

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Dyscyplina naukowa – biotechnologia
Dziedzina nauk – nauki ścisłe i przyrodnicze

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Pola Łomża-Kalinowska

**Mikrobiologiczna dehalogenacja – charakterystyka i zastosowanie
bakterii metabolizujących halogenowane związki organiczne**

Promotor
dr hab. inż. Agnieszka Tabernacka, prof. uczelni

Warszawa, 2024

Dziękuję
dr hab. inż. Agnieszce Tabernackiej, prof. uczelni

za opiekę naukową i ogromną życzliwość

prof. dr hab. Monice Załęskiej-Radziwiłł
Kierownikowi Zakładu Biologii

za cenne uwagi

Wszystkim pracownikom Zakładu Biologii,

za wspaniałą atmosferę pracy

Spis treści

Streszczenie.....	6
Abstract.....	7
Wykaz skrótów.....	8
1. Wstęp.....	9
1.1. Halogenowane związki organiczne – ogólna charakterystyka	9
1.2. Pestycydy stanowiące halogenowane związki organiczne	12
1.3. Przemiany HZO w środowisku	17
1.4. Potencjał mikroorganizmów do oczyszczania środowisk zanieczyszczonych HZO	18
1.5. Metabolizm halogenowych związków organicznych	19
1.6. Biologiczne procesy oczyszczania środowisk zanieczyszczonych	24
1.7. Bioremediacja halogenowanych związków organicznych – perspektywy	28
2. Cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze	33
3. Materiały i metody.....	35
3.1. Etapy przeprowadzonych badań.....	35
3.2. Materiały analityczne.....	38
3.3. Organizmy wykorzystywane w badaniach.....	41
3.4. Opis miejsc poboru próbek gruntów.....	41
3.5. Metody analityczne.....	42
3.6. Procedury obliczeniowe stosowane w testach ekotoksyczności.....	58
4. Wyniki i dyskusja.....	60
4.1. Analizy fizykochemiczne próbek środowiskowych	60
4.2. Wyniki analiz metagenomów	64
4.3. Izolacja, selekcja i charakterystyka mikroorganizmów.....	77
4.4. Charakterystyka genetyczna konsorcjów bakteryjnych – potencjał genetyczny konsorcjów do przeprowadzania procesów dehalogenacji.....	82
4.5. Symulacje biotransformacji HZO.....	88
4.6. Usuwanie 2,4-D.....	94
4.7. Testy ekotoksyczności.....	101
4.8. Porównanie toksyczności 2,4-D i jego głównych metabolitów.....	104
4.9. Analiza jakości wody.....	109
5. Podsumowanie.....	112
6. Wnioski	115
Finansowanie badań.....	118
Spis literatury.....	119
Spis figur	132

Streszczenie

Halogenowane związki organiczne (HZO) stanowią poważny problem dla środowiska. Na terenach rolniczych głównym źródłem HZO są stosowane na szeroką skalę środki ochrony roślin. Wiele z nich jest wysoce toksycznych i gromadzi się zarówno w glebie, osadach jak i w organizmach. Ich biologiczna przemiana odbywa się poprzez dehalogenację, podczas której podstawniki halogenowe oddzielają się od węgla w związku organicznym przy udziale enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy. Zwiększa to rozpuszczalność i biodostępność związków w wodzie, często zmniejsza toksyczność i sprawia, że powstały związek staje się bardziej podatny na biodegradację. W niniejszej pracy przeprowadzono ocenę potencjału mikroorganizmów do przeprowadzenia procesu dehalogenacji na podstawie analizy metagenomów środowisk zbliżonych do naturalnych oraz środowisk poddanych antropopresji. Metagenomy wszystkich poddanych badaniu środowisk posiadały geny kodujące enzymy zaangażowane w procesy dehalogenacji. Przeprowadzone analizy chemiczne zawartości HZO, w tym chlorowanych pestycydów, zawartości halogenów, metali ciężkich oraz produktów ropopochodnych, nie wykazały zanieczyszczeń analizowanych środowisk metalami ciężkimi, produktami ropopochodnymi, ani pestycydami, za wyjątkiem jednego stanowiska gruntów rolnych, gdzie odnotowano podwyższoną ponad dopuszczalną zawartość 4,4'-DDE. Skonstruowano cztery konsorcja bakteryjne (Rozt, Rol, Ocz, Rop) zdolne do biotransformacji wybranych chlorowanych pestycydów. Bakterie wchodzące w skład konsorcjów zawierały w swoich genomach geny, których produkty zaangażowane są w procesy dehalogenacji. Konsorcjów użyto następnie w symulacjach biotransformacji herbicydu 2,4-D oraz 4-chlorofenolu (4-CP). Efektywność biotransformacji 2,4-D wynosiła 100% w czasie 4-15 dni w zależności od użytego konsorcjum i stężenia początkowego herbicydu (2,1 g/l i 4,2 g/l), oraz dla 4-CP 60-82% w czasie 8 miesięcy (stężenie początkowe 0,025 g/l). W próbkach płynów hodowlanych po 100% ubytku 2,4-D oznaczano jego metabolit – 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP), który po 55 dniach prowadzenia symulacji był nadal obecny w płynach hodowlanych w stężeniach 0,009-0,02 g/l, w zależności od użytego konsorcjum. W końcowym etapie badań przeprowadzono testy ekotoksyczności 2,4-D oraz metabolitów jego biotransformacji (głównie 2,4-DCP), na glonach, skorupiakach oraz roślinach wyższych, które wykazały szkodliwy i toksyczny wpływ 2,4-D i 2,4-DCP na testowane organizmy.

Słowa kluczowe: mikroorganizmy, bioremediacja środowisk, biotransformacja, halogenowane związki organiczne, chlorowane pestycydy, 2,4-D.

Abstract

Halogenated organic compounds (HOC) pose a serious problem for the environment. In agricultural areas, the main source of HOC are plant protection products used on a large scale. Many of them are highly toxic and accumulate in soil, sediments and organisms. Their biological transformation takes place through dehalogenation, during which halogen substituents are separated from carbon in an organic compound using enzymes produced by microorganisms. This increases the solubility and bioavailability of compounds in water, often reduces toxicity and makes the resulting compound more susceptible to biodegradation. In this study, the potential of microorganisms to carry out the dehalogenation process was assessed based on the analysis of metagenomes of environments close to natural and environments subject to anthropopressure. The metagenomes of all studied environments contained genes encoding enzymes involved in dehalogenation processes. Metagenomic analyzes were supplemented with chemical analyzes of the content of HOC, including chlorinated pesticides, the content of halogens, heavy metals and petroleum products. These analyzes did not reveal any contamination of the analyzed environments with heavy metals or petroleum products, only samples from one site of agricultural land showed higher than permissible concentrations of 4,4'-Dichlorodiphenyldichloroethylene (4,4'-DDE), in other cases no pesticide contamination was recorded. In the next stages of research, four bacterial consortia (Rozt, Rol, Ocz, Rop) able to biotransformation of selected chlorinated pesticides were constructed. Bacteria genomes from constructed consortia contained genes encoding enzymes involved in dehalogenation processes. The consortia were then used in a simulation of the biotransformation of the herbicide 2,4-D and 4-chlorophenol (4-CP), the efficiency of the biotransformation of 2,4-D was 100% within 4-15 days depending on used consortium (concentrations of herbicide 2.1 g/l and 4.2 g/l), and for 4-CP 60-82% during 8 months (used concentration: 0.025 g/l). In samples of culture fluids, after 100% loss of 2,4-D, its metabolite - 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) was identified; after 55 days of simulation, it was present in culture fluids at concentrations of 0.009-0.02 g/l, depending on used consortium. In the final stage of the research, ecotoxicity tests of 2,4-D and its biotransformation metabolites (mainly 2,4-DCP) were studied on algae, crustaceans and higher plants, which showed the harmful and toxic effect of 2,4-D and 2,4-DCP on the tested organisms.

Keywords: microorganisms, bioremediation, biotransformation, halogenated organic compounds, chlorinated pesticides, 2,4-D.

Wykaz skrótów zastosowanych w pracy:

HZO – halogenowane związki organiczne

ŚOR – środki ochrony roślin

2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy

2,4-DCP – 2,4-dichlorofenol

4-CP – 4-chlorofenol, *p*-chlorofenol

tpm – transkrypty na milion odczytów

jtk – jednostki tworzące kolonie

HTG – horyzontalny transfer genów

1. Wstęp

Intensywny rozwój rolnictwa oraz przemysłu chemicznego przyczynił się do zwiększenia produkcji halogenowanych związków organicznych (HZO), które trafiają do środowiska w znacznych ilościach. Stosowanie na masową skalę w każdej niemal części świata, a zwłaszcza w krajach rozwiniętych środków ochrony roślin (ŚOR), stanowiących HZO, prowadzi do zanieczyszczeń środowisk gruntowo-wodnych, w tym wód gruntowych i powierzchniowych. HZO wykazują wysoką toksyczność oraz tendencję do akumulacji w środowisku, negatywnie oddziałując na całe ekosystemy. Wiele spośród HZO w tym ŚOR znalazło się na liście priorytetowych zanieczyszczeń Unii Europejskiej oraz Stanów Zjednoczonych.

W obliczu szybkiego wzrostu zużycia ŚOR skutkującego występowaniem zanieczyszczeń środowisk gruntowo-wodnych, remedium wydaje się wykorzystanie biotechnologii, jako technologii przyjaznej środowisku. Zastosowanie w tym przypadku mikroorganizmów zdolnych do przekształcania związku toksycznego w mniej toksyczną pochodną lub do całkiem nietoksycznego produktu, który inne drobnoustroje mogą wykorzystać jako źródło węgla i energii, prowadząc do jego całkowitego usunięcia, wydaje się być słusznym podejściem.

Mikroorganizmy na przestrzeni czasu wykształciły mechanizmy detoksykacji, a także matabolizowania HZO, poprzez wytwarzanie specyficznych i niespecyficznych enzymów atakujących HZO, co prowadzi do ich biotransformacji, a w efekcie do ich usunięcia. Informacja o tych aktywnych białkach zawarta jest w bakteryjnym genomie, a jej poznanie pozwala przewidywać, czy dany zespół mikroorganizmów posiada zdolność do efektywnej transformacji HZO. Stąd w niniejszej pracy podjęto badania nad określeniem genetycznego potencjału bakterii różnych środowisk (przekształconych przez człowieka i tych zbliżonych do naturalnych na terenie Polski) do biotransformacji HZO. Podjęto również badania nad określeniem czynników promujących wzrost efektywności mikrobiologicznych procesów dehalogenacji związków organicznych.

1.1. Halogenowane związki organiczne – ogólna charakterystyka

Halogenowane związki organiczne powstają na skutek przyłączenia grupy halogenowej, którą stanowią pierwiastki wchodzące w skład 17. grupy układu okresowego - F, Cl, Br, I, z węglem organicznym. Przyłączenie podstawnika halogenowego do związku organicznego zmienia znacząco jego właściwości.

Halogeny są silnie ujemne, a siła wiązania węgiel-halogen zmienia się w zależności od halogenu. Wiązanie węgiel-fluor jest bardzo mocne i stabilne, o wysokiej polarności. Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej halogenu energie wiązań węgiel-halogen maleją w następującej kolejności: $F > Cl > Br > I$. Cząsteczki zawierające wiązania węgiel-halogen mogą mieć różne dipole. W przypadkach, gdy obecny jest fluor lub chlor, molekularne momenty dipolowe mogą być wysokie, zmieniając rozpuszczalność związku w wodzie i dramatycznie wpływając na jego temperatury topnienia i wrzenia. W innych układach dipol cząsteczkowy może być mniejszy, albo z powodu mniej polarnych wiązań z halogenami (np.: dla Br i I), albo z powodu rozmieszczenia tych atomów w większej cząsteczce (Dolfing, 2016). Efekt przyciągania elektronów przez podstawnik halogenowy wpływa na reaktywność chemiczną cząsteczki oraz wymianę ciepła (transfer ciepła) i właściwości dielektryczne. Dodatkowo rozmiar oraz kształt podstawnika halogenowego może wpływać na reaktywność ze względu na efekt steryczny. Podstawnik halogenowy może zmieniać i często zwiększać toksyczność cząsteczki do której został przyłączony. Wraz ze wzrostem ilości podstawników halogenowych zwykle obserwowany jest wzrost toksyczności związku organicznego.

Odkrycie właściwości halogenowych związków organicznych spowodowało, że znalazły one szerokie zastosowanie w przemyśle i rolnictwie. Są one wykorzystywane do produkcji materiałów opóźniających zapłon (bromowane związki organiczne), plastyfikatorów (chlorowane parafiny), biocydów (chlorofenole), substancji chłodzących, smarujących, hydrofobowych czy rozpuszczających tłuszcze (Varenikov i in., 2020), a także do produkcji rozpuszczalników, farb, antybiotyków, farmaceutyków i środków ochrony roślin (Häggbloom, i Bossert, 2003).

Zmniejszenie rozpuszczalności w wodzie, przy jednoczesnym wzroście rozpuszczalności w tłuszczach związku organicznego z podstawioną grupą halogenową, wpływa na ograniczenie biodostępności HZO i znacząco zmniejsza poziom ich biodegradacji. Zwiększa to ryzyko ich odkładania w tkankach tłuszczowych zwierząt wyższych i człowieka oraz może zwiększać toksyczność takiego związku.

Związki te charakteryzują się ponadto wysokim stopniem trwałości i akumulacji w środowisku, a także teratogennością i kancerogennością. Szybkie tempo rozwoju przemysłu, a także intensywny system produkcji rolnej przyczynia się do wprowadzania do środowiska coraz większych ilości HZO, powodując lokalne zanieczyszczenia, stanowiące zagrożenie dla organizmów i problem dla środowiska poprzez negatywny wpływ na ekosystemy (Gribble, 1994; Song i in, 2000; Rubilar i in, 2008; Adrian i Löffler, 2016).

Spośród 36 trwałych zanieczyszczeń organicznych (ang. *persistent organic pollutants*-POPs) wymienionych w Konwencji sztokholmskiej (stan na 2023 r.), 18 stanowią pestycydy. Wszystkie te związki stanowią HZO, które są produkowane głównie do zastosowań przemysłowych i rolniczych. POPs są definiowane jako niebezpieczne substancje chemiczne, odporne na transformacje i degradacje, akumulujące w środowisku i tkankach tłuszczowych, o toksycznym wpływie na organizmy w tym człowieka. Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (EPA) wymienia 69 HZO na liście 126 priorytetowych substancji zanieczyszczających środowisko (US EPA, 2002).

Jednak warto zauważyć, iż halogenowe związki organiczne były obecne na Ziemi przed pojawieniem się człowieka, nie stanowiąc wówczas poważnego zagrożenia dla ekosystemów oraz powłoki ozonowej. Obecnie poznanych zostało ponad 5000 HZO naturalnego pochodzenia, choć badacze szacują, że jest ich znacznie więcej, a około dwustu nowych związków jest odkrywanych każdego roku (Gribble, 2004; 2010). Do niedawna uważano również, że halogenowane węglowodory aromatyczne są ksenobiotykami, dziś wiadomo, że mogą być pochodzenia naturalnego (Gribble, 1992).

Najliczniej występującymi w środowisku naturalnym HZO są te zawierające chlor i brom, w mniejszej ilości jod, najmniej licznie reprezentowane są związki zawierające fluor. Pochodzenie naturalnych HZO związane jest z przemianami geochemicznymi związanymi z wysoką temperaturą oraz podwyższonym ciśnieniem. Powstają zatem na skutek erupcji wulkanów, pożarów lasów oraz spalania biomasy zawierającej nieorganiczne związki chloru, bromu, fluoru czy jodu, które w takich warunkach mogą łączyć się ze związkiem organicznym tworząc jego halogenową pochodną (Gribble, 1994; Jordan i in, 2000). HZO mogą być także produkowane przez najróżniejsze organizmy, jak np.: bakterie, grzyby, gąbki, porosty, glony, rośliny, mięczaki, meduzy, owady czy ssaki (Oberg, 1998; Hoekstra i in, 1999; Gribble 2015). Szacuje się, że roczna produkcja bromometanu w oceanach to około 56 tys. ton, a bromoformu 1-2 milionów ton. Pożary biomasy emitują od 20 tys. do 50 tys. ton bromometanu rocznie (Gribble 1999), podczas gdy całkowita produkcja przemysłowa bromometanu w 1990 wynosiła ok. 66 tys. ton, w 1999 71,5 tys. ton. Według Hägglöm i Bossert (2003) naturalna produkcja chlorometanu wynosi rocznie nawet do 8 milionów ton, co przewyższa stukrotnie ilość przemysłowo syntetyzowanego związku. Przykładowe ilości produkowanych przez człowieka HZO przedstawiono w tabeli 1.

Produkowanymi przez organizmy HZO są np.: metabolity, hormony (np.: trijodotyronina, tyroksyna), antybiotyki (np.: chloramfenikol, chlorotetracyklina), biocydy. Głównym celem ich produkcji przez organizmy jest ochrona przed drapieżnikami i zapewnienie

przestrzeni do życia, a tym samym odstraszenie innych osobników. Wciąż jednak funkcje wielu naturalnych HZO są nieznane (Gribble 1999, 2012, 2015; Agarwal i in. 2017).

Tabela 1. Roczna produkcja wybranych halogenowanych związków organicznych.

związek	Ilość [tony]	rok	miejsce	literatura
chloroeten (chlorek winylu)	62 mln	2016	świat	Schellerer i in., 2016
chloroform (trichlorometan)	254 000	1994	USA	
1,2-dichloroeten	8 mln	1993	USA	Häggbloom i
chlorometan	358 000	1993	USA	Bossert,
1,1,1-trichloroetan	205 000	1993	USA	2003
dichloroetan	160 000	1993	USA	
tetrachlorometan	140 000	1991	USA	
tetrachloroeten	125 000	1993	USA	
chloroetan	70 000	1990	USA	
DDT	3772	2014	świat	van den Berg i in., 2017

Wprowadzane do środowiska przez człowieka HZO są trudno degradowalne i akumulują w znacznej mierze w środowiskach beztlenowych, w których ich rozkład przebiega znacznie wolniej, aczkolwiek większość polihalogenowanych związków organicznych ulega biologicznej transformacji jedynie w warunkach beztlenowych. Obserwuje się, że im wyższa ilość przyłączonych grup halogenowych, tym niższa podatność na tlenową degradację takich związków (Häggbloom i Bossert, 2003; Bedard, 2008; Matturro i in., 2016; Needham i in., 2019; Botti i in., 2023).

1.2. Pestycydy stanowiące halogenowane związki organiczne

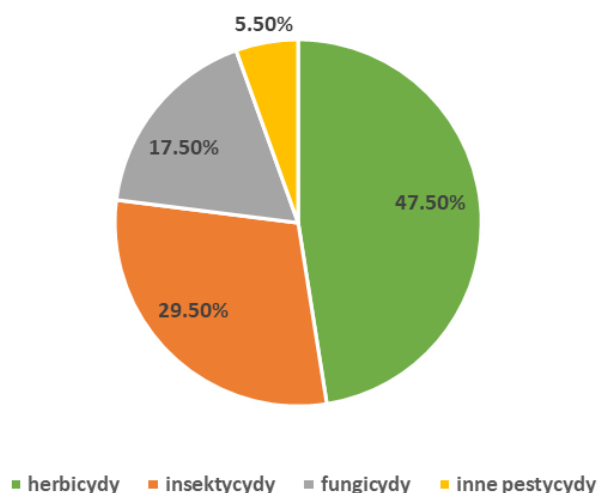
Pestycydy to substancje stosowane jako środki ochrony roślin, które zapobiegają, niszczą lub kontrolują szkodliwe organizmy, jak np.: insekty, grzyby lub chwasty, współzawodniczące z roślinami uprawnymi o przestrzeń i zasoby. Ponadto pestycydy chronią rośliny lub produkty roślinne podczas produkcji, przechowywania i transportu. Ich stosowanie zapewnia wiele korzyści, takich jak zwiększona produkcja żywności i ograniczenie chorób przenoszonych przez owady. Pestycydy dzielą się na kilka typów, w tym chloroorganiczne,

fosforoorganiczne, karbaminiany, pyretroidy, triazyny i neonikotynoidy. Wiele z nich to niebezpieczne chemikalia, odporne na degradację i transformację, gromadzące się w środowisku i tkance tłuszczowej oraz wykazujące wysoką toksyczność dla organizmów, w tym człowieka.

Pestycydy są uwalniane do środowiska głównie w wyniku ich stosowania na gruntach rolnych oraz w celu zwalczania szkodników poza rolnictwem na obszarach niezabudowanych, w parkach, na trawnikach i ogrodach, chodnikach, oraz na terenach komercyjnych (WHO, 2011). Transport pestycydów do wód gruntowych odbywa się poprzez migrację wód opadowych lub przez systemy nawadniające. Pestycydy i produkty ich transformacji (często w literaturze nazywane również metabolitami) są transportowane z wodami gruntowymi na duże odległości. Niektóre z nich mogą zostać zatrzymane w glebie i warstwie wodonośnej, a kierunek i odległość ich migracji do wód gruntowych i w ich obrębie jest trudny do przewidzenia. Zarówno pestycydy, jak i produkty ich transformacji mogą przedostawać się bezpośrednio do wód gruntowych przez strefę ruchomą, ale niektóre związki są uwięzione w strefach nieruchomych i mogą być stopniowo uwalniane do wód gruntowych poprzez wypłukiwanie i dyfuzję, czasem nawet długo po uwolnieniu do środowiska (WHO, 2011; Swartjes i Van der Aa 2020; Baran i in., 2021).

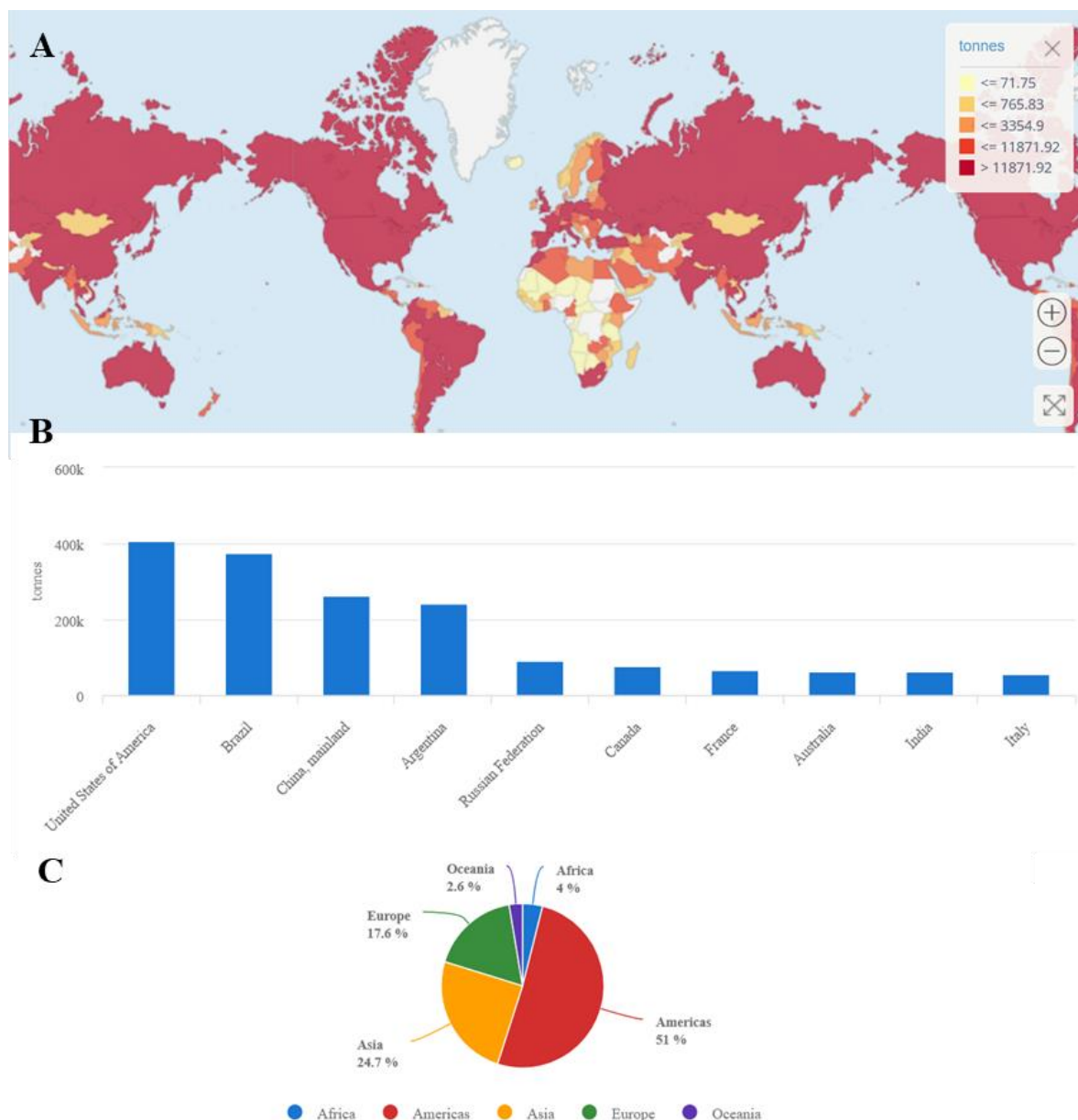
1.2.1. Produkcja i stosowanie pestycydów oraz ich wpływ na ekosystemy

W 2020 roku światowe roczne zużycie pestycydów wyniosło około 2,7 mln ton (wg FAOSTAT), z czego 47,5% to herbicydy, 29,5% to insektycydy, 17,5% to fungicydy, a 5,5% to inne pestycydy (Sharma i in., 2019) (wykres 1).



Wykres 1. Roczne zużycie pestycydów - udział poszczególnych grup pestycydów (wg Sharma i in., 2019).

Dziesięć krajów o największym zużyciu pestycydów na świecie to Stany Zjednoczone, Brazylia, Chiny, Argentyna, Rosja, Kanada, Francja, Australia, Indie i Włochy (wykres 2). Zużycie pestycydów w Polsce w 2020 roku szacowane jest na około 24 tys. ton (dane wg FAOSTAT, 2020). Szacuje się, że do 2026 roku światowe zużycie pestycydów wzrośnie do 4,4 miliona ton (wg Reportlinker).



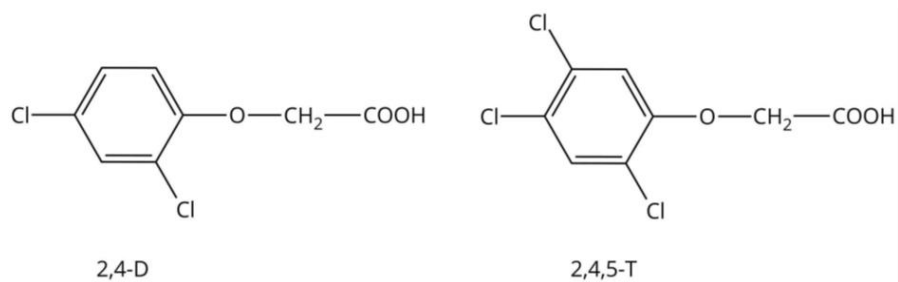
Wykres 2. Roczne zużycie pestycydów w 2020 roku: **A** – na świecie w tonach, **B** – w tonach, przez dziesięciu największych konsumentów, **C** – na świecie w procentach (FAOSTAT 2020).

Według danych Eurostatu w 2016 roku we Francji zużyto ponad 30 tys. ton herbicydów, w Hiszpanii i Niemczech ponad 15 tys. ton, w Polsce i Wielkiej Brytanii odpowiednio 13 tys.

ton i 10 tys. ton oraz 7,5 tys. ton we Włoszech; zużycie fungicydów wyniosło około 39 tys. ton w Hiszpanii, 3 tys. ton we Włoszech, 32 tys. ton we Francji, 12 tys. ton w Niemczech, 7,5 tys. ton w Polsce, 5 tys. ton w Wielkiej Brytanii. Według FAOSTAT w 2016 r. średnie zużycie pestycydów na hektar wyliczono na 2,66 kg. Szacuje się, że tylko 1 do 10% pestycydów dociera do organizmu docelowego (Arias-Estevéz i in., 2008), co oznacza, że pozostałe zanieczyszczenia mają wpływ na pożyteczne owady, ssaki i kręgowce. Pestycydy powodują utratę korzystnej mikroflory glebowej, zmianę bilansu azotu (N), działanie fitotoksyczne, gromadzenie się w sieci pokarmowej i niekorzystne skutki dla organizmów symbiotycznych (Jacobsen i Hjelmso, 2014; Brogan i Relyea, 2017), a w rezultacie pogorszenie jakości i warunków biotycznych środowisk gruntowo-wodnych. W Polsce aktualnie dopuszczonych do użytku jest 271 aktywnych substancji wchodzących w skład pestycydów, a w całej Unii Europejskiej 446 (wg Komisji Europejskiej, 2023).

1.2.2. Herbicydy fenoksyłowe

Herbicydy stanowiące pochodne kwasu fenoksykarboksylowego, powstają na drodze przyłączenia do pierścienia fenyłowego co najmniej jednego atomu chloru. Środki te są strukturalnie podobne do naturalnej auksyny, która jest hormonem roślinnym odpowiadającym za regulację wzrostu, stąd są wykorzystywane do zwalczania chwastów szerokolistnych w różnych uprawach rolnych. Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), jest najpowszechniej stosowanym herbicydem należącym do grupy chlorofenoksyłowej/kwasów fenoksykarboksylowych i drugim za glifosatem najczęściej stosowanym herbicydem na świecie. 2,4-D jest jednym z najwcześniej opracowanych herbicydów fenoksykarboksylowych (1944), a także jednym z najbardziej znanych, ze względu na jego fitotoksyczne zastosowanie przez wojsko amerykańskie w wojnie w Wietnamie (w latach 1961–1971) jako tzw.: Agent Orange. Prócz 2,4-D w skład Agent Orange wchodził także kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T) (ryc. 1.), wycofany z obrotu jako środek ochrony roślin.



Rycina 1. Wzory strukturalne 2,4-D i 2,4,5-T.

Herbicydy z grupy kwasów fenoksykarboksylowych są powszechnie stosowane głównie ze względu na niski koszt i skuteczność działania (Islam i in., 2018). Są one produkowane na szeroką skalę od lat 50-tych XX wieku. W Unii Europejskiej, 2,4-D jest dopuszczony do użytku do końca 2030 roku (baza pestycydów Komisji Europejskiej, 2023) i wchodzi w skład licznych preparatów ochrony roślin. Obecnie na świecie zarejestrowanych jest około 1500 preparatów, zawierających 2,4-D. 2,4-D znajduje się w wykazie środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu i stosowania również w Polsce, gdzie wchodzi w skład ponad 40 preparatów, których składnikami są sole sodowe, dimetyloaminowe i dietyloaminowe tego kwasu oraz estru etylowego lub butylowego.

Okres półtrwania ($t_{1/2}$) 2,4-D wynosi od 20 do 312 dni, w zależności od warunków środowiskowych (Walters, 2011, Ordaz-Guillén i in., 2014; Ju i in., 2019). Zarówno w warunkach beztlenowych, jak i tlenowych głównym metabolitem 2,4-D jest 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP) (Smith i Aubin, 1991) oraz rzadziej 4-chlorofenol (4-CP). Herbicyd aplikowany jest bezpośrednio na glebę lub opryskuje się nim uprawy. 2,4-D oraz jego ester i aminy, są cząsteczkami polarnymi, będąc słabymi kwasami ($pK_a = 2,8$), wykazują niski stopień adsorpcji w glebie, co sprawia że są związkami mobilnymi, dlatego 2,4-D często przedostaje się z gleby do wód gruntowych, powierzchniowych i osadów (Chinalia i Killham, 2006). Często wykrywa się go w wodach powierzchniowych i gruntowych, co stanowi zagrożenie dla ekosystemów i zdrowia człowieka (Gaultier i in., 2008, Kearns i in., 2014, Shareef i Shaw, 2008). Według badań przeprowadzonych przez Mountassif i in. (2008) około 92% 2,4-D ostatecznie trafia do wody. Herbicyd ten nie jest specyficzny wobec konkretnego organizmu (Zabaloy i Gómez, 2014), jego działanie może powodować szereg negatywnych skutków, jak spowolnienie tempa wzrostu, problemy reprodukcyjne, może powodować śmierć organizmów innych niż docelowe. Znany jest również jako środek zaburzający funkcjonowanie układu hormonalnego, wpływający na procesy rozwojowe (Pattanasupong i in., 2004).

1.2.3. Pestycydy w wodach gruntowych

Zanieczyszczenie wód gruntowych pestycydami stanowi zagrożenie dla stanu jakości warstw wodonośnych na całym świecie. W Europie wody gruntowe są dla wielu krajów najważniejszym zasobem wody pitnej, np.: do 100% w Danii i Austrii, 95% na Węgrzech, 85% we Włoszech, 80% w Szwajcarii, 75% w Polsce i około 70% we Francji (EurEau, 2021). Zasadniczo w każdym kraju woda gruntowa i woda pitna są zanieczyszczone pestycydami (Swartjes i Van der Aa, 2020). Środowiskowy Standard Jakości podaje wartości dopuszczalnych stężeń dla pestycydów w wodach podziemnych wynoszące 0,1 $\mu\text{g/l}$ (z

wyjątkiem wybranych pestycydów cyklodienowych (aldryna, dieldryna, heptachlor i epoksyd heptachloru - 0,03 µg/l) oraz 0,5 µg/l dla sumy poszczególnych pestycydów wykrytych i określonych ilościowo w procedurze monitorowania, w tym ich istotnych pochodnych- stanowiących produkty procesu ich transformacji (dyrektywa 2006/118/WE Parlamentu Europejskiego i Rady, 2006; dyrektywa Rady 80/778/EWG, 1980; dyrektywa Rady 75 /440/EWG, 1975). Normy jakości Europejskiej Dyrektywy w sprawie wody pitnej dla każdego pestycydu i odpowiedniej pochodnej nie są normami zdrowotnymi. Powodem ustanowienia takich norm było ograniczenie polityki stosowania pestycydów oraz ówczesne ograniczenia metodologii analitycznej i jej czułości. Według pracy Hernández i wsp. (2008) najczęściej wykrywanymi związkami chemicznymi w wodach gruntowych były herbicydy (90% wszystkich wykrytych pestycydów). Według raportu sporządzonego przez Mohaupt i współpracowników (2020), atrazyna, jej metabolit desetylatriazyna (inaczej deetylatriazyna), symazyna i diuron były najczęściej wykrywanymi pestycydami w wodach gruntowych powyżej normy jakości w całej Europie, wszystkie stanowią HZO. Niestety dostępnych jest znacznie mniej danych na temat obecności pestycydów w wodach podziemnych niż w wodach powierzchniowych. Ponadto rozporządzenie UE nie podaje informacji o produktach przemiany pestycydów, które stanowią bardzo zróżnicowaną grupę nieznaną i niewykrywanych współzanieczyszczeń. Te chemikalia zwykle wykazują większą mobilność w środowisku glebowym i mogą przedostawać się do wód gruntowych szybciej niż ich związki macierzyste (Hernández i in., 2008). To sprawia, że ich identyfikacja ma kluczowe znaczenie dla oceny czystości wód gruntowych i wody pitnej.

1.3. Przemiany HZO w środowisku

Abiotyczne przemiany HZO stanowią procesy fizyczno-chemiczne takie jak utlenianie, hydroliza oraz transformacje fotochemiczne i chemiczne (Schechter i Gasiewicz, 2003; Rubilar i in., 2008).

W procesach przemian HZO, do mniej toksycznych produktów i w końcu w ich całkowitej mineralizacji, ważną rolę pełnią mikroorganizmy. Biotransformacja naturalnego pochodzenia HZO nie przysparza drobnoustrojom większych trudności, gdyż w toku ewolucji wykształciły one wyspecjalizowane enzymy i odpowiednie szlaki metaboliczne transformacji HZO. Inaczej rzecz się ma w przypadku związków pochodzenia antropogenicznego, stanowiących substrat oporny na biotransformację (Satpathy i in., 2017). Przyczyny tego zjawiska naukowcy upatrują w zbyt krótkim czasie adaptacji organizmów do nowopowstałych związków, nieobecnych wcześniej w środowisku. Drobnoustroje nie zdążyły wykształcić

specyficznych mechanizmów, szlaków metabolicznych prowadzących do transformacji i degradacji syntetycznych HZO. Najczęściej umiejętność mikroorganizmów do transformacji nowych, ksenobiotycznych HZO wynika z przypadkowo zachodzących przemian, w których biorą udział enzymy i metabolity produkowane przez mikroorganizmy do przeprowadzenia zupełnie innych procesów lub też na drodze podobieństwa tych HZO do naturalnie występujących związków rozkładanych na drodze szeregu reakcji już istniejących szlaków metabolicznych. Taki proces biotransformacji/biodegradacji nazywany jest kometabolizmem. Do biotransformacji HZO może również dochodzić dzięki zajściu mutacji, na drodze której organizmy nabywają zdolności do dehalogenowania (odłączenia grupy halogenowej) związków organicznych. Mikrobiologiczna dehalogenacja metaboliczna oparta jest na wykorzystaniu przez mikroorganizm HZO jako źródła węgla i energii. Proces dehalogenacji jest zatem wstępnym etapem umożliwiającym enzymatyczne rozerwanie szkieletu węglowego, prowadzące do pozyskania węgla i energii. HZO może stanowić również alternatywny akceptor elektronów w procesie oddychania beztlenowego, wówczas proces taki nazywany jest dehalorespiracją, w rezultacie której mikroorganizmy wytwarzają energię. Dehalogenacja może stanowić także mechanizm obronny mikroorganizmów, prowadzący do zmniejszenia toksyczności związku, a zatem do jego detoksykacji, nie dostarczając energii i węgla (Häggblom i Bossert, 2003; Hug i Edwards, 2013; Hug i in., 2013; Atashgahi i in., 2018). Wykorzystanie mechanizmów transformacji organohalogenków przez drobnoustroje zależy od struktury związku, jego właściwości, potencjału redoks, czy rodzaju donorów i akceptorów elektronów obecnych w środowisku (Häggblom i Bossert, 2003).

1.4. Potencjał mikroorganizmów do oczyszczania środowisk zanieczyszczonych HZO

W procesach oczyszczania środowisk zanieczyszczonych HZO wprowadzonymi przez człowieka kluczową rolę pełnią mikroorganizmy. Drobnoustroje są zdolne do transformacji związków organicznych zawdzięczają przede wszystkim ogromnej różnorodności produkowanych enzymów oraz zdolnościami adaptacyjnymi do zmieniających się warunków środowiska i tolerancji na często wysokie stężenia toksycznych substancji. Bakterie charakteryzują się szybkim cyklem rozwojowym, powszechnością występowania, w niemal każdym nawet najbardziej ekstremalnym środowisku (gorące źródła, powierzchnie rowów tektonicznych w dnie morskim, wieczna zmarzlina). Występujący u bakterii horyzontalny transfer genów, gwarantuje szybsze dostosowanie się do zmian zachodzących w środowisku, poprzez szybką dystrybucję genów odpowiedzialnych za oporność np.: na metale ciężkie, antybiotyki, jak również genów odpowiadających za transformację HZO. Bakterie

samoczynnie adaptując się do środowiska są w stanie przetrwać w warunkach wysokich stężeń toksycznych substancji, np.: chlorowcopochodnych węglowodorów. Niezwykłe właściwości adaptacyjne drobnoustrojów w połączeniu z ich ogromną liczebnością (biomasa mikroorganizmów porównywalna jest z biomasą wszystkich wyższych organizmów na Ziemi) i szybkim cyklem reprodukcyjnym, zainteresowała naukowców do wykorzystywania ich w procesach oczyszczania środowisk z różnego rodzaju skażeń (Kunicki-Goldfinger, 1994). Dodatkowo wykorzystanie technik współczesnej biologii molekularnej pozwala poznać dokładniej szlaki metabolizmu i transformacji HZO. Z kolei wiedza ta połączona z nieocenionym potencjałem mikroorganizmów umożliwia stworzenie technologii przeznaczonej do efektywnej i wydajnej remediacji terenów zanieczyszczonych (Gadd, 2000). Najczęściej wśród mikroorganizmów transformujących HZO można znaleźć bakterie należące do rodzajów: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, *Flavobacterium*, *Nocardioide*s, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Dehalobacterium*, *Acetobacterium*, *Dehalospirillum*, *Desulfomonile* i wiele innych (Löffler i in., 2003) oraz grzyby, głównie wymieniane są w literaturze tzw.: grzyby białej zgnilizny (ang. *white rot fungi*), np.: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Panus tigrinus* (Rubilar i in., 2008).

1.5. Metabolizm halogenowych związków organicznych

HZO naturalnego pochodzenia takie jak chlorometan, chlorooctan, chlorobenzoetan, chlorofenol mogą stanowić substrat odżywczy dla mikroorganizmów i tym samym być przez nie metabolizowane w warunkach tlenowych. Inaczej sytuacja wygląda w przypadku syntetycznych HZO z wieloma podstawnikami halogenowymi, takich jak perchloroetylen (PCE), heksachlorobenzen (HCB), pentachlorofenol (PCP), polichlorowane bifenylole (PCBs), polihalogenowane dioksyny. Związki te wykazują oporność na dehalogenację w warunkach tlenowych i są metabolizowane jedynie w środowisku braku dostępu tlenu na drodze dehalorespiracji (Hägglom i Bossert, 2003; Bedard, 2008; Matturro i in., 2016; Atashgahi i in., 2017; 2018; Needham i in., 2019; Botti i in., 2023).

Dehalogenacja najczęściej odbywa na drodze reakcji rozerwania wiązania węgiel-grupa halogenowa katalizowanej przez specyficzny enzym. Wiele enzymów zaangażowanych w procesy dehalogenacji zostały zidentyfikowane wraz z opisem ich struktur krystalograficznych, co pozwoliło zaobserwować miejsca wiązania halogenku w enzymie prowadzące do katalizowania reakcji dehalogenacji poprzez stabilizację ładunku ujemnego, skutkując

rozerwaniem wiązania węgiel-grupa halogenowa. Głównymi typami reakcji katalizowanymi przez odpowiednie tlenowe dehalogenazy są: podstawienie, utlenienie, dehydrogenacja i eliminacja, przy czym reakcje utleniania i redukcji mogą angażować enzymy, których udział bezpośrednio nie prowadzi do rozerwania wiązania węgiel- grupa halogenowa. Udział tych enzymów natomiast doprowadza do osłabienia wiązania, które na drodze kolejnych już reakcji, samoistnie ulega rozerwaniu doprowadzając do dehalogenacji związku (Fetzner, 1998; van Pee i Unversucht, 2003; Atashgahi i in., 2018). Wśród specyficznych reakcji prowadzących do dehalogenacji związku organicznego można wymienić: dehalogenację substytucyjną, dehydrohalogenację, dehalogenację oksydacyjną, dehalogenację przez transfer grupy metylowej oraz redukcyjną dehalogenację.

1.5.1. Dehalogenacja substytucyjna

Mechanizm dehalogenacji substytucyjnej polega na podstawieniu grupy halogenowej, np.: grupą hydroksylową pochodzącą z cząsteczki wody. Mianem dehalogenacji substytucyjnej możemy objąć reakcje: dehalogenacji hydrolitycznej, dehalogenacji tiolitycznej, oraz dehalogenacji przez substytucję wewnątrzcząsteczkową.

Dehalogenacja hydrolityczna

Hydrolityczne dehalogenazy stanowią najliczniejszą grupę opisanych dehalogenaz. Enzymy te katalizują reakcje dehalogenacji związków alifatycznych, heterocyklicznych oraz aromatycznych. Najlepiej zbadanym przykładem hydrolitycznej dehalogenazy jest haloalkanowa dehalogenaza pochodząca z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, bakterii zdolnej do degradacji 1,2-dichloroetanu. Wśród mikroorganizmów produkujących hydrolityczne dehalogenazy można wyróżnić również gatunki należące do rodzajów: *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Corynebacterium* oraz *Rhodococcus corallinus*, *Sphingomonas chlorophenolica* (Fetzner, 1998). Mechanizm reakcji katalizowanej przez ten enzym został dokładnie zbadany i opisany dzięki wykorzystaniu wyników analizy krystalografii rentgenowskiej i ukierunkowanej mutagenzie. Na drodze reakcji hydrolitycznej dehalogenacji grupa halogenowa jest podstawiana grupą hydroksylową pochodzącą z wody (Slater i in., 1997). Mechanizm reakcji wygląda nieco inaczej w przypadku związków aromatycznych, gdzie dehalogenacja następuje kilkietapowo. I tak na przykład transformacja halobenzoesu do hydroksybenzoesu, wymaga udziału trzech enzymów katalizujących trzy następujące po sobie reakcje. Konwersję halobenzoesu do halobenzoilo-CoA katalizuje odpowiednia ligaza halobenzoeso-CoA,

konwersję halobenzoilo-CoA do hydroksybenzoilo-CoA katalizuje dehalogenaza halobenzoilo-CoA, a hydroksybenzoilo-CoA do hydroksybenzoesu odpowiednia tioesteraza hydroksybenzoilo-CoA. Rodzaj enzymu zależy od grupy halogenowej przyłączonej do pierścienia oraz od miejsca jego podstawienia (Fetzner, 1998; Luo i in., 2001).

Dehalogenacja tiolityczna

Grupa halogenowa, w reakcji dehalogenacji tiolitycznej jest podstawiana nukleofilem - tiolanowym anionem glutationu. Podstawienie katalizowane jest przez enzym S-transferazę glutationową, w wyniku czego ulega uwolnieniu grupa halogenowa oraz powstaje nietrwały i niestabilny S-halometyloglutation, który ulega hydrolizie, tworząc halogen, glutation i formaldehyd. Mikroorganizmami, u których zaobserwowano ten typ reakcji, są np.: *Hyphomicrobium sp.* oraz *Methylophilus sp.* (Fetzner, 1998; Gisi i in., 1998; van Pee i Unversucht, 2003).

Dehalogenacja przez substytucję wewnątrzcząsteczkową

Dehalogenazy haloalkoholowe (występujące również pod nazwą dehalogenazy halohydrynowe, liazy halohydrynowe halogeno-wodorowe) katalizują reakcje wewnątrzcząsteczkowego podstawienia grupy halogenowej grupą hydroksylową w halogenowanych alkoholach i ketonach z wytworzeniem produktu przejściowego- epoksydu. Mikroorganizmami wytwarzającymi haloalkoholowe dehalogenazy są m.in. bakterie z rodzaju: *Pseudomonas*, *Arthrobacter* oraz *Corynebacterium* (Wijngaard in., 1989; Slater i in., 1997).

1.5.2. Dehydrohalogenacja

Na drodze dehydrohalogenacji przy udziale odpowiednich dehydrohalogenaz jest usuwany kwas halogenowodorowy (np.: HCl, HBr), prowadząc do powstania w związku organicznym wiązania podwójnego. Przykładem dehydrohalogenacji z udziałem dehydrohalogenazy może być dehalogenacja γ -heksachlorocykloeksanu (van Pee i Unversucht, 2003).

1.5.3. Dehalogenacja oksydacyjna

Dehalogenacja oksydacyjna ma duże znaczenie w procesie biologicznej degradacji wszelkich związków halogenowanych, zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych. Reakcje oksydacyjnej dehalogenacji są niespecyficzne (przypadkowe). Kooksydacja wielu organohalogenków zachodzi przy udziale odpowiednich mono- i dioksygenaz produkowanych m.in. przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*,

Mycobacterium. Udział oksygenaz w procesie odłączenia grupy halogenowej polega na utworzeniu niestabilnego związku, np.: epoksydu, poprzez wbudowanie tlenu w cząsteczkę HZO, który w kolejnym etapie ulega samoistnemu rozpadowi z uwolnieniem jonu halogenowego. Procesy kooksydacji nie przynoszą komórce żadnych korzyści, HZO współzawodniczą z substratami odżywczymi o miejsce aktywne w oksygenazie. Oksygenazy mogą aktywnie dehalogenować związki organiczne w warunkach tlenowych na drodze opisanej powyżej oraz w warunkach beztlenowych, wówczas jednak do rozerwania wiązania węgiel-grupa halogenowa dochodzi w procesie redukcyjnej dehalogenacji (Koe i Vilker, 1993; Fetzner i Lingens, 1994).

1.5.4. Dehalogenacja przez transfer grupy metylowej

W procesie transferu grupy metylowej z cząsteczki chlorometanu uczestniczy dehalogenaza chlorometanowa, indukowana obecnością chlorometanu. Grupa metylowa z chlorometanu zostaje przeniesiona na tetrahydrofolian, w rezultacie powstaje metylotetrahydrofolian i jon chlorkowy. Metylotetrahydrofolian jest degradowany do octanu. Dehalogenaza chlorometanowa zbudowana jest z czterech białek, z czego jedno niesie kofaktor korenoidowy, w którym zredukowany atom kobaltu (I) stanowi akceptor grupy metylowej. Dalej tworzony jest korenoid metylokobaltu (III), który stanowi donora grupy metylowej dla metylotransferazy, wytwarzając chlorometylotetrahydrofolian, rozpadający się dalej spontanicznie na jon chlorkowy i metylenotetrahydrofolian. Dalszy metabolizm metylenotetrahydrofolianu do octanu przebiega poprzez reakcje szlaku acetylo-CoA. Dehalogenacja przez transfer grupy metylowej została zaobserwowana u bakterii tlenowych i ściśle beztlenowych wykorzystujących chlorometan i dichlorometan jako jedyne źródło węgla (Meßmer i in., 1996; Fetzner, 1998; Coulter i in., 1999).

1.5.5. Redukcyjna dehalogenacja

Proces redukcyjnej dehalogenacji odgrywa znaczącą rolę w procesie dehalogenacji polihalogenowanych związków organicznych, wykazujących najwyższy stopień trwałości, akumulacji w środowisku, toksyczności oraz wyzwanie dla bioremediacji.

Kometaboliczna redukcyjna dehalogenacja

Wiele badań nad procesami transformacji HZO dowiodło powszechności wykorzystywania redukcyjnej dehalogenacji przez bakterie fakultatywnie i ściśle beztlenowe. Wiele gatunków spośród bakterii redukujących siarczany i redukujących żelazo prezentuje zdolność do kometabolicznej redukcyjnej dehalogenacji, nie przynoszącej komórce żadnych

korzyści (Adrian i Sulfit, 1994). W procesie biorą udział związane z białkiem kofaktory tetrapirołowe, takie jak porfiryny żelaza (II), korynoidy, czynnik F_{430} oraz kompleksy flawoproteinowo-flawinowe, czy ferredoksyna. I tak na przykład kobalamina (witamina B12) i czynnik F_{430} pośredniczą w redukcyjnej dehalogenacji pentachloroetyleny do etenu. Donorami elektronów niezbędnymi do aktywności enzymów są metabolity komórkowe. Również cytochromy typu C (np.: cytochrom $P_{450-cam}$) wytwarzane podczas wzrostu mikroaerofilnego są zaangażowane w reakcje redukcyjnego odłączania chloru (Holliger i in., 2003; Moe i in., 2016; Fincker i Spormann, 2017). Wśród mikroorganizmów prowadzących kometaboliczną redukcyjną dehalogenację można wymienić *Clostridium bifermentans* szczep DPH-1, *Shewanella putrefaciens*, *Methanosarcina thermophila*, *Escherichia coli* czy *Pseudomonas putida* (Fetzner, 1998).

Redukcyjna dehalogenacja w warunkach tlenowych

Redukcyjne reakcje dehalogenacji nie ograniczają się wyłącznie do warunków beztlenowych, mogą zachodzić również w warunkach tlenowych. Dodatkową dobrze zbadaną klasą dehalogenaz redukcyjnych jest białko z nadrodziny S-transferazy glutationowej (GST), zdolne do dehalogenacji toksycznego związku pośredniego, tetrachlorohydrochinonu, powstającego w wyniku oksydacyjnej dehalogenacji związku antropogenicznego pentachlorofenolu (Agarwal i in., 2017). Na drodze redukcyjnej dehalogenacji dochodzi do asymilacji odpowiednich kwasów karboksylowych przez bakterie. Zależna od glutationu dehalogenaza tetrachlorohydrochinonowa katalizuje reakcję redukcyjnej dehalogenacji tetrachloro-p-hydrochinonu do trichlorohydrochinonu, a następnie dichlorohydrochinonu. Wymieniona zależna od glutationu redukcyjna dehalogenaza katalizuje również degradację γ -heksachlorocykloheksanu. *Azotobacter chroococcum* MSB-1 jest zdolny do degradacji herbicydu kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) jako jedyne źródła węgla na drodze redukcyjnej dehalogenacji do kwasu 4-chlorofenoksyoctowego (Schuhmacher i in., 1997; van Pee i Unversucht, 2003; Agarwal i in., 2017).

Dehalorespiracja- redukcyjna dehalogenacja w warunkach beztlenowych

W redukcyjnej dehalogenacji, prowadzonej przez bakterie w warunkach beztlenowych, odłączenie grupy halogenowej od związku organicznego jest związane z metabolizmem energetycznym komórki. HZO takie jak, pentachlorofenol, tetrachloroeten, trichloroeten stanowią ostateczny akceptor elektronów, natomiast H_2 lub związek organiczny np.: octan, mrówczan czy fumaran stanowią donor elektronów w procesach oddechowych (Cole i in.,

1994). Bakteryjne enzymy- redukcyjne dehalogenazy- katalizują proces, pośredniczą w przekazywaniu elektronów z donora elektronów na HZO, będący ich akceptorem. Jest to możliwe dzięki specyficznej budowie enzymu. Redukcyjna dehalogenaza tetrachloroetenowa pochodząca z *Dehalobacter multivorans* zawiera w swej strukturze korynoid, stanowiący prawdopodobnie miejsce aktywne enzymu, żelazo oraz kwasowo labilną siarkę, natomiast ten sam enzym pochodzący z *Dehalobacter restrictus*, zawiera żelazowo-siarkowy klaster oraz kobalaminę stanowiącą miejsce aktywne enzymu. Oba enzymy związane są z błoną komórkową. Korynoid, klaster Fe-S oraz kobalamina znane są jako przenośniki elektronów. U *D. multivorans* i *D. restrictus* hydrogenaza związana z błoną komórkową dostarcza elektrony pochodzące z wodoru (z każdej jednej cząsteczki H_2 dostarczane są przez hydrogenazę dwa elektrony) na redukcyjną dehalogenazę tetrachloroetenową, która u *D. restrictus* związana jest z błoną komórkową natomiast u *D. multivorans* znajduje się w cytoplazmie. Dwa protony wodorowe powstałe na skutek aktywności hydrogenazy zostają uwolnione na zewnątrz błony komórkowej, redukcja tetrachloroetenu następuje wewnątrz komórki zużywając jeden proton wodorowy na uwolnienie jednego atomu jonu chlorowego. Powstały gradient elektrochemiczny generuje syntezę ATP w komórce (Holliger i Schumacher, 1994; Holliger i in., 1998; Hug i in., 2013; Agarwal i in., 2017).

1.6. Biologiczne procesy oczyszczania środowisk zanieczyszczonych

Powszechnie stosowanym procesem oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego zanieczyszczonego substancjami takimi jak: metale ciężkie, węglowodory ropopochodne, dioksyny, związki azotowe oraz HZO jest bioremediacja. Metoda ta wykorzystuje metabolizm organizmów (bakterii, grzybów, glonów jednokomórkowych, roślin wyższych - wówczas nazywana fitoremediacją) prowadzący do zmniejszenia zawartości lub całkowitego usunięcia substancji zanieczyszczającej. Procesy bioremediacji można stosować do oczyszczania różnych środowisk, np.: gruntów, osadów dennych, wód gruntowych, wód powierzchniowych, ścieków. W procesach bioremediacyjnych można wykorzystać mikroflorę autochtoniczną, czyli organizmy naturalnie zasiedlające tereny zanieczyszczone lub mikroorganizmy allochtoniczne, które pochodzą z innego miejsca, w którym wystąpiły podobne czynniki antropopresji i zanieczyszczenie podobnymi substancjami. Organizmy allochtoniczne zdążyły jednak przystosować swój metabolizm do znacznie podwyższonych stężeń czynnika zanieczyszczającego, stąd wprowadzone do nowego środowiska mogą natychmiast aktywnie metabolizować zanieczyszczenie. W zależności od miejsca przeprowadzenia procesu oczyszczania, można wyróżnić bioremediację *in situ* (w miejscu skażenia) oraz *ex situ* (w

innym niż miejsce skażenia). Ze względu na sposób wykorzystania drobnoustrojów, można podzielić bioremediację na naturalną oraz inżynieryjną, w ramach której wyróżnia się biostymulację oraz bioaugmentację (Łebkowska i Klimiuk, 2005; Błaszczuk, 2007; Shahsavari i in., 2017).

1.6.1. Monitoring środowiska

Przed podjęciem decyzji o wdrożeniu biotechnologii celem oczyszczenia terenu, kluczowym etapem jest dokładna analiza- monitoring środowiska. Analiza taka powinna prowadzić do określenia typu zanieczyszczenia, jego skali, określić właściwości fizyczno-chemiczne niezbędne do zaplanowania prac bioremediacyjnych, takie jak na przykład: pH, wilgotność, temperatura, potencjał redoks, obecność, ilość oraz rodzaj donorów i akceptorów elektronów, właściwości sorpcyjne (w przypadku gruntów), twardość wody, skład chemiczny, powierzchnię, jaką zajmuje zanieczyszczenie, jego dokładna lokalizacja, określenie kierunków migracji skażenia, kierunek przepływu wód gruntowych oraz obecność innych współwystępujących zanieczyszczeń (np.: metalami ciężkimi czy produktami ropopochodnymi) (Groudev i in., 2008; Nikolaoua i in., 2008). Kolejnym krokiem jest ocena kondycji autochtonicznej mikroflory, która jest wykonywana głównie poprzez określenie liczebności bakterii heterotroficznych. Liczebność szacowana powyżej 10^4 - 10^5 jtk (jednostek tworzących kolonię) $\cdot g^{-1}$ s.m. gleby uważana jest za wystarczającą do przeprowadzenia skutecznego procesu bioremediacji (Błaszczuk, 2007).

1.6.2. Bioremediacja naturalna

Wykorzystanie mikroflory autochtonicznej w procesach oczyszczania środowiska, z jednoczesnym zminimalizowaniem ingerencji człowieka jest właściwe dla procesów bioremediacji naturalnej, określanej też mianem bioremediacji pasywnej (Vidali, 2001). Dokładny monitoring środowiska wraz z charakterystyką mikroflory natywnej pozwala na oszacowanie potencjału mikroorganizmów do usuwania skażenia, skuteczności procesu oraz jego tempa. Jeśli analiza sytuacji wskazuje na skuteczne wyeliminowanie zanieczyszczenia i przywrócenie równowagi w zdegradowanym ekosystemie za sprawą wykorzystania naturalnie przebiegających procesów samooczyszczania, a więc poprzez naturalną bioremediację, nie ma konieczności stosowania bardziej kosztownych technik. Bioremediacja pasywna jednak jest najwolniejszą metodą eliminacji zanieczyszczeń, co również należy wziąć pod uwagę planując proces oczyszczania.

1.6.3. Bioremediacja inżynieryjna

W przypadku, gdy endogenna mikroflora występuje w zbyt małej ilości lub też nie wykazuje aktywności metabolicznej wobec danego czynnika wywołującego zanieczyszczenie, albo gdy tempo procesu oczyszczania jest niezadowalające, należy wdrożyć dodatkowe działania bioremediacyjne. Wśród metod inżynieryjnych wyróżnia się biostymulację i bioaugmentację, prowadzące do intensyfikacji procesów pozbywania się skażenia.

Biostymulacja ma za zadanie uaktywnić mikroflorę autochtoniczną, poprzez pobudzenie jej metabolizmu wobec substancji zanieczyszczającej, zapewniając optymalne warunki dla rozwoju. Może to być związane przykładowo z zapewnieniem odpowiedniej wilgotności, warunków tlenowych (napowietrzanie), dostarczaniem właściwej ilości biogenów: azotu i fosforu dla otrzymania optymalnej proporcji C:N:P odpowiadającej 100:10:1, gwarantującej osiągnięcie wysokiej aktywności metabolicznej mikroflory (Łebkowska i Klimiuk, 2005; Agarry i Ogunleye, 2012).

Z kolei bioaugmentacja oparta jest na wprowadzaniu do środowiska puli mikroorganizmów, wykazujących zdolność do rozkładu czy transformacji danego zanieczyszczenia. Proces poprzedzony jest selekcją szczepów zdolnych do utylizacji konkretnego związku czy też grupy związków wywołujących skażenie oraz symulacjami ich rozkładu. W ten sposób uzyskuje się szczepy przystosowane do transformacji/degradacji wybranych zanieczyszczeń. Mikroorganizmy wprowadzane są do objętego skażeniem środowiska w formie biopreparatu, inaczej szczepionki bioremediacyjnej złożonej z namnożonych drobnoustrojów jednego szczepu lub części konsorcjum złożonego z kilku szczepów. Często bioaugmentacja wspomagana jest metodami stosowanymi w biostymulacji dla spotęgowania efektu oczyszczania (Błaszyk, 2007; Tyagi i in., 2011).

1.6.4. Podział metod bioremediacji inżynieryjnej ze względu na miejsce przeprowadzanego procesu oczyszczania

Bioremediację można podzielić ze względu na miejsce jej przeprowadzania. Oczyszczanie drogą biologiczną może następować w miejscu skażenia (*in situ*) lub poza miejscem skażenia (*ex situ*), do którego, np.: skażona gleba została przewieziona (Vidali, 2001).

Metody *in situ*

Biowentylacja i biozaszanie są to metody, w których za pomocą pomp, dmuchaw oraz systemu rur wtłaczane są, w miejsce skażenia znajdujące się pod powierzchnią ziemi, biogeny, woda oraz sprężone powietrze. Różnica polega na tym, iż przy biozaszaniu do wtłaczania

dochodzi poniżej poziomu wody, w strefie nasycenia, stąd wtłaczanie nutrientów czy powietrza do tej przestrzeni wymaga zastosowania wysokich ciśnień, w odróżnieniu do biowentylacji przy której do wtłaczania dochodzi powyżej poziomu wody, w strefie areacji (nienasyconej), co wymaga niskich ciśnień wtłaczania (Łebkowska i Klimiuk, 2005).

Bioekstrakcja jest odpowiednia dla gruntów o dobrej przepuszczalności, polega na wypłukiwaniu skażeń za pomocą roztworów płuczających glebę wspomaganych stymulacją solami mineralnymi i bioagumentacją. Zanieczyszczone odcieki trafiają do bioreaktorów, gdzie w fazie ciekłej zachodzi dekontaminacja wody (Łebkowska i Klimiuk, 2005).

Metody *ex situ*

Obróbka agrotechniczna (ang. *land farming*) jest to metoda oparta na uprawie gleby uprzednio ulokowanej na nieprzepuszczalnej geomembranie, uniemożliwiającej migrację zanieczyszczenia do wód gruntowych, wyposażonej w system drenaży odbierających odcieki. Na tak przygotowanej płycie bioremediacyjnej, gleba poddawana jest obróbce agrotechnicznej poprzez nawadnianie, dodawanie soli mineralnych, składników odżywczych, biopreparatów, a także jest napowietrzana na skutek przeorywania i bronowania. Okres w jakim skażona gleba podlega oczyszczaniu za pomocą tej metody, to od pół roku do trzech lat (Lin i in., 2010).

Pryzmy do oczyszczania gruntu usypuje się na nieprzepuszczalnej powłoce. Ich konstrukcja powinna mieć szerokość 5-8 m oraz wysokość 1-2 m, z odpowiednim nachyleniem względem podłoża umożliwiającym odbieranie odcieków. Konstrukcja przyzmy powinna zawierać system drenaży mających dostarczać tlen, wodę, biogeny oraz szczepionki bioremediacyjne (Łebkowska i Klimiuk, 2005).

Bioreaktory (fermentatory) to urządzenia wyposażone w naczynia, system wirników oraz sond mających zapewnić odpowiednie warunki natlenienia, obiegu nutrientów, temperatury, w których zachodzą procesy mikrobiologiczne, prowadzące do degradacji i transformacji zanieczyszczeń. Procesy redukcji związków organicznych są przeprowadzane wewnątrz urządzenia dzięki obecności biokatalizatorów oraz substancji powierzchniowo czynnych (SPC) produkowanych przez mikroorganizmy lub obecności samych mikroorganizmów. Bioreaktory wytwarzają pożądany produkt, zapewniają utrzymywanie odpowiedniego środowiska (pH, temperatura, zawartość tlenu), warunków aseptycznych, co przy hodowlach bakteryjnych dla niektórych szczepów jest istotne ze względu na ich wrażliwość w stosunku do innych kultur. Fermentatory mogą służyć do oczyszczania ścieków komunalnych, przemysłowych oraz odcieków z przyz i płyt bioremediacyjnych (Zhao i in., 2007; Deshusses i in., 1997).

Biofiltry jest to specyficzny rodzaj bioreaktorów przystosowanych do immobilizacji drobnoustrojów na powierzchni stanowiącej fazę stałą, którą może być torf, kompost, gleba, trociny, piasek, styropian, stanowiących swoisty filtr, przez który przepuszcza się zanieczyszczenia w fazie gazowej. Biofiltry wykorzystują wymianę gazów, jaka zachodzi na granicy faz gazowej i ciekłej lub gazowej i stałej. Jest to rozwiązanie przystosowane do usuwania lotnych związków organicznych (VOCs- ang. *Volatile Organic Compounds*) wchodzących w skład ropy naftowej oraz substancji odorowych np.: H_2S . Bakterie zasiedlające biofiltry są zdolne do degradacji związków organicznych przechodzących przez nie, usuwając skażenia. Ogromną korzyścią płynącą z wykorzystania tej metody jest jej niski koszt oraz brak toksycznych produktów ubocznych (Srivastava i Majumder, 2008).

Kompostowanie materii zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi składa się z dwóch głównych procesów przeprowadzanych przez mikroorganizmy w warunkach tlenowych: mineralizacji z wytworzeniem mineralnych związków fosforu i azotu oraz humifikacji wraz z emisją do atmosfery znacznych ilości ditlenku węgla oraz energii cieplnej. Wiele toksycznych substancji organicznych poddawanych kompostowaniu nie ulega całkowitej mineralizacji i jest immobilizowanych w materii organicznej (związkach próchnicznych). Wyróżnia się dwa typy kompostowania, z udziałem pryzm statycznych z napowietrzaniem, za pomocą pomp czy dmuchaw oraz pryzm mieszanych mechanicznie, tzw. reaktory z mieszaniem (Błaszczyk, 2007). Zarówno obróbkę agrotechniczną jak i kompostowanie wykorzystuje się w metodach oczyszczania *in situ* oraz *ex situ*.

1.7. Bioremediacja halogenowanych związków organicznych- perspektywy

Wykorzystanie mikrobiologicznych procesów dehalogenacji w bioremediacji terenów zanieczyszczonych HZO wydaje się być obiecującym sposobem ich usuwania. Obok metod fizycznochemicznych, metody biologicznego oczyszczania środowiska z HZO uważane są za efektywne i ekonomiczne rozwiązanie.

Szybkość i efektywność bioremediacji terenów zanieczyszczonych HZO zależy od stężenia organohalogenku, jego toksyczności, dostępności tlenu, obecności fosforu i azotu oraz innych makro- i mikroelementów (wiele metali wchodzi w skład centrów aktywnych dehalogenaz), optymalnej wilgotności, temperatury, pH, równowagi sorpcyjnej, alternatywnych substratów wzrostowych obecnych w środowisku, a także braku inhibitorów np.: toksycznych metali i metaloidów jak As, Se, Cd, Pb (Łebkowska i Klimiuk 2005; Błaszczyk, 2007) oraz interakcji między organizmami. Istotnym czynnikiem jest konkurencja międzygatunkowa i tak np.: przenawożenie gleby może skutkować zwiększeniem populacji

pierwotniaków będących naturalnymi konsumentami bakterii, w tym również tych prowadzących biotransformację HZO (Błaszczuk, 2007). Aby jednak móc pokonać opór środowiska trzeba dokładnie poznać i sprecyzować, które czynniki oraz w jaki sposób wpływają negatywnie na procesy bioremediacji.

Poważny problem stanowi biodostępność HZO i ich podatność na biotransformację/biodegradację, na które wpływają cechy samego związku, tzn.: rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa, struktura, obecność grup funkcyjnych. Duży problem stanowi sorpcja HZO do substancji organicznej naturalnie obecnej w glebie, jak np.: kwasów humusowych, blokując w ten sposób ich dostęp dla drobnoustrojów.

Kolejnym niezwykle ważnym aspektem, który musi być uwzględniony w planowaniu procesów bioremediacji, są produkty pośrednie metabolizmu HZO. Niektóre drobnoustroje są w stanie przeprowadzać pełną transformację halogenowanego związku organicznego jak *Dehalococcoides ethenogenes*, potrafiący przeprowadzić dehalogenację perchloroetenu (PCE) do etenu natomiast dla większości mikroorganizmów jest to niemożliwe, np.: *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfomonile tiedjei*, biorą udział w dehalogenacji PCE do trichloroetenu (TCE) i dalej do dichloroetenu (DCE), jednak pochodne tego ostatniego nie są dalej transformowane. Powoduje to szybkie nagromadzenie się produktu reakcji, który może działać toksycznie na mikroorganizmy. Dodatkowym problemem jest zdolność niektórych mikroorganizmów dehalogenujących do przeprowadzania procesu halogenacji związku organicznego, co może skutkować wtórnym nagromadzeniem halogenowanych pochodnych. W takich sytuacjach jedynym rozwiązaniem wydaje się być wdrożenie bioaugmentacji z zastosowaniem odpowiedniego zaszczepienia lub zmiana warunków prowadzenia procesu, np.: poprzez wprowadzenie napowietrzania i dodatkowego źródła węgla stymulującego tlenowe procesy kometabolicznego usuwania HZO (Fennel i Gossett, 2003; Reineke i in., 2011).

Warto zwrócić uwagę, iż na powodzenie metod bioremediacji *in situ* wpływa cały zespół mikroorganizmów i ich wzajemne relacje jak np.: konkurencja o substrat, donor elektronów, transfer genów, wymiana metabolitów. Zrozumienie interakcji zachodzących w środowisku pomiędzy drobnoustrojami pozwoli na wyeliminowanie czynników hamujących i osiągnięcie zadowalających wyników w pracach bioremediacyjnych. Jest to zadanie trudne, ale na pomoc przychodzą techniki izotopowe, jak np.: stabilne frakcjonowanie izotopowe umożliwiające identyfikację i pomiar efektywności procesów biodegradacji. Metoda ta opiera się na obecności dwóch stabilnych izotopów wodoru i węgla w cząsteczkach organicznych, gdzie mikroorganizmy chętniej rozkładają izotopowo lżejsze cząsteczki (^{12}C , ^1H) (Bombach i

in., 2010). Również pomocne są metody stosowane we współczesnej biologii molekularnej, takie jak wysokoprzepustowe sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), mikromacierze, analizy metagenomiczne, metatranskryptomiczne i metaproteomiczne, których wykorzystanie umożliwia bardziej wnikliwą analizę zależności między mikroorganizmami w ekosystemach, niezbędne do zaplanowania i wdrożenia właściwej technologii oczyszczania.

Do tej pory wiele prób wdrożenia strategii bioremediacji zostały zakończone sukcesem. Warto tu jednak zauważyć, że prace te wykonują głównie firmy świadczące usługi bioremediacyjne, które nie ujawniają szczegółów wykonanych prac. Istnieje niewiele ogólnodostępnych przykładów szczegółowo omówionych działań bioremediacyjnych. Dla przykładu, badania przeprowadzone przez naukowców z Uniwersytetu Stanforda w ośrodku pilotażowym Moffett Field wykazały, że zanieczyszczenie wód gruntowych trichloroetylenem może ulegać skutecznej biodegradacji kometabolicznej poprzez dodanie substratu stanowiącego dla mikroorganizmów źródło węgla i energii tj. toluenu i fenolu, a także natlenienie w celu wsparcia wzrostu mikroorganizmów autochtonicznych. Efektem prac bioremediacyjnych była redukcja zawartości TCE i DCE nawet do 90% (Hopkins i McCarty, 1995).

W oparciu o opracowaną w Moffett Field procedurę bioremediacji *in situ*, wdrożono ją również w bazie sił powietrznych Edwards (AFB), położonej w zachodniej części pustyni Mojave, około 100 km na północ od Los Angeles. AFB jest wykorzystywana do badań i rozwoju samolotów. W latach 1958–1967 samoloty rakietowe X-15 stacjonowały w tym miejscu, a do czyszczenia ich silników stosowano TCE, co przyczyniło się do zanieczyszczenia wód gruntowych. Plama zanieczyszczenia rozciągała się na odległość około 1 km od źródła zanieczyszczenia. Obszar objęty procesem bioremediacji wynosił około 400 m² a stężenie TCE w poddanych bioremediacji wodach gruntowych wahał się od 500 do 1200 µg/l. Średnia redukcja TCE podczas procesu bioremediacji (145–271 dni) wynosiła 87% w górnej warstwie wodonośnej i 69% w dolnej warstwie wodonośnej. Podczas operacji zrównoważonego przepływu (365–444 dni) średnie usunięcie TCE wyniosło odpowiednio 86% i 83% w górnych i dolnych warstwach wodonośnych. W efekcie wdrożenia procesu bioremediacji stężenie TCE zmniejszono o 97,7%, z 1150 µg /l do 27 µg/l w wodach gruntowych, a usuwanie toluenu (używanego jako substrat pokarmowy) zwykle przekraczało 99,98% (raport U.S. EPA, 2000).

Kolejnym przykładem zakończonego sukcesem procesu bioremediacji może być Savannah River Site (SRS) należąca do Departament Energii Stanów Zjednoczonych (DOE). SRS to obiekt o powierzchni 480 km² w Aiken w Południowej Karolinie, który był wykorzystywany do szerokiej gamy operacji związanych z badaniami i produkcją materiałów

jądrowych. W obszarze „M” w obiekcie SRS formowano aluminium oraz wykonywano prace metalurgiczne. Od lat pięćdziesiątych do osiemdziesiątych XX wieku ścieki z obszaru „M” były zrzucane do zlewni i pobliskiego strumienia, co spowodowało zanieczyszczenie gleby i wód gruntowych rozpuszczalnikami chlorowanymi, przede wszystkim (TCE) i tetrachloroetenem (PCE). Stężenia TCE i PCE w wodach gruntowych wahały się odpowiednio od 10 do 1031 µg/l i 3 do 124 µg/l. Zawartość TCE i PCE w osadach wynosiła odpowiednio od 0,67 do 6,29 mg/kg i 0,44 do 1,05 mg/kg. Proces bioremediacji w tym przypadku opierał się na wykorzystaniu natywnych mikroorganizmów, dostarczeniu im akceptorów elektronów w postaci wtłaczanego powietrza, donorów elektronów oraz dodatkowego źródła węgla i energii, a także nutrientów w postaci wtłaczanego metanu, podtlenku azotu i fosforanu trietylu. Dodatek metanu miał za zadanie stymulować wzrost metanotrofów. Podczas fazy dodatku metanu populacja metanotrofów wzrosła o kilka rzędów wielkości, do poziomu bliskiego 10⁵ NPL/ml (NPL- najbardziej prawdopodobna liczba). Dodatek składników odżywczych zawierających azot i fosfor w połączeniu z metanem stymulował aktywność drobnoustrojów i według doniesień optymalizował bioremediację i mineralizację TCE i PCE w wodach gruntowych i osadach.

Po 384 dniach prac zawartość PCE i TCE w osadach obniżyły się poniżej poziomu wykrywalności, a stężenia PCE i TCE w wodach gruntowych spadły do poziomu poniżej 5 ppb dla PCE i TCE. Ponadto stężenie gazów w glebie spadło o ponad 99%. Usunięto około 7,7 tony LZO (lotne związki organiczne) dzięki połączeniu remediacji typu soil vapor extraction (SVE) i biodegradacji. Stężenia TCE i PCE w osadach przed i po procesie oczyszczania wykorzystano do obliczenia masy zdegradowanych LZO. Zastosowanie remediacji SVE umożliwiło usunięcie 5,5 tony LZO, a dzięki biodegradacji usunięto 2,2 tony LZO. Przeprowadzona analiza kosztów i korzyści wykazała, że bioremediacja *in situ* może obniżyć koszty o ponad 30% w porównaniu z podstawową technologią SVE. Ponadto z przeprowadzonych analiz wynika, że bioremediacja *in situ* może skrócić czas wymagany do rekultywacji terenu o 5 do 7 lat w porównaniu z remediacją z wykorzystaniem metody SVE (raport U.S. EPA, 2000).

Wiele prac bioremediacyjnych wykonują prywatne firmy, w Polsce można tu wymienić: Dekonta Polska, SEGI-AT, Hydrogeotechnika, Remea, eco-RGS. Wyniki prac bioremediacyjnych, w tym przypadku najczęściej stanowią tajemnicę, do której zobowiązuje się firma podpisując umowę, z kolei metodyka prac jaka została wdrożona stanowi *know-how* konkretnej firmy i nie jest upubliczniana. Dalsze badania nad procesami bioremediacji środowisk gruntowo-wodnych zanieczyszczonych HZO bazujące na nowoczesnych metodach biologii molekularnej, jak analizy metagenomowe, metaproteomowe, metabolomiczne oraz

nad wpływem różnych czynników abiotycznych na poziom transformacji zanieczyszczeń, których wyniki będą publicznie dostępne, wydają się być niezbędne do zwiększenia efektywności prac bioremediacyjnych oraz stanu wiedzy w tej dziedzinie biotechnologii.

2. Cel i zakres pracy oraz hipotezy badawcze

Celem niniejszej pracy była ocena potencjału mikroorganizmów środowisk zbliżonych do naturalnych oraz antropogenicznie przekształconych do przeprowadzania procesu dehalogenacji halogenowanych związków organicznych (HZO) w oparciu o analizy metagenomowe oraz stworzenie prototypu biopreparatu przeznaczonego do redukcji zawartości HZO w środowiskach gruntowo-wodnych.

Cele cząstkowe obejmowały:

- wyizolowanie mikroorganizmów z wytypowanych do analiz środowisk oraz wyselekcjonowanie z nich szczepów bakterii zdolnych do biotransformacji HZO – utworzenie konsorcjów bakteryjnych,
- ocena potencjału konsorcjów bakteryjnych do biotransformacji HZO (na przykładzie herbicydu 2,4-D oraz 4-chlorofenolu),
- określenie determinant genetycznych skonstruowanych konsorcjów oraz ich produktów w postaci białek enzymatycznych zaangażowanych w procesy dehalogenacji,
- ocena wpływu czynników abiotycznych na przebieg mikrobiologicznej dehalogenacji.

Zakres pracy

1. Pobór próbek gruntów oraz próbek z oczyszczalni ścieków oraz poddanie ich następującym analizom:

- a) analizy chemiczne – oznaczanie zawartości: halogenowanych pestycydów, metali ciężkich, produktów ropopochodnych, halogenów (F, I, Cl, Br),
- b) identyfikacja genów, których produkty zaangażowane są w procesy dehalogenacji oraz oznaczenie składu zespołów mikroorganizmów badanych środowisk, w oparciu o sekwencjonowanie metagenomowe,
- c) izolacja szczepów bakteryjnych.

2. Selekcja wyizolowanych szczepów bakteryjnych pod względem ich zdolności do biotransformacji wybranych HZO – utworzenie konsorcjów bakteryjnych.

3. Symulacje biotransformacji herbicydu 2,4-D oraz 4-chlorofenolu – metodami hodowlanymi, przez skonstruowane konsorcja bakteryjne.

4. Analiza składu taksonomicznego konsorcjów bakteryjnych oraz identyfikacja genów, których produkty białkowe zaangażowane są w procesy dehalogenacji, w oparciu o sekwencjonowanie metagenomowe.

5. Identyfikacja białek wydzielniczych produkowanych przez konsorcja w symulacjach biotransformacji 2,4-D oraz 4-chlorofenolu, w oparciu o analizę metaproteomów konsorcjów.
6. Badanie wpływu czynników abiotycznych na tempo biotransformacji 4-chlorofenolu, na przykładzie etanolu jako dodatkowego źródła węgla oraz metylokobalaminy jako przenośnika elektronów.
7. Analiza ekotoksyczności metabolitów powstałych podczas procesu biotransformacji HZO.

Hipotezy badawcze

Mikroorganizmy środowisk poddanych antropopresji i środowisk zbliżonych do naturalnych posiadają geny kodujące enzymy odpowiedzialne za dehalogenację związków organicznych.

Proces biotransformacji herbicydu 2,4-D przebiega z wytworzeniem metabolitów pośrednich, które mogą pozostawać w środowisku po pełnej jego biotransformacji.

3. Materiały i metody

3.1. Etapy przeprowadzonych badań

Etap I

Cel: charakterystyka fizykochemiczna wytypowanych środowisk, w tym określenie występowania zanieczyszczeń pestycydami, halogenami, substancjami ropopochodnymi, metalami ciężkimi.

Realizacja: analiza fizykochemiczna wytypowanych środowisk (naturalnych i antropogenicznie przekształconych – analizie poddano 6 środowisk).

Etap II

Cel: poznanie potencjału genetycznego mikroorganizmów różnych środowisk (zbliżonych do naturalnych oraz antropogenicznie przekształconych) do przeprowadzania procesu dehalogenacji HZO w oparciu o analizy metagenomowe.

Realizacja:

- ekstrakcja DNA z próbek gleby wytypowanych środowisk w ramach etapu I
- analiza metagenomowa DNA- sekwencjonowanie nowej generacji (Novaseq6000)
- analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania
- charakterystyka potencjału genetycznego bakterii analizowanych środowisk do przeprowadzania dehalogenacji.

Etap III

Cel: wyizolowanie mikroorganizmów z wytypowanych środowisk.

Realizacja: izolacja bakterii heterotroficznych zdolnych do biotransformacji HZO z próbek pochodzących z analizowanych środowisk:

- metodami hodowlanymi- wytypowanie 210 izolatów ze wszystkich testowanych środowisk na podstawie różnic w morfologii kolonii,
- metodami molekularnymi: (i) ekstrakcja DNA ze wszystkich 210 izolatów, (ii) sprawdzenie obecności genu 16S rRNA w wyizolowanym DNA wszystkich izolatów, (iii) analizy restrykcyjne DNA wszystkich izolatów, w celu wyeliminowania izolatów tego samego gatunku – otrzymanie 34 unikatowych szczepów bakteryjnych.

Etap IV

Realizacja: selekcja izolatów – hodowla izolatów na podłożu z dodatkiem HZO (chwastox trio) w celu wytypowania izolatów wyróżniających się najwyższą efektywnością transformacji HZO.

Etap V

Cel: poznanie potencjału genetycznego konsorcjów bakteryjnych do przeprowadzania procesu dehalogenacji HZO w oparciu o analizy metagenomowe.

Realizacja:

- Utworzenie 4 konsorcjów bakteryjnych: Rozt, Rol, Ocz (na podstawie selekcji izolatów) oraz Rop (z hodowli własnej Zakładu Biologii WIBHiŚ PW),
- ekstrakcja DNA z każdego szczepu wchodzącego w skład konsorcjum,
- sekwencjonowanie wyekstrahowanego DNA konsorcjów (sekwencjonowanie nowej generacji, Novaseq6000),
- analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania,
- charakterystyka potencjału genetycznego konsorcjów.

Etap VI

Cel: sprawdzenie fizjologicznego potencjału konsorcjów do biotransformacji HZO (na przykładzie 2,4-D oraz *p*-chlorofenolu).

Badanie wpływu czynników abiotycznych na tempo mikrobiologicznej dehalogenacji.

Identyfikacja białek zaangażowanych w procesy dehalogenacji.

Realizacja:

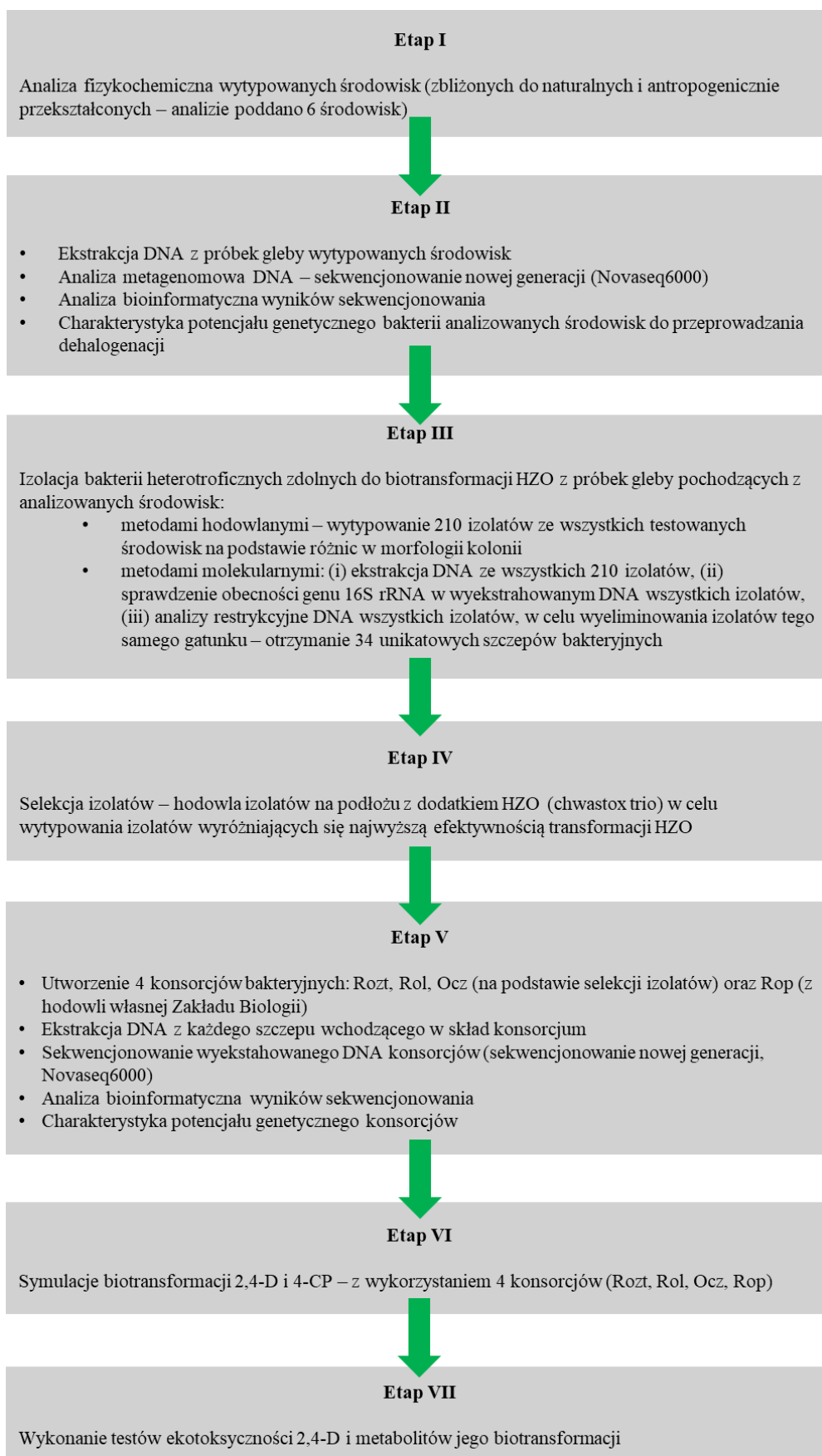
- Symulacje biotransformacji 2,4-D i *p*-chlorofenolu – z wykorzystaniem 4 konsorcjów (Rozt, Rol, Ocz, Rop),
- ekstrakcja białek wydzielniczych z hodowli prowadzonych na 2,4D i *p*-chlorofenolu – analiza metaproteomów.

Etap VII

Cel: sprawdzenie ekotoksyczności płynów hodowlanych po pełnej biotransformacji 2,4-D i porównanie ekotoksyczności 2,4-D oraz jego metabolitów obecnych w płynie hodowlanym po pełnej biotransformacji 2,4-D.

Realizacja: wykonanie testów ekotoksyczności 2,4-D i metabolitów jego biotransformacji.

Schemat przeprowadzonych badań



3.2. Materiały analityczne

3.2.1. Podłoża mikrobiologiczne

Podłoże mineralne M9

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 7,6 g/l, KH_2PO_4 3,0 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4Cl 1,0 g/l. Sterylizacja w autoklawie 121°C, 15 min. Po sterylizacji i ostudzeniu do temperatury pokojowej dodano roztwory soli w ilości 2 ml/l podłoża: (i) roztwór soli $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (24,6 g/ 100 ml) oraz (ii) 1 ml/l podłoża roztworu soli CaCl_2 (1,11 g/100 ml). Końcowe pH (przy 25°C): 7,0-7,2.

Podłoże bulion odżywczy

Trzustkowy hydrolizat żelatyny 5,0 g/l, wyciąg z mięsa wołowego 3,0 g/l, pepton 5,0 g/l, NaCl 5,0 g/l. Końcowe pH (przy 25°C): 7,4. Sterylizacja w autoklawie 121°C, 15 min.

Podłoże agar odżywczy

Ekstrakt mięsny 1 g/l, Ekstrakt drożdżowy 2g/l, pepton 5 g/l, NaCl 5 g/l agar 15 g/l; Końcowe pH (przy 25°C): 7,4. Sterylizacja w autoklawie 121 °C, 15 min.

Podłoże agarowe TSA (ang. *Tryptic soy agar*)

Trzustkowy pepton kazeiny 15,0 g/l, papainowy pepton sojowy 5,0 g/l, NaCl 5,0 g/l, agar 15,0 g/l. Końcowe pH (przy 25°C): $7,3 \pm 0,2$. Sterylizacja w autoklawie 121 °C, 15 min.

Podłoże do oznaczenia aktywności celulolitycznej

K_2HPO_4 0,5 g/l, MgSO_4 0,25 g/l, karboksymetyloceluloza sodu (CMC) 2,0 g/l, żelatyna 2,0 g/l, agar 15,0 g/l. Końcowe pH (przy 25°C): 6,8-7,2. Sterylizacja w autoklawie 121 °C, 15 min.

Podłoże do oznaczenia aktywności lipolitycznej

Bulion odżywczy 8 g/l, NaCl 4 g/l, agar 10 g/l. Końcowe pH (przy 25°C): 7,0. Sterylizacja w autoklawie 121°C, 15 min.

Po ostudzeniu do 60°C dodano oliwy z oliwek 31,25 ml (2,5% wt/vol) uprzednio oczyszczonej poprzez przepuszczenie przez kolumnę wypełnioną aktywowanym tlenkiem glinu (neutral alumina) w mieszaninie rozpuszczalników eter dietylowy i eter naftowy (1:10 vol/vol), oraz rodaminę B 10 ml (stężenie 1 mg/ml) (0,001% wt/vol) rozpuszczono w wodzie dejonizowanej i sterylizowano przez filtrację (średnica porów filtra 0,2 µm).

Podłoże do oznaczenia aktywności ureolitycznej

L-tryptofan 3 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, NaCl 5 g/l, mocznik 20 g/l, 95% etanol 10 ml/l, czerwień fenolowa 0,05 g/l. Końcowe pH (przy 25°C): 7,0. Sterylizowano przez filtrację (średnica porów filtra 0,2 μm).

3.2.2. Roztwory i bufor

- Roztwór soli fizjologicznej (RF) – 0,85% NaCl,
- roztwór Tris-HCl [50 mM, 30 mM],
- bufor TAE 50 x stężony,
- bufor TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 1 mM EDTA,
- bufor PBS (ang. *phosphate buffer saline*) (EURx sp. z o.o.),
- kwas tróchlorooctowy (TCA – ang. *trichloroacetic acid*) (50%),
- roztwór do lizy komórkowej – ang. *PCR lysis solution*: 0,05 M NaOH + 0,25% SDS w wodzie MiliQ,
- jodyna Grama - roztwór I i KI w wodzie: I 3,3 g/l, KI 6,7 g/l.

Roztwory i bufor stosowane do elektroforezy DNA

- Bufor TAE: 40 mM Tris base, 20 mM kwas octowy, 1 mM EDTA,
- bufor obciążający: 0,25% błękit bromofenolowy, 30% glicerol,
- Midori Green barwnik do barwienia DNA w żelach agarozowych: 8 μl /200 ml agarozy,
- żel agarozowy: 1 – 2% agaroz w buforze TAE 1 x stężonym.

3.2.3. Enzymy

- Enzym restrykcyjny *HaeIII* – firmy Thermo Fisher Scientific Inc.,
- polimeraza DNA Taq – firmy A&A Biotechnology.

Do obróbki enzymatycznej DNA używano buforów dostarczanych przez producentów.

3.2.4. Wzorzec wielkości DNA

Jako wzorzec wielkości liniowych fragmentów DNA wykorzystywano wzorzec firmy A&A Biotechnology – 100-3000 pz, stężenie: 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (wielkość fragmentów: 100, 300, 500, 1000, 1500, 2000, 3000 pz) (pz- par zasad).

3.2.5. Zestawy odczynników

- Soil DNA Mini Kit (Syngen Biotech Sp. z o.o.) – zestaw do ekstrakcji DNA z próbek gruntów i próbek z oczyszczalni ścieków,
- Environmental DNA & RNA Purification Kit (EUR_x Sp. z o.o.) – zestaw do oczyszczania wyekstrahowanego DNA,
- Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit (EUR_x Sp. z o.o.) – zestaw do oczyszczania wyekstrahowanego DNA,
- zestaw odczynników do pomiaru stężenia DNA- metodą Qubit 2.0 Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.),
- zestaw do PCR (PCR Kit 1) – firmy A&A Biotechnology (skład: Taq polimeraza (1 U/μl), 10 mM dNTP Mix, 10x bufor I (z jonami Mg²⁺), 10x bufor III (bez jonów Mg²⁺), 25 mM MgCl₂, bufor obciążający).

3.2.6. Inne

- etanol: 96%, 70%,
- metanol 99,9%,
- izopropanol 70%,
- aceton 99,9%,
- heksan 99,9%,
- halogenowane związki organiczne:
 - chwastox trio – stanowiący mieszaninę trzech pestycydów: MCPA (200 g/l), mekoprop-P (150 g/l), dicamba (40 g/l),
 - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D),
 - *p*-chlorofenol (4-CP),
- siarczan sodu bezwodny,
- tlenek glinu,
- agaroza,
- eter naftowy 60%,
- wzorce chromatograficzne: Acid Herbicide Mix (Supelco, Merck Life Science Sp. z.o.o.), 2,4-D solution (Supelco Merck Life Science Sp. z.o.o.),
- ziemia okrzemkowa.

3.3. Organizmy wykorzystywane w badaniach

3.3.1. Bakterie

Bakterie wyizolowane z miejsc (stanowisk): s1, s2, s3, s4, s5, s6, oraz bakterie wchodzące w skład kolekcji Zakładu Biologii WIBHiŚ PW.

3.3.2. Glony i rośliny wyższe

- Zielenice: *Desmodesmus quadricauda* (CCALA 463) – pochodzące z Institute of Botany, Academy of Science w Czechach;
- rośliny wyższe: *Sorghum nigrum* (sorgo czarne- należący do roślin jednoliściennych), *Lepidium sativum* (pipeprzycza siewna, potocznie nazywana rzeżuchą siewną- należąca do roślin dwuliściennych), *Sinapis alba* (gorczyca biała- należąca do roślin dwuliściennych)- załączone do zestawu Phytotoxkit (MicroBioTests Inc, Gent, Belgia).

3.3.3. Zwierzęta

Skorupiaki: *Daphnia magna* (rozwielitka wielka) – pochodzące z kolekcji własnej Zakładu Biologii WIBHiŚ PW.

3.4. Opis miejsc poboru próbek gruntów

Realizowano w I etapie badań.

Badania przeprowadzono, pobierając próbki gruntów z sześciu różnych miejsc (stanowisk). Próbki oznaczone s1, s2, s3, s6 pobrano ze stanowisk należących do środowisk antropogenicznie przekształconych. Stanowiska s1, s2, s3 pochodziły z użytków rolnych (w Ożarowie Mazowieckim i Starych Babicach, zachodnie obrzeża Warszawy), na których stosowano pestycydy zawierające HZO. Stanowisko s1 stanowiło grunty rolne, na których uprawiano kukurydzę; s2 grunty rolne na których uprawiano kapustę; s3 grunty rolne, na których uprawiano pszenicę; stanowisko s6 stanowiło oczyszczalnię ścieków Eco-Babice Sp. z o.o., w Starych Babicach, z której pobrano próbki oznaczone s6 stanowiące osad czynny, recyrkulat oraz ścieki surowe. Próbki s4, s5 pochodziły z Kolonii-Terebiń (50.705, 23.849, k. Zamościa w południowo-wschodniej Polsce) i zostały pobrane z gruntów leśnych – stanowiska mające charakteryzować środowisko zbliżone do naturalnego. Próbki gruntów pobierano z głębokości 0–30 cm. Z każdego stanowiska (s1-s6) pobrano dziesięć próbek (łącznie pobrano 60 próbek). Pobrane próbki gruntów ujednolicono metodą kwartowania (technika mieszania materiałów sypkich), a następnie przesiano z użyciem sita o średnicy oczek 2mm

i przechowywano je w temperaturze -80°C (do ekstrakcji DNA) i -20°C (do analiz chemicznych).

3.5. Metody analityczne

3.5.1 Analizy fizykochemiczne próbek gruntów

Procedurę realizowano w I etapie badań.

Odczyn gruntu określono zgodnie z normą EN ISO 10390:2022 przez zawieszenie gleby w roztworze chlorku potasu o stężeniu 1 mol/l (pH w KCl). W celu określenia zawartości materii organicznej w glebie odważone ilości gleby wstępnie wysuszono w temperaturze 105°C aż do oznaczenia suchej masy. Tak przygotowane próbki gleby poddawano prażeniu w temperaturze 550°C przez trzy godziny i ponownie ważono zgodnie z normą PN-EN 12879:2004.

3.5.2. Oznaczenie zawartości metali ciężkich

Procedurę realizowano w I etapie badań.

Oznaczenia zawartości metali ciężkich zostały wykonane przez certyfikowane laboratorium Państwowego Instytutu Geologicznego PAN w Warszawie.

Próbki gruntów zostały wysuszone w temperaturze pokojowej, przesiane przez sita nylonowe o średnicy oczek 2 mm, a następnie utarte w agatowych młynach kulowych do frakcji $<0,06$ mm.

Do analizy pierwiastkowej próbki rozтворzono wodą królewską. 1g próbki zalano mieszaniną wody królewskiej (6 ml HCl + 2 ml HNO₃) i pozostawiono na około 12h. Następnie próbki ogrzewano przez 1h w aluminiowych blokach grzejnych w temperaturze 95°C . Wystudzone roztwory przesączono przez sączi bibułowe do butelek polipropylenowych (PP) i dopełniono wodą dejonizowaną do 50g.

Zawartość pierwiastków: As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, Sn i Zn oznaczano metodą emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES) przy wykorzystaniu spektrometru ICP-OES iCAP 6500 DUO firmy Thermo Fisher Scientific Inc. zgodnie z procedurą badawczą PB-40 (edycja 7 z 20.01.2020 r.).

Charakterystyka spektrometru ICP-OES iCAP 6500 DUO:

- siatka dyfrakcyjna typu Echelle
- zakres dostępnego widma: 166 nm – 818 nm
- detektor typu CID (ang. *Charge Injection Device*)

- obserwacja plazmy typu „Duo View”
- osiowy
- radialny

Zastosowane warunki pomiarowe:

- nebulizer koncentryczny („Meinharda”)
- standardowy palnik z wewnętrzną rurką o średnicy 2 mm
- komora mgielna typu „cyclonic”
- moc generatora: 1250 W
- przepływ roztworu (próbka + wzorzec wewnętrzny) ~ 2ml/min
- przepływ gazu (Ar):
 - nośny – 0,62 L/min
 - chłodzący – 12 L/min
 - pomocniczy – 0,5 L/min
- system obserwacji: *osiowy, radialny*
- czas integracji: 10 s

Kalibracja:

pomiar próbek poprzedzony był wykonaniem krzywych kalibracyjnych na roztworach kalibracyjnych przygotowanych z certyfikowanych materiałów odniesienia. Krzywe kalibracyjne były co najmniej 4-punktowe i miały współczynnik nachylenia co najmniej 0,999. Zakres metody ICP-OES podano w tabeli 2.

Kontrola jakości:

kontrola jakości polegała na pomiarze próbek kontrolnych: próbki „zerowej” dla próbek, próbek podwójnie roztworzonych, materiału odniesienia, ślepej próby odczynnikowej QCL, próbki kontrolnej QCH o znanej zawartości przygotowanej z certyfikowanych materiałów odniesienia.

Tabela 2. Zakres stosowania metody ICP-OES.

Pierwiastek	Jednostka	Zakres stosowania	Granice oznaczalności
As	mg/kg	3-500	3
Ba	mg/kg	1-1500	1
Cd	mg/kg	0,5-250	0,5

Co	mg/kg	1-500	1
Cr	mg/kg	1-500	1
Cu	mg/kg	1-500	1
Fe	%	0,01-10	0,01
Mo	mg/kg	0,5-500	0,5
Ni	mg/kg	1-500	1
Pb	mg/kg	2-1250	2
Sn	mg/kg	2-500	2
Zn	mg/kg	1-1250	1

3.5.3. Oznaczenie zawartości halogenów

Procedurę realizowano w I etapie badań.

Oznaczenie zawartości halogenów w próbkach gruntów zostało wykonane przez certyfikowane laboratorium Państwowego Instytutu Geologicznego PAN w Warszawie.

Próbki gruntów zostały wysuszone w temperaturze pokojowej, przesiane przez sita nylonowe o średnicy oczek 2 mm, a następnie utarte w agatowych młynach kulowych do frakcji <0,06 mm.

Do analizy próbki gruntów ekstrahowano wodą dejonizowaną w temperaturze pokojowej. 1g próbki zalano 50 ml wody dejonizowanej, wytrząsano przez 2h na wstrząsarce laboratoryjnej i pozostawiono na minimum 16h. Następnie próbki przesączono przez sączki bibułowe do butelek polipropylenowych (PP).

Zawartość anionów: Br, Cl, F i I w wyciągu wodnym oznaczano metodą chromatografii jonowej przy wykorzystaniu chromatografu cieczowego Alliance firmy Waters, wyposażonego w kolumnę IC-Pak Anion HR, detektor konduktometryczny i detektor PDA.

Kalibracja:

pomiar próbek poprzedzony był wykonaniem krzywych kalibracji. Roztwory kalibracyjne przygotowano z certyfikowanych materiałów odniesienia. Krzywe kalibracji były co najmniej 6-punktowe (dla Br, Cl i F) oraz 3-punktowe dla I. Współczynnik nachylenia krzywych kalibracji wynosił co najmniej 0,998. Zakres stosowania metody chromatografii jonowej przedstawiono w tabeli 3.

Kontrola jakości:

kontrola jakości polegała na pomiarze próbki „zerowej”, próbek podwójnie wyekstrahowanych, certyfikowanego materiału odniesienia, próbek kontrolnych o znanej zawartości przygotowanych z certyfikowanych materiałów odniesienia.

Tabela 3. Zakres stosowania metody chromatografii jonowej.

Jon	Jednostka	Zakres stosowania	Granice oznaczalności
Br	mg/kg	5-100	5
Cl	mg/kg	25-25000	25
F	mg/kg	5-250	5
I	mg/kg	5-2500	5

3.5.4. Ekstrakcja HZO

Procedury realizowano w I, IV i VI etapie badań.

Ekstrakcja HZO z próbek gruntów i osadów ściekowych

Procedurę realizowano w I etapie badań.

Analityczną procedurę ekstrakcji przeprowadzono zgodnie z normą ISO 10382. Próbkę gleby (10g, uziarnienie $\leq 0,20$ mm) ekstrahowano w ekstraktorze Soxhleta mieszaniną rozpuszczalników heksan/aceton (70:30 v/v). Ekstrakty glebowe zatężono i rozpuszczalnik wymieniono na heksan. Zatężone ekstrakty przepuszczono przez szklaną kolumnę wypełnioną watą szklaną, 2 g dezaktywowanego tlenku glinu (15% w wodzie Milli-Q) i 1 cm bezwodnego siarczanu sodu; następnie eluowano 20 ml eteru naftowego. Po odparowaniu próżniowym rozpuszczalnik wymieniono na heksan i ekstrakty zatężono do 1 ml, oznaczano zawartość HZO z wykorzystaniem GC-MS i/lub GC-ECD (Ukalska-Jaruga i in., 2020), procedura opisana w punkcie 3.5.5.

Ekstrakcja HZO z płynów hodowlanych

Procedurę realizowano w IV i VI etapie badań.

Pobrano 300 μ l płynu hodowlanego do 2 ml fiolek chromatograficznych, następnie dodano 900 μ l mieszaniny heksan/aceton (zmieszanych w stosunku 9:1). Wytrząsano w pozycji horyzontalnej z maksymalną prędkością przez 1 minutę. Następnie pozostawiono na 16 godzin

do wytrząsania przy prędkości wytrząsania 150 rpm w temperaturze pokojowej. Po czym próbki wirowano z prędkością 5300 rpm przez 10 minut, zebrano warstwę organiczną i przeniesiono do świeżej fiołki, na podstawie zmodyfikowanego protokołu Fava i współpracowników (2003). Następnie zawartość HZO oznaczano z wykorzystaniem GC-MS i/lub GC-ECD, procedura opisana w punkcie 3.5.5.

3.5.5. Oznaczanie HZO

Procedurę realizowano w I, IV i VI etapie badań.

Oznaczenia HZO wykonywane były metodą chromatografii gazowej przy użyciu chromatografu gazowego Agilent Technologies GC 7890A sprzężonego ze spektrometrem masowym MS 5975C VL MSD oraz sprzężonym z detektorem wychwyty elektronów ECD. GC-MS i GC-ECD były wyposażone w kolumnę DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Metodyka oznaczania zawartości HZO w próbkach przy zastosowaniu kolumny DB-5 została opracowana dla potrzeb niniejszej pracy na podstawie procedury przedstawionej w pracy Ukalskiej-Jarugi i in. (2020).

Oznaczanie zawartości HZO w gruntach, i próbkach z oczyszczalni ścieków przeprowadzono w I etapie badań, natomiast oznaczenie HZO w próbkach płynów hodowlanych w IV i VI etapie badań.

Z uprzednio wyekstrahowanych próbek (wg procedury przedstawionej w punkcie 3.5.4.) wprowadzono 1 μl do portu wstrzykiwania GC przez 7683B ALS (automatic liquid sampler).

Program pracy chromatografu Agilent Technologies GC 7890A (z detektorem ECD lub detektorem MS):

- gaz nośny He – 1 ml/min
- temperatura dozownika - 280°C
- temperatura początkowa pieca - 70°C utrzymywana przez 2 minuty,
- program: przyrost temperatury 8°C/min do 150°C, następnie 3°C/min do 200°C, a następnie 8°C/min do 280°C
- temperatura końcowa 280°C przez 10 minut.

Warunki pracy spektrometru masowego MS 5975C VL MSD:

- temperatura linii transferowej 280°C
- temperatura źródła jonów: 230°C
- temperatura kwadrupola: 150°C

Warunki pracy detektora ECD:

- temperatura detektora 310 °C
- gaz pomocniczy azot – 40 ml/min.

3.5.6. Oznaczanie liczebności bakterii heterotroficznych w próbkach gruntów i próbkach z oczyszczalni ścieków

Procedurę realizowano w I etapie badań.

Odważono po 10 g ziemi z 50 próbek gruntów oraz 10 g osadu ściekowego z 4 próbek, 10 ml recyrkulatu z dwóch próbek i 10 ml ścieków surowych z 4 próbek pochodzących z oczyszczalni ścieków i przeniesiono do sterylnych kolb Erlenmeyera o pojemności 200 ml, zalano 90 ml RF i wytrząsano 2 godziny przy prędkości obrotów 130 rpm. Przygotowano rozcieńczenia do 10^{-8} względem RF dla każdego powtórzenia, wysiano po 100 μ l na szalki Petriego z podłożem TSA i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 72 godziny. Po 72 godzinach zliczono wyrosłe kolonie.

3.5.7. Ekstrakcja DNA z próbek środowiskowych

Procedurę realizowano w II etapie badań.

Dziesięć próbek z każdego stanowiska (s1 – s6) poddano ekstrakcji DNA (DNA ekstrahowano łącznie z 60 próbek). Metagenomowy DNA ekstrahowano z 0,5 g próbek gleby i osadów ściekowych oraz z 0,5 ml recyrkulatu i ścieków surowych za pomocą zestawu Soil DNA Mini Kit (Syngen Biotech Sp. z o.o.) zgodnie z protokołem producenta. Wyekstrahowane DNA zostało dalej oczyszczone z zanieczyszczeń (m.in.: kwasami humusowymi) przy użyciu zestawu Environmental DNA & RNA Purification Kit (EURx Sp. z o.o.) zgodnie z protokołem producenta. Jakość wyekstrahowanego i oczyszczonego DNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru (BioPhotometer plus, Eppendorf), mierząc stosunek A260/280 (w celu sprawdzenia próbek pod kątem zanieczyszczenia RNA) oraz stosunek A260/230 (w celu sprawdzenia próbek pod kątem zanieczyszczenia kwasami humusowymi), a następnie przeprowadzono PCR w celu wykrycia genu 16S rRNA. Wszystkie 60 próbek przeszło testy kontroli jakości. Po testach kontroli jakości 10 próbek DNA z każdego stanowiska zmieszano w jedną próbkę. Otrzymane sześć próbek oznaczono odpowiednio jako s1, s2, s3, s4, s5 i s6 i zsekwencjonowano, zgodnie z metodyką podaną w punkcie 3.5.9.

3.5.8. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) i elektroforeza DNA

Procedurę realizowano w II i III i V etapie badań.

W celu wykrycia genu 16S rRNA, zastosowano zestaw PCR Kit (firmy A&A Biotechnology) i specyficzne startery (27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG oraz 1492R: GGTTACCTTGTACGACTT). Charakterystyka reakcji PCR: 10x bufor 2 μ l, $MgCl_2$ (25 mM) 2 μ l, dNTP (8 mM) 2 μ l, startery 27F 1 μ l i 1492R 1 μ l, DNA 2,5 μ l, polimeraza Taq (1 U/ μ l) 0,2 μ l, uzupełniono wodą do PCR do 25 μ l. Warunki temperatury: początkowa denaturacja nici DNA 5 minut 94°C, dalej w 25 cyklach: denaturacja 30 s w 94°C, hybrydyzacja 30 s w 55°C, elongacja 60 s w 72°C, końcowa elongacja 1 cykl 5 minut w 72°C (Lane, 1991).

Po zakończeniu reakcji PCR, przeprowadzono elektroforetyczny rozdział produktu PCR w 1% żelu agarozowym przy 110 V przez czas 30 minut, żel był zabarwiony barwnikiem fluorescencyjnym Midori Green interkalującym do DNA, po rozdziale elektroforetycznym wykonano zdjęcia żelu w świetle UV.

3.5.9. Sekwencjonowanie DNA i analiza bioinformatyczna

Procedurę realizowano w II i V etapie badań.

DNA wyekstrahowane z próbek środowiskowych i konsorcjów bakteryjnych poddano procesowi sekwencjonowania i analizie bioinformatycznej. Stężenie genomowego DNA mierzono przed procedurą przygotowania biblioteki za pomocą fluorymetrii z użyciem odczynnika PicoGreen (Life Technologies). Pomiar wykonano na aparacie Tecan Infinite. W celu przygotowania bibliotek dla sześciu próbek DNA (wyekstrahowanego z próbek ze stanowisk s1 – s6) oraz czterech próbek DNA konsorcjów bakteryjnych. Metagenomowy DNA fragmentowano przez sonikację na urządzeniu Covaris E210 (Covaris), zgodnie z parametrami zalecanymi do przygotowania biblioteki do sekwencjonowania przy użyciu technologii Illumina. Biblioteki przygotowano przy użyciu zestawu NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs) zgodnie z instrukcjami producenta. Każda próbka została jednoznacznie oznaczona indeksami TruSeq UD. Sekwencjonowanie przeprowadzono przy użyciu sekwenatora NovaSeq6000, technologii sparowanych końców (PE), 2 x 150nt, przy użyciu odczynników NovaSeq 6000 S4 Reagent Kit v1.5 300 cykli (Illumina) zgodnie z protokołem producenta. Odczyty zostały przefiltrowane za pomocą Cutadapt w wersji 3.0. Kontrolę jakości wyników sekwencjonowania przeprowadzono za pomocą programu FastQC. Późniejsza analiza danych została przeprowadzona przy użyciu narzędzia Trimmomatic (wersja 0.38) (Bolger i in., 2014) (SLIDINGWINDOW:4:20, HEADCROP:5 i MINLEN:100). Ludzkie odczyty usunięto przy użyciu BMTagger (v. 1.1.0) (Rotmistrovsky i Agarwala, 2011) oraz bazy

danych ludzkiego genomu GRCh38/hg38. Uzyskane niezmontowane odczyty zostały przypisane do taksonów przy użyciu Kraken2 (v. 2.0.8-beta) (Wood i in., 2019) oraz sekwencji białek prokariotycznych, grzybowych i wirusowych zawartych w bazie danych NCBI RefSeq (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> dostęp 14.07.2022). Metagenomy zostały złożone przy użyciu SPAdes v3.13.1, a przycięte odczyty zmapowano do kontigów przy użyciu Bowtie2 w wersji 2.3.5.1. Kontigi krótsze niż 1 kb lub o średnim pokryciu mniejszym niż pięć zostały odrzucone z zestawu. QUAST (wersja 5.0.2) został użyty do oceny zebranych kontigów. Adnotacja została następnie wykonana przy użyciu programu PROKKA (v. 1.13) z parametrami domyślnymi oraz przy użyciu KofamScan (v. 1.3.0) z profilami KOfam HMM (v. 26.04.2021). Trafienia z wynikiem bitowym <60 i wartością $e > 1 \times 10^{-5}$ zostały odrzucone. Na podstawie numerów KO i klasyfikacji ortologów KEGG geny przypisano do szlaków metabolicznych. Duplikaty zostały usunięte za pomocą MarkDuplicates z zestawu narzędzi Picard. Dla wszystkich próbek pokrycie wyrażono jako transkrypty na milion (tpm), obliczone wg wzoru (1). Taksonomiczne przypisanie sekwencji przeprowadzono przy użyciu metody ostatniego wspólnego przodka z parametrami domyślnymi (taxator-tk v1.3.3e).

$$TPM = \frac{r_g \times rl \times 10^6}{fl_g \times T}$$

$$T = \sum_{g \in G} \frac{r_g \times rl}{fl_g}$$
(1)

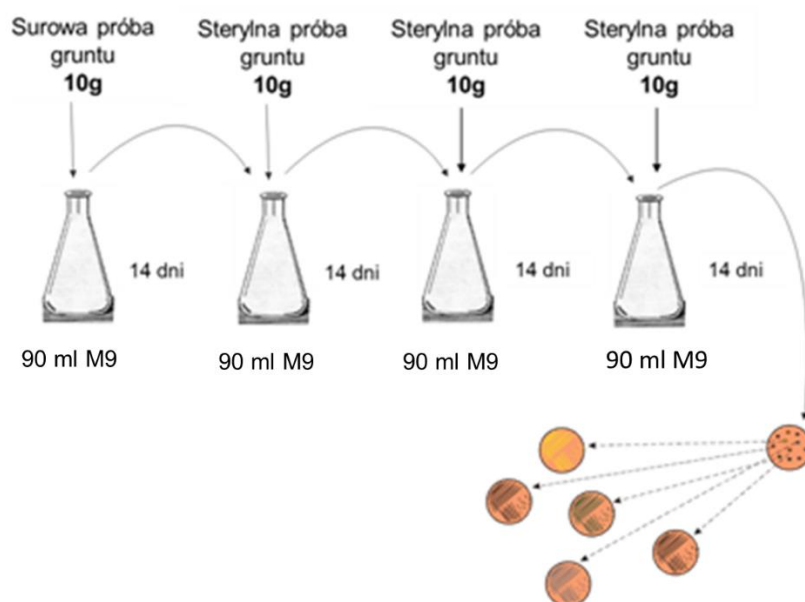
r_g : odczyty zmapowane do genu g
 rl : długość odczytu
 fl_g : feature length – długość funkcji

3.5.10. Izolacja bakterii heterotroficznych, zdolnych do rozkładu HZO

Procedurę realizowano w III etapie badań.

W celu izolacji szczepów bakteryjnych prowadzono serię trzech 14-dniowych pasażów hodowli na płynnym podłożu mineralnym M9 wzbogaconym wybranymi próbkami gruntu (grunty rolne, leśne) oraz próbkami pochodzącymi z oczyszczalni ścieków (osad ściekowy, recyrkulat ściekowy oraz ścieki surowe) oraz dodatkiem 0,5 ml preparatu Chwastox trio zawierającego HZO, w postaci chlorowanych pestycydów (ryc.3.). Próbki pochodzące z danego stanowiska zmieszano i ujednolicono (stanowiska: grunty uprawne, grunty leśne, osad ściekowy, recyrkulat ściekowy oraz ścieki surowe). W pierwszym etapie do podłoża dodano surową próbkę gruntu lub próbki z oczyszczalni ścieków, zaś do kolejnych 3 pasażów

wysterylizowaną próbkę gruntów lub próbki z oczyszczalni ścieków. Miało to na celu promowanie rozwoju drobnoustrojów zdolnych do wzrostu w obecności HZO obecnych w podłożu i wykorzystanie ich jako źródła węgla i energii. Po ostatnim pasażu wysiano płyn hodowlany w rozcieńczeniach do 10^{-7} względem RF na podłoże TSA, schemat działania przedstawiono na rycinie 2. Po 72 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej zliczono wyrosłe kolonie. Z każdego wariantu (posiewów pochodzących z hodowli prowadzonej na próbkach gruntów rolnych, leśnych oraz próbkach z oczyszczalni ścieków) przesiewano 70 kolonii na świeże podłoże TSA tzw.: metodą suchych rozcieńczeń (posiew redukcyjny) w celu uzyskania czystych kultur mikroorganizmów. Wykonanie posiewu redukcyjnego wykonano w kolejnych trzech pasażach dla każdego 70 kolonii.



Rycina 2. Schemat selekcji szczepów zdolnych do rozkładu produktów ropopochodnych.

3.5.11. Ekstrakcja DNA kolonii bakteryjnych

Procedurę realizowano w III etapie badań.

Do ekstrakcji DNA wyizolowanych szczepów bakteryjnych wykorzystano pojedynczą kolonię, którą zawieszono w 100 μ l 10 mM buforu TE w 200 μ l probówkach typu eppendorf, poddano wytrząsaniu i wirowano z prędkością 12000 rpm przez 10 minut. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 20 μ l roztworu do lizy komórkowej (*PCR lysis solution*). Następnie inkubowano w 95 °C przez 15 minut (w termocyklerze do PCR) a następnie schłodzono do 4 °C, po czym natychmiast dodano 180 μ l sterylnej wody MiliQ i umieszczono

próbki na lodzie. Jakość wyekstrahowanego i oczyszczonego DNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru (BioPhotometer plus, Eppendorf), mierząc stosunek A260/280 (w celu sprawdzenia próbek pod kątem zanieczyszczenia RNA), oraz mierząc jego stężenie. Następnie przeprowadzono PCR, w celu wykrycia genu 16S rRNA.

3.5.12. Analizy restrykcyjne fragmentów genów 16S rRNA

Procedurę realizowano w III etapie badań.

Trawienie enzymem restrykcyjnym *Hae*III (10 U/ μ L) prowadzono w warunkach zalecanych przez producenta (Thermo Fisher Scientific Inc.) przez 30 minut w 37°C, używając 2 jednostki enzymu na około 1 μ g DNA. Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej DNA poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym przez 30 minut przy napięciu 100 V.

3.5.13. Przygotowanie *inoculum* bakteryjnego

Procedurę realizowano w IV i VI etapie badań.

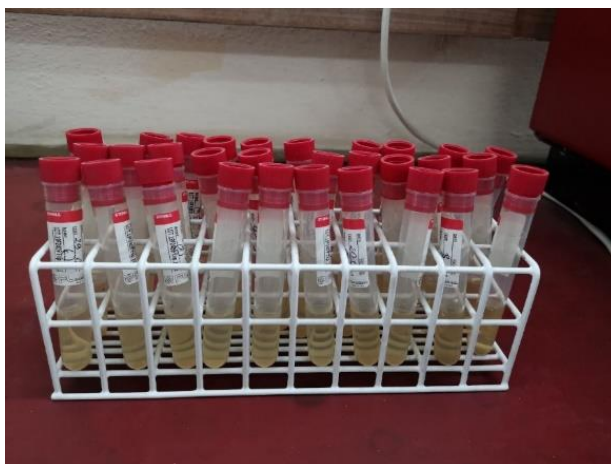
5 ml podłoża płynnego bulion odżywczy (BO) zaszczerpiono kulturami bakteryjnymi (każda probówka z podłożem BO została zaszczerpiona konkretną kulturą bakteryjną), prowadzono hodowlę 24-godziną z wytrząsaniem 130 rpm w 22°C. Hodowlę wirowano przy 6500 rpm, przez 10 minut w celu oddzielenia podłoża od komórek bakteryjnych. Po odwirowaniu usunięto supernatant i przepłukano osad roztworem RF, po czym wirowano w tych samych warunkach, procedurę płukania i wirowania powtórzono dwukrotnie. Po ostatnim wirowaniu osad zawieszono w podłożu M9 uzyskując końcową objętość 20 ml. Dla tak przygotowanego *inoculum* oznaczano liczebność mikroorganizmów, metodą płytkową Kocha.

3.5.14. Selekcja bakterii zdolnych do biotransformacji halogenowanych pestycydów

Procedurę realizowano w IV etapie badań.

Wyizolowane szczepy bakterii z próbek gruntów i oczyszczalni ścieków poddano badaniom pod kątem zdolności do dehalogenacji wybranych pestycydów. Symulacja dehalogenacji przeprowadzona została w probówkach (fot. 1.) w objętości 5 ml na podłożu M9, do którego dodano 100 μ l mieszaniny pestycydów Chwastox trio jako jedyne źródła węgla i energii (Ryc. 3). Dodano 200 μ l *inoculum* bakteryjnego o gęstości 10^8 jtk/ml. Następnie hodowlę inkubowano w 22°C przez 60 dni z wytrząsaniem (130 rpm). Przy rozpoczęciu symulacji dehalogenacji i po upływie czasu inkubacji przeprowadzono ekstrakcję próbki płynu hodowlanego oraz oznaczano zawartości pestycydów z wykorzystaniem GC-MS, zgodnie z

metodyką podaną w punkcie 3.5.5. Przeprowadzono również pomiar żywotności analizowanych szczepów poprzez odpipetowanie 30 µl płynu hodowlanego punktowo na podłoże AO na szalkach Petriego. Szczepy charakteryzujące się najwyższą redukcją pestycydów zostały wyselekcjonowane do dalszych symulacji, wchodząc finalnie w skład trzech konsorcjów (Rozt, Rol, Ocz).

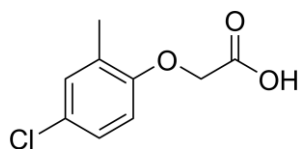


Fotografia 1. Symulacja rozkładu pestycydów wchodzących w skład preparatu Chwastox trio.

Kwas 2-metylo-4-chlorofenoksyoctowy (MCPA)
 $C_9H_9ClO_3$

masa molowa: 200,62 g/mol
 rozpuszczalność w wodzie:
 270 g/l

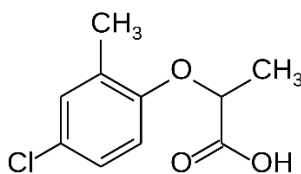
W Chwastox trio występuje w formie soli potasowych w stęż.: 200 g/l



Kwas metylochlorofenoksypropionowy (Mecoprop-P)
 $C_{10}H_{11}ClO_3$

masa molowa: 214,64 g/mol
 rozpuszczalność w wodzie:
 0,88 g/l

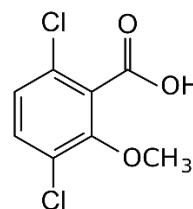
W Chwastox trio występuje w formie soli potasowych w stęż.: 150 g/l



kwask 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesowy (Dicamba)
 $C_8H_6Cl_2O_3$

masa molowa: 221,03 g/mol
 rozpuszczalność w wodzie:
 8,31 g/l

W Chwastox trio występuje w formie soli potasowych w stęż.: 40 g/l



Rycina 3. HZO wchodzące w skład preparatu Chwastox trio.

3.5.15. Oznaczenia aktywności celulolitycznej szczepów bakteryjnych

Procedurę realizowano w IV etapie badań.

5 µl hodowli nocnej badanego szczepu bakterii wysiano punktowo na podłoże do oznaczenia aktywności celulolitycznej. Płytki inkubowano w 28°C przez 48 godzin. Po inkubacji płytki zostały zalane jodyną Grama na 3 do 5 minut, po czym obserwowano wystąpienie przejaśnienia wokół miejsca inokulacji badanym szczepem bakterii. Przejaśnienie wokół punktu inokulacji oznacza wytwarzanie celulaz przez badany szczep (Kasana i in., 2008).

3.5.16. Oznaczenia aktywności lipolitycznej szczepów bakteryjnych

Procedurę realizowano w IV etapie badań.

10 µl hodowli nocnej badanego szczepu bakterii wysiano punktowo na podłoże do analizy aktywności lipolitycznej. Płytki inkubowano w 37°C przez 48 godzin. Produkcję lipaz monitorowano przez naświetlanie płytek światłem UV przy długości fali równej 350 nm. Po czasie inkubacji wokół kolonii produkujących lipazy widoczne było pomarańczowe halo fluorescencji. Szczepy nieprodukujące lipaz, akumulują rodaminę B, wchodzącą w skład podłoża, tworząc kolonie o różowym zabarwieniu, nie wykazując obecności pomarańczowego fluorescencyjnego halo wokół kolonii po naświetleniu UV (Kouker i Jaeger, 1987).

3.5.17. Oznaczenia aktywności ureolitycznej szczepów bakteryjnych

Procedurę realizowano w IV etapie badań.

Oznaczenie aktywności ureolitycznej przeprowadzono w probówkach zawierających po 5 ml podłoża płynnego do oznaczenia aktywności ureolitycznej, które zaszczerpiono czystymi, 24 -godzinnymi hodowlami z podłoża stałego. Próbkę inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C. O obecności ureazy świadczyła zmiana zabarwienia podłoża z pomarańczowo-czerwonego na purpurowo-fioletowe.

3.5.18. Ekstrakcja DNA konsorcjów bakteryjnych

Procedurę realizowano w V etapie badań.

DNA konsorcjów bakteryjnych ekstrahowano z 24-godzinnej hodowli płynnej prowadzonej na podłożu bulion odżywczy w objętości 10 ml. Po inkubacji hodowlę wirowano z prędkością 12000 rpm, przez 10 minut. Supernatant odrzucono, a uzyskany osad płukano jeszcze dwukrotnie buforem PBS, po czym powtórnie wirowano z prędkością 12000 rpm, przez 10 minut. Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w 1 ml buforu PBS. Z tak

przygotowanych próbek ekstrahowano DNA za pomocą zestawu Soil DNA Mini Kit (Syngen Biotech Sp. z o.o.) zgodnie z protokołem producenta. Wyekstrahowane DNA zostało dalej oczyszczone z zanieczyszczeń przy użyciu zestawu Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit (EURx Sp. z o.o.) zgodnie z protokołem producenta. Jakość wyekstrahowanego i oczyszczonego DNA sprawdzono za pomocą spektrofotometru, mierząc stosunek A260/280 (w celu sprawdzenia próbek pod kątem zanieczyszczenia RNA). Stężenie DNA mierzono z wykorzystaniem Qubit 2.0 Invitrogen wg protokołu producenta. Następnie wykonano PCR w celu wykrycia genu 16S rRNA. Wyekstrahowane próbki DNA bakterii należących do danego konsorcjum pulowano w jedną próbkę, w ten sposób uzyskano cztery próbki DNA metagenomowego oznaczone Rozt, Rol, Ocz i Rop – należące do czterech konsorcjów bakteryjnych. Próbki następnie sekwencjonowano, zgodnie z metodyką podaną w punkcie 3.5.9.

3.5.19. Symulacje biotransformacji HZO

Symulacje biotransformacji 2,4-D przez konsorcja bakteryjne

Procedurę realizowano w VI etapie badań.

Symulacje prowadzone były w 150 ml kolbach Erlenmayera. Do kolb odważono 3g ziemi okrzemkowej, sterylizowanej następnie trzykrotnie w aparacie Kocha w procesie tyndalizacji. Po wyjałowieniu ziemi okrzemkowej dodano 90 ml podłoża M9 oraz 2,4-D dodane po uprzednim rozpuszczeniu w 96% etanolu uzyskując w kolbach symulacyjnych następujące stężenia: 16 g/l, 8 g/l, 4,2 g/l, 2,1g/l -testowane wobec wszystkich czterech konsorcjów. Kolbki zaszczipiono 1 ml *inoculum* konsorcjum bakteryjnego o gęstości 10^8 jtk/ml. Następnie hodowlę inkubowano w 22°C z wytrząsaniem (120 rpm) (fot. 2.).

W trakcie symulacji dehalogenacji pobierano próbki, za każdym razem z każdej kolbki symulacyjnej pobierano 2 próbki, płynu hodowlanego do ekstrakcji i oznaczano zawartość 2,4-D z wykorzystaniem GC-MS i/lub GC-ECD. W trakcie trwania symulacji dehalogenacji przeprowadzono pomiar żywotności konsorcjów bakteryjnych użytych do symulacji, poprzez odpipetowanie 30 μ l płynu hodowlanego punktowo na podłoże AO na szalkach Petriego.



Fotografia 2. Symulacja rozkładu HZO.

Symulacje biotransformacji 4-chlorofenolu przez konsorcja bakteryjne

Procedurę realizowano w VI etapie badań.

Symulacje sprawdzające wpływ czynników abiotycznych prowadzone były w 150 ml kolbach Erlenmayera. Do kolb odważono 3g ziemi okrzemkowej, sterylizowanej następnie trzykrotnie w aparacie Kocha w procesie tyndalizacji. Po wyjałowieniu ziemi okrzemkowej dodano 90 ml podłoża M9 oraz 250 μ l 1% wodnego roztworu 4-chlorofenolu. Tak przygotowane próbki zaszczepiono 1 ml *inoculum* konsorcjum Rol o gęstości 10^8 jtk/ml wariant A, do wariantu B dodano dodatkowo 520 μ l 96% etanolu jako dodatkowe źródło węgla i energii, do wariantu C dodano 1 ml roztworu metylokobalaminy (0,0125 mg/ml) jako alternatywny przenośnik elektronów, a do wariantu D dodano etanol (520 μ l 96% etanolu) i metylokobalaminę (1 ml roztworu o stężeniu 0,0125 mg/ml). Wszystkie warianty oraz kontrolę wykonano w trzech powtórzeniach. Hodowlę inkubowano w 22°C z wytrząsaniem (120 rpm) (fot. 2.). Próbkę płynu hodowlanego do ekstrakcji i oznaczeń zawartości 4-chlorofenolu z wykorzystaniem GC-MS i/lub GC-ECD pobierano w czasie rozpoczęcia symulacji oraz w trakcie trwania symulacji, monitorując zmiany stężeń p-chlorofenolu, za każdym razem z każdej kolbki symulacyjnej pobierano 2 próbki płynów hodowlanych do ekstrakcji. W trakcie symulacji dehalogenacji przeprowadzono pomiar żywotności konsorcjów bakteryjnych

użytych do symulacji, poprzez odpipetowanie 30 µl płynu hodowlanego punktowo na podłoże AO na szalkach Petriego w trakcie trwania symulacji.

3.5.20. Ekstrakcja białek z płynów hodowlanych

Realizowano w VI etapie badań.

Próbki płynu hodowlanego o objętości 20 ml pobrano z każdego testu symulacji transformacji 2,4-D (użytego w stężeniu 2,1 g/l) w czasie 1, 2 i 6 dni od rozpoczęcia symulacji oraz z testów symulacji transformacji 4-chlorofenolu (warianty 1A, 1B, 1C i 1D) w czasie 30 dni od rozpoczęcia symulacji. Płyn hodowlany wirowano z prędkością 12 000 rpm przez 20 minut w celu oddzielenia frakcji białek wydzielniczych od wewnątrzkomórkowych, oraz oddzielenia od komórek i struktur komórkowych. Po wirowaniu supernatant przelano do sterylnych probówek typu falkon o objętości 50 ml i rozpoczęto procedurę strącania białek z roztworu za pomocą stężonego kwasu trójchlorooctowego (TCA). Zimny (schłodzony do ok. 4 °C) TCA dodano do próbek w ilości dającej stężenie końcowe TCA w próbce równe 20%. Próbkę wymieszano, a następnie inkubowano w 4 °C przez minimum 16 godzin. Po inkubacji wirowano z prędkością 12 000 rpm w 4 °C przez 25 minut. Po wirowaniu usunięto supernatant, a powstały osad przemyto lodowatym acetonem (przechowywanym w -20 °C przez ok. 24 godz.). Próbkę zawieszono w acetonie przeniesiono do 1,5 ml probówek typu eppendorf, po czym wirowano z prędkością 15 000 rpm 15 min w 4 °C, przemyto dwukrotnie lodowatym acetonem po czym wirowano, supernatant odrzucono. Suszono próbki na powietrzu przez ok. 20 minut, następnie zawieszono w 30 mM buforze tris-HCl i poddano identyfikacji, zgodnie z punktem 3.5.21.

3.5.21. Identyfikacja białek

Procedurę realizowano w VI etapie badań.

Białka identyfikowano za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym Spektrometrem Mas (LC – MS-MS / MS) przy użyciu systemu Nano-Acquity (Waters) LC i spektrometru masowego Orbitrap Velos (Thermo Electron Corp., San Jose, CA) w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Przed analizą białka poddano standardowej procedurze „trawienia w roztworze”, podczas której były redukowane 50 mM Tris-(2-karboksyetylo)fosfiną (przez 60 min w 60°C), alkilowane 200 mM S-metanotiosulfonianem metylu (45 minut w temperaturze pokojowej) i trawione przez noc trypsyną (Sequencing Grade Modified Trypsin; Promega V5111). Mieszaninę peptydów naniesiono na wstępną kolumnę RP-18 (nanoACQUITY Symmetry®

C18; Waters 186003514), z wodą zawierającą 0,1% kwasu trifluorooctowego stosowaną jako fazę ruchomą. Następnie mieszaninę przeniesiono na kolumnę nano-HPLC RP-18 (nanoACQUITY BEH C18; Waters 186003545) stosując gradient acetonitrylu (ACN) (5%–35% ACN w 180 min) z 0,05% kwasem mrówkowym (natężenie przepływu 250 µl/min). Wylot kolumny był bezpośrednio połączony ze źródłem jonów spektrometru pracującego w reżimie zależnego od danych przełączania MS na MS/MS. Każdą analizę poprzedziła ślepa próba zapewniająca brak zanieczyszczenia krzyżowego z poprzednich próbek. Uzyskane surowe dane zostały przetworzone przez Mascot Distiller, a następnie Mascot Search (Matrix Science, Londyn, Wielka Brytania, licencja na miejscu) w bazie danych białek NCBI. Peptydy z wynikiem Mascot przekraczającym wartość progową odpowiadającą <5% wartości oczekiwanej, obliczonym za pomocą procedury Mascot, uznano za pozytywnie zidentyfikowane.

3.5.22. Testy ekotoksyczności

W VII etapie badań przeprowadzono testy ekotoksyczności płynów hodowlanych z symulacji biotransformacji 2,4 D i 4-chlorofenolu z zastosowaniem glonów, skorupiaków i roślin wyższych.

Test hamowania wzrostu glonów

Test hamowania wzrostu glonów *Desmodesmus quadricauda* wykonano według procedury OECD 201. Oceny inhibicji wzrostu organizmów dokonano na podstawie mikroskopowego pomiaru zagęszczenia komórek po 72-godzinny kontakt z substancjami – 2,4-D, oraz metabolitami jego rozkładu obecnymi w płynie hodowlany.

Test immobilizacji skorupiaków

Test immobilizacji skorupiaków wykonano zgodnie z procedurą OECD 202. W badaniach zastosowano skorupiaki *Daphnia magna*. Ocenę immobilizacji (unieruchomienia) bioindykatorów dokonano po 48-godzinny kontakt z substancjami – 2,4-D, oraz metabolitami jego rozkładu obecnymi w płynie hodowlany.

Test hamowania wzrostu roślin

Test hamowania wzrostu roślin wyższych wykonano na trzech gatunkach: *Sorghum nigrum*, *Lepidium sativum*, *Sinapis alba*, według procedury testu Phytotoxkit (MicroBioTests Inc, Gent, Belgia). Oceny inhibicji wzrostu organizmów dokonano na podstawie kiełkowania

nasion oraz pomiaru długości korzenia po 120-godzinny kontakt z metabolitami biotransformacji 2,4-D obecnymi w glebie wykorzystanej do testu. W pierwszej kolejności określono pojemność sorpcyjną gleby (referencyjnej OECD) wg procedury testu. Test prowadzono w płytkach testowych w których umieszczono 90 ml gleby referencyjnej którą nasączono odpowiednią ilością płynu pozwalającą osiągnąć maksymalną pojemność sorpcyjną. W przypadku wariantu kontrolnego była to woda dejonizowana, a w przypadku płynu hodowlanego – odpowiednim jego rozcieńczeniem względem wody dejonizowanej, uzyskując stężenia 5%, 10%, 20%. Na równomiernie rozłożoną warstwę gleby nałożono bibułę, a na nią po dziesięć nasion testowanych gatunków roślin, każdy gatunek na osobnej płytce testowej, podobnie każdy wariant stężenia płynu hodowlanego na osobnej płytce testowej (fotografia 3.).



Fotografia 3. Płytki testowe w teście Phytotoxkit.

3.6. Procedury obliczeniowe stosowane w testach ekotoksyczności

Procedury realizowano w VII etapie badań.

Określenie inhibicji wzrostu glonów (wg normy OECD 201).

Tempo wzrostu glonów określono na podstawie równania:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (2)$$

gdzie:

N_0 - liczba komórek glonów w 1 cm^3 w czasie t_0 ;

N_n - liczba komórek glonów w 1 cm^3 w czasie t ;

t_n - czas ($t - t_0$).

Inhibicję wzrostu obliczano zgodnie z równaniem:

$$I\mu_i = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (3)$$

gdzie:

$I\mu_i$ - procent inhibicji;

μ_i - średnie tempo wzrostu glonów w badanym stężeniu;

μ_c - średnie tempo wzrostu glonów w próbce kontrolnej.

Obliczanie stężeń efektywnych

Stężenia efektywne EC_{50} w testach obliczono metodą probitową, określając 95% przedziały ufności (Weber, 1972):

$$LC(EC)_{50} - t = 10^{\frac{5 - \bar{y} + a \cdot \bar{x}}{a}} \quad (4)$$

gdzie:

$\bar{x}$ - wartość średnia logarytmów poszczególnych stężeń;

a - współczynnik regresji;

5 - wartość stała probitu odpowiadająca 50% śmiertelności/inhibicji;

$\bar{y}$ - średnia wartość probitów odpowiadająca % śmiertelności/inhibicji dla poszczególnych stężeń.

4. Wyniki i dyskusja:

4.1. Analizy fizykochemiczne próbek środowiskowych

Celem I etapu badań była charakterystyka fizykochemiczna sześciu wytypowanych środowisk (zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie przekształconych), w tym określenie występowania zanieczyszczeń pestycydami, halogenami, substancjami ropopochodnymi, metalami ciężkimi. Ze środowisk poddanych antropopresji pochodziły próbki oznaczone w niniejszej pracy s1, s2, s3 (stanowiące próbki z gruntów rolnych) oraz s6 (stanowiące próbki z oczyszczalni ścieków), ze środowisk zbliżonych do naturalnych pochodziły próbki oznaczone s4 i s5 (stanowiące grunty leśne). Szczegółowy opis pochodzenia próbek i metodyki poboru przedstawiono w rozdziale 3.4.

Wszystkie próbki charakteryzowały się odczynem lekko kwaśnym (6,2 – 6,4 pH). Średnia zawartość materii organicznej w próbkach wynosiła odpowiednio: s1 – 3,44%, s2 – 3,90%, s3 – 2,64%, s4 – 4,57%, s5 – 14,21% i s6 – 75,58%.

Jednym z podstawowych kroków w charakterystyce środowiska zasiedlonego przez zespoły mikroorganizmów zdolnych do metabolizowania wybranych substancji – polutantów, jest ocena obecności współistniejących zanieczyszczeń. W związku z tym dokonano analizy składu i zawartości metali ciężkich, halogenów oraz obecności produktów ropopochodnych w analizowanych próbkach.

Wyniki zawartości metali ciężkich w próbkach gleb i osadów ściekowych przedstawione w tabeli 4 wykazały, że różniły się one od siebie pod względem zawartości

Tabela 4. Zawartość metali ciężkich w próbkach gruntu i osadów ściekowych metodą emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES).

próbka	As	Ba	Cr	Sn	Zn	Cd	Co	Cu	Mo	Ni	Pb	Fe
	mg/kg s.m.											%
s1	<3	33	10	<2	19	<0,5	3	7	<0,5	7	11	0,71
s2	<3	68	11	<2	39	<0,5	3	22	<0,5	13	14	0,50
s3	4	91	14	2	58	<0,5	3	21	<0,5	9	21	1,08
s4	<3	44	15	<2	21	<0,5	4	7	<0,5	9	13	0,99
s5	<3	76	16	<2	38	<0,5	3	21	<0,5	15	16	0,77
s6	<3	132	22	12	470	0,8	3	199	4	16	11	1,13

poszczególnych metali, przy czym próbka s6 charakteryzowała się znacznie wyższą zawartością metali niż wszystkie pozostałe. Największe różnice obserwowano w przypadku baru (33-91 mg/kg s.m. w próbkach s1-s5, 132 mg/kg s.m. w próbce s6), chromu (10-16 mg/kg s.m. w próbkach s1-s5, 22 mg/kg s.m. w próbce s6), cynku (19-58 mg/kg s.m. w próbkach s1-s5, 470 mg/kg s.m. w próbce s6), miedzi (7-22 mg/kg s.m. w próbkach s1-s5, 199 mg/kg s.m. w próbce s6) i molibdenu (<0,5 mg/kg s.m. w próbkach s1-s5, 4 mg/kg s.m. w próbce s6).

Zawartość halogenów w próbkach gleb przedstawiono w tabeli 5. Uzyskane wyniki wykazały ilość bromu poniżej limitu detekcji we wszystkich próbkach. W przypadku jodu ilość poniżej limitu detekcji w próbkach s1, s3-s5, oraz 14,50 mg/kg s.m. w próbce s2, wartości poniżej limitu detekcji w przypadku fluoru uzyskano w próbce s1, w próbce s2 31,50 mg/kg s.m., a w próbkach s3-s5 13,5 mg/kg s.m. Zawartość chloru była w zakresie od 37,5-78,0 mg/kg s.m. w próbkach gruntów rolnych (s1-s3) i 127,0 mg/kg s.m. w próbkach gruntów leśnych (s4 i s5).

Tabela 5. Całkowita zawartość halogenów (fluoru, chloru, bromu i jodu) w próbkach gruntu otrzymane metodą chromatografii jonowej.

Próbka	F	Cl	Br	I
	mg/kg s.m.			
s1	<5,00	37,5	<5,00	<5,00
s2	31,50	45,5	<5,00	14,50
s3	13,50	78,0	<5,00	<5,00
s4	13,50	127,0	<5,00	<5,00
s5	13,50	127,0	<5,00	<5,00

W przypadku fluoru, chloru i bromu ich zawartość była zgodna ze średnimi stężeniami obserwowanymi w litosferze. Według Kirka (2012) stężenia fluoru, chloru, bromu i jodu w litosferze wynoszą odpowiednio 770, 550, 1,6 i 0,3 (mg/kg). Fuge (2019) wskazał zawartość fluoru w skorupie ziemskiej na 557 mg/kg, Geilfus (2019) notuje średnie stężenie chloru w litosferze na 480 mg/kg, a inni autorzy obliczyli zawartość bromu na 2,1 mg/kg (Vassilev et al., 2000), z kolei zawartość jodu na 0,3 mg/kg (Cox i Arai, 2014). Stężenie jodu w próbce s2 było prawie pięćdziesiąt razy wyższe niż obserwowana zawartość jodu w litosferze (tabela 5). Przyczynę tak wysokiego stężenia trudno jednoznacznie wyjaśnić.

Analiza chemiczna składu próbek gleby i osadów pod kątem obecności HZO przeprowadzona za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) wykazała obecność DDT (dichlorodifenylotrichloroetan), DDE (dichlorodifenylodichloroetylen) i estrów kwasu trichlorooctowego (w próbkach s1–s3 oraz

s6), a także obecność estru oktadecylowego kwasu 2-chloropropanowego, chloroheksadekanu, trifluoroacetoksytetradekanu, kwasu tridecyloheptafluoromasłowego, 3,6-dichloro-9H-karbazolu, 1-chlorooktadekanu i 1-jodo-2-metylundekanu w próbkach s4 i s5. Należy nadmienić, że we wszystkich badanych próbkach gleby HZO występowały w ilościach śladowych. Próbki gruntów leśnych, w mniejszym stopniu przekształconych przez człowieka (s4 i s5) charakteryzowały się większą różnorodnością HZO niż próbki z lokalizacji antropogenicznie przekształconych. Ponadto zbadano zawartość pestycydów chloroorganicznych w próbkach gruntów i osadów ściekowych, za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem wychwyty elektronów (GC-ECD). Wyniki zawartości chlorowanych pestycydów w próbkach gruntów i osadów ściekowych przedstawiono w tabeli 6. Zawartość 4,4'-DDE w próbce s2 przekraczała dopuszczalne stężenia w użytkach rolnych w Polsce (Dz. U. 16.09.2016, poz. 1395), ponadto tylko w próbce s2 z próbek gruntów oraz w próbce osadów ściekowych s6 zaobserwowano wyższą niż śladowa zawartość izomerów DDD (dichlorodifenylodichloroetan), DDT i DDE.

W żadnej z analizowanych próbek gruntów nie stwierdzono podwyższonej zawartości metali ciężkich i nie wykryto węglowodorów ropopochodnych. Analiza chemiczna próbek gruntów nie wykazała obecności żadnych halogenowanych pestycydów organicznych, które były stosowane na gruntach rolnych przed pobraniem próbek. Może to być spowodowane migracją pestycydów do głębszych warstw gleby, gdzie panują warunki beztlenowe, i/lub rozprzestrzenianiem się pestycydów na znaczną odległość od miejsca zastosowania. Organohalogeny docierają do wód gruntowych głównie poprzez wodę, która infiltruje glebę i przedostaje się przez strefę nienasyconą poniżej do powierzchni wód gruntowych. Transport HZO do wód podziemnych jest spowodowany przez opady deszczu lub systemy nawadniające (de Souza i in., 2020). HZO są w dużej mierze zatrzymywane w glebie i warstwach wodonośnych, a transport tych związków do wód gruntowych i w ich obrębie jest trudny do przewidzenia. Zarówno HZO, jak i produkty ich degradacji mogą przedostawać się bezpośrednio do wód gruntowych przez strefy ruchome, ale niektóre związki są uwięzione w strefach nieruchomych i mogą być stopniowo uwalniane do wód gruntowych poprzez wypłukiwanie i dyfuzję, czasem długo po wprowadzeniu do środowiska. Ponadto wszelkie halogenowane pestycydy stosowane w miejscach pobierania próbek mogły zostać już przekształcone i/lub zdegradowane przez natywne mikroorganizmy glebowe, wchodząc w cykl halogenowy.

Tabela 6. Zawartość pestycydów chloroorganicznych w próbkach gleb i osadów uzyskanych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem wychwytu elektronów (GC-ECD). LOR - Limit raportowania.

parametr	jednostka	LOR	s1	s2	s3	s4	s5	s6
Sucha masa w 105 ° C	%	0,1	78,6	81,1	83,2	80,6	70,5	16,5
Pestycydy chloroorganiczne		mg/kg s.m.						
1,2,3,4-Tetrachlorobenzen		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
1,2,3,5- i 1,2,4,5- Tetrachlorobenzen		0,02	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
2,4-DDD		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	0,011
2,4-DDE		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
2,4-DDT		0,01	<0,010	0,012	<0,010	<0,010	<0,010	0,039
4,4'-DDD		0,01	<0,010	0,014	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
4,4'-DDE		0,01	<0,010	0,171	<0,010	<0,010	<0,010	0,016
4,4'-DDT		0,01	<0,010	0,062	<0,010	<0,010	<0,010	0,014
Alachlor		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Aldrina		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Alpha-Endosulfan		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Beta-Endosulfan		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Dichlobenil		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Dicofol		0,03	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030
Dieldryna		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Endryna		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heptachlor		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heptachloroepoksyd-cis		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heptachloroepoksyd-trans		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heksachlorobenzen(HCB)		0,005	<0,0050	<0,0050	<0,0050	<0,0050	<0,0050	<0,0050
Heksachlorobutadien		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heksachlorocycloheksan <i>Epsilon</i>		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heksachlorocycloheksan <i>Alpha</i>		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heksachlorocycloheksan <i>Beta</i>		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heksachlorocycloheksan <i>Delta</i>		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Heksachlorocycloheksan <i>Gamma</i>		0,01	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100	<0,0100
Heksachloroetan		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Pentachlorobenzen		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Kwintozen i pentachloroanalina		0,02	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
suma 3 tetrachlorobenzenów		0,03	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030	<0,030
suma 4 heksachlorocycloheksanów		0,04	<0,0400	<0,0400	<0,0400	<0,0400	<0,0400	<0,0400
suma 4 izomerów DDT		0,04	<0,040	0,259	<0,040	<0,040	<0,040	0,069
suma 6 izomerów DDT		0,06	<0,060	0,259	<0,060	<0,060	<0,060	0,080
suma aldryn and dieldryn		0,02	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
suma endosulfanów		0,02	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020	<0,020
Telodryna		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Trifluralina		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Izodryny		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010
Metoksychlor		0,01	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010	<0,010

Oznaczenie liczebności bakterii heterotroficznych w analizowanych próbkach pochodzących z badanych środowisk, wykonano wg procedury zaprezentowanej w punkcie 3.5.6., uzyskując następujące wyniki: dla stanowiska s1- średnia liczba bakterii wyniosła $7,4 \cdot 10^6$ jtk/ml, dla stanowiska s2- $6,4 \cdot 10^6$ jtk/ml, dla s3- $4,2 \cdot 10^6$ jtk/ml, dla s4- $1,4 \cdot 10^6$ jtk/ml, dla s5- $1,7 \cdot 10^6$ jtk/ml. Dla stanowiska s6, w przypadku ścieków surowych średnia liczba bakterii wyniosła $4,6 \cdot 10^6$ jtk/ml, dla recyrkulatu ścieków $5,4 \cdot 10^6$ jtk/ml, a w przypadku osadu ściekowego $3,9 \cdot 10^6$ jtk/ml. Wyniki wykazują obserwowaną w niezanieczyszczonych próbkach gruntów ilość mikroorganizmów.

4.2. Wyniki analiz metagenomów

W celu poznania potencjału mikroorganizmów różnych środowisk (zbliżonych do naturalnych oraz antropogenicznie przekształconych) do przeprowadzania procesu dehalogenacji HZO oraz w celu poznania ich składu taksonomicznego w ramach II etapu badań wykonano analizy metagenomowe sześciu próbek środowiskowych (s1-s6), których wyniki analiz fizykochemicznych przedstawiono w punkcie 4.1. Szczegółowy opis pochodzenia próbek i metodyki poboru przedstawiono w punkcie 3.4, natomiast sposób analiz metagenomowych w punkcie 3.5.9.

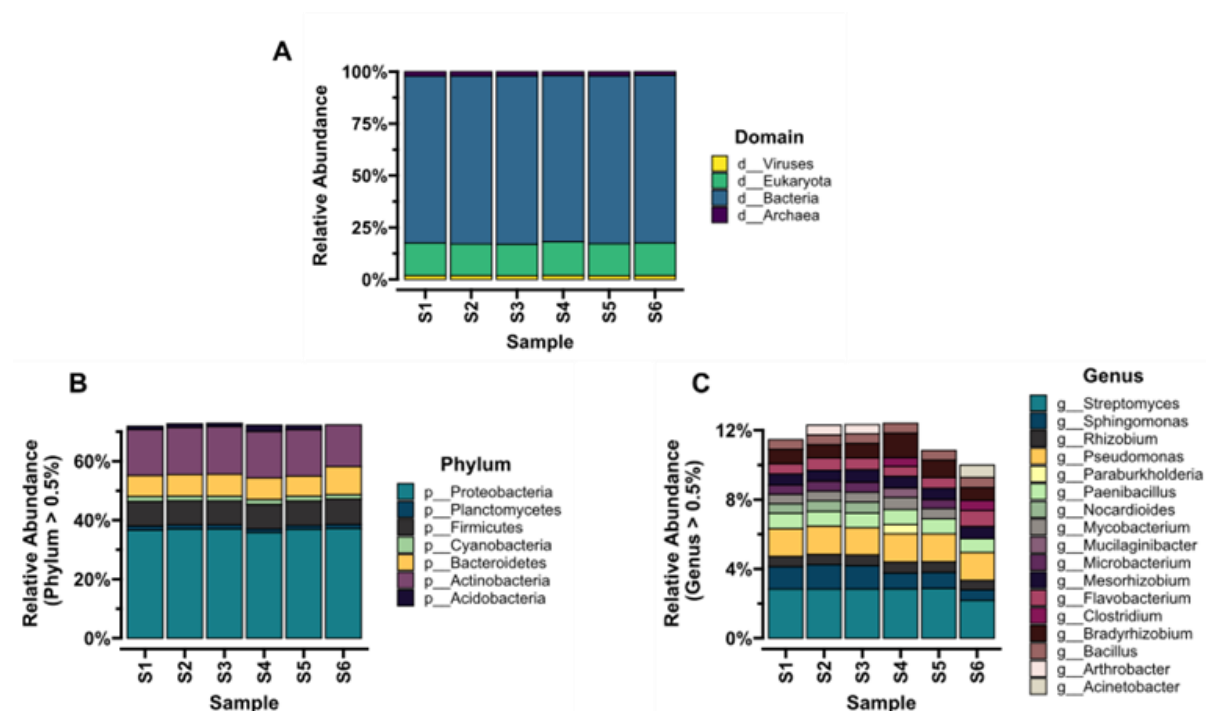
4.2.1. Ogólna charakterystyka metagenomów środowisk zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie zmodyfikowanych

Sekwencjonowanie metagenomowe próbek DNA pochodzących z badanych środowisk przeprowadzono przy użyciu systemu sekwencjonowania nowej generacji Novaseq 6000 firmy Illumina. Uzyskano średnio 47 168 834,5 surowych par odczytów o długości 150 pz. Po przeprowadzeniu kontroli jakości (filtrowanie odczytów niskiej jakości oraz zanieczyszczeń i chimer) pozostało średnio łącznie 47 080 794 odczytów par wysokiej jakości, które miały średnią długość $143,76 \pm 0,16$ pz. Klasyfikacja taksonomiczna była możliwa dla $51,48 \pm 3,36\%$ odczytów metagenomowych, podczas gdy adnotacja funkcjonalna była możliwa dla $58 \pm 9,69\%$ odczytów. Wyniki sekwencjonowania metagenomowego DNA zostały zdeponowane pod adresem: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA889689> (próbki s1-s6).

4.2.2. Skład taksonomiczny i różnorodność zespołów mikroorganizmów

Próbki s1-s6 pochodziły ze stanowisk tak samo oznaczonych s1-s6. W niniejszym rozdziale wyniki analizy próbek s1-s6, charakteryzują stanowiska s1-s6.

W metagenomach środowisk glebowych około 87% przypisanych odczytów dotyczyło bakterii. We wszystkich badanych stanowiskach dominującym typem była *Proteobacteria*, stanowiąca od 32% (stanowisko s4) do 43% (stanowisko s6) przypisanych odczytów, a następnie *Actinobacteria* dla stanowisk s1, s2, s3, s6 stanowiąca 10–12% i *Acidobacteria* s4, s5 stanowiąca 11–18% przypisanych odczytów. Dominującymi klasami w stanowiskach s1–s5 były *Alphaproteobacteria*, w zakresie od 13–16% przypisanych odczytów, oraz *Actinomycetia*, z 9–11% przypisanych odczytów, podczas gdy dominującą klasą w stanowisku s6 była *Betaproteobacteria* z 16% przypisanych odczytów (wykres 3).



Wykres 3. Skład taksonomiczny środowisk zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie zmodyfikowanych, wyrażony w procentach, przedstawiony na poziomie (A) – domeny (ang. *Domain*), (B) - dominujących typów (ang. *Phylum*) (względna obfitość, ang. *relative abundance* > 0,5%) oraz (C) - dominujących rodzajów (ang. *Genus*) (*relative abundance* > 0,5%), w oparciu o analizy metagenomów.

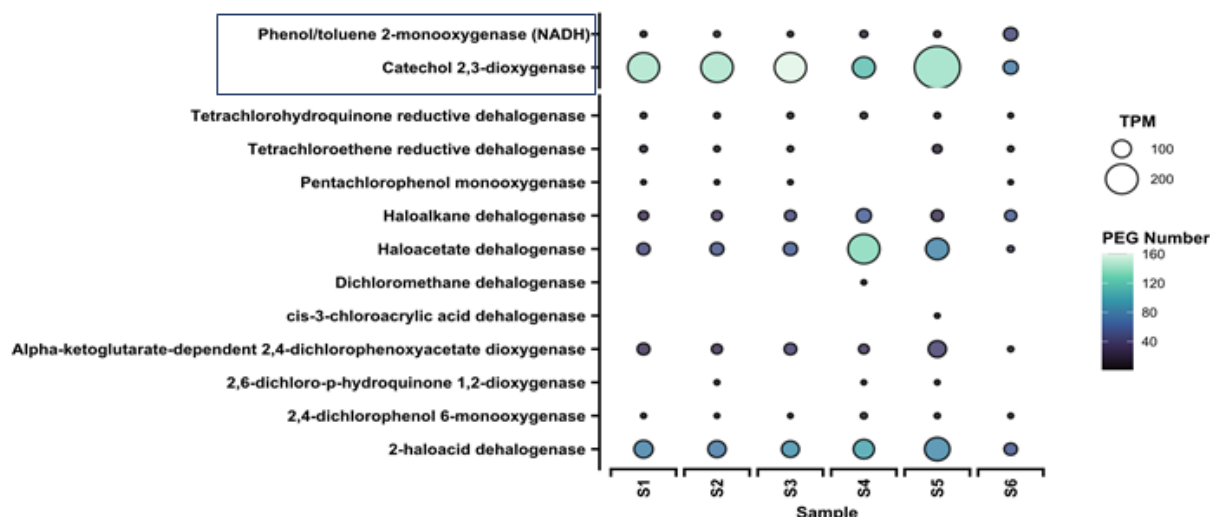
Zarówno w przypadku środowisk rolniczych, jak i pozarolniczych (stanowiska s1–s5) oraz oczyszczalni ścieków (stanowisko s6) dominowały rzędy *Hyphomicrobiales* i *Burkholderiales*. Dominującymi rodzinami były *Sphingomonadaceae* na stanowiskach s1–s3, *Nitrobacteraceae* na stanowiskach s4 i s5 oraz *Nitrospiraceae* na stanowisku s6. Najliczniejszymi rodzajami były

Sphingomonas, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* (s1–s5) oraz *Nitrospira*, *Propionivibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* w s6 (wykres 3).

4.2.3. Występowanie genów dehalogenaz w środowiskach zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie zmodyfikowanych

W metagenomach próbek środowiskowych zidentyfikowano geny kodujące enzymy uczestniczące w metabolicznej i kometabolicznej dehalogenacji, nazywane dalej metabolicznymi i kometabolicznymi dehalogenazami. Znalezionych zostało 11 genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i 2 geny kodujące dehalogenazy kometaboliczne, ze względną obfitością odpowiednio 1867 i 1214 transkryptów na milion (tpm) (ryc. 2). Największą liczebność genów kodujących dehalogenazy metaboliczne stwierdzono w próbce dla stanowiska s5 (475 tpm) i s4 (450 tpm), najmniejszą w s6 (136 tpm), podobną tendencję zaobserwowano w przypadku genów kodujących dehalogenazy kometaboliczne – największą ich ilość stwierdzono w próbce dla stanowiska s5 (312 tpm), a najmniejszą w s6 (134 tpm).

Najobficiej występującym genem wśród kodujących dehalogenazy metaboliczne była dehalogenaza 2-halokwasowa, ze względną obfitością 611 tpm, a miejscem o najwyższej względnej obfitości jego występowania było stanowisko s5 (149 tpm). Innym bardzo liczny genem kodującym dehalogenazy metaboliczne była dehalogenaza haloctanowa (524 tpm), z najwyższą względną liczebnością w próbce dla stanowiskach s4 (198 tpm) i s5 (133 tpm), następnie dehalogenaza haloalkanowa (292 tpm) i dioksygenaza 2,4-dichlorofenoksyoctanowa zależna od alfa-ketoglutaranu (286 tpm) i ponownie próbkami o najwyższych względnych obfitościach były odnotowane odpowiednio dla stanowisk s4 i s5. Najobficiej występującym genem kodującym dehalogenazę kometaboliczną była 2,3-dioksygenaza katecholowa ze względną obfitością 1092 tpm, z najwyższą względną obfitością dla próbki stanowiska s5 (300 tpm), a najniższą dla s6 (69 tpm) (wykres 3). Gen 2-monooksygenazy fenolowo-toluenowej był lepiej reprezentowany w antropogenicznie przekształconym środowisku s6 niż w innych środowiskach. Jeśli chodzi o inny gen kodujący monooksygenazę pentachlorofenolową, nie zaobserwowano go w próbkach ze środowisk zbliżonych do naturalnych, a geny kodujące dehalogenazę dichlorometanową i dehalogenazę kwasu cis-3-chloroakrylowego zaobserwowano tylko w próbkach ze środowisk zbliżonych do naturalnych (s4 i s5) (wyk. 4). Charakterystykę aktywności zidentyfikowanych dehalogenaz zestawiono w tabeli 7.



Wykres 4. Względna obfitość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaboliczne zidentyfikowane w metagenomach środowisk zbliżonych do naturalnych i przekształconych antropogenicznie, wyrażona w transkryptach na milion (tpm) odczytów. W ramce - dehalogenazy kometaboliczne. PEG (ang. *protein encoding genes*) – geny kodujące białka. Nazewnictwo enzymów w języku polskim zgodnie z tłumaczeniem podanym w tabeli 7.

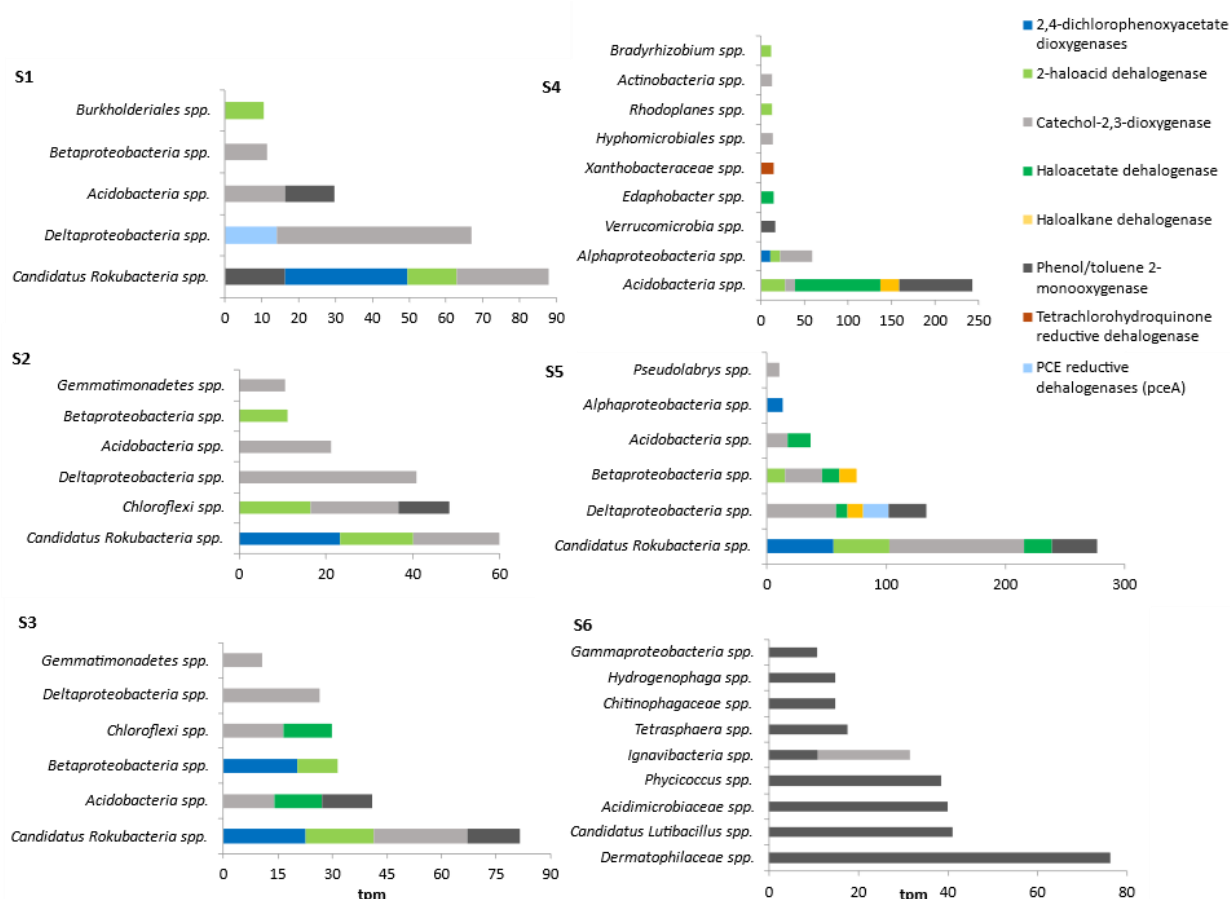
Tabela 7. Charakterystyka dehalogenaz, których geny zidentyfikowano w metagenomach próbek gruntów i osadów ściekowych.

Typ enzymu	Nazwa enzymu	Reakcja chemiczna	Charakterystyka mechanizmu dehalogenacji	Bibliografia
Metaboliczne dehalogenazy	Monooksygenaza pentachlorofenolu (pentachlorophenol monooxygenase)	$H^+ + NADPH + O_2 + \text{penta chlorofenol} = 2,3,5,6\text{-tetrachloro-1,4-benzochinone} + \text{chlorek} + H_2O + NADP^+$	Monooksygenaza pentachlorofenolu należy do klasy oksydoreduktaz (monooksygenaz) i jest odpowiedzialna za dechlorację pentachlorofenolu do tetrachlorobenzochinonu	Hlouchova, 2012; Rudolph i in., 2014
	1,2-dioksenaza 2,6-dichloro- <i>p</i> -hydrochinonu (2,6-dichloro- <i>p</i> -hydroquinone 1,2-dioxygenase)	$2,6\text{-dichlorohydrochinon} + O_2 + H_2O = \text{octan 2-chloromaleylu} + HCl$	1,2-dioksenaza 2,6-dichloro- <i>p</i> -hydrochinonu należy do klasy oksydoreduktaz i jest odpowiedzialna za otwarcie pierścienia aromatycznego 2,6-dichloro- <i>p</i> -hydrochinonu (rozerwanie pierścienia aromatycznego między grupą hydroksylową a grupą chlorową) w celu produkcji octanu 2-chloromaleylu.	Xun i in., 1999; Hayes i in., 2013
	Dehalogenaza kwasów 2-haloalkanowych (2-haloacid dehalogenase)	$\text{kwas 2-haloalkanowy} + H_2O = \text{kwas hydroksyalkanowy} + \text{halogenek}$	Dehalogenaza kwasów 2-haloalkanowych, należy do klasy hydrolaz, przeprowadza dehalogenację kwasów 2-haloalkanowych do kwasów hydroksyalkanowych, z odwróceniem konfiguracji przy C-2. Działa na kwasy 2-haloalkanowe o długości łańcucha węglowego pięć lub mniej.	Hasan i in., 1991; Slater i in., 1995

6-monooksygenaza 2,4-dichlorofenolowa (2,4-dichlorophenol 6-monooxygenase)	2,4-DCP + H ⁺ + NADPH + O ₂ = 3,5-dichlorocatechol + H ₂ O + NADP ⁺	6-monooksygenaza 2,4-dichlorofenolu należy do klasy oksydoreduktaz (monooksygenaz). Przekształca 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP) w 3,5-dichlorocatechol, używając NADH lub NADPH jako donor elektronów.	Beadle i Smith, 1982
Dehalogenaza haloalkanowa (haloalkane dehalogenase)	1-haloalkan + H ₂ O = alkohol 1-rzędowy + halogenek	Dehalogenaza haloalkanowa należy do klasy hydrolaz i ma szeroką specyficzność substratową. Katalizuje hydrolityczne rozerwanie wiązań węgiel- grupa halogenowa w alifatycznym halogenowanym związku organicznym. Działa na szeroki zakres 1-haloalkanów, haloalkoholi, haloalkenów i niektórych związków haloaromatycznych, prowadząc do powstania odpowiednich alkoholi pierwszorzędowych, jonów halogenków i protonów.	Nagata i in., 1993; Nagata i in., 1997; Hynková i in., 1999
Dehalogenaza haloocetanowa (haloacetate dehalogenase)	halooctan + H ₂ O = halogenek + glikolan + H ⁺	Dehalogenaza haloocetanowa należy do klasy hydrolaz i katalizuje hydrolityczne rozerwanie wiązań węgiel- grupa halogenowa w fluoroocetanie - 1. typ dehalogenazy haloocetanowej DehH1 oraz chloro-, bromo- i jodoocetanie, ale nie w fluoroocetanie - 2. typ dehalogenazy haloocetanowej DehH2, dając halogenek i glikolan.	Goldman, 1965; Goldman i Milne, 1966; Leisinger i Bader, 1993; Fetzner i Lingens, 1994
Dehalogenaza dichlorometanowa (dichloromethane dehalogenase)	dichlorometan + H ₂ O = 2Cl ⁻ + formaldehyd + 2H ⁺	Dehalogenaza dichlorometanu jest enzymem należącym do klasy liaz, który generuje powstanie formaldehydu. Ponadto dehalogenaza dichlorometanu należy do rodziny S-transferaz glutationu. Glutation jest niezbędny do jego aktywności.	Kayser i Vuilleumier, 2001; Yu i in., 2020;
Dioksygenaza alpha-ketoglutaranowa 2,4-dichlorofenoksyocetanu	2,4-dichlorofenoksyocetanu + 2-oksoglutaran + O ₂ = 2,4-dichlorofenol + CO ₂ + glioksylian + bursztynian	Dioksygenaza alpha-ketoglutaranowa 2,4-dichlorofenoksyocetanu (Alpha-ketoglutarate-dependent 2,4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase) należy do klasy oksydoreduktaz. Bierze udział w degradacji herbicydu kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D). Potrafi także katalizować degradację kwasu 2-metylo-4-chlorofenoksyoctowego i kwasu 3-chlorobenzoesowego.	Suwa i in., 1996; Kitagawa i in., 2002
Dehalogenaza kwasu <i>cis</i> -3-chloroakrylowego (<i>cis</i> -3-chloroacrylic acid dehalogenase)		Dehalogenaza kwasu <i>cis</i> -3-chloroakrylowego należy do hydrolaz i jest zaangażowana w hydrolityczne rozerwanie wiązania węgiel-grupa halogenowa w 3-haloakrylanach, dając semialdehyd malonianowy.	Poelarends i in., 2004
Redukcyjna dehalogenaza tetrachlorohydrochinonu (tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase)	2,6-dichlorohydrochinon + chlorek + dwusiarczek glutationu + H ⁺ = 2,3,6-trichlorohydrochinon + 2-glutathione	Redukcyjna dehalogenaza tetrachlorohydrochinonu należy do klasy oksydoreduktaz i jest odpowiedzialna za sekwencyjną redukcję tetrachloro- <i>p</i> -hydrochinonu do monochlorofenolu, przy użyciu glutationu jako czynnika redukującego.	Cai i Xun, 2002

Kometaboliczne dehalogenazy	Redukcyjna dehalogenaza tetrachloroetenu (tetrachloroethene reductive dehalogenase)	$AH_2 + PCE = A + \text{chlorek} + H^+ + TCE$	Redukcyjna dehalogenaza tetrachloroetenu należy do klasy oksydoreduktaz i rodziny redukcyjnych dehalogenaz. Katalizuje redukcyjną dechlorację tetrachloroetenu (PCE) do trójkloroetenu (TCE) oraz dechlorację trójkloroetenu do <i>cis</i> -1,2-dichloroetenu (DCE). Może również przekształcać różne chlorowane etany, takie jak tetrachloroetan, pentachloroetan i heksachloroetan. A- akceptor wodoru; AH_2 - donor wodoru.	Neumann i in., 1998
	Monooksygenaza fenolowa (phenol monooxygenase)	$\text{fenol} + NADPH + H^+ + O_2 = \text{katechol} + NADP^+ + H_2O$	Monooksygenaza fenolowa ma szeroką specyficzność substratową, należy do klasy oksydoreduktaz (monooksygenaz). Hydroksyluje różne podstawione fenole, takie jak fluoro- i chlorofenole.	Fetzner i Lingens, 1994; Fetzner, 1998
	Monooksygenaza toluenowa (toluene monooxygenase)	$H^+ + NADH + O_2 + \text{toluene} = 4\text{-metylofenol} + H_2O + NAD^+$	Monooksygenaza toluenowa należy do klasy oksydoreduktaz (monooksygenaz), wykorzystuje siłę redukującą NADH do rozerwania wiązań pomiędzy tlenem i włączenia pojedynczego atomu tlenu w postaci grupy hydroksylowej do chlorowanego substratu, tworząc nietrwałą halohydrynę. Następnie niestabilna halohydryna spontanicznie eliminuje jon halogenkowy.	Fetzner i Lingens, 1994; Fetzner, 1998; Arp i in., 2001
	2,3-dioksygenaza katecholowa (catechol 2,3-dioxygenase)	$\text{katechol} + O_2 = 2\text{-hydroxy-6-oxonona-2,4-dienedioate} + H^+$	2,3-dioksygenaza katecholowa należąca do rodziny dioksygenaz ekstradiolowych i klasy oksydoreduktaz, katalizuje rozszczepianie pierścienia katecholu oraz katecholi podstawionych chlorem, grupą metylową i etylową w pozycji meta.	Reineke i Knackmuss, 1978; Hartmann, i in., 1979; Bartels i in., 1984; Vaillancourt i in., 2006; Wojcieszńska, i in., 2013.

Taksony, którym przypisano najliczniejszej reprezentowane geny kodujące dehalogenazy, obejmowały *Candidatus Rokubacteria spp.* (do tego taksonu przypisano pięć genów kodujących dehalogenazy: dioksygenazę 2,4-dichlorofenoksyoctanu, dehalogenazę 2-halokwasu, dehalogenazę haloocetanu, 2-monooksygenazę fenolu/toluenu oraz 2,3-dioksygenazę katecholową dając łącznie ponad 500 tpm) i *Acidobacteria spp.* (przypisano pięć genów dehalogenaz: dehalogenazę 2-halokwasu, dehalogenazę haloocetanu, dehalogenazę haloalkanową, 2-monooksygenazę fenolu/toluenu oraz 2,3-dioksygenazę katecholową z całkowitymi odczytami ponad 370 tpm). Oprócz tych taksonów geny dehalogenaz zostały również przypisane (lub miały dużą liczbę odczytów w tpm) do *Delta*-, *Beta*- i *Alpha*-*proteobacteria spp.* i *Chloroflexi spp.* (wykres 5).



Wykres 5. Względna obfitość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaboliczne w metagenomach środowisk zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie przekształconych wyrażana w transkryptach na milion (tpm) odczytów, przedstawiona na poziomie taksonów. Nazewnictwo enzymów w języku polskim zgodnie z tłumaczeniem podanym w tabeli 7.

Większość genów kodujących dehalogenazy wykrytych zarówno w środowiskach antropogenicznie przekształconych, jak i w środowiskach zbliżonych do naturalnego należą do taksonów bakteryjnych (ryc. 3), głównie *Candidatus Rokubacteria* spp. w środowiskach zmodyfikowanych antropogenicznie oraz *Candidatus Rokubacteria* spp. i *Acidobacteria* spp. w środowiskach zbliżonych do naturalnego. Wskazuje to, że bakterie odgrywają kluczową rolę w przemianie HZO w środowisku. Geny dehalogenaz najliczniej występowały w próbkach ze środowisk zbliżonych do naturalnego (stanowiska s4 i s5). Oprócz 2-monooksygenazy fenolowo-toluenowej, 1,2-dioksygenazy 2,6-dichloro-p-hydrochinonowej i monooksygenazy pentachlorofenolowej, pozostałe dziesięć genów było najlepiej reprezentowanych w próbkach s4 i s5. Może to świadczyć o ewolucyjnej adaptacji organizmów do transformacji HZO, które musiały być obecne w środowisku naturalnym w ilościach oddziałujących na mikroorganizmy, zmuszając organizmy do wypracowania mechanizmów ich transformacji. Obecność genów dehalogenazy dichlorometanu i dehalogenazy kwasu cis-3-chloroakrylowego jedynie w

próbek ze środowisk zbliżonych do naturalnych sugeruje naturalne pochodzenie dichlorometanu i chlorku winylu w glebach leśnych. Gribble (2009) doszedł do podobnego wniosku, zauważając, że dichlorometan może pochodzić z naturalnych źródeł - ze spalania biomasy lub terenów podmokłych, wskazując że chlorek winylu może być wytwarzany abiotycznie w glebie podczas utleniającej degradacji materii organicznej w glebach. Naturalnie wytwarzany w glebie trichlorometan może być również prekursorem dichlorometanu. Z kolei brak genu monooksygenazy pentachlorofenolu w metagenomach pochodzących ze środowisk zbliżonych do naturalnych i jego obecność w środowiskach zmodyfikowanych antropogenicznie sugeruje, że gen monooksygenazy pentachlorofenolu bierze udział w dehalogenacji ksenobiotycznych HZO.

Bakterie wykształciły różne strategie usuwania podstawnika halogenowego ze związków organicznych. Na ogół obejmują one podejścia oksygenolityczne, hydrolityczne i redukujące. Dehalogenacja oksygenolityczna przebiega ściśle w warunkach tlenowych, w których tlen jest niezbędny; dehalogenacja hydrolityczna i redukcyjna może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, ale najczęściej dehalogenacja redukcyjna zachodzi przy całkowitym braku tlenu (Löffler i in., 2003). Analiza metagenomowa przeprowadzona w niniejszej pracy wykazała przewagę dehalogenacji tlenowej i hydrolitycznej. We wszystkich badanych środowiskach glebowych, przeważały reakcje ukierunkowanej dehalogenacji metabolicznej, podczas gdy w próbkach z oczyszczalni ścieków procesy metaboliczne i kometaboliczne były równocenne. Najliczniej reprezentowanym genem kodującym metaboliczne dehalogenazy był gen kodujący dehalogenazę 2-halokwasu (611 tpm), natomiast wśród dehalogenaz kometabolicznych gen kodujący 2,3-dioksygenazę katecholową (1092 tpm).

Jednym z mechanizmów prowadzących do usunięcia podstawników halogenowych jest eliminacja HCl przez dehydrohalogenazy obecne w organizmach, w tym *Sphingomonas* (Fetzner, 1998; Mai in., 2024). Substytucyjna dehalogenacja z kolei polega na mechanizmie opartym na podstawieniu nukleofilowym, ten typ reakcji jest również nazywany hydrodehalogenacją. Według niektórych badań (Dunaway-Mariano i Babbitt, 1994; Janssen i in., 1994; Slater i in. 1995; Fetzner, 1998; Oyewusi i in., 2020; Franke i in., 2020) enzymami zaangażowanymi w ten mechanizm są hydrolaza s-triazyny, chlorohydrolaza 2,6-dichlorohydrochinonu i chlorohydrolazy atrazyny, które są obecne u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, *Rhodococcus* i *Rhizobium*. Reakcje podstawienia w związkach aromatycznych są przeprowadzane przez kilka szczepów bakterii należących do rodzajów zidentyfikowanych w badanych metagenomach, w tym *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Nocardia* i

Corynebacterium. Reakcje te są katalizowane przez dehalogenazę 2-halokwasową i halidohydrolazę 1-chloroalkanową, a także enzymy obecne w badanych metagenomach, takie jak dehalogenazę haloalkanową i dehalogenazę haloctanową.

W ramach dehalogenacji oksydacyjnej, kometaboliczne utlenianie stanowi bardzo ważną grupę reakcji, która umożliwia dehalogenację alkanów, alkenów i związków aromatycznych. Reakcje te są katalizowane przez liczne enzymy, głównie mono- i dioksygenazy (m.in. fenol/toluen monooksygenazy, o których wiadomo, że rozkładają różne związki organiczne) (tabela 8). Ważnymi rodzajami bakterii zaangażowanymi w dehalogenację oksydacyjną są *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Burkholderia* i *Mycobacterium* (Reineke i Knackmuss, 1978; Bartels i in., 1984; Vannelli i Hooper, 1993; Fetzner, 1998).

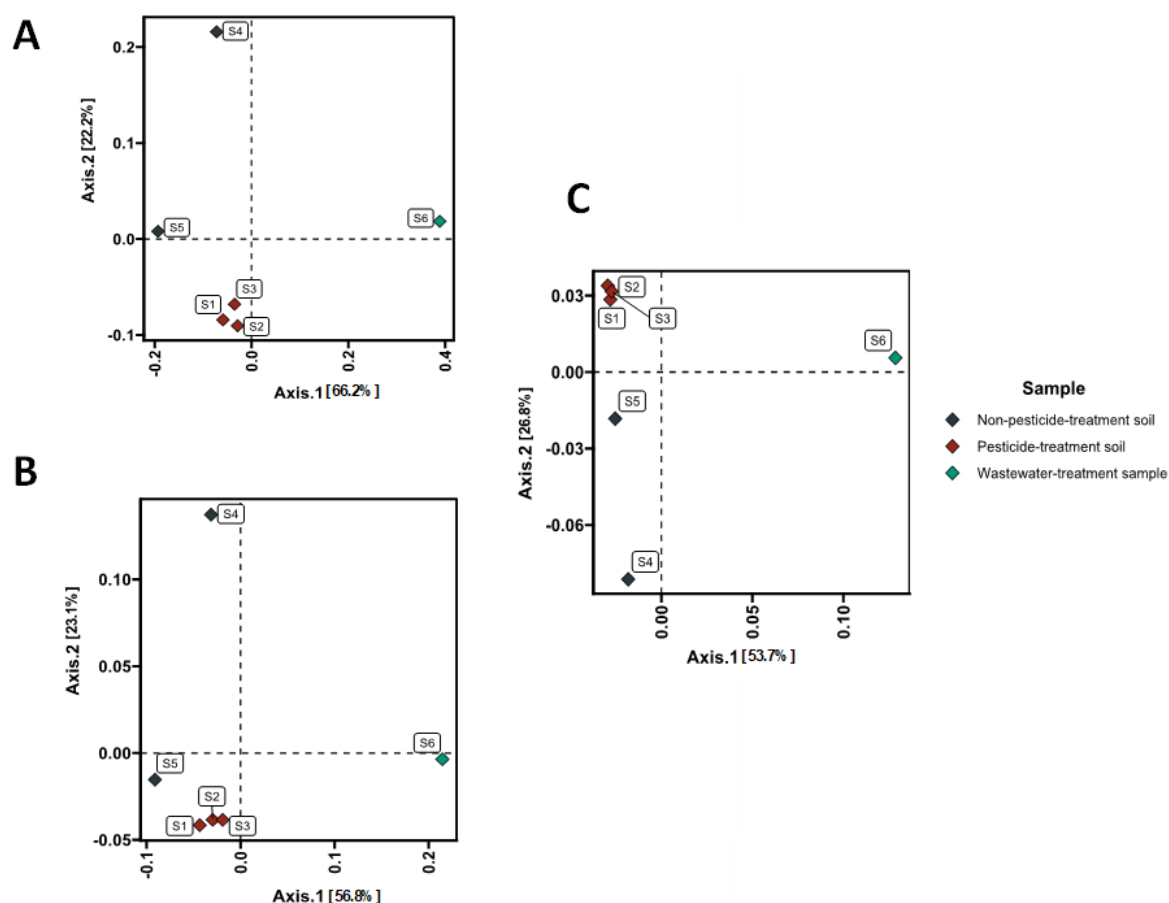
Procesy redukcyjnej (beztlenowej) dehalogenacji przeprowadzają takie rodzaje jak *Dehalobacter*, *Dehalobacterium* i *Dehalococcoides* (Janssen i in., 1994; Slater i in. 1995; Fetzner, 1998; Matturro i in., 2013; Zhang i in. 2020b; Xiao i in., 2020). Zostały one znalezione we wszystkich badanych metagenomach, ale w niewielkiej względnej obfitości (*ang. abundance* < 0,01%). W metagenomach zidentyfikowano również geny dwóch dehalogenaz redukujących – dehalogenazę redukującą tetrachloroetenu i dehalogenazę redukującą tetrachlorohydrochinonu, przy czym tę ostatnią zidentyfikowano tylko w metagenomie pochodzącym z oczyszczalni ścieków. Należy zaznaczyć, że obecność genów wykrytych w badanych metagenomach nie jest równoznaczna z ich ekspresją i produkcją aktywnego białka.

Podsumowując, identyfikacja genów drobnoustrojów, o których wiadomo, że biorą udział w cyklu halogenowym w metagenomach zespołów bakterii środowisk zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie zmodyfikowanych, dostarcza dowodów na istnienie mikrobiologicznych szlaków dehalogenacji we wszystkich badanych środowiskach i ewolucyjnej adaptacji mikroorganizmów do dehalogenacji HZO. Otwartym pozostaje pytanie, jak wpływać na ekspresję tych genów? Można przypuszczać, że opisane procesy dehalogenacji mogą być ważnym elementem przemian halogenowanych pestycydów i ogólniej HZO w środowisku.

Z analizy metagenomów gruntów rolnych oraz leśnych, a także osadów ściekowych, pod kątem obecności genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy dehalogenacji związków organicznych wynika, że mikrobiom wszystkich analizowanych środowisk posiada determinanty genetyczne umożliwiające przeprowadzanie procesów dehalogenacji HZO zarówno na drodze metabolicznych jak i kometabolicznych przemian.

4.2.4. Analizy korelacji

Analiza podobieństw głównych składowych (ang. *principal components analysis* - PCA) między badanymi zespołami drobnoustrojów oparta na analizie metagenomów wykazała duże podobieństwa między zespołami mikroorganizmów z trzech pól uprawnych (próbki s1, s2, s3). Wykazano również znaczne różnice między próbkami ze środowisk zbliżonych do naturalnych, mimo że punkty poboru próbek pochodziły z tego samego obszaru leśnego. Różnice mogą wynikać z różnic w charakterystyce gleby; na przykład mogą być spowodowane różnicą w zawartości materii organicznej, s4 – 4,57%, natomiast s5 – 14,21% (wykres 6).



Wykres 6. Analiza głównych składowych (PCA) podobieństwa zespołów mikroorganizmów w oparciu o metagenomy środowisk naturalnych i zmodyfikowanych antropogenicznie; analiza PCA wykonana według podobieństwa: dehalogenaz (A), wszystkich zidentyfikowanych genów (B), taksonomii (C). *Non-pesticide-treatment soil* – grunty leśne (s4, s5), *pesticide treatment soil* – grunty rolne (s1-s3), *wastewater-treatment sample* – oczyszczalnia ścieków (s6).

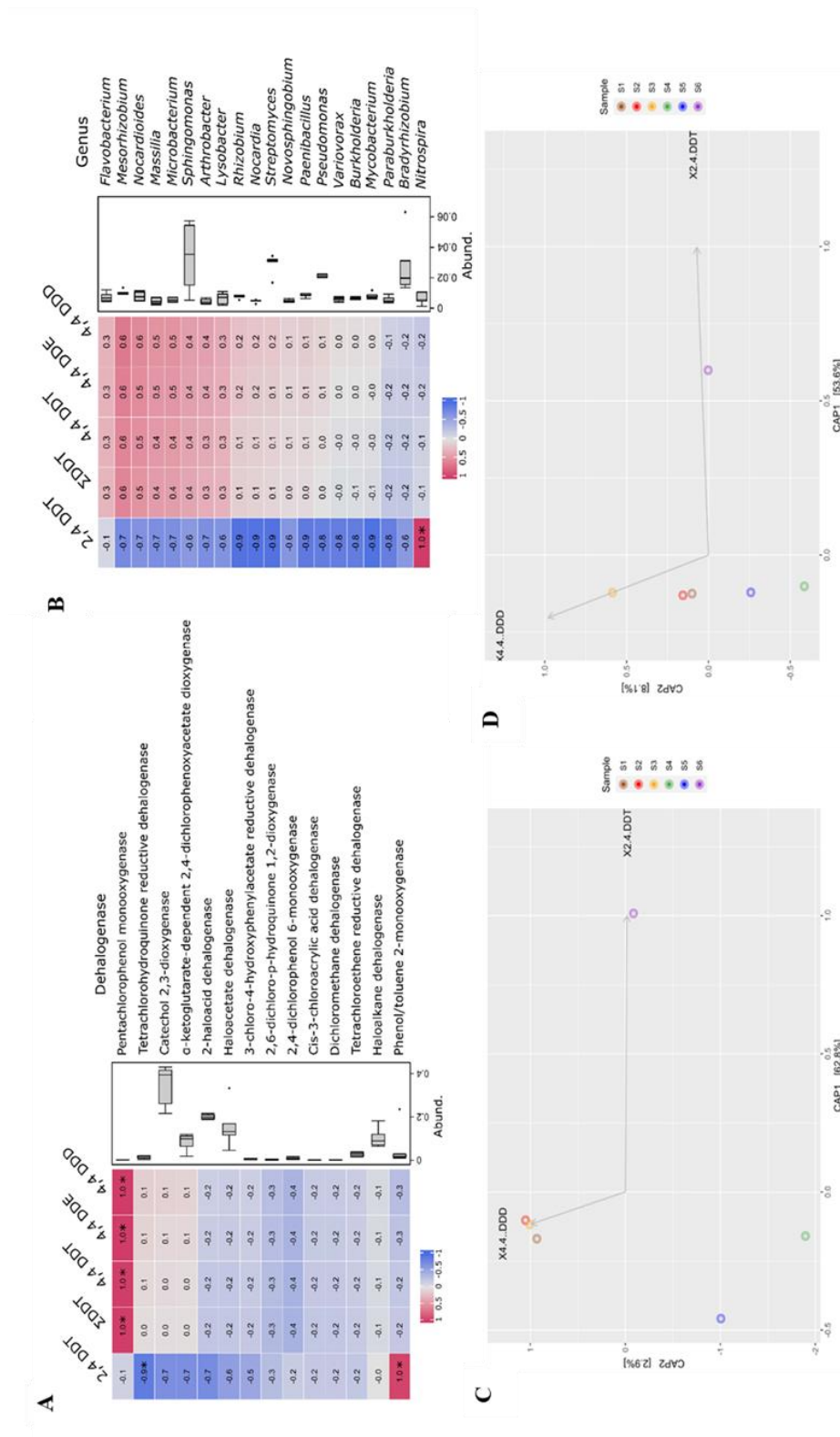
Dane analizy PCA wskazują, że występowanie genu kodującego 2-monooksygenazę fenolowo-toluenową związana jest z wyższą zawartością 2,4-DDT w analizowanych środowiskach, z kolei występowanie genu kodującego monooksygenazę pentachlorofenolu związana jest z występowaniem pestycydów zawierających atomy chloru w pozycji *para* (4,4 -DDT, 4,4-DDE,

4,4-DDD) (wyk. 7A). Analiza korelacji przedstawiona na wykresie 7B pokazuje, że rodzaje *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Nocardioides*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Sphingomonas*, *Arthrobacter*, *Lysobacter* są prawdopodobnie bardziej tolerancyjne lub mają mechanizmy detoksykacji/transformacji 4,4-DDT, 4,4-DDE, 4,4 -DDD, podczas gdy rodzaj *Nitrospira* jest tolerancyjny lub ma mechanizmy detoksykacji/transformacji 2,4-DDT. Inną kwestią jest to, że analiza kanoniczna głównych współrzędnych (ang. *canonical analysis of principal coordinates* - CAP) (wyk. 7C) wskazuje na większe podobieństwo między próbkami s1, s2, s3 na podstawie zawartości 4,4-DDD i genów kodujących dehalogenazy. Podobieństwo między próbkami potwierdza również korelacja oparta na zawartości 4,4-DDD i taksonomii (wyk. 7D). Analiza korelacji między zawartością chlorków, fluorków i jodków a genami kodującymi dehalogenazy wykazuje podobieństwo między próbkami s1, s2, s3 oraz między próbkami s4 i s5 (wyk. 8C), natomiast analiza korelacji między zawartością halogenów a taksonomią wskazuje na większe podobieństwo między próbką s5 a próbkami s1, s2, s3 niż s4 (wyk. 8D). W środowiskach bogatych w chlorki można zaobserwować trend obecności w genomach bakteryjnych następujących genów: 6-monooksygenazy 2,4-dichlorofenolowej, dehalogenazy 2-halokwasowej, dehalogenazy haloctanowej, dehalogenazy haloalkanowej, 2-monooksygenazy fenolowo-toluenowej, cis-dehalogenazy kwasu-3-chloroakrylowego, dehalogenazy dichlorometanowej, redukcyjnej dehalogenazy tetrachlorohydrochinonu, zależnej od alfa-ketoglutaranu, dioksygenazy 2,4-dichlorofenoksyoctanowej (wyk. 8A).

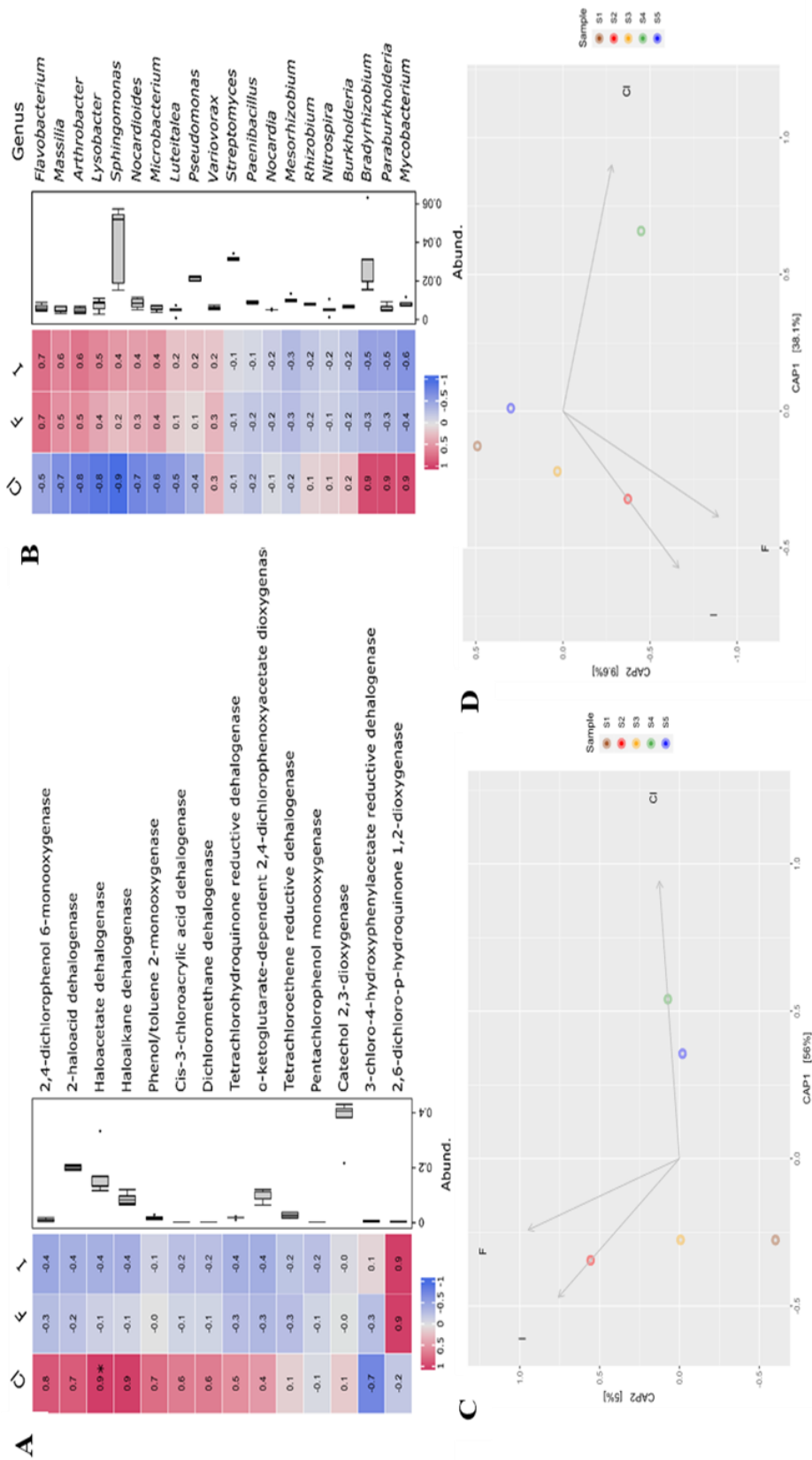
Rodzaje takie jak *Mycobacterium*, *Paraburkholderia* i *Bradyrhizobium* mogą mieć pewne preferencje dla środowisk z wyższą zawartością chlorków, podczas gdy rodzaje takie jak *Flavobacterium*, *Massilia*, *Arthrobacter*, *Lysobacter*, *Sphingomonas*, *Nocardioides*, *Microbacterium* dla środowisk z wyższą zawartością fluorków i jodków (wyk. 8B).

W II etapie badań osiągnięto założony cel, potwierdzono potencjał genetyczny mikroorganizmów badanych środowisk do przeprowadzania procesu dehalogenacji HZO w oparciu o analizy metagenomowe. Scharakteryzowano pod względem taksonomicznym wszystkie środowiska, wskazując dominujące taksony. Ponadto zidentyfikowano geny kodujące enzymy zaangażowane w metaboliczne i kometaboliczne procesy dehalogenacji HZO, oraz oznaczono ich obfitość występowania.

Nazwy wszystkich genów opisanych w rozdziale 4.2. wraz z ich tłumaczeniem, oraz funkcją enzymów przez nie kodowanych znajdują się w tabeli 7.



Wykres 7. A - Analiza korelacji - zależności między zawartością pochodnych DDT a genami kodującymi dehalogenazy. Obfitość (Abundance) wskazuje na ilość każdej dehalogenazy w analizowanych środowiskach. **B**- Analiza korelacji pokazuje zależność między zawartością pochodnych DDT a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzaju. Obfitość wskazuje na liczebność każdego rodzaju w analizowanych środowiskach. **C**- Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (ang. *canonical analysis of principal coordinates* - CAP) pokazuje zależność między zawartością pochodnych DDT a obecnością odpowiednich genów kodujących dehalogenazy w analizowanych środowiskach. **D**- Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (CAP) pokazuje związek między zawartością pochodnych DDT a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzaju. Długość każdej linii wektora jest proporcjonalna do siły korelacji. (*) oznacza statystycznie istotny wynik (wartość $p < 0.05$).



Wykres 8. A- Analiza korelacji - zależności między zawartością chlorków, fluorków, jodków a genami kodującymi dehalogenazy. Obfitość (Abundance) wskazuje na ilość poszczególnych dehalogenaz w analizowanych środowiskach. **B-** Analiza korelacji pokazuje zależność między zawartością chlorków, fluorków, jodków a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzajowym. **C-** Analiza korelacji wskazuje na liczebność każdego rodzaju w analizowanych środowiskach. **C-** Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (ang. *canonical analysis of principal coordinates* - CAP) pokazuje zależność między zawartością chlorków, fluorków, jodków a obecnością odpowiednich genów kodujących dehalogenazy w analizowanych środowiskach. **D-** Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (CAP) pokazuje zależność między zawartością chlorków, fluorków, jodków a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzaju. Długość każdej linii wektora jest proporcjonalna do siły korelacji. (*) oznacza statystycznie istotny wynik (wartość $p < 0.05$).

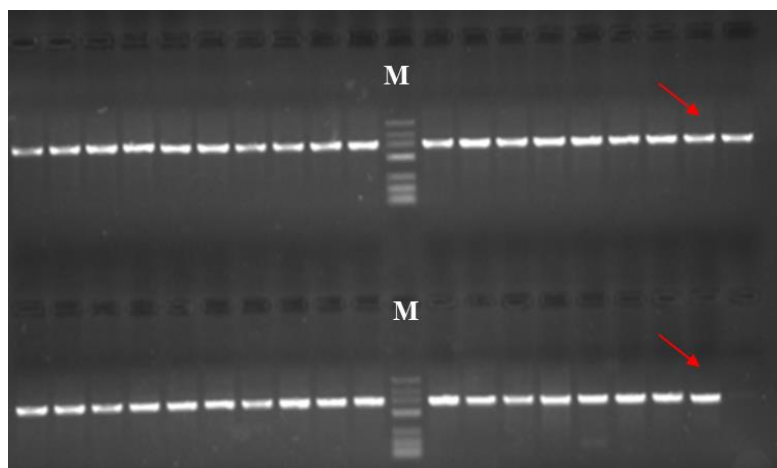
4.3. Izolacja, selekcja i charakterystyka mikroorganizmów

Uzyskane w etapie II wyniki badań wykazały obecność genów kodujących różne dehalogenazy, w metagenomach zespołów mikroorganizmów wszystkich badanych środowisk, a zatem potwierdziły potencjał genetycznego drobnoustrojów do dehalogenacji HZO. Celem kolejnego etapu badań była izolacja bakterii heterotroficznych zdolnych do biotransformacji HZO z badanych środowisk (etap III), a następnie wyselekcjonowanie szczepów bakteryjnych charakteryzujących się najwyższą efektywnością w biotransformacji wybranych HZO (etap IV).

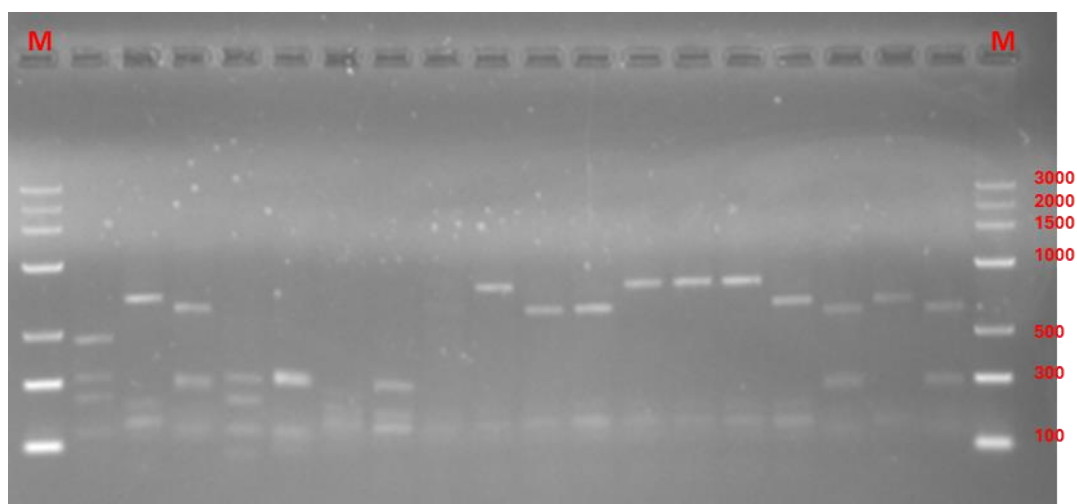
4.3.1. Izolacja i selekcja mikroorganizmów

Izolację szczepów bakteryjnych z próbek środowiskowych przeprowadzono wykonując serię trzech 14-dniowych pasażu hodowli na płynnym podłożu mineralnym M9. Szczegółowy opis procedury izolacji został zaprezentowany w punkcie 3.5.10.

Liczebność bakterii w podłożu po pierwszym pasażu była na poziomie 10^6 jtk/ml, natomiast po trzecim pasażu osiągnęła wartość 10^7 jtk/ml. Na podstawie różnic w morfologii kolonii oraz z uwzględnieniem losowego wyboru poszczególnych kolonii, do selekcji czystych kultur wytypowano 70 szczepów, pochodzących z ujednoliconej próbki z każdego środowiska (grunty rolne, grunty leśne, oczyszczalnia ścieków), uzyskując finalnie około 210 szczepów bakteryjnych. W celu wyeliminowania tych samych szczepów przeprowadzono kompleksową analizę restrykcyjną genów 16S rRNA. Dla każdego z badanych szczepów wyizolowano całkowite DNA metodą izolacji DNA z kolonii bakteryjnej. Na matrycy uzyskanego DNA przeprowadzono reakcje PCR z wykorzystaniem starterów 27F i 1492R, komplementarnych do odpowiednich nukleotydów w genie 16S rRNA. Dla większości wyizolowanych szczepów analiza elektroforetyczna produktów PCR potwierdziła obecność fragmentów DNA wielkości ok. 1500 pz (par zasad), świadczących o obecności genu 16S rRNA (fot. 4). Uzyskane produkty amplifikacji zostały następnie poddane analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem enzymu *Hae*III (fot. 5). Analiza elektroforetyczna fragmentów restrykcyjnych wykazała, że w puli 210 wybranych szczepów znajduje się 34 unikatowych szczepów bakteryjnych, którym nadano autorskie nazwy (liczbowe lub literowe w zależności od typu próbki). Najsilniej reprezentowany był szczep nr 2-ocz (9% w puli wszystkich szczepów) oraz szczepy nr: D, α , B (odpowiednio 7%, 5% i 3%). Pozostałe izolaty stanowiły od 0,5% do 2% wyselekcjonowanych szczepów.



Fotografia 4. Przykładowe zdjęcie żelu po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR genów 16S rRNA (zaznaczony strzałką). Potwierdzono obecność fragmentów DNA wielkości ok. 1500 pz (par zasad), świadczących o obecności genu 16S rRNA. M - marker wielkości fragmentów DNA.



Fotografia 5. Przykładowe zdjęcie żelu po rozdziale elektroforetycznym produktów trawień DNA enzymem restrykcyjnym *HaeIII*. M - marker wielkości fragmentów DNA. Liczby wskazują na wielkość fragmentu wyrażoną w parach zasad (pz).

4.3.2. Selekcja bakterii zdolnych do biotransformacji halogenowanych pestycydów

Dla wyselekcjonowanych na drodze analiz restrykcyjnych izolatów bakteryjnych pochodzących z próbek gruntów oraz oczyszczalni ścieków prowadzono dalszą selekcję pod kątem ich zdolności do biotransformacji HZO, co stanowiło IV etap badań. Z 34 wyizolowanych szczepów do dalszych analiz wybrano 30, cztery z nich wykazywały trudności w hodowli w warunkach laboratoryjnych w dłuższym czasie. Szczegółowy opis procedury selekcji został zaprezentowany w punkcie 3.5.14.

Izolaty bakteryjne poddano symulacji procesów dehalogenacji, która została przeprowadzona na podłożu M9 z dodatkiem mieszaniny pestycydów Chwastox trio jako jedyne źródła węgla i energii. Symulacje procesów dehalogenacji pestycydów prowadzone były dla każdego izolatu bakteryjnego w trzech powtórzeniach. Ubytek halogenowanych pestycydów mierzono względem ich zawartości w momencie rozpoczęcia symulacji oraz względem wariantu kontrolnego, do którego nie dodano mikroorganizmów. W trakcie symulacji kontrolowano żywotność izolatów – wszystkie izolaty utrzymywały żywotność, stąd wniosek, że posiadały mechanizmy do wykorzystania pestycydów jako źródła węgla i energii.

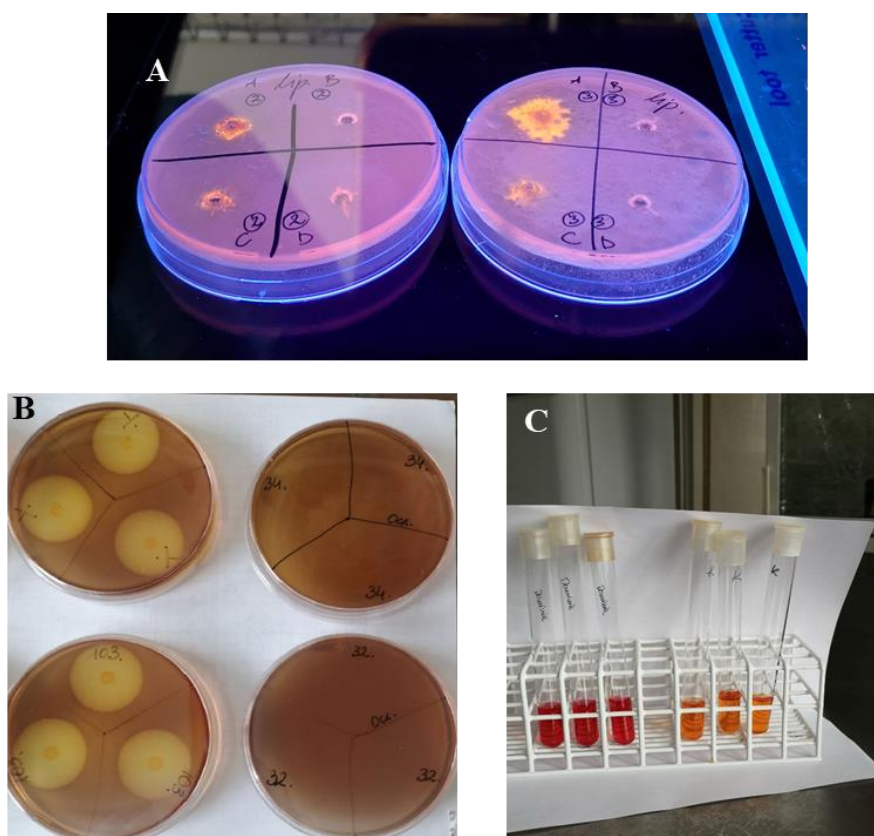
Tabela 8. Ubytek pestycydów wchodzących w skład preparatu Chwastox trio w przeprowadzonej mikrobiologicznej symulacji biotransformacji. Na szaro zaznaczono szczepy wytypowane do konsorcjów Rozt (X, Y, Z, 103, 104, 118), Rol (C, 3, 7, 10, 21), Ocz (α , 29, 34).

Nr szczepu	Ubytek MCPA [%]	Ubytek Mecoprop-P [%]	Nr szczepu	Ubytek MCPA [%]	Ubytek Mecoprop-P [%]	Nr szczepu	Ubytek MCPA [%]	Ubytek Mecoprop-P [%]
Grunty rolne			Grunty leśne			Oczyszczalnia		
A	48	>99	X	67	>99	α	70	>99
B	64	>99	Y	64	>99	M	34	>99
C	71	>99	Z	76	>99	2-ocz	56	>99
D	42	>99	103	72	84	12	58	>99
F	45	4	104	>99	>99	20	51	>99
1	60	94	118	71	88	21-ocz	51	41
3	61	>99	114	27	0	27	69	50
7	74	>99				29	74	>99
10	67	93				32	34	21
11	60	>99				34	70	>99
21	75	>99						
27	53	>99						
31	46	>99						

Stwierdzono, że większość wyselekcjonowanych szczepów usuwała Mecoprop-P z efektywnością >99%, natomiast efektywność usuwania MCPA wahała się od 27% do >99%. Szczepy charakteryzujące się najwyższą redukcją zawartości pestycydów zostały wyselekcjonowane do dalszych symulacji, wchodząc finalnie w skład trzech konsorcjów – Rozt, Rol, Ocz, wyniki ubytku pestycydów wchodzących w skład preparatu Chwastox trio zaprezentowano w tabeli 8.

4.3.3. Charakterystyka fizjologiczna szczepów z konsorcjów bakteryjnych

Szczepy charakteryzujące się najwyższym stopniem redukcji zawartości pestycydów wchodzących w skład preparatu Chwastox trio, wchodząc finalnie w skład trzech konsorcjów – Rozt, Rol, Ocz, zostały przebadane pod kątem zdolności do produkcji wybranych enzymów: celulaz, lipaz oraz ureaz. Oznaczenia jakościowe zdolności do produkcji wymienionych enzymów przeprowadzono w oparciu o testy hodowlane (fot.6.). Metodę testów przedstawiono w rozdziale 3.5.15., 3.5.16., 3.5.17.



Fotografia 6. Wyniki oznaczeń testów hodowlanych sprawdzających produkcję lipaz (A), celulaz (B) i ureaz (C) przez szczepy wchodzące w skład konsorcjów. Lipazy: wynik pozytywny- fluorescencja w świetle UV, negatywny- brak fluorescencji. Celulazy: wynik pozytywny- strefa przejaśnienia wokół kolonii, negatywny- brak strefy przejaśnienia. Ureazy: wynik pozytywny- zmiana zabarwienia podłoża z pomarańczowo-czerwonego na różowe, wynik negatywny brak zmiany zabarwienia podłoża.

Dla każdego szczepu z konsorcjów przeprowadzono odpowiedni test w trzech powtórzeniach. Przeprowadzono również oznaczenia jakościowe zdolności do produkcji celulaz, lipaz, i ureaz u szczepów bakteryjnych zdolnych do efektywnego rozkładu substancji ropopochodnych pochodzących z kolekcji Zakładu Biologii oznaczonych jako konsorcjum Rop. Wyniki aktywności celulolitycznej, lipolitycznej oraz ureolitycznej zaprezentowano w tabeli 9.

Celulazy stanowią grupę enzymów z klasy hydrolaz, katalizujących hydrolizę wiązań β -1,4-glikozydowych pomiędzy cząsteczkami glukozy w celulozie. Celuloza jest substratem powszechnie występującym w glebie, a aktywność do jej rozkładu, poprzez produkcję celulaz wykazują zarówno bakterie jak i grzyby. Z kolei lipazy są enzymami hydrolitycznymi katalizującymi rozkład wiązań estrowych w tłuszczach. Ureazy natomiast stanowią grupę enzymów, również z klasy hydrolaz, katalizując reakcję hydrolitycznego rozkładu mocznika na amoniak i dwutlenek węgla. W środowisku wodnym i glebowym, amoniak występuje w formie jonu amonowego NH_4^+ , który stanowi najbardziej przyswajalną formę azotu dla roślin. Sprawdzenie aktywności celulolitycznej, lipolitycznej oraz ureolitycznej mikroorganizmów jest istotne z punktu widzenia wpływu na dalsze procesy degradacji związków organicznych stanowiących produkty dehalogenacji oraz wpływu na ekosystemy. Celulazy, lipazy i ureazy

Tabela 9. Wyniki testów hodowlanych sprawdzających produkcję ureaz, celulaz i lipaz przez wyselekcjonowane szczepy bakteryjne zdolne do biotransformacji HZO. Wynik dodatni oznaczony jest +, wynik negatywny oznaczony jest - .

szczep	ureazy	celulazy	lipazy
szczepy grunty rolne			
C	-	-	+
3	-	+	-
7	-	-	-
10	-	+	+
21	-	-	+
szczepy grunty leśne			
X	-	-	+
Y	-	+	-
Z	-	+	-
103	-	+	-
104	-	-	-
118	-	-	-
szczepy oczyszczalnia			
alfa	-	+	-
29	+	-	-
34	-	-	+
szczepy zakładowe rozkładające ropopochodne			
Art	-	-	-
Bac	+	-	+
P7	-	-	+
Bielinek	-	-	+
Dominik	+	-	+

bardzo często zaangażowana są w kolejne etapy rozkładu związków organicznych. Enzymy te biorąc udział w rozkładzie celulozy, tłuszczów i mocznika, rozszczepiają te związki odpowiednio do prostszych form: glukozy, kwasów tłuszczowych i amoniaku, dostarczając

substratów innym mikroorganizmom (Margesin i wsp., 1999; 2007; Kuppusamy, 2017; Pawlik, 2017), pośrednio zaangażowanym w biotransformację i biodegradację pestycydów.

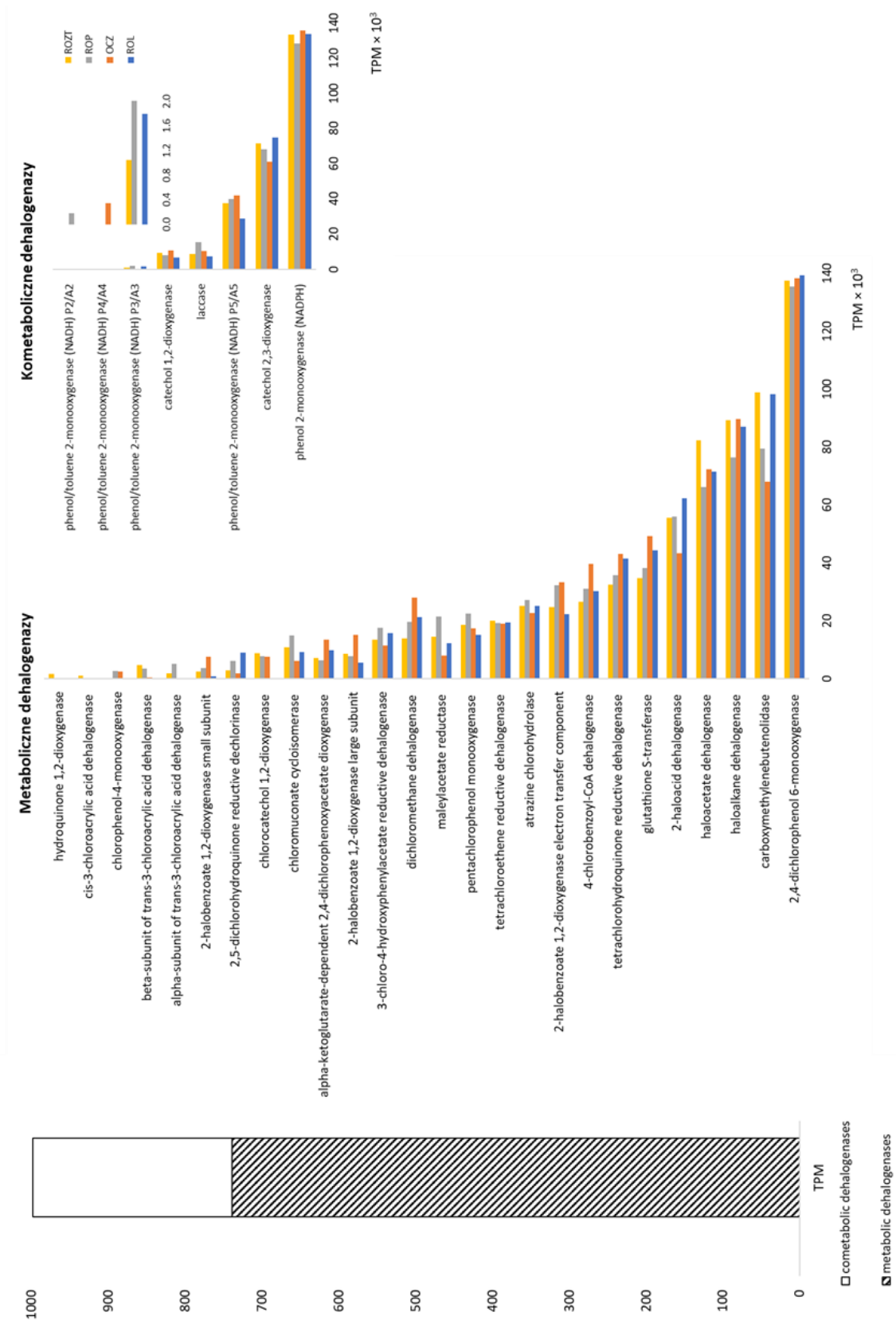
Wśród bakterii pochodzących z gruntów rolnych obecne są szczepy zdolne do produkcji celulaz (3, 10) oraz lipaz (C, 10, 21), podobnie wśród bakterii wyizolowanych z gruntów leśnych obecne są szczepy zdolne do produkcji celulazy (Y, Z, 103) oraz lipaz (X). Wśród szczepów pozyskanych z oczyszczalni ścieków szczep alfa wykazywał aktywność celulolityczną, 29 – ureolityczną, a 34 lipolityczną. W przypadku szczepów zdolnych do rozkładu substancji ropopochodnych, wszystkie szczepy prócz Art. wykazywały aktywność lipolityczną, a ureolityczną- wykazywały szczep Bac i Dominik (tabela 9).

4.4. Charakterystyka genetyczna konsorcjów bakteryjnych – potencjał genetyczny konsorcjów do przeprowadzania procesów dehalogenacji

Wyniki prezentowane w niniejszym rozdziale stanowią rezultaty V etapu badań. W celu oceny potencjału genetycznego konsorcjów bakteryjnych (Rozt, Rol, Rop, Ocz) wyizolowane DNA każdego szczepu, wchodzącego w skład danego konsorcjum, połączono w cztery próbki (każda próbka stanowiła mikrobiom jednego z czterech konsorcjów), które zsekwencjonowano na platformie Novaseq 6000 firmy Illumina. Na podstawie wyników sekwencjonowania metagenomowego ustalono skład gatunkowy konsorcjów, który zaprezentowano w tabeli 10. Zidentyfikowano również geny kodujące enzymy uczestniczące w metabolicznej i kometabolicznej dehalogenacji, nazywane dalej metabolicznymi i kometabolicznymi dehalogenazami (wykres 9, tabela 11).

Tabela 10. Skład gatunkowy konsorcjów bakteryjnych wykorzystywanych przy symulacjach rozkładu HZO, ustalony na podstawie sekwencjonowania metagenomowego, oraz ich pochodzenie.

Rozt	Rol	Pochodzenie bakterii wchodzących w skład konsorcjów: Rozt – szczepy bakteryjne pochodzące z gruntów leśnych z okolic Zamościa. Rol – szczepy bakteryjne pochodzące z gruntów rolnych z pól uprawnych obrębu Stare Babice, Ożarów Mazowiecki. Rop – szczepy bakteryjne aktywne wobec degradacji substancji ropopochodnej, stanowiące kultury bakteryjne Zakładu Biologii WIBHiŚ PW. Ocz – szczepy bakteryjne pochodzące z oczyszczalni ścieków Eko-Babice w Starych Babicach.
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas lini</i>	
<i>Janthinobacterium lividum</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Aeromonas media</i>	
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	
<i>Chryseobacterium carnipullorum</i>	<i>Brevundimonas sp.</i>	
<i>Flavobacterium sp.</i>		
Rop	Ocz	
<i>Raoultella planticola</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	<i>Achromobacter denitrificans</i>	
<i>Pseudomonas mandelii</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		



Wykres 9. Względna obfitość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaaboliczne w metagenomach konsorcjów wyrażona w transkryptach na milion (tpm) odczytów. Nazewnictwo enzymów w języku polskim zgodnie z tłumaczeniem podanym w tabeli 11.

Tabela 11. Nazwy zidentyfikowanych genów kodujących metaboliczne i kometaboliczne dehalogenazy, w języku polskim i angielskim.

	Nazwa w języku angielskim z przyporządkowanymi numerami z bazy KEGG	Nazwa w języku polskim z przyporządkowanymi numerami z bazy KEGG
dehalogenazy kometaboliczne	2,4-dichlorophenol 6-monooxygenase [EC:1.14.13.20]	6-monooksygenaza 2,4-dichlorofenolu [EC:1.14.13.20]
	2,5-dichlorohydroquinone reductive dechlorinase [EC:2.5.1.-]	Dechlorynaza redukcijna 2,5-dichlorohydrochinonu [EC:2.5.1.-]
	2-halolacid dehalogenase [EC:3.8.1.2]	Dehalogenaza 2-halokwasu [EC:3.8.1.2]
	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase electron transfer component [EC:1.18.1.3]	2-halobenzoesan 1,2-dioksygienaza, składnik przenoszący elektrony [EC:1.18.1.3]
	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase large subunit [EC:1.14.12.13]	Duża podjednostka 2-halobenzoesanu 1,2-dioksygienazy [EC:1.14.12.13]
	2-halobenzoate 1,2-dioxygenase small subunit [EC:1.14.12.13]	Mala podjednostka 2-halobenzoesanu 1,2-dioksygienazy [EC:1.14.12.13]
	3-chloro-4-hydroxyphenylacetate reductive dehalogenase [EC:3.8.1.-]	Dehalogenaza redukcijna 3-chloro-4-hydroksyfenylooctanu [EC:3.8.1.-]
	4-chlorobenzoyl-CoA dehalogenase [EC:3.8.1.7]	Dehalogenaza 4-chlorobenzoilo-CoA [EC:3.8.1.7]
	alpha-ketoglutarate-dependent 2,4-dichlorophenoxyacetate dioxygenase [EC:1.14.11.-]	Dioksygienaza 2,4-dichlorofenoksyoctanu zależna od alfa-ketoglutaranu [EC:1.14.11.-]
	alpha-subunit of trans-3-chloroacrylic acid dehalogenase [EC:3.8.1.-]	podjednostka alfa dehalogenazy kwasu trans-3-chloroakrylowego [EC:3.8.1.-]
	atrazine chlorohydrolase [EC:3.8.1.8]	chlorohydrolaza atrazyny [EC:3.8.1.8]
	beta-subunit of trans-3-chloroacrylic acid dehalogenase [EC:3.8.1.-]	podjednostka beta dehalogenazy kwasu trans-3-chloroakrylowego [EC:3.8.1.-]
	carboxymethylenebutenolidase [EC:3.1.1.45]	karboksymetylenobutenolidaza [EC:3.1.1.45]
	catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	1,2-dioksygienaza katecholowa [EC:1.13.11.1]
	catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	2,3-dioksygienaza katecholowa [EC:1.13.11.2]
	chlorocatechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.-]	1,2-dioksygienaza chlorokatecholu [EC:1.13.11.-]
	chloromuconate cycloisomerase [EC:5.5.1.7]	cykloizomeraza chloromukonianowa [EC:5.5.1.7]
	chlorophenol-4-monooxygenase [EC:1.14.14.173 1.14.14.-]	4-monooksygenaza chlorofenolu [EC:1.14.14.173 1.14.14.-]
	cis-3-chloroacrylic acid dehalogenase [EC:3.8.1.-]	Dehalogenaza kwasu cis-3-chloroakrylowego [EC:3.8.1.-]
	dichloromethane dehalogenase [EC:4.5.1.3]	dehalogenaza dichlorometanowa [EC:4.5.1.3]
	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	S-transferaza glutationowa [EC:2.5.1.18]
	haloacetate dehalogenase [EC:3.8.1.3]	dehalogenaza haloactanowa [EC:3.8.1.3]
	haloalkane dehalogenase [EC:3.8.1.5]	Dehalogenaza haloalkanowa [EC:3.8.1.5]
	hydroquinone 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.66]	1,2-dioksygienaza hydrochinonu [EC:1.13.11.66]
	laccase [EC:1.10.3.2]	laka [EC:1.10.3.2]
	maleylacetate reductase [EC:1.3.1.32]	Reduktaza maleilooctanu [EC:1.3.1.32]
dehalogenazy kometaboliczne	pentachlorophenol monooxygenase [EC:1.14.13.50]	monooksygenaza pentachlorofenolowa [EC:1.14.13.50]
	phenol 2-monooxygenase (NADPH) [EC:1.14.13.7]	2-monooksygenaza fenolowa (zależna od NADPH) [EC:1.14.13.7]
	phenol/toluene 2-monooxygenase (NADH) P5/A5 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]	2-monooksygenaza fenolowo-tolenuowa (NADH) P5/A5 [EC:1.14.13.244 1.14.13.243]
	tetrachloroethene reductive dehalogenase [EC:1.21.99.5]	Dehalogenaza redukcijna tetrachloroetenu [EC:1.21.99.5]
	tetrachlorohydroquinone reductive dehalogenase [EC:1.21.4.5]	Dehalogenaza redukcijna tetrachlorohydrochinonu [EC:1.21.4.5]

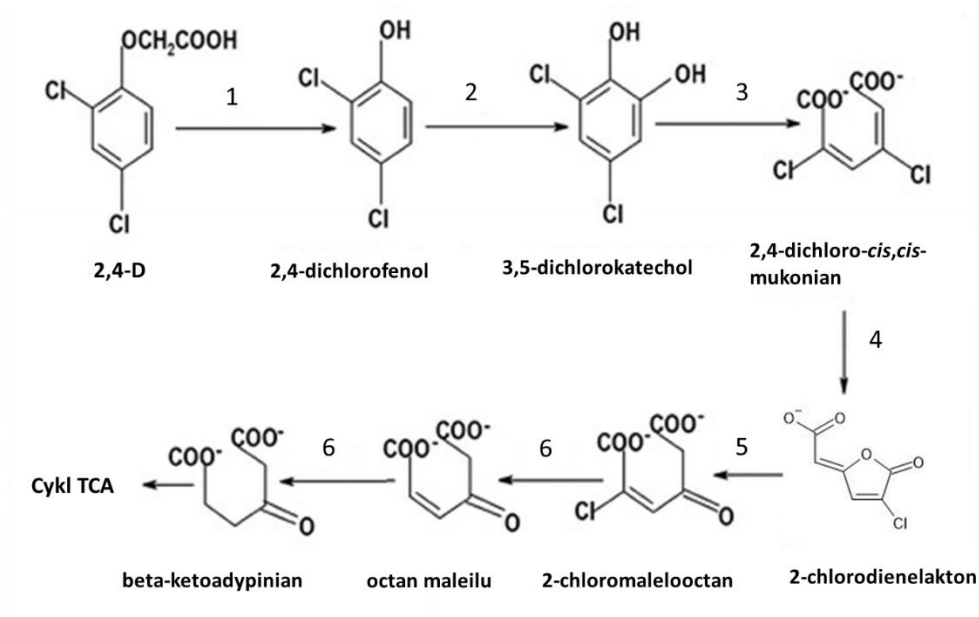
W konsorcjum Rop zidentyfikowano 26 genów kodujących metaboliczne dehalogenazy oraz 7 genów kodujących kometaboliczne dehalogenazy, w konsorcjum Rozt odpowiednio 25 metabolicznych i 6 kometabolicznych, w konsorcjum Ocz 24 metaboliczne oraz 6 kometabolicznych, a w konsorcjum Rol 20 metabolicznych i 6 kometabolicznych dehalogenaz.

Wśród najliczniej występujących genów kodujących metaboliczne dehalogenazy były: 6-monooksygenaza 2,4-dichlorofenolu, karboksymetylenobutenolidaza, dehalogenaza haloalkanowa, dehalogenaza haloctanowa, dehalogenaza 2-halokwasowa. Natomiast wśród genów kodujących kometaboliczne dehalogenazy najliczniej reprezentowane były: 2-monooksygenaza fenolowa (zależna od NADPH), 2,3-dioksygenaza katecholowa, 2-monooksygenaza fenolowo-toluenowa (zależna od NADH) P5/A5. W metagenomach wszystkich konsorcjów zaobserwowano również geny kodujące enzymy uczestniczące w szlakach transformacji 2,4-D. Zidentyfikowano sześć takich genów: 6-monooksygenazę 2,4-dichlorofenolową (alternatywna nazwa to hydroksylaza 2,4-dichlorofenolu) (o średniej liczbie odczytów równej $137,6 \cdot 10^3$ tpm), karboksymetylenobutenolidazę ($86,2 \cdot 10^3$ tpm), reduktazę maleilooctanową ($14,1 \cdot 10^3$ tpm), cykloizomerazę chloromukonianową ($10,3 \cdot 10^3$ tpm), dioksygenazę 2,4-dichlorofenoksyoctanową zależną od alfa-ketoglutaranu ($9,25 \cdot 10^3$ tpm) oraz 1,2-dioksygenazę chlorokatecholową ($6,1 \cdot 10^3$ tpm) – która nie była obecna tylko w metagenomie konsorcjum Rol. Na rycinie 4. przedstawiono szlaki metabolicznej transformacji 2,4-D, wraz z uwzględnieniem udziału odpowiednich enzymów.

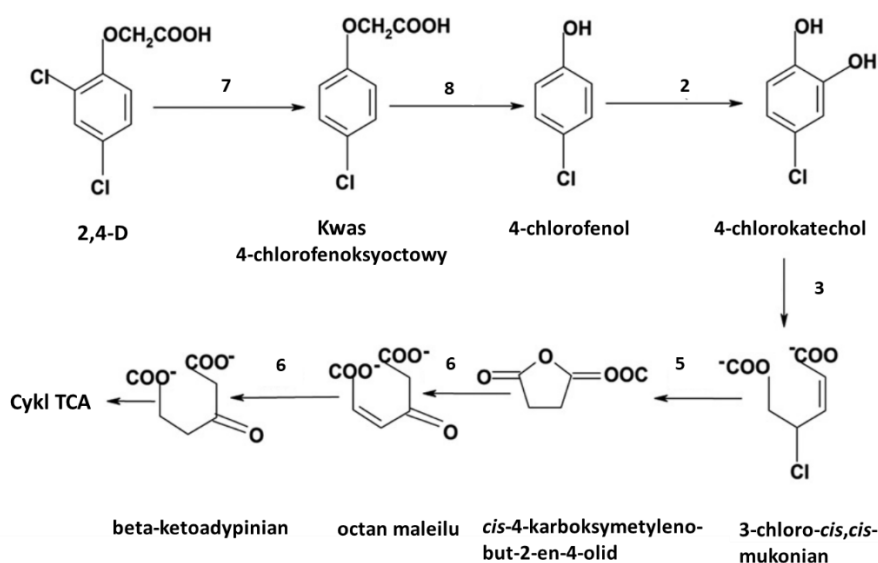
Dane literaturowe wskazują, że znacznie częściej spotykanym szlakiem metabolicznej transformacji 2,4-D jest szlak A (rycina 4A), w którym na drodze działania enzymu 2,4-D dioksygenazy zależnej od α -ketoglutaranu (1) powstaje 2,4-dichlorofenol, a następnie dochodzi do hydroksylacji 2,4-dichlorofenolu przez hydroksylazę 2,4-dichlorofenolu (2) z wytworzeniem 3,5-dichlorokatecholu. Kolejnym etapem jest rozszczepienie *orto*- lub *meta*-dichlorokatecholu przez 1,2-dioksygenazę chlorokatecholu (3) z wytworzeniem 2,4-dichloro-*cis,cis*-mukonianu. Transformacja 2,4-dichloro-*cis,cis*-mukonianu do 2-chlorodienelaktonu ma miejsce przy udziale cykloizomerazy chloromukonianu (4). Dalsza transformacja 2-chlorodienelaktonu do 2-chloromaleilooctanu jest katalizowana przez hydrolazę chlorodienelaktonu (5), a transformacja powstałego 2-chloromaleilooctanu do beta-ketoadipinianu przez maleilooctan katalizowana odpowiednio przez reduktazę chloromaleilooctanu i reduktazę maleilooctanu (6). Powstały w wyniku przemian biochemicznych beta-ketoadipinian jest kierowany do cyklu kwasu trójkarboksylowego (Kumar i in., 2016; Islam i in., 2018).

W metagenomach konsorcjów obecne są geny, których produkty zaangażowane są w reakcje zaprezentowane na rycinie 4, oznaczone następującymi numerami: 1, 2, 3, 4, 6.

A

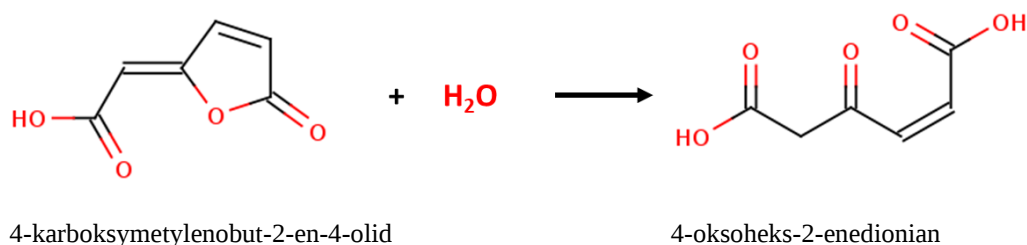


B



Rycina 4. Przykładowe dwa szlaki metabolicznej transformacji 2,4-D: **A** częściej obserwowany w środowisku, **B** - znacznie rzadziej przeprowadzany przez bakterie. Reakcje transformacji 2,4-D ponumerowane są 1-8, w które zaangażowane są następujące enzymy: (1) 2,4-D dioksygenaza zależna od α -ketoglutaranu, (2) hydroksylaza 2,4-dichlorofenolu, (3) 1,2-dioksygenaza chlorokatecholowa, (4) cykloizomeraza chloromukonianu, (5) hydrolaza chlorodienelaktonu (6) odpowiednio reduktaza chloromaleilooctanu i reduktaza maleilooctanu, (7) dehalogenaza 2,4-D, (8) monooksygenaza 4-chlorofenoksyoctowa.

Z kolei produkt genu karboksymetylenobutenolidazy zidentyfikowany w metagenomach konsorcjów, stanowi enzym z klasy hydrolaz, katalizuje następującą reakcję (rycina 5.):



Rycina 5. Reakcja katalizowana przez enzym karboksymetylenobutenolidazę.

Karboksymetylenobutenolidaza uczestniczy również w reakcji degradacji: 3-chlorokatecholu, chlorocykloheksanu, chlorobenzenu, fluorobenzoesanu, oraz toluenu (wg baz danych KEGG oraz BRENDA).

Rzadziej spotykanym szlakiem metabolicznej transformacji 2,4-D jest szlak B (Rycina 4B), w którym na drodze działania enzymu dehalogenazy 2,4-D (7) odłączony zostaje jeden atom chloru, w efekcie czego powstaje kwas 4-chlorofenoksyoctowy. Następnie przy udziale monooksygenazy 4-chlorofenoksyoctowej (8) powstaje 4-chlorofenol (*p*-chlorofenol, 4-CP). Przy udziale hydroksylazy 2,4-dichlorofenolu (2) dochodzi do hydroksylacji 4-CP, czego produktem jest 4-chlorokatechol. Kolejnym etapem jest rozszczepienie pierścienia chlorokatecholu przez 1,2-dioksygenazę chlorokatecholu (3) z wytworzeniem 3-chloro-*cis,cis*-mukonianu. Transformacja 3-chloro-*cis,cis*-mukonianu do *cis*-4-karbowsymetyleno-but-2-en-4-olidu ma miejsce przy udziale hydrolazy chlorodienelaktonu (5). Następnie przy udziale reduktazy chloromaleilooctanu (6) powstaje octan maleilu, a przy udziale reduktazy maleilooctanu (6) octan maleilu jest transformowany do beta-ketoadipinianu. Ten ostatni związek jest włączany do cyklu kwasów trójkarboksylowych (Kumar i in., 2016; Islam i in., 2018). Dwa ostatnie etapy szlaków metabolizmu 2,4-D są takie same w obu przypadkach, podobnie w obu przypadkach udział biorą w większości te same enzymy. Wyjątek stanowią dwie pierwsze reakcje, w które zaangażowane są dehalogenaza 2,4-D (7) oraz monooksygenaza 4-chlorofenoksyoctowa (8).

Na podstawie analiz wyników sekwencjonowania metagenomów konsorcjów bakteryjnych Rozt, Rol, Rop, Ocz, można jednoznacznie stwierdzić, że wyselekcjonowane mikroorganizmy wchodzące w skład konsorcjów są genetycznie przystosowane do

biotransformacji HZO, w tym 2,4-D. Pomimo, że pochodzą z różnych środowisk, w tym takich, na które wpływ człowieka jest nieznaczny (konsorcjum Rozt) oraz środowisk poddanych antropopresji w znacznym stopniu (konsorcja Rol, Rop, Ocz) – wszystkie te mikroorganizmy wykształciły bądź nabyły drogą horyzontalnego transferu genów (HTG), mechanizmy transformacji HZO, w tym 2,4-D. W kolejnym etapie weryfikowano zdolność konsorcjów do biotransformacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) i 4-chlorofenolu (4-CP) – VI etap badań.

4.5. Symulacje biotransformacji HZO

4.5.1. Symulacje biotransformacji 2,4-D przez konsorcja bakteryjne

Celem VI etapu badań było określenie zdolności opracowanych konsorcjów bakteryjnych do biotransformacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) i 4-chlorofenolu (4-CP). Symulacje biotransformacji 2,4-D prowadzone były na podłożu mineralnym M9 z dodatkiem ziemi okrzemkowej pełniącej funkcję powierzchni adsorpcji bakterii oraz z dodatkiem odpowiedniego stężenia 2,4-D. Pestycyd rozpuszczony uprzednio w 96% etanolu w odpowiednim rozcieńczeniu dodawano do kolbek symulacyjnych. Podłoże zaszczerpiono *inoculum* konsorcjum bakteryjnego Rozt, Rol, Rop, Ocz. Symulacje procesów biotransformacji 2,4-D prowadzone były dla każdego konsorcjum bakteryjnego oraz w wariancie kontrolnym, do którego nie dodano mikroorganizmów, w trzech powtórzeniach (szczegółowy opis procedury znajduje się w punkcie 3.5.19.). Ubytek 2,4-D mierzono w czasie w stosunku do jego zawartości w momencie rozpoczęcia symulacji oraz w stosunku do wariantu kontrolnego. Przeprowadzano również pomiar żywotności bakterii w czasie trwania symulacji. W tabeli 12 zestawiono użyte w testach biotransformacji stężenia 2,4-D oraz ich wpływ na konsorcja bakteryjne. Początkowo zastosowane w symulacji biotransformacji 2,4-D stężenie 16 g/l miało letalny wpływ na bakterie wchodzące w skład badanych konsorcjów. Stężenie 8,4 g/l hamowało aktywność mikroorganizmów – brak obserwowanej biotransformacji 2,4-D. W przypadku stężeń 2,4-D równych 4,2 g/l i 2,1 g/l obserwowano efektywną biotransformację pestycydu.

W testach biotransformacji 2,4-D w stężeniu 4,2 g/l próbki do ekstrakcji HZO z płynów hodowlanych w celu oznaczenia ubytku 2,4-D pobierano w czasie rozpoczęcia symulacji (T0), po 15 dniach (T15), po 24 dniach (T24), po 30 dniach (T30), a w przypadku stężenia 2,1 g/l w czasie rozpoczęcia symulacji (T0), po 4 dniach (T4), po 10 dniach (T10), po 30 dniach (T30) i po 55 dniach (T55). Za każdym razem z każdej kolbki symulacyjnej pobierano 2 próbki, łącznie 30 próbek w każdym czasie). Próbki te były następnie analizowane z wykorzystaniem

GC-ECD oraz GC-MS (w celu identyfikacji produktów biotransformacji). Dla tak prowadzonej symulacji biotransformacji 2,4-D otrzymano wyniki, które zaprezentowano na wykresie 10.

Tabela 12. Użyte w symulacji biotransformacji stężenia 2,4-D i ich wpływ na konsorcja bakteryjne.

Stężenie 2,4-D (g/l)	Wpływ na konsorcja bakteryjne
16	letalny w stosunku do wszystkich konsorcjów
8,4	zahamowanie biotransformacji 2,4-D
4,2	efektywna biotransformacja
2,1	efektywna biotransformacja

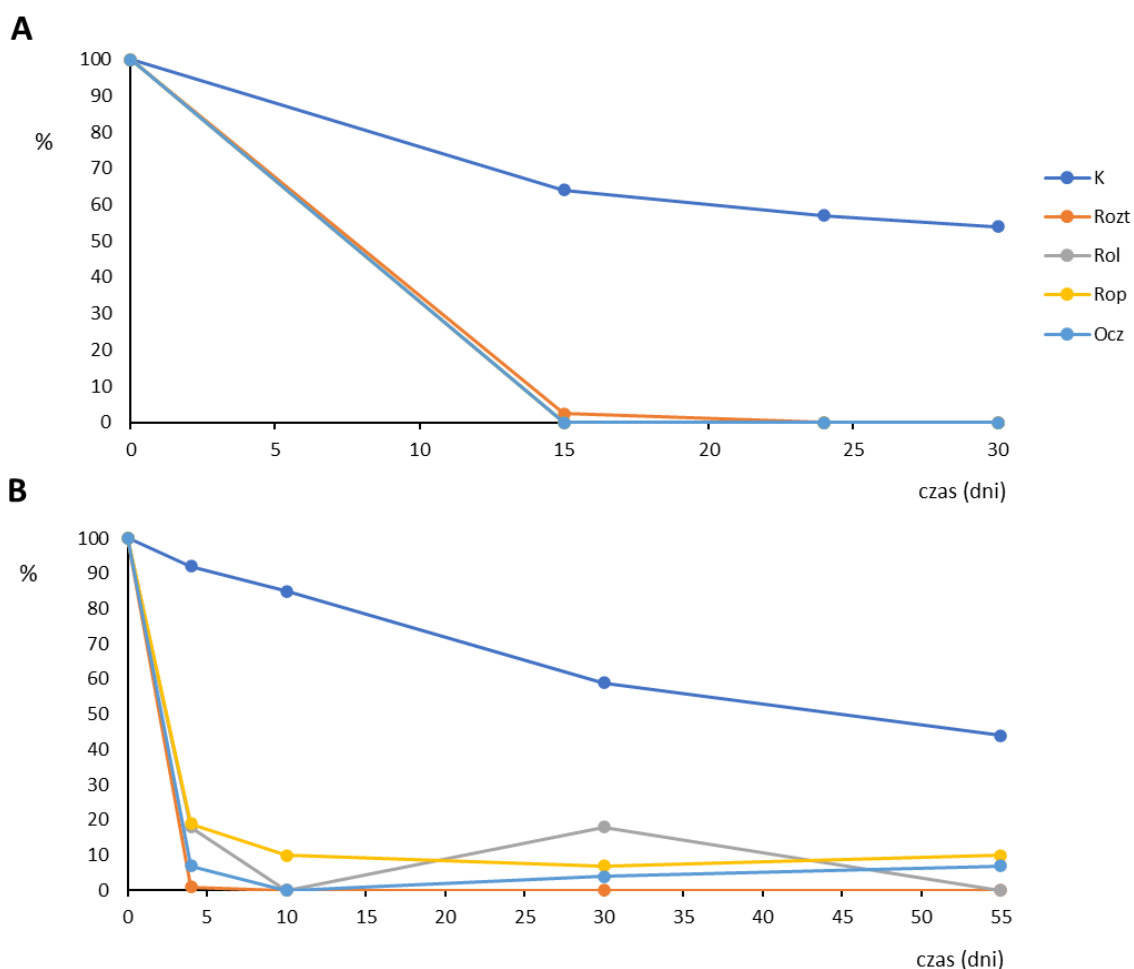
Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że w warunkach prowadzonych testów biotransformacji 2,4-D ulega samorzutnej estryfikacji do estru etylowego kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (nazywanego w dalszej części estrem etylowym 2,4-D). W symulacjach biotransformacji 2,4-D obserwowano hydrolizę estru etylowego 2,4-D do 2,4-D i następnie jego transformację do 2,4-DCP (ale również do 2,4,5-trichlorofenolu – 2,4,5-TCP).

Badania prowadzone przy początkowym stężeniu 2,4-D równym 4,2 g/l wykazały, że we wszystkich badanych hodowlach obserwowano spadek stężenia estru etylowego 2,4-D (o 93-96%) po 15 dniach prowadzenia testów biotransformacji. Efektywność usuwania 2,4-D z hodowli po 30 dniach wynosiła 100%. Należy jednak zaznaczyć, że w próbie kontrolnej (pozbawionej mikroorganizmów) także obserwowano stopniowy spadek stężenia badanego związku – 30% po 30 dniach prowadzenia symulacji.

Najlepszą efektywność usuwania estru etylowego 2,4-D z podłoża płynnego przy początkowym stężeniu 2,1 g/l obserwowano przy zastosowaniu konsorcjum Rozt – ubytek 2,4-D wynosił 99% po 4 dniach, a po 10 dniach wynosił 100%. W przypadku konsorcjum Rol po 4 dniach ubytek związku wyniósł 82%, po 10 dniach 100%, natomiast trzydziestego dnia zaobserwowano chwilowy wzrost stężenia estru w próbkach płynu hodowlanego, mogło to być spowodowane desorpcją związku z ziemi okrzemkowej. Po 55 dniach ubytek 2,4-D w hodowli Rol wyniósł 100 %. Ubytek estru etylowego 2,4-D w przypadku konsorcjum Ocz i Rop, w czasie T4 spadł odpowiednio o 80% i 90%, w dalszym czasie utrzymywał się jednak na stałym poziomie (wyk. 10 B.)

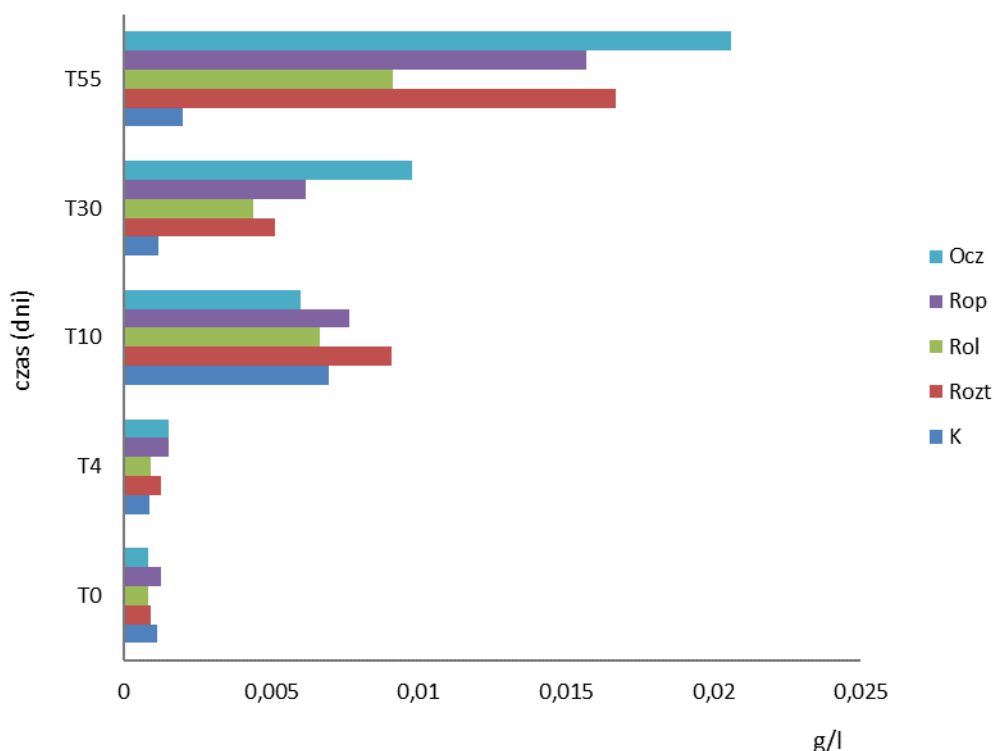
Konsorcjum Rozt i Rol wykazywały najwyższy poziom transformacji 2,4-D, z tego względu do dalszych symulacji biotransformacji wybrano właśnie te konsorcja. Ilość bakterii przez cały okres symulacji utrzymywała się na tym samym poziomie 10^6 jtk/ml, a po roku

wynosiła: w symulacji z użyciem konsorcjum Rozt średnio $4,33 \cdot 10^6$ jtk/ml, konsorcjum Rol $8,95 \cdot 10^6$ jtk/ml, konsorcjum Rop $8,15 \cdot 10^6$ jtk/ml, konsorcjum Ocz $1,68 \cdot 10^6$ jtk/ml.



Wykres 10. Procentowa zawartość estru etylowego 2,4-D w płynie hodowlanym w czasie, w symulacji biotransformacji 2,4-D. **A-** początkowe stężenie 2,4-D 4,2 g/l, **B-** początkowe stężenie 2,4-D 2,1 g/l. Rozt, Rol, Rop, Ocz – użyte konsorcja, K -wariant kontrolny. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem GC-ECD.

Wraz z ubytkiem zawartości estru 2,4-D, a potem 2,4-D, w hodowlach wzrastało stężenie 2,4-DCP (2,4-dichlorofenolu), czyli pierwszego metabolitu metabolizmu 2,4-D w szlaku metabolicznym A, zaprezentowanego na rycinie 4. Na wykresie 11. zaprezentowano zmiany zawartości 2,4-DCP w czasie. Zaobserwowano także, że dodatek świeżej porcji 2,4-D do symulacji, po jego pełnej transformacji do 2,4-DCP, powodował efekt letalny- śmierć całej populacji bakterii we wszystkich hodowlach.



Wykres 11. Zmiany stężenia 2,4-DCP w płynie hodowlanym w czasie, w symulacji biotransformacji 2,4-D. Rozt, Rol, Rop, Ocz – użyte konsorcja, K -wariant kontrolny. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem GC-ECD.

4.5.2. Symulacje biotransformacji 4-CP przez konsorcja bakteryjne

4-CP (4-chlorofenol) wybrano do prowadzenia symulacji biotransformacji w celu sprawdzenia zdolności konsorcjów bakteryjnych Rozt i Rol, do przeprowadzania rzadziej obserwowanego szlaku, którego jednym z pierwszych metabolitów jest 4-CP (rycina 4B), oraz ze względu na podobieństwo 4-CP do 2,4-DCP.

Symulacje prowadzone były na podłożu mineralnym M9 z dodatkiem ziemi okrzemkowej pełniącej funkcję powierzchni adsorpcji bakterii oraz z dodatkiem 250 μ l 1% wodnego roztworu 4-CP (otrzymano stężenie 0,025 g/l). Podłoże zaszczerpiono *inoculum* konsorcjum bakteryjnego Rozt i Rol (szczegółowy opis procedury znajduje się w punkcie 3.5.19.). Symulacje procesów biotransformacji 4-CP prowadzone były dla każdego konsorcjum bakteryjnego w trzech powtórzeniach w następujących wariantach: (A) 4-CP jako jedyne źródło węgla, (B) etanol jako dodatkowe źródło węgla, (C) metylokobalamina jako przenośnik elektronów, (D) etanol oraz metylokobalamina. Kontrola dla każdego wariantu zawierała wszystkie składniki dodane w danym wariantcie, oprócz konsorcjum bakteryjnego. Hodowle prowadzono przez 8 miesięcy. Ubytek 4-CP mierzono w czasie w odniesieniu do jego

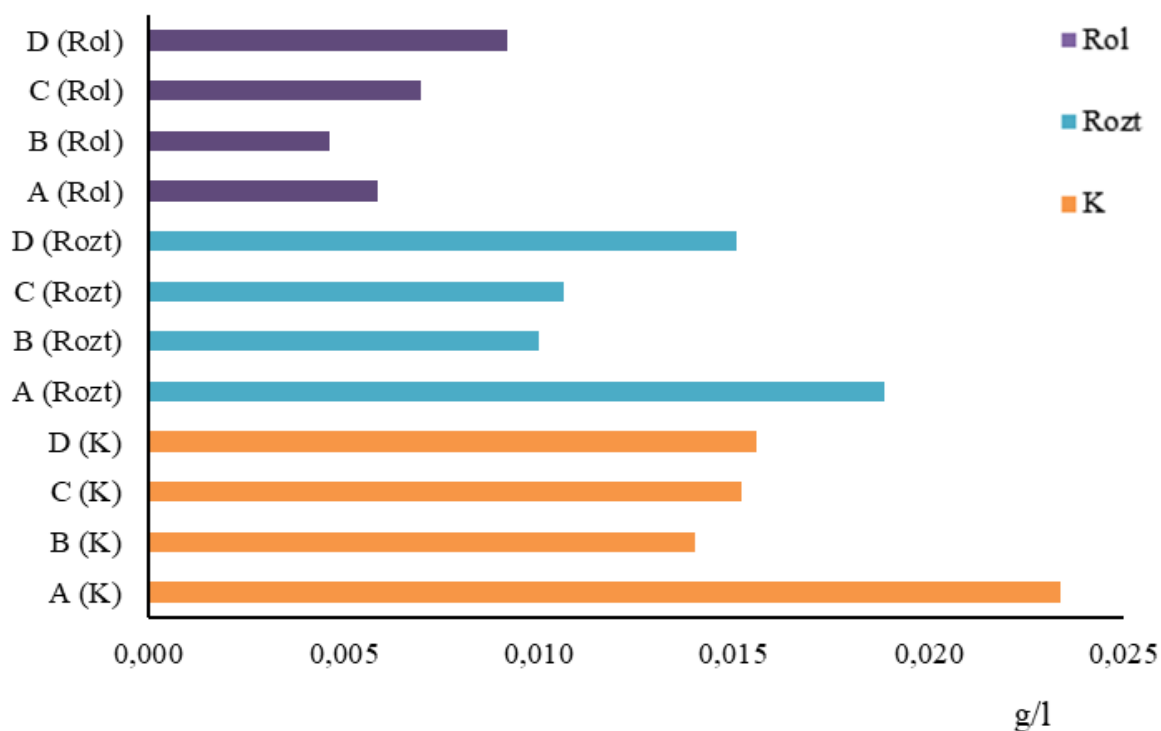
zawartości w momencie rozpoczęcia symulacji oraz względem wariantu kontrolnego. Próbkę do oznaczeń stężenia 4-CP pobrano na początku symulacji (T0), przez pierwszych 50 dni próbki pobierano co 7 dni- jednak ubytek 4-CP był w tym okresie nieznaczny, stąd kolejny pobór wykonano po 8 miesiącach (T8). Przeprowadzano również pomiar żywotności bakterii w czasie trwania symulacji.

Wyniki symulacji biotransformacji 4-chlorofenolu przedstawiono na wykresie 12 i w tabeli 13. Najwyższą efektywność procesu usuwania 4-CP z hodowli stwierdzono dla wariantu B symulacji (tabela 13). Po 8 miesiącach ubytek 4-CP w symulacjach z zastosowaniem konsorcjum Rol wynosił 82%, a konsorcjum Rozt – 60%. Efektywność usuwania 4-CP w wariancie C wynosiła w przypadku konsorcjum Rol 72%, a w przypadku konsorcjum Rozt 58%. Dodatek jednocześnie etanolu i metylokobalaminy zmniejszył efektywność usuwania 4-CP, efektywność przy zastosowaniu konsorcjum Rol wyniosła 64%, a Rozt 40% (wariant D). Najniższa efektywność procesu biotransformacji 4-CP obserwowana była w wariancie A, w przypadku konsorcjum Rozt – gdzie osiągnięto efektywność równą 25%.

Bakterie w znaczący sposób zwiększają efektywność usuwania 4-CP. Warto zwrócić uwagę, iż we wszystkich badanych przypadkach użycie dodatkowego źródła węgla w postaci etanolu zwiększyło efektywność procesu transformacji toksykanta, nawet w wypadku wariantu kontrolnego. Należy podkreślić, że również w kontroli obserwowano wzrost tempa usuwania 4-CP, po dodaniu etanolu i metylokobalaminy.

Liczba bakterii przez cały okres symulacji utrzymywała się na podobnym poziomie - 10^6 jtk/ml, a po 8 miesiącach wynosiła w symulacji z użyciem konsorcjum Rozt średnio wg wariantu: (A) $1,68 \cdot 10^6$, (B) $8,71 \cdot 10^6$, (C) $4,05 \cdot 10^6$, (D) $7,23 \cdot 10^6$, w symulacji z użyciem konsorcjum Rol odpowiednio: (A) $1,00 \cdot 10^6$, (B) $9,30 \cdot 10^6$, (C) $5,70 \cdot 10^6$, (D) $4,50 \cdot 10^6$ jtk/ml.

Bakterie należące do konsorcjum Rozt i Rol posiadają genetyczny i fizjologiczny mechanizm do biotransformacji 4-CP. Jednak jest to proces niezwykle czasochłonny w porównaniu z procesem biotransformacji 2,4-D. Ponadto warto podkreślić, iż w symulacji biotransformacji 2,4-D, użyto go w ilości 4,2 i 2,1 g/l, natomiast w symulacji biotransformacji 4-CP użyto go w ilości 0,025 g/l, zatem niemal w odpowiednio dwustu- i stukrotnie niższym stężeniu, a mimo to tempo jego usuwania jest znacznie niższe.



Wykres 12. Zmiany stężenia 4-CP w symulacji biotransformacji 4-CP po 8 miesiącach inkubacji wyrażone w g/l. Początkowe stężenie 4-CP – 0,025 g/l. (A) 4-CP jako jedyne źródło węgla, (B) etanol jako dodatkowe źródło węgla, (C) metylokobalamina jako przenośnik elektronów, (D) etanol oraz metylokobalamina. Rozt i Rol – użyte konsorcja, K -wariant kontrolny. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem GC-ECD.

Tabela 13. Procentowy ubytek 4-CP w płynach hodowlanych symulacji biotransformacji 4-CP przy użyciu konsorcjum Rozt i Rol po 8 miesiącach prowadzenia symulacji.

	Wariant	% ubytku 4-CP
K	A (K)	8%
	B (K)	45%
	C (K)	40%
	D (K)	38%
Rozt	A (Rozt)	25%
	B (Rozt)	60%
	C (Rozt)	58%
	D (Rozt)	40%
Rol	A (Rol)	77%
	B (Rol)	82%
	C (Rol)	72%
	D (Rol)	64%

4.5.3. Analiza metaproteomów konsorcjów bakteryjnych

Na podstawie analiz metaproteomów konsorcjów (szczegółowy opis procedury znajduje się w punkcie 3.5.20. i 3.5.21.) w trakcie symulacji biotransformacji 2,4-D i 4-CP wśród białek wydzielniczych udało się zidentyfikować trzy dehalogenazy. W płynach hodowlanych symulacji biotransformacji 2,4-D były to S-transferaza glutationu i karboksymetylenobutenolidaza, natomiast w płynach hodowlanych symulacji biotransformacji 4-CP zidentyfikowano S-transferazę glutationu i karboksymetylenobutenolidazę (ryc. 5) oraz 2,3-dioksygenazę katecholową (tab.8.). S-transferaza glutationu katalizuje podstawienie grupy halogenowej tiolanowym anionem glutationu, w wyniku czego powstaje nietrwały i niestabilny S-halometyloglutation, który następnie ulega hydrolizie, tworząc halogen, glutation i formaldehyd (Fetzner, 1998).

Identyfikacja jedynie trzech dehalogenaz nie jest jednoznaczna z ekspresją jedynie trzech genów kodujących wymienione dehalogenazy, jednak ilość dehalogenaz w stosunku do reszty białek wydzielniczych bakterii była zbyt mała, by mogły być one oznaczone z wykorzystaniem techniki LC – MS-MS / MS.

4.6. Usuwanie 2,4-D

Do usuwania chlorowanych herbicydów stanowiących pochodne kwasu fenoksyoctowego z wody stosuje się kilka metod, w tym fotokatalizę (Alvarez i in., 2007; Muszyński i in., 2020; Pattappan i in., 2023; Bi i in., 2023), elektrochemiczną degradację (Brillas i in., 2000; Oturan, 2000; Dargahi i in., 2019;), utlenianie poprzez zaawansowane procesy utleniania (ang. *Advanced Oxidation Processes* - AOP) (Garcia-Segura i in. 2011; Rivera-Utrilla i in., 2012; Sanchis i in. 2013) oraz biodegradację (Chinalia i Killham, 2006; Onbasili i Aslim 2011; Evangelista i in. 2010; Sanchis i in. 2013; Magnoli i in. 2020).

Abiotyczna transformacja 2,4-D, jak proponują Chen i współpracownicy (2017), może przebiegać w następujący sposób: na skutek działania nadsiarczanu aktywowanego FeS (makinawit), aktywowane rodniki tlenowe atakują wiązanie C–O w grupie fenoksyłowej 2,4-D i rozrywają łańcuch boczny, na skutek czego powstaje 2,4-dichlorofenol (2,4-DCP) oraz kwas glikolowy. Powstały kwas glikolowy może zostać następnie przekształcony w kwas szczawiowy poprzez odwodornienie i hydroksylację, po czym mineralizowany do CO₂ i H₂O. 2,4-DCP może natomiast zostać przekształcony do 4-chloro-1,3-benzenodiolu (4-CR) i 2-chlorofenolu (2-CP) poprzez podstawienie chloru grupą hydroksylową, a następnie przekształcony w 2-chlorohydrochinon (2-CHQ) i p-benzochinon (PBQ) w procesie odchlorowania. Jednocześnie 2,4-DCP na drodze hydroksylacji, a następnie ataku

elektrofilowego ulega transformacji w 4,6-dichlororezorcynol (4,6-DCR), z którego na drodze reakcji eliminacji powstaje 2-CP. W kolejnym etapie dochodzi, według badaczy, do otwarcia pierścienia aromatycznego w wyniku ataku nukleofilowego na produkty chinonowe i/lub dalszego utlenienia przez odchlorowanie. Powstałe kwasy maleinowy i fumarowy mogą zostać rozłożone do CO₂ i H₂O.

Z kolei według Pattappan i współpracowników (2023) początkowe działanie rodników tlenowych przebiega tak, jak zaproponowali to Chen i współpracownicy, natomiast powstały 2,4-DCP ulega odchlorowaniu z wytworzeniem 2-CHQ, a następnie hydroksychinolu, poprzez łatwiejsze usunięcie grupy OH z pozycji *para*-, w porównaniu z grupą OH z pozycji *orto*-. 2-CHQ tworzy stabilny izomer - 2-chloro-1,4-benzochinon, po czym następuje odchlorowanie z wytworzeniem hydroksychinolu. W wyniku dalszego utleniania i reakcji otwarcia pierścienia hydroksychinolu powstają kwasy alifatyczne (kwas maleinowy/kwas mrówkowy). Kwasy alifatyczne ulegają mineralizacji, tworząc CO₂ i H₂O w wyniku ciągłego ataku rodników tlenowych.

W przypadku metod biologicznych, istnieje kilka szczepów opisywanych w literaturze jako zdolne do biodegradacji 2,4-D, wykorzystujących co najmniej dwa główne szlaki transformacji: szlak ketoglutaranu (szlak A, którego pierwszym produktem metabolizmu jest 2,4-DCP) lub szlak dehalogenazy (szlak B, którego pierwszym produktem metabolizmu jest kwas 4-chlorofenoksyoctowy, a następnie 4-CP) (rycina 4). Takie genetyczne przystosowanie mikroorganizmów do metabolizowania ksenobiotyku, wprowadzonego do środowiska w połowie dwudziestego wieku, jakim jest 2,4-D, jest zastanawiające. Mikroorganizmy miały stosunkowo niewiele czasu do przystosowania się do toksykanta i stworzenia szlaków jego metabolizmu. Van der Meer (1994) sugeruje, że aktywność metaboliczna w kierunku 2,4-D, może wynikać z modyfikacji już istniejących szlaków metabolizmu naturalnie występujących związków aromatycznych. Inni naukowcy sugerują jednak niezależne, ewolucyjne nabycie genów szlaku biodegradacji 2,4-D (Dejonghe i in. 2000).

Przeprowadzona w ramach niniejszej pracy analiza danych literaturowych wskazuje, że posiadanie przez drobnoustroje wyspecjalizowanych mechanizmów biodegradacji 2,4-D wynika z podobieństwa 2,4-D do naturalnie występujących w środowisku HZO, posiadających w swej strukturze pierścień aromatyczny jak np. chlorofenole. Mocne dowody na naturalne powstawanie chlorofenoli uzyskali w swoich badaniach Hoekstra i współpracownicy poprzez wzbogacenie gleby leśnej izotopem chloru ³⁷Cl, a następnie wykrycie chlorofenoli wzbogaconych w ³⁷Cl (1999). Metodą tą potwierdzono naturalne powstawanie 4-chlorofenolu, 2,4- (lub 2,5-) dichlorofenolu, 2,6-dichlorofenolu i 2,4,5-trichlorofenolu. Najsilniejsze

wzbogacenie w izotop ^{37}Cl zaobserwowano dla 4-chlorofenolu, a suma wszystkich prostych chlorofenoli wykrytych w glebach leśnych wynosiła do 71 $\mu\text{g/kg}$ s.m. Potwierdzenie naturalnego pochodzenia 2,4-DCP oraz 4-CP, tłumaczy posiadanie wyspecjalizowanych szlaków metabolizmu 2,4-D, prowadzących do powstania metabolitów 2,4-DCP i 4-CP, przez mikroorganizmy różnych środowisk. Rozpowszechnienie wśród bakterii pochodzących z różnych środowisk genów, których produkty stanowią enzymy uczestniczące w szlakach metabolizmu 2,4-D, zostało udowodnione w niniejszych badaniach – w analizie metagenomów pochodzących z gruntów leśnych, rolnych, oczyszczalni ścieków, a także obecnych w metagenomach konsorcjów wyizolowanych z tych środowisk oraz w metagenomie konsorcjum pochodzącego z gruntów silnie skażonych produktami ropopochodnymi. W wymienionych metagenomach obecne były prawie wszystkie geny, których produkty biorą udział w metabolizmie 2,4-D.

Mikroorganizmy, z całą pewnością musiały wykształcić mechanizm transformacji 2,4-D prowadzący do powstania 2,4-DCP – reakcja katalizowana przez 2,4-D dioksygenazę zależną od α -ketoglutaranu (reakcja ta jest, jak już wspomniano powyżej, częściej obserwowana w środowisku) lub kwasu 4-chlorofenoksyoctowego. Ta druga reakcja, katalizowana przez dehalogenazę 2,4-D i przez monooksygenazę 4-chlorofenoksyoctową, z jakichś przyczyn nie jest faworyzowana przez drobnoustroje. Być może 4-CP wykazuje wyższą toksyczność względem mikroorganizmów środowiskowych, choć przeprowadzone przeze mnie badania na wyselekcjonowanych konsorcjach (Rozt, Rol) na to nie wskazują, bądź produkcja 2,4-DCP jest dla komórki bardziej opłacalna energetycznie.

Pierwszą próbę opisu katabolicznego szlaku biodegradacji 2,4-D podjęto przy użyciu *Arthrobacter* spp. (Loos i in. 1980). Z drugiej strony, najlepiej zbadany do dziś szlak kataboliczny opiera się na modelu kodowanym przez plazmid pJP4 wyizolowany po raz pierwszy z *Ralstonia eutrofa* JMP134, wcześniej znanego jako *Alcaligenes eutrochus* (Cavalca i in., 1999; Hotopp i Hausenger 2001; Kumar i in., 2014). Wśród organizmów metabolizujących 2,4-D można wymienić bakterie, w tym należące do α -, β - i γ -proteobakterii (Itoh i in., 2002; Nielsen i in., 2013; Han i in., 2015; Kumar i in., 2016; Islam i in., 2018). Przykładowe taksony bakterii metabolizujących 2,4-D, wymienianych w literaturze, zaprezentowano w tabeli 14.

Tabela 14. Przykładowe taksony bakterii metabolizujących 2,4-D.

Bakterie	Klasa bakterii	Bibliografia
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Alphaproteobacteria</i>	Huong i in. (2007)
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA94		Hayashi i in. (2016)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. HW13		Kitagawa i in. (2002)
<i>Ochrobactrum anthropic</i>		Carboneras i in. (2017)
<i>Sphingomonas</i> sp.		Huong i in. (2007)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		Cycoń i in. (2011)
<i>Xanthobacter</i> sp. CP		Ditzelmüller i in. (1989)
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Betaproteobacteria</i>	Igbinosa i in. (2007b)
<i>Achromobacter</i> sp. LZ35		Xia i in. (2017)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>denitrificans</i> EST4002		Vedler i in. (2004)
<i>Alcaligenes</i> sp.		Jacobsen i Pedersen (1992)
<i>Burkholderia</i> sp.		Huong i in. (2007)
<i>Burkholderia cepacia</i>		Xia i in. (2017)
<i>Cupriavidus</i> sp.		Han i in. (2014)
<i>Cupriavidus necator</i> JMP 134		Lerch i in. (2007)
<i>Cupriavidus gilardii</i>		Wu i in. (2017)
<i>Dechloromonas</i> sp.		Yang i in. (2017)
<i>Delftia acidovorans</i> P4a		Hoffmann i in. (2003)
<i>Delftia acidovorans</i> MC1010		Müller (2007)
<i>Ralstonia</i> sp.		Huong i in. (2007)
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Gammaproteobacteria</i>	Silva i in. (2007)
<i>Aeromonas hydrophila</i> IBRB-36 4CPA		Markusheva i in. (2004)
<i>Azotobacter chroococcum</i>		Balajee i Mahadevan (1990)
<i>Halomonas</i> sp. EF43		Kleinstauber i in. (2001)
<i>Serratia marcescens</i>		Silva i in. (2007)

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		Silva i in. (2007)
<i>Stenotrophomonas sp.</i>		Han i in. (2014)
<i>Pseudomonas sp.</i>		Yang i in. (2017)
<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Actinomycetia</i>	Igbinosa i in. (2007a)
<i>Corynebacterium sp.</i>		Igbinosa i in. (2007b)
<i>Nocardioides sp.</i>		Huong i in. (2007)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> DSM6263		Hou i in. (2016)
<i>Rhodococcus ruber</i>		Carboneras i in. (2017)
<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>Flavobacteria</i>	Silva i in. (2007)

Czas potrzebny mikroorganizmom na biodegradację 2,4-D waha się od kilku tygodni do kilku miesięcy (Loos i in. 1980; Ghani i Wardle 2001). Zmienność ta wynika z biodostępności i/lub samych organizmów biodegradujących. Ważnym czynnikiem jest szybkość sorpcji i desorpcji 2,4-D do materii organicznej i nieorganicznej obecnej w matrycy środowiskowej (Benoit i in. 1996). Jeśli związek nie jest biodostępny dla rozkładających go drobnoustrojów, oznacza to, że nie może zostać wchłonięty przez żywą komórkę i tym samym metabolizowany, bądź jest niedostępny dla produkowanych zewnątrzkomórkowo specyficznych enzymów. Na biodostępność 2,4-D ma wpływ jego wiązanie się do cząstek gleby (matrycy środowiskowej), ale także procesy utrudniające jego dyfuzję z matrycy środowiskowej. 2,4-D może utrzymywać się w środowisku przez długi czas również ze względu na brak wymaganej zdolności katabolicznej drobnoustrojów lub wielkość i aktywność populacji mikroorganizmów zdolnych do transformacji 2,4-D jest zbyt mała.

Na dystrybucję genów, których produkty zaangażowane są w transformację 2,4-D, w mojej opinii ma wpływ naturalne pochodzenie 2,4-DCP oraz 4-CP, jednak wydaje się iż umiejscowienie tych genów na ruchomych elementach genetycznych ma tu kluczowe znaczenie. Zaobserwowano, iż geny których produkty zaangażowane są w biotransformację 2,4-D, to jest 2,4-D dioksygenaza zależna od α -ketoglutaranu (*tfdA*), hydroksylaza 2,4-dichlorofenolu (*tfdB*), 1,2-dioksygenaza chlorokatecholowa (*tfdC*), cykloizomeraza chloromukonianu (*tfdD*), hydrolaza chlorodienelaktonu (*tfdE*), odpowiednio reduktaza chloromaleilooctanu (*tfdF*) i reduktaza maleilooctanu (*tfdF*), leżą na plazmidzie (Don i

Pemberton, 1985; Streber i in., 1987; Kumar i in., 2014). Rozkład 2,4-D w glebie i wodzie można przyspieszyć poprzez bioaugmentację, tj. poprzez zaszczerpienie matrycy mikroorganizmami, o których wiadomo, że łatwo metabolizują herbicyd, lub które zostały wyposażone w niezbędne do biotransformacji ksenobiotyku geny. Podejście bioaugmentacyjne przyspieszyło niejednokrotnie degradację zanieczyszczeń organicznych, chociaż wprowadzone w formie szczepionki bakterie przeżywały jedynie od 3 do 14 dni (Dejonghe i in., 2000).

W symulacjach rozkładu 2,4-D obserwowano hydrolizę estru etylowego 2,4-D do 2,4-D i następnie jego transformację do 2,4-DCP (ale również do 2,4,5-TCP). Pomimo, że transformacja ta w wykonaniu wyselekcjonowanych szczepów konsorcyjnych nie przysparza bakteriom trudności, a całkowita transformacja 2,4-D zajmuje zaledwie 4 dni (2,4-D podany w stężeniu 2,1 g/l, konsorcjum Rozt), to rozkład 2,4-DCP wydaje się być wąskim gardłem całego procesu biodegradacji 2,4-D. Po roku prowadzenia transformacji 2,4-D, 2,4-DCP wciąż jest obecny w płynach hodowlanych. Pomimo, że nie jest on dla bakterii toksyczny, gdyż cały czas drobnoustroje utrzymują swą populację na poziomie 10^6 jtk/ml, to jednak pełna transformacja 2,4-DCP do dalszych produktów szlaku metabolizmu 2,4-D nie była obserwowana. Być może dostępność 2,4-DCP jest ograniczona dla bakterii, przy niższych stężeniach lub jest adsorbowany na powierzchni komórek. Być może dodanie surfaktantu zwiększyłoby biodostępność 2,4-DCP lub przyczyną jest brak mikroelementów istotnych w tworzeniu białek enzymatycznych, np.: metali lub witamin stanowiących kofaktor danego enzymu, przez co proces pełnej transformacji 2,4-DCP jest utrudniony. Niemniej, wydaje się, że bakterie wykorzystują metabolity 2,4-D jako źródło energii i węgla, gdyż stanowią jedyne ich źródło w pożywce hodowlanej po tak długim czasie.

Według wyników uzyskanych przez Cyconia i współpracowników (2011) w czasie 10 dni prowadzenia symulacji biotransformacji 2,4-D w warunkach tlenowych – hodowla płynna na podłożu mineralnym z dodatkiem 2,4-D jako jedynym źródle węgla w stężeniu początkowym 0,05 g/l, z dodatkiem 1 ml *inokulum* bakteryjnego (bakterie pochodziły z gruntów na których prowadzono opryski 2,4-D) w ilości $3 \cdot 10^6$ jtk/ml – zaobserwowano ubytek herbicydu na poziomie 54-69%, w zależności od użytego szczepu. Warto zwrócić uwagę, iż użyte przez Cyconia i współpracowników początkowe stężenie 0,05 g/l jest od 42 do 84 razy niższe niż użyte w symulacjach opisanych w niniejszej pracy (2,1g/l i 4,2 g/l). Cycon i współpracownicy zauważyli wzrastające stężenie 2,4-DCP wraz z ubytkiem 2,4-D, w przypadku szczepu *Sphingomonas paucimobilis* po 10 dniach obserwowano stężenie 2,4-DCP równe 0,0065 g/l zatem około dziesięciokrotnie niższe niż początkowo użyte stężenie 2,4-D. W przypadku symulacji opisanych w niniejszej pracy stężenie 2,4-DCP obserwowane w 10

dniu wahały się 0,006-0,009 g/l w zależności od użytego konsorcjum, zatem wyniki stężenia powstałego 2,4-DCP były około 230 do 700 razy niższe od początkowego stężenia 2,4-D (odpowiednio dla stężeń 2,1 g/l i 4,2 g/l).

McTernan i Pereira (1991) prowadzili biotransformację 2,4-D w stężeniach 0,05; 0,5 i 5 mg/l w warunkach tlenowych – hodowla płynna na podłożu mineralnym z dodatkiem octanu sodu (0,1 g/l) oraz zaszczepieniem *inokulum* bakteryjnym (bakterie pochodziły z oczyszczalni ścieków). Po 16 dniach badacze obserwowali ubytek 2,4-D na poziomie 96% dla stężenia 0,05 mg/l, 84% dla stężenia 0,5 mg/l oraz 36% dla 5 mg/l.

Han i współpracownicy (2015) prowadzili symulację biotransformacji 2,4-D w warunkach tlenowych – hodowla płynna na podłożu mineralnym z dodatkiem 2,4-D jako jedynym źródle węgla w stężeniu początkowym 0,2; 0,35; 0,5; 0,8 g/l zaszczepione *inoculum* bakteryjnym (bakterie pochodziły z gruntów rolnych, na których prowadzono opryski 2,4-D). Badacze osiągnęli następujący ubytek 2,4-D 98% dla stężenia 0,2 g/l po 3 dniach, 90% dla stężenia 0,35 po 4 dniach, 94% dla 0,5 g/l po 7 dniach i 61% dla 0,8 g/l po 7 dniach. Należy zaznaczyć, że McTernan i Pereira oraz Han i współpracownicy użyli znacznie niższe stężenia 2,4-D niż w symulacjach opisanych w niniejszej pracy, co potwierdza bardzo wysoką efektywność skonstruowanych konsorcjów bakteryjnych do usuwania 2,4-D.

Zaobserwowano, że dodatek świeżej porcji 2,4-D do symulacji, po jego pełnej transformacji do 2,4-DCP, powodował efekt letalny- śmierć całej populacji bakterii. Zatem w przypadku badań środowiskowych i kontroli stanu wód należy zwrócić szczególną uwagę na obecność metabolitów 2,4-D, w szczególności 2,4-DCP, który ma addytywne lub nawet synergiczne działanie toksyczne ze związkiem macierzystym.

Bioaugmentacja mikroorganizmami aktywnymi wobec toksykantów oraz bioaugmentacja genetyczna wydaje się skutecznym rozwiązaniem do bioremediacji środowisk zanieczyszczonych 2,4-D i jego metabolitami. Bioaugmentacja genetyczna polega na wprowadzeniu genów katabolicznych do istniejących natywnych szczepów drobnoustrojów w celu zwiększenia ich zdolności do metabolizowania substancji zanieczyszczających (Garbisu i in., 2017). Technologia ta wykorzystuje samoprzenoszące się ruchome elementy genetyczne, którymi w tym przypadku są plazmidy. W przypadku bioaugmentacji genetycznej, szczep bakterii-dawcy, posiadający plazmid kataboliczny, niosący geny transformacji 2,4-D, jest wprowadzany do zespołu drobnoustrojów autochtonicznych. Dzięki horyzontalnemu transferowi genów (HTG) plazmid jest kompetentnie pobierany przez natywną populację bakterii (Ikuma i Gunsch, 2012a, 2012b; Yanagida i in., 2016; Nojiri, 2016). W wyniku ekspresji nabytych genów katabolicznych powstają funkcyjne białka uczestniczące w szlaku

transformacji 2,4-D, co w efekcie prowadzi do zwiększonej efektywności usuwania zanieczyszczeń. Dodatkowo unika się w ten sposób presji natywnych mikroorganizmów na allochtoniczne drobnoustroje, które najczęściej nie wytrzymują konkurencji międzygatunkowej z autochtoniczną mikroflorą. Dla utrzymania efektywności procesu bioagumentacji i bioagumentacji genetycznej, należy prowadzić i monitorować biostymulację, poprzez zapewnienie właściwej wilgotności (w przypadku gruntów), napowietrzania, dostępu do makro- i mikroelementów w postaci roztworów soli, w tym metali – kofaktorów specyficznych enzymów zaangażowanych w proces biotransformacji oraz właściwego stosunku C:N:P.

4.7. Testy ekotoksyczności

W ramach VII etapu badań przeprowadzono badania wpływu 2,4-D oraz metabolitów 2,4-D zawartych w płynach hodowlanych pochodzących z symulacji biotransformacji 2,4-D na organizmy – glony, rośliny wyższe, skorupiaki wodne. Płyn hodowlany nie zawierał 2,4-D, natomiast w jego skład wchodziły metabolity przemiany materii i metabolity szlaku biotransformacji 2,4-D – głównie 2,4-DCP (w stężeniu 17,6 mg/l.) Szczegółowy opis procedury znajduje się w punkcie 3.5.22.

4.7.1. Test hamowania wzrostu glonów

Test hamowania wzrostu glonów wykonano na zielenicach z gatunku *Desmodesmus quadricauda*, wobec 2,4-D w następujących stężeniach 2100; 1050; 525; 263; 131 (mg/l) oraz wobec płynu hodowlanego w następujących stężeniach: 50; 25; 20; 15; 12,5; 6,25; 3,125 (%). W tabeli 15. zestawiono stężenia 2,4-DCP (obecne w płynach hodowlanych) odpowiadające stężeniom procentowym płynu hodowlanego użytym w teście. Użyty płyn hodowlany, nie zawierał bakterii, ani ziemi okrzemkowej, w tym celu próbki płynu hodowlanego wirowano przy prędkości 9600 rpm, w czasie 20 minut, a do testów toksyczności używano odpowiednio rozcieńczony (względem podłoża OECD, wskazanego w procedurze OECD 202) supernatant płynu hodowlanego.

W przypadku płynu hodowlanego wykazano stymulację wzrostu biomasy glonów do stężenia 15% (odpowiadającą 2,64 mg/l 2,4-DCP) włącznie, przy czym niższe stężenia, tzn. 6,25% (odpowiadające 1,1 mg/l 2,4-DCP) i 3,125% (odpowiadające 0,55 mg/l 2,4-DCP) wykazywały wyższą stymulację wzrostu liczebności glonów. Z przeprowadzonego testu wynika, że obecność metabolitu 2,4-DCP, może powodować eutrofizację wód powierzchniowych, jeśli dostanie się do nich w niewielkim stężeniu, w wyższych stężeniach

powoduje spadek liczebności glonów, wartość EC_{50} -72h wyniosła 23,91% (co odpowiada stężeniu 4,2 mg/l 2,4-DCP).

Z kolei w przypadku 2,4-D we wszystkich użytych stężeniach obserwowana była inhibicja wzrostu glonów, EC_{50} -72h wyniosło 160 mg/l.

Tabela 15. Stężenia płynu hodowlanego użyte w teście hamowania wzrostu glonów, zestawione z zawartością 2,4-DCP w płynie hodowlanym. Stężenia 2,4-DCP oznaczono za pomocą GC-MS.

C (%) płynu hodowlanego	C (mg/l) 2,4-DCP
50	8,80
25	4,40
20	3,52
15	2,64
12,5	2,20
6,25	1,10
3,125	0,55

4.7.2. Test immobilizacji skorupiaków

Test immobilizacji skorupiaków przeprowadzono na *Daphnia magna*. Badania przeprowadzono w takim samym zakresie stężeń 2,4-D oraz płynu hodowlanego jak w teście na glonach. Wartość EC_{50} -48h płynu hodowlanego wyniosła 12,81% (co odpowiada stężeniu 2,25 mg/l 2,4-DCP), natomiast dla 2,4-D wartość EC_{50} -48h wyniosła 40 mg/l.

Porównując otrzymane wartości EC_{50} z oceną toksyczności związków chemicznych w odniesieniu do kryteriów ich szkodliwości dla biocenoz wodnych wg Unii Europejskiej (tabela 16) można zauważyć, że 2,4-DCP jako metabolit szlaku biotransformacji 2,4-D, obecny w płynach hodowlanych wykazuje znacznie wyższą toksyczność niż związek macierzysty, a w zestawieniu z kryteriami UE jest to związek toksyczny dla organizmów biocenoz wodnych, natomiast 2,4-D jest klasyfikowany jako szkodliwy.

Tabela 16. Ocena toksyczności związków chemicznych w odniesieniu do kryteriów ich szkodliwości dla biocenoz wodnych wg Unii Europejskiej (Dyrektywa 93/67/EEC, 1993).

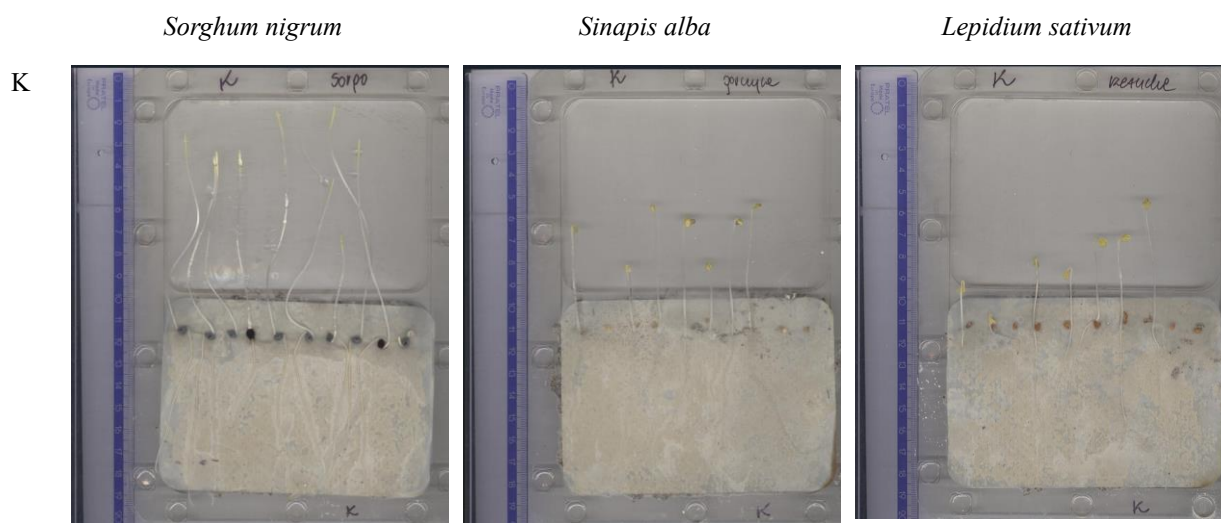
LC(EC) ₅₀ (mg/l)	Ocena toksyczności związku
<0,1	ekstremalnie toksyczny
0,1-1	bardzo toksyczny
>1-10	toksyczny
>10-100	szkodliwy
>100	nietoksyczny

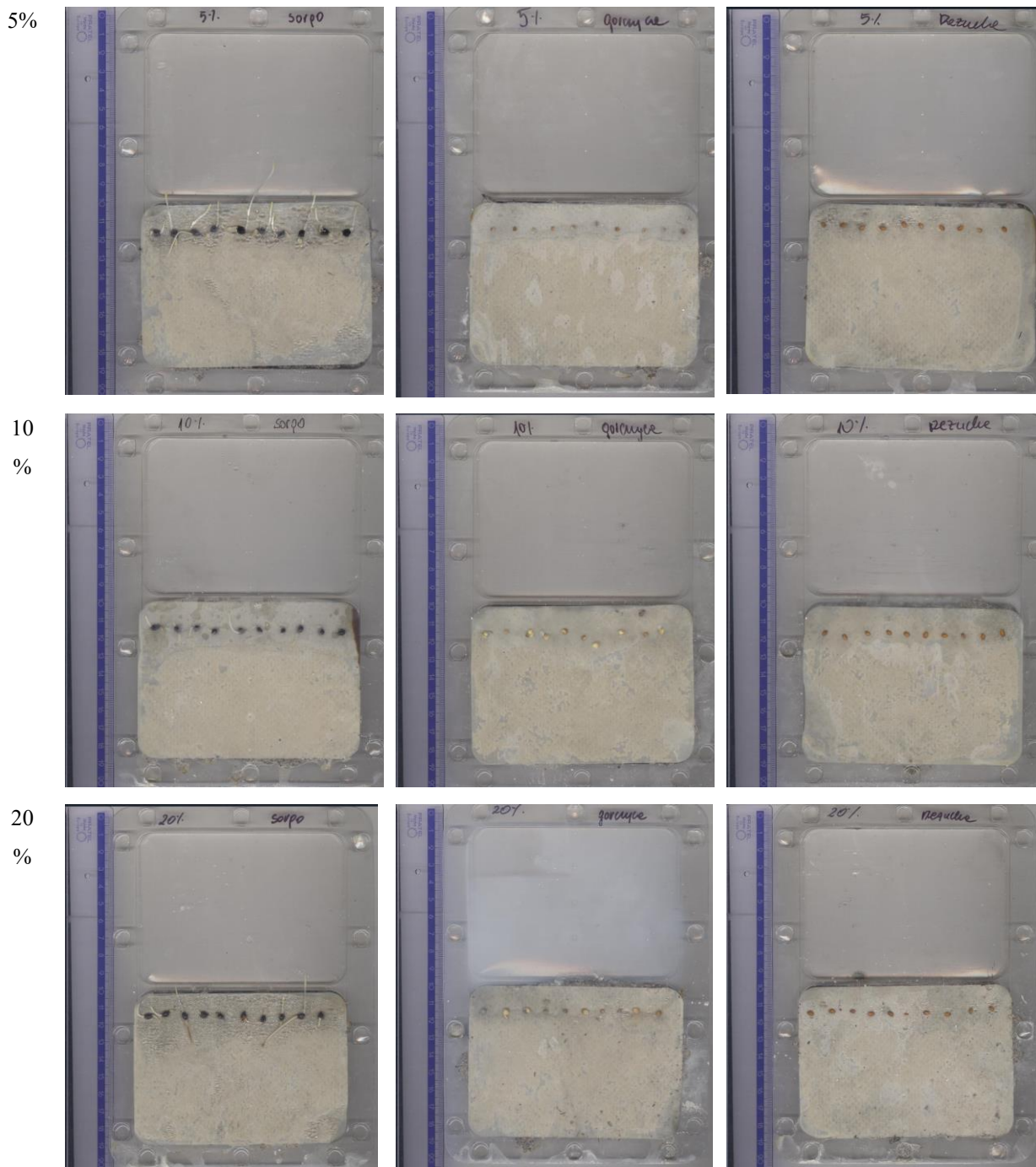
4.7.3. Test hamowania wzrostu roślin

Test hamowania wzrostu roślin wyższych wykonano na trzech gatunkach: *Sorghum nigrum* (roślina jednoliścienna), *Sinapis alba* (roślina dwuliścienna), *Lepidium sativum* (roślina dwuliścienna). Oceny inhibicji wzrostu organizmów dokonano na podstawie kiełkowania nasion oraz długości korzenia po 120-godzinnym kontakcie z metabolitami biotransformacji 2,4-D obecnymi w płynie hodowlanym (dominującym związkiem w płynie hodowlanym był 2,4-DCP). Płyn hodowlany dodano do gleby referencyjnej w następujących stężeniach 5%, 10%, 20%, do kontroli dodano wodę dejonizowaną. Użyte stężenia płynów hodowlanych odpowiadały następującym stężeniom 2,4-DCP: 5% – 0,880 mg/l, 10% – 1,760 mg/l, 20% – 3,520 mg/l, stężenia 2,4-DCP oznaczono za pomocą GC-MS. Wyniki testu przedstawiono w postaci fotografii z badań – rycina 6, oraz w tabeli 17. Stwierdzono, że najmniejsze użyte stężenie metabolitów transformacji 2,4-D – 2,4-DCP powoduje inhibicję kiełkowania nasion roślin dwuliściennych. Natomiast w przypadku roślin jednoliściennych zastosowane stężenia 2,4-DCP powodują znaczną inhibicję wzrostu korzenia (tabela 17.).

Tabela 17. Zestawienie wyników testu ekotoksyczności phytotoxkit. Wyniki prezentują wpływ 2,4-DCP, obecnego w płynie hodowlanym w stężeniach 5, 10, 20 (%), na kiełkowanie i wzrost korzenia roślin wyższych – *Sorghum nigrum*, *Sinapis alba*, *Lepidium sativum*. K - wariant kontrolny.

	kiełkowanie (liczba nasion w szt.)			średnia długość korzenia (cm)		
	<i>Sorghum nigrum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Lepidium sativum</i>	<i>Sorghum nigrum</i>	<i>Sinapis alba</i>	<i>Lepidium sativum</i>
K	10	7	7	6,1	3,8	3
5%	10	2	0	0,51	0	0
10%	9	5	0	0,22	0	0
20%	9	3	0	0,67	0	0





Rycina 6. Fotografie przedstawiające wyniki testu wpływu 2,4-DCP, obecnego w płynie hodowlanym w stężeniach 5, 10, 20 (%), na kiełkowanie i wzrost korzenia roślin wyższych, na przykładzie trzech gatunków: *Sorghum nigrum*, *Sinapis alba*, *Lepidium sativum*. K - wariant kontrolny.

4.8. Porównanie toksyczności 2,4-D i jego głównych metabolitów

Na podstawie wyników z przeprowadzonych testów ekotoksyczności jednoznacznie wynika, że za równo 2,4-D jak i 2,4-DCP wykazują szkodliwy i toksyczny wpływ na organizmy wodne (glony i skorupiaki), oraz organizmy lądowe (rośliny wyższe). Ciągłe uwalnianie do środowiska 2,4-D, a przez to i 2,4-DCP, negatywnie wpłynie na całe ekosystemy wodne i

ładowe. W tabeli 18. przedstawiono porównanie ekotoksyczności 2,4-D, 2,4-DCP i 4-CP. Z wyników tych wynika, że 2,4-DCP i 4-CP wykazują wyższą ekotoksyczność niż ich związek macierzysty, a 2,4-DCP wykazuje wyższą ekotoksyczność od 4-CP. Różnice te tłumaczy struktura cząsteczek związków – 2,4-DCP podobnie jak 4-CP w porównaniu z herbicydem 2,4-D, ma krótszą długość bocznego łańcucha fenoksyłowego oraz małą objętość i zawadę przestrzenną (rycina 7.), co sprawia, że 2,4-DCP łatwo przenika przez błony komórkowe, co ma wpływ na jego większą toksyczność. Dodatkowo 2,4-DCP oraz 4-CP wykazują znacznie wyższą rozpuszczalność w wodzie niż 2,4-D, a zatem i wyższą biodostępność. Obecność 2,4-D oraz jego metabolitów powinna być kontrolowana w wodach powierzchniowych ze względu na swój szkodliwy i toksyczny wpływ na ekosystemy wodne. Warto nadmienić że stacje uzdatniania wody bardzo często pozyskują wodę właśnie z wód powierzchniowych.

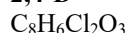
2,4-D jest substancją często wykrywaną w wodzie, glebie i powietrzu. Badania wykazały, że 2,4-D był najczęściej wykrywanym herbicydem w podziemskich wodach powierzchniowych w Stanach Zjednoczonych w latach 1999–2010, z najwyższym stężeniem wynoszącym 0,46 µg/l (Wijnja i in., 2014). 2,4-DCP jest równie często wykrywany w środowisku jak 2,4-D – wykryto go w ponad połowie próbek wód powierzchniowych w Chinach, a najwyższe jego stężenie wynosiło 19,960 µg/l (Gao i in., 2008).

Tabela 18. Porównanie ekotoksyczności 2,4-D, 2,4-DCP i 4-CP, wykonana na podstawie kart charakterystyki czystych związków (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Związek	Ryby słodkowodne	Rozwielitka	Głony słodkowodne	Microtox
2,4-D	LC ₅₀ : 6,3 - 11,0 mg/l, 96h, (<i>Poecilia reticulata</i>)	EC ₅₀ : 17,6 - 32,6 mg/l, 48h, (<i>Daphnia magna</i>)	EC ₅₀ : 23,7 - 24,7 mg/l, 96h, (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	EC ₅₀ = 5,74 mg/l 15 min
	LC ₅₀ : = 70,7 mg/l, 96h (<i>Poecilia reticulata</i>)			
	LC ₅₀ : = 165 mg/l, 96h, (<i>Pimephales promelas</i>)			
	LC ₅₀ : 103 - 171 mg/l, 96h, (<i>Pimephales promelas</i>)			
	LC ₅₀ : 2450 - 3160 mg/l, 96h, (<i>Oryzias latipes</i>)			
	LC ₅₀ : 77 - 157 mg/l, 96h, (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)			
	LC ₅₀ : = 180 mg/l, 96h, (<i>Lepomis macrochirus</i>)			
	LC ₅₀ : 127,9 - 141,7 mg/l, 96h, (<i>Cyprinus carpio</i>)			
	LC ₅₀ : = 20 mg/l, 96h (<i>Cyprinus carpio</i>)			

2,4-DCP	LC ₅₀ : = 5,5 mg/l, 96h (<i>Poecilia reticulata</i>)	EC ₅₀ : 1,2 - 1,7 mg/l, 48h (<i>Daphnia magna</i>)	EC ₅₀ : = 14 mg/l, 96h (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	EC ₅₀ = 1,10 mg/l 5 min
	LC ₅₀ : = 3,9 mg/l, 96h, (<i>Brachydanio rerio</i>)			EC ₅₀ = 1,18 mg/l 15 min
	LC ₅₀ : = 2,6 mg/l, 96h, (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)			EC ₅₀ = 1,24 mg/l 30 min
	LC ₅₀ : 2,182 - 3,108 mg/l, 96h, (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)			EC ₅₀ = 15 mg/l 60 h
	LC ₅₀ : 4,5 - 8,3 mg/l, 96h , (<i>Oryzias latipes</i>)			
	LC ₅₀ : 1,6 - 2,6 mg/l, 96h (<i>Lepomis macrochirus</i>)			
	LC ₅₀ : 7,4 - 8,8 mg/l, 96h, (<i>Pimephales promelas</i>)			
4-CP	LC ₅₀ : 5,43 - 6,87 mg/l, 96h, (<i>Pimephales promelas</i>)	EC ₅₀ : 2,3 - 2,7 mg/l, 48h, (<i>Daphnia magna</i>)	EC ₅₀ : = 8 mg/l, 96h (<i>Desmodesmus subspicatus</i>)	EC ₅₀ = 0,96 mg/l 5 min
	LC ₅₀ : = 1,91 mg/l, 96h, (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)		EC ₅₀ : = 38 mg/l, 96h (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	
	LC ₅₀ : 3,4 - 4,3 mg/l, 96h, (<i>Pimephales promelas</i>)		EC ₅₀ : = 8,3 mg/l, 72h (<i>Desmodesmus subspicatus</i>)	EC ₅₀ = 1,07 mg/l 30 min
	LC ₅₀ : 3,1 - 4,8 mg/l, 96h, (<i>Lepomis macrochirus</i>)		EC ₅₀ : 2,29 - 41,7 mg/l, 96h (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	
	LC ₅₀ : = 5,6 mg/l, 96h (<i>Brachydanio rerio</i>)		EC ₅₀ : 3,34 - 18,7 mg/l, 72h (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	EC ₅₀ = 8,3 mg/l 1 h
	LC ₅₀ : 3,7 - 6,6 mg/l, 96h, (<i>Oryzias latipes</i>)			
	LC ₅₀ : = 9 mg/l, 96h, (<i>Poecilia reticulata</i>)			

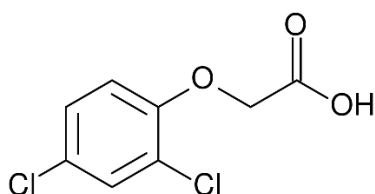
2,4-D



masa molowa: 221,04 g/mol

rozpuszczalność w wodzie:

310 mg/l w 25 °C



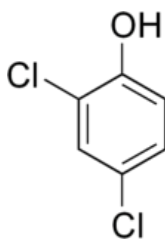
2,4-DCP



masa molowa: 163,00 g/mol

rozpuszczalność w wodzie:

4500 mg/l w 20 °C



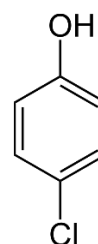
4-CP



masa molowa: 128,56 g/mol

rozpuszczalność w wodzie:

27000 mg/l w 20 °C



Rycina 7. Struktura i podstawowe właściwości chemiczne 2,4-D i jego metabolitów – 2,4-DCP i 4-CP (na podstawie bazy danych PubChem).

Chlorofenole wykorzystywane są do produkcji chemikaliów rolniczych, farmaceutyków, biocydów i barwników. Po uwolnieniu do środowiska los i transport chlorofenoli zależy od pH środowiska. W warunkach kwaśnych związki te mają tendencję do ulatniania się i adsorbowania na powierzchni gleby, natomiast w warunkach obojętnych do zasadowych następuje zmniejszenie ulatniania się z wody i gleb wilgotnych oraz wzrost mobilności w glebach. Chlorofenole, zwłaszcza te posiadające więcej atomów chloru i określone pozycje chloru, są odporne na biodegradację i dzięki temu są trwałe w środowisku (niektóre mogą pozostawać w glebie przez kilka lat).

Unia Europejska (UE) sklasyfikowała 132 substancje niebezpieczne (w oparciu o ich toksyczność, stabilność i bioakumulację), które należy monitorować w wodach (EEA, 2007). Do tych substancji zaliczają się chlorofenole oraz substancje, które można przekształcić w związki chloroorganiczne i w tym chlorofenole (tabela 19.).

Tabela 19. Priorytetowe zanieczyszczenia określone przez UE i USA-EPA będące chlorofenolami oraz fenol.

UE	US-EPA
2-amino-4-chlorofenol	fenol
2-chlorofenol	2-chlorofenol
3-chlorofenol	2,4-dichlorofenol
4-chlorofenol	4-chloro-3-metylofenol
4-chlorofenol-3-metylofenol	2,4,6-trichlorofenol
2,3,4-trichlorofenol	pentachlorofenol
2,4,5-trichlorofenol	
2,4,6-trichlorofenol	
3,4,5-trichlorofenol	
3,5,6-trichlorofenol	
pentachlorofenol	

Jednoznaczne określenie szkodliwego wpływu 2,4-D na organizmy inne niż docelowe, na bazie przeglądu literatury jest trudne i może być bardzo mylące. Obok publikacji wskazujących na wysoką toksyczność i szkodliwość 2,4-D, można znaleźć również prace sugerujące nieszkodliwe skutki stosowania 2,4-D przy niskich stężeniach. Należy w tym miejscu podkreślić, że 2,4-D jest szeroko rozpowszechnionym i stosowanym w handlu herbicydem, przynoszącym znaczne zyski finansowe. Firmy uczestniczące w zyskach z

produkcji 2,4-D i jego użytkowania prowadzą szeroko zakrojoną kampanię na rzecz jego stosowania, dlatego też nie należy ignorować jego znaczenia przemysłowego i gospodarczego.

Liczne badania wykazały, że 2,4-D stanowi zagrożenie dla środowiska (Benli i in., 2007; Celik i Tuluce, 2007; Aronzon i in., 2011; Bondada, 2011; Li i in., 2017). Toksyczność wyrażona jako LD₅₀ dla 2,4-D (oraz 2,4,5-T jest podobna) jest rzędu 500-1000 mg/kg m.c., efekty letalne mogą wystąpić już po przekroczeniu dawek 100-300 mg/kg m.c. 2,4-D podany zwierzętom w toksycznych dawkach powoduje zmniejszenie ruchliwości, zwiększając kurczliwość mięśni, powodując ich bezwład, powoduje brak apetytu i apatię. Zgon występuje w efekcie migotania komór lub śpiączki. 2,4-D wykazuje działanie embriotoksyczne, fetotoksyczne, teratogenne (efekt teratogeny notowano u zwierząt przy dawce powyżej 10 mg/kg m.c./dobę) oraz kancerogenne (Piotrkowski, 2006). Uważa się, że u ludzi dawka 3-4 g 2,4-D powoduje objawy toksyczności ostrej, odnotowano że dawka 6,5 g stanowiła zatrucie ostre, samobójcze (Piotrowski, 2006).

2,4-DCP charakteryzuje się wysoką toksycznością i trwałością w środowisku (Aoyama in., 2005; Sawle i in., 2010; Bors i in., 2011), jest klasyfikowany jako substancja rakotwórcza, którą należy traktować jako priorytetową substancję zanieczyszczającą środowisko (EEA, 2007; Xu i in., 2016; Jiang i in., 2017). 2,4-DCP akumuluje w organizmach wodnych (Gao i in., 2008; Limam i in., 2010; Foszpańczyk i in., 2018), ponadto jest substancją zaburzającą funkcjonowanie układu hormonalnego (tzw. EDC – ang. *endocrine-disrupting chemical*), wpływa na syntezę hormonów płciowych i poziom ekspresji mRNA u ryb (Zhang i in., 2008; Ma i in., 2012; Yuan i in. 2020; Zhang i in., 2020a; Hu i in., 2021). Badania metabolomiczne u rybaka zwyczajnego wykazały redukcję kilku niezbędnych aminokwasów po ekspozycji na 2,4-DCP (Kokushi i in., 2017). W przypadku badań na modelach linii komórkowych *in vitro* (hepatocyty ryb) zaobserwowano indukcję apoptozy po ekspozycji na 2,4-DCP (Li i in., 2013).

Według raportu dotyczącego toksyczności chlorofenoli (Toxicological Profile for Chlorophenols, 2022), potwierdzono toksyczny wpływ chlorofenoli na wątrobę u zwierząt laboratoryjnych. Po doustnym narażeniu szczurów i myszy na 2,4-DCP i 4-CP obserwowano następujące zmiany w wątrobie: zmiany w chemii klinicznej, zwiększenie masy wątroby, hipertrofie hepatocytów i martwice. U zwierząt narażonych na działanie chlorofenoli drogą doustną zgłaszano zmniejszenie liczby implantacji zarodków, liczebności miotu i/lub liczby żywych urodzeń w miocie po krótkotrwałej ekspozycji na 2,4-DCP (46 mg/kg/dzień) i 4-CP (200 mg/kg/dzień). Ostra ekspozycja na 2,4-DCP u myszy wywołała niekorzystne skutki dla męskiego układu rozrodczego (w tym wzrost odsetka nieprawidłowych plemników i

zmniejszoną ruchliwość plemników), co ma znaczący wpływ na reprodukcję organizmów. Ponadto, 2,4-DCP jest jedynym chlorofenolem, który wykazuje wpływ na funkcje układu immunologicznego, obserwowane u szczurów już przy dawce doustnej 4,6 mg/kg/dzień (Toxicological Profile for Chlorophenols, 2022).

Metabolizm pestycydu niekoniecznie prowadzi do detoksykacji. Niejednokrotnie metabolit wykazuje wyższą toksyczność niż związek macierzysty. Macierzyste pestycydy i ich metabolity współistnieją w tym samym środowisku. Połączone toksyczności mieszanin macierzystego pestycydu i jego metabolitów mogą oddziaływać addytywnie, synergicznie lub antagonistycznie (Velisek i in., 2017), stąd przy opracowywaniu wytycznych dotyczących jakości wody należy brać pod uwagę wspólne działanie pestycydów i ich metabolitów, które jest niezwykle trudne do określenia.

4.9. Analiza jakości wody

Zgodnie z polskim prawem (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi; Dz.U. 2017 poz. 2294) w wodzie przeznaczonej do spożycia stężenia pestycydów nie mogą przekraczać 0,1 µg/l, a suma pestycydów 0,5 µg/l. Termin „pestycydy” obejmuje organiczne: insektycydy, herbicydy, fungicydy, nematocydy, akarycydy, algicydy, rodentocydy, slimicydy, a także produkty pochodne (m.in. regulatory wzrostu) oraz ich pochodne metabolity, a także produkty ich rozkładu i reakcji. Należy oznaczać jedynie te pestycydy, których występowania w wodzie można oczekiwać w danej strefie zaopatrzenia w wodę. Wartość wskazanych stężeń stosuje się do każdego poszczególnego pestycydu. W przypadku aldryny, dieldryny, heptachloru i epoksydu heptachloru wartość parametryczna wynosi 0,030 µg/l. Suma pestycydów oznacza sumę poszczególnych pestycydów wykrytych i oznaczonych ilościowo w ramach monitoringu.

Według MPWiK Warszawa – spółki odpowiadającej za pobór, uzdatnianie i dostarczenie wody do sieci wodociągowej w Warszawie, w okresie od 2018-2023 roku ilościowe oznaczenia pestycydów w wodzie wykonywane były kwartalnie. W przypadku spółki Eco-Babice, odpowiadającej za pobór, uzdatnienie i doprowadzenie wody do sieci wodociągowej do gminy Stare Babice (powiat warszawski zachodni, otoczony gruntami rolnymi, o liczbie mieszkańców 22 tys.), ilościowe oznaczenia pestycydów w wodzie wykonywane były co pół roku. Lista oznaczanych przez obie spółki pestycydów znajduje się w tabeli 20. Listę pestycydów jakie spółka ma obowiązek oznaczyć w wodzie narzuca lokalna stacja sanitarno-epidemiologiczna (sanepid).

Tabela 20. Pestycydy podlegające identyfikacji w wodzie przeznaczonej do spożycia przed wprowadzeniem jej do sieci wodociągowej. Dane pochodzą z dwóch spółek dostarczających wodę do sieci: MPWiK S.A. w Warszawie oraz Eko-Babice Sp. Z o.o. w Starych Babicach. * gwiazdką oznaczono pestycydy oznaczane jedynie przez Eko-Babice.

Nazwa pestycydów	Dopuszczalne stężenie (µg/l)	Stan użytku w UE/USA	Od kiedy niedopuszczony do użytku
<i>alfa a</i> -HCH	0,10	niedopuszczony	1979 UE, 1978 USA
<i>beta b</i> -HCH	0,10	niedopuszczony	
<i>delta d</i> -HCH	0,10	niedopuszczony	
<i>gamma g</i> -HCH (Lindan)	0,10	niedopuszczony	
<i>o,p'</i> -DDE	0,10	niedopuszczony	1986 UE, 1972 USA
<i>p,p'</i> -DDE	0,10	niedopuszczony	
<i>o,p'</i> -DDD	0,10	niedopuszczony	
<i>p,p'</i> -DDD	0,10	niedopuszczony	
<i>o,p'</i> -DDT	0,10	niedopuszczony	
<i>p,p'</i> -DDT	0,10	niedopuszczony	
Stężenie pestycydów DDD	0,10	niedopuszczony	
Stężenie pestycydów DDE	0,10	niedopuszczony	
Stężenie pestycydów DDT	0,10	niedopuszczony	
Suma pestycydów: DDE, DDD, DDT, HCH,	0,50		
HCB	0,10	niedopuszczony	1981 UE, 1966 USA
Aldryna	0,030	niedopuszczony	1991 UE, 1987 USA
Diendryna	0,030	niedopuszczony	1981 UE, 1987 USA
Endryna	0,10	niedopuszczony	1991 UE, 1984 USA
Izodryna	0,10	niedopuszczony	1990 w UE
Heptachlor	0,030	niedopuszczony	1985 UE, 1988 USA
Epoksyd heptachloru	0,030	niedopuszczony	pochodna heptachloru
<i>Cis</i> - chlordan	0,10	niedopuszczony	1981 UE, 1988 USA
<i>Trans</i> - chlordan	0,10	niedopuszczony	
α - Endosulfan	0,10	niedopuszczony	2005 UE, 2016 USA
β - Endosulfan	0,10	niedopuszczony	
alachlor*	0,10	niedopuszczony	2006 UE,
HCBD*	0,10	w użyciu	
DMDT*	0,10	niedopuszczony	2002 UE, 2003 USA

Oznaczenie skrótów:

HCB- Hexachlorobenzene

HCH- heksachlorocykloheksan

DDT- Dichlorodifenylotrichloroetan

DDE- Dichlorodifenylochloroetylen

DDD- dichlorodifenyldichloroetan

HCBD- heksachlorobutadien

DMDT- metoksychlor

ŚOR oznaczane przez obie spółki, odpowiedzialne za dostarczanie odbiorcom, czystej i nadającej się do spożycia wody, to związki od dawna nieużywane w rolnictwie, a ich stosowanie jest zakazane. Bezsprzecznie były to wyjątkowo toksyczne środki, o negatywnym wpływie na całe ekosystemy, a po latach ich stosowania wycofane. Pestycydy te charakteryzowały się ponadto niską biodostępnością oraz wysokim stopniem akumulacji w środowisku, co skutkuje, pomimo wycofania z obrotu ponad trzydzieści lat temu, ich ciągłym uwalnianiem do wód gruntowych i powierzchniowych.

Zastanawia jednak fakt, dlaczego obecnie stosowane na masową skalę ŚOR, pomimo informacji płynących z wielu niezależnych źródeł o ich toksyczności, nie są w żaden sposób monitorowane pod kątem ich obecności w wodzie przeznaczonej do spożycia?

Jest to ogromne niedopatrzenie ze strony sanepidu, zważywszy że w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2017 r. znajduje się zdanie: „Należy oznaczać jedynie te pestycydy, których występowania w wodzie można oczekiwać w danej strefie zaopatrzenia w wodę”.

Dostarczanie odbiorcom wody, uznanej z zbadaną i zdatną do spożycia, w tym wypadku jest nadużyciem. W celu poprawy tej sytuacji i dostarczania nieświadomym odbiorcom bezpiecznej wody, należałoby dokładnie przeanalizować, które pestycydy są w danym roku dopuszczone do użytku przez rolników oraz jakie są ich główne produkty transformacji (metabolity) i te związki włączyć do obowiązkowych oznaczeń wykonywanych przez lokalne stacje uzdatniania wody. Dodatkowo można zastanowić się czy częstotliwość wykonywania analiz, raz na pół roku czy raz na kwartał jest wystarczająca dla oceny bezpieczeństwa sanitarnego wody wprowadzanej do sieci wodociągowej. Warto wziąć pod uwagę iż przeciętny konsument spożywa 1,5 litra wody dziennie co daje 548 litrów wody rocznie – tyle wody, potencjalnie zanieczyszczonej ŚOR i ich metabolitami, jest filtrowanej przez ludzki organizm. Biorąc pod uwagę zdolność HZO do akumulacji w tkance tłuszczowej nawet niewielkie ich stężenia przy narażeniu chronicznym mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi, doprowadzając do nieodwracalnych zmian.

5. Podsumowanie

W metagenomach próbek środowiskowych zidentyfikowano geny kodujące enzymy uczestniczące w metabolicznej i kometabolicznej dehalogenacji. Zidentyfikowano 13 genów dehalogenaz - 11 kodujących dehalogenazy metaboliczne i 2 kometaboliczne, ze względną liczebnością odpowiednio 1867 i 1214 transkryptów na milion (tpm). Najliczniej występującym genem wśród dehalogenaz metabolicznych był gen kodujący dehalogenazę 2-halokwasową (611 tpm), a najliczniej występującym genem należącym do dehalogenaz kometabolicznych był gen kodujący 2,3-dioksygenazę katecholową (1092 tpm). Środowiskami, w których najliczniej występowały geny kodujące dehalogenazy, były grunty leśne. Wyniki te potwierdziły potencjał genetyczny drobnoustrojów wytypowanych środowisk do przeprowadzania procesu dehalogenacji. Dodatkowo zidentyfikowanie genów dehalogenaz w tak różnych środowiskach – zarówno poddanych antropopresji w znacznym stopniu, jak i z ograniczonym wpływem człowieka, wskazuje na rozprzestrzenienie się genów dehalogenaz w populacjach bakterii, również odległych od siebie filogenetycznie. Przewaga dehalogenaz specyficznych w stosunku do katalizowanej reakcji (dehalogenazy metaboliczne) nad dehalogenazami zaangażowanymi w procesy kometabolicznej dehalogenacji wskazuje na wyspecjalizowanie bakterii względem konkretnych przemian i dehalogenacji danej grupy halogenowanych związków organicznych (HZO). Sugeruje to obecność wielu HZO w środowisku od znacznie dłuższego czasu niż wprowadzone do użytku halogenowane pestycydy. Obserwowane rozprzestrzenienie w stosunkowo krótkim czasie genów dehalogenaz w populacjach bakterii wskazuje na podobieństwo halogenowanych pestycydów i innych ksenobiotycznych HZO do naturalnie występujących HZO oraz udział horyzontalnego transferu genów (HTG) w procesie migracji genów dehalogenaz. Warto podkreślić, że środowiskiem, w którym geny dehalogenaz zidentyfikowano najliczniej, były grunty leśne (środowisko zbliżone do naturalnego). Tego typu badania środowiskowe na chwilę przygotowania niniejszej rozprawy są jedynymi przeprowadzonymi w Polsce i stanowią ważny wkład w rozwój wiedzy z dyscypliny mikrobiologii i biotechnologii środowiska.

W ramach niniejszej pracy wyizolowano i wyselekcjonowano szczepy bakterii tworzące cztery konsorcja charakteryzujące się skutecznością w biotransformacji wybranych halogenowanych pestycydów oraz 4-chlorofenolu (4-CP), a także zdolnością do produkcji istotnych, z punktu widzenia dalszych przemian związków organicznych, enzymów – celulaz, lipaz i ureaz. Zidentyfikowano taksony szczepów wchodzących w skład konsorcjów bakteryjnych. W każdym konsorcjum zidentyfikowano licznie występujące geny

zaangażowane w procesy dehalogenacji, w tym dehalogenacji 2,4-D, jednego z najpowszechniej stosowanych obecnie herbicydów. W konsorcjum Rop zidentyfikowano 26 genów kodujących metaboliczne dehalogenazy oraz 7 genów kodujących kometaboliczne dehalogenazy, w konsorcjum Rozt odpowiednio 25 metabolicznych i 6 kometabolicznych, w konsorcjum Ocz 24 metaboliczne oraz 6 kometabolicznych, a w konsorcjum Rol 20 metabolicznych i 6 kometabolicznych dehalogenaz.

Na podstawie analiz wyników sekwencjonowania metagenomów konsorcjów bakteryjnych można jednoznacznie stwierdzić, że wyselekcjonowane taksony bakteryjne wchodzące w skład konsorcjów są genetycznie przystosowane do biotransformacji HZO, w tym 2,4-D. Pomimo, że pochodzą z różnych środowisk, w tym takich, na które wpływ człowieka jest nieznaczny (Rozt) oraz środowisk poddanych antropopresji w znacznym stopniu (Rol, Rop, Ocz) – wszystkie te mikroorganizmy wykształciły bądź nabyły drogą HTG, mechanizmy transformacji HZO, w tym 2,4-D.

Preferowanym szlakiem metabolizmu 2,4-D, przez bakterie wchodzące w skład wszystkich czterech konsorcjów jest szlak, którego pierwszym metabolitem jest 2,4-DCP. Opracowane konsorcja bakteryjne są również w stanie metabolizować 2,4-D w rzadziej spotykanym szlaku metabolicznym, w którym jednym z pierwszych metabolitów jest 4-CP, co zostało potwierdzone na drodze symulacji transformacji 4-CP przez konsorcja Rozt i Rol.

Najwyższą efektywność biotransformacji 2,4-D stwierdzono stosując konsorcjum Rozt – poziom transformacji 2,4-D już po 4 dniach wynosił 99%, a po czasie 10 dni 100%. Wraz z ubytkiem zawartości 2,4-D obserwowano wzrost zawartości 2,4-DCP, pierwszego metabolitu szlaku biotransformacji 2,4-D, którego biotransformacja wymagała znacznie więcej czasu niż związku macierzystego (do kilku miesięcy).

W przypadku transformacji 4-CP maksymalny ubytek tego związku w symulacjach z zastosowaniem konsorcjum Rol wynosił 82%, a stosując konsorcjum Rozt 60%. Warto jednak zauważyć, że proces biotransformacji 4-CP wymagał znacznie więcej czasu – przedstawione wyniki efektywności usuwania tego związku ze środowiska uzyskano po 8 miesiącach badań.

Zarówno 4-CP jak i 2,4-DCP występują w glebach leśnych, a ich pochodzenie określa się jako naturalne. Obydwa chlorofenole wymagają jednak długiego czasu do ich całkowitego usunięcia ze środowiska. Są także związkami o wysokiej toksyczności, znacznie wyższej niż 2,4-D (będący ksenobiotykiem). Wydaje się zatem, że pochodzenie związku (naturalne czy antropogeniczne) nie ma wpływu na zdolność mikroorganizmów do jego biotransformacji i na efektywność tego procesu.

Uzyskane wyniki badań bezsprzecznie potwierdziły obecność genów dehalogenaz u bakterii pochodzących z różnych środowisk, w tym genów uczestniczących w szlaku metabolizmu 2,4-D. Obecność genów transformacji 2,4-D u wszystkich czterech konsorcjów wskazuje na podobieństwo tego ksenobiotyku do naturalnie występujących w przyrodzie chlorofenoli, stąd tak powszechna obecność genów jego metabolizmu. Stanowi to istotny wkład w rozwój wiedzy z obszaru mikrobiologii środowiskowej.

W efekcie prowadzonych prac badawczych powstały 4 prototypy biopreparatów, opartych o szczepy bakteryjne genetycznie i fizjologicznie predysponowane do przeprowadzania procesów dehalogenacji. Jedno z konsorcjów dodatkowo jest również przystosowane do biodegradacji produktów ropopochodnych, zatem może być wykorzystane w warunkach współistnienia zanieczyszczeń produktami ropopochodnymi.

Rezultaty badań umożliwią prowadzenie skuteczniejszej bioremediacji środowisk zanieczyszczonych HZO, w tym chlorowanymi pestycydami i ich metabolitami. Wykorzystanie biopreparatów na bazie skonstruowanych konsorcjów może pomóc w rozprzestrzenieniu genów szlaku metabolizmu 2,4-D, które zlokalizowane są na plazmidach, a tym samym pomóc w skutecznym usuwaniu zanieczyszczeń na drodze genetycznej bioaugmentacji, co wpłynąć może na rozwój mikrobiologii i biotechnologii środowiskowej, w tym na bioremediację HZO.

Uzyskane wyniki wskazują również na konieczność badania przebiegu biotransformacji pestycydów i powstających metabolitów pośrednich pod kątem toksyczności oraz ich potencjalnej synergii. Ma to istotne znaczenie szczególnie w doborze odpowiednich parametrów przy ocenie jakości wód dostarczanych do sieci wodociągowych.

W ramach dalszych prac planowane jest badanie efektywności biotransformacji innych halogenowanych pestycydów przez opracowane konsorcja bakteryjne, sprawdzenie wpływu kofaktorów (jak metale cynku, żelaza lub miedzi) na efektywność biotransformacji wybranych HZO, określenie wpływu bioaugmentacji genetycznej na procesy rozprzestrzeniania się genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy dehalogenacji wśród autochtonicznych mikroorganizmów oraz ocena wpływu bioaugmentacji genetycznej na efektywność procesu biotransformacji HZO. Informacje te pozwolą na dopracowanie skonstruowanych prototypów biopreparatów w oparciu o utworzone konsorcja i dodatek odpowiednich substancji chemicznych, zwiększających efektywność biotransformacji. W kolejnym etapie badań planowane jest przeskalowanie prac nad biotransformacją HZO do skali ćwierć technicznej i w końcu wdrożenie.

6. Wnioski

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki badań umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. we wszystkich analizowanych metagenomach pochodzących zarówno ze środowisk zbliżonych do naturalnych oraz antropogenicznie przekształconych potwierdzono obecność genów, których produkty odpowiadają za biologiczne procesy dehalogenacji HZO. Wskazuje to na powszechne występowanie HZO w środowisku oraz ewolucyjną adaptację bakterii do biotransformacji tych związków i powszechne występowanie genów kodujących enzymy zaangażowane w szlaki ich transformacji.
2. Potwierdzono obecność niemal wszystkich genów, których produkty są zaangażowane w szlaki metabolizmu 2,4-D w metagenomach konsorcjów bakteryjnych wyizolowanych z badanych środowisk (Rozt, Rol, Ocz), ale również u bakterii wyizolowanych z środowiska silnie zanieczyszczonego produktami ropopochodnymi (Rop). Wskazuje to na podobieństwo 2,4-D do innych związków obecnych w środowisku od dawna oraz na podobieństwo 2,4-D do chlorofenoli pochodzenia naturalnego. Dodatkowo umiejscowienie tych genów na plazmidach, potwierdza ich rozprzestrzenienie w środowisku.
3. Czas pełnej biotransformacji 2,4-D w środowisku wodnym jest stosunkowo krótki, zajmuje od 4-15 dni, w zależności od użytego konsorcjum. Jednak wraz z ubytkiem 2,4-D, obserwowany jest wzrost zawartości głównego metabolitu 2,4-DCP, o znacznie wyższej toksyczności od substancji macierzystej. Potwierdza to również, że częściej spotykany w środowisku szlak metabolizmu 2,4-D, którego pierwszym metabolitem jest 2,4-DCP, był szlakiem prezentowanym i preferowanym przez wszystkie cztery konsorcja.
4. Konsorcja Rozt i Rol, są w stanie transformować 4-CP, a zatem drugi metabolit rzadziej występującego w środowisku szlaku metabolizmu 2,4-D. Sugeruje to zdolność do biotransformacji 2,4-D przez bakterie na drodze obu szlaków metabolicznych, preferowany jest jednak szlak opierający się na 2,4-DCP.
5. Zwiększenie efektywności biotransformacji 4-CP można osiągnąć dodając dodatkowe źródło węgla (np. etanol w niskim stężeniu), oraz przenośniki elektronów (np.

metylkobalaminę). Dodatek tych substancji spowodował również wzrost efektywności transformacji 4-CP w warunkach abiotycznych.

6. Na podstawie badań opisanych w niniejszej pracy opracowano cztery konsorcja bakteryjne zdolne do biotransformacji 2,4-D, oraz innych HZO, z których najwyższą efektywnością odznaczały się Rozt i Rol. Wykazano, że bakterie wchodzące w skład konsorcjów potrafią wytwarzać celulazy, lipazy i ureazy – enzymy stanowiące istotne ogniwo w szlakach metabolicznych środowisk gruntowo-wodnych, a zwłaszcza mające duże znaczenie dla gruntów i ich ekosystemów. Produkty metabolizmu tych enzymów mogą stanowić łatwo przyswajalne źródło węgla oraz azotu dla innych mikroorganizmów glebowych oraz roślin, stymulując tym samym wzrost biomasy roślin i pożytecznej mikroflory glebowej. Na bazie wyselekcjonowanych konsorcjów można stworzyć gotowe biopreparaty przydatne w usuwaniu chlorowanych pestycydów.
7. Metabolity pośrednie powstające w procesie biotransformacji 2,4-D (2,4-DCP) pozostają w środowisku wodnym po całkowitym usunięciu z niego tego pestycydu i wykazują silnie toksyczny wpływ w stosunku do organizmów wodnych i roślin wyższych.
8. Analiza wyników oznaczeń pestycydów w wodach wprowadzanych do sieci wodociągowej jest zdecydowanie niewystarczająca. Woda wprowadzana do sieci wodociągowej nie jest analizowana pod kątem pestycydów aktualnie stosowanych przez rolników i służby miejskie, co może skutkować wprowadzeniem do sieci wody zanieczyszczonej tymi pestycydami oraz ich metabolitami, których zawartość również nie jest monitorowana, a które mogą mieć toksyczny wpływ na życie i zdrowie ludzi.

W ramach przeprowadzonych badań opisanych w niniejszej pracy potwierdzono hipotezy badawcze:

- Mikroorganizmy środowisk poddanych antropopresji i środowisk zbliżonych do naturalnych posiadają geny kodujące enzymy odpowiedzialne za dehalogenację związków organicznych.

- Proces biotransformacji herbicydu 2,4-D przebiega z wytworzeniem metabolitów pośrednich, które mogą pozostawać w środowisku po jego pełnej biotransformacji.

Finansowanie badań:

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy zostały zrealizowane w ramach następujących projektów:

- Preludium NCN nr 2019/33/N/NZ9/01404, „Badanie potencjału zespołu mikroorganizmów do przeprowadzania dehalogenacji naturalnych i antropogenicznych halogenowanych związków organicznych”,
- stypendium MPWiK Sp. Z o.o. w Warszawie.

Spis literatury:

- Adrian, L. i Löffler, F.E. (2016). *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 52-55.
- Adrian, N.R., Sulfit, J.M. (1994). Anaerobic biodegradation of halogenated and nonhalogenated N-, S-, and O- heterocyclic compounds in aquifer slurries. *Environ Toxicol Chem*, 13, 1551-1557.
- Agarwal, S.E., Ogunleye, O.O. (2012). Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 3.
- Agarwal, V., Miles, Z. D., Winter, J. M., Eustaquio, A. S., El Gamal, A. A., Moore, B. S. (2017). Enzymatic Halogenation and Dehalogenation Reactions: Pervasive and Mechanistically Diverse. *Chem. Rev.* 117, 5619–5674.
- Alvarez, M., López, T., Odriozola, J. A., Centeno, M. A., Domínguez, M. I., Montes, M., ... & González, R. D. (2007). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) photodegradation using an Mn⁺/ZrO₂ photocatalyst: XPS, UV–vis, XRD characterization. *Applied Catalysis B: Environmental*, 73(1-2), 34-41.
- Aoyama, H., Hojo, H., Takahashi, K. L., Shimizu, N., Araki, M., Harigae, M., Tanaka, N., Shirasaka, N., Kuwahara, M., Nakashima, N., Yamamoto, E., Saka, M., Teramoto, S. (2005). A two-generation reproductive toxicity study of 2,4-dichlorophenol in rats. *J. Toxicol. Sci.* 30, 59–78. 10.2131/jts.30.s59.
- Arias-Estevéz, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.C. and García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 123, 247.
- Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., Pérez-Coll, C. S. (2011). Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American Toad, *Rhinella arenarum*. *Environ. Toxicol.* 26, 373–381. 10.1002/tox.20564.
- Arp, D.J., Yeager, C.M., Hyman, M.R. (2001). Molecular and Cellular Fundamentals of Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene. *Biodegradation* 12(2): 81–103.
- Atashgahi, S., Haggblom, M.M., Smidt, H. (2018). Organohalide respiration in pristine environments: implications for the natural halogen cycle. *Environmental microbiology*. 20 (3), 934-948
- Atashgahi, S., Lu, Y., Ramiro-Garcia, J., Peng, P., Maphosa, F., Sipkema, D., Dejonghe, W., Smidt, H., Springael, D. (2017). Geochemical parameters and reductive dechlorination determine aerobic cometabolic vs aerobic metabolic vinyl chloride biodegradation at oxic/anoxic interface of hyporheic zones. *Environmental Science Technology*, 51 (3), 1626-1634.
- Baran, N., Surdyk, N., Auterives, C. (2021). Pesticides in groundwater at a national scale (France): Impact of regulations, molecular properties, uses, hydrogeology and climatic conditions. *Science of The Total Environment*, 791, 148137.
- Bartels, I., Knackmuss, H.J., Reineke, W. (1984) Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas Putida* Mt-2 by 3-Halocatechols Downloaded From. *Appl Environ Microbiol* 47(3):500-505.
- Beadle, C.A., and Smith, A.R.W. (1982) The Purification and Properties of 2,4-Dichlorophenol Hydroxylase from a Strain of *Acinetobacter* Species. *Eur J Biochem* 123(2):323–32.
- Bedard, D. L. A. (2008). Case Study for Microbial Biodegradation: Anaerobic Bacterial Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls From Sediment to Defined Medium. *Annu. Rev. Microbiol.* 62 (1), 253–270.
- Benli, A. C. K., Sarıkaya, R., Sepici-Dincel, A., Selvi, M., Sahin, D., Erkoc, F. (2007). Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 296–299. 10.1016/j.pestbp.2007.01.004.
- Bi, L., Fu, G., Cai, D., Shen, J., Zhang, J., Kang, J., ... and Chen, Z. (2023). Electron rich P doped g-C₃N₄ for photodegradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid under visible light by improving

- oxygen adsorption: Performance and catalytic mechanism. *Separation and Purification Technology*, 306, 122562.
- Błaszczuk, M., *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 2007.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30:214-2120.
- Bombach, P., Richnow, H.H., Kastner, M., Fischer, A., (2010). Current approaches for the assessment of in situ biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 839–852.
- Bondada, B. R. (2011). Micromorpho-anatomical examination of 2,4-D phytotoxicity in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Leaves. *J. Plant Growth Regul.* 30, 185–198. 10.1007/s00344-010-9183-7.
- Bors, M., Bukowska, B., Pilarski, R., Gulewicz, K., Oszmiański, J., Michałowicz, J., Koter-Michalak, M. (2011). Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2202–2211. 10.1016/j.fct.2011.06.013. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
- Botti, A., Biagi, E., Musmeci, E., Breglia, A., Degli Esposti, M., Fava, F., Zanaroli, G. (2023). Effect of polyhydroxyalkanoates on the microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls and competing anaerobic respirations in a marine microbial culture. *Marine Pollution Bulletin*, 186, 114458.
- BRENDA, <https://www.brenda-enzymes.org/>
- Brillas, E., Calpe, J. C., Casado, J. (2000). Mineralization of 2, 4-D by advanced electrochemical oxidation processes. *Water Research*, 34(8), 2253-2262.
- Brogan, 3rd W.R., and Relyea, R.A. (2017). Multiple mitigation mechanisms: Effects of submerged plants on the toxicity of nine insecticides to aquatic animals. *Environ. Pollut.* 220 (A), 688.
- Cai, M., and Xun, L. (2002) Organization and Regulation of Pentachlorophenol-Degrading Genes in *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723. *Journal of Bacteriology* 184(17), 4672–4680.
- Carboneras, B., Villasenor, J., Fernandez-Morales, F.J. (2017). Modelling aerobic biodegradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid by mixed-cultures. *Bioresour Technol* 243:1044–1050.
- Cavalca, L., Hartmann, A., Rouard, N., Soular, G. (1999). Diversity of tfdc genes, distribution and polymorphism among 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29, 45-58.
- Celik, I., Tuluçe, Y. (2007). Determination of toxicity of subacute treatment of some plant growth regulators on rats. *Environ. Toxicol.* 22, 613–619. 10.1002/tox.20284.
- Chandra, R., Kumar, V. (2015) Biotransformation and biodegradation of organophosphates and organohalides. In Chandra R (ed.) *Environmental waste management*. CRC Press.
- Chen, H., Zhang, Z., Feng, M., Liu, W., Wang, W., Yang, Q., & Hu, Y. (2017). Degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in water by persulfate activated with FeS (mackinawite). *Chemical Engineering Journal*, 313, 498-507.
- Chinalia, F. A., and Killham, K. S. (2006). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) biodegradation in river sediments of Northeast-Scotland and its effect on the microbial communities (PLFA and DGGE). *Chemosphere*, 64(10), 1675-1683.
- Cole, J.R., Cascarelli, A.L., Mohn, W.W., Tiedje, J.M. (1994). Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 60, 3536-3542.
- Coulter, C., Hamilton, J.T.G., McRoberts, W.C., Kulakov, L., Larkin, M.J., Harper, D.B. (1999). Halomethane:bisulfide/ halide ion methyltransferase, an unusual corrinoid enzyme of environmental significance isolated from an aerobic methylotroph using chloromethane as the sole carbon source. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 4301–4312.
- Council of the European Communities, 1975. Council Directive 75/440/EEC of 16 June 1975 concerning the quality required of surface water intended for the extraction of drinking water. *Off. J. Eur. Communities* 1975, L 194, 26–31.
- Council of the European Communities, 1980. Council Directive 80/778/EEC of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption. *Off. J. Eur. Communities* 1980, L 229, 11–29.

- Cox, E. M., and Arai, Y. (2014). Environmental chemistry and toxicology of iodine. *Advances in Agronomy*, 128, 47-96.
- Cycoń, M., Żmijowska, A., Piotrowska-Seget, Z. (2011). Biodegradation kinetics of 2,4-D by bacterial strains isolated from soil. *Cent Eur J Biol* 6(2):188–198.
- Dargahi, A., Ansari, A., Nematollahi, D., Asgari, G., Shokoohi, R., and Samarghandi, M. R. (2019). Parameter optimization and degradation mechanism for electrocatalytic degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) herbicide by lead dioxide electrodes. *RSC advances*, 9(9), 5064-5075.
- de Souza, R.M., Seibert, D., Quesada, H.B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M.R., Bergamasco, R. (2020). Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: a review. *Process. Saf. Environ. Prot.*
- Dejonghe, W., Goris, J., El Fantroussi, S., Hofte, M., de Vos, P., Verstraete, W., Top, E.M. (2000). Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3297-3304.
- Deshusses, M.A., Chen W., Mulchandani A., Dunn, I.J. (1997). Innovative bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*. 8:165-168.
- Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006, on the protection of groundwater against pollution and deterioration.
- Ditzelmüller, G., Loidl, M., Streichsbier, F. (1989). Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. *Appl Microbiol Biotechnol* 31(1):93–96.
- Dolfing, J. (2016) Energetic considerations in organohalide respiration. In *Organohalide-respiring bacteria*. Adrian, L., and Löffler, F. E. (eds). Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 31-48.
- Don, R.H., Pemberton, J.M. (1985). Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pJP4. *J Bacteriol.* 161:466–8.
- Dunaway-Mariano, D., Babbitt, P.C. (1994). On the Origins and Functions of the Enzymes of the 4-Chlorobenzoate to 4-Hydroxybenzoate Converting Pathway. *Biodegradation* 5(3–4): 259–76.
- Dyrektywa Rady 75/440/EWG z dnia 16 czerwca 1975 r. dotycząca wymaganej jakości wód powierzchniowych przeznaczonych do pozyskiwania wody pitnej w Państwach Członkowskich.
- Dyrektywa Rady 80/778/EWG z dnia 15 lipca 1980 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.
- Dyrektywa Komisji 93/67/EWG z dnia 20 lipca 1993 r. ustanawiająca zasady oceny ryzyka dla człowieka i środowiska naturalnego ze strony substancji notyfikowanych zgodnie z dyrektywą Rady 67/548/EWG.
- Dyrektywa 2006/118/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 12 grudnia 2006 r. w sprawie ochrony wód podziemnych przed zanieczyszczeniem i pogorszeniem ich stanu.
- EEA- European Environment Agency. Progress in management of contaminated sites (CSI 015), 2007. enzymatic activity of two novel cellulose-degrading bacteria isolated from koala Faeces. *Environ.* <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/progress-in-the-management-of> (dostęp: 05.05.2023.)
- Europe's water in figures. An overview of the European drinking water and waste water sectors. 2021 edition: <https://www.eureau.org/resources/publications/eureau-publications/5824-europe-s-water-in-figures-2021/file> (dostęp: 10.05.2023.)
- Eurostat - https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agriculture_environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides#Analysis_at_EU_and_country_level (dostęp: 05.09.2019.)
- Evangelista, S., Cooper, D.G., Yargeau, V.: The effect of structure and a secondary carbon source on the microbial degradation of chlorophenoxy acids. *Chemosphere* 79, 1084–1088 (2010).
- FAOSTAT. 2020. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize> (dostęp: 01.05.2023.)
- Fava, F., Zanaroli, G., Young, L. Y. (2003). Microbial reductive dechlorination of pre-existing PCBs and spiked 2, 3, 4, 5, 6-pentachlorobiphenyl in anaerobic slurries of a contaminated sediment of Venice Lagoon (Italy). *FEMS microbiology ecology*, 44(3), 309-318.
- Fennel, D.E. i Gossett, J.M. (2003). Microcosms for site-specific evaluation of enhanced biological reductive dehalogenation. 15, 385-394. W: Haggblom M.M., Bossert I.D., Dehalogenation:

- Microbial Processes and Environmental Applications. 116-157. Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2003).
- Fetzner, S. (1998). Bacterial dehalogenation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 633-657.
- Fetzner, S., Lingens, F. (1994). Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev.*, 58(4), 641-685.
- Fincker, M., i Spormann, A. M. (2017). Biochemistry of catabolic reductive dehalogenation. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 357–386.
- Foszpańczyk, M., Drozdek, E., Gmurek, M., Ledakowicz, S. (2018). Toxicity of aqueous mixture of phenol and chlorophenols upon photosensitized oxidation initiated by sunlight or vis-lamp. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, pp. 34968-34975.
- Franke, S., Seidel, K., Adrian, L., Nijenhuis, I. (2020). Dual element (C/Cl) isotope analysis indicates distinct mechanisms of reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and dichloroethane in *Dehalococcoides mccartyi* strain BTF08 with defined reductive dehalogenase inventories. *Frontiers in Microbiology*, 11, 544918.
- Fuge, R. (2019). Fluorine in the environment, a review of its sources and geochemistry. *Applied Geochemistry*, 100, 393-406.
- Gadd, G.M. (2000). Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, *Current Opinion in Biotechnology* 11, 271-279.
- Gao, J., Liu, L., Liu, X., Zhou, H., Huang, S., Wang, Z. (2008). Levels and spatial distribution of chlorophenols - 2,4-Dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, and pentachlorophenol in surface water of China. *Chemosphere*. 71, 1181–1187. 10.1016/j.chemosphere.2007.10.018.
- Garbisu, C., Garaiyurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., Alkorta, I. (2017). Plasmidmediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Front. Microbiol.* 8, 1966.
- Garcia-Segura, S., Cesar Almeida, L., Bocchi, N., Brillas, E. (2011). Solar photoelectro-Fenton degradation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid optimized by response surface methodology. *J. Hazard. Mater.* 194, 109–118.
- Gaultier, J., Farenhorst, A., Cathcart, J., Goddard, T. (2008). Degradation of [carboxyl-14C] 2,4-D and [ring-U-14 C] 2,4-D in 114 agricultural soils as affected by soil organic carbon content. *Soil Biol. Biochem.* 40, 217–227.
- Geilfus, C. M. (2019). Chloride in soil: From nutrient to soil pollutant. *Environmental and Experimental Botany*, 157, 299-309.
- Ghani, A., Wardle, D.A. (2001). Fate of 14C from glucose and the herbicide meta-sulfuronmethyl in a plant-soil microcosm system. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 777-785.
- Gisi, D., Willi, L., Traber, H., Leisinger, T., Vuilleumier, S. (1998). Effects of bacterial host and dichloromethane dehalogenase on the competitiveness of methylotrophic bacteria growing with dichloromethane. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1194–1202
- Goldman, P. (1965). The Enzymatic Cleavage of the Carbon-Fluorine Bond in Fluoroacetate. *J Biol Chem* 240(8): 3434–38.
- Goldman, P., and Milne, G.W. (1966). Carbon-Fluorine Bond Cleavage. II. Studies on the Mechanism of the Defluorination of Fluoroacetate. *J Biol Chem* 241(23): 5557–59.
- Gribble, G. W. (2009). Naturally occurring organohalogen compounds-a comprehensive update (Vol. 91). Springer Science & Business Media. Pp 12-13, 21-23.
- Gribble, G. W. (2015). A recent survey of naturally occurring organohalogen compounds. *Environmental Chemistry*, 12, 396–405.
- Gribble, G.W. (1992). Naturally occurring organohalogen compounds a survey. *J Nat Prod (Lloydia)*;55: 1353-1395.
- Gribble, G.W. (1994). The natural production of chlorinated compounds. *Environmental Science Technology*, 28 (7), 310–319.
- Gribble, G.W. (1999). The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chem. Soc. Rev.* 28, 335-346.
- Gribble, G.W. (2004). Natural organohalogen. *Science dossier. Eurochlor* 17.
- Gribble, G.W. (2010). Naturally occurring organohalogen compounds—a comprehensive update. *Progress in the chemistry of organic natural products*, 91, 1–613.
- Gribble, G.W. (2012). Recently discovered naturally occurring heterocyclic organohalogen compounds, *Heterocycles*, 84, 157–207.

- Gribble, G.W., Scheuer, P.J., Moore, R.E., and Faulkner, D.J. (2018). Newly discovered naturally occurring organohalogenes. *Arkivoc*;372-410.
- Groudev S., Georgiev P., Spasova I., Nicolova M. (2008). Bioremediation of acid mine drainage in a uranium deposit. *Hydrometallurgy*, 94, 93–99.
- Häggbloom, M.M. (1992). Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol Lett* 103:29–71.
- Häggbloom, M.M., Bossert, I.D. *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*. Kluwer Academic, Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 2003.
- Häggbloom, M.M., Bossert, I.D. Halogenated organic compounds - a global perspective. In: *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, pages 3-29.; Häggbloom, M.M., Bossert, I.D., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2003;
- Han, L, Liu, Y, He, A, Zhao, D. (2014). 16S rRNA gene phylogeny and *tfdA* gene analysis of 2,4-D-degrading bacteria isolated in China. *World journal of microbiology and biotechnology* 30, 2567–2576.
- Han, L., Zhao, D., Li, C. (2015). Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. *Braz. J. Microbiol.* 46, 433–441.
- Hartmann, J., Reineke, W., Knackmuss, H.J. (1979). Metabolism of 3-Chloro-, 4-Chloro-, and 3,5-Dichlorobenzoate by a *Pseudomonad*. *Appl Environ Microbiol* 37(3): 421–28.
- Hasan, Q.A.K.M., Takada, H., Esaki, N., Soda, K. (1991). Catalytic Action of L-2-halo Acid Dehalogenase on Long-chain L-2-haloalkanoic Acids in Organic Solvents. *Biotechnol Bioeng* 38(9): 1114–17.
- Hayashi, S., Sano, T., Suyama, K., Itoh, K. (2016). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)- and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading gene cluster in the soybean root-nodulating bacterium *Bradyrhizobium elkanii* USDA94. *Microbiol Res* 188:62–71.
- Hayes, R.P., Green, A.R., Nissen, M.S., Lewis, K.M., Xun, L., Kang, C. (2013). Structural Characterization of 2,6-Dichloro-p-Hydroquinone 1,2-Dioxygenase (PcpA) from *Sphingobium Chlorophenicum*, a New Type of Aromatic Ring-Cleavage Enzyme. *Mol Microbiol* 88(3): 523–36.
- Hernández F, Marín JM, Pozo ÓJ, Sancho JV., López FJ, Morell I. (2008). Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast. *Int J Environ Anal Chem.*88(6):409-424.
- Hlouchova, K., Rudolph, J., Pietari, J.M.H., Behlen, L.S., Copley, S.D. (2012). Pentachlorophenol Hydroxylase, a Poorly Functioning Enzyme Required for Degradation of Pentachlorophenol by *Sphingobium Chlorophenicum*. *Biochemistry* 51(18): 3848–60.
- Hoekstra, E.J., De Weerd, H., De Leer, E.W.B., Brinkman, U.A.T. (1999). Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a Douglas fir forest. *Environ Sci Technol* 33(15):2543–2549.
- Hoffmann, D., Kleinstuber, S., Muller, R.H., Babel, W. (2003). A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a. *Microbiology* 149:2545–2556.
- Holliger, C., Schumacher, W. (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process, *Antonie van Leeuwenhoek*, 66, 239-246.
- Holliger, C., Hahn, D., Harmsen, H., Ludwig, W., Schumacher, W., Tindall, B., Vazquez, F., Weiss, N., Zehnder, A.J.B. (1998). *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloro- ethene in an anaerobic respiration, *Arch Microbiol* 169, 313-321.
- Holliger, C., Regard, C., Diekert, G. *Dehalogenation by anaerobic bacteria*. W: Häggbloom, M.M., Bossert, I.D. *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*. 116-157. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic, Publishers, 2003.
- Hopkins, G. D., and McCarty, P. L. (1995). Field evaluation of in situ aerobic cometabolism of trichloroethylene and three dichloroethylene isomers using phenol and toluene as the primary substrates. *Environmental science & technology*, 29(6), 1628-1637.
- Hotopp, J.C.D., Hausinger, R.P. (2001). Alternative substrate of 2,4-Dichlorophenoxyacetate/-Ketoglutarate dioxygenase. *Journal of Molecular Catalysis B, Enzymatic* 15, 155-162.

- Hou, J., Liu, F., Wu, N., Ju, J., Yu, B. (2016). Efficient biodegradation of chlorophenols in aqueous phase by magnetically immobilized aniline-degrading *Rhodococcus rhodochrous* strain. *J Nanobiotechnol* 14:5.
- Hu, Y., Li, D., Ma, X., Liu, R., Qi, Y., Yuan, C., Huang, D. (2021). Effects of 2,4-dichlorophenol exposure on zebrafish: Implications for the sex hormone synthesis. *Aquat. Toxicol.*, 236, Article 105868.
- Hug, L. A. & Edwards, E. A. (2013). Diversity of reductive dehalogenase genes from environmental samples and enrichment cultures identified with degenerate primer PCR screens. *Front. Microbiol.* 4, 341.
- Hug, L. A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F. E., Smidt, H., Edwards, E. A., Adrian, L. (2013). Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biology Science*, 368, 20120322.
- Huong, N. L., Itoh, K., Suyama, K. (2007). Diversity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T)-degrading bacteria in Vietnamese soils. *Microbes and environments*, 22(3), 243-256.
- Hynková, K., Nagata, Y., Takagi, M., and Damborský, J. (1999). Identification of the Catalytic Triad in the Haloalkane Dehalogenase from *Sphingomonas Paucimobilis* UT26. *FEBS letters* 446(1): 177–81.
- Igbinsola, O.E., Ajisebutu, O.S., Okoh, I.A. (2007a). Aerobic dehalogenation activities of two petroleum degrading bacteria. *Afr J Biotechnol* 6(7):897–901.
- Igbinsola, O.E., Ajisebutu, O.S., Okoh, I.A. (2007b). Studies on aerobic biodegradation activities of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by bacteria species isolated from petroleum polluted site. *Afr J Biotechnol* 6(12):1426–1431.
- Ikuma, K., Gunsch, C.K. (2012a). Genetic bioaugmentation as an effective method for in situ bioremediation. *Bioengineered* 3, 236–241.
- Ikuma, K., Gunsch, C.K. (2012b). Genetic bioaugmentation as an effective method for in situ bioremediation: functionality of catabolic plasmids following conjugal transfers. *Bioengineered* 3, 236–241.
- Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S., Xu, L., Zhu, J., ..., Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment international*, 111, 332-351.
- Itoh, K., Kanda, R., Sumita, Y., Kim, H., Kamagata, Y., Suyama, K., Yamamoto, H., Hausinger, R.P., Tiedje, J.M. (2002). *tfdA*-like genes in 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria belonging to the *Bradyrhizobium*-*Agromonas*-*Nitrobacter*-*Afipia* cluster in α -proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3449–3454.
- Jacobsen, C.S., Pedersen, J.C. (1992). Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil inoculated with *Pseudomonas cepacia* DBO1(pRO101), *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) and *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4): effects of inoculation level and substrate concentration. *Biodegradation* 2(4):253–263.
- Jacobsen, C.S. and Hjelmso, M.H. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 15.
- Janssen, D.B., Pries, F., and Van Der Ploeg, J.R. (1994). Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annu Rev Microbiol* 48:163-191.
- Jiang, G., Lan, M., Zhang, Z., Lv, X., Lou, Z., Xu, X., ..., Zhang, S. (2017). Identification of active hydrogen species on palladium nanoparticles for an enhanced electrocatalytic hydrodechlorination of 2, 4-dichlorophenol in water. *Environmental science & technology*, 51(13), 7599-7605.
- Jiang, G., Lan, M., Zhang, Z., Lv, X., Lou, Z., Xu, X., Dong, F., Zhang, S. (2017). Identification of active hydrogen species on palladium nanoparticles for an enhanced electrocatalytic hydrodechlorination of 2,4-dichlorophenol in water. *Environ. Sci. Technol.*, 51, pp. 7599-7605.
- Jordan, A., Harnisch, J., Borchers, R., Le Guern, F., Shinohara, H. (2000). Volcanogenic halocarbons. *Environmental Science Technology*, 34, 1122-1124.
- Ju, Z., Liu, S.S., Xu, Y.Q., Li, K. (2019). Combined Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and Its Metabolites 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP) on Two Nontarget Organisms. *ACS Omega*. Jan 18;4(1):1669-1677.

- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57, 503-507.
- Kayser, M.F., Vuilleumier, S. (2001). Dehalogenation of dichloromethane by dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase leads to the formation of DNA adducts. *J Bacteriol* 183: 5209–5212.
- Kearns, J., Wellborn, L., Summers, R., Knappe, D. (2014). 2, 4-D adsorption to biochars: effect of preparation conditions on equilibrium adsorption capacity and comparison with commercial activated carbon literature data. *Water Res.* 62, 20–28.
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>.
- Kirk, K. L. (2012). *Biochemistry of the elemental halogens and inorganic halides*. Springer Science & Business Media.
- Kitagawa, W., Takami, S., Miyauchi, K., Masai, E., Kamagata, Y., Tiedje, J.M., Fukuda, M. (2002). Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *J Bacteriol* 184(2):509–518.
- Kleinstuber, S., Müller, R.H., Babel, W. (2001). Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in an alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, *Halomonas* sp. EF43. *Extremophiles* 5(6):375–384.
- Koe, G.S., Vilker, V.L. (1993). Dehalogenation by cytochrome P- 450cam: effect of oxygen level on the decomposition of 1,2-di- bromo-3-chloropropane. *Biotechnol Prog*, 9, 608-614.
- Kokushi, E., Shintoyo, A., Koyama, J., Uno, S. (2017). Evaluation of 2,4-dichlorophenol exposure of Japanese medaka, *Oryzias latipes*, using a metabolomics approach. *Environ. Sci. Pollut. Res Int*, 24, pp. 27678-27686.
- Komisja Europejska, 2023. Active substances, safeners and synergists. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances> (dostęp: 02.05.2023.)
- Kouker, G., and Jaeger, K. E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*, 53(1), 211-213.
- Kumar, A., Pillay, B., Olaniran, A.O. (2014). Two structurally different diene lactone hydrolases (TfdEI and TfdEII) from *Cupriavidus necator* JMP134 plasmid pJP4 catalyse cis-and trans-dienelactones with similar efficiency. *PLoS One* 9, e101801.
- Kumar, A., Trefault, N., Olaniran, A.O. (2016). Microbial degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid: insight into the enzymes and catabolic genes involved, their regulation and biotechnological implications. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 194–208.
- Kunicki-Goldfinger, W.J.H. *Życie Bakterii*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1994.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Singh, S., Naidu, R., Megharaj, M. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation potential, surfactant production, metal resistance and enzymatic activity of two novel cellulose-degrading bacteria isolated from koala faeces. *Environmental Earth Sciences*, 76, 1-12.
- Lane D. J., 16S/23S rRNA sequencing. (Stackebrandt E., Goodfellow M., red.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons: New York. 1991.
- Łebkowska M., Klimiuk E., *Biotechnologia w Ochronie Środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 2005.
- Leisinger, T., Bader, R. (1993). Microbial Dehalogenation of Synthetic Organohalogen Compounds: Hydrolytic Dehalogenases. *Chimia* 47: 116-121.
- Lerch, T.Z., Dignac, M.F., Barriuso, E., Bardoux, G., Mariotti, A. (2007). Tracing 2,4-D metabolism in *Cupriavidus necator* JMP134 with 13Cl labelling technique and fatty acid profiling. *J Microbiol Methods* 71(2):162–174.
- Li, H., Zhang, X., Qiu, Q., An, Z., Qi, Y., Huang, D., Zhang, Y. (2013). 2, 4-Dichlorophenol induces apoptosis in primary hepatocytes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) through mitochondrial pathway. *Aquatic toxicology*, 140, 117-122.
- Li, K., Wu, J. Q., Jiang, L. L., Shen, L. Z., Li, J. Y., He, Z. H., ... , He, M. F. (2017). Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*, 171, 40-48.
- Limam, I., Guenne, A., Driss, M. R., Mazeas, L. (2010). Simultaneous determination of phenol, methylphenols, chlorophenols and bisphenol-A by headspace solid-phase microextraction-gas

- chromatography-mass spectrometry in water samples and industrial effluents. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 90(3-6), 230-244.
- Lin, T.C., Pan, P.T., Cheng, S.S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 176:27–34.
- Löffler, F.E., Cole, J.R., Ritalahti, K.M., Tiedje, J.M. (2003). Diversity of dechlorinating bacteria. In *Dehalogenation Microbial Processes and Environmental Applications*. Häggblom, M.M., and Bossert, I.D. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 53-87.
- Loos, M.A., Konston, A., Kearney, P.C. (1980). Inexpensive soil flask for ¹⁴C pesticide degradation studies. *Soil Biochemistry* 12, 583-585.
- Luo, L., Taylor, K.L., Xiang, H., Wie, Y., Zhang, W., Dunaway-Mariano, D. (2001). Role of active site binding interactions in 4-chlorobenzoyl-coenzyme A dehalogenase catalysis. *Biochemistry* 40, 15684–15692.
- Ma, Y., Han, J., Guo, Y., Lam, P.K., Wu, R.S., Giesy, J.P., Zhang, X., Zhou, B. (2012). Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in vivo assay in zebrafish by 2,4-dichlorophenol. *Aquat. Toxicol.*, 106–107, pp. 173-181.
- Magnoli, K., Carranza, C. S., Aluffi, M. E., Magnoli, C. E., Barberis, C. L. (2020). Herbicides based on 2, 4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 38501-38512.
- Margesin, R., Hammerle, M., Tscherko, D. (2007). Microbial Activity and Community Composition during Bioremediation of Diesel-Oil Contaminated Soil: Effects of Hydrocarbon Concentration, Fertilizers, and Incubation Time. *Microbial ecology* 53: 259–269.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. (1999). Soil lipase activity– a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques* 13: 859–863.
- Markusheva, T.V., Zhurenko, E.Y., Galkin, E.G., Korobov, V.V., Zharikova, N.V., Gafiyatova, L.R. (2004). Identification and characterization of a plasmid in strain *Aeromonas hydrophila* IBRB-36 4CPA carrying genes for catabolism of chlorophenoxyacetic acids. *Genetika* 40(11): 1469–1474.
- Matturro, B., Presta, E., Rossetti, S. (2016). Reductive dechlorination of tetrachloroethene in marine sediments: biodiversity and dehalorespiring capabilities of the indigenous microbes. *Science of The Total Environment*, 545, 445-452.
- Matturro, B., Tandoi, V., Rossetti, S. (2013). Different Activity Levels of Dehalococcoides Mccartyi Revealed by FISH and CARD-FISH under Non-Steady and Pseudo-Steady State Conditions. *New Biotechnol* 30(6): 756–62.
- McTernan, W. F., and Pereira, J. A. (1991). Biotransformation of lindane and 2, 4-D in batch enrichment cultures. *Water Research*, 25(11), 1417-1423.
- Meßmer, M., Reinhardt, S., Wohlfarth, G., Diekert, G. (1996). Studies on methyl chloride dehalogenase and O-demethylase in cell extracts of the homoacetogen strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay. *Arch Microbiol* 165, 18-25.
- Moe, W. M., Rainey, F. A., Yan, J. (2016). The genus *Dehalogenimonas* in Organohalide-Respiring Bacteria, eds L. Adrian and F. E. Löffler (Berlin: Springer), 137–151.
- Mohaupt, V., Völker, J., Altenburger, R., Birk, S., Kirst, I., Kühnel, D., ... , Whalley, C. (2020). Pesticides in European rivers, lakes and groundwaters–data assessment. ETC/ICM Technical Report 1/2020: European Topic Centre on Inland, Coastal and Marine Waters.
- Mountassif, D., Kabine, M., Mounchid, K., Mounaji, K., Latruffe, N., El Kebbaj, M.H.S. (2008). Biochemical and histological alterations of cellular metabolism from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, effects on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 90, 87–96.
- Müller, R.H. (2007). Activity and reaction mechanism of the initial enzymatic step specifying the microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Eng Life Sci* 7(4):311–321.
- Muszyński, P., Brodowska, M. S., Paszko, T. (2020). Occurrence and transformation of phenoxy acids in aquatic environment and photochemical methods of their removal: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 1276-1293
- Nagata, Y., Miyauchi, K., Damborsky, J., Manova, K., Ansorgova, A., Takagi, M. (1997). Purification and Characterization of a Haloalkane Dehalogenase of a New Substrate Class from a Gamma-

- Hexachlorocyclohexane-Degrading Bacterium, *Sphingomonas Paucimobilis* UT26. *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3707–10.
- Nagata, Y., Nariya, T., Ohtomo, R., Fukuda, M., Yano, K., Takagi, M. (1993). Cloning and Sequencing of a Dehalogenase Gene Encoding an Enzyme with Hydrolase Activity Involved in the Degradation of γ -Hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas Paucimobilis*. *J Bacteriol* 175(20): 6403–10.
- Needham, T. P., Payne, R. B., Sowers, K. R., Ghosh, U. (2019). Kinetics of PCB microbial dechlorination explained by freely dissolved concentration in sediment microcosms. *Environmental Science & Technology*, 53(13), 7432-7441.
- Neumann, A., Wohlfarth, G., Diekert, G. (1998). Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:4140-5.
- Nielsen, T.K., Xu, Z., Gözdereliler, E., Aamand, J., Hansen, L.H., Sørensen, S.R. (2013). Novel insight into the genetic context of the *cadAB* genes from a 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid-degrading *Sphingomonas*. *PLoS One* 8, e83346.
- Nikolaou, A.D., Meric, S., Lekkas, D.F., Naddeo, V., Belgiornob, V., Groudevd, S., Tanike, A. (2008). Multi-parametric water quality monitoring approach according to the WFD application in Evros trans-boundary river basin: priority pollutants, Desalination, 226, 306–320.
- Nojiri, H. (2016). Comparisons of the transferability of plasmids pCAR1, pB10, R388, and NAH7 among *Pseudomonas putida* at different cell densities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1020–1023.
- Oberg, G. (1998). Chloride and organic chlorine in soil. *Acta Hydrochem Hydrobiol.* 26, 137–144.
- Onbasili, D., Aslim, B. (2011). Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) herbicide by *pseudomonas* spp Strains. *Fresen. Environ. Bull.* 20, 1438–1446.
- Ordaz-Guillén, Y., Galíndez-Mayer, C.J., Ruiz-Ordaz, N., Juárez-Ramírez, C., Santoyo-Tepole, F., Ramos-Monroy, O. (2014). Evaluating the degradation of the herbicides *picloram* and 2,4-D in a compartmentalized reactive biobarrier with internal liquid recirculation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 8765–8773.
- Oturan, M.A. (2000). An ecologically effective water treatment technique using electrochemically generated hydroxyl radicals for in situ destruction of organic pollutants: application to herbicide 2,4-D. *J. Appl. Electrochem.*, 30, pp. 475-482.
- Oyewusi, H. A., Wahab, R. A., Huyop, F. (2020). Dehalogenase-producing halophiles and their potential role in bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111603.
- Pattanasupong, A., Nagase, H., Inoue, M., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., Miyamoto, K. (2004). Ability of a microbial consortium to remove pesticide, carbendazim and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 517–522.
- Pattappan, D., Mohankumar, A., Kumar, R. R., Palanisamy, S., Lai, Y. T., Huh, Y. S., ... , Haldorai, Y. (2023). Visible light photocatalytic activity of a FeCo metal-organic framework for degradation of acetaminophen and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and a nematode-based ecological assessment. *Chemical Engineering Journal*, 464, 142676.
- Pawlik, M., Cania, B., Thijs, S., Vangronsveld, J., Piotrowska-Seget, Z. (2017). Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. *Environ Sci Pollut Res.*
- Piotrowski, J. K. (2006). *Podstawy toksykologii: kompendium dla studentów szkół wyższych*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. 335-336.
- Poelarends, G.J., Serrano, H., Person, M.D., Johnson, W.H. Jr, Murzin, A.G., Whitman, C.P. (2004). Cloning, expression, and characterization of a *cis*-3-chloroacrylic acid dehalogenase: insights into the mechanistic, structural, and evolutionary relationship between isomer-specific 3-chloroacrylic acid dehalogenases. *Biochemistry* 43:759-72.
- PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Reineke W., Mandt C., Kaschabek S., R., Pieper D.H., Chlorinated Hydrocarbon Metabolism. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester (2011).

- Reineke, W., and Knackmuss, H.J. (1978). Chemical Structure and Biodegradability of Halogenated Aromatic Compounds Substituent Effects on 1,2-Dioxygenation of Benzoic Acid. *BBA - General Subjects* 542(3): 412–23.
- Rejestr środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi: <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/rejestr-rodkow-ochrony-roslin> (dostęp: 26.09.2023.).
- Reportlinker - <https://www.reportlinker.com/clp/global/13> (dostęp: 03.05.2023.).
- Rivera-Utrilla, J., Sanchez-Polo, M., Abdel Daïem, M.M., Ocampo-Perez, R. (2012). Role of activated carbon in the photocatalytic degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by the UV/TiO₂/activated carbon system. *Appl. Catal. B* 126, 100–107.
- Rotmistrovsky, K., Agarwala, R. (2011). BMTagger: Best Match Tagger for removing human reads from metagenomics datasets. <ftp://ftpnrcbinlmnihgov/pub/agarwala/bmtagger/>
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi; Dz.U. 2017 poz. 2294.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi, Dz. U. 16.09.2016, poz. 1395.
- Rubilar, O., Diez, M.C., Gianfreda, L. (2008). Transformation of Chlorinated Phenolic Compounds by White Rot Fungi. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38, 227–268.
- Rudolph, J., Erbse, A.H., Behlen, L.S., Copley, S.D. (2014). A Radical Intermediate in the Conversion of Pentachlorophenol to Tetrachlorohydroquinone by *Sphingobium Chlorophenicum*. *Biochemistry* 53(41): 6539–49.
- Sanchis, S., Polo, A.M., Tobajas, M., Rodriguez, J.J., Mohedano, A.F. (2013). Degradation of chlorophenoxy herbicides by coupled Fenton and biological oxidation. *Chemosphere* 93, 115–122.
- Satpathy, R., Konkimalla, V. B., Ratha, J. (2017). Microbial Dehalogenation: 3-Chloropropanoic Acid (3-CPA) Degradation as a Case Study. *Microbiology*. 86 (1), 32–41.
- Sawle, A. D., Wit, E., Whale, G., Cossins, A. R. (2010). An information-rich alternative, chemicals testing strategy using a high definition toxicogenomics and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Toxicol. Sci.* 118, 128–139.
- Schechter, A. and Gasiewicz, T.A. *Dioxins and health*. John Wiley & Sons, Inc. 2nd. ed. 2003. ISBN 0-471-43355-1.
- Schellerer, K.M., Kufner, T., Mieden, O., Vogel, E. (2016). Polyvinyl chloride (PVC). *Kunststoffe International*, 10, 28-32.
- Schuhmacher, W., Holliger, C., Zehnder, A.J.B., Hagen, W.R. (1997). Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Lett.* 409, 421–425.
- Shahsavari, E., Poi, G., Aburto-Medina, A., Haleyur, N., Ball, A. S. (2017). Bioremediation Approaches for Petroleum. *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants*. 21-41.
- Shareef, K., Shaw, G. (2008). Sorption kinetics of 2,4-D and carbaryl in selected agricultural soils of northern Iraq: application of a dual-rate model. *Chemosphere* 72, 8–15.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., ... , Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16.
- Silva, T.M., Stets, M.I., Mazzetto, A.M., Andrade, F.D., Pileggi, S.A.V., Fávero, P.R., Cantú M.D., Carrilho, E., Carneiro, P.I.B., Pileggi, M. (2007). Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. *Braz J Microbiol* 38(3):522–525.
- Slater, J.H., Bull, A.T., Hardman, D.J. (1995). Microbial Dehalogenation. *Biodegradation* 6(3): 181–89.
- Slater, J.H., Bull, A.T., Hardman, D.J. (1997). Microbial dehalogenation of halogenated alkanolic acids, alcohols and alkanes. *Adv Microb Physiol* 38, 133-176.
- Smith, A. E., Aubin, A. J. (1991). Metabolites of [C-14] 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in Saskatchewan soils. *J. Agric. Food Chem.* 39 (11), 2019–2021. 10.1021/jf00011a029.
- Song, B., Palleroni, N.J., Hagglblom, M.M. (2000). Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (8), 3446–3453.
- Srivastava, N.K., Majumder, C.B. (2008). Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 151:1–8 .

- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs), United Nations Environment Programme. Stockholm, 22 May 2001. https://www.chemsafetypro.com/Topics/Convention/Stockholm_Convention_on_Persistent_Organic_Pollutants_POPs.html
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>
- Streber, W.R., Timmis, K.M., Zenk, M.H. (1987). Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J Bacteriol* 169: 2950–2955.
- Strona Komisji Europejskiej: baza danych UE dotycząca pestycydów - substancje aktywne, dostęp 12.09.2023. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances>
- Suwa, Y., Wright, A.D., Fukimori F, Nummy K.A., Hausinger, R.P., Holben, W.E., Forney, L.J. (1996). Characterization of a chromosomally encoded 2,4-dichlorophenoxyacetic acid/alpha-ketoglutarate dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain RASC. *Appl Environ Microbiol* 62:2464-9.
- Swartjes, F. A., and Van der Aa, M. (2020). Measures to reduce pesticides leaching into groundwater-based drinking water resources: An appeal to national and local governments, water boards and farmers. *Science of the Total Environment*, 699, 134186.
- Toxicological Profile for Chlorophenols. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590747/> (dostęp: 07.01.2024).
- Tyagi, M., Fonseca, M.M.R., Carvalho, C.C.C.R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231–241.
- U.S. EPA, 2000, Raport: Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications. EPA 542-R-00-008. <https://www.epa.gov/remedytech/engineered-approaches-situ-bioremediation-chlorinated-solvents-fundamentals-and-field> (dostęp: 05.09.2023).
- U.S. EPA, 2002. Priority pollutants: <https://www3.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf> (dostęp: 07.01.2024).
- Ukalska-Jaruga, A., Smreczak, B., Siebielec, G. (2020). Assessment of Pesticide Residue Content in Polish Agricultural Soils. *Molecules*. 25, 587.
- Vaillancourt, F., Bolin, J., Eltis, L. (2006). The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41(4): 241–67.
- van den Berg, H., Manuweera, G., Konradsen, F. (2017). Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases, *Malar J*, 16, 401.
- van der Meer, J.R. (1994). Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 239-249.
- van Pee, K.H., Unversucht, S. (2003). Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere*, 52, 299–312.
- Vannelli, T., Hooper, A.B. (1993). Reductive Dehalogenation of the Trichloromethyl Group of Nitrpyrin by the Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosomonas Europaea* Downloaded From. *Appl Environ Microbiol* 59(11): 3597-3601.
- Varenikov, A., Shapiro, E., Gandelman, M. (2020). Decarboxylative halogenation of organic compounds. *Chemical Reviews*, 121(1), 412-484.
- Vassilev, S. V., Eskenazy, G. M., Vassileva, C. G. (2000). Contents, modes of occurrence and origin of chlorine and bromine in coal. *Fuel*, 79(8), 903-921.
- Vedler, E., Vahter, M., Heinaru, A. (2004). The completely sequenced plasmid pEST4011 contains a novel IncP1 backbone and a catabolic transposon harboring *tfd* genes for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation. *J Bacteriol* 186(21):7161–7174.
- Velisek, J., Stara, A., Zuskova, E., Kouba, A. (2017). Effects of three triazine metabolites and their mixture at environmentally relevant concentrations on early life stages of marbled crayfish (*Procambarus fallax* f. *virginalis*). *Chemosphere*. 175, 440–445. 10.1016/j.chemosphere.2017.02.080.
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163-1172.

- Walters, J. (2011). Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Environmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA, USA. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/24-d.pdf>. (dostęp: 20.04.2022.)
- Weber, E. (1972). Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner, Veb Fischer Verlag, Jena.
- Wijngaard, A.J., van den Janssen, D.B., Witholt, B. (1989). Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment. J Gen Microbiol, 135, 2199-2208.
- Wijnja, H., Doherty, J. J., Safie, S. A. (2014). Changes in pesticide occurrence in suburban surface waters in Massachusetts, USA, 1999-2010. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93, 228–232. 10.1007/s00128-014-1251-4.
- Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Guzik, U. (2013). Factors Affecting Activity of Catechol 2,3-Dioxygenase from 2-Chlorophenol-Degrading *Stenotrophomonas Maltophilia* Strain KB2. Biocatal Biotransformation 31(3): 141–47.
- Wood, D.E., Lu, J., Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. Genome Biol 20:257.
- World Health Organization. (2011). Guidelines for drinking-water quality - 4th ed.
- Worldometers - <https://www.worldometers.info/food-agriculture/pesticides-by-country/>
- Wu, X., Wang, W., Liu, J., Pan, D., Tu, X., Lv, P., Wang, Y., Cao, H., Wang, Y., Hua, R. (2017). Rapid biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Cupriavidus gilardii* T-1. J Agric Food Chem 65(18):3711–3720.
- Xia, Z.Y., Zhang, L., Zhao, Y., Yan, X., Li, S.P., Gu, T., Jiang, J.D. (2017). Biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by a new isolated strain of *Achromobacter* sp. LZ35. Curr Microbiol 74(2):193–202.
- Xiao, Z., Jiang, W., Chen, D., Xu, Y. (2020). Bioremediation of typical chlorinated hydrocarbons by microbial reductive dechlorination and its key players: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 202, 110925.
- Xu, J., Liu, X., Lowry, G.V., Cao, Z., Zhao, H., Zhou, J.L., Xu, X. (2016). Dechlorination mechanism of 2,4-dichlorophenol by magnetic MWCNTs supported Pd/Fe nanohybrids: rapid adsorption, gradual dechlorination, and desorption of phenol. ACS Appl. Mater. Interfaces, 8, pp. 7333-7342.
- Xun, L., Bohuslavsek, J., Cai, M. (1999). Characterization of 2,6-Dichloro-p-Hydroquinone 1,2-Dioxygenase (PcpA) of *Sphingomonas Chlorophenolica* ATCC 39723. Biochem Biophys Res Commun 266(2): 322–25.
- Yanagida, K., Sakuda, A., Suzuki-Minakuchi, C., Shintani, M., Matsui, K., Okada, K., & Nojiri, H. (2016). Comparisons of the transferability of plasmids pCAR1, pB10, R388, and NAH7 among *Pseudomonas putida* at different cell densities. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 80(5), 1020-1023.
- Yang, Z., Xu, X., Dai, M., Wang, L., Shi, X., Guo, R. (2017). Rapid degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid facilitated by acetate under methanogenic condition. Bioresour Technol 232:146–151.
- Yu, J., Shi, J., Zhang, Y., Yu, Z. (2020). Molecular docking and site-directed mutagenesis of dichloromethane dehalogenase to improve enzyme activity for dichloromethane degradation. Applied Biochemistry and Biotechnology 190(2): 487–505.
- Yuan, C., Zhang, C., Qi, Y., Li, D., Hu, Y., Huang, D. (2020). 2,4-Dichlorophenol induced feminization of zebrafish by down-regulating male-related genes through DNA methylation. Ecotoxicol. Environ. Saf., 189, Article 110042.
- Zabaloy, M.C., Gómez, M.A. (2014). Isolation and characterization of indigenous 2,4-D herbicide degrading bacteria from an agricultural soil in proximity of Sauce Grande River, Argentina. Ann. Microbiol. 64, 969–974.
- Zhang, C., Li, D., Ge, T., Han, J., Qi, Y., Huang, D. (2020a). 2,4-Dichlorophenol induces feminization of zebrafish (*Danio rerio*) via DNA methylation. Sci. Total Environ., 708, Article 135084.
- Zhang, S., Adrian, L., Schüürmann, G. (2020b). Dehalococcoides-Mediated B12-Dependent Reductive Dehalogenation of Aromatics Does Not Proceed through Outer-Sphere Electron Transfer. Environmental Science & Technology, 54(24), 15751-15758.

- Zhang, X., Zha, J., Li, W., Yang, L., Wang, Z. (2008). Effects of 2,4-dichlorophenol on the expression of vitellogenin and estrogen receptor genes and physiology impairments in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environ. Toxicol.*, 23, pp. 694-701.
- Zhao, Y., Lou, Z., Guo, Y., Xu, D. (2007). Treatment of sewage using an aged-refuse-based bioreactor. *Journal of Environmental Management*. 82:32–38.

Spis Figur

Spis tabel:

Tabela 1. Roczna produkcja wybranych halogenowanych związków organicznych.

Tabela 2. Zakres stosowania metody ICP-OES.

Tabela 3. Zakres stosowania metody chromatografii jonowej.

Tabela 4. Zawartość metali ciężkich w próbkach gruntu i osadów ściekowych metodą emisyjnej spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES).

Tabela 5. Całkowita zawartość halogenów (fluoru, chloru, bromu i jodu) w próbkach gruntu otrzymane metodą chromatografii jonowej.

Tabela 6. Zawartość pestycydów chloroorganicznych w próbkach gleb i osadów uzyskanych za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem wychwyty elektronów (GC-ECD). LOR - Limit raportowania.

Tabela 7. Charakterystyka dehalogenaz, których geny zidentyfikowano w metagenomach próbek gruntów i osadów ściekowych.

Tabela 8. Ubytek pestycydów wchodzących w skład preparatu Chwastox trio w przeprowadzonej mikrobiologicznej symulacji biotransformacji. Na szaro zaznaczono szczepy wytypowane do konsorcjów Rozt (X, Y, Z, 103, 104, 118), Rol (C, 3, 7, 10, 21), Ocz (α , 29, 34).

Tabela 9. Wyniki testów hodowlanych sprawdzających produkcję ureaz, celulaz i lipaz przez wyselekcjonowane szczepy bakteryjne zdolne do biotransformacji HZO. Wynik dodatni oznaczony jest +, wynik negatywny oznaczony jest -.

Tabela 10. Skład gatunkowy konsorcjów bakteryjnych wykorzystywanych przy symulacjach rozkładu HZO, ustalony na podstawie sekwencjonowania metagenomowego, oraz ich pochodzenie.

Tabela 11. Nazwy zidentyfikowanych genów kodujących metaboliczne i kometaboliczne dehalogenazy, w języku polskim i angielskim.

Tabela 12. Użyte w symulacji biotransformacji stężenia 2,4-D i ich wpływ na konsorcja bakteryjne.

Tabela 13. Procentowy ubytek 4-CP w płynach hodowlanych symulacji biotransformacji 4-CP przy użyciu konsorcjum Rozt i Rol po 8 miesiącach prowadzenia symulacji.

Tabela 14. Przykładowe taksony bakterii metabolizujących 2,4-D.

Tabela 15. Stężenia płynu hodowlanego użyte w teście hamowania wzrostu glonów, zestawione z zawartością 2,4-DCP w płynie hodowlanym; stężenia 2,4-DCP oznaczono za pomocą GC-MS.

Tabela 16. Ocena toksyczności związków chemicznych w odniesieniu do kryteriów ich szkodliwości dla biocenozy wodnych wg Unii Europejskiej (Dyrektywa 93/67/EEC, 1993).

Tabela 17. Zestawienie wyników testu ekotoksyczności phytotoxkit. Wyniki prezentują wpływ 2,4-DCP, obecnego w płynie hodowlanym w stężeniach 5, 10, 20 (%), na kiełkowanie i wzrost korzenia roślin wyższych – *Sorghum nigrum*, *Sinapis alba*, *Lepidium sativum*. K - wariant kontrolny.

Tabela 18. Porównanie ekotoksyczności 2,4-D, 2,4-DCP i 4-CP, wykonana na podstawie kart charakterystyki czystych związków.

Tabela 19. Priorytetowe zanieczyszczenia określone przez UE i USA-EPA będące chlorofenolami.

Tabela 20. Pestycydy podlegające identyfikacji w wodzie przeznaczonej do spożycia przed wprowadzeniem jej do sieci wodociągowej. Dane pochodzą z dwóch spółek dostarczających wodę do sieci: MPWiK S.A. w Warszawie oraz Eko-Babice Sp. Z o.o. w Starych Babicach. * gwiazdką oznaczono pestycydy oznaczane jedynie przez Eko-Babice.

Spis wykresów:

Wykres 1. Roczne zużycie pestycydów - udział poszczególnych grup pestycydów (wg Sharma i in., 2019).

Wykres 2. Roczne zużycie pestycydów w 2020 roku: **A** – na świecie w tonach, **B** – w tonach, przez dziesięciu największych konsumentów, **C** – na świecie w procentach (FAOSTAT 2020).

Wykres 3. Skład taksonomiczny środowisk zbliżonych do naturalnych i antropogenicznie zmodyfikowanych, wyrażony w procentach, przedstawiony na poziomie (A) – domeny (ang. *Domain*), (B) – dominujących typów (ang. *Phylum*) (względna obfitość, ang. *relative abundance* > 0,5%) oraz (C) – dominujących rodzajów (ang. *Genus*) (*relative abundance* > 0,5%), w oparciu o analizy metagenomów.

Wykres 4. Względna obfitość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaboliczne zidentyfikowane w metagenomach środowisk zbliżonych do naturalnych i zmodyfikowanych antropogenicznie, wyrażona w transkryptach na milion (tpm) odczytów. W ramce – dehalogenazy kometaboliczne. PEG (ang. *protein encoding genes*) – geny kodujące białka. Nazewnictwo enzymów w języku polskim zgodnie z tłumaczeniem podanym w tabeli 7.

Wykres 5. Względna obfitość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaboliczne w metagenomach środowisk zbliżonych do naturalnych i zmodyfikowanych antropogenicznie wyrażana w transkryptach na milion (tpm) odczytów, przedstawiona na poziomie taksonów. Nazewnictwo enzymów w języku polskim zgodnie z tłumaczeniem podanym w tabeli 7.

Wykres 6. Analiza głównych składowych (PCA) podobieństwa zespołów mikroorganizmowa w oparciu o metagenomy środowisk naturalnych i zmodyfikowanych antropogenicznie; analiza PCA wykonana według podobieństwa: dehalogenaz (A), wszystkich zidentyfikowanych genów (B), taksonomii (C). *Non-pesticide-treatment soil* – grunty leśne (s4, s5), *pesticide treatment soil* – grunty rolne (s1-s3), *wastewater-treatment sample* – oczyszczalnia ścieków (s6).

Wykres 7. **A** - Analiza korelacji - zależności między zawartością pochodnych DDT a genami kodującymi dehalogenazy. Obfitość (Abundance) wskazuje na ilość każdej dehalogenazy w analizowanych środowiskach. **B**- Analiza korelacji pokazuje zależność między zawartością pochodnych DDT a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzaju. Obfitość wskazuje na liczebność każdego rodzaju w analizowanych środowiskach. **C**- Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (ang. *canonical analysis of principal coordinates* - CAP) pokazuje zależność między zawartością pochodnych DDT a obecnością odpowiednich genów kodujących dehalogenazy w analizowanych środowiskach. **D**- Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (CAP) pokazuje związek między zawartością pochodnych DDT a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzaju. Długość każdej linii wektora jest proporcjonalna do siły korelacji. (*) oznacza statystycznie istotny wynik (wartość $p < 0,05$).

Wykres 8. **A**- Analiza korelacji - zależności między zawartością chlorków, fluorków, jodków a genami kodującymi dehalogenazy. Obfitość (Abundance) wskazuje na ilość poszczególnych dehalogenaz w analizowanych środowiskach. **B**- Analiza korelacji pokazuje zależność między zawartością chlorków, fluorków, jodków a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzajowym. Obfitość wskazuje na liczebność każdego rodzaju w analizowanych środowiskach. **C**- Kanoniczna analiza współrzędnych głównych (ang. *canonical analysis of principal coordinates* - CAP) pokazuje zależność między zawartością chlorków, fluorków, jodków a obecnością odpowiednich genów kodujących dehalogenazy w analizowanych środowiskach. **D**- kanoniczna analiza współrzędnych głównych (CAP) pokazuje zależności pomiędzy zawartością chlorków, fluorków, jodków a składem taksonomicznym analizowanych środowisk na poziomie rodzaju. Długość każdej linii wektora jest proporcjonalna do siły korelacji. (*) oznacza statystycznie istotny wynik (wartość $p < 0,05$).

Wykres 9. Względna obfitość genów kodujących dehalogenazy metaboliczne i kometaboliczne w metagenomach konsorcjów wyrażana w transkryptach na milion (tpm) odczytów. Nazewnictwo enzymów w języku polskim zgodnie z tłumaczeniem podanym w tabeli 11.

Wykres 10. Procentowa zawartość estru etylowego 2,4-D w płynie hodowlanym w czasie, w symulacji biotransformacji 2,4-D. **A**- początkowe stężenie 2,4-D 4,2 g/l, **B**- początkowe stężenie 2,4-D 2,1 g/l. Rozt, Rol, Rop, Ocz – użyte konsorcja, K -wariant kontrolny. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem GC-ECD.

Wykres 11. Zmiany stężenia 2,4-DCP w płynie hodowlanym w czasie, w symulacji biotransformacji 2,4-D. Rozt, Rol, Rop, Ocz – użyte konsorcja, K -wariant kontrolny. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem GC-ECD.

Wykres 12. Zmiany stężenia 4-CP w symulacji biotransformacji 4-CP po 8 miesiącach inkubacji wyrażone w g/l. Początkowe stężenie 4-CP – 0,025 g/l. (A) 4-CP jako jedyne źródło węgla, (B) etanol jako dodatkowe źródło

węgla, (C) metylokobalamina jako przenośnik elektronów, (D) etanol oraz metylokobalamina. Rozt i Rol – użyte konsorcja, K -wariant kontrolny. Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem GC-ECD.

Spis rycin:

Rycina 1. Wzory strukturalne 2,4-D i 2,4,5-T.

Rycina 2. Schemat selekcji szczepów zdolnych do rozkładu produktów ropopochodnych.

Rycina 3. HZO wchodzące w skład preparatu Chwastox trio.

Rycina 4. Przykładowe dwa szlaki metabolicznej transformacji 2,4-D – **A** częściej obserwowany w środowisku, **B**- znacznie rzadziej przeprowadzany przez bakterie. Reakcje transformacji 2,4-D ponumerowane są 1-8, w które zaangażowane są następujące enzymy: (1) 2,4-D dioksygenaza zależna od α -ketoglutaranu, (2) hydroksylaza 2,4-dichlorofenolu, (3) 1,2-dioksygenazę chlorokatecholowa, (4) cykloizomeraza chloromukonianu, (5) hydrolaza chlorodienelaktonu (6) odpowiednio reduktaza chloromaleilooctanu i reduktaza maleilooctanu, (7) dehalogenaza 2,4-D, (8) monooksygenaza 4-chlorofenoksyoctowa.

Rycina 5. Reakcja katabolizowana przez enzym karboksymetylenobutenolidazę.

Rycina 6. Fotografie przedstawiające wyniki testu wpływu 2,4-DCP, obecnego w płynie hodowlanym w stężeniach 5, 10, 20 (%), na kiełkowanie i wzrost korzenia roślin wyższych, na przykładzie trzech gatunków: *Sorghum nigrum*, *Sinapis alba*, *Lepidium sativum*. K - wariant kontrolny.

Rycina 7. Struktura i podstawowe właściwości chemiczne 2,4-D i jego metabolitów – 2,4-DCP i 4-CP (na podstawie bazy danych PubChem).

Spis fotografii:

Fotografia 1. Symulacja rozkładu pestycydów wchodzących w skład preparatu Chwastox trio prowadzona w probówkach.

Fotografia 2. Symulacja rozkładu HZO prowadzona w kolbkach.

Fotografia 3. Płytką testowa w teście Phytotoxkit.

Fotografia 4. Przykładowe zdjęcie żelu po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR genów 16S rRNA (zaznaczony strzałką) potwierdziła obecność fragmentów DNA wielkości ok. 1500 pz (par zasad), świadczących o obecności genu 16S rRNA. M - marker wielkości fragmentów DNA.

Fotografia 5. Przykładowe zdjęcie żelu po rozdziale elektroforetycznym produktów trawień DNA enzymem restrykcyjnym *HaeIII*. M - marker wielkości fragmentów DNA.

Fotografia 6. Wyniki oznaczeń testów hodowlanych sprawdzających produkcję lipaz (A), celulaz (B) i ureaz (C) przez szczepy wchodzące w skład konsorcjów. Lipazy: wynik pozytywny- fluorescencja w świetle UV, negatywny- brak fluorescencji. Celulazy: wynik pozytywny- strefa przejaśnienia wokół kolonii, negatywny- brak strefy przejaśnienia. Ureazy: wynik pozytywny- zmiana zabarwienia podłoża z pomarańczowo-czerwonego na różowe, wynik negatywny brak zmiany zabarwienia podłoża.

Spis wzorów:

- (1) Transkrypty na million odczytów (tpm, ang. *transcripts per million*)
- (2) Tempo wzrostu.
- (3) Inhibicja wzrostu.
- (4) Obliczenie stężeń letalnych i efektywnych (LC_{50} i EC_{50}).