

Alicja Wysocka<sup>1</sup>, Agata Olszyna<sup>1</sup>, Iga Komorowska<sup>1</sup>, Magdalena Popowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w styczniu 2017 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka nitrozwiązków aromatycznych. 2.1. Właściwości chemiczne i synteza nitroarenów. 2.2. Syntetyczne nitrozwiązki aromatyczne. 3. Nitrozwiązki aromatyczne w środowisku. 4. Zagrożenia związane z nitrozwiązkami aromatycznymi. 5. Biodegradacja nitrozwiązków aromatycznych. 5.1. Mikrobiologiczna degradacja związków aromatycznych. 5.1.1. Degradacja tlenowa (aerobowa). 5.1.2. Redukcyjny rozkład nitroarenów. 5.1.2.1. Rozkład beztlenowy (anaerobowy). 5.1.3 Degradacja nitrobenzenu – przykład alternatywnych ścieżek rozkładu. 6. Bioremediacja. 6.1 Bioremediacja związków nitroaromatycznych – przykłady realizacji. 6.1.1. Bioremediacja inżynierska *in situ*. 6.1.2. Bioremediacja inżynierska *ex situ*. 6.2. Ograniczenia procesu bioremediacji i strategię ich przewyższania. 7. Podsumowanie

#### Nitroaromatic compounds – characteristics and methods of biodegradation

**Abstract:** Nitroaromatic compounds are present in the environment mainly as industry products. They pose a serious risk to our health (often exhibiting strong mutagenic and carcinogenic effect) as well as to the environment. Most of the nitroaromatic compounds are stable due to considerable resistance to degradation and they persist in the environment for a long time. In this review, we present the current state of knowledge concerning biodegradation of nitroaromatic compounds. In the first part, general information regarding their properties, synthesis and sources as well as pathways of microbial aerobic or anaerobic degradation are described. In some cases microorganisms have evolved several pathways of degradation specific nitrocompound, for instance nitrobenzene, which we describe in detail. The second part of the publication focuses on environmental bioremediation of nitrocompounds.

1. Introduction. 2.2. Characteristics of aromatic nitrocompounds. 2.1. Chemical properties and synthesis nitroarenes. 2.2. Synthetic aromatic nitrocompounds. 3. The aromatic nitrocompounds in the environment. 4. Risks related to aromatic nitrocompounds. 5. Biodegradation of aromatic nitrocompounds. 5.1. Microbial degradation of aromatic compounds. 5.1.1. Aerobic degradation. 5.1.2. Reductive degradation nitroarenes. 5.1.2.1. Anaerobic digestion. 5.1.3 Degradation of nitrobenzene – an example of alternative distribution pathway. 6. Bioremediation. 6.1. Bioremediation of aromatic nitro compounds – examples of implementation. 6.1.1. Bioremediation engineering *in situ*. 6.1.2. Bioremediation engineering *ex situ*. 6.2. Limitations of the bioremediation process and strategies to overcome them. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** nitrozwiązki aromatyczne, środowisko naturalne, mikroorganizmy, biodegradacja, bioremediacja

**Key words:** aromatic nitrocompounds, the natural environment, microorganisms, biodegradation, bioremediation

## 1. Wprowadzenie

Występowanie związków nitroaromatycznych (nitroarenów) w środowisku jest w znacznej mierze konsekwencją działalności człowieka. Powstają one w wyniku niepełnego spalania paliw kopalnych oraz reakcji nitrowania. Stanowią ważną klasę chemikaliów przemysłowych, są powszechnie stosowane w produkcji m.in. barwników, polimerów, środków ochrony roślin, farmaceutyków, materiałów wybuchowych i innych [18]. Związkom tym nadano 3. stopień ryzyka, najwyższy stopień zagrożenia i toksyczności [87]. Wykazano, że większość z nich wykazuje właściwości mutagenne i kancerogenne dla człowieka oraz stanowi poważne zagrożenie dla środowiska [97]. Niestety, szerokie spektrum zastosowań nitroarenów w połączeniu z odpornością na degradację doprowadziły do ich akumulacji w środowisku naturalnym prowadząc do skażeniem gleby, wód gruntowych oraz atmosfery [60].

Wykorzystanie zdolności żywych organizmów do asymilacji i rozkładu ksenobiotyków, w tym nitroare-

nów, jest obecnie najbardziej skuteczną i ekonomicznie opłacalną metodą usuwania tych zanieczyszczeń ze środowiska. Mikroorganizmy (zwłaszcza bakterie) odgrywają w tym procesie decydującą rolę [86]. Bakterie z zanieczyszczonych środowisk szybko adoptują się do obecności chemikaliów poprzez modyfikację już istniejących bądź wykształcenie nowych dróg ich metabolizmu.

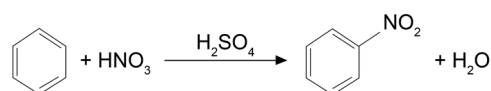
W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę związków nitroaromatycznych, dokonano przeglądu technik bioremediacyjnych wykorzystywanych do oczyszczenia wód i gruntów nimi skażonych oraz przedstawiono przykłady ich wykorzystania.

## 2. Charakterystyka nitrozwiązków aromatycznych

### 2.1. Właściwości chemiczne i synteza nitroarenów

Związki nitroaromatyczne posiadają co najmniej jedną grupę nitrową (-NO<sub>2</sub>) dołączoną do pierścienia aromatycznego. W zdecydowanej większości są to

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: magdapop@biol.uw.edu.pl



Rys. 1. Reakcja nitrowania benzenu z wykorzystaniem mieszaniny nitrującej

związki otrzymywane syntetycznie, chociaż zidentyfikowano kilka produktów biologicznych, które można zaliczyć do grupy nitroarenów [46].

Nitrowanie jest głównym typem reakcji wykorzystywanym w przemysłowej syntezie tych związków. Polega ono na wprowadzeniu grupy nitrowej do pierścienia aromatycznego. W tym celu używana jest mieszanina nitrująca, w skład której wchodzi dwa kwasy – azotowy oraz siarkowy. W ich obecności dochodzi do wytworzenia kationu nitroniowego ( $+\text{NO}_2$ ) o silnych właściwościach elektrofilowych. Ulega on substytucji elektrofilowej do pierścienia aromatycznego [59]. Przebieg reakcji przedstawiono na przykładzie nitrowania benzenu (rys. 1).

Reakcji nitrowania na skalę przemysłową poddawane są m.in. benzen, chlorobenzen, anilina, fenol, toluen, naftalen. W zależności od warunków prowadzenia procesu można otrzymać mono-, di- oraz polinitropochodne arenów, gdzie grupa nitrowa znajduje się w pozycji *orto*, *meta* lub *para* [42].

## 2.2. Syntetyczne nitrozwiązki aromatyczne

Właściwości chemiczne grupy nitrowej sprawiły, że związki nitroaromatyczne wykorzystywano do produkcji wysokoenergetycznych **materiałów wybuchowych** (1,3,5-trinitrofenol, 2,4,6-trinitrotoluen). Wykorzystywane są również do produkcji szerokiej gamy **pestycydów** (insektycydów, herbicydów, fungicydów itp.). Ponadto, wiele **leków** wywodzi się od nitrozwiązków aromatycznych. Przykładowo, paracetamol sprzedawany bez recepty jako środek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy, produkowany jest na drodze jednostopniowej redukcji acetamidacji *p*-nitrofenolu [9]. Związki nitroaromatyczne (głównie aniliny) znalazły zastosowanie w produkcji szerokiej gamy **środków chemicznych** (pianki poliuretanowe, gumy, barwniki azowe, chemikaliów fotograficzne, lakiery) [101]. W Tabeli I przedstawiono przemysłowe zastosowanie głównych klas nitrozwiązków aromatycznych z uwzględnieniem ich wpływu na organizmy żywe oraz w Tabeli II wpływ nitroarenów na wybrane organizmy na przykładzie nitrobenzenu.

## 3. Nitrozwiązki aromatyczne w środowisku

Nitroareny mogą powstawać w wodach, powietrzu atmosferycznym i glebach. W środowiskach wodnych, światło słoneczne katalizuje reakcje nitrowania i halogenowania naturalnie występujących związków.

Naświetlanie wody morskiej zawierającej fenol prowadzi do produkcji nie tylko 2- i 4-nitrofenolu, ale również chlorofenoli i bromofenoli [15]. W powietrzu, węglowodory uwolnione na skutek procesów spalania i niepełnego spalania paliw kopalnych służą jako substraty do nitrowania w reakcji z atmosferycznym dwutlenkiem azotu [72].

Większość ze znanych nitrozwiązków aromatycznych stanowią syntetycznie otrzymane związki chemiczne. Zidentyfikowano również nitroareny będące produktami aktywności metabolicznej różnych grup bakterii, grzybów i roślin. Podobnie jak w przemyśle, biosynteza nitroarenów może zachodzić na drodze substytucji elektrofilowej (rozdz. 2.1) bądź przy udziale wyspecjalizowanych enzymów N-oksygenez na drodze bezpośredniego utlenienia [110].

Mikroorganizmy produkują związki z tej grupy na drodze metabolizmu wtórnego. Wiele bakterii z rodzaju *Streptomyces* jest znanych z produkcji antybiotyków. Niektóre z nich zawierają nitroaromatyczne komponenty (np. chloramfenikol produkowany przez *Streptomyces venezuelae*). Wybrane bakterie Gram-ujemne (m.in. szczepy *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Coralloccoccus exiguus*, *Cystobacter ferrugineus*, *Myxococcus fulvus*, *Enterobacter agglomerans*) produkują pyrrolnitrin, chloronitroaromatyczny metabolit o aktywności przeciwgrzybiczej [46]. Badania trufli *Stephanospora caroticolor* ujawniły, że syntetyzują one chloronitroaromatyczne związki. Pełnią one funkcję repelentów, gdyż warunkują intensywną barwę grzyba [63]. Nitrowanie aminokwasów aromatycznych jest też mechanizmem modyfikacji funkcjonalnej białek u ssaków [82].

## 4. Zagrożenia związane z nitrozwiązkami aromatycznymi

Związki nitroaromatyczne stanowią zagrożenie dla ludzi i innych organizmów (patrz tabela I i II). Na drodze metabolizmu nitroarenów często dochodzi do powstawania bardziej toksycznych pochodnych – hydroksyloamin. Wykazują one właściwości toksyczne oraz mutagenne wobec DNA. Podczas gdy toksyczność jest konsekwencją elektrofilowych właściwości tych związków, mutagenność to wynik reakcji z guaniną (mutacje punktowe) [19]. U ssaków, za transformację ksenobiotyków odpowiada flora bakteryjna przewodu pokarmowego. W zależności od enzymów uczestniczących w modyfikacji tych związków, pochodne mają właściwości bardziej toksyczne (rola bakteryjnych nitroreduktaz) lub mutagenne (acetylotransferaz) [1]. Ponadto, właściwości toksyczne są konsekwencją oddziaływania z innymi cząsteczkami np. aryloamin z oksyhemoglobina [67]. Związki nitroaromatyczne mogą oddziaływać z grupami tiolowymi białek, przez

Tabela I  
Charakterystyka wybranych grup nitrozwiązków aromatycznych – zastosowanie przemysłowe  
oraz wpływ na organizmy żywe

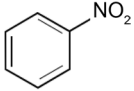
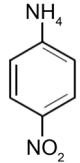
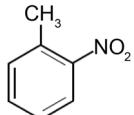
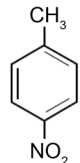
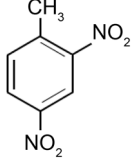
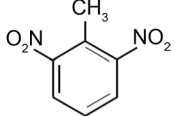
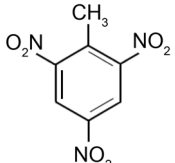
Nazwa związku	Struktura chemiczna	Zastosowanie przemysłowe	Wpływ na organizmy żywe
<b>Nitrobenzen</b> [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• produkcja 1,3-dinitrobenzenu, synteza innych związków organicznych</li> <li>• wyjściowy materiał do produkcji aniliny (min. 95% produkcji) [11]</li> <li>• rozpuszczalnik w rafinacji ropy naftowej oraz produkcji eterów celulozy, octanu celulozy [108]</li> <li>• główny półprodukt w syntezie: poliuretanów, lakierów, barwników, farb, kosmetyków oraz farmaceutyków</li> </ul> <p><u>Dawne wykorzystanie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• przemysł spożywczy – substytut esencji migdałowych</li> <li>• rozpuszczalnik m.in. w: farbach drukarskich, atramencie, przyborach piśmienniczych</li> <li>• dodatek do środków dezynfekujących, perfum, mydeł, past do butów</li> <li>• zamiennik „aromatu kwiatowego”, intermediat barwników</li> <li>• stosowany w rafinacji olejów smarowych itd. [108]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prowadzi do methemoglobinemii – upośledzenie przenoszenia tlenu [107]</li> <li>• uszkodzenie organów wewnętrznych m.in. śledziony i wątroby przy bezpośredniej ekspozycji</li> <li>• silne działanie neurotoksyczne [53]</li> </ul>
<b>p-nitroanilina</b> [C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• półprodukt w produkcji barwników</li> <li>• zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym – produkcja Nitroquanilu (lek antymalariyczny) [11]</li> <li>• synteza azotowego barwnika Para Red [111]</li> <li>• przemysł włókienniczy – barwnik, trwale wiążący się z włóknem [70]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• methemoglobinemia</li> <li>• działanie rakotwórcze – podwyższone ryzyko zapadalności na raka pęcherza moczowego, gruczołu krokowego oraz cewki moczowej [51]</li> </ul>
<b>2-nitrotoluen</b>  <b>4-nitrotoluen</b> [C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ]	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• przemysł włókienniczy – produkcja barwników i wybielaczy</li> <li>• <b>2-nitrotoluen:</b> intermediat w przemyśle agrochemicznym [11]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-nitrotoluen – methemoglobinemia</li> <li>• działanie mutagenne – indukcja dziedzicznych wad genetycznych</li> <li>• działanie kancerogenne – podwyższona zachorowalność na raka ludzi narażonych na długotrwały kontakt [21]</li> </ul>
<b>Dinitrotolueny</b> 2,4-dinitrotoluen  2,6-dinitrotoluen [C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• produkcja elastycznych pianek poliuretanowych wykorzystywanych w przemyśle meblarskim i pościelowym</li> <li>• produkcja amunicji, materiałów wybuchowych, barwników, samochodowych poduszek powietrznych [21, 52]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stwierdzono podwyższony poziom śmiertelności na choroby serca i układu naczyniowego u pracowników narażonych na bezpośredni kontakt z DNT</li> <li>• niekorzystny wpływ na układ nerwowy przy bezpośredniej ekspozycji organizmu [21, 52]</li> </ul>
<b>2,4,6-trinitrotoluen (TNT)</b> [C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• materiał wybuchowy stosowany w amunicji wojskowej i cywilnej, górnictwie, kopalnictwie</li> <li>• substrat wieloskładnikowych materiałów wybuchowych [34]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• uszkodzenie wątroby oraz niedokrwistość</li> <li>• podrażnienie błon śluzowych</li> <li>• leukocytoza lub leukopenia, bóle mięśni, nieprawidłowości pracy serca i podrażnienie nerek [23]</li> </ul>

Tabela I c.d.

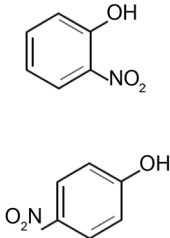
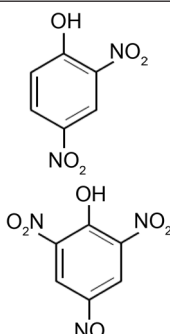
Nazwa związku	Struktura chemiczna	Zastosowanie przemysłowe	Wpływ na organizmy żywe
<b>Mononitrofenole</b> 2-nitrofenol (o-nitrofenol)  4-nitrofenol (p-nitrofenol) [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• synteza barwników</li> <li>• wykorzystanie w produkcji wywoływarza fotograficznego</li> <li>• <b>p-nitrofenol</b> – produkcja środków owadobójczych oraz herbicydów (zwłaszcza w uprawach ryżu) [11]</li> <li>• synteza leków (acetaminofenu – substytut aspiryny) [78]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• methemoglobinemia</li> <li>• podrażnienie dróg oddechowych (przy wdychaniu)</li> <li>• podrażnienie błon śluzowych jamy nosowej, gardła, przełyku, przewodu pokarmowego itd.</li> <li>• niebezpieczeństwo kumulacji w organizmie</li> <li>• działanie szkodliwe na organizmy wodne – długotrwałe niekorzystne zmiany w środowisku wodnym [54, 55]</li> </ul>
<b>Polinitrofenole</b> 2,4-dinitrofenol  2,4,6-trinitrofenol [C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>2,4-dinitrofenol</b> – substrat do produkcji antyseptyków i barwników</li> <li>• dodatek do materiałów wybuchowych</li> <li>• pestycyd [11]</li> <li>• <b>2,4,6-trinitrofenol</b> (tzw. kwas pikrynowy) – materiał wybuchowy stosowany w amunicji wojskowej oraz jako żółty barwnik jedwabiu (dawne zastosowanie)</li> <li>• pikrynian amonu – stosowany do trawienia szlifów na elementach stalowych [59]</li> </ul>	

Tabela II  
Toksyčność nitrobenzenu wobec organizmów

Organizm	Badany efekt	Czas ekspozycji [godz.]	Stężenie [mg/l]	Referencje
<i>Selenastrum capricornutum</i> (algi)	inhibicja wzrostu	96	43	[108]
<i>Scenedesmus obliquus</i> (sinice)	inhibicja wzrostu	48	67,7	[28]
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (wioślarki)	śmiertelność	24	54	[28]
<i>Lymnaea stagnalis</i> (ślimak)	śmiertelność	24	116 (98–139)	[108]
<i>Brachydanio rerio</i> (ryby)	śmiertelność	96	113	[108]
<i>Culex pipiens</i> (komar)*	śmiertelność	48	70	[108]

W badaniach posłużono się testem EC<sub>50</sub> (half maximal effective concentration)

\* w tym eksperymencie wykorzystano test LD<sub>50</sub> (ang. median lethal dose)

co doprowadzają do ich inaktywacji [29]. Znane są przypadki bezpośredniego zakłócania procesów metabolicznych. 2,4-dinitrofenol czy kwas pikrynowy rozprzegają szlak przekazu elektronów w trakcie fosforylacji oksydacyjnej, czego konsekwencją jest inhibicja wytwarzania siły protonomotorycznej, a co z tym związane – produkcji ATP [40]. Ponadto, w trakcie ich rozkładu emitowane są toksyczne gazy m.in. tlenki azotu (NO<sub>x</sub>) [60]. Niektóre z nitrozwiązków aromatycznych zostały wymienione na liście zanieczyszczeń priorytetowych Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska [24]. Są to m.in. *m*-, *p*-, *o*-nitroanilina, pochodne nitrobenzenu (chlorek nitrobenzoylu, nitrobenzotriazol, kwas siarkowy 3-nitrobenzenu, trifluorek 3-nitrobenzenu), 2-nitrofluoren.

Skutkiem powszechnego stosowania nitroarenów jest skażenie gleb i wód gruntowych. Rocznie do środowiska dostaje się 10 tys. ton nitrobenzenu [89]. W 2009 roku na terenie Stanów Zjednoczonych odnotowano 70 składników odpadów zawierających nitroaromatyczne materiały wybuchowe lub ich chemiczne prekursorzy [23]. Wytwarzanie, magazynowanie i używanie amunicji skażyło środowisko nitro arenami. Do wykrywania materiałów zalęgających w gruntach, mających specyficzne chemiczne właściwości spektralne, można wykorzystać urządzenia teledetekcyjne tj. lidar. Nitroaromatyczne materiały wybuchowe absorbują silnie promieniowanie ultrafioletowe, ale wykazują niską fluorescencję, więc bezpośrednio ich wykrywanie nie jest możliwe. Związki te można wykryć w glebie przy pomocy syn-



tetycznych polimerów, które wykazują zmiany fluorescencji w obecności materiałów wybuchowych.

Potencjalne zagrożenie dla środowiska stanowią również awarie w zakładach produkcyjnych wytwarzających lub/i wykorzystujących związki nitroaromatyczne. Najbardziej znany przypadek skażenia środowiska tymi chemikaliami, miał miejsce 13 listopada 2005 r., gdy eksplodowała jednostka nitrowania (stosowana w pierwszym etapie produkcji aniliny) w fabryce chemicznej w Chinach. Szacuje się, że około 100 ton benzenu i nitrobenzenu zostało przy tej okazji uwolnione do rzeki Songhua [62].

## 5. Biodegradacja nitrozwiązków aromatycznych

Zwiększony poziom świadomości organów zarządzających oraz społeczeństwa na temat zagrożeń związanych z wytwarzaniem, przetwarzaniem i składowaniem nitrozwiązków aromatycznych doprowadziły do wzrostu zainteresowania oraz rozwoju badań nad opracowaniem bezpiecznych technologii ich unieszkodliwiania i usuwania ze środowiska.

Znanych jest kilka konwencjonalnych metod neutralizacji omawianej klasy substancji: (foto-) utlenianie, hydroliza, parowanie, spalanie, adsorpcja itd. [48]. Metody fizykochemiczne posiadają jednak liczne wady i ograniczenia. Przykładowo, spalanie i procesy pogłębionego utleniania (AOPs) nie są ekonomicznie opłacalne ani bezpieczne ekologicznie [60]. Podczas filtracji, ekstrakcji i adsorpcji na żywicy, niepożądane związki są jedynie odseparowywane, jednak procesy te nie prowadzą to do ich degradacji.

Techniki biologiczne, takie jak bioremediacja i fitoremediacja stanowią alternatywę dla tradycyjnych metod usuwania ksenobiotyków ze środowiska [113]. Poszukiwania skutecznej biotechnologii usuwania nitrozwiązków (badania w szczególności skupiały się na TNT) zostały rozpoczęte już w latach 70. XX wieku.

### 5.1. Mikrobiologiczna degradacja związków aromatycznych

Związki nitroaromatyczne wykazują dużą stabilność w środowisku. Wynika to z faktu, że w dużych ilościach pojawiły się w nim wraz z rozpoczęciem przez człowieka działalności przemysłowej. Z ewolucyjnego punktu widzenia jest to wydarzenie stosunkowo niedawne. W konsekwencji, metaboliczne ścieżki ich rozkładu nie są bardzo powszechne w przyrodzie [79]. Opisano stosunkowo niewiele drobnoustrojów, które posiadają zdolność wykorzystywania nitroaromatycznych związków jako źródło azotu i/lub węgla i energii. Ponadto, wykazują one niskie tempo wzrostu, co jest

prawdopodobnie konsekwencją wysokiej toksyczności i słabej rozpuszczalności tych związków [83].

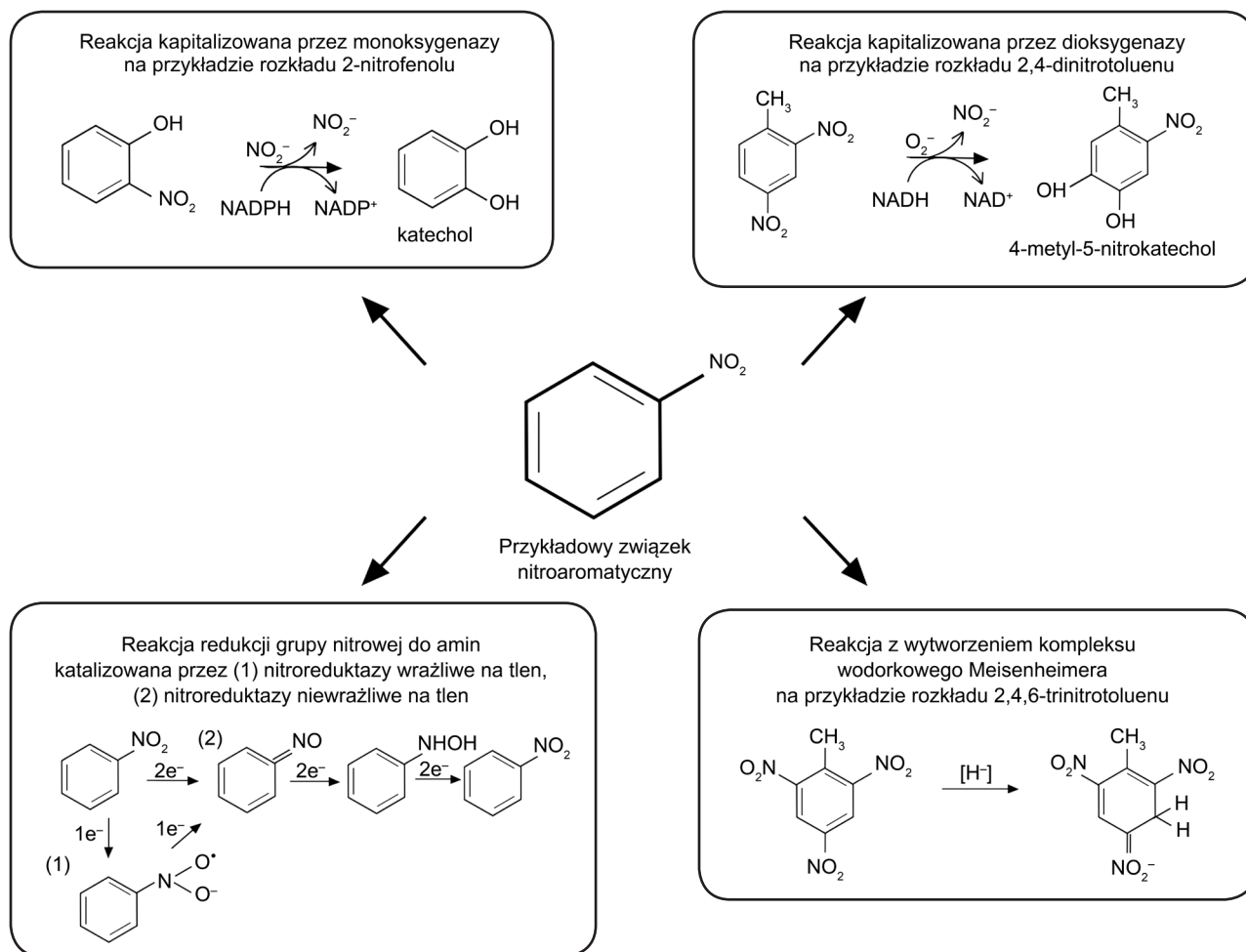
Wykazano, że odporność nitrozwiązków na biodegradację jest związana z obecnością w ich strukturze grup nitrowych. Utrudniają one elektrofilowy, atak tlenu na pierścień aromatyczny. Dodatkowy wpływ na stopień degradacji znitrowanych związków aromatycznych ma pozycja i rodzaj podstawników (*orto*-, *meta*-, *para*-) [60]. Jak w przypadku wszystkich arenów, problem stanowi również rozerwanie stabilnej struktury aromatycznej. Im więcej pierścieni, tym mniej podatny na degradację jest związek.

Asymilacja zanieczyszczeń organicznych obecnych w środowisku bytowania mikroorganizmów wpływa w istotny sposób na ich metabolizm. Pierwszy etap degradacji mikrobiologicznej związany jest indukcją syntezy i aktywacją aparatu enzymatycznego biorącego bezpośredni udział w procesie rozkładu lub modyfikacji zanieczyszczenia. Kluczowymi enzymami zaangażowanymi w degradację i przemiany ksenobiotyków aromatycznych są mono- oraz dioksygenazy [95]. W konsekwencji aktywności tych enzymów może dojść do rozszczepienia pierścienia aromatycznego, na skutek czego związki hydrofobowe przekształcane są w formy łatwiej przyswajalne przez mikroorganizmy [113]. Pierwotnie uważano, że katabolizm takich związków jest wyłącznie procesem tlenowym, w którym tlen molekularny jest substratem towarzyszącym, wykorzystywanym do zainicjowania ataku i rozerwania cyklicznej struktury. Wraz z rozwojem badań nad mechanizmami mikrobiologicznego rozkładu arenów, zaobserwowano iż istnieją mikroorganizmy zdolne do przeprowadzania tych procesów w warunkach anaerobowych [36]. Na rysunku 2. przedstawiono różne strategie rozkładu związków nitroaromatycznych.

W literaturze nadal opisywane są nowe ścieżki degradacji związków nitroaromatycznych. Z reguły różnią się od znanych szlaków katabolicznych rodzajem produktów pośrednich powstających w trakcie procesu biodegradacji. Identyfikowane są również bakterie zdolne do rozkładu związków dotąd uznawanych za niedegradowane. Przykładem może być szczep *Pseudomonas* sp. JHN wykazujący zdolność do rozkładu fungicydu 4-chloro-3-nitrofenolu (CNP) z wytworzeniem intermediatu w postaci 4-chlororezorcyny. Jak donoszą autorzy pracy jest to pierwszy szczep bakteryjny wykazujący zdolność do mineralizacji CNP [5].

#### 5.1.1. Degradacja tlenowa (aerobowa)

W warunkach aerobowych degradacji podlegają głównie związki mono- i dinitroaromatyczne. Ogólna strategia wykorzystywana przez drobnoustroje w celu degradacji nitrozwiązków aromatycznych jest anaboliczna do tej stosowanej w oksydacyjnej ścieżce



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie przebiegu enzymatycznych reakcji rozkładu związków nitroaromatycznych

Na podstawie: [60, 86, 99, 106, 115].

rozkładu aminokwasów i węglowodorów aromatycznych. Polega ona na konwersji substratu do fenoli, chinonów i katecholi, które w dalszej kolejności rozkładane są do intermediatów cyklu kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa) [48].

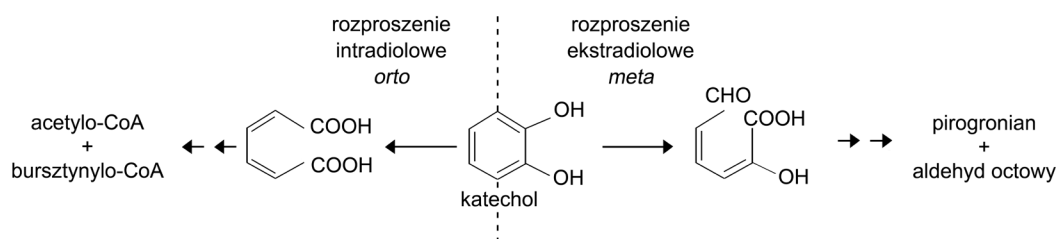
Nitroareny z jednym podstawnikiem hydroksylowym w pierścieniu, np. nitrofenole czy chlorofenole, są modyfikowane przez NAD(P)H-zależne monoooksygenazy [38]. Są to enzymy indukcyjne, pochodne cytochromu P-450. Wykorzystują NAD(P)H by rozbić tlen cząsteczkowy, który w kolejnym kroku wprowadzany jest do pierścienia aromatycznego [75, 60]. Na skutek ich aktywności grupa nitrowa odłącza się od pierścienia.

W przypadku 4-nitrofenolu (4-NP) poznano dwa alternatywne szlaki rozkładu tego związku różniące się rodzajem produktu pośredniego powstającego po hydroksylacji. Pierwsza ścieżka degradacji 4-NP, opisana w 1991 roku przez Gibsona i Spaina dla szczepu *Moraxella* sp., zakłada hydroksylację 4-nitrofenolu przez zależną od NADPH monoooksygenazę z jednoczesnym uwolnieniem azotynu i akumulacją benzochinonu, który jest niestabilnym inetrmediatem

przekształcanym w dalszej kolejności w hydrochinon, ulegający dalej rozkładowi do produktów pośrednich cyklu kwasów trójkarboksylowych.

Alternatywny szlak degradacji 4-nitrofenolu charakteryzuje szczep *Arthrobacter* sp., w przypadku którego produktem początkowego etapu degradacji z udziałem monoooksygenazy jest 4-nitrokatechol, podlegający następnie hydroksylacji w pozycji 3 lub 4, co prowadzi do powstania 1,2,4-benzenotriolu. W dalszej kolejności dochodzi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego benzenotriolu w pozycji *orto* i kolejnych przekształceń których efektem jest wytworzenie intermediatów cyklu Krebsa [60]. Jest to jeden z przykładów obrazujących złożoność szlaków rozkładu nitroarenów (patrz. Rozdział 5.1.3).

Związki aromatyczne, które nie posiadają w swej strukturze grupy OH, ulegają reakcji hydroksylacji, która katalizowana jest przez enzymy z grupy dioksygenaz hydroksylujących. Wprowadzają one dwie grupy hydroksylowe do struktury pierścienia aromatycznego z uwolnieniem jonu azotynowego. Produkt reakcji przekształcani jest do katecholu [105]. Przykładem



Rys. 3. Reakcje rozszczepienia pierścienia aromatycznego węglowodorów aromatycznych Droga *orto* i *meta*, wg Vaillancourt i wsp. [105], zmodyfikowany.

jest rozkład nitrobenzenu przeprowadzany przez *Comamonas* sp. [73].

Kolejnym istotnym etapem jest rozerwanie struktury aromatycznej. Wyróżnia się dwie główne rodziny dioksygenaz rozszczepiających zaangażowanych w degradację związków aromatycznych. Są to dioksygenazy intradiolowe oraz ekstradiolowe [14]. W przypadku pierwszej grupy, geny tych enzymów zlokalizowane są na chromosomie. Katalizują one rozerwanie wiązania między dwoma hydroksylovanymi atomami węgla leżącymi w pozycji *orto* w pierścieniu aromatycznym (rozszczepienie typu *orto*). Produktem tych przemian jest kwas *cis,cis*-mukonowy bądź jego pochodne (Rys. 2). Dioksygenazy ekstradiolowe, które katalizują otwarcie pierścienia typu *meta*, kodowane są przez geny zlokalizowane w większości przypadków na plazmidzie. W tym przypadku pęka wiązanie między węglem hydroksylovanym i sąsiednim węglem bez grupy hydroksylowej [38]. Produktem aktywności tych enzymów jest semialdehyd kwasu 2-hydroksymukonowego lub pochodne tego związku (Rys. 3).

W ostatnim etapie mikrobiologicznej degradacji arenów, alifatyczne łańcuchy kwasowe są utleniane do związków wchodzących do centralnych szlaków metabolicznych [6]. Kwas *cis,cis*-mukonowy, produkt reakcji rozszczepienia typu *orto*, ulega przemianom do substratów cyklu Krebsa m.in. bursztynylo-CoA oraz acetylo-CoA. W szlaku ekstradiolowym (*meta*) produktem otwarcia pierścienia jest semialdehyd 2-hydroksymukonowy lub jego pochodne. Związki te przekształcane są do intermediatów różnych szlaków (np. aldehyd octowy, pirogrotonian, szczawiooctan, fumaran) [38].

### 5.1.2. Redukcyjny rozkład nitroarenów

Tak jak opisano powyżej, związki nitroaromatyczne mogą ulegać rozkładowi na skutek ataku tlenu na pierścień aromatyczny i następujących po nim reakcjach. W przypadku związków o większej liczbie podstawników rozkład następuje drogą redukcji, co może zachodzić zarówno w warunkach anaerobowych jak i aerobowych. Wraz ze wzrostem liczby podstawników nitrowych, elektrony z pierścienia silniej odciągane są na tlen grup nitrowych. Struktura cykliczna wykazuje

deficyt elektronów, co uniemożliwia atak katalizowany przez oksygenazy [86].

Sposób rozkładu zależy również od rodzaju podstawników, w szczególności tych w pozycji *para*. Wzrost potencjału do redukcji grupy nitrowej jest uzależniony od grupy funkcyjnej wg następującego porządku:  $\text{NH}_2 < \text{OH} < \text{CH} < \text{H}_3\text{COOH} < \text{NO}_2$  [69]. Oznacza to, że redukcja pierwszej grupy nitrowej do grupy aminowej zachodzi łatwiej niż kolejnych podstawników. Zredukowanie wszystkich trzech podstawników w trinitrotoluenie możliwe jest wyłącznie w ściśle beztlenowych warunkach (warunki silnie redukcyjne). Proces przeprowadzają *Clostridium* sp. i *Desulfovibrio* sp. [97]. W wielu przypadkach do przeprowadzenia reakcji wymagane jest egzogenne źródło węgla, które pozwala utrzymać odpowiedni potencjał redoks [86].

Bardzo często, produktem tej reakcji jest związek azotu wykorzystywany przez mikroorganizmy jako źródło tego pierwiastka [86]. Zaobserwowano również, że bakterie *Pseudomonas putida* szczepu JLR11 wyspecjalizowały się w wykorzystywaniu trinitrotolenu jako ostatecznego akceptora elektronów. Przeprowadzają redukcję TNT w celu wytwarzania siły protonomotorycznej [26–27].

Redukcyjny rozkład nitroarenów następuje w dwójki sposób: (1) poprzez rozerwanie pierścienia aromatycznego przy udziale transferaz, które dołączają do niego dwa atomy wodoru ( $\text{H}^-$ ), (2) na skutek redukcji grup azotowych przez nitroreduktazy do hydroksyloamin lub amin (typu I niewrażliwych na tlen oraz typu II wrażliwych na tlen). W pierwszym przypadku ze związków di- i trinitroaromatycznych (np. TNT czy kwas pikrynowy) powstaje tzw. kompleks wodorokowy Meisenheimera (*Hydride-Meisenheimer Complex*) [97]. Po odłączeniu grupy azotowej ulega on rearomatyzacji [85]. Tą drogę rozkładu zaobserwowano m.in. u drożdży *Geotrichum candidum* AN\_Z4. Kompleks ulega konwersji do dinitroarenów, które są łatwiej biodegradowalne niż wyjściowy związek [73, 93].

Nitroreduktazy typu I katalizują reakcję redukcji na drodze stopniowego pobierania z NAD(P)H dwóch elektronów i przenoszenia ich na związek, który ulega transformacji. Enzymy należące do II typu przeprowadzają redukcję, w której pierwszym etapem jest addycja

jednego elektronu. Na skutek tego powstaje rodnik anionu nitrowego. Zidentyfikowano je u szczepów *Escherichia coli* i *Clostridium* sp. [4, 68, 80]. Bakterie mogą posiadać oba typy nitroreduktaz. Przykładowo, z zasiedlających nasze jelita *Bacteroides fragilis* wyizolowano aż cztery nitroreduktazy [56]. W przyrodzie częściej identyfikowane są enzymy należące do typu I [86].

Nitroreduktazy są bardzo rozpowszechnione w świecie mikroorganizmów. Zostały zidentyfikowane u bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich jak i u przedstawicieli *Archea*. Jest to prawdopodobnie konsekwencją zdarzeń horyzontalnego transferu ich genów [45] i świadczy o istotnej roli jaką te enzymy pełnią w adaptacji do środowiska. Enzymy te mają szeroki wachlarz substratów – związki aromatyczne, flawiny, chinony, jony żelaza i anion chromianowy. Jest to prawdopodobnie konsekwencją dużej plastyczności miejsca aktywnego i dużej zmienności aminokwasowej uczestniczących w interakcji z substratem [86].

#### 5.1.2.1. Rozkład beztlenowy (anaerobowy)

W warunkach beztlenowych nitrozwiązki aromatyczne redukowane są do nitrozo-pochodnych, hydroksyloamin lub amin, które są często bardziej toksyczne niż związków wyjściowy. Redukcja grupy nitrowej przebiega na drodze stopniowej addycji par elektronowych pobranych z ko-substratów. Reakcje te katalizowane są enzymatycznie przez nitroreduktazy [7].

Bakterie beztlenowe rzadko przeprowadzają pełną konwersję związków nitroaromatycznych do dwutlenku węgla czy metanu [84]. Zdolne są do tego bakterie metanogenne (degradacja nitrofenolu) jak *Methanobacterium formicium* [35, 39]. Przeprowadzenie całkowitej degradacji np.: dinitrotoluenów, mononitrofenoli, trinitrotolenu możliwe jest dzięki współdziałaniu z bakteriami tlenowymi w konsorcjach [2, 43]. Niektóre grzyby (np. *Phanerochaete chrysosporium*) są zdolne do mineralizacji TNT. Wykorzystują zewnątrzkomórkowe, niespecyficzne peroksydazy, dzięki którym mogą degradować szeroką gamę związków nitroaromatycznych [25, 96].

#### 5.1.3. Degradacja nitrobenzenu

##### – przykład alternatywnych ścieżek rozkładu

Tak jak wspomniano wcześniej, rozkład związków aromatycznych może zachodzić wieloma drogami. Nawet w przypadku jednej substancji mamy do czynienia ze ścieżkami alternatywnymi przeprowadzanymi przez różne grupy mikroorganizmów. Dobrym przykładem tego zjawiska jest degradacja nitrobenzenu. Jego rozkład może przebiegać według dwóch alternatywnych ścieżek: częściowej redukcji bądź oksydacji (Rys. 3). Pierwszy szlak opisany został dla szczepu *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 wyizolowanego z gleb i wód gruntowych zanieczyszczonych nitrobenzenem. Początkowym etapem degradacji nitrobenzenu jest częściowa

redukcja grupy nitrowej przy udziale nitroreduktazy nitrobenzenu, w wyniku której dochodzi do powstania hydroksyaminobenzenu. Ulega on transformacji enzymatycznej do 2-aminofenolu, będącego charakterystycznym intermediatem tej ścieżki katabolicznej. W kolejnym etapie dochodzi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego 2-aminofenolu, co katalizowane jest przez dioksygenazy. Powstały w wyniku tej reakcji produkt – semialdehyd 2-aminomukonowy ulega dalszym przekształceniom, aż do wytworzenia produktów pośrednich wchodzących w cykl kwasów trójkarboksylowych [94]. Kolejne badania potwierdziły istnienie wielu szczepów bakteryjnych degradujących nitrobenzen według przedstawionej powyżej ścieżki. Należą do nich m.in. zidentyfikowane w ostatnich latach mikroorganizmy takie jak: *Rhodococcus* sp. NB5, zdolny do całkowitej degradacji 1000 mg nitrobenzenu w ciągu 144 h [65] oraz *Pseudomonas* sp. a3, którego immobilizowane komórki są w stanie degradować 300 mg nitrobenzenu w czasie 10 godzin w obecności dodatkowych związków aromatycznych w postaci aniliny i fenolu [114].

Drugi szlak degradacji nitrobenzenu poznany został w 1995 roku przez Nishino i Spain'a, którzy wyizolowali bakterie z rodzaju *Comamonas* sp. szczepu JS765. Bakterie wykorzystują ścieżkę oksydacyjną degradacji nitrobenzenu. Reakcję inicjują dioksygenazy poprzez wprowadzenie dwóch grup hydroksylowych do pierścienia aromatycznego (patrz. Rys. 4). Skutkiem tego jest uwolnienie azotynu oraz powstanie katecholu, degradowanego w dalszej kolejności według szlaku *meta* z udziałem 2,3-dioksygenazy katecholowej. Nishino i Spain zauważyli, że ścieżka częściowej redukcji jest częściej spotykana wśród mikroorganizmów, niż ścieżka oksydacyjna. Tylko jeden spośród 155 przebadanych szczepów wytwarzał enzymy i intermediaty specyficzne dla szlaku oksydacyjnego.

## 6. Bioremediacja

Metabolizm ksenobiotyków przez mikroorganizmy zależy w znacznej mierze od rodzaju i właściwości danej substancji oraz dostępnego aparatu enzymatycznego. Mogą ulegać całkowitej degradacji do wody i dwutlenku węgla (mineralizacja), bądź też być przekształcane w produkty o mniejszej lub większej toksyczności niż związków wyjściowy, co określane jest mianem biotransformacji [41].

Bioremediacja jest definiowana jako proces, w którym odpady ulegają biologicznej degradacji lub transformacji do nieszkodliwych pochodnych lub do poziomu poniżej wartości granicznych ustalonych przez organy regulacyjne [60]. Wyróżnia się dwie grupy





zabiegów. W procesie bioremediacji podstawowej bierze udział wyłącznie autochtoniczna mikrobiota skażonego terenu. Wykorzystując zanieczyszczenie jako źródło węgla i/lub energii, przyczynia się do obniżenia stężenia toksycznych związków. Bioremediacja inżynieryjna obejmuje technologie biostymulacji i bioaugmentacji.

Biostymulacja ma na celu pobudzenie autochtonicznej mikrobioty środowiska do degradacji zanieczyszczeń. Podejmowane działania ukierunkowane są na stworzenie optymalnych warunków do wzrostu i aktywności mikroorganizmów. Przykładowo, dostępność tlenu jest częstym czynnikiem limitującym degradację zanieczyszczeń. Obecnie znanych jest wiele metod umożliwiających napowietrzanie np. wentylacja z wykorzystaniem układu drenów, mechaniczna uprawa gruntu (spulchnianie) oraz wtłaczanie rozcieńczonych roztworów nadtlenu wodoru i innych środków utleniających [10]. Proces rozkładu zanieczyszczeń może być limitowany przez stężenie pierwiastków biogennych tj. azotu czy fosforu, których niedobór może być uzupełniony poprzez zaaplikowanie odpowiednich pożywek [12].

Wprowadzenie do skażonego środowiska bakterii o wysokim potencjale do degradacji ksenobiotyków określane jest jako bioaugmentacja. Metoda bioaugmentacji wykorzystywana jest w przypadku gdy naturalna mikrobiota nie wykazuje pożądanego aktywności neutralizacyjnej wobec zanieczyszczeń [10]. Mikroorganizmy w postaci inokulum dostarczane są w miejsce skażenia. Drobnoustroje izolowane są z innych stanowisk bądź pochodzą z miejsca zanieczyszczonego i po okresie adaptacji są ponownie do niego wprowadzone.

Często stosuje się strategię łączącą biostymulację z bioaugmentacją. Przykładowo Kao i wsp. (2016) testowali efektywność rozkładu TNT przez *Achromobacter* sp. BC09 i *Citrobacter* sp. YC4 wyizolowane z gleby zanieczyszczonej tym związkiem. Wydajność nie była zadowalająca, dlatego dostarczono egzogenne źródła węgla w postaci sacharozy (0.25%) co zoptymalizowało proces. Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla *Klebsiella* sp. i *Achromobacter* sp. (wyizolowanych z gleby i osadu ściekowego). Mikroorganizmy również wykorzystywały TNT jako źródło azotu i doprowadziły do jego całkowitej degradacji w ciągu 10 dni. W tym przypadku jako źródło węgla wykorzystano melasę (8 g/l) [90].

Nie wyklucza się również rozwiązań opartych na genetycznie modyfikowanych mikroorganizmach (GMM), co wciąż budzi jednak wiele obaw i kontrowersji. Wykorzystanie GMM w bioremediacji ma służyć zwiększeniu efektywności rozkładu związków trudno degradowalnych [3]. Przykładowo, Cho i wsp. (2002) otrzymali szczep *E. coli* 22A11 z fosforoorganiczną hydrolazą (OPH) o aktywności hydrolazy parationu metylowego, która przeprowadza reakcję rozkładu związku nitroaromatycznego 25 razy szybciej niż enzym

wyjściowy. Kadiyala i wsp. (2003) uzyskali rekombinowane wektory, w których sklonowano geny nitroreduktazy (*nfs1*) z *Enterobacter cloacae*, nitroreduktazy nitrobenzenu (*nbzA*) i mutazy hydroksylaminobenzenu (*habA*) z *P. pseudoalcaligenes* JS 45. Wydajność procesu biokonwersji z wykorzystaniem transformowanych komórek *E. coli* szczepów JS 995 i JS 996 była wysoka, a reakcja zachodziła szybko (wydajność reakcji powyżej 64% w ok. 20 minut). Bakterie mogą być wykorzystane do przeprowadzania reakcji przekształcenia nitrozwiązków aromatycznych do *o*-aminofenoli. Związki te znajdują zastosowanie w przemyśle aeronautycznym i farmaceutycznym. Ich synteza chemiczna jest skomplikowana dlatego poszukiwana jest inna, prostsza strategia ich wytwarzania. Ponadto, pochodne fenolowe wykazują większą podatność na biodegradację, co jest istotne z uwagi na aspekty oczyszczania środowiska.

### 6.1. Bioremediacja związków nitroaromatycznych – przykłady realizacji

Wybór strategii bioremediacji uzależniony jest od rodzaju i poziomu zanieczyszczenia oraz od charakteru terenu poddawanego rekultywacji. Dekontaminacja zanieczyszczeń metodą bioremediacji inżynieryjnej może być prowadzona *in situ* bądź *ex situ* [58]. Technologie *in situ* odnoszą się do usuwania zanieczyszczeń w miejscu skażenia bez konieczności transportu materiału. Wykorzystywana jest w przypadku rozległych skażeń lub terenów, z których niemożliwe jest usunięcie zanieczyszczonego materiału. W drugim przypadku zanieczyszczony materiał jest usuwany z pierwotnej lokalizacji i przenoszony do specjalnie przygotowanych instalacji, w których poddawany jest zabiegom oczyszczania [60].

#### 6.1.1. Bioremediacja inżynieryjna *in situ*

Znane jest wiele metod mikrobiologicznego oczyszczaniu gruntów *in situ*. Jednak w przypadku związków nitroaromatycznych niewiele z nich znalazło zastosowanie w oczyszczaniu w dużej skali. Przykładowo kompostowanie, choć w większości wypadków stosowane jest jako strategia *ex situ*, zostało wykorzystane w testach wielkoskalowych na miejscu skażenia. Jest to proces, w którym dochodzi do mikrobiologicznej degradacji związków organicznych w warunkach podwyższonej temperatury (40–50°C). Istotna jest również dostępność ko-metabolitów, czyli łatwo przyswajalnych substratów wzrostowych. Metoda ta okazała się być skuteczna w przypadku gleby i osadów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi, chlorofenolami, wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, herbicydami, pestycydami oraz związkami nitroaro-

matycznymi. Przykładem wielkoskalowej realizacji jest kompostowanie gleb zawierających związki wybuchowe – TNT, RDX i HDX [116]. Autorzy podkreślają, że w eksperymencie doszło do degradacji biotycznej jak i abiotycznej.

Inna metoda to landfarming. Jest to metoda *ex situ*, gdyż zanieczyszczona gleba jest oddzielona od gruntu nieprzepuszczalną folią. Jej podobieństwo do metod *in situ* wynika z możliwości przeprowadzania procesu w dużej skali oraz blisko terenu skażenia, co znacznie obniża koszty przedsięwzięcia. Przyspieszenie naturalnego procesu oczyszczania jest możliwe dzięki dodawaniu nawozów (stymulacja wzrostu mikroorganizmów) oraz zaorywaniu gruntu (poprawa struktury i warunków powietrznych gleby). W pracy Widrig i wsp. (1997) zastosowano omawianą strategię wobec terenu zanieczyszczonego TNT (badania pilotażowe). Glebę wzbogacano w bogatą w związki odżywcze melasę. Autorzy zaznaczają, że przeprowadzone przez testy mogą znaleźć zastosowanie w wielkoskalowym oczyszczaniu terenów zanieczyszczonych nitrozwiazkami.

Na uwagę zasługuje również ryzoremediacja. W przypadku tej technologii efektywność degradacji zależy od współpracy roślin i bakterii, które zasiedlają wewnątrz ich korzeni (mikroorganizmy z grupy endofitów). Zauważono, że poszczególne gatunki roślin mogą promować występowanie konkretnych genotypów w zależności od rodzaju zanieczyszczenia. Przykładowo, w glebach zanieczyszczonych związkami nitro- aromatycznymi zaobserwowano wzrost liczby kopii genu reduktazy 2-nitrotoluenu *ntdAa* u bakterii zamieszkujących korzenie trawy. Nie zauważono tego w analogicznym eksperymencie badającym mikroorganizmy zasiedlające kostrzewę trzcinową (*Festuca arundinacea*) [91].

W przypadku oczyszczania wód na uwagę zasługuje technologia przepuszczalnych barier reaktywnych (*permeable reactive barriers – PRBs*). Zanieczyszczenia przepływają przez filtr, na którym mogą zostać zimmobilizowane mikroorganizmy. Jest to możliwe dzięki porowatej konstrukcji tej instalacji. Ulegają one precypitacji bądź sorpcji, a następnie biodegradacji na filtrze. W pracy przetestowano skuteczność rozkładu nitrobenzenu i aniliny przez konsorcjum związane na nośniku przy pomocy perlitu i torfu. Substancje zostały zmineralizowane po mniej niż 3 dniach, podczas gdy wolnym komórkom zajęło to od 3 do 5 dni. Kluczowe dla powodzenia procesu jest odpowiedni poziom natlenienia, co zostało uzyskane dzięki zastosowaniu technologii napowietrzania. Bakterie zostało wyizolowane z terenów chłodnych (średnia roczna temperatura wynosi 10°C), na których znajdowała się fabryka aniliny i poligon. W jego skład wchodziło 19 gatunków z rodzaju *Pseudomonas*, które stanowiły 98% populacji mikroorganizmów oraz przedstawiciele *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Afipia*, *Chryseobacterium*, *Delftia* i *Stenotrophomonas* [66].

### 6.1.2. Bioremediacja inżynierska *ex situ*

Technologie *ex situ* znajdują zastosowanie, gdy w zanieczyszczonym środowisku istnieje zagrożenie migracji zanieczyszczeń do wód podziemnych. Ta strategia umożliwia lepszą kontrolę procesu, a degradacja następuje szybciej niż w strategiach *in situ* [58]. Jest ona jednak bardziej kosztowna, gdyż wymagają przetransportowania zanieczyszczonego materiału oraz wytworzenia odpowiedniej infrastruktury laboratoryjnej, w której odbywać się będzie rozkład zanieczyszczeń.

Technologie *ex situ* obejmują wiele metod w zależności od charakteru zanieczyszczeń poddawanych neutralizacji. Do najpopularniejszych z nich należą: metoda bioreaktorowa, filtrów zraszanych (dotyczy oczyszczania z zanieczyszczeń ciekłych), pryzmowania, kompostowania, przeorywania (stosowana wobec odpadów stałych) oraz biopłuczki i biofiltry do oczyszczania emisji gazowych [12].

Bioremediacja *ex situ* z zastosowaniem bioreaktorów jest wykorzystywana przy oczyszczaniu gleby silnie skażonej np. zanieczyszczonej TNT. Materiał przenoszony jest ze źródła do bioreaktorów, gdzie w kontrolowanych warunkach (temperatura, pH, napowietrzanie itd.) następuje jego dekontaminacja. W procesie tym, gleba mieszana jest z wodą w stosunku 1:1 (w/w) [26]. Do homogennej zawiesiny dodawany jest ko-substrat, np. skrobia, który jest wykorzystywany przez autochtoniczne bakterie. Dochodzi tu do zjawiska ko-metabolizmu, co w tym przypadku oznacza degradację ksenobiotyków przy równoczesnym wykorzystywaniu związków stanowiących łatwo przyswajalne źródło węgla i energii [64]. Ko-substrat jest dawcą elektronów wykorzystywanych do redukcji grup nitrowych. Funk i współpracownicy (1993) opublikowali wyniki badań potwierdzające wysoką skuteczność tej metody. Odnotowano redukcję stężenia TNT z 3000 mg do 1 mg/kg gleby po 5 miesiącach. Równie wydajne oczyszczanie gleby przeprowadzono przy użyciu *R. pyridinivorans* NT2 do degradacji mieszaniny 4-nitrotoluenu (4-NT), 2,4-dinitrotoluenu (2,4-DNT) i 2,6-dinitrotoluenu (2,6-DNT). Zawartość zanieczyszczeń spadła o 86–88% w ciągu 60 dni [61].

W przypadku TNT procesy mikrobiologicznej transformacji najwydajniej przebiegają, gdy zanieczyszczony materiał poddawany jest warunkom tlenowym i beztlenowym naprzemiennie. Na skutek dodania łatwo przyswajalnego źródła węgla zużywany jest tlen obecny w bioreaktorze, a z czasem w reaktorze wytwarza się środowisko beztlenowe. Również metoda kompostowania pryzmowego, w której naprzemiennie występują warunki tlenowe i beztlenowe, okazała się być skuteczna w dekontaminacji gleb zanieczyszczonych materiałami wybuchowymi [13, 83].

Schrader i Hess [88] (2004) zaproponowali postępowanie, które zakłada połączenie degradacji biotycznej

z abiotyczną. Działania te obejmują zmieszanie skażonej gleby z wysoką koncentracją nadtlenu wodoru. W reakcji powstają kwasy organiczne, które ulegają transformacji przez mikroorganizmy dodane do bioreaktora w postaci osadu czynnego. W porównaniu z zastosowaniem wyłącznie metody chemicznej, metoda łączona jest bardziej wydajna – nastąpił wzrost mineralizacji TNT z 41 i 34% do 73 i 64% (warianty różniły się ilością dodanej gnojowicy).

## 6.2. Ograniczenia procesu bioremediacji i strategię ich przewyżczenia

Pomimo identyfikacji wielu taksonów wykazujących zdolność do degradacji nitroarenów i poznania warunków optymalizujących ten proces, zakres rozkładanych substancji jest ograniczony. Bioremediacja tej grupy związków napotyka kilka problemów:

- związki nitroaromatyczne są toksyczne względem mikroorganizmów. Zaobserwowano zróżnicowanie wrażliwości na TNT w zależności od budowy ściany komórkowej bakterii – bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe niż Gram-ujemne [30, 31, 57],
- charakteryzują się niską biodostępnością – są słabo rozpuszczalne i łatwo ulegają sorpcji na cząstkach gleby,
- często w środowisku obecne są mieszaniny wielu związków, co spowalnia proces degradacji. W eksperymencie prowadzonym przez Karlová i wsp. (2016) zaobserwowano dwukrotny spadek degradacji 4-nitrotoluenu (4-NT) po dodaniu 4-nitrofosforanu (4-NP). Wydajność degradacji 4-NP nie uległa zmianie w stosunku do warunków kontrolnych (bez 4-NT). 4-NP wpływał bezpośrednio na spowolnienie degradacji 4-NT (inhibicja kompetywna) i pośrednio, poprzez obniżanie zdolności adaptacyjnych mikroorganizmów,
- systemy enzymatyczne drobnoustrojów nie są przystosowane do przeprowadzenia pełnej mineralizacji zanieczyszczeń, gdyż szlaki rozkładu nie są wystarczająco złożone [60]. Dlatego bardziej efektywnie proces ten przeprowadzają konsorcja bakteryjne niż pojedyncze szczepy [77].
- w środowisku zanieczyszczonym nitroarenami występują również inne związki toksyczne w tym inhibitory procesu bioremediacji jak np. metale ciężkie czy farmaceutyki [22, 76].

W poniższych akapitach rozwinięto niektóre z wyżej wymienionych problemów.

Istotnym problemem w przypadku bioaugmentacji jest spadek liczby mikroorganizmów wprowadzanych do skażonego środowiska na co wpływ ma szereg czynników biotycznych i abiotycznych m.in. wahania tem-

peratury, zmiany poziomu wilgotności, niski poziom pierwiastków biogenych, niewystarczająca zawartość tlenu, drapieżnictwo (*Protozoa*) czy zbyt wysokie stężenie toksycznych zanieczyszczeń. W celu zabezpieczenia mikroorganizmów przed szkodliwym wpływem środowiska, podejmowane są próby immobilizacji drobnoustrojów na różnego typu nośnikach. Powszechnie stosowanymi materiałami są: agar, agaroz, alginian, poliuretan, żelatyna, guma gellan czy żele z dodatkiem alkoholu poliwinylowego [103].

Wu i współpracownicy (2012) sprawdzili efektywność rozkładu zanieczyszczeń przez immobilizowane bakterie. Wykorzystano szczep *Pseudomonas* sp. a3 zdolny do degradacji nitrobenzenu. Jako nośnik zastosowano alginian sodu w połączeniu z alkoholem poliwinylowym, których stężenie wynosiło kolejno 3 i 9%. Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że immobilizowane komórki *Pseudomonas* sp. a3 są zdolne do bardziej wydajnego rozkładu wieloskładnikowych mieszanin zanieczyszczeń aromatycznych niż komórki wolne. Bakterie zamknięte w nośniku całkowicie usuwają z podłoża nitrobenzen (stężenie początkowe wynosiło 300 mg/l) oraz anilinę i fenol (150 mg/l) w czasie 10 godzin. Zaobserwowano również ich podwyższoną tolerancję na niesprzyjające warunki środowiska takie jak wysokie zasolenie (10% NaCl) i kwasowość (pH 4–5) [114].

Zwiększenie dostępności związków możliwe jest dzięki wykorzystaniu metod fizykochemicznych. Islam i współpracownicy (2015) usunęli TNT i heksogen (RDX) z gleb wykorzystując metodę ekstrakcji przegrzaną wodą w temperaturze 175°C (*subcritical water extraction*). Wadą takich metod jest jednak zagrożenie degradacji gleby (utrata struktury gruzelkowej, wypłukanie biogenów i zabicie większości mikroorganizmów). Metodą bardziej przyjazną środowisku jest stosowanie biosurfaktantów. Są to związki, które zmniejszają napięcie powierzchniowe, dzięki czemu kontakt bakterii z hydrofobowym zanieczyszczeniem jest ułatwiony. Niektóre bakterie są zdolne do wytwarzania związków o takich właściwościach. Szczep *Rhodococcus pyridinivorans* NT2 wyizolowany z gleby zanieczyszczonej pestycydami, zaczyna produkować biosurfaktanty (są to pochodne trehalozy m.in. glikolipidy) w trakcie metabolizmu 4-nitrotoluenu. Są to związki zdolne do emulsyfikacji zanieczyszczenia. Co ciekawe, takie emulsje są stabilne nawet przez 24 godziny, co pozwala bakteriom przeprowadzać „ułatwioną” degradację zanieczyszczeń dłużej. Wytwarzanie biosurfaktantów jest skorelowane z cyklem komórkowym bakterii – zaczynają być produkowane, gdy komórki wkraczają w stacjonarną fazę wzrostu [61].

Otoczki wspomnianego szczepu mają charakter silnie hydrofobowy. Zawierają kwasy mykolowe, glikolipidy, kwasy tłuszczowe i wielocukry. To również jest



mechanizm adaptacji bakterii do obecności związków aromatycznych w środowisku. Dochodzi wówczas do zmiany nasycenia i długości kwasów tłuszczowych oraz mykoloowych błony komórkowej, zawartości kwasów rozgałęzionych i wzrostu lipofiliowości [16]. Takie adaptacje są powszechne wśród bakterii żyjących w warunkach wysokiej hydrofobowości środowiska. Podobne zmiany zaobserwowano u *Staphylococcus haemolyticus* po ekspozycji na toluen [71] czy *Arthrobacter chlorophenolicus* na m.in. 4-nitrofenol [104].

Jedną ze strategii zwiększających efektywność oczyszczania jest stosowanie biopreparatów. Są to konsorcja mikroorganizmów, które „współpracują” przy rozkładzie zanieczyszczeń. Bakterie umożliwiają rozkład związków poprzez przeprowadzanie poszczególnych etapów szlaku. Współdziałanie może być również oparte na promocji rozwoju innych grup bakterii w konsekwencji dostarczania im niezbędnych do wzrostu substratów. Biopreparaty znajdują zastosowanie w warunkach oczyszczania *in situ* jak i *ex situ*.

Istnieje wiele mikroorganizmów wykorzystanych jako komponenty biopreparatów zwiększających efektywność degradacji nitrozwiązków aromatycznych. Jako przykład mogą posłużyć dwa szczepy *Pseudomonas* oznaczone symbolami S1 i S2, które zmieszano w stosunku 5:1 tworząc konsorcjum. Preparat został zastosowany do biodegradacji 4-nitrofenolu (PNP) zawartego w glebie skażonej pestycydami fosforanowymi. Wyniki badań potwierdziły synergistyczne działanie wyizolowanych szczepów bakteryjnych, które prowadzi do przekształcenia PNP w 4-nitrokatchol. Całkowitą degradację związku osiągnięto już po upływie 120 godzin od inokulacji medium hodowlanego [81].

Inny przykład to konsorcjum zawierające cztery gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus* (*Bacillus subtilis* RSE165, *Bacillus megaterium* RSA32, *Bacillus cereus* RSB80 i *Bacillus lexus* RSD127) zdolne do rozkładu 2,4-DNT. Nie zidentyfikowano dotychczas szczepu bakterii zdolnego do jego samodzielnej degradacji. Konsorcjum wykazywało lepszy wzrost na podłożu wzbogaconym w ksenobiotyk, niż szczepy hodowane oddzielnie. Bakterie są zdolne do jego degradacji przy najwyższym dotychczas odnotowanym w literaturze stężeniu tego związku (0,3 mg/ml) [92].

Wykorzystanie konsorcjum znalazło zastosowanie przy oczyszczaniu wspomnianego wcześniej heksogenu (RDX). Zaobserwowano, że bakterie szczepu *Gordonia* sp. KTR9 wykorzystują ten związek jako źródło azotu. Produktem końcowym ich metabolizmu jest 4-nitro-2,4-diazabutanal (NDAB). Aby się go pozbyć, do hodowli tych bakterii dodano *Methylobacterium* sp. JS178. W efekcie doszło do mineralizacji zanieczyszczenia, gdyż dwa szczepy rozłożyły związek przeprowadzając różne etapy szlaku degradacji. Autorzy wnioskują,

że dwuskładnikowe konsorcjum może zostać wykorzystane do całkowitej degradacji heksogenu [20].

Innym przykładem konsorcjum bakteryjnego jest bioprodukt BACTREM. W opisie patentowym PL 219151 B1 jest opisany jako szczepionka bioremediacyjna zawierająca kompozycję 11 szczepów, wyselekcjonowanych z terenów zanieczyszczonych (gleby i wody) jedno- i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, nitrozwiązkami, pestycydami, metalami ciężkimi i farmaceutykami. BACTREM jest produktem organiczno-mineralnym zawierającym kompozycję szczepów tlenowych bakterii saprofitycznych, pożywkę oraz nośnik sprzyjające rozwojowi tych bakterii. Według producenta tego preparatu, spółki BACTrem typu spin-off Uniwersytetu Warszawskiego, przeznaczony jest do bioremediacji gleby, hałd, wycieków, składowisk skażonych węglowodorami aromatycznymi, związkami nitrowymi, metalami ciężkimi w warunkach tlenowych i względnie beztlenowych oraz wspomagania procesów biodegradacji przy kompostowaniu, w przydomowych oczyszczalniach ścieków oraz w glebie pod uprawy. Preparat osadzony na złożu biologicznym może zostać również wykorzystany do oczyszczania wód odciekowych, przemysłowych i innych [8]. Kompozycja, zastosowanie szczepionki bioremediacyjnej do usuwania zanieczyszczeń i sposób oczyszczania zostały opatentowane również w USA, Rosji, Ukrainie, Chinach i krajach Unii Europejskiej. Zespół badawczy BACTrem Sp. o.o. wykazał bardzo wysoką skuteczność biopreparatu na terenach byłej rafinerii w Gorlicach co zostało potwierdzone przez Regionalną Dyрекcję Ochrony Środowiska w Krakowie. Analiza skażenia wykazała obecność w tej glebie WWA, BTX, olejów mineralnych, nitrozwiązków jak również wysokich stężeń metali ciężkich: ołowiu, miedzi, niklu, cynku i chromu. W zanieczyszczonej glebie podanej działaniu biopreparatu w określonym stosunku objętościowym już po 7 dniach odnotowano redukcję zanieczyszczeń o ponad 80% w stosunku do stanu wyjściowego, która utrzymywała się także po upływie miesiąca oraz kolejnych 6 miesięcy od dnia rozpoczęcia bioremediacji wyznaczonego terenu.

## 7. Podsumowanie

O konieczności oczyszczania środowiska decydują nie tylko względy zdrowotne ale również gospodarcze i ekonomiczne. Składowiska odpadów niebezpiecznych bądź tereny nimi zanieczyszczone generują ogromne koszty, stąd zainteresowanie wielu podmiotów gospodarczych ich neutralizacją. Ponadto, z roku na rok rośnie społeczna świadomość dotycząca ochrony środowiska. Obowiązek oczyszczania środowiska z określonych ksenobiotyków jest regulowany licznymi

rozporządzeniami Ministra Zdrowia i Ministra Środowiska, pozostającymi w zgodzie z aktualnymi dyrektywami Unii Europejskiej (UE). Obecnie obowiązują następujące Rozporządzenia Ministra Środowiska: (i) z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (ii) z dnia 9 listopada 2011 r. w sprawie sposobu kwalifikacji stanu jednolitych części wód powierzchniowych oraz środowiskowych norm jakości dla substancji priorytetowych (wdrożenie dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2000/60/WE; 2008/105/WE; 2009/90/WE) (iii) z dnia 18 listopada 2014 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz (iv) Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska po zmianach, po zmianach obowiązująca od 1 stycznia 2017. Niniejsza ustawa dokonuje w zakresie swojej regulacji wdrożenia następujących dyrektyw Unii Europejskiej: 87/217/EWG; 91/692/EWG; 92/43/EWG; 96/59/WE; 1999/94/WE; 2000/53/WE; 2002/49/WE; 2004/107/WE; 2008/50/WE; 2008/56/WE; 2008/98/WE; 2009/147/WE; 2010/75/UE; 2009/28/WE; 2012/18/UE; 166/2006/WE. Każde z tych rozporządzeń czy ustaw podlega nowelizacji zgodnie ze zmieniającymi się dyrektywami UE. Wprowadzane zmiany czynią przepisy coraz bardziej restrykcyjne w stosunku do poprzednich. Przykładem mogą być zmiany, które weszły w życie od 1 stycznia 2017 roku w procedurze ocen oddziaływania na środowisko (OOŚ), m.in. są nowe wytyczne w zakresie karty informacyjnej przedsięwzięcia oraz raportów OOŚ. Zgodnie z nowymi regulacjami prawnymi na inwestora będzie mogła zostać nałożona kara pieniężna w wysokości od 500 zł do 1.000.000 zł. Kara będzie grozić inwestorowi zarówno w sytuacji, kiedy przedsięwzięcie będzie w trakcie realizacji, jaki i wtedy, kiedy będzie już zrealizowane. Zmiany, wynikające wprost z dyrektywy 2010/75/UE, dotyczą również zmniejszenia poziomu emisji zanieczyszczeń z instalacji przemysłowych. Dodatkowo uporządkowano system prawny: dotyczący ochrony i rekultywacji powierzchni ziemi. Doprecyzowano przepisy dotyczące dokonywania oceny wystąpienia zanieczyszczenia powierzchni ziemi oraz określenia sposobów prowadzenia rekultywacji terenów zanieczyszczonych. Wszystkie proponowane zmiany mają przyczynić się do osiągnięcia wysokiego poziomu ochrony zdrowia ludzi i środowiska.

W związku z powyższym, przywrócenie pierwotnego stanu wód, powietrza i gleby to problem priorytetowy. Spośród metod stosowanych do neutralizacji zanieczyszczeń występujących w glebie, hałdach czy odpadach, techniki bioremediacji są zazwyczaj bardziej ekonomicznie opłacalne niż tradycyjne metody dekontaminacji. Poza tym, większość zanieczyszczeń

przedostających się do środowiska może być unieszkodliwiane na miejscu skażenia (*in situ*) co czyni procedurę oczyszczania prostszą i bezpieczniejszą. Warto zauważyć, że bioremediacja oparta na naturalnej zdolności mikroorganizmów do degradacji toksycznych zanieczyszczeń zyskała większą akceptację ze strony społeczeństwa niż inne technologie umożliwiające ich usuwanie. Należy pamiętać, że pełna mineralizacja zanieczyszczeń jest zjawiskiem rzadkim. Efektywność bioremediacji gruntów zanieczyszczonych nitrozwiązkami aromatycznymi może być wspomagana przez współdziałanie konsorcjów mikroorganizmów zdolnych do rozkładu różnych związków lub przeprowadzających poszczególne etapy często bardzo złożonych szlaków rozkładu. Takie biopreparaty mogą być również wykorzystane do neutralizacji skutków awarii systemów przesyłowych ropy i jej pochodnych, a także w przypadku katastrof ekologicznych.

W niniejszej pracy przedstawiono przegląd technik stosowanych w bioremediacji związków nitroaromatycznych w większości reprezentujących badania pilotażowe. Pomimo wielu lat badań, w literaturze nadal braknie doniesień o wielkoskalowych eksperymentach. Z drugiej strony istnieje wiele doniesień o nowych systemach usprawniających ten proces. Można się zatem spodziewać, że eksperymenty w większej skali niebawem zostaną przeprowadzone.

## Piśmiennictwo

1. Aiub C.A.F., Mazzei J.L., Pinto L.F.R., Felzenszwalb I.: Evaluation of nitroreductase and acetyltransferase participation in n-nitrosodiethylamine genotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* **161**, 146–154 (2006)
2. Alexander M.: Bioremediation and biodegradation. *J. Environ. Qual.* **32**, 1126–1133 (1999)
3. Ang E.L., Zhao H., Obbard J.P.: Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 487–496 (2005)
4. Angermaier L., Simon H.: On nitroaryl reductase activities in several Clostridia. *Biol. Chem.* **364**, 1653–1664 (1983).
5. Arora P.K., Srivastava A., Singh V.P.: Degradation of 4-chloro-3-nitrophenol via a novel intermediate, 4-chlororesorcinol by *Pseudomonas* sp. *JHN. Sci. Rep.* **4**, DOI: 10.1038/srep04475 (2014)
6. Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. PWN, Warszawa, 2006
7. Backhaus T., Froehner K., Altenburger R., Grimme L.H.: Toxicity testing with *Vibrio fishcheri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. *Cheraospher.* **35**, 2925–2938 (1997)
8. BACTrem Sp. z o.o., <http://www.bactrem.pl/> (29-12-2016)
9. Bhattacharya A., Purohit V.C., Suarez V., Tichkule R., Parmer G., Rinaldi F.: One-step reductive amidation of nitro arenes: application in the synthesis of acetaminophen tm. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1861–1864 (2006)
10. Bojanowska I.: Bioremediacja metali ciężkich i innych zanieczyszczeń z gleby. Materiały Wykładowe – Zakład Inżynierii Środowiska Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego, [www.parasit.ump.edu.pl/seminars/1WL-2/W-3.pdf](http://www.parasit.ump.edu.pl/seminars/1WL-2/W-3.pdf) (04-03-2017)

11. Booth G.: Nitro Compounds, Aromatic (w) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, red. G. Booth, John Wiley & Sons, New York, 2007, s. 302–349
12. Błaszczak M.K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska. PWN, Warszawa, 2007
13. Bruns-Nagel D., Knicker H., Drzyzga O., Butehorn U., Steinbach K., Gemsa D., Low E.: Characterization of 15 n-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state 15n nmr spectroscopy.2.systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1549–1556 (2000)
14. Bugg T.D.H.: Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*. **59**, 7075–7101 (2003)
15. Calza P., Massolino C., Pelizzetti E., Minero C.: Solar driven production of toxic halogenated and nitroaromatic compounds in natural seawater. *Sci. Total Environ.* **398**, 196–202 (2008)
16. de Carvalho C.C.: Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents (w) Biology of *Rhodococcus*, red. H.M. Alvarez, Springer, Berlin Heidelberg, 2010, s. 109–131
17. Cho C.M., Mulchandani A., Chen W.: Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2026–2030 (2002)
18. Coates J.D., Anderson R.T.: Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends Biotechnol.* **18**, 408–412 (2000)
19. Corbett M.D., Corbett B.R.: Bioorganic chemistry of the aryl-hydroxylamine and nitrosoarene functional groups (w) Biodegradation of nitroaromatic compounds, red. J.C. Spain, Springer US., New York, 1995, s. 151–182
20. Crocker F., Blakeney G., Jung C.: Complete degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by a co-culture of *Gordonia* sp. KTR9 and *Methylobacterium* sp. JS178. *Remediation*, DOI: 10.1002/rem.21457 51 (2016)
21. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej 31.05.2008. Komunikat Komisji w sprawie wyników analizy ryzyka i strategii ograniczenia ryzyka stwarzanego przez następujące substancje: 2-nitrotoluen i 2,4-dinitrotoluen (2008/C 134/02).
22. Edwards S.J., Kjellerup B.V.: Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9909–9921 (2013)
23. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS): [https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@na+@rel+Trinitrotoluene \(04-03-2017\)](https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@na+@rel+Trinitrotoluene (04-03-2017))
24. Environmental Protection Agency: Attachment G -list of priority pollutants. [www.waterboards.ca.gov/rwqcb7/board\\_decisions/adopted\\_orders/orders/2005/05\\_0082g.pdf+&cd=1&hl=pl&ct=clnk&gl=pl&client=firefox-b-ab, \(26-12-2016\)](http://www.waterboards.ca.gov/rwqcb7/board_decisions/adopted_orders/orders/2005/05_0082g.pdf+&cd=1&hl=pl&ct=clnk&gl=pl&client=firefox-b-ab, (26-12-2016))
25. Esteve-Núñez A., Caballero A., Ramos J.L.: Biological degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 335–352 (2001)
26. Esteve-Núñez A., Lucchesi G., Philipp B., Schink B., Ramos J.L.: Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *J. Bacteriol.* **182**, 1352–1355 (2000)
27. Esteve-Núñez A., Ramos J.L.: Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. *J. Bacteriol.* **32**, 3802–3808 (1998)
28. European Union Risk Assessment Report: Nitrobenzene (2007): [http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/existing-chemicals/risk\\_assessment/report/nitrobenzenereport305.pdf \(05-03-2017\)](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/existing-chemicals/risk_assessment/report/nitrobenzenereport305.pdf (05-03-2017))
29. Eyer P.: Reactions of nitrosobenzene with reduced glutathione. *Chemico-biological interactions*, **24**, 227–239 (1979)
30. Fuller M.E., Manning J.E.J.: Evidence for differential effects of 2,4,6-trinitrotoluene and other munitions compounds on specific subpopulations of soil microbial communities. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 2185–2195 (1998)
31. Fuller M.E., Manning J.F.: Aerobic gram-positive and gram-negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Curr. Microbiol.* **35**, 77–83 (1997)
32. Funk S.B., Roberts D.J., Crawford D.L., Crawford R.L.: Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2171–2177 (1993)
33. Gellert G.: Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 87–91 (2000)
34. Global security: Explosives – Nitroaromatics (TNT [2,4,6-trinitrotoluene]). [www.globalsecurity.org](http://www.globalsecurity.org) (20-12-2016)
35. Gorontzy T., Kuver J., Blotevogel K.-H.: Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1331–1336 (1993)
36. Guzik U., Wojcieszynska D., Hupert-Kocurek K.: Mikrobiologiczny rozkład związków aromatycznych w warunkach anoksji. *Post. Mikrobiol.* **49**, 217–226 (2010)
37. Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M., Ślaski U., Biochemii K., Kaczorek K.E.: Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych wprowadzenie. *NAFTA-GAZ*, **66**, 1019–1027 (2010)
38. Guzik U.: Charakterystyka biochemiczna i genetyczna enzymów z grupy dioksygenaz, uczestniczących w rozkładzie związków aromatycznych, u wybranych szczepów bakterii. Rozprawa doktorska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice, 2007
39. Haghghi-Podeh M.R., Bhattacharya S.K.: Fate and toxic effects of nitrophenols on anaerobic treatment systems. *Water Sci. Technol.* **34**, 345–350 (1996)
40. Hanstein W.G., Hatefi Y.: Trinitrophenol: a membrane-impermeable uncoupler of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 288–92 (1974)
41. Hatzinger P. B., Kelsey J. W. R.: Biodegradation (w) Encyclopedia of Soils in the Environment, red. D. Hillel, Elsevier, New York, 2005, s. 250–258
42. Hepworth J.D., Waring D.R., Waring M.J.: Chemia związków aromatycznych. PWN, Warszawa, 2009
43. Hess T., Schmidt S., Silversstein J., Howe B.: Supplemental substrate enhancement of 2,4-dinitrophenol mineralization by a bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1551–1558 (1990)
44. Islam M.N., Shin M.S., Jo Y.T., Park J.H.: TNT and RDX degradation and extraction from contaminated soil using subcritical water. *Chemosphere*, **119**, 1148–1152 (2015)
45. Johnson G.R., Spain J.C.: Evolution of catabolic pathways for synthetic compounds: bacterial pathways for degradation of 2,4-dinitrotoluene and nitrobenzene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 110–123 (2003)
46. Ju K.S., Parales R.E.: Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 250–72 (2010)
47. Kadiyala V., Nadeau L.J.: Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to ortho-aminophenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6520–6526 (2003)
48. Kanekar P., Dautpure P., Sarnaik S.: Biodegradation of nitro-explosives. *Indian J. Exp. Biol.* **41**, 991–1001 (2003)
49. Kao C., Lin B., Chen S., Wei S., Yao C., Chien C.: Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by indigenous microorganisms from TNT-contaminated soil, and their application in TNT bioremediation. *Bioremediation J.* **9868**, 1547–6529 (2016)
50. Karlová P., Gelbíčová T., Sedláček I.: Substrate interactions between 4-nitrophenol and 4-nitrotoluene during biodegradation of their mixture. *Desalin. Water Treat.* **57**, 2759–2765 (2016)
51. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji – 4-nitroanilina, zgodnie z Roz. MZ z dnia 03.07.2002 r., PN-ISO 11014-1 i Dyrektywą 91/155/EEC



52. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji – dinitrotoluen, 22 grudnia 2008 r. Na podstawie zał. II do Roz. WE 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r.
53. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji – nitrobenzen, zgodnie z Roz. MZ z dnia 03.07.2002 r., PN-ISO 11014-1 i Dyrektywą 91/155/EEC
54. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji MERC – 2,4-dinitrofenol, zgodnie z Roz. WE 1907/2006
55. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji MERC – 2-nitrofenol, zgodnie z Roz. WE 1907/2006
56. Kinouchi T., Yoshinari O.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 596–604 (1983)
57. Klausmeier R.E., Osmon J.L., Walls D.R.: The effect of trinitrotoluene on microorganisms. *Dev. Ind. Microbiol.* **15**, 309–317 (1973)
58. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawelczyk A.: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska. Oficyna wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2005
59. Krygowski T.M. i wsp.: Chemia – encyklopedia szkolna. WSiP, Warszawa, 2001
60. Kulkarni M., Chaudhari A.: Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *J. Environ. Manage.* **85**, 496–512 (2007)
61. Kundu D., Hazra C., Chaudhari A.: Bioremediation potential of *Rhodococcus pyridinivorans* NT2 in nitrotoluenes contaminated soils: The effectiveness of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation approaches. *Soil Sediment Contam.* DOI: 10.1080/15320383.2016.1190313 (2016)
62. Lague D.: China blames oil firm for chemical spill. The New York Times, <http://www.nytimes.com/2005/11/24/world/asia/24iht-harbin.html> (29-12-2016)
63. Lang M., Spittler P., Hellwig V., Steglich W.: Stephanosporin, a “traceless” precursor of 2-chloro-4-nitrophenol in the *Gasteromyces* *Stephanospora caroticolor*. *Angew. Chemie – Int. Ed.* **40**, 1704–1705 (2001)
64. Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L.: Bioremediation of soils contaminated with explosives. *J. Environ. Manage.* **70**, 291–307 (2004)
65. Lin H., Chen X., Ding H., Jia X., Zhao Y.: Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. NB5 capable of degrading a high concentration of nitrobenzene. *J. Basic Microbiol.* **51**, 397–403 (2011)
66. Liu N., Ding F., Wang L., Liu P., Yu X., Ye K.: Coupling of bio-prb and enclosed in-well aeration system for remediation of nitrobenzene and aniline in groundwater. *Env. Sci Pollut Res.* DOI: 10.1007/s11356-016-6206-3 (2016)
67. Maples K.R., Eyer P., Manson R.P.: Aniline-, phenylhydroxylamine-, and hemoglobin thyl free radical formation *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* **37**, 311–318 (1989)
68. Mason R.P., Holtzman J.L.: The role of catalytic superoxide formation in the o<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1267–1274 (1975)
69. McCormick N.G., Feeherry F.E., Levinson H.S.: Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 949–958 (1976)
70. McMurry J.: Chemia organiczna. Tom 3. PWN, Warszawa, 2013
71. Nielsen L.E., Nielsen L.E., Nickerson K.W., Nickerson K.W.: Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in. *Microbiology*, **71**, 5171–5176 (2005)
72. Nishino N., Atkinson R., Arey J.: Formation of nitro products from the gas-phase oh radical-initiated reactions of toluene, naphthalene, and biphenyl: effect of NO<sub>2</sub> concentration. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 9203–9209 (2008)
73. Nishino S.F., Paoli G.C.: Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2139–2147 (2000)
74. Nishino S.F., Spain J.C.: Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2308–2313 (1995)
75. Otto K., Hofstetter K., Röthlisberger M., Witholt B., Schmid A.: Biochemical characterization of styab from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible mono-oxygenase. *J. Bacteriol.* **186**, 5292–5302 (2004)
76. Oves M., Saghir Khan M., Huda Qari A., Nadeen Felemban M., Almeelbi T.: Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. *J. Bioremediat. Biodegrad.* **7**, DOI: 10.4172/2155-6199.1000334 (2016)
77. Pacheco A.de O., Kagohara E., Andrade L.H., Comasseto J.V., Crusius I.H.S., Paula C.R., Porto A.L.M.: Biotransformations of nitro-aromatic compounds to amines and acetamides by tuberous roots of *Arracacia xanthorrhiza* and *Beta vulgaris* and associated microorganism (*Candida guilliermondii*). *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 65–69 (2007)
78. Paracetamol – informacja od wytwórcy: <http://web.archive.org/web/20130407031450/http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/paracetamol/pharmwebpicg.html> (04-03-2017)
79. Peres C.M., Agathos S.N.: Biodegradation of nitroaromatic pollutants: from pathways to remediation. *Biotechnol. Annu. Rev.* **6**, 197–220 (2000)
80. Peterson J., Mason P., Hovsepian J., Holtzman J.: Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**, 4009–4014 (1979)
81. Qureshi A., Purohit H.: Isolation of bacterial consortia for degradation of p-nitrophenol from agricultural soil. *Ann. Appl. Biol.* **140**, 159–162 (2002)
82. Radi R.: Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS*, **101**, 4003–4008 (2003)
83. Ramos J.L., González-Pérez M.M., Caballero A., Dillewijn P. Van: Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 275–281 (2005)
84. Razo-Flores E., Donlon B., Lettinga G., Field J.A.: Biotransformation and biodegradation of n-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 525–538 (1997)
85. Rieger P.G., Knackmuss H.J.: Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil (w) Biodegradation of nitroaromatic compounds. red. J.C. Spain, Springer US, New York, 1995, s. 1–18
86. Roldán M.D., Pérez-Reinado E., Castillo F., Moreno-Vivián C.: Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x (2008)
87. Sax I.R., Lewis R.J.: Nitro-compounds of aromatic hydrocarbons. *Dangerous properties of industrial material*, **2**, 2534–2536 (1999)
88. Schrader P.S., Hess T.F.: Bioremediation and biodegradation coupled abiotic-biotic mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in soil slurry. *J. Environ. Qual.* **33**, 1202–1209 (2004)
89. Shao P., Yuan X., Liu R., Cao J.P.: Effects of nitrobenzene on liver antioxidant defense system of *Carassius auratus*. *Chem. Res. Chinese Univ.* **26**, 204–209 (2010)
90. Sheu Y.T., Lien P.J., Chen C.C., Chang Y.M., Kao C.M.: Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated groundwater using unique bacterial strains: microcosm and mechanism studies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **13**, 1357–1366 (2016)
91. Siciliano S.D., et al.: Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, DOI: 10.1128/AEM.67.6.2469-2475.2001 (2001)



92. Smitha M.S., Singh R., Liu H.-J.: Novel bacillus consortium for degradation of 2,4-dinitrotoluene: a xenobiotic compound. *Br. Microbiol. Res. J.* **15**, 1–10 (2016)
93. Snellinx Z., Taghavi S., Vangronsveld J., Lelie D., Van Der: Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: isolation and characterisation. *Biodegradation*, **14**, 19–29 (2003)
94. Somerville C.C., Nishino S.F., Spain J.C.: Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **177**, 3837–3842 (1995)
95. Spain J.C., Hughes J.B., Knackmuss H.J.: Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press, Boca Raton, 2000
96. Spain J.C.: Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions (w) Biodegradation of Nitroaromatic Compounds, red. J.C. Spain, Springer Science+Business Media, New York, 1995, s. 19–35
97. Spain J.C.: Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Rev. Microbiol.* **49**, 523–555 (1995)
98. Spain J.C., Gibson D.T.: Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 812–819 (1991)
99. Suen W.C., Haigler B.E., Spain J.C.: 2,4-dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* **178**, 4926–4934 (1996)
100. Talmage S.S., Opresko D.M., Maxwell C.J., Welsh C., Cretella F.M., Reno P.H., Daniel F.B.: Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Re. Environ. Contam. Toxicol.* **161**, 1–156 (1999)
101. Travis E.R., Hannink N.K., Van Der Gast C.J., Thompson I.P., Rosser S.J., Bruce N.C.: Impact of transgenic tobacco on trinitrotoluene (TNT) contaminated soil community. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5854–5861 (2007)
102. Travis A.S.: Manufacture and uses of the anilines: a vast array of processes and products. *Chemistry of Functional Groups*. DOI: 10.1002/9780470682531.pat0395 (2007)
103. Tyagi M., da Fonseca M.M.R., de Carvalho C.C.C.R.: Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, **22**, 231–241 (2011)
104. Unell M., Kabelitz N., Jansson J.K., Heipieper H.J.: Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 138–143 (2007)
105. Vaillancourt E.H., Bolin J.T., Eltis L.D.: The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 241–267 (2006)
106. Vorbeck C., Lenke H., Fischer P., Knackmuss H.J.: Identification of a hydride-meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a mycobacterium strain. *J. Bacteriol.* **176**, 932–934, 1994
107. Wakefield J.C.: Nitrobenzene toxicological overview. Health Protection Agency, [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/338243/hpa\\_nitrobenzene\\_toxicological\\_overview\\_v1.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/338243/hpa_nitrobenzene_toxicological_overview_v1.pdf) (20-12-2016)
108. World Health Organization: Nitrobenzene. Environmental health criteria 230. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc230.htm> (19.12.2016)
109. Widrig D.L., Boopathy R., Manning J.F.: Bioremediation of TNT-contaminated soil: a laboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1141–1148 (1997)
110. Winkler R., Hertweck C.: Biosynthesis of nitro compounds. *Chem. BioChem.* **8**, 973–977 (2007)
111. Williamson K.L.: Macroscale and microscale organic experiments. Houghton-Mifflin, Boston, 2002
112. World Health Organization: International Programme on Chemical Safety, <http://www.inchem.org/pages/ehc.html> (04-03-2017)
113. Wójcik P., Tomaszewska B.: Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych. *Biotechnologia*, **4**, 156–172 (2005)
114. Wu Z., Liu Y., Liu H., Xia Y., Shen W., Hong Q., Li S., Yao H.: Characterization of the nitrobenzene-degrading strain *Pseudomonas* sp. A3 and use of its immobilized cells in the treatment of mixed aromatics wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2679–2687 (2012)
115. Zeyer J., Kocher H.P., Timmis K.N.: Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 334–339 (1986)
116. Ziegenfuss P.S., Williams R.T., Weston R.F., Chester W., Myler C.A.: Hazardous materials compostion. *J. Hazard. Mater.* **28**, 91–99 (1991)