szczepy izolowane z takiego materiału w warunkach laboratoryjnych zdolne były do wykorzystywania glifozatu jako źródła fosforu poprzez bezpośrednie rozcięcie wiązania C-P, czyli według szlaku sarkozynowego, nie produkowały natomiast AMPA. Przypuszcza się, że przebieg degradacji glifozatu w glebie jest wynikiem współdziałania różnych grup mikroorganizmów, stąd wyniki otrzymane na podstawie badań czystych kultur nie oddają rzeczywistych procesów zachodzących w środowisku naturalnym. Jakkolwiek udało się pozyskać nieliczne szczepy bakteryjne posiadające aktywność oksydoreduktazy GOX, większość pochodziła jednak z poprodukcyjnych ścieków przemysłowych zanieczyszczonych glifozatem, a nie ze środowiska glebowego (50). Do tej skromnej grupy ostatnio dołączono szczep *Xantomonas maltophila* zdolny do degradacji kwasu N-fosfonometyloiminodioktowego (PIA), głównego związku pośredniego przemysłowej syntezy N-fosfonometyloglicyny. Szczep ten degradujący glifozát w obecności PIA, posiadał zdolność wytwarzania AMPA w warunkach głodu fosforanowego (52). Wyizolowano również termofilny szczep *Geobacillus caldxylosilyticus* T20, w którym wykazano aktywność GOX (53). Wspomnieć tu należy, że mikroorganizmy posiadające aktywność oksydoreduktazy glifozatu (GOX) znalazły ogromne

zastosowanie praktyczne, gdyż ich geny wykorzystywane zostały do uzyskiwania roślin uprawnych odpornych na działanie herbicydu zawierającego glifozat (50).

Wyizolowano ponadto szczep *Streptomyces lusitanus* StC zdolny do degradowania N-fosfonometyloglicyny w sposób niehamowany przez fosforan nieorganiczny (54).

2.5. Biodegradacja kwasu fosfonoctowego

Mikrobiologiczną degradację tego związku opisano stosunkowo niedawno. Badania dotyczące scharakteryzowania enzymu odpowiedzialnego za rozkład kwasu fosfonoctowego prowadzone były na nietypowym szczepie *Pseudomonas fluorescens* 27F uzyskanym metodą kultury wzbogaconej. Wyizolowany szczep zdolny był do wykorzystywania kwasu fosfonoctowego jako źródła węgla i fosforu, przeprowadzając całkowitą mineralizację kwasu fosfonowego w sposób niezależny od obecności fosforanu nieorganicznego (55,56). Badania te były pierwszym doniesieniem o niezależnej od kontroli regulonu *pho* mikrobiologicznej degradacji syntetycznego fosfonianu. Kwas fosfonoctowy jest podobny strukturalnie do aldehydu fosfonoctowego będącego związkiem pośrednim w szlaku biodegradacji kwasu 2-aminoetylofosfonowego, jednak hydrolaza aldehydu fosfonoctowego jest w odróżnieniu od hydrolazy fosfonoctanu enzymem zależnym od statusu fosforanowego komórki. Hydrolaza fosfonoctanu jest indukowana obecnością substratu, a jej aktywność prowadzi do powstawania równomolowych ilości kwasu octowego i fosforanu (rys. 7), przy czym uwalnianie fosforanu nie hamuje transportu substratu ani ekspresji genu kodującego enzym (55). Gen hydrolazy fosfonoctanu został sklonowany, zsekwenconowany i ekspresjonowany w *Pseudomonas putida* i *Escherichia coli*. Zarówno jego sekwencja, jak i przypuszczalna sekwencja aminokwasów budujących enzym nie odpowiadała żadnemu z poznanych dotychczas enzymów rozcinających wiązanie C-P (57). Strukturalnie enzym ten zbudowany jest z dwóch identycznych podjednostek, a jego aktywność zależna jest od obecności jonów cynku. Hydrolaza fosfonoctanu jest enzymem bardzo ciekawym pod względem sposobu regulacji – jest jedynym znanym przykładem enzymu degradującego fosfoniany indukowanym przez własny substrat, w odróżnieniu od opisywanych w literaturze – będących pod kontrolą regulonu indukowanego stanem głodu fosforanowego – komórki. Dodatkowo, wykorzystywanie przez mikroorganizmy kwasu fosfonowego jako jednocześnie źródła



Rys. 7. Mikrobiologiczny rozkład kwasu fosfonoctowego.

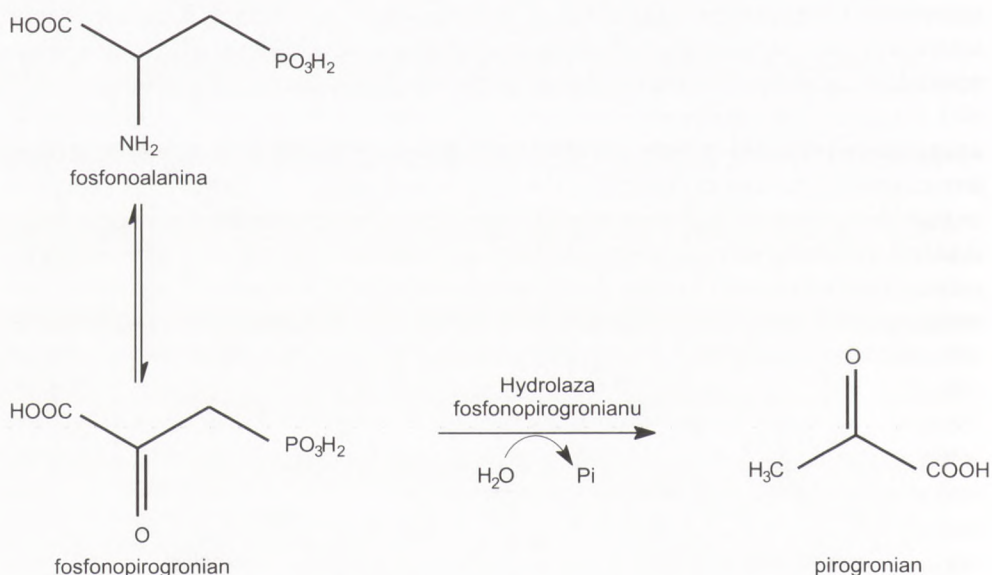
węgla i fosforu, gdzie pobieranie substratu przez komórkę nie jest hamowane przez uwalniany fosforan nieorganiczny odróżnia ten szlak kataboliczny od systemów enzymatycznych rozkładu związków takich jak przykładowo 3-fosfoglicerol u *E. coli*, który nie mógł służyć jako źródło węgla, gdyż fosforan będący produktem rozpadu związku hamował jego transport do komórki (58).

Niedawno opisano rozkład kwasu fosfonoctowego przez grzyba *Penicillium oxalicum*, zdolnego do wykorzystywania tego fosfonianu jako jedyne źródła fosforu dla wzrostu. Częściowo scharakteryzowany enzym odpowiedzialny za rozszczepienie wiązania C-P w cząsteczce fosfonoctanu okazał się odmienny od hydrolazy bakteryjnej, gdyż jego aktywność nie zależała od obecności jonów metali dwuwartościowych (59).

2.6. Rozkład innych kwasów fosfonowych

Ze względu na dużą różnorodność związków fosfonowych oraz ich wciąż wzrastające zużycie, badano również drogi degradacji innych strukturalnie fosfonianów.

Szczep *Burkholderia cepacia* rozkładał fosfonowy związek naturalny – fosfonoalaninę, wykorzystując go jako źródło azotu, węgla i fosforu, a jednym z enzymów tego szlaku rozkładu był enzym analogiczny do fosfomutazy PEP, która bierze udział w syntezie wiązania P-C. W wyniku transaminacji fosfonoalaniny powstawał fosfonopirogronian, który był substratem reakcji katalizowanej przez hydrolazę fosfonopirogronianu i ulegał przekształceniu do pirogronianu i fosforanu nieorganicznego (rys. 8) (60).



Rys. 8. Mikrobiologiczny rozkład fosfonoalaniny.

Enzym ten został częściowo scharakteryzowany i okazał się podobny do PEP fosfomutazy pochodzącej ze szczepu *Pseudomonas gladioli* (61).

Badano również rozkład kwasów fosfinowych, które były wykorzystywane przez mikroorganizmy jako źródło węgla i energii oraz fosforu, a także azotu. W ten sposób degradowały te związki *Agrobacterium radiobacter* (36), *Pseudomonas* sp. 4ASW (39) i *Pseudomonas* sp. GS (62). Na przykład enzymem odpowiedzialnym za degradację fosfinitricyny – była transaminaza biorąca udział w degradacji kwasu γ -aminomasłowego przez *E. coli* K12 (transaminaza GABA : kwas α -ketoglutarynowy, [E.C. 2.6.1.19]) (63).

Warto zauważyć również, że zdolnością do rozcinania wiązania P-C w antybiotykach, np. fosfomicynie można wytłumaczyć odporność niektórych mikroorganizmów na te związki (64).

Opisano również szczep drożdży *Kluyveromyces fragilis* zdolny wykorzystywać syntetyczny 4-aminobutylofosfonian jako źródło azotu w sposób niezależny od statusu fosforanowego komórki. Dokładny szlak degradacji nie został jednak jeszcze zbadany (65).

Ciekawą pod względem potencjału degradacyjnego wobec fosfonianów grupą mikroorganizmów są bakterie z rodzaju *Streptomyces*. Wśród badanych szczepów odnaleziono nie tylko zdolne do syntezy związków zawierających wiązanie C-P, ale również do wykorzystywania fosfonianów uważanych za odporne na biodegradację, takich jak związki 1-aminofosfonowe (66).

3. Podsumowanie

Mechanizm kontroli transportu i syntezy enzymów degradujących kwasy fosfonowe przez zespół genów regulonu *pho* został dokładnie poznany i opisany. Znajomość tych procesów pozwalała przypuszczać, że kwasy fosfonowe są degradowane w środowisku jedynie, gdy mogą służyć jako źródło fosforu w warunkach ograniczonego dostępu fosforanu nieorganicznego.

Założono istnienie C-P liazy, enzymu bądź zespołu enzymów o szerokim spektrum substratowym, indukowanego warunkami głodu fosforanowego, katalizującego rozcięcie wiązania pomiędzy atomami węgla i fosforu w cząsteczce fosfonianu pozwalającego na wykorzystanie powstałej reszty fosforanowej przez komórkę. Wykazano istnienie takiej aktywności enzymatycznej w szczepach izolowanych z gleby, demonstrując powstawanie odpowiednich węglowodorów z degradowanych kwasów alkilofosfonowych. Wyniki tych badań stanowiły dużą wartość poznawczą, budziły jednak wątpliwości co do ewentualnego praktycznego zastosowania takich mikroorganizmów w procesach usuwania zanieczyszczeń powstających przez ciągłe rosnące stosowanie kwasów fosfonowych. Pojawiały się nawet komentarze, że biologiczne oczyszczanie odpadów i zanieczyszczeń fosfonowych mija się z celem (67), ze względu na naturalną zawartość wysokich stężeń fosforanu nieorganicznego

w tego rodzaju środowiskach, które musiałyby hamować procesy degradacji kontrolowane przez regulon rządzący pulą fosforu komórek mikroorganizmów. W ostatnich latach jednak pojawiały się doniesienia o izolowaniu szczepów zdolnych do wykorzystywania fosfonianów jako źródła węgla, azotu oraz fosforu poprzez rozkład tych związków z towarzyszącym uwalnianiem poza komórkę fosforanu nieorganicznego w stężeniach daleko przekraczających próg hamujący ekspresję genów będących pod kontrolą regulonu fosforanowego. Mikroorganizmy te albo posiadają „rozregulowany” system kontroli, albo mechanizm degradacji fosfonianów jest u nich całkowicie niezależny od regulonu *pho*. Za tą drugą możliwością przemawia fakt, że enzymy biorące udział w tym procesie indukowane są obecnością substratu, a nie limitacją dostępnego komórkom fosforu, jak ma to miejsce w przypadku enzymów kontrolowanych przez regulon *pho*. Wszystkie dotąd poznane enzymy tego rodzaju są specyficzne substratowo, co stanowi ograniczenie ich ewentualnego praktycznego stosowania, niemniej jednak stanowią dowód istnienia różnorodnych systemów degradacji kwasów fosfonowych i zachętę do poszukiwań badawczych.

Literatura

1. Freedman L. D., Doak G. O., (1957), *Chem. Rev.*, 57, 479-523.
2. Kafarski P., Mastalerz P., (1984), *Betrage zur Wirkstofforschung*, 21, 1-110.
3. Hendlin D., Stapley E. O., Jackson M., Wallick H., Miller A. K., Wolf F. J., Miller T. W., Chaiet L., Khan F. M., Foltz E. L., Woodruff H. B., Mata J. M., Hernandez S., Mochales S., (1969), *Science*, 166, 122-123.
4. Umezawa H., (1980), *Recent. Results Cancer Res.*, 75, 115-125.
5. Taylor A., Daims M. A., Lee J., Surgenor T., (1982), *Curr. Eye Res.*, 2, 47-56.
6. Pulido-Cejudo G., Conway B., Prolux P., Brown R., Izaguirre C. A., (1997), *Antiviral Res.*, 36, 167-177.
7. Grembecka J., Kafarski P., (2001), *Mini Rev. Med. Chem.*, 1, 133-144.
8. Vazeux G., Iturrioz X., Corvol P., Llorens-Cortes C., (1997), *Biochem. J.*, 327, 883-889.
9. Kafarski P., Lejczak B., (2001), *Curr. Med. Chem.*, 1, 301-312.
10. Kafarski P., Lejczak B., (2000), *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity*, Eds. Kukhar V. P., Hudson H. R., John Wiley & Son, 407-442, Chichester.
11. Lin W. H., Cramer S. G., Turcotte J. G., Thrall R. S., (1997), *Respiration*, 64, 96-101.
12. Rawls R., (1998), *Chem. Eng. News.*, 93, 29-32.
13. Weiss R. B., Christian M. C., (1993), *Drugs*, 46, 360-377.
14. Fest C., Schmidt K. J., (1982), *Organophosphorus pesticides*, Springer Verlag, Berlin.
15. Ohkawa H., (1981), *Insecticide mode of action*, Ed. Coats J. R., Academic Press Inc., New York.
16. Hilderbrand R. L., (1983), *The role of phosphonates in living system*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
17. Zhang Y., Autenrieth R. L., Bonner J. S., Harvey S. P., Wild J. R., (1999), *Biotechnol. and Bioeng.*, 64 (2), 221-231.
18. Egli T., (1988), *Microbiol. Sci.*, 5, 36-39.
19. Williams G. M., Kroes R., Munro I. C., (2000), *Reg. Toxicol. Pharma.*, 31(2/1), 117-165.
20. Atkinson D., (1985), *The herbicide glyphosate*, Eds. Grossbard E., Atkinson D., 127-133, Butterworths, London.
21. Wanner B. L., (1990), *The Molecular Basis of Bacterial Metabolism*, Eds. Hauska G., Thauer R., Springer-Verlag Berlin, 152-163.

22. Metcalf W. W., Wanner B. L., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 587-600.
23. Torriani-Gorini A., (1994), *Phosphate in microorganisms*, Eds. Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver S., 1-3, ASM Press, Washington D.C.
24. Makino K. M., Amemura S. K., Kim A. Makata, Shingawa H., (1994), *Phosphate in microorganisms*, Eds. Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver S., 5-11, ASM Press, Washington D.C.
25. Metcalf W. W., Wanner B. L., (1993), *Gene*, 129, 27-32.
26. Wanner B. L., (1994), *Multiple controls of the Escherichia coli Pho regulon by the Pi sensor PhOR, the Catalytic sensor CreC and acetyl phosphate*, in: *Phosphate in microorganisms*, Eds. Torriani-Gorini A., Yagil E., Silver S., 13-21, ASM Press, Washington D.C.
27. Wanner B. L., (1987), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, 2nd ed, 1, 1326-1333, Eds. Neidhardt F. C., Curtis R. I., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low Jr K. B., Magasanic B., Reznikoff W., Schaechter M., Umberger H. E., Riley M., American Society for Microbiology, Washington DC.
28. Malik J., Barry G., Kishore G. M., (1989), *Biofactors*, 2, 17-25.
29. McGrath J. W., Ternan N. G., Queen J. P., (1997), *Lett. Appl. Microbiol.*, 24, 69-73.
30. Bujacz B., Wieczorek P., Krzysko-Lupicka T., Golab Z., Lejczak B., Kafarski P., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2905-2910.
31. Krzysko-Lupicka T., Strof W., Kubs K., Skorupa M., Wieczorek P., Lejczak B., Kafarski P., (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 549-552.
32. Zboinska E., Maliszewska I., Lejczak B., Kafarski P., (1992), *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 269-272.
33. Cordeiro M. L., Pompliano D. L., Frost J. W., (1986), *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 332-334.
34. Avila L. Z., Loo S. H., Frost J. W., (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 6758-6764.
35. Shames S. L., Wackett L. P., LaBarge S., Kuczkowski R. L., Walsh C. T., (1987), *Bioorg. Chem.*, 15, 366-373.
36. Wackett L. P., Shames L. S., Venditii C. P., Walsh C. T., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 710-717.
37. Pipke, R., Amrhein N., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2868-2870.
38. Pipke, R., Amrhein N., Jackob G. S., Schaefer J., Kishore G. M., (1987), *Eur. J. Biochem.*, 165, 267-273.
39. Quinn J. P., Peden J. M. M., Dick R. E., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 283-285.
40. Sobera M., Wieczorek P., Kafarski P., Lejczak B., (1997), *Toxic. Environ. Chem.*, 61, 229-235.
41. Lacoste A. M., Dumora C., Cassaigne A., (1976), *Biochimie (Paris)*, 58, 703-712.
42. Dumora C., Lacoste A. M., Cassaigne A., (1983), *Eur. J. Biochem.*, 133, 119-125.
43. Kim A. D., Baker A. S., Dunaway-Mariano D., Metcalf W. W., Wanner B. L., Martin B. M., (2002), *J. Bacteriol.*, 184, 4134-4140.
44. La Nauze J. M., Rosenberg H., Shaw D. C., (1970), *Biochim. Biophys. Acta.*, 212, 332-350.
45. Dumora C., Lacoste A. M., Cassaigne A., (1989), *Bioch. Biophys. Acta.*, 997, 193-198.
46. Olsen D. B., Hepburn T. W., Moos M., Mariano P. S., Dunaway-Mariano D., (1988), *Biochemistry*, 27, 2229-2234.
47. Ternan, N. G., Queen J. P., (1998), *System. Appl. Microbiol.*, 21, 346-352.
48. Klimek-Ochab M., Obojska A., Lejczak B., (2003), *Chemistry for Agriculture*, Eds. Gorecki H., Dobrzański Z., Kafarski P., vol.4., CZECH-POL-TRADE, Czechy, 583-588.
49. Dick, R. E., Queen J. P., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 134, 177-182.
50. Kishore G. H., Barry G., (1992), *Glyphosate tolerant plants*. International patent PCT/US91/04514.
51. McAuliffe K. S., Hallas L. E., Kulpa C. F., (1990), *J. Ind. Microbiol.*, 6, 219-221.
52. Carson D. B., Heitkamp M. A., Hallas L. E., (1997), *Can. J. Microbiol.*, 43, 97-101.
53. Obojska A., Ternan N. G., Lejczak B., Kafarski P., McMullan G., (2002), *Appl Environ Microbiol.*, 68, 2081-2084.
54. Obojska A., Lejczak B., Kubrak M., (1999), *Appl Microbiol Biotechnol.*, 51, 872-876.
55. McMullan G., Queen J. P., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 320-324.
56. McMullan G., Harrington F., Queen J. P., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1364-1366.
57. Kulakova A. N., Kulakov L. A., Queen J. P., (1997), *Gene*, 195, 49-53.
58. Brzoska, P., Rimelle M., Brzostek K., Boos W., (1994), *J. Bacteriol.*, 176, 15-20.

59. Klimek-Ochab M., Lejczak B., Forlani G., (2003), FEMS Microbiol. Lett., 222, 205-209.
60. Ternan, N. G., McGrath J. W., Queen J. P., (1998), Appl. Environ. Microbiol., 64, 2291-2294.
61. Nakashita H., Shimazu A., Hidaka T., Seto H., (1992), J. Bacteriol., 174, 6857-6861.
62. Albrecht B., Weidhase R., Stock M., Weidhase R. A., (1991), J. Basic Microbiol., 31, 403-409.
63. Schultz A., Taggeselle P., Tripier D., Bartsch K., (1990), Appl. Environ. Microbiol., 56, 1-6.
64. Quinn J. P., (1989), Lett. Appl. Microbiol., 8, 113-116.
65. Ternan N. G., McMullan G., (2000), FEMS Microbiol. Lett., 184, 237-240.
66. Obojska A., Lejczak B., (2003), Appl Microbiol Biotechnol., (E-pub).
67. Cook A. M., (1988), *Mixed and multiple feedstocks*, Eds. Hamer G., Egli T., Snozzi M., EFB Konstanz, 71-83.