

Agnieszka Nowak^{1*}, Izabela Greń¹, Agnieszka Mrozik¹

¹ Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Wpłynęło w maju 2015 r.
Zaakceptowano w czerwcu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Ogólna charakterystyka i toksyczność chlorofenoli. 3. Ogólne mechanizmy mikrobiologicznego rozkładu chlorofenoli w warunkach tlenowych. 4. Rozkład chlorofenoli w glebie. 5. Metody wspomagania rozkładu chlorofenoli w glebie. 5.1. Biostymulacja. 5.2. Bioaugmentacja. 5.3. „Aktywna gleba”. 6. Podsumowanie

Microbial degradation of chlorophenols in soil

Abstract: Chlorophenols are widely used in different branches of industry and agriculture as components of pesticides, disinfectants and wood treatment agents. They are hardly degradable and, therefore, can accumulate in the environment. One of the environment friendly methods of their removal from contaminated soil is microbial degradation. The efficiency of this process is determined by many abiotic and biotic factors. The first include the chemical structure of contaminants, their content and bioavailability as well as temperature, pH, soil texture, water content and oxygen concentration. In turn, biotic factors include the structure of microbial communities, stability and enzymatic activity of cells, their biomass, ability to chemotaxis and interactions between microorganisms. Several strategies have been developed to enhance the removal of chlorophenols from contaminated soil. The most effective in detoxifying these compounds are bioaugmentation, biostimulation and the use of “activated soil”. In this review, the influence of different factors on microbial degradation of chlorophenols in soil are described and the applicability of selected methods in their removal are discussed.

1. Introduction. 2. General characteristics and toxicity of chlorophenols. 3. General mechanisms of microbial degradation of chlorophenols in aerobic conditions. 4. Degradation of chlorophenols in soil. 5. Methods for enhancing the degradation of chlorophenols in soil. 5.1. Biostimulation. 5.2. Bioaugmentation. 5.3. “Activated soil”. 6. Summary

Słowa kluczowe: chlorofenole, czynniki abiotyczne i biotyczne, metody bioremediacji

Key words: chlorophenols, abiotic and biotic factors, methods of bioremediation

1. Wprowadzenie

Rozwój wielu gałęzi przemysłu oraz rolnictwa nie byłby możliwy bez stosowania na szeroką skalę związków chemicznych, jak pestycydy, środki ochrony drewna, czy środki dezynfekujące. Składnikami tych substancji są między innymi chlorofenole, których powszechne stosowanie oraz długi czas rozpadu prowadzi do groźnego zjawiska kumulowania się ich w środowisku. Ekosystemy glebowe są szczególnie narażone na toksyczny wpływ chlorofenoli, a rosnąca antropopresja zwiększa poziom degradacji gleby. Z tego względu niezwykle istotne stało się poszukiwanie skutecznych metod usuwania tych związków ze środowiska, mających jednocześnie jak najmniejszy wpływ na funkcjonowanie ekosystemów [22].

Na skalę przemysłową chlorofenole uzyskuje się poprzez chlorowanie hydroksybenzenu lub hydroksylację chlorobenzenu. Monochlorofenoli używa się do produkcji tetrachlorofenoli (TeCP) i pentachlorofenolu (PCP) stosowanych do konserwacji drewna [51, 58]. W rolnictwie chlorofenole stosowane są jako składniki bakteriocydów, fungicydów, insektycydów i herbicydów [16]. Jako produkty uboczne powstają między innymi w procesie dezynfekcji wody związkami chloru oraz

w trakcie wybielania pulpy drzewnej [22, 33, 70, 80]. W glebie chlorofenole mogą powstawać w wyniku chlorowania grup aromatycznych kwasów fulwowych z udziałem chloroperoksydaz w obecności nadtlenu wodoru oraz nieorganicznego chloru [2, 41, 69].

Szacuje się, że globalna produkcja chlorofenoli wynosi około 100 000 ton rocznie, w tym niżej chlorowanych fenoli 60 000 ton [96]. Z uwagi na to, że związki te są toksyczne dla organizmów żywych i kumulują się w środowisku, niezwykle istotne jest nie tylko monitorowanie ich losów, ale również podejmowanie działań zmierzających do ich detoksykacji i/lub usuwania. Działania takie podjęto między innymi w Finlandii, gdzie badano możliwość oczyszczania terenów skażonych środkami ochrony drewna, w tym szczególnie preparatem KY-5 zawierającym w swoim składzie mieszaninę różnych chlorofenoli [58, 59, 86]. W Wielkiej Brytanii monitorowano skład wody pitnej pod względem obecności chlorofenoli powstałych w procesie dezynfekcji wody [68], a we Włoszech analizowano obecność herbicydów i produktów ich transformacji w wodzie pitnej i w wodzie pochodzącej z Tybru [53]. W Rosji z kolei sprawdzano skład i toksyczność ścieków jednej z największych w kraju fabryk papieru, z której odpady odprowadzane są systematycznie do Jeziora

* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. (32) 20 09 576; e-mail: agnieszka.a.nowak@us.edu.pl

Bajkał [89]. W Stanach Zjednoczonych podjęto natomiast próbę monitorowania losów chlorofenoli w glebie [44]. Niewiele wiadomo na temat skażenia chlorofenolami gleb i wód w Polsce. Nieliczne badania wskazują, że związki te mogą występować w wodzie pitnej oraz ściekach surowych i oczyszczonych. Michałowicz i wsp. [64] wykazali obecność fenolu, 4-chlorofenolu (4-CP), trichlorofenoli (TCP) i TeCP w wodzie pitnej w Łodzi i Warszawie, w stężeniach przekraczających dopuszczalną zawartość $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$. Sezonowa analiza składu surowych i oczyszczonych ścieków pochodzących z Grupy Oczyszczalni Ścieków w Łodzi w latach 1999–2000 wykazała, że latem i jesienią stężenia fenolu i 2,4,6-TCP były w nich wysokie i zawierały się odpowiednio w zakresach $2,52\text{--}3,076 \mu\text{g l}^{-1}$ i $1,1\text{--}1,2 \mu\text{g l}^{-1}$. W ściekach surowych oprócz tych związków wykryto 4-CP, 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP), 2,4,5-TCP i TeCP w stężeniach przekraczających wartości dopuszczalne [64]. Prezentowane wyniki badań wskazują, że problem zanieczyszczenia środowiska chlorofenolami w Polsce jest poważny i wymaga opracowania skutecznych metod ich detoksykacji.

1. Ogólna charakterystyka i toksyczność chlorofenoli

Chlorofenole tworzą grupę 19 związków, z których każdy składa się z pierścienia benzenu podstawionego grupą hydroksylową oraz podstawnikami chlorowymi

w liczbie od 1 do 5. Związki te różnią się między sobą właściwościami fizykochemicznymi oraz toksycznością względem organizmów żywych. Posiadają różny kolor, zapach, ich temperatura topnienia waha się od $9,3^\circ\text{C}$ dla 2-chlorofenolu (2-CP) do 190°C dla PCP, natomiast temperatura wrzenia od 64°C dla 2,3,4,6-TeCP do 310°C dla PCP. Chlorofenole są raczej słabo rozpuszczalne w wodzie, a ich rozpuszczalność spada wraz ze wzrostem liczby podstawników chlorowych w pierścieniu aromatycznym. Wyznacznik kwasowości (pKa) tych związków mieści się w zakresie od 4,74 dla PCP do 8,85 dla 4-CP [22, 70] (Tab. I).

O toksyczności chlorofenoli decydują trzy elementy ich budowy: grupa hydroksylowa, podstawnik halogenowy oraz hydrofobowy pierścień aromatyczny. Obecność grupy hydroksylowej zmniejsza hydrofobowość związku z jednoczesnym wzrostem jego reaktywności. Silnie elektroujemny atom chloru przyciąga elektrony typu π z pierścienia benzenu, stabilizując jego strukturę. Powoduje to wzrost zarówno hydrofobowości, jak i kwasowości związku. Liczba oraz pozycja podstawników chlorowych wpływają na wartości pKa i współczynnika podziału danego związku w układzie oktanol-woda ($\log P$). Wraz ze wzrostem stopnia chlorowania fenolu maleje pKa, a $\log P$ – rośnie. Za najbardziej toksyczne uważa się związki, których wartość $\log P$ mieści się w przedziale od 1 do 5 [37, 66, 77]. Wartości $\log P$ dla chlorofenoli rosną wraz ze wzrostem stopnia uchlorowania fenolu i dla monochlorofenoli miesz-

Tabela I
Właściwości fizykochemiczne oraz toksyczność wybranych chlorofenoli

Właściwości związku	2-CP	4-CP	2,4-DCP	2,4,5-TCP	2,3,4,6-TeCP	PCP	Źródło
Masa molowa, g mol^{-1}	128,55	128,55	163,00	197,45	231,89	266,34	[22]
Gęstość (20°C), g ml^{-1}	1,26	1,22	1,38	1,68	1,83	1,99	[70]
Rozp. w H_2O (20°C), g l^{-1}	28,5	27,0	4,5	0,95	0,183	0,014	[22, 70]
Temp. topnienia, $^\circ\text{C}$	7	41–44	45	67	70	190	[70]
Temp. wrzenia, $^\circ\text{C}$	174	220	210	235	150	300	[22, 70]
Kwasowość, pKa	8,49	8,85	7,68	7,43	5,38	4,74	[70]
$\log P$	2,17	2,35	3,20	3,72	4,45	5,01	[70]
Badane mikroorganizmy	Toksyczność, EC_{50} (mg l^{-1})						
<i>Burkholderia</i> sp. RASC c2	28,3	23,1	11,1	1,2	–	–	[13]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	122,1	12,2	14,7	11,3	–	–	[13]
<i>P. putida</i> DOT-T1E	–	102,8	55,4	7,9	–	–	[20]
<i>Vibrio harveyi</i>	151,4	–	–	1,9	–	3,2	[76]
<i>V. fischeri</i>	158,5	–	–	4,5	–	1,2–3,9	[76]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	–	–	–	–	–	2,8–3,1	[95]
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	–	–	–	0,8–1,0	[95]
<i>Selenastrum capricornutum</i>	–	–	–	–	0,07	0,091	[85]
<i>Scenedesmus spinosus</i>	–	–	–	–	–	0,056	[85]
<i>Chlamydomonas</i> sp.	–	–	–	–	–	4,35	[85]

– brak danych

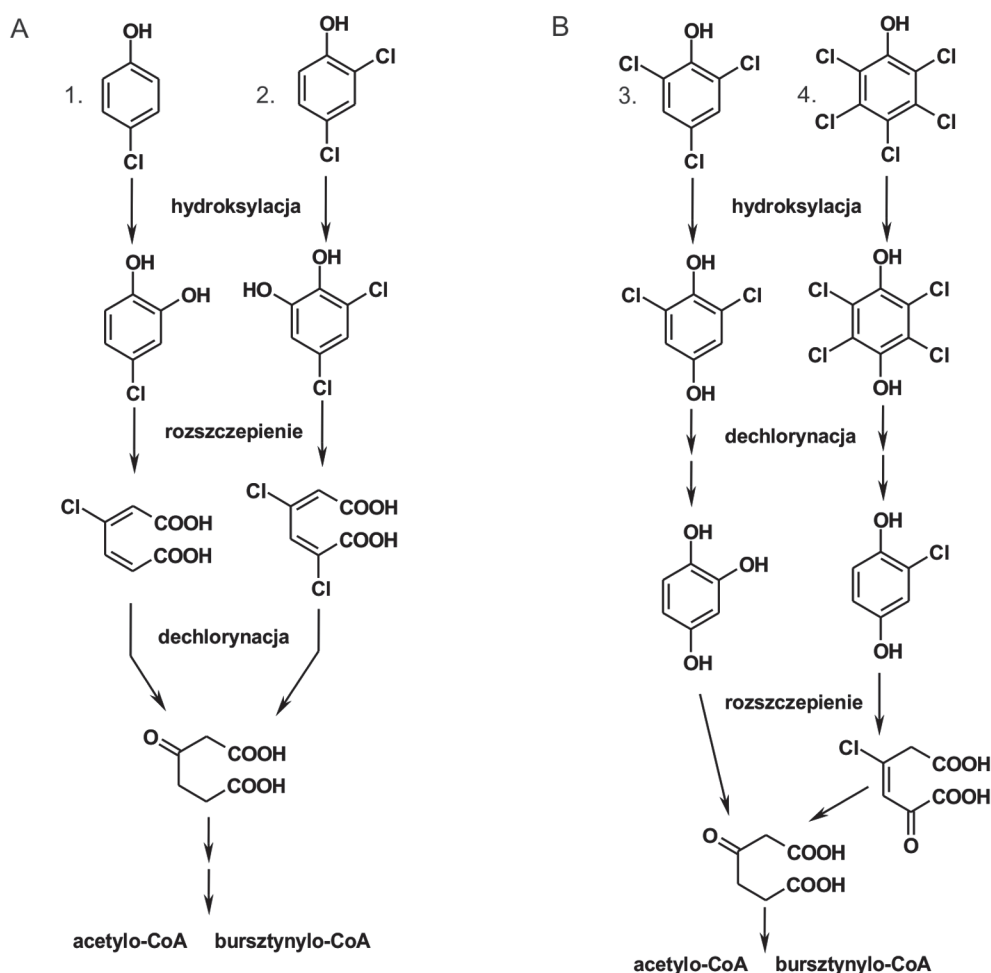
czą się w zakresie 2,17–2,50, a dla PCP wartość logP wynosi 5,01 (Tab. I). Wskazuje to na większą toksyczność związków wyżej chlorowanych w porównaniu do monochlorofenoli i fenolu [63, 70]. Badania zależności pozycji podstawników chlorowych w pierścieniu aromatycznym a stopniem toksyczności chlorofenoli wskazują, że izomery chlorofenoli podstawione atomami chloru w pozycjach 3 i 5 pierścienia aromatycznego są bardziej toksyczne niż izomery podstawione w pozycjach 2 i 6 [22, 82]. Ze względu na silne działanie toksyczne, niejednokrotnie rakotwórcze i teratogenne, chlorofenole w państwach Unii Europejskiej oraz w Stanach Zjednoczonych znalazły się na listach substancji niebezpiecznych i priorytetowych, których stosowanie powinno być stopniowo ograniczane, a obecność w środowisku stale monitorowana [21, 22, 43].

2. Mikrobiologiczny rozkład chlorofenoli w warunkach tlenowych

Toksyczność chlorofenoli oraz groźba skażenia nimi środowiska wymuszają konieczność opracowania skutecznych metod ich detoksykacji. Jednym ze sposobów

eliminacji tych związków jest mikrobiologiczna degradacja. Polega ona na mineralizacji chlorofenoli z jednoczesnym wydzielaniem chloru nieorganicznego. W zależności od stopnia uchlorowania chlorofenoli wyróżnia się dwie główne drogi ich przemian. Monochlorofenole w początkowym etapie degradacji utleniane są przez monoooksygenazy do chlorokatecholi, których pierścień aromatyczny ulega intradiolowemu lub ekstradiolowemu rozszczepieniu. Rozszczepienie intradiolowe (szlak *orto*) katalizuje 1,2-dioksygenaza katecholowa, a rozszczepienie ekstradiolowe (szlak *meta*) zachodzi z udziałem 2,3-dioksygenazy katecholowej [2, 9, 38]. Powstały w wyniku rozszczepienia pierścienia łańcuch alifatyczny ulega dalszym przemianom do intermediatów szlaków metabolizmu podstawowego komórki (Rys. 1A). Znanymi z literatury szczepami bakterii zdolnymi do degradacji mono- lub/i dichlorofenoli są na przykład *Alcaligenes* sp. OS2 [28], *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 [81], *Bacillus subtilis* OS1 [28], *Comamonas testosteroni* JH5 [42], *Pseudomonas putida* NCIM sp. 2650 [11], *Rhodococcus opacus* 1CP [48] i *Sphingomonas* sp. [35].

Polichlorofenole we wstępnym etapie rozkładu hydroksylowane są w pozycji *para*. W wyniku tej reakcji



Rys. 1. Mikrobiologiczny rozkład monochlorofenoli (A) oraz polichlorofenoli (B) w warunkach tlenowych [17, 100]

powstaje intermediat chinonowy, ulegający kolejnym etapom dechlorynacji. W zależności od rodzaju aktywnej 1,2-dioksygenazy w komórkach bakterii, rozszczepieniu ulegają pierścienie aromatyczne chlorotrihydroksybenzenów lub 2,6-dichloro-1,4-dihydroksybenzenu z jednoczesnym usunięciem atomu chloru [7, 17, 23]. Produktami rozszczepienia są maleilooctan lub chloromaleilooctan, metabolizowane następnie do 3-oksoadypinianu włączanego do cyklu Krebsa (Rys. 1B). Znanymi szczepami bakterii rozkładającymi polichlorofenole są: *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 [23], *Burkholderia cepacia* AC1100 [93], *Cupriavidus necator* JMP134 [83] i *Saccharomonospora viridis* [98].

Odrębną grupę drobnoustrojów zdolnych do rozkładu chlorofenoli stanowią grzyby białej zgnilizny. Wytwarzają one zewnątrzkomórkowe enzymy ligninolityczne, które dzięki niskiej specyficzności substratowej oraz silnym właściwościom utleniającym umożliwiają degradację wielu związków strukturalnie podobnych do ligninu, w tym chlorowanych fenoli. Enzymy te katalizują reakcje odszczepienia protonu od grupy hydroksylowej, co prowadzi do powstania rodników fenoksylowych, będących substratami dla reakcji nieenzymatycznych. Do najważniejszych enzymów ligninolitycznych należą: peroksydaza ligninowa, mangano-zależna peroksydaza i lakaza [61, 79] produkowane przez grzyby *Phanerochaete chrysosporium* [94], *Trametes versicolor* [25], *Penicillium camemberti* [91], czy *Cerrena unicolor* [34].

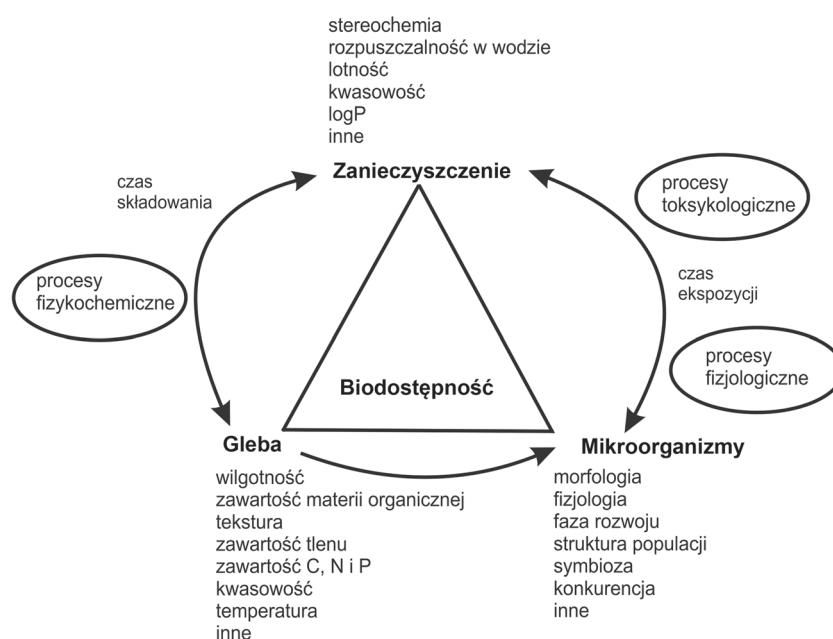
Mechanizmy degradacji chlorofenoli przez mikroorganizmy, enzymy uczestniczące w przemianach tych związków oraz kontrola genetyczna tych procesów są dobrze zbadane i opisane w literaturze [88, 90, 92, 100].

3. Rozkład chlorofenoli w glebie

Chlorofenole uwalniane do środowiska trudno podlegają biodegradacji i kumulują się w glebie. Do skażenia tymi związkami dochodzi najczęściej na terenach rolniczych, w okolicach zakładów przetwórstwa drewna, chemicznych i farmaceutycznych [22, 53, 64, 80]. Obecność chlorofenoli wpływa niekorzystnie na bioróżnorodność środowiska glebowego, dlatego istotne jest opracowanie metod skutecznego usuwania tych zanieczyszczeń. Na zakres i intensywność biodegradacji chlorofenoli w glebie wpływa szereg czynników abiotycznych i biotycznych. Do czynników abiotycznych należą: właściwości fizykochemiczne zanieczyszczeń i ich dostępność dla mikroorganizmów, zawartość i skład materii organicznej, odczyn pH, temperatura, wilgotność, tekstura gleby oraz dostępność tlenu. Do czynników biotycznych zalicza się natomiast skład i strukturę mikroflory gleby oraz wzajemne interakcje między mikroorganizmami, jak na przykład konkurencję o źródło węgla, czy symbiozę [4, 12, 14, 62].

Głównym czynnikiem abiotycznym decydującym o skuteczności usuwania chlorofenoli z gleby jest ich biodostępność dla zasiedlających glebę mikroorganizmów. Biodostępność związku definiowana jest jako stężenie zanieczyszczenia znajdującego się w stanie wolnym, które może zostać pobrane przez organizm lub zaadsorbowane na jego powierzchni w jednostce czasu. W środowisku glebowym o biodostępności zanieczyszczeń dla mikroorganizmów, w tym chlorofenoli, decydują procesy fizykochemiczne, fizjologiczne i toksykologiczne obserwowane jako interakcje zachodzące pomiędzy glebą, zanieczyszczeniem i drobnoustrojami [8, 31, 55, 87]. Na podstawie badań tych zależności wyróżniono trzy rodzaje biodostępności: chemiczną, biologiczną i toksykologiczną [57]. Biodostępność chemiczna determinowana jest przez fizykochemiczne właściwości zanieczyszczenia, takie jak: jego hydrofobowość, stereochemia, rozpuszczalność w wodzie, zdolność do adsorpcji/desorpcji na cząstkach stałych i kwasowość związku oraz właściwości gleby, jak: kationowa pojemność wymienna, pH, zawartość materii organicznej oraz iłów. O biodostępności biologicznej decydują właściwości mikroorganizmu, jak jego morfologia, w tym stosunek powierzchni komórki do objętości, struktura osłon komórkowych oraz faza rozwoju. Z kolei wewnątrzkomórkowe procesy, jak pobieranie i wydalanie, metabolizm, detoksykacja oraz magazynowanie substancji wpływają na biodostępność toksykologiczną. Dodatkowo na procesy te istotny wpływ ma czas zalegania zanieczyszczeń w glebie oraz czas ekspozycji mikroorganizmów na działanie zanieczyszczenia. Czynniki wpływające na biodostępność zanieczyszczeń w glebie oraz ich wzajemne interakcje przedstawia rys. 2. Losy chlorofenoli w glebie w zależności od tych czynników są różne. Mogą one ulegać degradacji, bioakumulacji, sekwestracji, ługowaniu lub parowaniu z gleby [57, 84].

Innym czynnikiem abiotycznym wpływającym na procesy degradacji chlorofenoli przez mikroorganizmy w glebie jest zawartość w niej wody. W glebach suchych sorpcja chlorofenoli do cząstek gleby jest silniejsza w porównaniu z glebami wilgotnymi, co ogranicza ich biodostępność dla mikroorganizmów glebowych [50]. Z badań Cho i wsp. [19] zależności szybkości degradacji 4-CP, 2,4,6-TCP oraz PCP przez rodzimą mikroflorę gleby wynika, że degradacja chlorofenoli zachodziła najszybciej ($12 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dzień}^{-1}$) w glebie o zawartości wody 10–15%, natomiast najwolniej w glebie o zawartości wody 25% ($5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dzień}^{-1}$). Niższy poziom wilgotności zapewniał swobodną dyfuzję tlenu atmosferycznego do przestrzeni między cząstkami gleby. Przy zawartości wody 25% gleba tworzyła agregaty, do wnętrza których dostęp tlenu był ograniczony. Wzrost wilgotności gleby do 30–40% powodował wzrost szybkości degradacji chlorofenoli do $8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dzień}^{-1}$, co mogło



Rys. 2. Czynniki wpływające na biodostępność zanieczyszczeń w glebie [31, zmodyfikowany]

być wynikiem wykorzystania przez mikroorganizmy tlenu rozpuszczonego w roztworze glebowym.

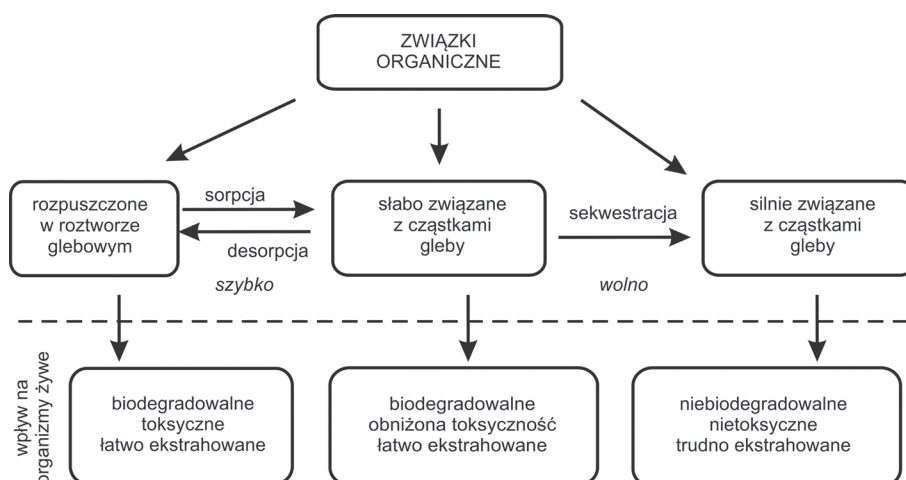
Biodostępność chlorofenoli w glebie zależy w dużej mierze od ich rozpuszczalności w wodzie. Większość drobnoustrojów pobiera związki rozpuszczone w fazie wodnej, a tylko nieliczne zdolne są do degradacji zanieczyszczeń zaadsorbowanych na powierzchni cząstek glebowych [67, 74]. Polaryzacja cząsteczek chlorofenoli, dzięki obecności grupy hydroksylowej, umożliwia ich rozdział do fazy organicznej i wodnej gleby. Jednocześnie rozdział ten zmienia się w zależności od wartości logP dla danego związku oraz zależy od liczby podstawników chlorowych w pierścieniu aromatycznym. Związki o logP w zakresie 3–4, do których należą di-, tri- i tetrachlorofenole, pobierane są głównie z fazy wodnej gleby, natomiast PCP, dla którego wartość logP jest wyższa (5,01) pobierany jest głównie z powierzchni cząstek stałych [22, 27, 39].

O biodostępności chlorofenoli w glebie decyduje także zawartość w niej materii organicznej. Związki o różnorodnych grupach funkcyjnych tworzące materię organiczną wiążą zanieczyszczenia poprzez słabe oddziaływania van der Waalsa, wiązania hydrofobowe i wodorowe lub silne wiązania kowalencyjne. Silne wiązanie zanieczyszczeń z materią organiczną ogranicza ich biodostępność [72, 75, 84]. Chlorofenole w zależności od liczby podstawników chlorowych wiążą się z cząstkami gleby na dwa sposoby. Monochlorofenole, podobnie jak fenol, biorą udział w reakcjach sprzężania utleniającego w obecności tlenków metali obecnych na powierzchni cząstek gleby, natomiast tri-, tetrachlorofenole i PCP ze względu na silnie hydrofobowy charakter i niską rozpuszczalność w wodzie wiążą

się z fazą stałą gleby oddziaływaniami hydrofobowymi [10]. Bezpośrednio z roztworu glebowego związki te są łatwo sorbowane na powierzchni cząstek gleby. Proces ten zachodzi szybko i jest odwracalny w odróżnieniu od sekwestracji, czyli powolnej dyfuzji i sorpcji zanieczyszczeń we wnętrzu porów lub cząstek gleby. Związane w ten sposób substancje stają się odporne na ekstrakcję i niedostępne dla mikroorganizmów. Sekwestracja związków jest tym silniejsza im zanieczyszczenia mają bardziej hydrofobowy charakter, dlatego procesowi temu silniej ulegają chlorofenole o większej liczbie podstawników chlorowych [1, 30, 71]. W wyniku dyfuzji zanieczyszczeń do wnętrza cząstek gleby dochodzi do ich związania głównie z fazą amorficzną materii organicznej [1, 67]. Różne sposoby wiązania związków organicznych z glebą ilustruje rys. 3.

Substancje zawarte w materii organicznej mogą stanowić źródło węgla i energii dla mikroorganizmów i wspomagać procesy rozkładu zanieczyszczeń [12, 65]. Pozytywną korelację pomiędzy zawartością materii organicznej a szybkością rozkładu PCP w glebie przez jej rodzimą mikroflorę wykazali Kuwatsuka i Igarashi [52]. Na podstawie badań degradacyjnych w 10 różnych rodzajach gleb o zawartości materii organicznej w zakresie od 0,04% do 7,87% stwierdzili, że PCP w stężeniu 0,1 mg g⁻¹ wprowadzony do gleby o zawartości materii organicznej 7,87% został całkowicie rozłożony po 50 dniach, podczas gdy w glebie o zawartości materii organicznej wynoszącej 0,04% w tym samym czasie nie stwierdzono jego ubytku.

O skuteczności biologicznego oczyszczania gleby z chlorofenoli decyduje także jej tekstura. Skład granulometryczny, czyli udział piasku, gliny i ilów w glebie



Rys. 3. Sposoby wiązania związków organicznych w glebie i jego biologiczne konsekwencje [67, zmodyfikowany]

determinuje wielkość porów, w których możliwe jest wiązanie zanieczyszczeń. Gleby piaszczyste charakteryzuje niska pojemność wodna oraz niewielka porowatość, dlatego zanieczyszczenia są z nich szybko wypłukiwane. Ograniczenie szybkości degradacji zanieczyszczeń w glebach piaszczystych na ogół nie jest związane z biodostępnością tych związków, ale z niewielką zawartością w nich materii organicznej i substancji odżywczych, które mogą stanowić dla mikroorganizmów dodatkowe źródła węgla i energii. Gleby gliniaste o wysokiej pojemności wodnej wykazują silne właściwości sorpcyjne, co ogranicza biodostępność zanieczyszczeń [56]. Z badań Cho i wsp. [19] wynika, że biodegradacja chlorofenoli w glebie gliniastej zachodziła wolniej niż w glebie piaszczystej z powodu silniejszej sorpcji zanieczyszczeń oraz ograniczonej dyfuzji tlenu do wnętrza agregatów gleby. Wielkość porów wpływa również na sekwestrację zanieczyszczeń. Przyjmuje się, że przemieszczanie związków chemicznych do wnętrza mikroporów gleby o średnicy mniejszej niż 20 nm powoduje zmniejszenie ich biodostępności, ponieważ uniemożliwia penetrację bakterii, grzybów, zwierząt oraz korzeni roślin do ich wnętrza [1].

Sorpcja związków organicznych do cząstek gleby jest uzależniona od stopnia zdysocjowania grup funkcyjnych, czyli pH środowiska. Sorpcja TeCP i PCP jest silniejsza od siły wiązania tri-, di- i monochlorofenoli, co wynika z większej hydrofobowości związków wyżej chlorowanych [78]. Odczyn środowiska ma również wpływ na aktywność mikroorganizmów. Biodegradacja chlorofenoli zachodzi najintensywniej w glebie o pH od 5,6 do 8,0 [56]. Potwierdzają to badania Cho i wsp. [19], którzy wykazali większy ubytek 4-CP, 2,4,6-TCP oraz PCP w glebie o pH 7,0 w porównaniu z glebami o pH 5,0 i 9,0. Fulthroe i Schofield [32] również stwierdzili większy ubytek PCP w glebie o pH 7,9 w porównaniu z glebą o pH 5,9. W glebach kwaśnych PCP w stężeniu $50 \mu\text{g g}^{-1}$ gleby w ciągu 60 dni uległ

degradacji w 15%, a w glebie o odczynie słabo zasadowym – w 40%.

Ważnym czynnikiem abiotycznym w rozkładzie zanieczyszczeń w glebie jest także temperatura, która wpływa na rozpuszczalność, lepkość, sorpcję i parowanie związków chemicznych oraz na aktywność mikroflory. Większość mikroorganizmów degraduje chlorofenole w zakresie temperatur od 24 do 37°C [19, 56], choć znane są również szczepy zdolne do rozkładu chlorowych pochodnych fenolu w niższych temperaturach. Przykładem jest *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, zdolny do degradacji 4-CP w stężeniu $180 \mu\text{g g}^{-1}$ gleby zarówno w temperaturze 28°C, jak i w 5°C. Szczepy zdolne do degradacji zanieczyszczeń w szerokim zakresie temperatur są szczególnie przydatne w oczyszczaniu terenów znajdujących się w pasie klimatu umiarkowanego, gdzie temperatura zmienia się w cyklu rocznym od temperatur ujemnych zimą, do ponad 30°C latem [3, 49].

Jednym z najistotniejszych czynników biotycznych, decydujących o eliminacji zanieczyszczeń z gleby jest skład i struktura zasiedlających ją zespołów mikroorganizmów. Poza bioróżnorodnością mikroorganizmów zaangażowanych w procesy degradacyjne, niezwykle ważne są również interakcje między nimi, stabilność i aktywność enzymatyczna komórek, ich biomasa oraz zdolność do chemotaksji. Niektóre związki aromatyczne, w tym chlorofenole, są szybciej rozkładane przez mikroorganizmy glebowe w obecności innych związków. Zjawisko to znane jest pod nazwą kometabolizmu [40].

Rozkład chlorofenoli w glebie zależy także od wcześniejszej ekspozycji mikroorganizmów na działanie tych związków. Wynika to z adaptacji bakterii do obecności toksycznych związków i zwiększenia ich udziału w zespołach mikroorganizmów zasiedlających skażone środowisko. Potwierdzają to badania Männistö i wsp. [60], którzy z gleby przez ponad 50 lat zanieczyszczanej środkami ochrony drewna wyizolowali 102 szczepy

bakterii, zdolne do wzrostu w obecności 2,3,4,6-TeCP i/lub PCP. Wśród nich były zarówno bakterie Gram-ujemne, głównie z grupy *Proteobacteria*, oraz bakterie Gram-dodatnie z grupy *Actinobacteria*. Dla porównania Caliz i wsp. [15] z gleby poddanej krótkotrwałej ekspozycji na działanie 2-CP, 2,4,6-TCP oraz PCP w zakresie stężeń od 0,1 mg do 5 g kg⁻¹ gleby wyizolowali 23 szczepy zdolne do rozkładu tych związków. Spośród nich największym potencjałem degradacyjnym i najlepszą przeżywalnością odznaczały się 4 szczepy, oznaczone na podstawie analizy fragmentów 16S rRNA do 3 gatunków: *Kocuria palustris*, *Lysobacter gummosus*, *Pseudomonas putida* i 1 rodzaju *Bacillus*.

O skuteczności rozkładu chlorofenoli w glebie decyduje również szereg interakcji pomiędzy mikroorganizmami, jak również między mikroorganizmami a organizmami eukariotycznymi występującymi w glebie, jak pierwotniaki, pierścienice, czy nicienie. Oddziaływania te mogą mieć charakter konkurencji o źródło węgla czy przestrzeń życiową, drapieżnictwa, symbiozy, komensalizmu i protokooperacji [26, 97].

4. Metody wspomagania rozkładu chlorofenoli w glebie

Jedną ze strategii umożliwiających likwidację niebezpiecznych zanieczyszczeń w skażonej glebie jest bioremediacja. Wykorzystuje ona naturalne zdolności mikroorganizmów do całkowitej degradacji konkretnych zanieczyszczeń lub ich transformacji w formy mniej szkodliwe. Intensyfikację rozkładu toksycznych związków uzyskuje się w procesach stymulacji czynnikami fizykochemicznymi lub biologicznymi. Z danych literaturowych wynika, że najczęściej stosowanymi technikami do zwiększania efektywności usuwania chlorofenoli z gleby są: biostymulacja, bioaugmentacja oraz użycie tzw. „aktywnej gleby”.

4.1. Biostymulacja

Wolne tempo procesów oczyszczania gleby z toksycznych zanieczyszczeń może być związane z pogorszeniem się warunków wzrostu mikroorganizmów, na przykład deficytem tlenowym, czy zmianą stosunku zawartości węgla do azotu. Biostymulacja, polegająca na dodaniu do gleby związków odżywczych w celu optymalizacji stosunku C:N:P i zwiększenia dostępności donorów/akceptorów elektronów, pozwala intensyfikować procesy degradacji zanieczyszczeń. Jako dodatkowe źródła azotu stosowane są mocznik, metylenomocznik lub azotan (V) amonu, a jako dodatkowe źródło fosforu wprowadzana jest mieszanina soli kwasu ortofosforowego (V). Związki dodawane są w takich stężeniach,

aby stosunek C:N:P wynosił 100:10:1 lub 100:5:1 [47, 62]. Zwiększenie dostępności tlenu zapewnia z kolei dodawanie do gleby na przykład trocin w stosunku 1:1 [47]. Oprócz regulacji stosunku C:N:P w glebie, biostymulacja może być również przeprowadzana z użyciem związków stanowiących donory lub akceptory elektronów. Stymulację beztlenowej biotransformacji PCP przez mikroflorę autochtoniczną po wprowadzeniu mleczanu i/lub antrachinono-2,6-disulfonianu do gleby bogatej w żelazo stwierdzili Chen i wsp. [18]. Mleczan służył jako donor elektronów, natomiast antrachinono-2,6-disulfonian stanowił ich przekaźnik, który umożliwiał sprzężanie redukcji tlenków żelaza z dechlorynacją PCP. Wykazano, że jednoczesne wprowadzenie do gleby tych związków zwiększyło tempo biotransformacji PCP. Dodatkowo na podstawie analizy polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (T-RFLP) w zespołach mikroorganizmów badanej gleby stwierdzono wzrost udziału bakterii redukujących żelazo oraz przeprowadzających dechlorynację związków organicznych, głównie z rodzaju *Clostridium*.

4.2. Bioaugmentacja

W miejscach skażonych związkami o strukturze aromatycznej, gdzie liczebność mikroorganizmów autochtonicznych degradujących określone zanieczyszczenia jest zbyt mała stosuje się bioaugmentację. Polega ona na wprowadzaniu do gleby wyselekcjonowanych szczepów mikroorganizmów zdolnych do degradacji konkretnych zanieczyszczeń. Stosowane w tym celu szczepy powinny charakteryzować się zdolnością do degradacji zanieczyszczeń w krótkim czasie, odpornością na zmiany środowiska (pH, czy siły jonowej), krótkim czasem życia, zdolnością do chemotaksji i adhezji do cząstek gleby [97]. Mikroorganizmy można wprowadzać do gleby w postaci pojedynczych, czystych szczepów lub konsorcjów złożonych z wielu ich gatunków. Przykłady mikroorganizmów użytych w bioaugmentacji terenów skażonych wybranymi chlorofenolami ilustruje Tabela II.

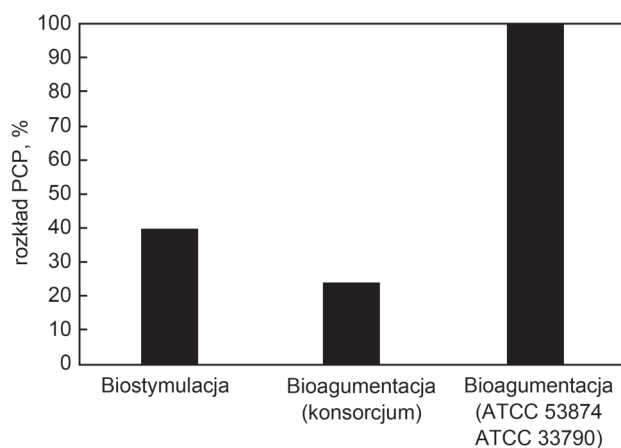
Pomyślnie zakończoną bioaugmentację gleby skażonej PCP w stężeniu 100 µg g⁻¹ gleby z użyciem szczepu *Sphingobium chlorophenolicum* przeprowadzili Dams i wsp. [24]. Wykazali, że w glebie bioaugmentowanej tymi bakteriami w ciągu 2 tygodni ubyło około 80% wprowadzonej dawki PCP, podczas gdy w glebie niebioaugmentowanej – około 40%. W innych badaniach Backman i Jansson [3] potwierdzili przydatność szczepu *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 w oczyszczaniu gleby skażonej 4-CP, w temperaturach 28°C i 5°C. Stwierdzili, że szczep ten rozkładał 4-CP w stężeniu 180 µg g⁻¹ w obu temperaturach w tym samym czasie, natomiast liczebność bakterii była większa w niższej temperaturze. Podobnie Briglia i wsp. [14] wykazali,

Tabela II
Mikroorganizmy użyte w bioaugmentacji gleb skażonych chlorofenolami

Mikroorganizmy	Chlorofenole	Lokalizacja	Źródło
<i>Pseudomonas putida</i>	2-CP	Tonara, Włochy	[54]
<i>Alcaligenes xylosooxidans</i>	2-CP	Tonara, Włochy	[54]
<i>A. faecalis</i>	2-CP	Tonara, Włochy	[54]
<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6L	4-CP	Uppsala, Szwecja	[46]
<i>A. chlorophenolicus</i> sp. nov.	4-CP	Ford Collins, USA	[99]
<i>Arthrobacter</i> sp.	4-CP	Uppsala, Szwecja	[45]
<i>Ralstonia eutrophica</i> TCP	2-CP, 3-CP, 4-CP	Cavenago, Włochy	[4]
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i> PCP-1	PCP	Suomusjärvi, Finlandia	[14]
<i>Flavobacterium</i> sp.	PCP	Suomusjärvi, Finlandia	[14]
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> ATCC 53874	PCP	Arecibo, Portoryko	[62]
<i>S. chlorophenolica</i> ATCC 33790	PCP	Arecibo, Portoryko	[62]
<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	PCP	Boyndie, Wielka Brytania	[24]

że w glebie inokulowanej szczepem *Rhodococcus chlorophenolicus* rozkład PCP przebiegał intensywniej niż w glebie kontrolnej.

Porównanie skuteczności oczyszczania gleby skażonej PCP metodami bioaugmentacji z wykorzystaniem konsorcjum bakterii Gram-ujemnych wyizolowanych z gleby z okolic kompleksu petrochemicznego w Puerto Rico, bioaugmentacji z użyciem szczepów *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 53874 i ATCC 33790 znanych ze zdolności do rozkładu PCP oraz biostymulacji przeprowadzili Massol-Deyá i wsp. [62]. Spośród tych metod najbardziej efektywna w usuwaniu PCP z gleby okazała się bioaugmentacja z użyciem obu szczepów *S. chlorophenolica*. W glebie tej całkowity rozkład PCP w stężeniu 250 mg kg⁻¹ gleby trwał 10 dni. Dla porównania w glebie inokulowanej konsorcjum bakterii ubytek PCP w tym czasie wynosił 24% wyjściowej dawki, a w glebie poddanej biostymulacji – 40% (Rys. 4).



Rys. 4. Porównanie efektywności usuwania PCP (250 mg kg⁻¹) z gleby poddanej bioaugmentacji z użyciem konsorcjum bakterii (A), z użyciem szczepów *Sphingomonas chlorophenolica* ATCC 53874 i ATCC 33790 (B) oraz biostymulacji (C) [62] (Objaśnienia w tekście)

Z licznych prac wynika, że wzrost przeżywalności bakterii po introdukcji do gleby można osiągnąć poprzez unieruchomienie komórek na powierzchni lub we wnętrzu odpowiedniego nośnika. Zabieg ten stosuje się, gdy liczebność inokulantów po wprowadzeniu do gleby drastycznie maleje i obniża się ich aktywność enzymatyczna. Ochronny wpływ włókien polikapramidu na wzrost i aktywność komórek *Streptomyces rochei* 303 stwierdzili Golovleva i wsp. [36] w badaniach ich zdolności do rozkładu 2,4,6-TCP. Bakterie unieruchomione w tym nośniku rozkładały 2,4,6-TCP w stężeniu 1000 mg l⁻¹, podczas gdy komórki wolne rozkładały 2,5-krotnie niższe stężenie tego związku. W innych badaniach Balfanz i Rehm [5] wykazali, że immobilizowany szczep *Alcaligenes* sp. A 7-2 w granulacie z gliny i wprowadzony do przepływowego bioreaktora wypełnionego piaszczystą glebą skażoną 4-CP w stężeniu 40 mg l⁻¹ degradował 6 dawek 4-CP w ciągu 36 godzin, podczas gdy komórki wolne rozkładały w podobnym czasie 3 dawki tego związku.

Do śledzenia losów bakterii introdukowanych do skażonej gleby wykorzystuje się często geny markerowe, na przykład geny białka zielonej fluorescencji (*gfp*) czy geny lucyferazy (*luc*). Elväng i wsp. [29] monitorowali w ten sposób liczebność dwóch mutantów *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 z wprowadzonymi genami odpowiednio *gfp* i *luc* w glebie skażonej 4-CP w stężeniu 175 µg g⁻¹ gleby. Stwierdzili, że oba mutanty były zdolne do rozkładu tej dawki 4-CP w ciągu 8–10 dni oraz że liczba bakterii z genem *gfp* była większa zarówno od liczby bakterii z genem *luc* jak i od liczby komórek oznaczonych tradycyjną metodą płytkową. Na tej podstawie stwierdzili, że spadek fluorescencji próby oraz spadek liczby kolonii na płytkach z agarem odżywczym były wynikiem mniejszej aktywności metabolicznej mikroorganizmów, a nie ich liczebności.

4.3. „Aktywna gleba”

Inną skuteczną metodą zwiększania efektywności usuwania chlorofenoli z gleby jest mieszanie skażonej gleby z tak zwaną „aktywną glebą”, zawierającą mikroorganizmy eksponowane przez długi okres czasu na działanie określonego typu zanieczyszczeń. Potwierdzają to wyniki Barbeau i wsp. [6], którzy w badaniach wykorzystali dwie gleby, pochodzące ze składowiska odpadów i z tartaku w Kanadzie. Mikroflora gleby ze składowiska odpadów była zdolna do degradacji PCP w zakresie stężeń od 50 do 300 mg l⁻¹, natomiast mikroflora gleby z tartaku nie rozkładała tego związku. Po zmieszaniu obu gleb osiągnięto prawie 100% eliminację PCP o wyjściowym stężeniu 400 mg kg⁻¹ w ciągu 130 dni. Podobnie Otte i wsp. [73] po zmieszaniu zawiesiny glebowej zawierającej mikroorganizmy zdolne do rozkładu PCP w stężeniu 700 mg l⁻¹ w ciągu doby z glebą skażoną PCP w stężeniu 50 mg kg⁻¹ gleby stwierdzili rozkład tego związku w 50% w ciągu 36 godzin, podczas gdy w glebie kontrolnej rozkład PCP nie zachodził.

5. Podsumowanie

Zanieczyszczenie gleby chlorofenolami stanowi poważny problem ekologiczny, wymagający nie tylko monitorowania ich losów w środowisku, ale również opracowania skutecznych metod ich detoksykacji. Jednym z przyjaznych środowisku rozwiązań jest ich rozkład mikrobiologiczny, a dobrymi praktykami w zwiększaniu tempa ich degradacji czy biotransformacji wydają się być różne techniki bioremediacji, jak bioaugmentacja, biostymulacja i stosowanie „aktywnej gleby”. Kluczowe znaczenie w intensyfikacji procesów usuwania chlorofenoli z gleby ma dokładne poznanie mechanizmów regulujących aktywność degradacyjną mikroorganizmów poprzez ocenę wpływu czynników środowiskowych na te procesy i zbadanie wzajemnych interakcji między mikroorganizmami w zależności od rodzaju skażenia czy wprowadzonych inokulantów. Znajomość takich zagadnień jest niezbędna do opracowania procedur oceny ryzyka ekologicznego, które powinny być uwzględnione w przepisach prawnych dotyczących ochrony gleb, a których nadal brak w regulacjach Unii Europejskiej.

Podziękowania

Artykuł powstał w ramach projektu badawczego ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (nr N N305 061640).

Piśmiennictwo

- Alexander M.: How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* **29**, 2713–2717 (1995)
- Arora P.K., Bae H.: Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb. Cell Fact.* **13**, 31 (2014)
- Backman A., Jansson J.K.: Degradation of 4-chlorophenol at low temperature and during extreme temperature fluctuations by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Microb. Ecol.* **48**, 246–253 (2004)
- Baggi G., Cavalca L., Francia P., Zangrossi M.: Chlorophenol removal from soil suspensions: effects of a specialized microbial inoculum and a degradable analogue. *Biodegradation*, **15**, 153–160 (2004)
- Balfanz J., Rehm H.J.: Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7–2 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 662–668 (1991)
- Barbeau C., Deschênes L., Karamanev D., Comeau Y., Samson R.: Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 745–752 (1997)
- Belchik S.M., Xun L.: Functions of flavin reductase and quinone reductase in 2,4,6-trichlorophenol degradation by *Cupriavidus necator* JMP134. *J. Bacteriol.* **190**, 1615–1619 (2008)
- Belfroid A.C., Sijm D.T.H.M., van Gestel C.A.M.: Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environ. Rev.* **4**, 276–299 (1996)
- Bestetti G., Galli E., Leoni B., Pelizzoni F., Sello G.: Regioselective hydroxylation of chlorobenzene and chlorophenols by a *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 260–263 (1992)
- Bhandari A., Novak J.T., Burgos W.D., Berry D.F.: Irreversible binding of chlorophenols to soil and its impact on bioavailability. *J. Environ. Eng.* **123**, 506–516 (1997)
- Bhatkal A., Punage S., Deshannavar U.B.: Biodegradation of 4-chlorophenol by *Pseudomonas putida* NCIM sp. 2650 under aerobic conditions. *Res. J. Environ. Sci.* **6**, 238–244 (2012)
- Boopathy R.: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.* **74**, 63–67 (2000)
- Boyd E., Killham K., Meharga A.: Toxicity of mono-, di- and trichlorophenols to *lux* marked terrestrial bacteria *Burkholderia* sp. RASC c2 and *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol. Lett.* **43**, 157–166 (2001)
- Briglia M., Briglia E.L., Nurmiäho-Lassila G., Vallini G., Salkinoja-Salonen M.: The survival of the pentachlorophenol-degrading *Rhodococcus chlorophenolicus* PCP-1 and *Flavobacterium* sp. in natural soil. *Biodegradation*, **1**, 273–281 (1990)
- Caliz J., Vil X., Martí E., Sierra J., Nordgren J., Lindgren P.E., Bañeras L., Montserrat G.: The microbiota of an unpolluted calcareous soil faces up chlorophenols: Evidences of resistant strains with potential for bioremediation. *Chemosphere*, **83**, 104–116 (2011)
- Čerňáková M., Zemanovičová A.: Microbial activity of soil contaminated with chlorinated phenol derivatives. *Folia Microbiol.* **43**, 411–416 (1998)
- Chaudhry G.R., Chapalamadugu S.: Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**, 59–79 (1991)
- Chen M., Shih K., Hu M., Li C., Wu W., Tong H.: Biostimulation of indigenous microbial communities for anaerobic transformation of pentachlorophenol in paddy soils of Southern China. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 2967–2975 (2012)
- Cho Y.G., Rhee S.K., Lee S.T.: Influence of environmental parameters on bioremediation of chlorophenol-contaminated soil by indigenous microorganisms. *Environ. Eng. Res.* **5**, 165–173 (2000)
- Chrzanowski Ł., Wick L.Y., Meulenkamp R., Kaestner M., Heipieper H.J.: Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Letts. Appl. Microbiol.* **48**, 756–762 (2009)

21. Cooper G.S., Jones S.: Pentachlorophenol and cancer risk: focusing the lens on specific chlorophenols and contaminants. *Environ. Health Perspect.* **116**, 1001–1008 (2008)
22. Czaplicka M.: Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Sci. Total Environ.* **322**, 21–39 (2004)
23. Dai M.H., Copley S.D.: Genome shuffling improves degradation of the anthropogenic pesticide pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2391–2397 (2004)
24. Dams R.I., Paton G., Killham K.: Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic systems. *Int. Biodegr. Biodegr.* **60**, 171–177 (2007)
25. Dodor D.E., Hwang H.M., Ekunwe S.I.N.: Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 210–217 (2004)
26. Dong Y.H., Xu J.L., Li X.Z., Zhang L.H.: AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *PNAS*, **97**, 3526–3531 (2000)
27. Ekelund R., Granmo A., Berggren M., Renberg L., Wahlberg C.: Influence of suspended solids on bioavailability of hexachlorobenzene and lindane to the deposit-feeding marine bivalve, *Abra nitida* (Müller). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 500–508 (1987)
28. El-Sayed W.S., Ismaeil M., El-Beih F.: Isolation of 4-chlorophenol-degrading bacteria, *Bacillus subtilis* OS1 and *Alcaligenes* sp. OS2 from petroleum oil-contaminated soil and characterization of its catabolic pathway. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **3**, 776–783 (2009)
29. Elväng A.M., Westerberg K., Jernberg C., Jansson J.K.: Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 cells during degradation of 4-chlorophenol in soil. *Environ. Microbiol.* **3**, 32–42 (2001)
30. Farrel J., Reinhard M.: Desorption of halogenated organics from model solids, sediments and soil under unsaturated conditions. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 53–62 (1994)
31. Frische T., Mebes K.H., Filser J.: Assessing the bioavailability of contaminants in soils: a review on recent concepts, Research Report 201 64 214 UBA-FB 000405, red. C. Hufenbach, Federal Environmental Agency, Berlin, 2003
32. Fulthorpe R.R., Schofield L.N.: A comparison of the ability of forest and agricultural soils to mineralize chlorinated aromatic compounds. *Biodegradation*, **10**, 235–244 (1999)
33. Ge F., Zhu L., Chen H.: Effect of pH on the chlorination process of phenols in drinking water. *J. Hazard Mater. B*, **133**, 99–105 (2006)
34. Gianfreda L., Sannino F., Filazzola M.T., Leonowicz A.: Catalytic behavior and detoxifying ability of laccase from the fungal strain *Cerrena unicolor*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **4**, 13–23 (1998)
35. Godoy F., Vancanneyt M., Martinez M., Steinbüchel A., Swing J., Rehm B.H.A.: *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 473–477 (2003)
36. Golovleva L.A., Zaborina O.E., Arinbasarova A.Y.: Degradation of 2,4,6-TCP and mixture of isomeric chlorophenols by immobilized *Streptomyces rochei* 303. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 815–819 (1993)
37. Greń I., Guzik U., Wojcieszynska D., Łabużek S.: Molekularne podstawy rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych. *Biotechnologia*, **2**, 58–67 (2008)
38. Haddock J.D.: Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons: enzyme structures and catalytic mechanisms (w) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, red. K.N. Timmis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, s. 1057–1069
39. Harms H., Wick L.Y., Smith K.E.C.: Matrix-hydrophobic compound interactions (w) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, red. K.N. Timmis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, s. 1467–1478
40. Hazen T.C.: Cometabolic bioremediation (w) Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology, red. K.N. Timmis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2010, s. 2505–2514
41. Hoekstra E.J., Weerd H., de Leer E.W.B., Brinkman U.A.T.: Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in soil of a douglas fir forest. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2543–2549 (1999)
42. Hollender J., Hopp J., Dott W.: Degradation of 4-chlorophenol via the meta cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4567–4572 (1997)
43. Igbinosa E.O., Odjajare E.E., Chigor V.N., Igbinosa I.H., Emoghene A.O., Ekhaie F.O., Igiehon N.O., Idemudia O.G.: Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: the public health perspective. *Scientific World J.* **2013**, ID 460215, 11 stron (2013)
44. Ivanciuc T., Ivanciuc O., Klein D.J.: Prediction of environmental properties for chlorophenols with poset quantitative super-structure/property relationships (QSSPR). *Int. J. Mol. Sci.* **7**, 358–374 (2006)
45. Jansson J.K., Björklöf K., Elvang A.M., Jørgensen K.S.: Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. *Environ. Pollut.* **107**, 217–223 (2000)
46. Jernberg C., Jansson J.K.: Impact of 4-chlorophenol contamination and/or inoculation with the 4-chlorophenol-degrading strain, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L, on bacterial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42**, 387–397 (2002)
47. Kauppi S., Sinkkonen A., Romantschuk M.: Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation. *Int. Biodegr. Biodegr.* **65**, 359–368 (2011)
48. Kolomytseva M.P., Solyanikova I.P., Golovlev E.L., Golovleva L.A.: Heterogeneity of *Rhodococcus opacus* 1CP as a response to stress induced by chlorophenols. *Appl. Biochem. Microbiol.* **41**, 474–479 (2005)
49. Kossowska-Cezak U.: Changes of the thermic seasons on Warsaw in the period 1933–2004. *Miscellanea Geographica*, **12**, 87–94 (2006)
50. Kottler B.D., White J.C., Kelsey J.W.: Influence of soil moisture on the sequestration of organic compounds in soil. *Chemosphere*, **42**, 893–898 (2001)
51. Kurata Y., Watanabe Y., Ono Y., Kawamura K.: Concentrations of organic wood preservatives in wood chips produced from wood wastes. *J. Mater. Cycles Waste Manage.* **7**, 38–47 (2005)
52. Kuwatsuka S., Igarashi M.: Degradation of PCP in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.* **21**, 405–414 (1975)
53. Laganà A., Bacaloni A., de Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A.: Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters. *Anal. Chim. Acta*, **462**, 187–198 (2002)
54. Lallai A., Mura G.: Biodegradation of 2-chlorophenol in forest soil: effect of inoculation with aerobic sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 325–330 (2004)
55. Leadbetter J.R., Greenberg E.P.: Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* **182**, 6921–6926 (2000)
56. Leung K.T., Nandakumar K., Sreekumari K., Lee H., Trevors J.T.: A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil. (w) Modern soil microbiology, red. J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington Marcel Dekker, Inc., Nowy Jork, 1997, s. 577–605

57. Loibner A., Jensen J., Ter Laak T., Celis R., Hartnik T.: Sorption and ageing of soil contamination (w) Ecological risk assessment of contaminated land. Decision support for site specific investigations. red. J. Jensen, M. Mesman, RIVM report number 711701047, Dania, 2006, s. 19–29
58. Lyytikäinen M., Sormunen A., Peraniemi S., Kukkonen J.V.K.: Environmental fate and bioavailability of wood preservatives in freshwater sediments near an old sawmill site. *Chemosphere*, **44**, 341–350 (2001)
59. Männistö M.K., Salkinoja-Salonen M.S., Puhakka J.A.: *In situ* polychlorophenol bioremediation potential of the indigenous bacterial community of boreal groundwater. *Wat. Res.* **35**, 2496–2504 (2000)
60. Männistö M.K., Tiirola M.A., Puhakka J.A.: Degradation of 2,3,4,6-tetrachlorophenol at low temperature and low dioxygen concentrations by phylogenetically different groundwater and bioreactor bacteria. *Biodegradation*, **12**, 291–301 (2001)
61. Marchut-Mikołajczuk O., Kwapisz E., Antczak T.: Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków. *Inż. Ochr. Środ.* **16**, 39–55 (2013)
62. Massol-Deyá A., Muniz R., Colon M., Graulau J., Tang N.S.: Microbial community structure in pentachlorophenol contaminated soils as determined by carbon utilization profiles. *Carrib. J. Sci.* **41**, 138–146 (2004)
63. Michałowicz J., Duda W.: Phenols transformations in the environment and living organisms. *Curr. Top. Biophys.* **30**, 24–36 (2007)
64. Michałowicz J., Ożadowicz R., Duda W.: Analysis of chlorophenols, chlorocatechols, chlorinated methoxyphenols and monoterpenes in communal sewage of Łódź and in the Ner River in 1999–2000. *Water, Air Soil Pol.* **164**, 205–222 (2005)
65. Mroziak A., Cycoń M., Piotrowska-Seget Z.: Changes of FAME profiles as a marker of phenol degradation in different soils inoculated with *Pseudomonas* sp. CF600. *Int. Biodeter. Biodegr.* **64**, 86–96 (2010)
66. Mroziak A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S.: Kwasy tłuszczowe błon komórkowych bakterii jako wskaźniki toksyczności związków aromatycznych. *Post. Mikrobiol.* **41**, 185–197 (2002)
67. Nam K., Kim J.Y.: Persistence and bioavailability of hydrophobic organic compounds in the environment. *Geosci. J.* **6**, 13–21 (2002)
68. Nicholls C., Karim K., Piletsky S., Saini S., Setford S.: Displacement imprinted polymer receptor analysis (DIPRA) for chlorophenolic contaminants in drinking water and packaging materials. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1171–1177 (2006)
69. Niedan V., Pavasars I., Öberg G.: Chloroperoxidase-mediated chlorination of aromatic groups in fulvic acid. *Chemosphere*, **41**, 779–785 (2000)
70. Olaniran A.O., Igbinsola E.O.: Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: properties, distribution and microbial degradation processes. *Chemosphere*, **83**, 1297–1306 (2011)
71. Oleszczuk P.: Biodostępność i bioakumulacja hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych. Część I. Informacje ogólne. *Biotechnologia*, **76**, 9–25 (2007)
72. Oleszczuk P.: Biodostępność i bioakumulacja hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych. Część II. Sorpcja zanieczyszczeń oraz czynniki wpływające na ten proces. *Biotechnologia*, **76**, 26–39 (2007)
73. Otte M.P., Gagnon J., Comeau Y., Matte N., Greer C.W., Samson R.: Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 926–932 (1994)
74. Park J.H., Zhao X., Voice T.C.: Development of a kinetic basis for bioavailability of sorbed naphthalene in soil slurries. *Wat. Res.* **36**, 1620–1628 (2002)
75. Pastuszko A.: Substancja organiczna w glebach. *Ochr. Środ. Zas. Nat.* **30**, 83–98 (2007)
76. Peinado M.T., Mariscal A., Carnero-Varo M., Fernandez-Crehuet J.: Correlation of two bioluminescence and one fluorogenic bioassay for the detection of toxic chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **53**, 170–177 (2002)
77. Penttinen O.P.: Chlorophenols in aquatic environments: structure-activity correlations. *Ann. Zool. Fennici.* **32**, 287–294 (1995)
78. Peuravuori J., Paaso N., Pihlaja K.: Sorption behaviour of some chlorophenols in lake aquatic humic matter. *Talanta*, **56**, 523–538 (2002)
79. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A.: Reakcje katalizowane przez lakazę – mechanizm i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia*, **4**, 82–94 (2007)
80. Roy M., Chakrabarti S.K., Bharadwaj N.K., Chandra S., Kumar S., Singh S., Bajpai P.K., Jauhari M.B.: Characterization of chlorinated organic material in Eucalyptus pulp bleaching effluents. *J. Sci. Ind. Res.* **63**, 527–535 (2004)
81. Sahoo N.K., Pakshirajan K., Ghosh P.K., Ghosh A.: Biodegradation of 4-chlorophenol by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6: effect of culture conditions and degradation kinetics. *Biodegradation*, **22**, 275–286 (2011)
82. Saito H., Sudo M., Shigeoka T., Yamauchi F.: *In vitro* cytotoxicity of chlorophenols to goldfish GF-scale (GSF) cells and quantitative structure-activity relationships. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 235–241 (1991)
83. Sánchez M.A., González B.: Genetic characterization of 2,4,6-trichlorophenol degradation in *Cupriavidus necator* JMP134. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2769–2776 (2007)
84. Semple K.T., Morriss A.W.J., Paton G.I.: Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 809–818 (2003)
85. Silva J., Iannaccone J., Cifuentes A., Troncoso L., Bay-Schmith E., Larrain A.: Assessment of sensitivity to pentachlorophenol (PCP) in 18 aquatic species, using acute and chronic ecotoxicity bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Rest.* **4**, 10–17 (2001)
86. Sinkkonen A., Kauppi S., Simpanen S., Rantalainen A.L., Strommer R., Romantschuk M.: Layer of organic pine forest soil on top of chlorophenol-contaminated mineral soil enhances contaminant degradation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 1737–1745 (2013)
87. Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B.: Biodostępność trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) w glebach. *Studia i Raporty IUNG-PIB*, **35**, 137–153 (2013)
88. Solyanikova I.P., Golovleva L.A.: Bacterial degradation of chlorophenols: pathways, biochemical and genetic aspects. *J. Environ. Sci. Health Part B*, **39**, 333–351 (2004)
89. Stepanova L.I., Lindstrom-Seppa P., Hanninen O.O.P., Kotelevtsev S.V., Glaser V.M., Novikov C.N., Beim A.M.: Lake Baikal: biomonitoring of pulp and paper mill waste water. *Aquat. Ecosyst. Health*, **3**, 259–269 (2000)
90. Szewczyk R., Długoński J.: Mikrobiologiczny rozkład pentachlorofenolu. *Biotechnologia*, **1**, 121–134 (2007)
91. Taseli B.K., Gockay C.F.: Degradation of chlorinated compounds by *Penicillium camemberti* in batch and up-flow column reactors. *Process Biochem.* **40**, 917–923 (2005)
92. Torii H., Machida A., Hara H., Hatta T., Takizawa N.: The regulatory mechanism of 2,4,6-trichlorophenol catabolic operon expression by HadR in *Ralstonia pickettii* DTP0602. *Microbiology* **159**, 665–677 (2013)
93. Travkin V.M., Solyanikova I.P., Golovleva L.A.: Hydroxyquinol pathway for microbial degradation of halogenated aromatic compounds. *J. Environ. Sci. Health B*, **41**, 1361–1382 (2006)
94. Tuor U., Wariishi H., Schoemaker H.E., Gold M.H.: Oxidation of phenolic arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds

- by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. *Biochem.* **31**, 4986–4995 (1992)
95. van Beelen P., Fleuren-Kemilä A.K.: Influence of pH on the toxic effects of zinc, cadmium and pentachlorophenol on pure cultures of soil microorganisms. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 146–153 (1997)
96. Veenagayathri K., Vasudevan N.: Degradation of 4-chlorophenol by a moderately halophilic bacterial consortium under saline conditions. *Brazil. Microbiol. Res. J.* **3**, 513–524 (2013)
97. Vogel T.M.: Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 311–316 (1996)
98. Webb M.D., Ewbank G., Perkins J., McCarthy A.J.: Metabolism of pentachlorophenol by *Saccharomonospora viridis* strains isolated from mushroom compost. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 1903–1914 (2001)
99. Westerberg K., Elväng A.M., Stackebrandt E., Jansson J.K.: *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2083–2092 (2000)
100. Wojcieszynska D., Guzik U., Greń I., Perkosz M., Hupert-Kocurek K.: Induction of aromatic ring cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 805–811 (2011)