

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Dehalogenázy – výskyt, mechanismus účinku,
substrátová specifita a aplikační možnosti**

Bakalářská práce

Kristina Novotná

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2019

NOVOTNÁ, Kristina, 2019, Dehalogenázy – výskyt, mechanismus účinku, substrátová specifita a aplikační možnosti (Dehalogenases – occurrence, mechanism of action, substrate specificity and application possibilities. Bc. Thesis, in Czech) – 27 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá dehalogenázami, tedy enzymy, které se vyskytují v mnoha mikroorganismech a rostlinách. Jsou schopné degradovat halogenované organické sloučeniny a mohou se vyskytovat jak v přírodě, tak synteticky. V této práci je uvedeno rozdělení těchto enzymů a také přehled mechanismu dehalogenace. Dále také podává stručný přehled možného využití dehalogenáz v remediaci míst, která jsou znečištěna halogenovanými sloučeninami.

Annotation

This bachelor thesis deals with dehalogenases, enzymes occurring in many microorganisms and plants, capable to degrade halogenated organic compounds - both naturally occurring and manmade. The thesis provides a survey of dehalogenation reactions mechanisms and the categorisation of the dehalogenases enzymes. It also gives several examples of possible applications of these enzymes in remediation processes for locations polluted with halogenated compounds.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Kristina Novotná

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za odborné vedení, připomínky, věnovaný čas a za pomoc se všemi schématy. Dále děkuji své rodině za podporu.

Obsah

1	Cíle práce.....	1
2	Úvod.....	2
2.1	Výskyt přírodních halogenovaných organických sloučenin.....	2
2.2	Výskyt a využití syntetických halogenovaných sloučenin	3
2.3	Mikrobiální degradace syntetických halogenovaných sloučenin	5
3	Skupiny dehalogenáz.....	6
3.1	Dehalogenázy pro halogenderiváty nearomatických uhlovodíků.....	6
3.1.1	Hydrolytická dehalogenace halogenderivátů nearomatických uhlovodíků.....	7
3.1.2	Oxygenační dehalogenace halogenderivátů nearomatických uhlovodíků.....	7
3.1.3	Redukční dehalogenace halogenderivátů nearomatických uhlovodíků.....	8
3.2	Dehalogenázy pro halogenderiváty organických kyselin	8
3.3	Dehalogenázy pro halogenderiváty aromatických sloučenin	9
3.3.1	Dehalogenázy chlorovaných derivátů fenolů	9
3.3.2	Dehalogenázy chlorovaných derivátů kyseliny benzoové.....	11
3.3.3	Dehalogenázy chlorovaných derivátů benzenů	11
3.3.4	Dehalogenázy pro polychlorované bifenyly.....	12
4	Aplikace mikrobiální dehalogenace	15
5	Závěr.....	19
6	Seznam literatury.....	20

1 Cíle práce

Podat přehled mikrobiálních enzymů dehalogenáz, jejich struktury, mechanismus působení, uvést spektrum degradovatelných substrátů a vyhledat možnosti aplikace zejména se zřetelem k biologické remediaci.

2 Úvod

Znečištění životního prostředí halogenovanými organickými sloučeninami je celosvětový problém. Do životního prostředí se tyto látky dostávají nejvíce při výrobních procesech syntézy halogenovaných produktů, nicméně je zajímavé, že se halogenované sloučeniny přirozeně vyskytují i v přírodě (Cairns, 1994).

2.1 Výskyt přírodních halogenovaných organických sloučenin

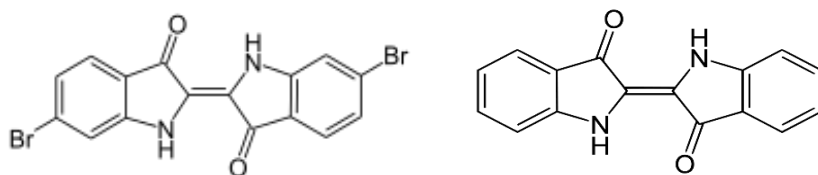
Přírodní halogenované organické sloučeniny obsahující kovalentní vazbu mezi uhlíkem a atomem halogenu se vyskytují jak v prokaryotických, tak v eukaryotických organismech, a takových sloučenin bylo identifikováno více než 700 (Wackett, 1991).

Organické sloučeniny obsahující fluor nejsou v přírodě příliš obvyklé. Nicméně např. již v roce 1944 byla Maraisem prokázána tvorba kyseliny fluoroctové u tropické rostliny *Dichapetalum cymosum* (Leong *et al.*, 2017). Tato sloučenina je přeměňována *in vivo* na fluoroacetyl CoA, a to pak vede k následné tvorbě toxického fluoroderivátu kyseliny citronové, který je silným inhibitorem enzymu akonitázy. Tento efekt způsobuje, že *Dichapetalum cymosum* je silně toxická pro býložravé živočichy.

Nejrozšířenějším halogenem, který se vyskytuje v přírodních sloučeninách je bezpochyby chlor. Většina izolovaných chlorovaných sloučenin byla získána z hub a lišejníků. U lišejníků (tedy organismů, které jsou symbiotickým společenstvím houby a řasy či sinice) je za syntézu chlorovaných sloučenin zodpovědná mykotická část organismu. Většina dosud izolovaných chlorovaných sloučenin má aromatický charakter a vykazuje biologickou aktivitu, zejména antimikrobiální nebo antitumorózní. Antimikrobiální aktivita chlorovaných přírodních sloučenin je využívána v současné medicíně, např. antibiotikum chloramfenikol produkovaný bakterií *Streptomyces venezuelae*, chlortetracyklin bakterií *Streptomyces aureofaciens* či griseofulvin plísni *Penicillium griseofulvin*. Mnoho dalších chlorovaných sloučenin využívaných k různým účelům od pigmentů k podpoře růstu rostlin bylo izolováno z hub (Cairns, 1994).

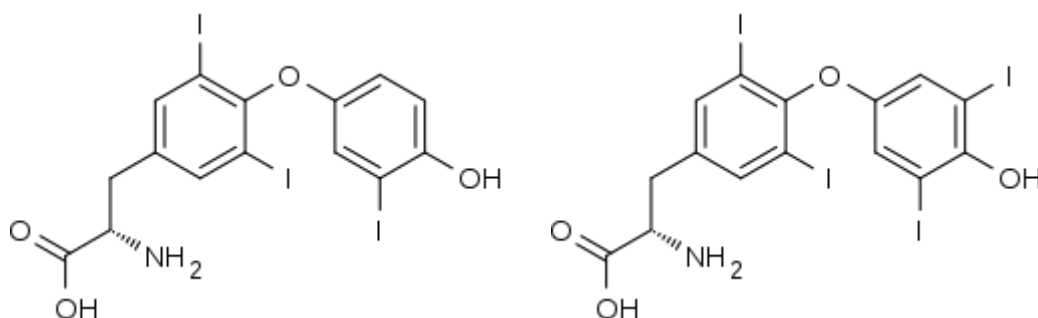
Bromované sloučeniny se nacházejí v různých druzích mořských organismů. Stejně jako chlorované sloučeniny vykazují antimikrobiální aktivitu nebo někdy fungují jako pigmenty. Už starověcí Féničané získávali z těl mořských měkkýšů bromovaný derivát indiga

(Obr. 1) – sloučeninu, která má na rozdíl od modré barvy indiga červenou barvu, a která se pro svou vzácnost používala pro barvení královských oděvů (Cairns, 1994).



Obr. 1: Vzorce bromovaného derivátu indiga (vpravo) a indiga (vlevo) (Habashi, 2018).

Deriváty jódu se vyskytují méně často, nicméně jsou např. důležité pro správné fungování štítné žlázy, orgánu, který se vyskytuje u všech obratlovců. Štítná žláza obsahuje vysokou hladinu derivátů aminokyseliny tyrosinu obsahujících jód – monojodtyrosin a dijodtyrosin. Tyto dvě biologicky inaktivní aminokyseliny jsou prekurzory hormonů – 3,3',5,5'tetraiodtyroninu a 3,3',5-trijodtyroninu, tedy sloučenin s ještě vyšším obsahem jódu, které jsou zodpovědné za růst a vývoj organismu (Rousset *et al.*, 2015).



Obr. 2: Vzorec 3,3',5-trijodtyroninu (vlevo) a 3,3',5,5'-tetraiodotyroninu (vpravo) (Rousset *et al.*, 2015).

Vzhledem k tomu, že se v přírodě vyskytuje velké množství halogenovaných organických sloučenin různorodých struktur, není překvapující, že mnohé organismy si vytvořily metabolické dráhy pro odbourávání těchto halogenovaných sloučenin za účelem detoxifikace látek či získání organického uhlíku ze zbytku molekuly zbavené halogenu (Cairns, 1994).

2.2 Výskyt a využití syntetických halogenovaných sloučenin

Od 50. let minulého století se v produkci chemického průmyslu objevuje čím dál víc organických sloučenin s jedním nebo více atomy halogenu v molekule, které jsou využívány k nejrůznějším účelům např. jako léčiva, nosiče aerosolů, pesticidy, rozpouštědla, barviva nebo chladiva. Kvůli širokému používání a následnému rozšíření do všech částí životního prostředí jsou tyto antropogenní sloučeniny vnímány jako látky znečišťující životní prostředí,

tzv. polutanty. Cizorodé sloučeniny mohou mít škodlivý vliv v každé části ekosystému, ale v důsledku perzistence v životním prostředí a bioakumulaci v živých organismech jsou nejvíce ohroženy organismy, které jsou vystavené dlouhodobé expozici, např. vodní organismy u polutantů v přírodních vodách či vyšší patra potravního řetězce (Cairns, 1994).

Odolnost těchto sloučenin k degradačním procesům je důsledkem pevnosti vazby uhlík-halogen. Například fluorované uhlovodíky jsou zvláště inertní, protože mají vysokou disociační energii vazby uhlík-fluor, a to 439,614 kJ/mol oproti 326,57 kJ/mol u vazby uhlík-chlor a 276 kJ/mol u vazby uhlík-brom. (Zumdahl & Zumdahl, 2010). Inertnost těchto látek má za následek např. přetrvání těkavých fluorovaných uhlovodíků v atmosféře, kde podléhají až ve vyšších vrstvách atmosféry fotochemickému rozkladu UV zářením a vytvářejí volné radikály, které reagují s ozónem a poškozují tak ozónovou vrstvu. Chlorovaných sloučenin je vyráběno velké množství s velmi rozmanitou strukturou, struktura pak významně ovlivňuje dobu přetrvání v přírodním prostředí. Obecně cyklické a aromatické sloučeniny s molekulovou hmotností větší než 236 g/mol vykazují větší perzistenci v přírodním prostředí než nízkomolekulární chlorované alkany nebo alkeny (Ritter *et al.*, 1996). Tak např. chlorované deriváty aromatických uhlovodíků a nenasycených alifatických uhlovodíků se rozkládají mnohem pomaleji než chlorované deriváty nasycených alifatických uhlovodíků, protože první skupina podléhá hydrolytickému či fotolytickému štěpení vazby mezi uhlíkem a vodíkem obtížněji než sloučeniny skupiny druhé (Wackett, 1991).

Jedním z nejčastějších užití syntetických chlorovaných organických sloučenin je jejich využití ve formě pesticidů (herbicidů, fungicidů, insekticidů a dalších). V dnešní době je na trhu k dispozici mnoho druhů těchto přípravků, odlišují se nejen svou strukturou a účinností, ale zejména dobou, po kterou přetrvávají v přírodním prostředí (Wackett, 1991).

Z hlediska struktury jsou nejjednoduššími chlorovanými sloučeninami, které jsou používány jako herbicidy substituované alifatické kyseliny jako např. kyselina trichloroctová, kyselina 2,2-dichlorpropionová, 2,2,3-trichlorpropionová, 2,2-dichlormáselná a 2,3-dichloroisomáselná (Wackett, 1991).

Z hlediska doby přetrvání v přírodním prostředí a v organismech je všeobecně známý insekticid DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis[4-chlorfenyl]ethan), který je sice v mnoha zemích světa zakázaný, ale v afrických zemích se stále používá ke snížení výskytu malárie. Jeho tzv. poločas přetrvání v životním prostředí (half-life) se pohybuje v rozmezí 2–15 let (US EPA, 1989).

Perzistentní jsou i další látky, např. triazinové herbicidy, jejichž hodnoty přetrvání v životním prostředí (v půdách) jsou v řádu stovek dní (US EPA, 2003). Bylo však prokázáno, že i tyto sloučeniny podléhají degradaci, a to jak abiotické, např. fotochemické, tak biotické (Klementova & Keltnerova, 2015; Shapir *et al.*, 2007).

2.3 Mikrobiální degradace syntetických halogenovaných sloučenin

Vzápětí po prvních užitích herbicidů na bázi halogenovaných alifatických kyselin se vědci začali zajímat o jejich další osud v půdě. Postupně bylo zjišťováno, že existuje mnoho druhů mikroorganismů schopných degradovat tyto sloučeniny a že halogenované alifatické kyseliny jsou jedny z nejméně persistentních xenobiotik. První takové organismy představil již v roce 1957 Jensen, který identifikoval pět kmenů bakterií schopných růst v prostředí s monochloroctovou kyselinou jako jediným organickým substrátem. Všech pět kmenů bylo identifikováno jako druhy patřící do rodu *Agrobacterium*. Později izoloval další bakterie patřící do stejné skupiny (*Agrobacterium*) i do jiných skupin (*Nocardia*, *Pseudomonas*) a všechny byly schopné růst na médiu s dichlorderivátem kyseliny propionové jako jediným zdrojem uhlíku. Další organismy degradující trichloroctovou kyselinu zařadil do osmi kmenů ze skupiny *Arthrobacter* (Cairns 1994).

Bylo objeveno mnoho organismů se schopností využít deriváty nasycených alifatických kyselin halogenovaných v poloze 2, ale pouze zlomek izolovaných organismů má schopnost využít jako zdroj uhlíku nebo energie alifatické kyseliny halogenované v poloze 3. Izolace takového organismu se podařila dvojicí autorů Bollag a Alexander (1971), kteří tento organismus identifikovali jako *Micrococcus denitrificans*. Dále se to povedlo týmu Mesriho (Mesri *et al.*, 2009), kde organismu *Pseudomonas* sp. byl schopný degradovat 3-chlorpropionovou kyselinu.

Další skupina organismů byla izolována na základě jejich schopnosti využít halogenované alkany. Mezi tyto organismy patří *Xanthobacter* (Janssen *et al.*, 1989), *Ancylobacter* (Van den Wijngaard *et al.*, 1992), *Pseudomonas* a *Arthrobacter* (Van den Wijngaard *et al.*, 1989) a *Corynebacterium* (Yokota *et al.*, 1987). Enzymy, které jsou zodpovědné za odbourání halogenu z molekuly alkanu, jsou podle reakce, kterou katalyzují, nazývány haloalkanové dehalogenázy.

3 Skupiny dehalogenáz

Klíčem k přeměňování toxických halogenovaných organických sloučenin jsou enzymy zvané dehalogenázy. Tyto enzymy usnadňují dehalogenaci (odstranění atomů halogenu z molekul organických sloučenin) a dokáží je přeměnit v buď zcela netoxické či méně toxické látky. Ty se tak stanou látkami lépe odbouratelnými (Jugder *et al.*, 2016).

Stejně jako u jiných typů enzymů, i u dehalogenáz je snaha zjistit strukturu enzymů a charakterizovat jejich aktivní místo. Kromě jiných metod je na tento výzkum využívána krystalizace enzymů a následná analýza struktury pomocí rentgenové difrakce (Lahoda *et al.*, 2014; Prudnikova *et al.*, 2009).

Někteří autoři dělí dehalogenázy na 3 velké skupiny: dehalogenázy pro halogenderiváty nearomatických (alifatických) uhlovodíků, dehalogenázy pro halogenderiváty organických kyselin a dehalogenázy pro halogenderiváty aromatických sloučenin (Allpress & Gowland, 1998).

Dehalogenázy pro halogenderiváty nearomatických uhlovodíků se dělí na 3 podskupiny podle toho, zda k dehalogenaci dochází hydrolytickou, oxygenační a redukční cestou (Allpress & Gowland, 1998).

Dehalogenázy pro halogenderiváty organických kyselin se dělí na 3 velké skupiny, hydrolytické dehalogenázy, dehalogenázy halogenderivátů alkoholů a dehalogenázy závislé na kofaktoru. Hydrolytické dehalogenázy se dále dělí na skupinu způsobující hydrolytickou dehalogenaci organických kyselin s halogenem v poloze 2 a skupinu způsobující hydrolytickou dehalogenaci halogenderivátů alkanů. Dehalogenázy organických kyselin v poloze 2 se mohou dělit dále na jemnější podskupiny (Hamid *et al.*, 2011).

Dehalogenázy pro chlorované deriváty aromatických sloučenin se dělí na 3 podskupiny podle substrátu, z něhož jsou schopny halogen odštěpovat – dehalogenázy chlorovaných derivátů benzenů, chlorovaných derivátů kyseliny benzoové a chlorovaných derivátů fenolů (Allpress & Gowland, 1998).

3.1 Dehalogenázy pro halogenderiváty nearomatických uhlovodíků

Výskyt dehalogenáz pro halogenderiváty nearomatických uhlovodíků je oproti jiným dehalogenázám v přírodě poněkud vzácný (Allpress & Gowland, 1998).

Halogenované alkyly patří mezi sloučeniny často nacházené v přírodním prostředí jako polutanty. Zejména molekuly s kratšími řetězce mohou být snadno transportovány půdou až do podzemních vod, a tak znečišťovat vodonosné vrstvy, které jsou zdrojem pitné vody. Obecně bylo prokázáno, že nevětvené řetězce o 10 až 18 uhlících jsou nejpřístupnější k degradaci, ale kapalné alkyly s pěti až devíti uhlíky v řetězci byly studovány nejintenzivněji kvůli jejich vlivu na přírodní prostředí a zdraví člověka (Allpress & Gowland, 1998).

3.1.1 Hydrolytická dehalogenace halogenderivátů nearomatických uhlovodíků

Hydrolytické dehalogenázy jsou nejprve rozděleny podle závislosti na glutathionu (důležitý antioxidant u rostlin, zvířat, hub a některých bakterií), jelikož některé hydrolytické dehalogenázy vyžadují glutathion jako svůj kofaktor (Allpress & Gowland, 1998).

Dehalogenázy vyžadující glutathion byly nalezeny v cytosolu některých bakterií. Z bakterií rodu *Methylobacterium* a *Hyphomicrobium* (Kohler-Staub *et al.*, 1986) byl izolován enzym glutathiontransferáza, který způsobuje dehalogenaci dichlormethanu (Allpress & Gowland, 1998).

Druhá skupina dehalogenáz pro halogenderiváty nearomatických uhlovodíků přítomnost glutathionu nevyžaduje a zároveň (ve srovnání s předchozí skupinou) je zde podobnost v jejich substrátové specifitě (mají podobné substráty), molekulární hmotnosti, pH, teplotním optimu a reakční rychlostní konstantě (Allpress & Gowland, 1998). Sekvenování genů z různých kmenů *Ancylobacter aquaticus* GJ70 a *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ukázalo přítomnost identických dehalogenáz (Van Den Wijngaard *et al.*, 1992).

Allpress a Gowland (1998) studovali tři dehalogenázy pro halogenderiváty nearomatických uhlovodíků izolované z následujících organismů: *Arthobacter* HA1, *Rhodococcus* Y2 a *Corynebacterium* m15-3. Zjistilo se, že dehalogenázy vykazují pozoruhodně stejnou substrátovou specifitu, optimální pH a molekulovou hmotnost. Další dva enzymy, které byly izolované z organismu *Ancylobacter aquaticus* GJ70 a *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 vykazují homologii mezi prvními sedmnácti aminokyselin z 18 aminokyselinové sekvence.

3.1.2 Oxygenační dehalogenace halogenderivátů nearomatických uhlovodíků

V porovnání s hydrolytickou dehalogenací halogenderivátů nearomatických uhlovodíků, kde se enzymy zřejmě vyvinuly výhradně ke katalytické dehalogenaci, oxygenační dehalogenace je výsledkem náhodné akce enzymu monooxygenázy se širokou substrátovou specifitou

(Allpress & Gowland, 1998). Není tedy katalyzována specifickými dehalogenačními enzymy, přesto je pro úplnost do tohoto přehledu zařazena.

Mikrobiální degradace trichlorethenu je přisuzována právě výše zmíněnému enzymu – monooxygenáze. Tento proces je pravděpodobně kometabolický (degradace druhého substrátu je podmíněna přítomností prvního substrátu) a vede v akumulaci rozpadlých produktů jako je sůl kyseliny glyoxylové a dichlorderivát kyseliny octové (Allpress & Gowland, 1998). Odstranění halogenů z haloalkanů s krátkými řetězci v savcích i mikrobiálních systémech se děje za přítomnosti cytochrom monooxygenázy, která může katalyzovat dehalogenaci buď jako oxidaci nebo redukci (Jacoby, 1980).

3.1.3 Redukční dehalogenace halogenderivátů nearomatických uhlovodíků

Při analýzách výskytu halogenderivátů nearomatických uhlovodíků v přírodě bylo zjištěno, že haloalkany s krátkými řetězci jsou akumulovány v podzemních vodách. Toto prostředí je typickým příkladem anaerobního prostředí, a proto zde v důsledku nízkého redoxního potenciálu probíhá přednostně právě redukční dehalogenace před zbylými již uvedenými způsoby (Allpress & Gowland, 1998).

Redukční dehalogenace zahrnuje odstranění atomu halogenu z molekuly za současného dodání elektronů molekule. Proces redukční dehalogenace může probíhat dvěma způsoby: prvním způsobem je nahrazení halogenu atomem vodíku, druhým způsobem pak – u sloučenin se dvěma halogeny na sousedních uhlících – odstranění obou těchto substituentů za tvorby dvojných vazeb mezi uhlíkovými atomy, z nichž byly halogeny odstraněny. Redukční dehalogenaci není obvykle možné přisoudit jednomu určitému organismu a jeho enzymy, probíhá totiž za účasti nedefinovaných anaerobních komunit mikroorganismů, jako např. v zaplavených oblastech v půdě, v sedimentech (sladkovodních i mořských). Nicméně se podařilo laboratorně prokázat tento typ reakce i v čistých bakteriálních kulturách mnoha typů bakterií (Mohn & Tiedje, 1992).

3.2 Dehalogenázy pro halogenderiváty organických kyselin

Dehalogenázy pro halogenderiváty organických kyselin byly klasifikovány Slaterem *et al.* (1997) do 3 skupin: hydrolytické dehalogenázy, haloalkoholové dehalogenázy (tedy enzymy schopné dehalogenovat jak alkoholy, tak organické kyseliny) a dehalogenázy závislé na kofaktoru, bez něhož není enzym aktivní. Nejčastější dehalogenázy pro halogenderiváty organických kyselin jsou hydrolytické enzymy, a proto byly dále rozděleny do dalších skupin

podle toho, zda jsou schopny štěpit vazbu halogenu v poloze 2 vůči karboxylové skupině nebo v jiném místě. Dehalogenázy schopné odštěpovat specificky halogen v poloze 2 se ještě dále dělí podle toho, zda jsou stereospecifické či nikoli – pokud jsou stereospecifické, jsou dále děleny podle této stereospecifity na skupinu schopnou štěpit D izomery a skupinu schopnou štěpit L izomery. Obecně platí, že dehalogenázy třídy pro D izomery jsou méně běžné než dehalogenázy pro L izomery (Hamid *et al.*, 2011).

Stereospecifické dehalogenázy pro L isomery byly izolovány z mnoha organismů, jako příklad lze uvést *Pseudomonas* sp. CBS3 (Schneider *et al.*, 1991), *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Van der Ploeg *et al.*, 1991) nebo *Moraxella* sp. B (Kawasaki *et al.*, 1992).

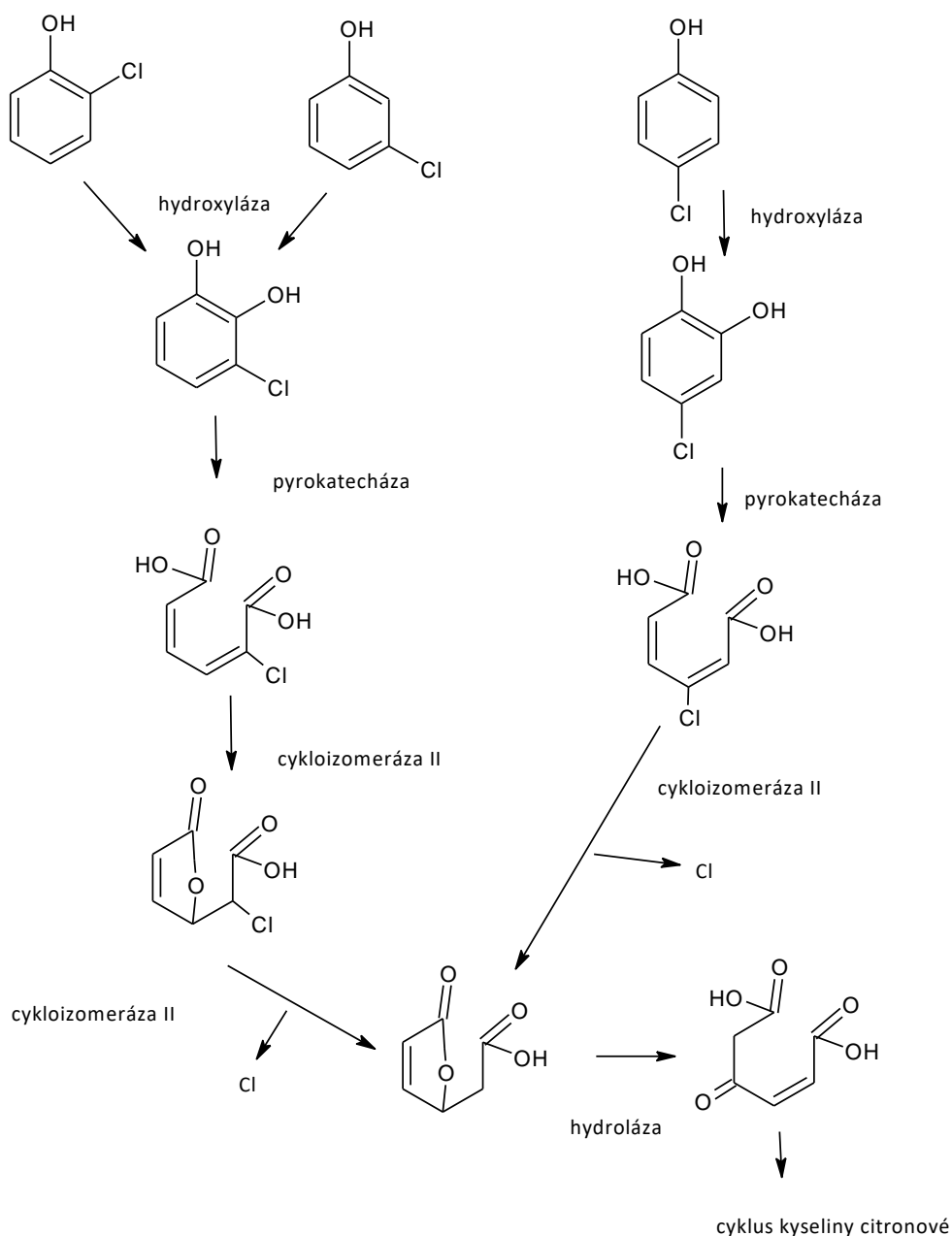
Některé organismy obsahují dehalogenázy schopné štěpit L i D izomery, např. *Pseudomonas putida* AJ1 (Jones *et al.*, 1992; Barth *et al.*, 1992, Smith *et al.*, 1990) nebo *Rhizobium* sp. RC1 (Leigh *et al.*, 1986, 1988; Cairns *et al.*, 1996).

3.3 Dehalogenázy pro halogenderiváty aromatických sloučenin

Degradace hlavních skupin halogenderivátů aromatických sloučenin (chlorovaných derivátů benzenu, kyseliny benzoové, fenolu a polychlorovaných bifenyly) byla velice detailně studována kvůli škodlivému dopadu těchto sloučenin na životní prostředí. Odstranění halogenového substituentu z aromatického kruhu je počáteční krok v jejich metabolismu, obvykle je halogen nahrazen hydroxylovou skupinou. Dojde k tomu buďto hydrolýzou (kde OH skupina je buď původem z vody, nebo je v ní zahrnut kyslíkový atom z rozpuštěného molekulárního kyslíku) anebo hydrogenací (přesněji redukční dehalogenací) (Shree Nath Singh, 2012).

3.3.1 Dehalogenázy chlorovaných derivátů fenolů

Mono- a dichlorfenoly jsou metabolizovány mnoha druhy bakterií, přičemž nejčastějšími meziprodukty jsou chlorkatecholy. Zjistilo se, že reakce se účastní jak hydroxylázy, tak dioxygenázy, ale dle literárních údajů převládá podíl hydroxyláz (Allpress & Gowland, 1998). Chlorkatecholy následně podléhají štěpení aromatického kruhu v *orto* poloze, které vede ke ztrátě chloru během cykloizomerace popsané v roce 1980 Schmidtem a Knackmussem. Reakce je znázorněna na Obr. 3 (Farrel, 2000).



Obr. 3: Degradace monochlorfenolů (Farrel, 2000).

Degradace polychlorovaných fenolů (PCP) je započata přeměnou na tetrachlorhydrochinon hydroxylací v *para*-poloze za účasti enzymu PCP-4-monooxygenázou (Shree Nath Singh, 2012) nebo enzymem typu cytochrom P-450 (Uotila, 1991; Uotila, 1992). Následné kroky se liší podle druhu organismu: v některých organismech dojde k přeměně PCP na tetrachlor derivát odstraněním chloru ve formě chloridu (Ohtsubo *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 1996; Orser & Lange, 1994) a postupně k další dehalogenaci na 2,6-dichlor-1,4-hydrochinon za účasti redukční dehalogenázy. Dalším krokem je štěpení kruhu enzymem ze skupiny dioxygenáz a produkce substrátů pro citrátový cyklus (Arora & Bae, 2014b).

V jiných organismech je PCP hydroxylován na tetrachlorhydrochinon membránovým enzymem typu cytochrom P-450, následně dojde k hydrolytické dehalogenaci a redukční dehalogenaci za tvorby dichlor- a monochlor-1,2,4-trihydroxybenzenu a nakonec 1,2,4-trihydroxybenzenu. Ten je pak enzymaticky přeměněn na substráty vhodné pro citrátový cyklus (Apajalahti *et al.*, 1987).

3.3.2 Dehalogenázy chlorovaných derivátů kyseliny benzoové

Narozdíl od monochlorfenolů, kde dehalogenace probíhá výhradně cestou rozštěpení kruhu, bylo u chlorovaných derivátů kyseliny benzoové několika autory potvrzeno přímé nahrazení atomu chloru hydroxylovou skupinou hydrolytickou cestou (Allpress & Gowland, 1998).

Redukční dechlorinace byla potvrzena u 2,4-dichlor derivátu kyseliny benzoové, kde jako první krok proběhne nahrazení atomu chloru v poloze 2 atomem vodíku, a tak se vytvoří 4-chlor derivát kyseliny benzoové. Tato reakce probíhá i v aerobních podmínkách, ale vzácně (Allpress & Gowland, 1998).

Chlorované deriváty kyseliny benzoové mohou být dehalogenovány za účasti oxidačně redukčních enzymů ze skupiny dioxygenáz tak, že nejprve se vytvoří chlorované katecholy, u nichž následně dojde ke štěpení kruhu tak, jak k tomu dochází při odbourávání chlorovaných fenolů. Toto bylo prokázáno u rozkladu derivátů kyseliny benzoové s chlorem v poloze 3, v poloze 4 a se dvěma chlory v polohách 3 a 5, kde počátečním krokem přeměny je tvorba mono- nebo dichlorokatecholů. Ukázalo se, že štěpením kruhu v *meta* poloze u některých bakteriálních druhů vznikají produkty, které jsou toxické pro organismy, v nichž jsou tvořeny (Allpress & Gowland, 1998).

3.3.3 Dehalogenázy chlorovaných derivátů benzenů

Podobně jako mono- a dichlorfenoly a halogenderiváty kyseliny benzoové jsou i mono- a dichlorbenzeny odbourávány za anaerobních podmínek za vzniku chlorovaného derivátu katecholu. Tento počáteční krok je pak následován štěpením aromatického kruhu. U chlorbenzenů je za transformaci zodpovědný systém, v němž se uplatňuje enzym dioxygenáza a dehydrogenáza (Allpress & Gowland, 1998).

Redukční dehalogenázy fungují za anaerobních podmínek a způsobují tzv. redukční dechloraci, tedy degradaci za uvolnění chloridových iontů. Redukční dechlorace polychlorovaných benzenů nevede ke kompletní dehalogenaci substrátu, ale častěji v méně halogenovaný substrát (Allpress & Gowland, 1998).

Nelson *et al.* (2014) použili tři obohacené kultury obsahující *Dehalobacter* spp., které byly schopné dehalogenovat všechny izomery dichlorbenzenu na monochlorbenzen. Zkoumali také dehalogenaci derivátů benzenu se třemi a více atomy chloru. Jedna z kultur byla schopna přeměnit pentachlorbenzen až na monochlorbenzen, aniž by v reakční směsi byly nahromaděny meziprodukty s více atomy chloru v molekule.

Další z použitých kultur byla schopna využít pro svůj růst jak 1,3-dichlorbenzen tak 1,2-dichlorbenzen a byla schopna dehalogenovat všechny testované chlorbenzeny s výjimkou izomeru 1,4-dichlorbenzen. Byla dokonce schopna dehalogenovat i velmi odolný 1,3,5-trichlorbenzen na monochlorovaný derivát.

Poslední z testovaných kultur vykazovala nejužší substrátové použití, ale zato byla jedinou kulturou schopnou dehalogenovat 1,4-dichlorbenzen.

3.3.4 Dehalogenázy pro polychlorované bifenyly

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou látky stálé, chemicky odolné a nehořlavé. Od 30. let 20. století se používaly čím dál více jako aditiva do barev, laků, hydraulických kapalin či teplotnosných médií, v transformátorech a kondenzátorech (Dai *et al.*, 2016). Od 60. let 20. století se začaly objevovat analýzy prokazující tyto látky u živých organismů na vrcholu potravního řetězce, protože se díky svému lipofilnímu a hydrofobnímu charakteru a persistenci hromadí v tukové tkáni. Postupně bylo prokázáno, že se jedná o látky karcinogenní zejména pokud jde o rakovinu slinivky břišní a rakovinu jater (US EPA, 2013). Jejich používání bylo v roce 1978 zakázáno v USA a v roce 2001 v Evropě (Porta & Zumeta, 2002). Postupně díky efektivnějším metodám byly nalezeny další organismy a další prostředí, které byly kontaminovány PCB, a to např. mořské řasy nebo led z Antarktidy (Fuoco *et al.*, 1996; Wiegel & Wu, 2000).

Polychlorované bifenyly jsou velká skupina látek zahrnující 209 jednotlivých sloučenin, izomerů, nazývaných kongenery (Abraham *et al.*, 2002).

Polychlorované bifenyly jsou mikrobiálně degradovány jak v aerobním prostředí, tak v anaerobním (Abraham *et al.*, 2002). Obecně platí, že vysoce chlorované kongenery, které jsou velmi stabilní a silně hydrofobní, jsou dobrými substráty pro anaerobní degradaci, pravděpodobně cestou využití původního substrátu jako akceptoru elektronu. V tomto případě jde tedy o reduktivní dehalogenaci.

Kongenery s nižším počtem atomů chloru jsou lépe degradovány v aerobním prostředí, v němž reagují primárně jako donor elektronu, mluvíme tedy o oxidativní dehalogenaci (Abraham *et al.*, 2002).

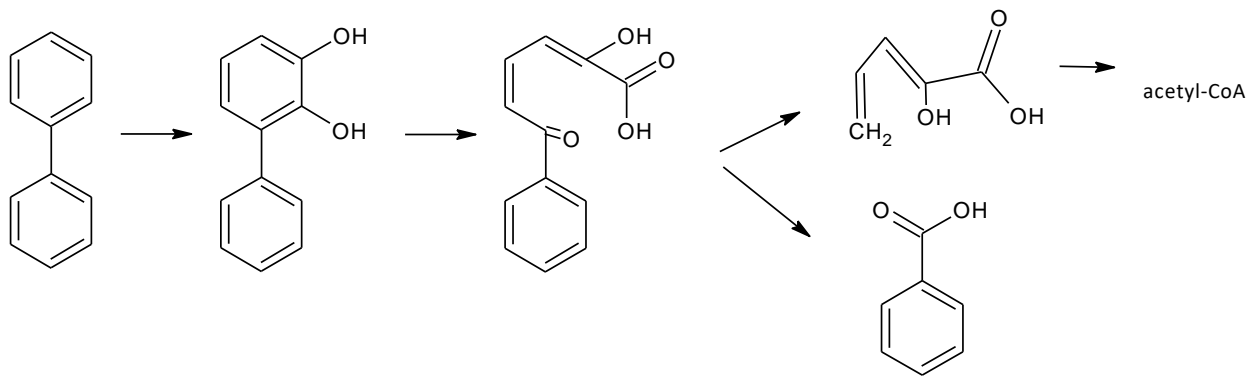
Mikrobiální dechlorinace PCB je rozšířena v mnoha anaerobních sedimentech. Prvním krokem dechlorinace je v těchto případech odstranění *meta* a/nebo *para* chlorových atomů za vzniku *ortho* substituovaných chlorbifenyků, nicméně byla prokázána i dechlorinace *ortho* derivátu (Wiegel & Wu, 2000).

Zdá se, že různé organismy jsou zodpovědné za různé dechlorinační procesy a že velký vliv mají i faktory prostředí jako např. dostupnost elektronových donorů či akceptorů (Wiegel & Wu, 2000).

Organismy způsobující reduktivní dechlorinaci PCB je obtížné identifikovat tradičními izolačními cestami (kultivacemi), protože se jedná o velké soubory různých organismů. Byly proto použity molekulárně biologické metody. Hou a Dutta (2000) charakterizovali mikrobiální komunity způsobující *para*- nebo *meta*- dechlorinaci PCB a našli v hojné míře sekvenci vztahující se k členům rodu *Clostridium*.

Weiland-Bräuer *et al.* (2017) zkoumali biodegradační potenciál bakteriálních komunit alpinského ledovce vůči PCB a zjistili, že biodegradaci způsobují druhy *Pseudomonas*, *Shigella*, *Bubtercola*, *Chitinophaga* a *Janthinobacterium*.

Degradace PCB s nižším počtem atomů chloru probíhá v mnoha organismech. Většina těchto organismů patří k proteobakteriím jako *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas* nebo *Rhododococcus* (Williams *et al.*, 1997; Master & Mohn, 1998; Kim & Picardal, 2000; Kim & Picardal, 2001; Fedi *et al.*, 2001). Klíčovými enzymy jsou specifické bifenyk 2,3-dioxygenázy (Pieper, 2004), nicméně za odbourávání je zodpovědná komplexní síť metabolických procesů. Navíc PCB nejsou v organismech schopných jejich degradace odbourávány až na anorganické komponenty, nejsou tedy mineralizovány, ale často vznikají toxické metabolity. Jedním z takových metabolitů je protoanemonin, látka patřící mezi jedovaté cyklické laktony pryskyřníků (US NLM, 2019). Vznik takových látek může být zodpovědný za nízké rychlosti odstraňování PCB z přírodního prostředí.



Obr. 4: Degradace bifenylu (Pieper, 2004).

4 Aplikace mikrobiální dehalogenace

Mikroorganismy hrají důležitou roli v remediaci složek životního prostředí kontaminovaného halogenovanými organickými látkami díky svému přirozenému nebo dodatečně rozvinutému aparátu enzymů zvaných dehalogenázy. Dehalogenázy katalyzují odbourání halogenů z molekuly halogenderivátů jak v aerobních, tak anaerobních podmínkách (Ang *et al.*, 2018).

Hodnocení a monitorování kontaminovaných míst může být založeno na přístupech používajících molekulární techniky analýzy nukleových kyselin. Ve výzkumu prováděném Hendricksonem *et al.* (2002) byly zkoumány vzorky z 24 míst v Severní Americe a Evropě, na nichž docházelo k dechloraci chlorethenu. Ve vzorcích byly prováděny testy na přítomnost skupiny *Dehalococcoies* s využitím PCR testu vyvinutého na detekci *Dehalococcoides* 16S rRNA gen (rDNA) sekvenci. Sekvence odpovídající členům skupiny *Dehalococcoides* byly nalezeny na 21 místech, na nichž také došlo k úplné dechlorinaci chlorethenu na ethen. Na zbývajících třech místech nebyly nalezeny organismy zkoumané skupiny, na těchto místech také docházelo jen k částečné dechlorinaci, která se zastavila na 1,2-cis-dichlorethenu.

Hexabromcyklododekany a hexachlorcyklohexany jsou halogenované uhlovodíky s podobnou stereochemií, tedy prostorovým uspořádáním. Obě tyto sloučeniny jsou považovány za biologicky těžko odbouratelné látky, u nichž proto dochází k bioakumulaci. Nicméně obě látky jsou náchylné k bakteriální biotransformaci dehalogenázou z bakterie *Sphingobium indicum* B90A, zvanou LinB neboli hexachlorcyklohexan přeměňující haloalkandehalogenázu, jak ukázali Heeb *et al.* (2012). Všechny stereoizomery obou látek byly přeměňovány, i když některé pomaleji než jiné. Pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (LC-MS) byly detekovány hydroxylované produkty. Zatím zbývá prozkoumat, zda k přeměně bromovaného cyklododekanu, k nimž docházelo v laboratorních pokusech s izolovaným enzymem, bude docházet též *in vivo* za použití organismů obsahujících příslušné enzymy.

Adrian *et al.* (1998) popsali směsnou bakteriální kulturu získanou z říčního sedimentu řeky Saale schopnou efektivní dechlorinace tri- a di-chlorbenzenů a prozkoumali řadu faktorů ovlivňujících tyto procesy. Ukázali také (s použitím inhibice aktivity metanogenních bakterií specifickým inhibitorem bromethansulfonanem), že dechlorinace probíhá v konzorciu nezávisle na přítomnosti tohoto typu bakterií.

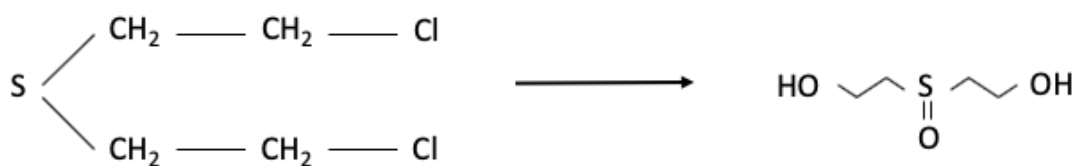
Jde-li o odstraňování těžkých kovů z kontaminovaných míst, jsou často užívány rostliny. Pro organické polutanty, zejména halogenované, je ale tato tzv. fyto-remediace nevhodná, protože rostliny nemají příslušný enzymatický aparát k dehalogenaci. Mena-Benitez *et al.* (2008) zavedli geny pro dva enzymy ze skupiny dehalogenáz z bakterie *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 do rostlin tabáku. Tyto geneticky modifikované rostliny tabáku byly schopny remediace několika chlorovaných sloučenin, záleželo ovšem na tom, jestli byl exprimován pouze jeden gen haloalkandehalogenáza, nebo oba geny, tj. haloalkandehalogenáza a dehalogenáza pro halogenované karboxylové kyseliny (haloacid dehalogenase).

Pokud byl přítomen jen enzym haloalkandehalogenáza, docházelo k přeměně 1,2-dichlorethanu na 2-chlorethanol, který byl ovšem dál metabolizován na fytotoxický 2-chloroacetaldehyd, a tabákové rostliny umíraly. Pokud byly exprimovány oba geny, docházelo k další přeměně na chloroctovou kyselinu a k její další konverzi na glykolovou kyselinu, která je součástí glyoxylátového cyklu. Bylo tak prokázáno, že vhodná genetická modifikace může být využita k rozvinutí nízkonákladové fyto-remediace organických polutantů.

Dehalogenázy se podílí také na detoxikaci býložravců. Požití rostlin produkující fluoroacetát je považováno pro býložravce za toxické. Když hospodářská zvířata požijí tyto rostliny, často to ústí ve fatální otravu, která způsobuje významné ekonomické problémy – zejména v Austrálii, Brazílii a jižní Africe (Leong *et al.*, 2017). Za tuto toxicitu je částečně zodpovědný silný inhibitor (2R,3R)-erythro-fluorcitrát, který inhibuje enzym akonitáza, který v citrátovém cyklu přeměňuje citrát na isocitrát (Lauble *et al.*, 1996). Pro ochranu právě od tohoto toxického fluoroacetátu byla objevena geneticky modifikovaná dehalogenáza produkovaná bakteriemi, které jsou schopny jej degradovat (Leong *et al.*, 2017). Ve studii *in vivo* provedené Greggem a kolegy (1998) byla jedna skupina ovcí naočkována rekombinantní bakterií před požitím krmiva obsahujícího fluoroacetát. Oproti tomu kontrolní skupina naočkována rekombinantními bakteriemi nebyla. Tato studie prokázala významný rozdíl mezi skupinami, kde se naočkované ovce zdály být relativně normální i přes toxickou dávku fluoroacetátu 0,4 mg/kg zvířete, zatímco kontrolní ovce uhynuly na otravu fluoroacetátem (Gregg *et al.*, 1998).

Dehalogenázy našly uplatnění i v dekontaminaci půdy. Dehalogenázy schopné odštěpovat chlor ze haloalkanů byly testovány pro dekontaminaci yperitem kontaminované půdy. Yperit je vojenský bojový plyn (zvaný také hořčičný plyn podle zápachu). Bylo prokázáno, že tato látka může být dehalogenázou pro haloalkany přeměněna na netoxickou formu obsahující

hydroxylové skupiny na místě, kde původně byly atomy chloru (Koudelakova *et al.*, 2012). Reakce je znázorněna a na Obr. 5.



Obr. 5: Rozklad yperitu na netoxickou formu (Koudelakova *et al.*, 2012).

Speciálně vyrobená dehalogenáza pro haloalkany, která je používána na degradaci yperitu, byla pojmenována Yperzyme. Tato dehalogenáza byla vyrobena a uvedena na trh firmou Enantis – biotechnologická firma založena v České republice. Tento enzym může být také použit k vyčištění starých skladů yperitu (Alamo-Bethencourt *et al.*, 2007).

Přírodní a člověkem vyráběné organické sloučeniny obsahující atomy halogenů a jejich rozšíření v biosféře jsou díky perzistenci těchto sloučenin předmětem zájmu vědců zabývajících se různými částmi přírodního prostředí, zejména půdními ekosystémy a ekosystémy vodních sedimentů. Nízká reaktivita těchto sloučenin a jejich toxicita i vůči organismům majícím potenciál k jejich degradaci jsou příčinou toho, že praktická biodegradace ve větším měřítku je obtížná a rozsah odbourání je limitovaný. Navíc jde o sloučeniny, které se akumulují v tukových tkáních a akumulace se zvyšuje s trofickou úrovní potravního řetězce, což vede k závažným environmentálním následkům obecně i konkrétně pro člověka (Puzyn *et al.*, 2010). To je důvodem k dalšímu hledání možností masivnější remediaci a odstraňování těchto sloučenin ze míst, kde došlo k antropogennímu znečištění. Přestože mikroorganismy způsobující degradaci organických sloučenin obsahujících halogen, nejsou úplně běžné, podařilo se úspěšně implementovat mikrobiální procesy k obnově lokalit těmito látkami znečištěných (Janssen *et al.*, 2005; Deweerd & Suflita, 1990; Magnuson *et al.*, 1998). Ve všech výzkumech s touto tematikou jsou středem zájmu enzymy podílející se na odbourání halogenderivátů organických látek, tj. dehalogenázy, schopné katalyzovat atomy halogenů z organických sloučenin jak za aerobních, tak anaerobních podmínek, a to s velmi různorodými substráty (Kurihara & Esaki, 2008; Oakley *et al.*, 2004). Přesto je stále mnoho překážek na cestě k biotechnologickému využití, limitujícími faktory jsou např. inhibice organismů tvořenými produkty, nedostatečná enzymová selektivita v případě znečištění určitými látkami, nízká afinita a katalytická účinnost vzhledem k vybraným substrátům (Koudelakova *et al.*, 2012). Objevují se ale práce, které navrhují strategie k překonání

některých z těchto překážek, zejména cestami proteinového inženýrství a využití organismů jako jsou extrémofilní bakterie (Arora & Bae, 2014a; Koudelakova *et al.*, 2012).

5 Závěr

Znečištění halogenovanými organickými sloučeninami je v poslední době věnována celosvětově pozornost.

Přestože halogenované sloučeniny se vyskytují i přirozeně, na znečištění se podílí člověkem produkovávané látky.

Mikroorganismy, ale i některé rostliny, jsou schopné produkovat enzymy schopné štěpit vazbu halogen-uhlík a tím usnadnit odbourání halogenovaných látek. Těmto enzymům, tzv. dehalogenázám je proto věnována velká pozornost nejen z hlediska poznání mechanismu dehalogenačních reakcí ale i kvůli jejich možnému využití k odstranění halogenovaných látek z životního prostředí, tzv. remediaci.

6 Seznam literatury

- Abraham, W. R., Nogales, B., Golyshin, P. N., Pieper, D. H., Timmis, K. N. (2002): Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Current Opinion in Microbiology*, **5**(3), 246-253.
- Adrian, L., Manz, W., Szewzyk, U., Görisch, H. (1998): Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene. *Applied and environmental mikrobiology*, **64**(2), 496-503.
- Alamo-Bethencourt, V., Aldridge, S., Coombs, A., Defrancesco, L., Huggett, B., Osborne, R., (2007): Mustard gas enzyme (News in brief). *Nature Biotechnology*, **25**(11), 1197-1198.
- Allpress, J. D., & Gowland, P. C. (1998): Dehalogenases: Environmental defence mechanism and model of enzyme evolution. *Biochemical Education*, **26**(4), 267-276. Retrieved 18.10.2018 from: <https://bit.ly/2Jgvm1M>.
- Ang, T. F., Maiangwa, J., Salleh, A., Normi, Y., & Leow, T. (2018): Dehalogenases: From Improved Performance to Potential Microbial Dehalogenation Applications. *Molecules*, **23**(5), 1100.
- Apajalahti, J. H., & Salkinoja-Salonen, M. S. (1987): Complete dechlorination of tetrachlorohydroquinone by cell extracts of pentachlorophenol-induced *Rhodococcus chlorophenicus*. *Journal of Bacteriology*, **169**(11), 5125–5130.
- Arora, P. K., & Bae, H. (2014a): Role of Dehalogenases in Aerobic Bacterial Degradation of Chlorinated Aromatic Compounds. *Journal of Chemistry*, **2014**, 1-10.
- Arora, P., & Bae, H. (2014b): Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microbial Cell Factories*, **13**(1), 31.
- Barth, P. T., Bolton, L., Thomson, J. C., (1992): Cloning and partial sequencing of an operon encoding two *Pseudomonas putida* haloalkanoate dehalogenases of opposite stereospecificity. *Journal of bacteriology*, **174**(8), 2612-9.
- Bollag, J. M., & Alexander, M., (1971): Bacterial Dehalogenation of chlorinated aliphatic acids. *Soil Biology and Biochemistry*, **3**(2), 91-96.
- Cairns, S. S. (1994): The cloning and analysis of *Rhizobium* dehalogenase genes.

- Cairns, S. S., Cornish, A., Cooper, R. A., (1996): Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of two *Rhizobium* sp. genes encoding haloalkanoate dehalogenases of opposite stereospecificity., *European Journal of Biochemistry*, **253**, 744-749. Retrieved 6.3.2019 from: <https://bit.ly/2VJecPl>.
- Dai, Q., Min, X., & Weng, M. (2016): A review of polychlorinated biphenyls (PCBs) pollution in indoor air environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*, **66**(10), 941-950. Retrieved 25.3.2019 from: <https://bit.ly/2CCUbmM>.
- Deweerd, K. A., & Suflita, J. M. (1990): Anaerobic Aryl Reductive Dehalogenation of Halobenzoates by Cell Extracts of "Desulfomonile tiedjei". *Applied and environmental microbiology*, **56**(10), 2999-3005.
- Farrel, A. (2000): Mono-chlorophenol Degradation by *Pseudomonas putida* CPI and a Mixed Microbial Population. School of Biotechnology, Dublin City University, Ireland.
- Fedi, S., Carnevali, M., Fava, F., Andracchio, A., Zappoli, S., Zannoni, D. (2001): Polychlorinated biphenyl degradation activities and hybridization analyses of fifteen aerobic strains isolated from a PCB-contaminated site. *Research in Microbiology*, **152**(6), 583-592.
- Fuoco, R., Colombini, M. P., Ceccarini, A., Abete, C. (1996): Polychlorobiphenyls in Antarctica. *Microchemical Journal*, **54**(4), 384-390.
- Gregg, K., Hanmdof, B., Henderson, K., Kopecny, J., Wong, C., (1998): Genetically modified ruminal bacteria protect sheep from fluoroacetate poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3496-3498.
- Habashi, F. (2018): Indigo and Bromo Indigo. The Plant and Animal Kingdoms. *Latest Trends in Textile and Fashion Designing*, **1**, 80-82.
- Hamid, T. H. T., Hamid, A. A. A., Huyop, F., (2011): A Review: on non-stereospecific haloalkanoic acid dehalogenases. *African Journal of Biotechnology*, **10**(48), 9725-9736. Retrieved 6.3.2019 from: <https://bit.ly/2EC1CKP>.
- Heeb, N. V., Zindel, D., Geueke, B., Kohler, H.-P. E., & Lienemann, P. (2012): Biotransformation of Hexabromocyclododecanes (HBCDs) with LinB—An HCH-Converting Bacterial Enzyme. *Environmental Science & Technology*, **46**(12), 6566-6574.

- Hendrickson, E. R., Payne, J. A., Young, R. M., Starr, M. G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D., E., Ebersole, R. C. (2002): Molecular Analysis of Dehalococcoides 16S Ribosomal DNA from Chloroethene-Contaminated Sites throughout North America and Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(2), 485-495.
- Hou, L.H., & Dutta, S. K. (2000): Phylogenetic characterization of several *para*- and *meta*-PCB dechlorinating Clostridium species: 16s rDNA sequence analyses. *Letters in Applied Microbiology*, **30**(3), 238-243.
- Jakoby, W. B. (1980): Enzymatic Basis of Detoxification, vol. I, Academic Press, New York, ISBN 0-12380001-3 (v. 1).
- Janssen, D. B., Dinkla, I. J. T., Poelarends, G. J., & Terpstra, P. (2005): Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental Microbiology*, **7**(12), 1868-1882.
- Janssen, D. B., Preis, F., Van der Ploeg, J., Eazemeir, B., Terpstra, P., W itholt, B. (1989): Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of *Xanthobacter autotrophicus* G JIG and expression and sequencing of the *dhlA* gene. *Journal of Bacteriology*, **171**(12), 6791-6799.
- Jensen, H. L. (1957): Decomposition of chloro-substituted aliphatic acids by soil bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **3**(2), 151-164.
- Jones, D. H. A., Barth, P. T., Byrom, D., Thomas, C. M., (1992): Nucleotide sequence of the structural gene encoding a 2-haloalkanoic acid dehalogenase of *Pseudomonas putida* strain AJ1 and purification of the encoded protein. *Journal of General Microbiology*, **138**, 675-683.
- Jugder, B. E., Ertan, H., Bohl, S., Lee, M., Marquis, C. P., Manefield, M. (2016): Organohalide Respiring Bacteria and Reductive Dehalogenases: Key Tools in Organohalide Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, **7**. Retrieved 14. 10. 2018 from: <https://bit.ly/2EIIHSX>.
- Kawasaki, H., Tsuda, K., Matsushita, I., Tonomura, K., (1992): Lack of homology between two haloacetate dehalogenase genes encoded on a plasmid from *Moraxella* species strain. *Journal of General Microbiology*, **138**, 1317-1323. Retrieved 6.3. 2019 from: <https://bit.ly/2Tt0vXj>.

- Kim, S., & Picardal, F. (2001): Microbial Growth on Dichlorobiphenyls Chlorinated on Both Rings as a Sole Carbon and Energy Source. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4), 1953-1955.
- Kim, S., & Picardal, F. W. (2000): A novel bacterium that utilizes monochlorobiphenyls and 4-chlorobenzoate as growth substrates. *FEMS Microbiology Letters*, **185**(2), 225-229.
- Klementova S., Keltnerova L. (2015): Triazine Herbicides in the Environment. In: Herbicides, Physiology of Action, and Safety. Price A. Kelton J., Sarunaite L. (Eds.), InTechOpen. ISBN 978-953-51-2217-3. Retrieved 1. 4. 2019 from: <https://bit.ly/2WDLv6U>.
- Kohler-Staub, D., Hartmans, S., Galli, R. (1986): Evidence for identical dichloromethane dehalogenases in different methylotrophic bacteria. *Journal of General*. **132**(10), 2837-2843. Retrieved 14. 10. 2018 from: <https://bit.ly/2OPVeHM>.
- Koudelakova, T., Bidmanova, S., Dvorak, P., Pavelka, A., Chaloupkova, R., Prokop, Z., Damborsky, J. (2012): Haloalkane dehalogenases: Biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, **8**(1), 32-45.
- Kurihara, T., & Esaki, N. (2008): Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: Occurrences, reaction mechanisms, and applications. *The Chemical Record*, **8**(2), 67-74.
- Lahoda, M., Mesters, J. R., Stsiapanava, A., Chaloupkova, R., Kutý, M., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I., (2014): Crystallographic Analysis of 1,2,3-Trichloropropane Biodegradation by Haloalkane Dehalogenase DhaA31. *Acta Crystallographica*, **70**, 209-217.
- Lange, C. C., Schneider, B. J., & Orser, C. S. (1996): Verification of the Role of PCP 4-Monooxygenase in Chlorine Elimination from Pentachlorophenol by *Flavobacterium* sp. Strain ATCC 39723. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **219**(1), 146-149.
- Lauble, H., Kennedy, M.C., Emptage, M.H., Beinert, H., Stout, C.D., (1996): The reaction of fluorocitrate with aconitase and the crystal structure of the enzyme-inhibitor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 13699-13703.
- Leigh, J. A., Skinner, A. J., Cooper, R. A., (1986): Isolation and partial characterisation of dehalogenase - deficient mutants of a *Rhizobium* sp. *FEMS Microbiology Letters*, **36**, 163-166.

- Leong, L. E. X., Khan, S., Davis, C. K., Denman, S. E., & McSweeney, C. S., (2017): Fluoroacetate in plants – a review of its distribution, toxicity to livestock and microbial detoxification. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **8**(1).
- Magnuson, J. K., Stern, R. V., Gossett, J. M., Zinder, S. H., Burris, D. R. (1998): Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Applied and environmental microbiology*, **64**(4), 1270-1275.
- Master, E. R., & Mohn, W. W (1998): Psychrotolerant bacteria isolated from Arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(12) 4823-4829.
- Mena-Benitez, G. L., Gandia-Herrero, F., Graham, S., Larson, T. R., McQueen-Mason, S. J., French, C. E., Rylott, E., L., Bruce, N. C. (2008): Engineering a Catabolic Pathway in Plants for the Degradation of 1,2-Dichloroethane. *Plant Physiology*, **147**(3), 1192-1198.
- Mesri, S., Wahab, R., Huyop, F., (2009): Degradation of 3-chloropropionic acid (3CP) by *Pseudomonas* sp. B6P isolated from a rice paddy field. *Annals of Microbiology*, **59** (3), 447-451.
- Mohn, W. W. & Tiedje, J. M. (1992): Microbial reductive dehalogenation. *Microbiological reviews*, **56**(3), 482-507. Retrieved 1. 4. 2019 from: <https://bit.ly/2U5DACi>.
- Neilson, A. H. (1990): The Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Journal of Applied Bacteriology*, **69**, 445-470. Retrieved 18. 11. 2018 from: <https://bit.ly/2KgmAkL>.
- Nelson, J. L., Jiang, J., Zinder, S. H. (2014): Dehalogenation of Chlorobenzenes, Dichlorotoluenes, and Tetrachloroethene by Three *Dehalobacter* spp. *Environmental Science & Technology*, **48**(7), 3776-3782.
- Oakley, A. J., Klvaňa, M., Otyepka, M., Nagata, Y., Wilce, M. C. J., Damborský, J. (2004): Crystal Structure of Haloalkane Dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 at 0.95 Å Resolution: Dynamics of Catalytic Residues. *Biochemistry*, **43**(4), 870-878.
- Ohtsubo, Y., Miyauchi, K., Kanda, K., Hatta, T., Kiyohara, H., Senda, T., Takagi, M. (1999): PcpA, which is involved in the degradation of pentachlorophenol in *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC39723, is a novel type of ring-cleavage dioxygenase. *FEBS Letters*, **459**(3), 395-398.

- Orser, C. S., & Lange, C. C. (1994): Molecular analysis of pentachlorophenol degradation. *Biodegradation*, **5**(3-4), 277-288.
- Pieper, D. H. (2004): Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**(2), 170-191.
- Porta, M. & Zumeta, E. (2002): Implementing the Stockholm Treaty on Persistent Organic Pollutants. *Occupational and Environmental Medicine*, **59** (10), 651-652.
- Prudnikova, T., Mozga, T., Rezacova, P., Chaloupkova, R., Sato, Y., Nagata, Y., Brynda, J., Kutý, M., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I., (2009): Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of a Novel Haloalkane Dehalogenase DbeA from *Bradyrhizobium elkani* USDA94. *Acta Crystallographica*, **F65**, 353-356.
- Puzyn, T., Haranczyk, M., Suzuki, N., & Sakurai, T. (2010): Estimating persistence of brominated and chlorinated organic pollutants in air, water, soil, and sediments with the QSPR-based classification scheme. *Molecular Diversity*, **15**(1), 173-188.
- Ritter, L., Solomon, K.R., Foret, J. (1996): Persistent Organic Pollutants. An Assessment Report for The International Programme on Chemical Safety (IPSC).
- Rousset, B., Dupuy, C., Miot, F., Dumont, M. D, (2015): Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. South Dartmouth (MA).
- Shapir, N., Mongodin, E. F., Sadowsky, M. J., Daugherty, S. C., Nelson, K. E., & Wackett, L. P. (2007): Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. *Journal of Bacteriology*, **189**(3), 674-682. Retrieved 2.3.2019 from: <https://bit.ly/2BXmSKk>.
- Shree Nath Singh (2012): *Microbial Degradation of Xenobiotics*, Springer, New York, ISBN 978-3-642-23788-1.
- Schmidt, E., & Knackmuss, H. J. (1980): Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochemical Journal*, **192**(1), 339-347.
- Schneider, B., Müller, R., Frank, R., & Lingens, F., (1991): Complete nucleotide sequences and comparison of the structural genes of two 2-haloalkanoic acid dehalogenases from *Pseudomonas* sp. strain CBS3. *Journal of bacteriology*, **173**(4), 1530-5.

Slater, J. H., Bull, A. T., Hardman, D. J., (1997): Microbial dehalogenation of halogenated alkanolic acids. *Advances in Microbial Physiology*, **38**, 133-176.

Smith, J.M., Harrison, K., Colby, J., (1990): Purification and characterization of D-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas putida* strain AJ1/23. *Journal of General Microbiology*, **136**, 881-886.

U.S. National Library of Medicine (2019): Protoanemonin. Retrieved 26.3.2019 from: <https://bit.ly/2UYIVJo>.

Uotila, J. S., Kitunen, V. H., Saastamoinen, T., Coote, T., Häggblom, M. M., & Salkinoja-Salonen, M. S. (1992): Characterization of aromatic dehalogenases of *Mycobacterium fortuitum* CG-2. *Journal of Bacteriology*, **174**(17), 5669-5675.

Uotila, J. S., Salkinoja-Salonen, M. S., & Apajalahti, J. H. A. (1991): Dechlorination of pentachlorophenol by membrane bound enzymes of *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-I. *Biodegradation*, **2**(1), 25-31.

US EPA (1989): Environmental fate and effects division, pesticide environmental fate one line summary: DDT (p, p'). Washington, DC.

US EPA (2003): Decision documents on atrazine. Washington, DC.

US EPA (2013): Health effects of PCBs. Washington, DC.

Van den Wijngaard, A. J., Janssen, D. B. and Witholt, B., (1989): Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment. *Journal of General Microbiology*, **135**, 2199-2208. Retrieved 25. 11. 2018 from: <https://bit.ly/2rfM7SB>.

Van Den Wijngaard, A.J., Van der Kamp, K.W.H.J., Van der Ploeg, J., Pries, F., Kazemier, B., a Janssen, D.B. (1992): Degradation of 1,2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(3), 976-983. Retrieved 14. 10. 2018 from: <https://bit.ly/2ORkLQUP>.

Van der Ploeg, J., van Hall, G., Janssen, D. B., (1991): Characterization of the haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 and sequencing of the *dhlB* gene. *Journal of bacteriology*, **173**(24), 7925-33.

- Wackett, L.P. (1991): Dehalogenation of organohalide pollutants by bacterial enzymes and coenzymes, Texas A&M University, *College Station*, TX D910318-21, Plenum Press, 191-200.
- Weiland-Bräuer, N., Fischer, M. A., Schramm, K.W., Schmitz, R. A. (2017): Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Potential of Microbes Present in a Cryoconite of Jamtalferner Glacier. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1-17.
- Wiegel, J., & Wu, Q. (2000): Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiology Ecology*, **32**(1), 1-15.
- Williams, W. A., Lobos, J. H., Cheetham, W. E. (1997): A Phylogenetic Analysis of Aerobic Polychlorinated Biphenyl-Degrading Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**(1), 207–210.
- Yokota, T., Omori, T., Kodama, T. (1987): Purification and properties of haloalkane dehalogenase from *Corynebacterium* sp. strain m 15-3. *Journal of Bacteriology*, **169** (9), 4049-4054.
- Zumdahl S. S, Zumdahl S.A. (2010): Bonding: General Concepts. In Chemistry, 8th edition, Charles Hartford. Retrieved 20. 2. 2019 from: <https://bit.ly/2IIUaTg>.