

## BIOVOLATILIZÁCIA POTENCIÁLNE TOXICKÝCH PRVKOV MIKROORGANIZMAMI

JANA JUHÁSOVÁ a SLAVOMÍR ČERŇANSKÝ

*Katedra environmentálnej ekológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, juhasova22@uniba.sk*

Došlo 24.1.17, prijaté 17.2.17.

**Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.**

Kľúčové slová: biovolatilizácia, biometylácia, bioalkylácia

### Obsah

1. Úvod
2. Biovolatilizácia
3. Biometylácia
  - 3.1 Mechanizmus biometylácie
4. Bioalkylácia
5. Význam biovolatilizácie a biometylácie
6. Záver

### 1. Úvod

Medzi potenciálne toxické prvky patria niektoré kovy, polokovy, ale aj pre život organizmov nevyhnutné, tzv. esenciálne prvky, ktoré však pri zvýšenej koncentrácii môžu pôsobiť toxicky na biotu aj človeka. Za vysoké obsahy potenciálne toxických prvkov v prírodnom prostredí je v dnešnej dobe zodpovedná predovšetkým antropogénna činnosť (priemysel, poľnohospodárstvo, odpadové hospodárstvo), ale aj prírodné procesy (vulkanizmus, erózia, pedogenéza)<sup>1</sup>. Riziko potenciálne toxických prvkov pre živé organizmy (vrátane človeka) určuje forma ich vystupovania v prostredí (špeciácia), s ktorou sa menia ich základné vlastnosti, ako mobilita, toxicita, rozpustnosť alebo bioprístupnosť. Popri pH a Eh prostredia, patrí činnosť mikroorganizmov medzi významné faktory ovplyvňujúce správanie sa potenciálne toxických prvkov v rámci ich biogeochemických cyklov. Mikroorganizmy prostredníctvom svojich metabolických procesov sú schopné viazať, transformovať, stabilizovať alebo mobilizovať potenciálne toxické prvky vo vode, pôde, sedimentoch, ale aj na skládkach, haldách alebo odkaliskách<sup>2</sup>.

Biovolatilizácia predstavuje biologickú produkciu prchavých zlúčenín, ktoré vznikajú ako výsledok biometry-

lačných procesov prebiehajúcich takmer vo všetkých živých organizmoch. Biovolatilizácia tvorí dôležitú súčasť biogeochemických cyklov prvkov ako As, Bi, Hg, Pb, Se, Sb, Sn a Te (cit.<sup>3,4</sup>).

Princíp procesu biometylácie spočíva v mikrobiálnej premene anorganických foriem prvkov na organické formy a ich následné vylučovanie, za vzniku prchavých (biovolatilizácia) a neprchavých metylovaných zlúčenín týchto prvkov. Biometylácia je dôležitá z hľadiska chemickej transformácie potenciálne toxických prvkov ako As, Bi, Cd, Cl, Ge, Hg, P, Pb, S, Sn, Se, Te v prírodnom prostredí. Spôsobuje zmenu ich rozpustnosti, mobility, toxicity a biologickej prístupnosti, čím významne ovplyvňuje biogeochemické cykly týchto prvkov<sup>5,6</sup>.

### 2. Biovolatilizácia

Proces biovolatilizácie patrí medzi bežné mechanizmy biotransformácie potenciálne toxických prvkov v prostredí. Predstavuje premenu látok na plynné, prchavé formy za pomoci mikroorganizmov, najčastejšie mikroskopických húb a baktérií. Prchavé metylované, príp. alkylované deriváty a hydridy kovov a polokovov sú následne uvoľnené z buniek mikroorganizmov do atmosféry. Prchavé deriváty potenciálne toxických prvkov sú často súčasťou plynov unikajúcich z prírodného alebo antropogénneho prostredia (napr. pôda, vodné systémy, sedimenty, tuhý odpad, odpadové vody a i.)<sup>7</sup>.

Prvá doložená správa o prchavých (polo)kovoch je zaznamenaná v dizertačnej práci Caroliho de la Fonta zo 17. st., ktorá však nebola uznaná kvôli údajným „absurdným dohadom“. Potom, ako sa na začiatku 19. st. začali v Nemecku šíriť otravy arzénom zapríčinené farbami na tapetách, chemik Leopold Gmelin v roku 1839 upozornil, že otravy boli spôsobené volatilizáciou arzenu z pigmentov pridávaných do farieb. V roku 1891 taliansky fyzik Bartolomeo Gosio dokázal, že niektoré druhy mikroskopických húb rastúcich na tapetách sú zodpovedné za volatilizáciu arzenu, produkujú plyn cesnakového zápachu. Na začiatku 20. st. anglický biochemik Frederick Challenger identifikoval tento plyn ako trimetylarzín  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$  (TMA). Mechanizmus premeny arzeničnanu  $(\text{As}^{\text{V}})$  na prchavý TMA popísal Challenger na biometylácii arzenu prostredníctvom mikroskopickej huby *Scopulariopsis brevicaulis*<sup>8,9</sup>.

Tvorba prchavých zlúčenín biometyláciou bola v prírodných systémoch zistená pre As, Cd, Ge, Hg, Pb, S, Sb, Se, Sn, Te a v laboratórnych podmienkach aj pre Au, Cr, Pd, Pt a Tl (cit.<sup>10</sup>).

### 3. Biometylácia

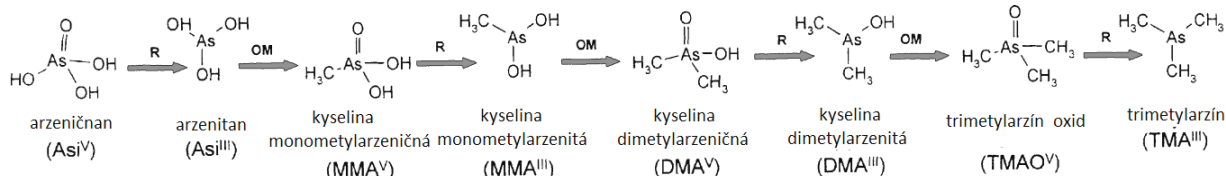
Biometylácia je prirodzene sa vyskytujúci enzymaticky kontrolovaný proces, prebiehajúci v bunkách živých organizmov<sup>7</sup>. Predstavuje prenos a väzbu metylovej skupiny ( $\text{CH}_3-$ ) na jeden alebo viac atómov kovu alebo polokovu priamo cez atóm uhlíka. Proces biometylácie prebieha vo všetkých druhoch organizmov (vyššie huby, rastliny, živočíchy vrátane človeka), avšak z hľadiska biogeochemických cyklov potenciálne toxických prvkov ako As, Cd, Ge, Hg, Pb, S, Sb, Sn, Se a Te sú najdôležitejšie mikroorganizmy (baktérie, mikroskopické huby)<sup>5,6,11</sup>. Biometylácia prvkov ako Cr, Pd, Pt a Tl bola sledovaná v laboratórnych podmienkach<sup>12</sup>.

Avšak veľké množstvo metylovaných zlúčenín (polo)kovov vyskytujúcich sa v prostredí má antropogénny pôvod ako výsledok priemyselnej činnosti a znečistenia<sup>11</sup>.

#### 3.1. Mechanizmus biometylácie

Biometylácia organických molekúl, napr. proteínov, nukleových kyselín, polysacharidov a mastných kyselín, prebieha vo všetkých živých bunkách a predstavuje nevyhnutnú súčasť metabolizmu prokaryotických a eukaryotických buniek<sup>11,13</sup>.

Mechanizmus biometylácie prvý popísal Frederick Challenger v roku 1945 na biometylácii arzenu. Pôvodne bol navrhnutý len pre arzén a selén, ale v súčasnosti z neho vychádzajú aj mechanizmy metylácie ostatných chemických prvkov. Mechanizmus spočíva v postupnej väzbe 1–4 metylových skupín na kov alebo polokov (obr. 1). Pri metylácii arzenu sa anorganický arzeničnan ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) alebo arzenitan ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) môže naviazaním jednej metylovej skupiny meniť na dobre rozpustné kyseliny – kyselinu monometylarzeničnú (môže sa označovať ako  $\text{MMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{MAA}$ ,  $\text{MMAA}$ ,  $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ ) a kyselinu monometylarzenitú ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ,  $\text{CH}_3\text{As}(\text{OH})_2$ ) alebo na prchavý monometylarzín ( $\text{MMA}$ ,  $\text{MMAs}$ ,  $\text{CH}_3\text{AsH}_2$ ). Ak sa naviažu dve metylové skupiny, taktiež vznikajú neprchavé dobre rozpustné kyseliny – dimetylarzeničná ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ,  $\text{DMAA}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{AsOOH}$ ), kyselina kakodylová a dimetylarzenitá ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{AsOH}$ ) alebo prchavý dimetylarzín ( $\text{DMA}$ ,  $\text{DMAs}$ ,  $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$ ). Väzbou troch metylových skupín vznikajú prchavé zlúčeniny trimetylarzín oxid ( $\text{TMAO}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{AsO}$ ) alebo trimetylarzín ( $\text{TMA}$ ,  $\text{TMAAs}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ )<sup>6,12,14</sup>.



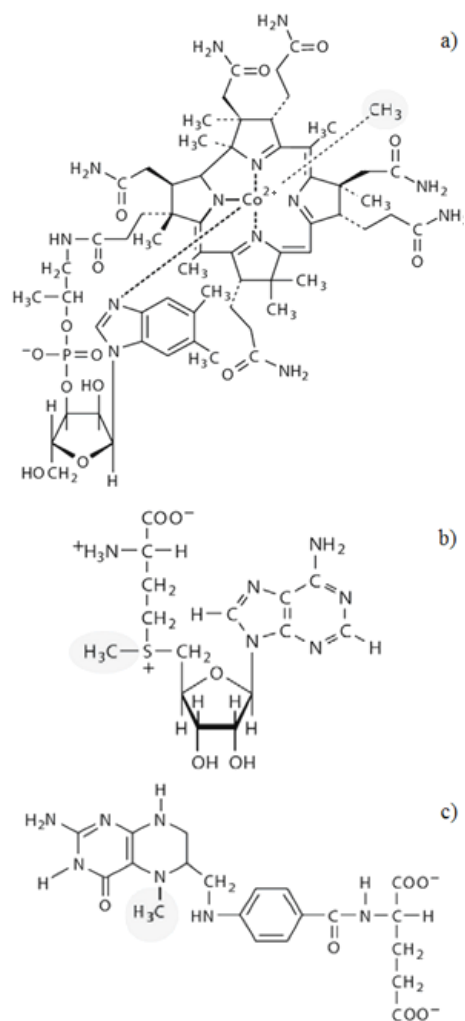
Obr. 1. Challengerov mechanizmus biometylácie arzenu<sup>12</sup>; R – redukcia, OM – oxidatívna metylácia

Najdôležitejšími donormi metylových skupín pre organické molekuly ako aj pre potenciálne toxické prvky (obr. 2) sú koenzými *S*-adenozylmetionín (SAM), metylkobalamín ( $\text{CH}_3\text{CoB}_{12}$ , derivát vitamínu  $\text{B}_{12}$ )<sup>5,6</sup> a *N*-metyltetrahydrofolát (metylTHF, derivát kyseliny listovej)<sup>11,13,15</sup>.

SAM je považovaný za všade prítomný metylačný činiteľ, ktorý vzniká prenosom adenosylovej skupiny z ATP na atóm síry metionínu. Kladný náboj na atóme síry aktivuje metylovú skupinu metionínu, čím sa stane SAM potenciálnym donorm metyloveho iónu. Metylová skupina je prenášaná ako prechodný radikál ( $\text{CH}_3^{\cdot}$ ) alebo ako uhličitanový kation ( $\text{CH}_3^+$ ), z toho dôvodu atóm prijímajúci metylovú skupinu (akceptor) musí byť nukleofilný, čo vyžaduje voľný elektrónový pár vo valenčnej vrstve<sup>13</sup>. Čiže podľa Challengerovho mechanizmu metylácie arzenu prostredníctvom SAM je počiatočný  $\text{As}^{\text{V}}$  najprv redukovaný na  $\text{As}^{\text{III}}$  a až potom metylovaný<sup>6,17</sup>. Počas metylácie je akceptor oxidovaný na päťmocnú formu (oxidatívna metylácia) a pred pripojením ďalších metylových skupín musí byť znova najprv redukovaný<sup>18</sup>. S redukciou sú spojené molekuly obsahujúce síru, ako glutatión<sup>19</sup>, ktoré zohrávajú úlohu aj pri tvorbe a stabilizovaní trojmocných medziproduktov tejto reakcie<sup>20,21</sup>. Podobne prebieha metylácia prvkov s voľným elektrónovým párom ako Sb, Se, P, a Te (cit.<sup>5</sup>). Prvky, ktorých počiatočná forma nedisponuje voľným elektrónovým párom (väčšinou oxyanióny), musia byť pred prenosom metylovej skupiny redukované<sup>21</sup>.

*N*-Metyltetrahydrofolát môže tiež prenášať metylovú skupinu ako radikál ( $\text{CH}_3^{\cdot}$ ) alebo ako uhličitanový kation ( $\text{CH}_3^+$ ), avšak jeho potenciál prenosu nie je taký veľký ako u SAM<sup>13</sup>. Naopak pri metylkobalamíne je metylová skupina prenášaná ako uhličitanový anión ( $\text{CH}_3^-$ ), čiže atóm prijímajúci metylovú skupinu (akceptor) musí byť elektrofilný a je metylovaný v jeho najviac oxidovanej forme. Metylkobalamín súvisí s metyláciou Hg, Pb, Sn, Pd, Pt, Au a Tl (cit.<sup>15,22</sup>). Hoci sa metylkobalamín javí ako výhradný prirodzený donor uhličitanového aniónu, v prostredí sa môže uhličitanový anión prenášať aj z iných organokovových zlúčenín, ako napr.  $(\text{CH}_3)_3\text{Pb}^+$  alebo  $(\text{CH}_3)_3\text{Sn}^+$  (cit.<sup>13</sup>).

Oxidovať a metylovať kovové zlúčeniny môžu aj iné molekuly ako iodometán ( $\text{CH}_3\text{I}$ ), betaín alebo humínové kyseliny<sup>11</sup>. Ako akceptory metylových skupín slúžia okrem kovových alebo polokovových iónov aj atómy C, O, N, S (cit.<sup>6,21</sup>).



Obr. 2. Štruktúrny vzorec hlavných biometylačných činidiel v organizmoch<sup>11,16</sup>; a) metylkobalamín; b) *S*-adenozylmetionín; c) *N*<sup>5</sup>-metyl-tetrahydrofolát

Existujú rôzne mechanizmy metylácie, pričom prevládajúci je funkciou rozdielnej špeciácie a oxidačného stavu kovov a polokovov. Na rozdiel od kovových kationov, polokovy vystupujú v prostredí najčastejšie ako oxyanióny slabých kyselín, preto ich špeciácia závisí od pH. Napr. na metylácii As a Sb a ostatných polokovov sa v oxickom prostredí podieľa SAM a v anoxickom prostredí môže metylácia prebiehať prostredníctvom metylkobalamínu (cit.<sup>18</sup>). Avšak, ak vystupuje metylkobalamín ako samostatný metylačný činiteľ, metylácia Sb končí medziproduktmi, pričom na uhlíku sú naviazané dve metylové skupiny a tvoria sa zlúčeniny ako  $\text{CH}_3\text{SbO}$  alebo prchavý trimetylstibín ( $\text{TMSb}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{Sb}$ )<sup>20</sup>.

#### 4. Bioalkylácia

Bioalkylácia je prenos alkylovej skupiny na atóm kovu alebo polokovu. Keďže v prírode sa prenos metylovej skupiny objavuje najčastejšie v porovnaní s prenosom ostatných alkylových skupín, pojem biometylácia označuje prenos metylovej skupiny a bioalkylácia označuje prenos ostatných alkylových skupín<sup>5,6</sup>.

Bioalkylácia je oveľa zriedkavejšia ako biometylácia a bola zistená jedine pre také polokovy, ktoré sú schopné byť biometylované vyššími organizmami (As, Se, Te). Bioalkylácia bola pozorovaná prevažne pre As, pričom najviac prebieha v morskom prostredí, hlavne prostredníctvom rias, ktoré premieňajú anorganický As na menej toxické alkylové zlúčeniny arzenu, ako arzenolipidy a arzenocukry<sup>13</sup>. Ďalšie alkylové zlúčeniny arzenu sú arzenobetain, nachádzajúci sa zvyčajne v bezstavovcoch a rybách spolu s menej zastúpeným arzenocholinom<sup>11</sup>.

Avšak väčšina alkylovaných zlúčenín, ako napr. etyl-deriváty olova, butylderiváty cínu alebo fenylderiváty ortuti sú antropogénneho pôvodu<sup>10</sup>.

#### 5. Význam biovolatilizácie a biometylácie

Biometylácia je často považovaná za detoxifikačný mechanizmus organizmov. Metylované deriváty sa vylučujú z buniek oveľa ľahšie, sú často prchavé a môžu byť menej toxické, ako napr. organické zlúčeniny arzenu. Avšak, pre niektoré potenciálne toxické prvky, proces biometylácie pravdepodobne nespĺňa detoxifikačnú funkciu, z dôvodu vyššej toxicity metylovaných produktov a existencie účinnejších detoxifikačných mechanizmov, ako napr. redukcia  $\text{Hg}^{\text{II}}$  na  $\text{Hg}^0$  (cit.<sup>11,23</sup>).

Miera toxicity a environmentálne vlastnosti zlúčenín výrazne závisia nielen od prítomného prvku, ale aj od počiatkovej špeciácie prvku, od stupňa substitúcie a typu organickej (alkylovej) skupiny a môže variovať zásluhou rôznych druhov zúčastnených mikroorganizmov. Špeciácia prvku ovplyvňuje taktiež mobilitu danej zlúčeniny. Organokovové kationy (napr.  $\text{Bu}_3\text{Sn}^+$ ) majú tendenciu byť viac vodorozpustné a neprchavé, naproti tomu saturované zlúčeniny (napr.  $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$ ) sú hydrofóbne a prchavé<sup>13</sup>.

S výnimkou As, Se a Sb, biometylácia zvyšuje toxicitu, pretože metylované deriváty sú viac lipofilné a tým pádom viac biologicky aktívne<sup>13</sup>. Naviazanie metylovej skupiny na atóm zvyšuje rozpustnosť v tukoch a zvyčajne aj vo vode<sup>21</sup>.

Biovolatilizácia prvkov prostredníctvom biometylácie má však veľký význam z hľadiska dekontaminácie rozličných prírodných ekosystémov<sup>24</sup>. Mikrobiálna premena prvkov na prchavé deriváty sa môže využiť pri uvoľňovaní toxických prvkov z rôznych kontaminovaných substrátov, v ktorých sa metylujúce mikroorganizmy nachádzajú (napr. pôda, vodné systémy, sedimenty, tuhý odpad, odpadové vody a i.)<sup>13,25</sup>.

## 6. Záver

Predložený referát sa zaoberá v prírode bežne prebiehajúcimi procesmi biovolatilizácie a biometylácie. Baktérie a mikroskopické huby svojimi metabolickými procesmi premieňajú anorganické formy na organické, často prchavé, zlúčeniny, ktoré u väčšiny prvkov majú menšiu toxicitu, ako ich anorganické formy. Procesy biovolatilizácie a biometylácie sú dôležité z hľadiska chemickej transformácie potenciálne toxických prvkov ako As, Hg, Pb, Sb, Se, Sn, Tl v prostredí. Naviazanie metylovej skupiny na atóm (polo)kovu mení fyzikálne a chemické vlastnosti prvku. Zmena mobility, rozpustnosti, toxicity významne ovplyvňuje biogeochemický cyklus prvku otvorením nových možných transportných ciest. Študovanie procesov biovolatilizácie a biometylácie potenciálne toxických prvkov by mohlo prispieť k získaniu poznatkov využiteľných pri bioremediáciách kontaminovaných lokalít, ale aj k pochopeniu správania sa potenciálne toxických prvkov v prírode a prípadnému zabráneniu stále sa zvyšujúcemu znečisteniu prírodného prostredia.

*Publikácia bola podporená grantovými projektmi VEGA1/0098/14 a KEGA 029UK-4/2016.*

## LITERATÚRA

- Čurlík J.: *Potenciálne toxické stopové prvky a ich distribúcia v pôdach Slovenska*. Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava 2011.
- Raab A., Feldmann J.: *Sci. Prog.* 86 (3), 179 (2003).
- Weber J. H.: *Mar. Chem.* 65, 67 (1999).
- Michalke K., Schmidt A., Huber B., Meyer J., Sulkowski M., Hirner A. V., Boertz J., Mosel F., Dammann P., Hilken G., Hedrich H. J., Dorsch M., Rettenmeier A. W., Hensel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 10, 3069 (2008).
- Fatoki O. S.: *S. Afr. J. Sci.* 93, 366 (1997).
- Bentley R., Chasteen T. G.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2, 250 (2002).
- Kabata-Pendias A.: *Trace elements in soils and plants*, 4. vyd. Taylor and Francis Group, Boca Raton 2011.
- Challenger F.: *Chem. Rev.* 36(3), 315 (1945).
- Meyer J., Michalke K., Kouril T., Hensel R.: *Syst. Appl. Microbiol.* 31, 81 (2008).
- Hirner A. V., Feldmann J., Krupp E., Grümping R., Goguel R., Cullen W.: *Org. Geochem.*, 5-7, 1765 (1998).
- Gadd G. M.: *FEMS Microbiol. Rev.* 11, 297 (1993).
- Dopp E., Hartmann L. M., Florea A. M., Rettenmeier A. W., Hirner A. V.: *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 301 (2004).
- Craig P. J.: *Organometallic compounds in the environment*, 2. vyd. Wiley, Chichester 2003.
- Cullen W. R., Reimer K. J.: *Chem. Rev.* 89, 713 (1989).
- Ridley W. P., Dizikes L. J., Wood J. M.: *Science* 4301, 329 (1977).
- Koolman J., Röhm K.-H.: *Barevný atlas biochemie*, Preklad 4. vyd. Grada Publishing, Praha 2012.
- Sun H. (ed.): *Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth*. Wiley, Chichester 2011.
- Mason R. P., v knihe: *Methylation – From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment* (Dricu A., ed.), kap. 11. InTech, Rijeka 2013.
- Styblo M., Del Razo L. M., Vega L., Germolec D. R., LeCluyse E. L., Hamilton G. A., Reed W., Wang C., Cullen W. R., Thomas D. J.: *Arch. Toxicol.* 74, 289 (2000).
- Wehmeier S., Raab A., Feldmann J.: *Appl. Organomet. Chem.* 18, 631 (2004).
- Thayer J. S.: *Appl. Organomet. Chem.* 16, 677 (2002).
- Fatoki O. S.: *S. Afr. J. Sci.* 8, 1 (2009).
- Clarkson T. W., v knihe: *Mercury Pollution: Integration and Synthesis* (Watras C. J., Huckabee J. W., ed.), zv. VIII, kap. 1. Lewis Publishers, Boca Raton 1994.
- Ševc J., Čerňanský S.: *Phytopedon* 2, 60 (2003).
- Tabak H., Lens P., Hullebusch E. D., Dejonghe W.: *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 4, 115 (2005).

**J. Juhásová and S. Čerňanský** (*Department of Environmental Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava*): **Biovolatilization of Potentially Toxic Elements by Microorganisms**

This review deals with the current state of knowledge on biovolatilization and biomethylation of potentially toxic elements, which are naturally occurring in the environment. It is almost exclusively microorganisms which are responsible for these processes. Microbes can, through their metabolism, transform potentially toxic elements and influence their distribution. The changes in mobility, toxicity, bioavailability or solubility of the elements caused by microorganisms represent an important part of their biogeochemical cycles. The biomethylation is a process by which methyl groups are directly bonded through a carbon atom to metal or metalloid. The result of this process is a production of volatile or nonvolatile organometal(loid) compounds, which are mostly less toxic than their inorganic forms. The volatile methylated derivatives are excreted readily from cells via biovolatilization. Accordingly, biomethylation and biovolatilization can be considered as the metal(loid) detoxification mechanism of microorganisms and may have a potential for the bioremediation of contaminated habitats.