

MARIA J. KRÓL, ANDRZEJ PERZYŃSKI

Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

WYKORZYSTANIE BENZENU JAKO JEDYNEGO ŹRÓDŁA WĘGLA
W WIĄZANIU WOLNEGO AZOTU PRZEZ BAKTERIE Z RODZAJU
AZOSPIRILLUM I PSEUDOMONAS STUTZERI

Utilisation of benzene as the sole carbon source in fixation of free nitrogen by *Azospirillum* spp.
and *Pseudomonas stutzeri* strains of bacteria

ABSTRAKT: Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri* były izolowane wcześniej z endoryzofery jęczmienia (*Hordeum sativum*), kukurydzy (*Zea mays*), uprawianych na różnych glebach i z wydmuchrzycy piaskowej (*Elymus arenarius*) rosnącej na piaskach wybrzeża Bałtyku (Sobieszewo i Świnoujście). Szczepy te były zdolne do degradacji benzenu. Wiązanie azotu przez szczepy *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri* (głodzone), wyrażone redukcją acetylenu, było badane w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla w czasie 168 godzin. Najwyższą aktywność nitrogenazy *Azospirillum* spp. stwierdzono od 24 h do 48 h, gdy wahała się od 108,19 nM do 109,71 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ fazy gazowej. Najwyższą aktywność nitrogenazy *Pseudomonas stutzeri* stwierdzono po 168 h, wynosiła ona około 83,8 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$.

słowa kluczowe: key words:

Azospirillum spp. – *Azospirillum* spp., *Pseudomonas stutzeri* – *Pseudomonas stutzeri*, benzen – benzene, redukcja acetylenu – acetylene reduction

WSTĘP

W środowisku glebowym benzen występuje w bardzo małych ilościach. Przede wszystkim znajduje się on w ropie naftowej (do $0,4 \text{ g} \cdot 1000 \text{ cm}^{-3}$) i benzynie. Aktywność wulkaniczna i pożary lasów przyczyniają się do pojawienia się benzenu w środowisku.

Stwierdzono zdolność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 do biodegradacji samego benzenu z mieszanki wieloskładnikowej związków aromatycznych z fenolem, toluenem, naftalenem, chlorobenzenem i trichloroetylenem (11). Szczep ten syntetyzował niespecyficzną 1,2-dioksygenazę toluenową podobną do tej, którą zidentyfikowano w szczepie *Pseudomonas putida*, umożliwiającą tlenową degradację benzenu i fenoli. Znana jest również tlenowa biodegradacja metylobenzenu (toluenu) do form orto-,

meta- i para-ksylenu przez monoooksygenazy szczepów OX1, M1 i R1 *Pseudomonas stutzeri* (4). Umowny schemat cyklu utleniania benzoesanów według G e s c h e r a i in. (9) można przedstawić dla bakterii via ortho-katechol i dla grzybów via β -ketoadypinian. Natomiast u proteobakterii *Azoarcus evansii* nie stwierdzono cyklu utleniania benzoesanów ani via ortho-katechol, ani via protokatecholanu (44). *Azoarcus toluovorans* i *Azoarcus toluoclasticus*, a z bakterii brodawkowych *Burkholderia kururiensis* oraz rodzaje *Bradyrhizobium* i *Mezorhizobium* mogą rozkładać różne związki benzenowe tylko w warunkach denitryfikacji (1, 35, 41, 42, 44). Znacznie większe znaczenie niż benzen mają jego homologi oraz ich pochodne, np. nitrobenzen i wiele innych, służące do produkcji farb, lakierów, rozpuszczalników, lekarstw, tworzyw sztucznych itp. Nitrobenzen jest jedną z toksycznych pochodnych benzenu, jego emisja do środowiska może być wysoka, szczególnie w fabrycznych osadach ściekowych, ponieważ jest on używany przy produkcji poliuretanów, jako rozpuszczalnik w przemyśle rafineryjnym i przy produkcji celulozy, przy wytwarzaniu różnych związków organicznych i innych. F l e t c h e r i M c F a r l a n e (8, 31-33) stwierdzili, że w glebie skażonej nitrobenzenem system korzeniowy soi (*Glycine max*) pobiera go w ilości 0,02–100 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i akumuluje aż do 80% tego związku.

W strefie korzeniowej roślin obserwuje się zwiększone tempo bioremediacji organicznych zanieczyszczeń w porównaniu z glebą nieryzosferową. Wiąże się to przede wszystkim z aktywnością metaboliczną mikroory licznie zasiedlającej ryzosferę. Okazuje się, że istotne znaczenie mają też mikroorganizmy bezpośrednio związane z rośliną, żyjące wewnątrz tkanek korzenia, łodygi i liści (5). Do takich bakterii między innymi należą ryzobakterie z rodzaju *Azospirillum* i endofit *Pseudomonas stutzeri*, wiążące wolny azot. B a l d a n i i in. (2) zaliczają *Azospirillum* sp. do fakultatywnych endofitów zdolnych do kolonizacji zarówno zewnętrznej powierzchni korzenia, jak i wewnętrznych przestrzeni międzykomórkowych, korzystnie oddziałujących na wzrost i rozwój roślin.

We wcześniejszych badaniach stwierdziliśmy, że szczepy bakterii *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri*, wyizolowane z endoryzosfery jęczmienia jarego, kukurydzy i wydmuchrzycy piaskowej, wiązały wolny azot przy wykorzystaniu naftalenu, antracenu, fenantrenu, pirenu i chryzenu jako jedyne źródła węgla (19-23, 28, 45).

Celem niniejszej pracy były dalsze badania nad aktywnością nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri* hodowanych w pożywkach bezazotowych z benzenem jako jedynym źródłem węgla.

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano 7 szczepów bakterii *Azospirillum* spp. i 7 szczepów *Pseudomonas stutzeri* wyizolowanych wcześniej, a pochodzących z endoryzosfery jęczmienia jarego (*Hordeum sativum*), kukurydzy (*Zea mays*) i wydmuchrzycy piaskowej (*Elymus arenarius*) zasiedlającej wydmy nadbałtyckie (14-17, 25).

Szczepy bakterii *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri* badano określając wykorzystywanie przez nie benzenu jako jedynego źródła węgla i energii podczas wzrostu i wiązania azotu w ciągu 168 godzin w bezazotowej pożywce mineralnej (6, 7). Bakterie po zmyciu solą fizjologiczną ze skosów z podłoża ziemniaczanego były głodzone przez 15 godzin inkubacji na pożywce bez źródła węgla (w celu wykorzystania endogennych zapasów). Następnie przenoszono je na półpłynne podłoże z badanym węglowodorem i oznaczano aktywność nitrogenazy. Hodowlę prowadzono w dwóch powtórzeniach w temperaturze 30°C.

Liczebność bakterii (przeżywalność) po głodzeniu określano w odpowiednich rozcieńczeniach na agarze odżywczym i ziemniaczanym. Podobnie określano liczebność komórek po 7 dniach hodowli w podłożu bezazotowym zawierającym benzen jako jedyne źródło węgla. Jako kontrolę przyjmowano wyjściową liczebność bakterii w rozcieńczeniach na tych samych podłożach. Hodowlę na płytkach prowadzono w czterech powtórzeniach.

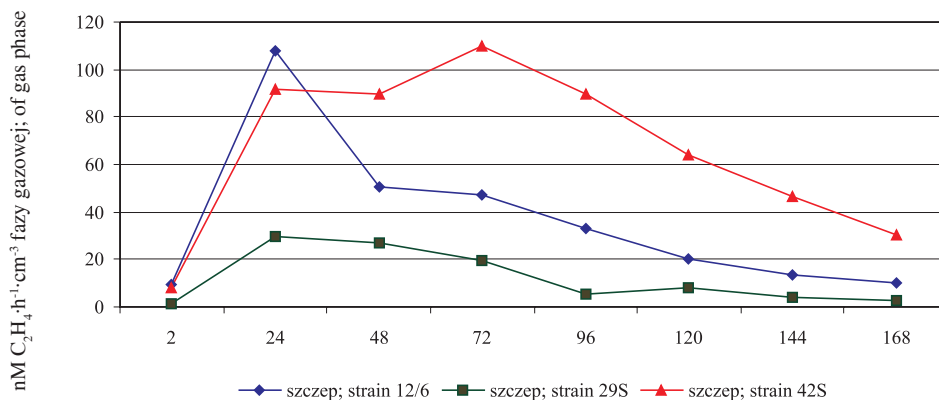
Aktywność nitrogenazy szczepów bakterii oznaczano metodą redukcji acetyleny z wykorzystaniem chromatografu gazowego PAY UNICAM - 204 (Detektor płomieniowo-jonizacyjny FID. Kolumna szklana, długości 2,1 m, wypełnienie Poropak Q 80-120 mesh. Temperatury: dozownik 135°C, detektor 125°C, kolumna 60°C. Jako gaz nośny stosowano odtleniony azot, zawartość O₂ poniżej 2 mg·kg⁻¹). Bakterie hodowano w kalibrowanych buteleczkach zawierających 6 cm³ bezazotowego, półpłynnego podłoża z benzenem w dawce 0,1% (około 2 kropli na buteleczkę, po sterylizacji pożywki) i inkubowano od 2 do 168 godzin w atmosferze 10% acetyleny w temp. 30°C (pojemność fazy gazowej 7 cm³). Pomiary redukcji acetyleny do etyleny wykonywano po 2, 24, 48, 72, 86, 120, 144 i 168 godzinach inkubacji. Jako kontrolę stosowano podłoża nie szczepione z węglowodorem i bez niego.

WYNIKI

Wolno żyjące bakterie z rodzaju *Azospirillum* pochodziły z endoryzosfery jęczmienia (szczep 12/6) uprawianego na czarnej ziemi, a także z endoryzosfery kukurydzy (szczepy: 4B, 35Bb, 77Bb1, 83 B1) uprawianej na madzie średniej i z endoryzosfery wydmuchrzycy piaskowej (szczepy: 29S, 42S) z wydm piaskowych w Sobieszewie. Szczepy bakterii *Pseudomonas stutzeri* pochodziły z endoryzosfery jęczmienia (szczep 102) i z endoryzosfery wydmuchrzycy piaskowej z Sobieszewa (szczepy: 40T1, 40T2, 40T4) i Świnoujścia (szczepy: 52, 53, 54).

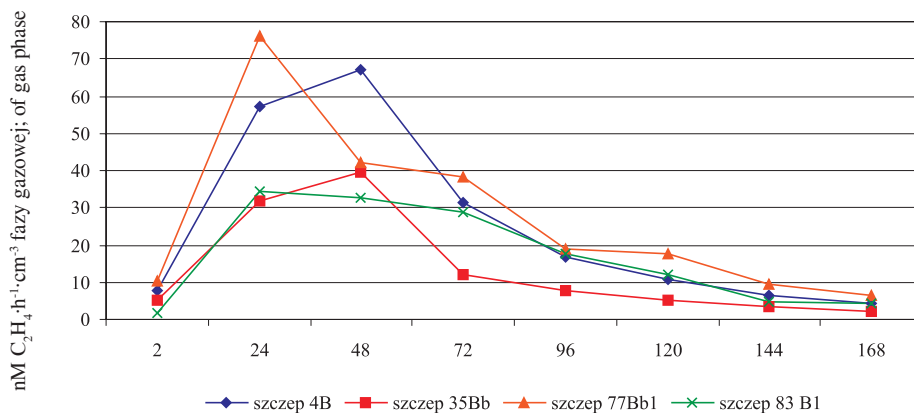
Aktywność nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri*, hodowanych w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla i energii, przedstawiono na rysunkach 1-4. Benzen był wykorzystywany jako jedyne źródło węgla przy wiązaniu N₂ w hodowlach bezazotowych bakterii przez wszystkie szczepy *Azospirillum* spp. i *Pseudomonas stutzeri*.

Redukcja acetyleny przez szczepy wyizolowane z endoryzosfery jęczmienia, kukurydzy i wydmuchrzycy piaskowej nie była wysoka. Średnio najintensywniej za-



Rys. 1. Redukcja acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp., wyizolowane z endoryzofery jęczmienia (12/6) i wydmuchrzy cy piaskowej w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla

The nitrogenase activity of *Azospirillum* spp., isolated from the endorhizosphere of barley (12/6) and *Elymus arenarius*, grown in N-free medium with benzene as the sole carbon source



Rys. 2. Redukcja acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp., wyizolowane z endoryzofery kukurydzy w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla

The nitrogenase activity of *Azospirillum* spp., isolated from the endorhizosphere of maize, grown in N-free medium with benzene as the sole carbon source

chodziła w początkowej fazie hodowli komórek, między 24 a 48 godziną. Aktywność nitrogenazy najszybciej wzrastała u szczepu 12/6 wyizolowanego z endoryzosfery jęczmienia – po 24 h przekroczyła $100 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej, ale w ciągu następnych 12 godzin spadła poniżej $60 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$. Szczep 42S wyizolowany ze strefy korzeniowej wydmuchrzy cy piaskowej najdłużej, od 24 do 96 godziny, utrzymywał aktywność nitrogenazy powyżej $80 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej (rys. 1).

Aktywność nitrogenazy szczepów bakterii wyizolowanych z endoryzosfery kukurydzy była niższa w stosunku do poprzednio wymienionych, ale w pierwszych dwóch dniach badań, między 24 a 48 godziną, utrzymywała się powyżej $60 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej dla szczepów 77Bb1 i 4B (rys. 2). Dwa pozostałe szczepy 35Bb i 83B1 miały dużo niższą aktywność nitrogenazy, która obniżała się wraz z wydłużaniem okresu inkubacji z benzenem.

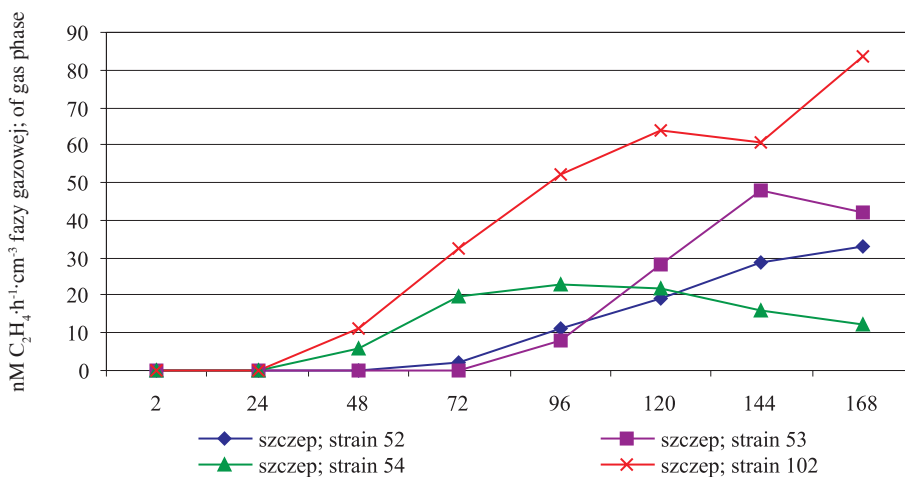
Na podstawie uzyskanych wyników przeżywalności komórek bakterii różnych szczepów *Azospirillum* spp. po 7-dniowej hodowli w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla możemy wnioskować, że liczebność komórek wszystkich szczepów bakterii zdecydowanie wzrosła (tab. 1). Większy przyrost bakterii wcale jednak nie sugeruje wyższego wiązania N_2 , ponieważ u szczepu 4B z bardzo wysoką aktywnością nitrogenazy stwierdzono niższą liczebność komórek na agarze odżywczym i ziemniaczanym w stosunku do kontroli.

W przeciwieństwie do szczepów *Azospirillum* spp., u których aktywność nitrogenazy była najwyższa między 24 a 48 godziną hodowli, najwyższą aktywność nitrogenazy (powyżej $50 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej) u niektórych szczepów *P. stutzeri*

Tabela 1

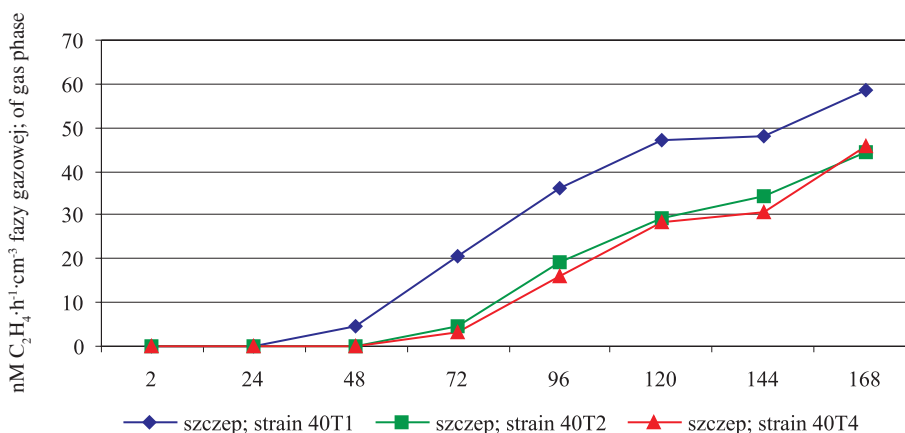
Liczebność bakterii *Azospirillum* spp. na agarze odżywczym i ziemniaczanym po hodowli w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla; liczebność bakterii w $1 \text{ cm}^3 (\times 10^6)$
The number of bacteria *Azospirillum* spp. in nutrient agar and potato agar medium after 7 days' culture in N-free medium with benzene as the sole carbon source; the number of bacteria in $1 \text{ cm}^3 (\times 10^6)$

Szczepy bakterii Strains of bacteria	Liczebność bakterii wyjściowa Initial number of bacteria		Liczebność bakterii po 7 dniach Number of bacteria after 7 days	
	agar odżywczy nutrient agar	PDA z jabłczanem potato agar with malate	agar odżywczy nutrient agar	PDA z jabłczanem potato agar with malate
12/6	275	220	70 400	43 600
4B	252	103	8 400	9 600
35B	1488	1360	160 000	85 600
48B	256	226	15 200	10 400
77Bb1	1984	1216	82 000	52 800
83B1	512	444	19 600	10 800
29S	664	508	29 200	44 000
42S	166	172	34 000	28 400



Rys. 3. Redukcja acetyleny przez szczepy *Pseudomonas stutzeri*, wyizolowane z endoryzofery jęczmienia i wydmuchrzycy piaskowej, w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla (Świnoujście)

The nitrogenase activity of *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the endorhizosphere of barley and *Elymus arenarius*, grown in N-free medium with benzene as the sole carbon source (Świnoujście)



Rys. 4. Redukcja acetyleny przez szczepy *Pseudomonas stutzeri*, wyizolowane z endoryzofery wydmuchrzycy piaskowej, w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla (Sobieszewo)

The nitrogenase activity of *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the endorhizosphere of *Elymus arenarius*, grown in N-free medium with benzene as the sole carbon source (Sobieszewo)

(102 i 40T1) stwierdzono dopiero po 7 dniach (rys. 3 i 4). Wyjątkowo mało aktywny był jeden szczep – 54, wyizolowany z endoryzosfery wydmuchrzycy piaskowej ze Świnoujścia. Szczególnie wysoką aktywność nitrogenazy ($83,8 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej) stwierdzono u szczepu 102 wyizolowanego z endoryzosfery jęczmienia i u szczepu 40T1, wyizolowanego z endoryzosfery wydmuchrzycy piaskowej z Sobieszewa ($58,6 \text{ nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej).

Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących przeżywalności komórek bakterii szczepów *P. stutzeri* po 7-dniowej hodowli w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla wnioskujemy, że liczebność komórek szczepów bakte-

Tabela 2

Liczebność bakterii *P. stutzeri* na agarze odżywczym i ziemniaczanym po hodowli w pożywce bezazotowej z benzenem jako jedynym źródłem węgla; liczebność bakterii w $1 \text{ cm}^3 (\times 10^6)$
 The number of bacteria *P. stutzeri* in nutrient agar and potato agar medium after 7 days' culture in N-free medium with benzene as the sole carbon source;
 the number of bacteria in $1 \text{ cm}^3 (\times 10^6)$

Szczepy bakterii Strains of bacteria	Liczebność bakterii wyjściowa Initial number of bacteria		Liczebność bakterii po 7 dniach Number of bacteria after 7 days	
	agar odżywczy nutrient agar	PDA z jabłczanem potato agar with malate	agar odżywczy nutrient agar	PDA z jabłczanem potato agar with malate
102	720	500	1 000	1 000
52	3 200	2 600	1 000	1 000
53	920	1 540	1 000	1 000
54	300	710	1 000	1 000
40T1	74	90	2 000	3 000
40T2	480	700	1 000	1 000
40T4	230	160	4 000	3 500

Tabela 3

Zestawienie średnich wartości (dane zlogarytmowane) aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp.

Mean value of nitrogenase activity of the strains of bacterium *Azospirillum* spp.
 ($\text{nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej; of gas phase)

Symbol szczepu Symbol of strain	Aktywność nitrogenazy* Nitrogenase activity
12/6	3,27 f
4B	2,78 d
35Bb	2,13 b
77Bb1	3,00 e
83B1	2,40 c
29S	2,04 a
42S	3,96 g
Średnio; Mean	2,79

* wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie
 values marked with different letter are significantly different

Tabela 4

Średnich wartości (dane logarytmowane) aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. w czasie 168 godzin inkubacji
 Mean value (log) of nitrogenase activity of the strains of bacterium *Azospirillum* spp. during 168 hours ($\text{nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej; of gas phase)

Czas w godzinach Time (hours)	Aktywność nitrogenazy* Nitrogenase activity
2	1,60 a
24	3,99 h
48	3,86 g
72	3,47 f
96	2,91 e
120	2,66 d
144	2,11 c
168	1,78 b
NIR; LSD	0,01

* wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie
 values marked with different letters are significantly different

Tabela 5

Zestawienie średnich wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *P. stutzeri*
 Mean value of nitrogenase activity of the strains of bacterium *P. stutzeri*
 ($\text{nM C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-3}$ fazy gazowej; of gas phase)

Symbol szczepu Symbol of strain	Aktywność nitrogenazy* Nitrogenase activity
102	38,00 g
52	7,70 a
53	15,75 d
54	12,30 b
40T1	26,91 f
40T2	16,43 e
40T4	15,44 c
Średnio; Mean	18,93

* wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie
 values marked with different letters are significantly different

rii zdecydowanie wzrosła, poza dwoma szczepami wyizolowanymi z endoryzosfery jęczmienia – 52 i 53 (tab. 2). Największy przyrost (wielokrotny) liczebności bakterii zanotowano w przypadku szczepów 40T1 i 40T4.

Obliczenia statystyczne potwierdziły istotność zróżnicowania średnich wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *Azospirillum* spp. (tab. 3, 4) i *P. stutzeri* (tab. 5, 6) w czasie 168 godzin inkubacji, podczas hodowli w pożywkach bezazotowych z benzenem jako jedynym źródłem węgla.

Tabela 6

Zestawienie średnich wartości aktywności nitrogenazy szczepów bakterii *P. stutzeri* w czasie 168 godzin inkubacji
 Mean value of nitrogenase activity of the strains of the bacterium *P. stutzeri* during 168 hours (nM C₂H₄·h⁻¹·cm⁻³ fazy gazowej; of gas phase)

Czas w godzinach Time in hours	Aktywność nitrogenazy Nitrogenase activity
2	0,00 a
24	0,00 a
48	3,11 b
72	11,50 c
96	22,33 d
120	32,83 e
144	36,67 f
168	45,08 g
NIR; LSD	0,01

* wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie
 values marked with different letters are significantly different

DYSKUSJA

W dostępnej literaturze jest bardzo mało publikacji na temat rozkładu węglowodorów aromatycznych przez bakterie wolno żyjące, wiążące azot cząsteczkowy. Barkovskii i in. (3) donoszą o rozkładzie fenolu i benzoesanów przez *Azospirillum* spp., a Marchenko i in. (30) o wyizolowaniu z gleby zanieczyszczonej smołą i olejem napędowym *Azospirillum brasilense* szczep ZM-87. Nieliczne prace dotyczą proteobakterii z rodzaju *Azoarcus*, bakterii symbiotycznych *Bradyrhizobium*, *Mezorhizobium* i *Rhizobium*, które mogą rozkładać różne związki benzenowe jedynie beztlenowo (1, 35, 38, 41, 42, 44). Z rodzaju *Pseudomonas* znane są przede wszystkim bakterie ryzosferowe: *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. saccharofila* oraz endofit *P. stutzeri*, wiążący wolny azot z różnymi innymi źródłami węgla i inne (4, 10, 12, 13, 18-24, 28, 29, 36, 37, 40, 43).

Większość wyników prac dotyczących mineralizacji WWA jest opatentowana (podane są tylko streszczenia) i nie są ujawniane szczegółowe dane umożliwiające dyskusję.

W badaniach nad wykorzystaniem benzenu jako jedynego źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum* stwierdzono, że aktywność ich nitrogenazy była wyższa, szczególnie u dwóch szczepów wyizolowanych z endoryzofery wydmuchrzyicy piaskowej, w porównaniu ze szczepami z gatunku *P. stutzeri*. Nasze wcześniejsze badania nad tymi samymi szczepami wykazały, że również w hodowlach bezazotowych z innymi aromatycznymi węglowodorami – naftalenem, antracenenem, fenantrenem – bakterie z rodzaju *Azospirillum* aktywniej wiązały wolny

azot (19, 20, 21, 28, 45). Szczepy bakterii 12/6, 42S, 77Bb1 i 4B aktywne w hodowlach z benzenem jako jedynym źródłem węgla były również bardzo aktywne przy wykorzystaniu pirenu i chryzenu w wiązaniu wolnego azotu.

Zdolność do wykorzystywania przez mikroorganizmy węglowodorów jako źródła węgla i energii jest warunkowana informacją genetyczną umożliwiającą syntezę enzymów uczestniczących w ich przemianach do acetylo-CoA. Najczęściej jest ona zlokalizowana w elementach pozagenomowych – plazmidach. Dioksygenaza katecholowa jest głównym enzymem odpowiedzialnym za przekształcanie węglowodorów aromatycznych, katalizuje ona pierwszy etap ich oksydacji. Wiadomo, że informacja ta zlokalizowana jest na plazmidzie, np. NAH7 w szczepie np. *P. putida* PpG7, *P. putida* PaW736 i *P. putida* NCIB9816-4, a w szczepie *P. fluorescens* 5R na plazmidzie pKA1 (34, 40, 43). S a n s e v e r i n o i n. (40) wykazali że plazmid NAH7 *P. putida*, który koduje geny (nahRQD) odpowiedzialne za syntezę enzymów w degradacji naftalenu, może także pośredniczyć w mineralizacji fenantrenu i antracenu, co udowodniliśmy we wcześniejszych badaniach ze szczepami *P. stutzeri* (20, 21, 28, 45). W badaniach genetycznych określono wcześniej, dla tych samych szczepów *Azospirillum sp.* i *P. stutzeri*, niektóre determinanty enzymów umożliwiające wykorzystywanie WWA jako substratu pierwotnego podczas wiązania N₂ przez te bakterie (26, 27). Poszukiwano genów dla: dioksygenazy 2,3-katecholowej (C2,3-DO) i dioksygenazy naftalenowej (NDO). W tych badaniach w szczepach *P. stutzeri* 40T1, 40T2 oraz 40T5 nie stwierdzono amplifikacji fragmentu genu dla C2,3-DO, pomimo że zaobserwowano hybrydyzację DNA tych szczepów z sondą dla C2,3-DO. Dla całej serii szczepów znaczonej 40T1, 2 i 5 nie otrzymano produktu amplifikacji, co może sugerować bardzo małą liczbę kopii tego genu w ich genomie.

Dioksygenaza naftalenowa (NDO) katalizuje pierwszy etap reakcji w tlenowej mineralizacji naftalenu przez szczep *Pseudomonas sp.* NCIB 9816 (43) oraz jak wykazali w swoich badaniach L e e i G i b s o n (29) również utlenia etylobenzen do R-1-fenilo-1,2-etanediolu w reakcjach dihydroksylacji. W reakcji tej jednym z metabolitów jest styren i 2-hydroksyacetoftenon. Modelowym przykładem operonu związanego z bakteryjnym metabolizmem naftalenu do salicylanu jest nah, zlokalizowany na plazmidzie NAH7 u szczepu *Pseudomonas putida* PpG7 (34, 40). W szczepach *P. stutzeri* 57, 40T5 i 102 nie otrzymano produktu amplifikacji genu dla NDO. Jednak brak amplifikacji genu NDO za pomocą pojedynczego zestawu primerów nie zdegenerowanych nie może jednoznacznie przesądzać o braku podłoża genetycznego dla biosyntezy enzymów degradujących związki typu WWA (12).

Powyższe rozważania tłumaczą wyniki wcześniejszych badań, w których wykazano, że redukcja acetyleny przez szczepy 40T1, 40T2, 40T4 i 40T5 *P. stutzeri* z wymienionymi wyżej węglowodorami była mniej intensywna w porównaniu z innymi szczepami tego gatunku i szczepami bakterii *Azospirillum spp.*, pomimo stwierdzenia u nich obecności genu dla dioksygenazy katecholowej odpowiedzialnego za degradację tych węglowodorów (19, 20, 21, 28, 39, 45).

Natomiast w szczepach bakterii *Azospirillum* spp. 77Bb1 i 12/6 stwierdzono obecność dioksygenazy 2,3-katecholowej (C2,3-DO) i dioksygenazy naftalenowej (NDO), (26, 28, 45). Obecność tych dwóch enzymów biorących bez wątpienia udział w degradacji WWA, (jakkolwiek w wykorzystywaniu benzenu podczas wiązania N₂ mógł uczestniczyć tylko jeden z nich), wyjaśnia większą intensywność redukcji acetyleny przez szczepy *Azospirillum* spp.

WNIOSKI

Szczepy *Azospirillum* spp. i *P. stutzeri* bytujące w strefie korzeniowej i wewnątrz korzeni roślin mogą być prawdopodobnie czynnikiem sprzyjającym fitoremediacji gleb zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi. Zdolność wiązania azotu cząsteczkowego przy wykorzystywaniu benzenu jako jedynego źródła węgla i energii sugeruje, że szczepy te mogłyby uczestniczyć w procesach bioremediacji gleb zanieczyszczonych związkami WWA bez konieczności uzupełniania puli azotu w środowisku. W strefie korzeniowej roślin szczepy te mogłyby zapewnić ciągłość wiązania N₂ – w początkowym etapie *Azospirillum*, a w następnym *P. stutzeri*.

LITERATURA

1. Anders H. J., Kaetzke A., Kämpfer P., Ludwig W., Fuchs G.: Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying pseudomonad strain K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera Thauera, as *Thauera aromatica* sp. nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov., respectively, members of the beta subclass of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, 45: 327-333.
2. Baldani J. I., Caruso L., Baldani V. L. D., Goi S. R., Döbereiner J.: Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, 1997, 29: 911-922.
3. Barkovskii A. L., Korshunova V. E., Pozdnyacova L. I.: Catabolism of phenol and benzoate by *Azospirillum* strains. *Appl. Soil Ecol.*, 1995, 2: 17-24.
4. Bolognese F., Di Lecce C., Galli E., Barbieri P.: Activation and inactivation of *Pseudomonas stutzeri* methylebenzene catabolism pathways mediated by a transposable element. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65: 1876-1882.
5. Cunningham S. D., O w D. W.: Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol.*, 1996, 110: 1-5.
6. Döbereiner J.: Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil*, 1988, 110: 202-212.
7. Döbereiner J., Marriell J. E., Nery M.: Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, 1976, 22: 1464-1474.
8. Fletcher J. S., McFarlane J. C., Pfleeger T., Wickliff C.: Influence of root exposure concentration on the fate of nitrobenzene in soybean. *Chemosphere*, 1990, 20: 513-523.
9. Gescher J., Zaar A., Mohamed M., Schagger H., Fuchs G.: Genes coding for a new pathway of aerobic benzoate metabolism in *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.*, 2002, 184(22): 6301-6315.

10. He Z., Spain J. C.: A novel 2-aminomuconate deaminase in the nitrobenzene degradation pathway of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.*, 1998, 180(9): 2502-2506.
11. Haigler B. E., Pettigrew C. A., Spain J. C.: Bidegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58(7): 2237-2244.
12. Hamann C., Hegemann J., Hildebrandt A.: Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 173(1): 255-263.
13. Hughes M. A., Williams P. A.: Cloning and characterization of the *pnb* genes, encoding enzymes for 4-nitrobenzoate catabolism in *Pseudomonas putida* TW3. *J. Bacteriol.*, 2001, 183(4): 1225-1232.
14. Król M.: Drobnoustroje ryzosfery jęczmienia jarego. Rozprawa habilitacyjna, wyd. IUNG Puławy, 1997, H(13).
15. Król M. J.: Występowanie bakterii z rodzaju *Azospirillum* w ryzosferze traw. *Zesz. Nauk. AR Szczecin*, 181, Rolnictwo, 1997, 68: 133-140.
16. Król M. J., Kobus J.: Bakterie halofilne wiążące azot wyizolowane z endoryzosfery roślin jednoliściennych. W: *Drobnoustroje w środowisku*. Red. W. Barabasz, AR Kraków, 1997, 291-307.
17. Król M. J., Kobus J., Eckert B.: Characterization biochemical of free-living N_2 -fixing bacteria isolated from the endorhizosphere of barley – *Hordeum sativum* and *Elymus arenarius*. Third European Nitrogen Fixation Conference. De Blije Werelt Lunteren, The Netherlands, September 20-24, 1998, 183.
18. Król M., Kobus J., Perzyński A.: Redukcja acetyleny przez bakterie ryzosfery jęczmienia w zależności od źródła węgla. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum: Wpływ drobnoustrojów na wzrost i rozwój roślin. Puławy-Kazimierz Dolny, 17-18 maja 1990, 17-18.
19. Król M. J., Perzyński A.: Wykorzystanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Pam. Puł.*, 2002, 131: 69-80.
20. Król M. J., Perzyński A.: *Pseudomonas stutzeri* – bakterie wiążące azot z wykorzystaniem naftalenu i fenantreny jako jedyne źródła węgla i energii. *Pam. Puł.*, 2002, 131: 81-91.
21. Król M. J., Perzyński A.: Wykorzystanie antracenu w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie diazotroficzne. *Acta Agr. Silv.*, 2004, XLII: 229-237.
22. Król M. J., Perzyński A.: Wykorzystanie chryzenu jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Pam. Puł.*, 2004, 137: 77-94.
23. Król M. J., Perzyński A.: Wykorzystanie pireny jako jedyne źródła węgla w wiązaniu wolnego azotu przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*. *Pam. Puł.*, 2004, 137: 95-105.
24. Król M. J., Perzyński A., Kobus J.: N_2 -fixing bacteria isolated from the roots of crops and grasses. *Acta Agrophys.*, 2001, 52: 151-161.
25. Król M. J., Perzyński A., Eckert B.: *Pseudomonas stutzeri* – szczepy wyizolowane z endoryzosfery jęczmienia i wydmuchrzy cy piaskowej. *Zesz. Nauk. AR Szczecin, Agricultura*, 2002, 226(90): 83-90.
26. Król M. J., Wielbo J., Zielewicz-Dukowska J.: Genetyczne determinanty enzymów umożliwiające wykorzystywanie WWA jako substrat pierwotny podczas wiązania N_2 przez *Azospirillum* sp. (maszynopis), 2005.
27. Król M. J., Wielbo J., Zielewicz-Dukowska J.: Genetyczne determinanty enzymów umożliwiające wykorzystywanie WWA jako substrat pierwotny podczas wiązania N_2 przez *Pseudomonas stutzeri*. *Pam. Puł.*, 2005, 140: 331-338.
28. Kurek E., Król M. J., Zielewicz-Dukowska J., Perzyński A.: Rozkład produktów naftowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny. *Mat. Konf. Nauk.-Tech.: Ekologia w przemyśle rafineryjnym*, Kielce 10-12.10.2001, 153-162.

29. Lee K., Gibson D. T.: Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(9): 3101-3106.
30. Marchenko A. I., Vorobyov A. V., Dyadischev N. R., Sokolov M. S.: Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant rhizosphere. Polish Society of Humic Substances, 11-13 September, Wrocław, Poland, 2001, 465-467.
31. McCrady J. K., McFarlane C., Lindstrom F. T.: The transport and affinity of substituted benzenes in soybean stems. *J. Exp. Bot.*, 1987, 38: 1875-1890.
32. McFarlane J. C., Pfleeger T., Fletcher J.: Transpiration effect on the uptake and distribution of bromacil, nitrobenzene and phenol in soybean plants. *J. Environ. Qual.*, 1987, 16: 372-376.
33. McFarlane C., Nolt C., Wickliff C., Pfleeger T., Shimabuku R., McDowell M.: The uptake, distribution and metabolism of four organic chemicals by soybean plants and barley roots. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1987, 6: 847-856.
34. Menn F. M., Applegate B. M., Slayer G. S.: NAH plasmid-mediated catabolism anthracene and phenanthrene to naphtholic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 1938-1942.
35. Mohamed M. E., A. Zaar, C. Ebenau-Jehle, Fuchs G.: Reinvestigation of a new type of aerobic benzoate metabolism in the proteobacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.*, 2001, 183(6): 1899-1908.
36. Nishino S. F., Spain J. C.: Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 2520-2525.
37. Park H. S., Kim H. S.: Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J. Bacteriol.*, 2000, 182(3): 537-580.
38. Phaengthai S., Chaijuckam P., Junthongjin K., Pinpanichakarn P., Pattaragulwanit K., Omori T., Nilubol N., S. Thaniyavarn.: Oxidation of acenaphthalene by *Rhizobium* sp. CU-A1. Abstract, The Fourth Princess Chulabhorn International Science Congress: Chemical in the 21st Century: 1999, 255.
39. Rius N., Fuste M. C., Guasp C., Lalucat J., Loren J. G.: Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity. *J. Bacteriol.*, 2001, 183: 736-744.
40. Sanseverino J., Applegate B. M., King J. M. H., Sayler G. S.: Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59: 1931-1937.
41. Schuhle K., Jahn M., Ghisla S., Fuchs G.: Two similar gene clusters coding for enzymes of a new type of aerobic 2-aminobenzoate (anthranilate) metabolism in the bacterium *Azoarcus evansii*. *J. Bacteriol.*, 2001, 183(18): 5268-5278.
42. Song B., Haggblom M. M., Zhou J., Tiedje J. M., Palleroni N. J.: Taxonomic characterisation of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluovorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.*, 1999, 49: 1129-1140.
43. Yang Y., Chen R. F., Shiaris M. P.: Metabolism of naphthalene, urea, and phenanthrene: preliminary characterisation of cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J. Bacteriol.*, 1994, 176: 2158-2164.
44. Zhang H., Hanada S., Shigemastu T., Shibuya K., Kamagata Y., Kanagawa T., Kurane R.: *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, 50: 743-749.
45. Zielewicz-Dukowska J., Kurek E., Król M. J., Perzyński A.: *Pseudomonas stutzeri* bakterie wiążące azot z wykorzystaniem antracenu, jako jedynego źródła węgla. *Inż. Ekol.*, 2001, 4: 76-82.

UTILISATION OF BENZENE AS THE SOLE CARBON SOURCE IN FIXATION
OF FREE NITROGEN BY AZOSPIRILLUM SPP. AND PSEUDOMONAS STUTZERI STRAINS
OF BACTERIA

Summary

Azospirillum spp. and Pseudomonas stutzeri strains of bacteria were isolated from the endorhizosphere of barley (*Hordeum sativum*) and maize (*Zea mays*), cultivated on different soils and of *Elymus arenarius* grown on sands of the Baltic seaside (Sobieszewo and Świnoujście). These strains were able to degrade benzene. Nitrogen fixation of *Azospirillum* spp. and *Pseudomonas stutzeri* strains (starved), expressed as reduction of C_2H_2 , was determined in free-N medium with benzene as the sole carbon source, lasting for 168 hours. The highest nitrogenase activity of *Azospirillum* spp. was found after 24 h to 48 h. It ranged from 108,19 nM to 109,71 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ of gas phase. The highest nitrogenase activity of *Pseudomonas stutzeri* was found after 168 h and was about 83,8 nM $C_2H_4 \cdot h^{-1} \cdot cm^{-3}$ of gas phase.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 VIII 2005 r.