



Mikrobiologiczny rozkład pentachlorofenolu

Rafał Szewczyk, Jerzy Długoński

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Microbial degradation of pentachlorophenol

Summary

Pentachlorophenol (PCP) is a toxic xenobiotic of great environmental concern. It has been widely used for many years as a bactericide, fungicide, defoliant, herbicide and wood preservative. In this article, PCP properties, microbial biodegradation and other approaches of this xenobiotic elimination from contaminated areas are reviewed.

Key words:

pentachlorophenol, chlorophenols, biodegradation, pathways, toxicity.

1. Wprowadzenie

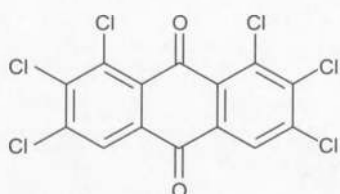
Pentachlorofenol (PCP) po raz pierwszy wprowadzono do użycia w 1936 r. i przez wiele lat stosowano jako środek ochrony drewna, herbicyd, defoliant, środek bakteriobójczy i grzybobójczy, biocyd. PCP znalazł także zastosowanie jako dodatek do mydeł i detergentów wykorzystywanych w medycynie (1-5). Czysty pentachlorofenol występuje w postaci słabo rozpuszczalnych w wodzie i bardzo dobrze w rozpuszczalnikach organicznych, bezbarwnych kryształów. Komercyjne preparaty zawierają do 86% PCP – pozostałe 14% stanowią związki powstające w procesie produkcji PCP. Na te zanieczyszczenia składają się m.in. chlorobenzen, dioksyny i furany (rys. 1), spośród których ostatnie są bardziej toksyczne od pentachlorofenolu (6-8).

Adres do korespondencji

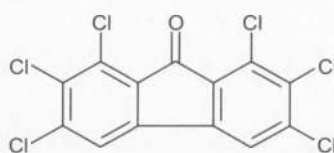
Rafał Szewczyk,
Katedra Mikrobiologii
Przemysłowej
i Biotechnologii,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź.

biotechnologia

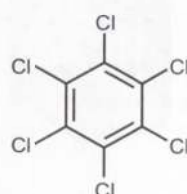
1 (76) 121-134 2007



heksachlorodibenzo-p-dioksyna



heksachlorodibenzofuran



heksachlorobenzen

Rys. 1. Związki poboczne powstające w procesie przemysłowej syntezy PCP.

Głównymi źródłami zanieczyszczeń wody i gleby były antropogeniczne źródła m.in. bezpośrednio uwolnienia roztworów zawierających PCP, składowanie i obróbka drewna lub stosowanie PCP jako składnika środków ochrony roślin (9-11). Trwałość pentachlorofenolu wynika z jego struktury, ponieważ pierścień aromatyczny podstawiony atomami chloru staje się wysoce stabilny i hydrofobowy. PCP jednak rozpuszcza się w wodzie w zakresie do 12-14 mg/l w temperaturze pokojowej (6,12-13). Właściwości te powodują szerokie rozprzestrzenienie PCP w środowisku wodnym i glebowym, co prowadzi do stałego wzrostu jego stężenia w ekosystemie.

2. Toksyczność PCP

EPA (ang. *Environmental Protection Agency*) sklasyfikowało PCP jako ksenobiotyk umiarkowanie toksyczny. Normy EPA przewidują wartość maksymalnego poziomu zanieczyszczenia wody pentachlorofenolem do 1 µg/l i 1 mg/kg w przypadku zanieczyszczenia gleby (8,14-16). W tabeli 1 przedstawiono maksymalne dzienne stężenia PCP, które nie powodują zwiększonego ryzyka wystąpienia niepożądanych efektów toksycznego działania ksenobiotyku.

Tabela 1

Maksymalne dopuszczalne stężenia PCP (6)

	Droga wnikania do organizmu				przezskórna
	wziewna	doustna			
toksyczność	bd	ostra	podostra	przewlekła	bd
dawka (mg/kg/dzień)		0,005	0,001	0,001	

bd – brak danych

Omawiany ksenobiotyk jest inhibitorem fosforylacji oksydacyjnej zachodzącej w mitochondriach i w związku z tym wpływa negatywnie na wszystkie żywe organizmy. W jego obecności w komórkach dochodzi do zaburzenia gradientu chemo-

osmotycznego tworzonego w wyniku transportu elektronów, co z kolei jest niezbędne do fosforylacji ADP. Prowadzi to do nasilenia przemian całkowitego metabolizmu komórkowego, czego efektem jest podwyższone wydzielanie ciepła przez komórkę (7,17). Fernandez i wsp. (17) wskazali także na inny mechanizm toksyczności PCP poprzedzający zmiany w mitochondriach. Proces ten polega na destabilizacji lizosomów oraz inicjacji kaskady reakcji apoptozy. Yang i wsp. (18) wykazali także, że cytotoksyczność PCP jest ściśle związana z zastosowaną dawką i wzrasta wraz z rosnącym stężeniem ksenobiotyku.

Pentachlorofenol jest wysoce toksyczny dla organizmów zasiedlających środowisko wodne. Zha i wsp. (19) wykazali, że u badanego gatunku ryb (*Oryzias latipes*) PCP wpływał negatywnie na procesy reprodukcyjne oraz aktywował receptory estrogonowe. Obecność PCP w hodowlach *Oryzias latipes* prowadziła do znacznego obniżenia produkcji jaj, obniżenia płodności i rozregulowania zachowań seksualnych. U niektórych gatunków ryb, bezkręgowców i glonów zaobserwowano zdolność do krótkotrwałej (do 10 godzin) akumulacji ksenobiotyku w organizmie. Jest to związane ze zwiększoną zdolnością niektórych organizmów do wytwarzania koniugatów, które jako związki bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie są następnie wydalone z organizmu. Zjawisko koniugacji zapobiega także akumulacji PCP w łańcuchu pokarmowym w znaczących ilościach. Omawiany biocyd jest mało toksyczny dla ptaków oraz zwierząt hodowlanych. Skażenie pentachlorofenolem wody lub gleby prowadzi do zahamowania wegetacji i obumierania roślin (10).

U ludzi PCP wywołuje wiele różnorodnych objawów w zależności od sposobu kontaktu i czasu ekspozycji na ksenobiotyk. Toksyczność ostra objawia się m.in. zwężeniem komór nosowych, chrypą, łzawieniem, zaczerwienieniem skóry lub wysypką. Zatrucia drogą pokarmową mogą prowadzić do nadpotliwości, zwiększonego pragnienia, przyspieszonego oddychania i bicia serca, gorączki, bólów brzucha, nudności, osłabienia, zawrotów głowy, braku łaknienia (6).

W przypadku zatruc podostrych i przewlekłych (chronicznych) u ludzi, PCP wywołuje złożone zespoły chorobowe. Po wprowadzeniu do organizmu, związek ten jest rozprowadzany po całym ciele, a następnie akumuluje się w wątrobie, nerkach, mózgu, śledzionie i tkance tłuszczowej, co z kolei prowadzi do nadkwasowości metabolicznej, powiększenia i dysfunkcji wątroby, osłabienia układu immunologicznego, zwiększenia zawartości porfiryny i kwasu delta-aminolewulinowego w moczu oraz aminotransferazy alaniny i kwasu asparaginowego w surowicy krwi (6). U osób mających ciągły kontakt z PCP stwierdzono jego obecność w nasieniu i znaczący wzrost przypadków aberracji chromosomalnych w obrębie limfocytów obwodowych (6-7). W badaniach na zwierzętach wskazuje się na silny wpływ PCP na rozwój osobników poddanych jego doustnemu działaniu, szczególnie w rozwoju płodowym i noworodkowym, objawiający się m.in. obniżoną ogólną masą płodu, śmiertelnością płodów i noworodków, zniekształceniami tkanek miękkich i szkieletowych (6,20).

Techniczne preparaty PCP zawierają liczne zanieczyszczenia, z których z punktu widzenia efektów toksykologicznych, największe znaczenie mają *para*-dioksyny i di-

benzenofurany. Związki te mają negatywny wpływ na proces rozwojowy ludzi oraz funkcjonowanie ludzkiego i zwierzęcego układu odpornościowego, objawiające się m.in. aktywacją limfocytów T, autoimmunizacją, immunosupresją, rozregulowaniem działania limfocytów B (6,21-22).

3. Rozkład pentachlorofenolu

Ze względu na zanieczyszczenie pentachlorofenolem środowiska i jego toksyczne właściwości, badania nad usuwaniem tego ksenobiotyku rozwinęły się na szeroką skalę. W środowisku pentachlorofenol podlega różnorodnym procesom biologicznym i fizykochemicznym, do których można zaliczyć biodegradację, fotodegradację i dysocjację (zachodzące głównie w zewnętrznych warstwach zbiorników wodnych), parowanie, sorpcję i wymywanie (głównie w glebach alkalicznych). Procesom tym często towarzyszą utlenianie i hydroliza. Przemiany te zachodzą we wszystkich typach ekosystemów naturalnych ze zróżnicowaną wydajnością i bezpośrednio wpływają na końcowe stężenie ksenobiotyku w środowisku (23). Czas transformacji waha się od kilku dni do kilku miesięcy lub lat i zależy od dostępności tlenu, światła, wilgotności, ilości i odporności na toksyczne działanie PCP organizmów glebowych lub wodnych, w tym głównie drobnoustrojów. Przyjmuje się, że średni czas półtrwania PCP wynosi 45 dni (20), ale może on ulec wydłużeniu, w przypadku gdy zawartość ksenobiotyku osiągnie stężenie bójcze dla mikroorganizmów. W wodzie pentachlorofenol ulega głównie sedymentacji. Zawartość i rozprzestrzenianie się PCP w glebie i osadach dennych zależy w dużej mierze od zawartości związków lipidowych. Lipidy wykazują zdolność do wiązania ksenobiotyku i znacznego spowolnienia procesów jego sorpcji i desorpcji (24). Proces ten wpływa korzystnie na rozkład PCP przez mikroorganizmy, które nie są narażone na bezpośredni kontakt z ksenobiotykiem. Istnieją jednak doniesienia wskazujące na dłuższy okres półtrwania badanego związku w glebie i wodzie – odpowiednio 178 i 200 dni (15,25). W niekorzystnym układzie, rozważając wymienione czynniki środowiskowe obecność PCP w wodzie lub glebie może ulec wydłużeniu do kilku lat.

3.1. Rozkład mikrobiologiczny

Główną drogą usuwania PCP ze środowiska jest biodegradacja przeprowadzana przez mikroorganizmy. Ze względu na znaczenie tych procesów w usuwaniu chlorofenoli szeroko badano mechanizmy i kinetykę biodegradacji tej grupy ksenobiotyków w wodzie, osadach dennych i glebie. Wzrastająca liczba obserwacji wskazuje na szeroko rozpowszechniony potencjał biodegradacyjny drobnoustrojów skierowany przeciwko różnym ksenobiotykom, w tym PCP, który manifestuje się w określonych, sprzyjających biodegradacji warunkach (26). Ważnymi czynnikami wpływa-

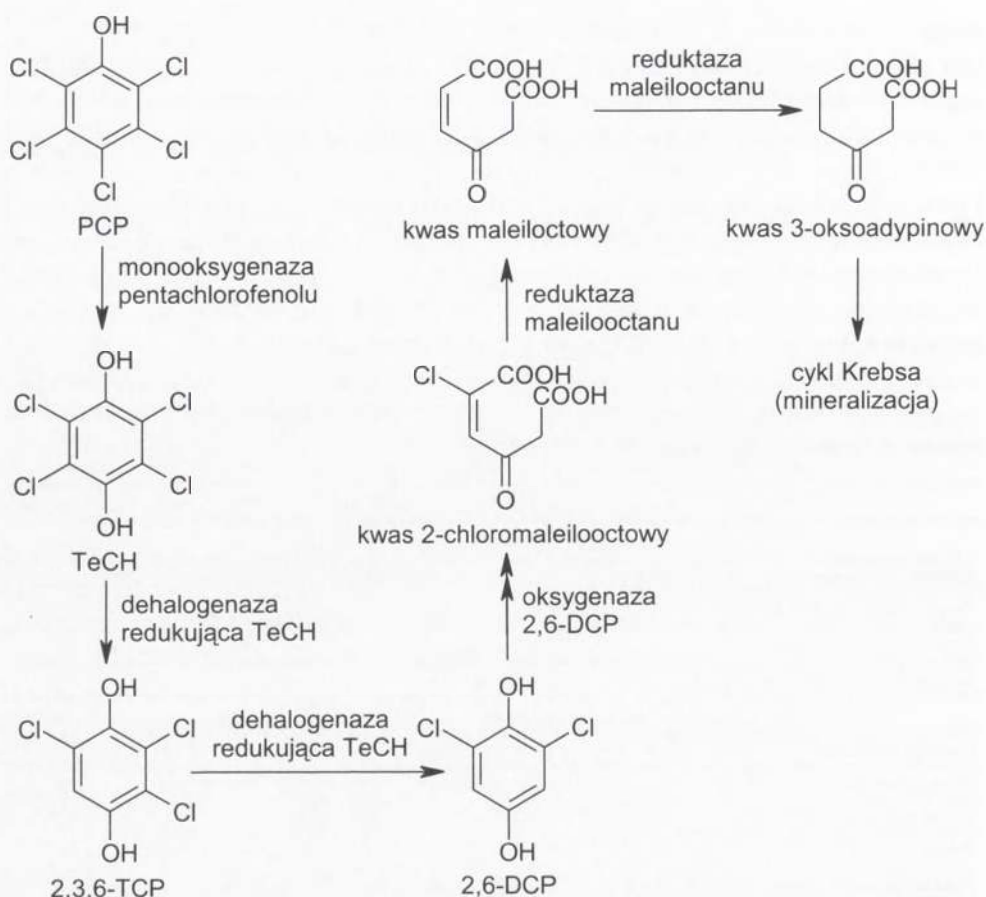
jącymi na mikrobiologiczny rozkład PCP są temperatura (27), dostępność akceptorów elektronów (28), donorów elektronów (29), czynników wzrostowych (30) i toksycznych metali (31). PCP ulega mikrobiologicznej degradacji na wiele różnych sposobów, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Wyizolowano liczne drobnoustroje, w tym bakterie, grzyby strzępkowe i glony, przekształcające PCP i inne chlorofenole do odpowiednich związków pochodnych, ale także zdolne do całkowitej mineralizacji ksenobiotyku. Rozkład beztlenowy, ze względu na tendencję do akumulacji pentachlorofenolu w osadach dennych i glebach, ma również ważne znaczenie w procesie usuwania tego ksenobiotyku ze środowiska. W tabeli 2 przedstawiono organizmy zdolne do metabolizowania PCP.

Tabela 2

Wybrane drobnoustroje degradujące PCP

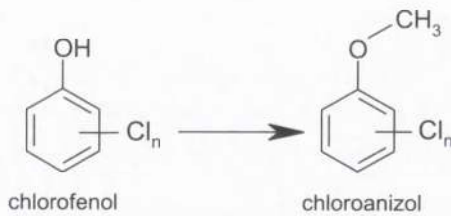
Drobnoustrój	Produkt/droga rozkładu	Literatura
Bakterie		
<i>Bakterie metanogenne</i>	dechlorynacja, mineralizacja	(42)
<i>Pseudomonas gladioli</i> M-2196	tetrachlorokatechol	(82)
<i>Pseudomonas mendocina</i>	mineralizacja	(67)
<i>Sphingobium chlorophenicum</i> ATCC 39723	mineralizacja	(55)
Grzyby		
<i>Coriolus versicolor</i>	O-metylacja, polimeryzacja	(77)
<i>Gleophyllum striatum</i>	mineralizacja	(78)
<i>Mucor ramosissimus</i> IM 6203	TeCH, 2,3,5,6-TCP, 2,3,4,6-TCP	(69,70)
<i>Panus tigrinus</i>	dechlorynacja, O-metylacja, polimeryzacja	(59)
<i>Penicillium camemberti</i>	mineralizacja	(81)
<i>Panerochaete chrysosporium</i>	mineralizacja, dechlorynacja	(57,71,79)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	mineralizacja	(16)
<i>Rhizopus nigricans</i>	mineralizacja	(80)
<i>Saccharomonospora viridis</i>	TeCH, koniugacja	(33)
<i>Trametes versicolor</i>	mineralizacja	(58)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	O-metylacja → pentachloroanizol	(63)
<i>Trichoderma viridae</i> IM 6325	O-metylacja → pentachloroanizol	(70)

W warunkach tlenowych, chlorofenole są degradowane zarówno przez czyste jak i mieszane kultury bakterii, grzybów i glonów. Rozkład omawianego ksenobiotyku jest reakcją wieloetapową. Związek ten jest bardzo trudno degradowalny ponieważ reakcja inicjująca biodegradację przebiega na drodze wymiany atomu chloru na grupę hydroksylową (reakcja katalizowana przez monooksygenazy) lub na atom wodoru (reakcja katalizowana przez dehalogenazy redukujące). Reakcje tego typu należą do grupy nietypowych przemian o charakterze rodnikowym. Rozerwanie pierś-

Rys. 2. Szlaki rozkładu PCP przez *Burkholderia cepacia* AC1100 i *Flavobacterium* sp. ATCC 39723 (34).

cienia aromatycznego fenolu zachodzi poprzez wprowadzenie atomów tlenu w pozycji 2 i 1 z jednoczesnym usunięciem jednego atomu chloru, co prowadzi do powstania łańcuchowych kwasów karboksylowych włączanych do cyklu Krebsa (rys. 2) (32-34). Rozerwanie pierścienia może także zachodzić poprzez dioksygenację pierścienia aromatycznego fenolu (2,35). Reakcje tego typu prowadzą do całkowitego rozkładu substratu – mineralizacji, której produktami są niskocząsteczkowe związki nieorganiczne, dwutlenek węgla i woda (rys. 2).

Law i wsp. (16) zaproponowali odmienny szlak rozkładu PCP zachodzący w warunkach tlenowych, przeprowadzany przez zespoły mikroorganizmów zasiedlające zużyty kompost stosowany w hodowli *Pleurotus pulmonarius*. Proces ten polega na kolejnych dechloracjach z wydzielaniem gazowego chloru, prowadzących w końcowym etapie do powstania fenolu. Następnie cząsteczka fenolu podlega reakcjom metylacji prowadzącym do powstania pochodnych toluenowych lub karboksylacji



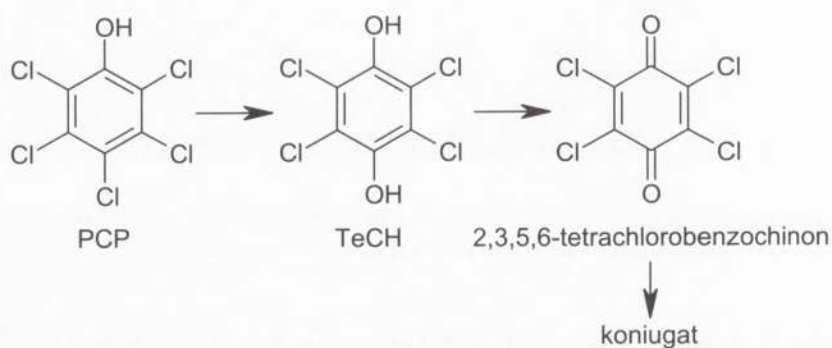
Rys. 3. Ogólny schemat przekształcania chlorofenoli do chloroanizoli.

i estryfikacji, której efektem jest powstanie ftalanów. W przypadku obu typów półproduktów reakcji dochodzi do rozerwania pierścienia benzenowego, a powstałe łańcuchy węglowe polimeryzują do kwasu oktadekanowego i heksadekanu.

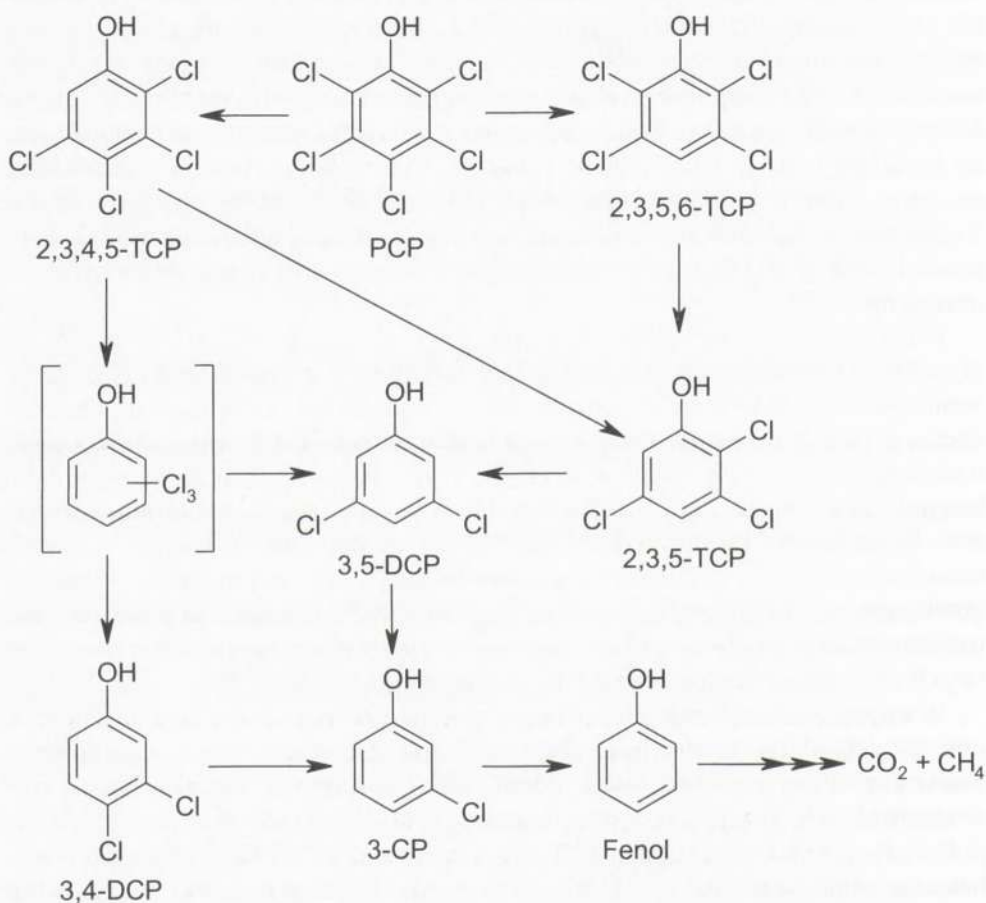
Kolejnym sposobem przekształcania polichlorofenoli w warunkach tlenowych prowadzącym do obniżenia toksyczności substratu, bez usunięcia atomów chloru z cząsteczki, jest alkilacja grupy hydroksylowej chlorofenoli prowadząca do powstania m.in. chloroanizoli (metoksypochoodnych) (36-39). Chloroanizole są znacznie mniej reaktywne i toksyczne w stosunku do substratów, z których powstały, ale jednocześnie bardziej odporne na atak mikrobiologiczny. Zwiększa się także ich hydrofobowy charakter. Reakcje O-metylacji traktuje się raczej jako przykłady detoksykacji związków (rys. 3). Grzyby białej zgnilizny, szczególnie z rodzaju *Phanerochaete* sp., są w stanie w krótkim czasie usunąć PCP ze skażonej gleby, przeprowadzając z jednej strony całkowitą mineralizację substratu, z drugiej wytwarzając duże ilości pentachloroanizolu (37-38). Proces O-metylacji zaobserwowano również u wyższych organizmów (40).

Polichlorofenole podlegają także procesowi koniugacji. Proces ten polega na utworzeniu koniugatu ze związkami zawierającymi m.in. grupę tiolową np. glutationem, cysteiną, lub kwasem glukuronowym czy glukozą (41) po uprzednim wprowadzeniu w pozycji *para*-chlorofenolu grupy hydroksylowej. Tego typu przekształcenia występują głównie u organizmów wyższych. Powstające koniugaty są związkami polarnymi i jako związki dobrze rozpuszczalne w wodzie ulegają wydaleni z organizmu. Webb i wsp. (33) zasugerowali podobny – do opisanego u ssaków – mechanizm przekształcania PCP przez *Saccharomonospora viridis* i zaproponowali schemat przekształceń, który przedstawiono na rysunku 4. Zastosowana przez autorów metodyka wskazuje na obecność koniugatów o niezidentyfikowanej strukturze wydzielanych do podłoża hodowlanego i zawierających grupę-SH (33).

W warunkach beztlenowych zaobserwowano dechlorynację redukcyjną chlorofenoli. Biodegradacja beztlenowa przeprowadzana jest przez zespoły mikroorganizmów zasiedlających ścieki, osady denne, gleby podtopione lub zanieczyszczone ściekami (42-43). W niektórych przypadkach, dechlorynacja dichlorofenoli może być połączona z redukcją siarczynu (28). Przykładem może być *Desulfomonile tiedjei* – bakteria redukująca siarczany, która przeprowadza dechlorynację PCP do 2,4,6-TCP (44). PCP może podlegać procesowi dechlorynacji prowadzącemu do powstania mie-



Rys. 4. Schemat transformacji PCP przez *Saccharomonospora viridis* (33).



Rys. 5. Szlak rozkładu PCP przez metanogenne konsorcjum bakteryjne (42).

szanin chlorofenoli w układach wykorzystujących konsorcja bakterii metanogenicznych (42-46). Juteau i wsp. (42) scharakteryzowali rozkład pentachlorofenolu przez bakterie metanogenne. Główny szlak rozkładu prowadził poprzez *para*, *orto*, *orto* i *meta*-dechlorynację (rys. 5). Najwolniejszym etapem było przekształcenie 3-chlorofenolu (3-CP) do fenolu. W licznych źródła wskazuje się na fakt spowolnienia procesu usuwania atomów chloru przez mikroorganizmy w warunkach beztlenowych wraz z ich spadającą liczbą w pierścieniu fenolowym (44,47). Kennes i wsp. (46) zaproponowali z kolei szlak rozkładu PCP przeprowadzany przez samoagregujące metanogenne konsorcja bakteryjne poprzez *meta*-,*orto*, *para/orto* i *meta/para* dechlorynację.

3.2. Kometabolizm

Biotransformacja lub mineralizacja u większości drobnoustrojów zaangażowanych w rozkład PCP i chlorofenoli może wymagać dodatkowych źródeł węgla i energii w środowisku wzrostu. Stwierdzono, że rozkład 4-CP przez *Phanerochaete chrysosporium* zachodzi tylko w podłożu zawierającym glukozę lub glicerol (48). Transformacja 2,3,5-TCP przez *Rhodococcus opacus* 1G zachodzi na podłożu wzbogaconym ekstraktem drożdżowym (49). Interesujący przykład kometabolizmu opisano u *Acinetobacter* sp. (50-51). Badany przez autorów szczep wykorzystuje fenol jako źródła węgla. W hodowlach z dodatkiem fenolu stwierdzili przyspieszenie rozkładu 3-CP i 4-CP. Jednocześnie całkowite zużycie fenolu przez drobnoustroj w trakcie wzrostu hodowli, spowalniało rozkład dodanych do hodowli chlorofenoli.

3.3. Podłoże genetyczne biodegradacji PCP

Dotychczasowe badania genetyczne pozwoliły na identyfikację, wyizolowanie i sklonowanie kilku genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład tego ksenobiotyku. Geny oznaczone jako *pcpA*, *pcpB*, *pcpC*, *pcpD* i *pcpR* wyizolowano z *Flavobacterium* sp. ATCC 39723 (patent 5512478, USA). Mogą one być stosowane m.in. w konstruowaniu zmodyfikowanych genetycznie bakterii. Ohtsubo i wsp. (52) uzyskali rekombinanty zawierające sekwencję *pcpA*, co umożliwiło określenie jej roli w syntezie dioksygenazy 2,6-DCHQ odpowiedzialnej za rozbicie pierścienia aromatycznego tego związku. Wang i wsp. (53) skonstruowali rekombinanty *Escherichia coli* zawierające geny kodujące 4-monooksygenazę PCP (PCP4MO), pochodzące z *Sphingomonas chlorophenolica*, transferazę glutationową (GST) i proteazę (EKLY-FQG). U szczepu *Pseudomonas* sp. zidentyfikowano i sklonowano u *Escherichia coli* JM109 plazmidy o masach 4 i 80 kb odpowiedzialne za całkowitą mineralizację PCP przez szczep wyjściowy (54). Z kolei Dai i Copley (55) poprzez zastosowanie techniki *genome shuffling* znacznie zwiększyli odporność i zdolności biodegradacyj-

ne u mutantów *Sphingobium chlorophenolicum* posiadających geny *pcpA*, *pcpB*, *pcpC*, *pcpD* i *pcpR*. Podłoże genetyczne przemian PCP u organizmów wyższych nie zostało jak dotąd dostatecznie wyjaśnione.

3.4. Enzymy zaangażowane w rozkład PCP i innych chlorofenoli

Do najważniejszych enzymów zaangażowanych w rozkład chlorofenoli należą: enzymy ligninolityczne (peroksydaza ligninowa, mangano-zależna peroksydaza, fenolooksydaza zawierająca atomy miedzi, lakkaza), dioksygenazy, monoooksygenazy, metylotransferazy, dehalogenazy redukujące.

Enzymy ligninolityczne są wytwarzane głównie przez grzyby tzw. „białej zgnilizny”. Jest to układ niespecyficzny charakteryzujący się wysokim potencjałem oksydoredukcyjnym dzięki czemu drobnoustroje te znalazły zastosowanie w rozkładzie wielu ksenobiotyków. Scharakteryzowano, jak dotąd, kilka gatunków grzybów białej zgnilizny zdolnych do całkowitej mineralizacji polichlorofenoli m.in. *Phanerochaete chrysosporium* (56-57), *Trametes versicolor* (58), *Panus tigrinus* (59), *Pleurotus pulmonarius* (16,60).

Dioksygenazy są grupą enzymów, która posiada w centrum aktywnym niehemo- wy atom żelaza. Enzymy te występują dość powszechnie u wielu organizmów. Katalizują reakcje, których efektem jest wprowadzenie dwóch atomów tlenu do cząsteczki substratu z wytworzeniem układów katecholowych lub epoksydowych (61) i często uczestniczą w kilku reakcjach w ramach danego szlaku metabolicznego.

Monoooksygenazy – cytochrom P-450, stanowią klasę podobnych strukturalnie enzymów, które zawierają układ hemowy. Przyjmuje się, że cytochrom P-450 występuje u wszystkich żywych organizmów ponieważ znaleziono go u archebakterii, bakterii, grzybów, roślin i zwierząt (62). Cytochrom P-450 jest odpowiedzialny za wiele różnorodnych reakcji biotransformacji m.in. steroidów, alkanów, WWA, pestycydów. Podstawowy mechanizm przemian przeprowadzanych przez monoooksygenazy polega na wprowadzeniu atomu tlenu w postaci grupy hydroksylowej do cząsteczki związku niepolarnego. W reakcjach z udziałem cytochromu P-450 mogą powstawać zarówno półprodukty o charakterze epoksydowym jak i chinonowym. Zdecydowana większość enzymów z tej grupy ma charakter indukcyjny.

Efektem działania O-metylotranferaz jest powstawanie m.in. chloroanizoli, które powstają w wyniku reakcji metylacji tiohalofenoli i halofenoli. Metylotransferazy są zróżnicowaną grupą enzymów. W centrum aktywnym posiadają grupę tiolową. Układy enzymatyczne występujące u roślin i zwierząt wymagają obecności jonów dwuwartościowych np. Mg^{2+} . Konstytucyjna metylotransferaza występująca u bakterii jest odpowiedzialna za transformacje szerokiej gamy substratów. Z kolei enzym scharakteryzowany przez Coque i wsp. (63) występujący u *Trichoderma longibrachiatum* jest metylotransferazą indukcyjną, nie wymagającą źródła jonów Mg^{2+} i specyficzną – skierowaną tylko na chlorofenole.

W warunkach beztlenowych, liczne organizmy wykorzystują halogenowane substraty jako końcowe akceptory elektronów (halorespiracja) w procesach utleniania wodoru lub substratów organicznych. Dehalogenazy redukujące należą do dużej grupy enzymów odpowiedzialnych za rozerwanie wiązania węgiel-halogen i wprowadzeniu w jego miejsce atomu wodoru. Enzymy z tej grupy to stereospecyficzne, konstytucyjne lub indukcyjne peptydy posiadające w swoim centrum aktywnym aminokwasy i wymagające do przeprowadzenia reakcji NADH, NADPH, GSH lub innych kofaktorów. Zidentyfikowano i opisano trzy dehalogenazy redukujące: dehalogenaza redukująca trichloroetenu u *Dehalococcoides ethenogenes*, dehalogenaza redukująca tetrachloroetenu u *Dehalospirillum multivorans* i dehalogenaza redukująca 2-chlorofenolu u *Desulfitobacterium dehalogenans* (32). Stwierdzono także, że bakterie rozkładają PCP w beztlenowych warunkach hodowli wykorzystując dehalogenazę redukującą (28).

Wszystkie enzymy zaangażowane w rozkład chlorofenoli mogą mieć charakter konstytucyjny lub indukcyjny. Ekspresja hydroksylazy PCP i dioksygenazy 2,6-dichlorohydrochinonu u *Flavobacterium* sp. i *Sphingomonas chlorophenolica* jest indukowana w obecności PCP w podłożu. Z kolei ekspresja dehalogenazy TeCH u *Sphingomonas chlorophenolica* nie jest indukowana przez dodatek PCP czy innych chlorofenoli (64). Układy związane z cytochromem P-450 są w większości przypadków indukcyjne i stereospecyficzne (65). Zewnątrzkomórkowe enzymy ligninolityczne wydzielane są przez organizmy grzybowe bez względu na rodzaj dostępnych substratów w środowisku i jako układ niespecyficzny degradują olbrzymią liczbę ksenobiotyków (66).

4. Zastosowanie drobnoustrojów do usuwania PCP ze skażonych środowisk

Oczyszczanie środowiska wymaga zaangażowania różnorodnych fizykochemicznych jak i biologicznych metod i technologii. Techniki biologiczne w porównaniu z innymi metodami charakteryzują się niewielkimi kosztami w stosunku do uzyskiwanych efektów. Podstawowe znaczenie w metodach biologicznych ma wzmacnianie procesów bioremediacji *in situ* i *ex situ*. Zastosowanie metod *ex situ* pozwala przy zastosowaniu odpowiedniego oprzyrządowania na dokładne kontrolowanie każdego aspektu procesu biotechnologicznego. Do najważniejszych parametrów należą: natlenienie, pH, temperatura, obecność i dostępność źródeł węgla i azotu, skład mineralny podłoża, rodzaj i ilość drobnoustrojów w hodowli. Kao i wsp. (67) określili warunki sprzyjające rozkładowi PCP *in situ* w glebie skażonej wyciekami z fabryki pestycydów w południowym Tajwanie. Podstawowe znaczenie miało zintensyfikowanie tlenowych i beztlenowych procesów kometabolicznej biodegradacji PCP, przeprowadzanych przez autochtoniczne mikroorganizmy, w tym głównie *Pseudomonas mendocina* odpowiedzialnego za całkowitą mineralizację ksenobiotyku. W tym celu opracowano i zastosowano „glebowe biobariery” zawierające melasę trzcinową

i osady, które pełniły rolę źródeł pierwotnych substratów wzrostowych. Schmidt i wsp. (30) przeprowadzili cykl doświadczeń z wykorzystaniem bioreaktorów, gdzie odtworzyli warunki środowiskowe wody skażonej niskimi stężeniami PCP (występującymi głównie w rejonach sąsiadujących z zakładami impregnacji drewna). PCP był rozkładany w warunkach tlenowych jako jedyne źródło węgla, przez zespoły mikroorganizmów wodno-glebowych naturalnie występujących w pobranych próbach, do poziomu 0,001 mg/l co pozwala na zastosowanie opracowanej metody do oczyszczania wód gruntowych. Szczep *Mucor ramosissimus* IM 6203 jest z kolei zdolny do wydajnego rozkładu PCP na podłożu zawierającym jedynie zużyty olej silnikowy, co pozwala na jego potencjalne zastosowanie w oczyszczaniu hydrofobowych odpadów przemysłowych i PCP (68-70). Shim i Kawamoto (71) opracowali system produkcji peroksydazy ligninowej do biodegradacji PCP przez immobilizowane komórki *Phanerochaete chrysosporium* w bioreaktorze. Mineralizacja PCP (roztwór 30 mg/l dodawany do bioreaktora z szybkością 2l/24h) w ustabilizowanym układzie ciągłym, osiągnęła 80%.

W bioremediacji wód i gleb stosuje się także metody ograniczające się do usuwania chlorofenoli i ich metabolitów ze środowiska (72). Opracowano metody usuwania chlorofenoli z wykorzystaniem granulatów inaktywowanej termicznie grzybnicy *Phanerochaete chrysosporium* i *Pleurotus sajor caju* (73-75) oraz inaktywowanej termicznie kory sosnowej, polegające na adsorpcji PCP na powierzchni zastosowanych nośników (76).

5. Podsumowanie

Ponad 50 lat stosowania chlorofenoli, w tym PCP, przyczyniło się do ich szerokiego rozprzestrzenienia w środowisku naturalnym i organizmach je zasiedlających. Ludzie mający kontakt z produktami zawierającymi PCP są szczególnie narażeni na jego toksyczne działanie niosące ze sobą zwiększone ryzyko wystąpienia nowotworów, defektów płodu, mutacji, zaburzeń składu krwi oraz zmian w układzie nerwowym. Mimo restrykcyjnych przepisów dotyczących użycia chlorofenoli, ich ilość w środowisku naturalnym nie ulega znaczącemu obniżeniu.

Nie opracowano tanich i wydajnych metod usuwania tych związków ze skażonych środowisk. Proceś rozkładu PCP jest wieloetapowy, co z kolei wymaga zaangażowania różnorodnych metod fizykochemicznych i biologicznych, z których te ostatnie ze względu na swoją efektywność mają szczególne znaczenie. Celowe jest zatem zarówno poszukiwanie drobnoustrojów zdolnych do rozkładu związków chloroorganicznych, jak i badanie mechanizmów warunkujących wydajny przebieg biodegradacji przeprowadzanej przez mikroorganizmy.

Pracę finansowano w ramach badań własnych Uniwersytetu Łódzkiego nr 505/387, 505/488 i 505/705 oraz z grantu międzynarodowego otrzymanego przez KMPiB UŁ z Unii Europejskiej, DG XII, INCO-COPERNICUS (Contract No. 15-CT 98-0114).

Literatura

1. Abramovitch R. A., Capracotta M., (2003), *Chemosphere* 50, 955-957.
2. Chaudhry G. R., Chapalamadugu S., (1991), *Microbiological Reviews*, 3, 59-79.
3. Hobbs S. J., Howe P. D., Dobson S., (1993), UK: Toxic Substances Division, Department of the Environment.
4. Muir J., Eduljee G., (1999), *The Science of the Total Environment*, 236, 41-56.
5. Ozanne G., (1995), Presentation to the 3rd Symposium of 'The Challenge Safety-Environment', Cannes Mandelieu, 6-7 February.
6. ASTDR, (2001), Toxicological Profile for Pentachlorophenol.
7. Fisher B., (1991), *Journal of Pesticide Reform*, 11, nr 1.
8. Qian Y., Zheng M., Liu W., Ma X., Zhang B., (2005), *Chemosphere*, 60(7), 951-958.
9. Kot-Wasik A., Kartanowicz R., Dąbrowska D., Namieśnik J., (2004), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 73, 511-518.
10. Machera K., Miliadis G. E., Anagnostopoulos E., Anastasiadou P., (1997), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59, 909-916.
11. Nascimento N. R., Nicola S. M. C., Rezende M. O. O., Oliveira T. A., Öberg G., (2004), *Geoderma*, 121, 221-232.
12. Czaplicka M., (2004), *Science of the Total Environment*, 322, 21-3.
13. Howard P. H., Meylan W. M., (1997), *Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals*, Lewis Publishers, New York, 97.
14. Laine M. M., Ahtiainen J., Wagman L. G., Oberg L. G., Jorgensen K. S., (1997), *Environmental Science and Technology*, 37, 3244-3250.
15. Larson S. J., Capel P. D., Majewski M. S., (1997), Ann Arbor Press, Inc, Michigan.
16. Law W. M., Lau W. N., Lo K. L., Wai L. M., Chiu S. W., (2003), *Chemosphere*, 52, 1531-1537.
17. Fernández F. P., Labrador V., Pérez M. J. M., Hazen M. J., (2005), *Toxicology*, 210, 37-44.
18. Yang S., Han X., Wei C., Chen J., Yin D., (2005), *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 20, 182-187.
19. Zha J., Wang Z., Schlenk D., (2006), *Chem. Biol. Interact.*, 161(1), 26-36.
20. ExToxNet, (1996), Pesticide Information Profiles – Pentachlorophenol.
21. Uhl S., Schmid P., Schlatter C., (1986), *Arch. Toxicol.*, 58(3), 182-186.
22. Lee C. C., Lin W. T., Liao P. C., Su H. J., Chen H. L., (2006), *Environ. Pollut.*, 141(2), 381-386.
23. Dudal Y., Jacobson A. R., Samson R., Deschenes L., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 460-465.
24. Chen Y.-X., Chen H.-L., Xu Y.-T., Shen M.-W., (2004), *Environment International*, 30, 31-37.
25. Büyüksönmez F., Rynk R., Hess T. F., Bechinski E., (1999), *Compost Science and Utilization*, 7(4), 66-82.
26. D'Angelo E. M., Reddy K. R., (2000), *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64, 933-943.
27. Kohring G. W., Rogers J. E., Wiegel J., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(2), 348-353.
28. Häggblom M. M., Rivera M. D., Young L. Y., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1162-1703.
29. Chang B. V., Yuan S. Y., (1996), *Chemosphere*, 33, 313-320.
30. Schmidt L. M., Delfino J. J., Preston J. F., Laurent G. St., (1999), *Chemosphere*, 38, 2897-2912.
31. Kuo C.-W., Genthner S. B. R., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2317-2323.
32. Janssen D. B., Pries F., van der Ploeg J. R., (1994), *Annual Review of Microbiology*, 48, 163-191.
33. Webb M. D., Ewbank G., Perkins J., McCarthy A. J., (2001), *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1903-1914.
34. Zeng Y., (2006), Pentachlorophenol Family Pathway Map. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (<http://umbdd.ahc.umn.edu>).
35. Mrozik A., Łabużek S. A., (2002), *Acta Microbiol. Pol.*, 51, 367-378.
36. Lamar R. T., Dietrich D. M., (1992), *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3093-3100.
37. Lamar R. T., Larson M. J., Kirk T. K., (1990), *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3519-3526.
38. Lestan D., Lamar R. T., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2045-2052.
39. McBain A., Cui F., Herbert L., Ruddick J. N. R., (1996), *Biodegradation*, 6, 47-55.

40. Bollag J.-M., (1992), *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1876-1881.
41. Renner G., Mucke W., (1986), *Toxicol. Environ. Chem.*, 11, 9-29.
42. Juteau P., Beaudet R., McSween G., Lepine F., Milot S., Bisaillon J. G., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 218-224.
43. Shen D.-S., Liu X.-W., Feng H.-J., (2005), *J. Hazard. Mat.*, 119, 239-243.
44. Mohn W. W., Kennedy J., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2131-2136.
45. Hendriksen H. V., Ahring B. K., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 662-666.
46. Kennes C., Wu W.-M., Bhatnagar L., Zeikus J. G., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 801-806.
47. Madsen T., Licht D., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2874-2878.
48. Zouari H., Labat M., Sayadi S., (2002), *Bioresource Technology*, 84, 145-150.
49. Bondar V. S., Boersma M. G., van Berkel W. J. H., Finkelstein Z. I., Golovlev E. L., Baskunov B. P., Vervoort J., Golovleva L. A., Rietjens I. M. C. M., (1999), *FEMS Microbiology Letters*, 181, 73-82.
50. Hao O. J., Kim M. H., Seagren E. A., Kim H., (2002), *Chemosphere*, 46, 797-807.
51. Kim M. H., Hao O. J., (1999), *Wat. Res.*, 33, 562-574.
52. Ohtsubo Y., Miyauchi K., Kanda K., Hatta T., Kiyohara H., Senda T., Nagata Y., Mitsui Y., Takagi M., (1999), *FEBS Letters*, 459, 395-398.
53. Wang H., Tiirola M. A., Puhakka J. A., Kuloma M. S., (2001), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 161-166.
54. Thakur I. S., Verma P. K., Upadhaya K. C., (2001), *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 286, 109-113.
55. Dai M., Copley S. D., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(4), 2391-2397.
56. Reddy G. V. B., Gelpke M. D. S., Gold M. H., (1998), *Journal of Bacteriology*, 10, 5159-5164.
57. Reddy G. V. B., Gold M. H., (2000), *Microbiology*, 146, 405-413.
58. Tuomela M., Lyytikäinen M., Oivanen P., Hatakka A., (1999), *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 65-74.
59. Leontievsky A. A., Myasoedova N. M., Golovleva L. A., Sedarati M., Evans C. S., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 599-604.
60. Kringstad K. P., Lindstrom K., (1984), *Environ. Sci. Technol.*, 18, 236A-248A.
61. Mason J. R., Cammack R., (1992), *Annu. Rev. Microbiol.*, 46, 277-305.
62. Anzenbacher P., Anzenbacherova E., (2001), *Cell. Mol. Life Sci.*, 58 (5-6), 737-747.
63. Coque J.-J. R., Alvarez-Rodriguez M. L., Larriba G., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 9, 5089-5095.
64. Copley S. D., (2000), *Trends in Biochemical Sciences*, 25(6), 261-265.
65. van den Brink H. J. M., van Gorcom R. F. M., Cees A. M., van den Hondel J. J., Punt P. J., (1998), *Fungal Genetics and Biology*, 23, 1-17.
66. Gianfreda L., Rao M. A., (2004), *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 339-354.
67. Kao C. M., Chai C. T., Liu J. K., Yeh T. Y., Chena K. F., Chen S. C., (2004), *Water Research*, 38, 663-672.
68. Długoński J., Szewczyk R., (2003), *Microbial Biodegradation and Biodeterioration of Technical Material*, 3rd Scientific Conference Lodz, Wyd. Pi, 69-71.
69. Szewczyk R., Bernat P., Milczarek K., Długonski J., (2003), *Biodegradation*, 14, 1-8.
70. Szewczyk R., (2006), *Biodegradacja pentachlorofenolu przez grzyby mikroskopowe*, rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ, Łódź.
71. Shim S.-S., Kawamoto K., (2002), *Water Research*, 36, 4445-4454.
72. Aksu Z., (2005), *Process Biochem.*, 40, 997-1026.
73. Denizli A., Cihangir N., Rad A. Y., Taner M., Alsancak G., (2004), *Process Biochemistry*, 39, 2025-2030.
74. Denizli A., Cihangir N., Tüzmen N., Alsancak G., (2005), *Bioresource Technology*, 96, 59-62.
75. Wu J., Yu H.-Q., (2006), *Process Biochemistry*, 41(1), 44-49.
76. Brás I., Lemos L., Alves A., Pereira M. F. R., (2005), *Chemosphere*, 60, 1095-1102.
77. Ullah M. A., Bedford C. T., Evans C. S., (2000), 53, 230-234.
78. Fahr K., Wetzstein H.-G., Grey R., Schlosser D., (1999), *FEMS Microbiology Letters*, 175, 127-132.
79. Reddy G. V. B., Gold M. H., (1999), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357, 901-905.
80. Cortes D., Barrios-Gonzalez J., Tomasini A., (2002), *Process Biochemistry*, 37, 881-884.
81. Taseli B. K., Gockay C. F., (2005), *Process Biochem.*, 40, 917-923.
82. Nakamura T., Motoyama T., Suzuki Y., Yamaguchi I., (2004), *Soil Biol. Biochem.*, 36, 787-795.