

ANNA GAŁAZKA

*Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Czartoryskich 8; 24-100 Puławy
E-mail: agalazka@iung.pulawy.pl*

ZANIECZYSZCZENIA GLEB SUBSTANCJAMI ROPOPOCHODNYMI Z UWZGLĘDNIENIEM BIOLOGICZNYCH METOD ICH OCZYSZCZENIA

ŹRÓDŁA I FORMY ZANIECZYSZCZEŃ GLEBY

Jednym z ważnych elementów środowiska przyrodniczego jest gleba. Jest to obszar, w którym czynniki abiotyczne i biotyczne mają decydujący wpływ na zmianę składu i właściwości samej gleby oraz na liczebność znajdujących się w niej mikroorganizmów (MANAHAN 2006). Prawidłowe użytkowanie gruntów, a przede wszystkim właściwe zagospodarowanie rolnicze, musi zatem uwzględniać mikrobiologiczny i fizykochemiczny stan gleb (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005).

Zanieczyszczenia gleb wynikające z działalności człowieka stanowią istotne zagrożenie dla ekosystemu (BARAN i TURSKI 1996). Nadmierna eksploatacja złóż naftowych, awarie podczas wydobywania, magazynowania i transportu surowców, stają się głównymi przyczynami narastającego skażenia przyrody substancjami ropopochodnymi (ALEXANDER 1999). Postępująca dewastacja i zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego tymi substancjami wymaga podjęcia intensywnych zabiegów, mających na celu przywrócenie pierwotnego stanu wód, powietrza i gleby. W zależności od elementu ekosystemu, w jakim występują, mogą ulegać powolnym przemianom w wyniku różnych procesów chemicznych, fizycznych, biologicznych. Konsekwencją wystąpienia zanieczyszczeń gleby o dużej toksyczności może być zanik życia, uniemożliwiający podjęcie procesu samooczyszczania środowiska glebowego (ATLAS 1995).

Toksyczne skażenia wykluczają wykorzystanie rolnicze użytków rolnych i stanowią

zagrożenie dla mikroorganizmów glebowych i organizmów żywych. W Polsce na terenach byłych jednostek i lotnisk wojskowych, a także na terenach instalacji przemysłu rafineryjnego, stacji benzynowych, problem tzw. zaolejonej gleby jest bardzo poważny. Zanieczyszczenia w takich miejscach osiągają niekiedy wysoki poziom, przekraczający często dopuszczalne normy (ROZPORZĄDZENIE 2002).

Ważną grupę substancji ropopochodnych stanowią wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) (ang. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs). Są to związki chemiczne zawierające dwa lub więcej skondensowanych pierścieni aromatycznych. Częsteczką WWA ma budowę płaską. Poznanych zostało około 100 homocyklicznych węglowodorów występujących w środowisku, a ponadto kilkaset ich pochodnych alkilowych, aminowych, nitrowych itp. (DYREKTYWA 2004). Znane są również heterocykliczne WWA z wbudowanymi atomami tlenu, siarki, lub azotu. W środowisku WWA występują głównie w postaci mieszanin tych związków (CHEN i YUAN 2012). Najlepiej poznanym i najczęściej oznaczanym WWA jest benzo[a]piren. Liczne badania sugerują, iż ta bardzo zróżnicowana i wszechobecna grupa zanieczyszczeń posiada również własności kancerogeniczne i mutagenne.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne to związki organiczne zawierające od 2 do 13 pierścieni aromatycznych w cząsteczce, w ułożeniu liniowym, kątowym

lub klasterowym, zawierające mniejsze lub większe ilości podstawników alkilowych lub nitrowych (MANAHAN 2006). Charakteryzują się silnymi właściwościami hydrofobowymi i lipofilowymi, słabą rozpuszczalnością w wodzie, małą lotnością i silnym powinowactwem sorpcyjnym w stosunku do glebowej substancji organicznej. Większość WWA wykazuje stosunkowo dużą trwałość w środowisku, głównie ze względu na wyjątkowo silne wiązania w układzie skondensowanych pierścieni aromatycznych, w postaci chmury zde-lokalizowanych elektronów π . Stąd też charakterystyczny dla WWA niewielki stosunek atomów wodoru do węgla, dość mocne wiązanie C-C, tendencja do ulegania reakcjom substytucji, a także delokalizacja elektronów w obrębie wielu atomów węgla (stabilizacja rezonansowa) (MARGESIN i SCHINNER 2001).

WWA są to ciała stałe o krystalicznej budowie, które w stanie czystym występują jako bezbarwne, jasno żółte lub zielone kryształy. Mają niską lotność (głównie cięższe WWA) i słabą rozpuszczalność w wodzie (brak grup polarnych). Im większa jest ich masa cząsteczkowa tym mniejsza rozpuszczalność (HU i AITKEN 2012). Przykładowo, rozpuszczalność naftalenu (M=128) w wodzie wynosi 37,2 [$\mu\text{g}/\text{l}$], benzo[a]antracenu (M=228) 14 [$\mu\text{g}/\text{l}$], benzo[a]pirenu (M=252) 3,8 [$\mu\text{g}/\text{l}$], natomiast perylenu (M=252) tylko 0,4 [$\mu\text{g}/\text{l}$]. Z tego powodu bardzo łatwo adsorbują się one na cząstkach niepolarnych, takich jak np. pyły. Absorbują światło w zakresie UV-VIS, co wykorzystuje się do oznaczeń zarówno ilościowych, jak i jakościowych (KUBIAK 2013). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mają różne struktury, w których pierścienie benzenu przyjmują różne wzajemne położenia. W niektórych cząstkach WWA występują charakterystyczne obszary, zwane regionem K (zewnętrzna krawędź pierścienia fenantrenu) oraz region M (przeciwstawne atomy struktury antracenu). Ważne jest także położenie regionu, zwanego regionem zatoki. To właśnie na te obszary i pozycje wskazują badacze i przypisują im aktywność biologiczną (MA i współaut. 2012). Drogi przenikania węglowodorów do organizmów żywych to: (i) wziewna, przez układ oddechowy, (ii) pokarmowa, wraz ze spożywanym pokarmem oraz (iii) poprzez skórę (CZARNOMSKI i IZAK 2008).

Na podstawie Rozporządzenia Wspólnoty Europejskiej Nr 850/2004 substancje ropopochodne, w tym także wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, zaliczane

są do grupy tzw. trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) (ang. persistent organic pollutants, POPs) (KOŁWZAN 2000). Do tej grupy zalicza się również, obok WWA i substancji ropopochodnych, chlorofenole, bifenylole, dioksyne i pestycydy. W zależności od związku i medium, w jakim występują, a także czynników środowiskowych, procesy degradacyjne zachodzą z różną szybkością, a nowopowstające związki mogą stanowić obciążenie dla środowiska glebowego (VOGEL 1996).

Z kolei na podstawie Konwencji Sztokholmskiej w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych (umowa międzynarodowa podpisana 23 maja 2001 r. w Sztokholmie mająca na celu ograniczenie produkcji i stosowania substancji z grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych; weszła w życie 17 maja 2004 r.), wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne nie zostały zaliczone do tej grupy (CZARNOMSKI i IZAK 2008).

Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej, uwzględniając zapisy Traktatu (art. 175 ust. 3), podjęli działania zmierzające do redukcji zanieczyszczeń, aby ograniczyć ich szkodliwy wpływ na zdrowie ludzkie, z uwzględnieniem populacji wrażliwych i środowiska jako całości. Na podstawie doniesień naukowych, w Dyrektywie 2004/107/WE Parlamentu Europejskiego i Rady przyjęto, że arsen, kadm, nikiel i niektóre wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są substancjami mutagennymi, rakotwórczymi dla ludzi i nie można określić progu, poniżej którego substancje te nie stanowią ryzyka dla zdrowia ludzkiego. Wskazano, iż na niektórych terenach trudne jest osiągnięcie takich poziomów tych związków, które nie stwarzałyby ryzyka dla zdrowia ludzkiego (DYREKTYWA 2004).

Według DYREKTYWY (2004) benzo(a)piren powinien być stosowany jako marker rakotwórczego ryzyka związanego z obecnością pozostałych kancerogennych WWA. Określono wartość docelową dla benzo(a)pirenu obecnego we frakcji pyłu na poziomie 1 ngm^{-3} . Państwa członkowskie muszą podjąć takie działania, aby od 31 grudnia 2012 r. stężenie benzo(a)pirenu nie przekraczało wartości docelowej. Zgodnie z Dyrektywą monitorowaniu w powietrzu podlegają także inne grupy związków z grupy WWA, takie jak: benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten, benzo(j)fluoranten, benzo(k)fluoranten, indeno(1,2,3-cd)piren i dibenzo(a,h)antracen.

W Polsce głównymi źródłami emisji WWA są procesy spalania w sektorze komunalnym i mieszkaniowym (87,2% wielkości emisji w Polsce), procesy produkcyjne w przemyśle (11,11%) oraz transport drogowy (0,99%) (CZARNOMSKI i IZAK 2008). Z przedstawionych udziałów wielkości emisji z wymienionych źródeł wynika, że nawet na terenach nieuprzemysłowionych WWA mogą stwarzać zwiększone zagrożenie dla zdrowia ludzi. Oznaczane są one we frakcji pyłu zawieszonego, co wynika z faktu występowania w nim przede wszystkim związków o większej liczbie pierścieni. Węglowodory o czterech i więcej pierścieniach skondensowanych ulegają zaadsorbowaniu na cząstkach stałych.

Działania na rzecz odnowy środowiska glebowego, czyli jego rekultywacji, polegają

na likwidacji zanieczyszczeń oraz na przywróceniu pierwotnych właściwości fizykochemicznych i biologicznych gleby. O ile problem neutralizacji szkodliwych środowiskowo zanieczyszczeń można rozwiązać dzięki zastosowaniu różnorodnych metod fizycznych i chemicznych, to pełne odtworzenie warunków środowiska naturalnego uzyskuje się jedynie dzięki wykorzystaniu osiągnięć technologii biologicznych, biotechnologii (WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005). Ponadto, metody biologicznego oczyszczania są o wiele tańsze, zazwyczaj prostsze w stosowaniu i często efektywniejsze, a zrekultywowane gleby wykazują właściwości zbliżone do gleb niezanieczyszczonych.

ZANIECZYSZCZENIA ZWIĄZKAMI ROPOPOCHODNYMI

Skażenie środowiska glebowego ropą naftową i jej pochodnymi oddziałuje bezpośrednio na dany ekosystem. Ciężkie frakcje ropy naftowej obfitują w węglowodory o silnym działaniu mutagennym i kancerogennym. Węglowodory kumulują się w organizmach żywych, a ich szkodliwy wpływ obserwowany jest nawet po wielu latach (ATLAS 1995).

Degradujące działanie ropy naftowej na środowisko glebowe zależy głównie od składu chemicznego ropy (Tabela 1), fizycznych i chemicznych właściwości gleby, stopnia jej nasycenia ropą oraz charakteru szaty roślinnej. Działanie to jest zmienne w czasie, ponieważ lekkie frakcje ropy (o małej masie cząsteczkowej) szybko ulatniają się do atmosfery, cięższe zaś przenikają do głębszych

warstw gruntu. Przesycenie gleby ropą naftową poważnie ogranicza rozwój lub zakłóca życie większości drobnoustrojów glebowych i roślin (VOGEL 1996, WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005).

Zmniejszenie aktywności mikrobiologicznej gleby silnie zanieczyszczonej ropą naftową wynika głównie z naruszenia warunków troficznych i tlenowych. Nadmiar aktywnych form węgla organicznego powoduje niedobór azotu i fosforu oraz tlenu (ORTEGA-CALVO i współaut. 2003, 2013; BOSZCZYK-MALESZAK i współaut. 2006).

Obecność drobnoustrojów zdolnych do rozkładu węglowodórów wykryto w glebie na różnych szerokościach geograficznych i w odmiennych warunkach ekologicznych. Rozwój autochtonicznych drobnoustrojów

Tabela 1. Frakcje ropy naftowej (ATLAS 1995, KOŁWZAN 2000).

Frakcja ropy naftowej	Temperatura destylacji [°C]	Liczba atomów węgla
gaz	poniżej 20	C ₁ -C ₄
eter naftowy	20-60	C ₅ -C ₆
ligroina (lekka nafta)	60-100	C ₆ -C ₇
gazolina surowa benzyna	40-205	C ₅ -C ₁₀ i cykloalkany
nafta	175-325	C ₁₂ -C ₁₈ i związki aromatyczne
olej gazowy	powyżej 275	C ₁₂ i wyższe
olej smarowy	nietlona ciecz	długie łańcuchy przyłączone do struktur cyklicznych
asfalt lub koks naftowy	nietlone ciało stałe	struktury policykliczne

rozkładających węglowodory w glebie zanieczyszczonej ropą naftową można zwiększyć m.in. poprzez nawożenie azotowe i fosforowe (GOGOI i współaut. 2003), napowietrzanie i odkwaszanie środowiska glebowego (CHAINEAU i współaut. 2000).

Ropa naftowa to mieszanina węglodorów (alkanów, cykloalkanów, arenów: 80-90%), kwasów karboksylowych, fenoli, tioalkoholi, pochodnych tiofenu, azotowych związków heterocyklicznych, żywic i związków metaloorganicznych. Gęstość to 11-19 g/cm³, barwa brązowa lub czarna; odznacza się silnym, specyficznym zapachem. Skład ropy naftowej jest zmienny i zależy od miejsca wydobycia. Głównymi zanieczyszczeniami są nieorganiczne sole i

woda. Ropa naftowa jest przerabiana metodami: destylacji frakcyjnej (destylacja), rafinacji, ekstrakcji selektywnymi rozpuszczalnikami (np. glikolem dietylowym), krystalizacji i in. Otrzymuje się z niej eter naftowy, ligroinę, benzynę, naftę, oleje mineralne, mazut oraz surowce dla przemysłu chemicznego, np. benzen, toluen, ksyleny (hydrokraking, kraking, reforming katalizacyjny) (ATLAS 1995).

Opracowanie szczegółowych programów zapobiegania degradacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, rekultywacji gleb zdegradowanych i ponownego ich zagospodarowania jest przedmiotem wielu badań naukowych.

ZANIECZYSZCZENIA WIELOPIERŚCIENIOWYMI WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI

Już w 1775 r. sir Percival Pott wskazał na powiązania pomiędzy wzmożoną zachorowalnością na raka moszny u londyńskich kominarzy a ekspozycją na WWA. Wsunął hipotezę, że zachorowalność na nowotwory jest powiązana z ekspozycją na smołę i sadzę, z którą mieli do czynienia podczas wykonywania swojej pracy. Pott nie potrafił jeszcze nazwać i wyodrębnić związków chemicznych, które powodowały nowotwory. Dopiero po ponad 150 latach, w 1929 r., zidentyfikowano dibenzo(a,h)antracen występujący w sadzach, który jest odpowiedzialny za powstawanie chorób nowotworowych (KUBIAK 2013).

Związki te powstają w wyniku wysokotemperaturowego procesu niecałkowitego spalania materii organicznej, gdzie łatwiej jest wykorzystywany wodór niż węgiel. Atomy węgla pozostają nieutlenione w postaci termodynamicznie trwałych struktur pierścieni aromatycznych (MANAHAN 2006). Jako naturalne źródła emisji wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych do środowiska należy wymienić: pożary, wybuchy wulkanów, wypalanie traw i nieużytków. W niewielkich ilościach zawierają je także naturalne kopaliny, węgiel kamienny i ropa naftowa. Spośród źródeł generowanych przez człowieka najważniejszymi są: emisja gazów i dymów z zakładów przemysłowych (szczególnie z przemysłu ciężkiego) oraz procesy wytwarzania energii w elektrowniach i elektrociepłowniach. Istotnymi źródłami uwalnianie WWA do środowiska są także: motoryzacja (spaliny samochodowe, ścieranie się

opon) oraz dymy z kotłowni i pieców domowych. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne występują także w surowcach przemysłowych takich jak pak węglowy, oleje mineralne oraz w produktach ich obróbki: smole pogazowej, sadzach i oleju kreozytowym. Skład i ilość mieszanin WWA emitowanych do środowiska zależy od rodzaju substancji spalanej, metody spalania oraz stosowania filtrów i innych urządzeń chroniących przed ich emisją.

Tego typu zanieczyszczenia dostające się do gleby powodują wzrost zawartości węgla organicznego i zmianę stosunku C:N, destabilizują roztwory koloidalne, pogarszają strukturę gruzełkową gleby, przez co zmieniają się w niej stosunki powietrzno-wodne (SMRE CZAK i MALISZEWSKA-KORDYBACH 2003, MALISZEWSKA-KORDYBACH 2005, GAŁĄZKA i współaut. 2012, MALISZEWSKA-KORDYBACH i współaut. 2012).

Pomimo ograniczonej biodostępności, małej rozpuszczalności w wodzie i sorpcji na cząstkach glebowych, wykazano obecność aż 90% całkowitej ilości wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych w środowisku glebowym (PARALES i współaut. 2002).

W glebach znacznie oddalonych od źródeł emisji, poziom szesnastu najczęściej występujących WWA wynosi zwykle od 1,5 do 5 mg/kg suchej masy gleby, zaś stężenie benzo[a]pirenu od 0,001 do 0,01 mg/kg suchej masy gleby (KABATA-PENDIAS i współaut. 1995). Na tej podstawie zaproponowano czterostopniową skalę zanieczyszczenia gleb (SIUTA 2003):

- czyste – zawierające do 6 mg (16 WWA) na kilogram suchej masy gleby;
- umiarkowanie skażone – zawierające 6–31 mg/kg suchej masy gleby;
- znacznie zagrożone – 31–100 mg oznaczonych WWA na kg suchej masy gleby;
- wysoko zagrożone – powyżej 100 mg/kg suchej masy gleby.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą działać hamująco, stymulująco lub nie wykazywać wpływu na organizmy testowe (MALISZEWSKA-KORDYBACH 2005). WWA nie występują w przyrodzie pojedynczo, dlatego też w badaniach zarówno fitotoksyczności jak i ekotoksyczności często stosuje się mieszaninę tych związków lub produkty ropopochodne zawierające WWA, natomiast rzadziej badany jest wpływ pojedynczych węglowodorów (ATLAS 1996).

Zakres i szybkość degradacji WWA w glebie zależy zarówno od właściwości samych węglowodorów, jak i czynników środowiskowych. Z badań MALISZEWSKIEJ-KORDYBACH (2005) wynika, że niektóre właściwości gleby (kwasowość hydrolityczna, zawartość części spławialnych oraz zawartość substancji organicznej) mają wpływ na przebieg rozkładu WWA w początkowym okresie po wprowadzeniu tych związków do gleby.

Podstawowym czynnikiem warunkującym ekotoksykologiczne oddziaływanie WWA w środowisku glebowym jest ich biodostępność. Koncepcja biodostępności oraz ogólne informacje na temat metod oceny biodostępności są zawarte w normie ISO/DIS 17402 (MALISZEWSKA-KORDYBACH 2005).

Słaba rozpuszczalność węglowodorów w wodzie oraz ich adsorbowanie na cząsteczkach glebowych powoduje znaczne zmniejszenie ich biodostępności, co istotnie ogranicza proces bioremediacji (SEMPLE i współaut. 2003). Niska efektywność degradacji tych związków nie wynika ze zbyt małej aktywności metabolicznej mikroorganizmów, ale z niewielkiej dostępności substratów, tj. składników zanieczyszczenia. Zastosowanie związków powierzchniowo czynnych oraz biosurfaktantów produkowanych przez drobnoustroje powoduje desorpcję i zwiększa rozpuszczalność związków hydrofobowych w fazie wodnej, a w konsekwencji zwiększa tempo biodegradacji (ZHOU i ZHU 2007).

Biodostępność (całkowita zawartość zanieczyszczeń w glebie; frakcja biodostępna gleby) jest uzależniona przede wszystkim od rodzaju receptora, czasu jego kontaktu z zanieczyszczeniami oraz drogi pobrania.

Z biologicznego punktu widzenia, biodostępna jest ta frakcja związku chemicznego, która może zostać pobrana przez określony organizm lub wywołać efekt toksyczny. Natomiast z chemicznej strony, za dostępną uważa się taką ilość substancji chemicznej, która w danym czasie w specyficznych warunkach może desorbować z gleby do roztworu glebowego (SEMPLE i współaut. 2003). Stąd też za frakcję biodostępną uznaje się stężenie danej substancji w fazie wodnej gleby, którą określa się często metodami ekstrakcji chemicznej. Tak definiowana biodostępność może być uzależniona od właściwości gleby, m.in. od zawartości węgla organicznego, oraz od fizykochemicznych właściwości związków.

Najważniejszym procesem abiotycznym decydującym o biodostępności WWA, a tym samym o ich toksyczności, jest sorpcja tych związków przez gleby, a zwłaszcza przez substancję organiczną, ale również przez frakcje mineralne gleb (PARALES i współaut. 2002).

WWA dostając się do gleby ulegają szybkiej sorpcji przez glebową substancję organiczną, poprzez tworzenie wiązań wodorowych i oddziaływań sił van der Waalsa. Niektóre połączenia mają charakter odwracalny, co powoduje przechodzenie WWA do fazy wodnej gleby oraz umożliwia ich rozkład i zwiększa dostępność WWA dla organizmów glebowych. Część WWA bardzo silnie związana przez glebę nie podlega procesom desorpcji i pozostaje w niej, jako tzw. trwała pozostałość, przechodząc następnie w tzw. „starzejące się” zanieczyszczenie, czego konsekwencją jest zmniejszenie biodostępności WWA (MALISZEWSKA-KORDYBACH 2005).

O biodostępności zanieczyszczenia, intensywności pobierania organicznych ksenobiotyków z gleb i ich biodegradacji w dużym stopniu decydują właściwości fizykochemiczne tych związków, m.in. współczynnik podziału oktanol/woda, K_{ow} . Wiadomo, że związki charakteryzujące się wartością $\log K_{ow} < 5,0$ w tym WWA, o liczbie pierścieni w cząsteczce < 4 , mogą być pobierane i transportowane do nadziemnych części roślin. Sorpcyjne właściwości WWA w stosunku do glebowej substancji organicznej charakteryzowane są przez współczynnik podziału węgiel organiczny/woda: K_{oc} i skorelowany z nim parametr K_{ow} ($\log K_{ow}$) (MALISZEWSKA-KORDYBACH 2005).

Prowadzone badania potwierdzają obecność WWA w każdym z elementów środowiska: w wodzie, glebie, powietrzu atmosferycznym.

rycznym, w materiałach biologicznych oraz produktach spożywczych (KOŁWZAN 2000). Podwyższone zawartości tych związków w środowisku, w tym także w glebie, odnotowuje się na obszarach o silnej antropopresji (SIUTA 2003). Informacje o zawartości WWA w glebie są bardzo ważne ze względu na możliwość określenia potencjalnego zagrożenia dla konkretnych ekosystemów oraz dla zdrowia człowieka. Występują w postaci pyłów i sadzy w powietrzu atmosferycznym oraz na powierzchni gleby i wód powierzchniowych. WWA wykazują zdolność do migracji pomiędzy poszczególnymi elementami środowiska, często ulegając przemianom w inne związki, które są lepiej rozpuszczalne w wodzie i często bardzo szkodliwe dla organizmów żywych. WWA stwierdzono zarówno w glebach z pól i lasów położonych z dala od autostrad i przemysłu, jak również w piaskach nadbrzeżnych Grenlandii. Fakty te wskazują, że część wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku jest pochodzenia endogenego. Należy jednak pamiętać, że działalność człowieka jest tu dominująca, a gwałtowny rozwój przemysłu i komunikacji spowodował znaczny wzrost zawartości tych związków w przyrodzie. Ogromna różnorodność i złożony charakter przemian WWA, szczególnie

w środowisku gruntowo-wodnym wzbudziły zainteresowanie wielu naukowców (KABATA-PENDIAS i współaut. 1995, MALISZEWSKA-KORDYBACH 2005).

Ponadto, źródłem WWA dla gleb użytkowanych rolniczo mogą być osady ściekowe i komposty stosowane w celach nawozowych, ścieki i spływy z dróg asfaltowych, a także paliwo i smary stosowane do maszyn rolniczych. Większość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ostatecznej kolejności dostaje się do środowiska glebowego, powodując w mniejszym lub większym stopniu jego zanieczyszczenie. Zbyt wysoka zawartość niektórych WWA w glebach może wpływać negatywnie na organizmy glebowe, a tym samym prowadzić do zmian w bioróżnorodności i naruszać siedliskowe funkcje gleb, co ma szczególne znaczenie w przypadku gleb wykorzystywanych rolniczo. Środowiskowe zagrożenie ze strony WWA jest silnie zróżnicowane i zależy od ich stężenia oraz rodzaju samego związku. Rośliny uprawne mogą ulegać zanieczyszczeniu przez WWA zarówno w wyniku opadów atmosferycznych, jak i pobierając je z gleby. W niekorzystnych warunkach może to prowadzić do ich akumulacji w łańcuchu pokarmowym człowieka, wywierając wysoce niekorzystny wpływ na jego zdrowie.

WSKAŹNIKI DEGRADACJI GLEBY

Rekultywacji wymagają gleby zanieczyszczone ropopochodnymi substancjami w stopniu ograniczającym wegetację roślin albo pogarszającym odżywczo lub technologiczną ich jakość. Zanieczyszczenia gleby dzielimy na (SIUTA 2003):

- odgórne – przez długotrwałe rozpraszanie płynnych i stałych substancji ropopochodnych;
- odgórne – przez wylewy ropy lub jej pochodnych;
- odgórne – przez wprowadzenie substancji ropopochodnych lub zaolejonych odpadów o stałej i/lub ciekłej konsystencji;
- oddolne – przez podsiąkającą ropę lub jej pochodne z podziemnych źródeł.

Powierzchniowa warstwa gleby (biologicznie czynna) może być zdegradowana w stopniu:

- małym – brak ujemnego wpływu na wegetację roślin przy ewentualnej zawarto-

ści węglowodorów w powierzchniowej warstwie gleby;

- średnim – punktowe zamieranie roślinności darniowej, wyraźne osłabienie wegetacji roślin uprawnych;
- dużym – płatowe zamieranie roślinności darniowej, spadek plonowania roślin uprawnych o ok. 50%;
- bardzo dużym – zanikanie lub całkowite zamarcie roślinności darniowej, niemożliwa wegetacja roślin uprawnych bez zastosowania zabiegów rekultywacyjnych.

Istotnym kryterium oceny zdegradowania gleby jest stosunek zawartości węgla do azotu w próchnicznej warstwie gleby (PARALES i współaut. 2002). Kryterium to jest mało przydatne do odróżnienia gleby czystej od słabo zanieczyszczonej węglowodorami i odwrotnie. Przy dużym zanieczyszczeniu gleby wartość ilościowego stosunku C:N jest proporcjonalna do stopnia zanieczyszczenia gleby (SWINDELL i REID 2006).

W poziomie próchnicznym gleb uprawnych zawartość azotu ogólnego, w porównaniu do zawartości węgla organicznego, pozostaje w stosunku C:N = 10. W glebach bardzo czynnych biologicznie (żyźnych) stosunek ten wynosi ok. 8:1 (BARAN i TURSKI 1996). W glebach mineralnych i o małej aktywności biologicznej (suche gleby piaskowe, podmokłe gleby o różnej granulacji) wartość stosunku C:N jest znacznie większa i zależy od wielu czynników. W glebach mineralnych wynosi:

- 8:1-10:1 – gleba czysta,
- 10:1-17:1 – gleba słabo zdegradowana,
- 17:1-30:1 – gleba średnio zdegradowana,
- 30:1-45:1 – gleba w dużym stopniu zdegradowana,
- powyżej 45:1 – gleba silnie zdegradowana.

Szata roślinna lub jej całkowity zanik odzwierciedlają stan degradacji gleby, jednak nie ma wyraźnej zależności pomiędzy aktualną zawartością węglowodorów w glebie a wegetacją roślin. Gleba stale zanieczyszczona może być całkowicie zdegradowana (bez roślinności) przy stosunkowo małej zawartości węglowodorów. Stosunek węgla do azotu jest więc lepszym wskaźnikiem degradacji gleby niż zawartość w niej węglowodorów (ATLAS 1995).

Bezpośrednim zadaniem rekultywacji zalejonych gruntów jest przywrócenie biolo-

gicznej aktywności i użytkowych walorów gleby. Pośrednim zadaniem rekultywacji jest zlikwidowanie źródła zanieczyszczenia. Zależnie od charakteru i stopnia zalejenia gleby oraz stanu roślinności, wyróżnia się rekultywację podstawową i higienizację glebowo-roślinną. Gleby zanieczyszczone ropopochodnymi składnikami w stopniu niepowodującym zniszczenia trwałej szaty roślinnej oraz umożliwiającym wegetację roślin uprawnych powinny być higienizowane przez sterowaną biodegradację węglowodorów. Gleby zanieczyszczone incydentalnie (w sposób nieciągły), jeżeli zachowują warunki do wegetacji roślin, mogą być pozbawione nadmiaru węglowodorów w ciągu jednego roku. Gleby zanieczyszczone w sposób ciągły wymagają stałej profilaktycznej higienizacji. W glebach biodegradacja węglowodorów wymaga (GOGOI i współaut. 2003): (i) zrównoważonego stosunku węgla organicznego do azotu i fosforu, (ii) natlenienia zalejonej warstwy gleby, (iii) wilgotności gleby umożliwiającej dużą aktywność mikrobiologiczną oraz (iv) niekwaśnego odczynu środowiska.

W środowisku glebowym poszczególne składniki zanieczyszczenia mogą mieszać się z powietrzem glebowym i w tej formie występują głównie lotne węglowodory alifatyczne i aromatyczne. Cięższe frakcje ropy naftowej ulegają adsorpcji na powierzchni cząstek glebowych lub są wymywane do głębszych warstw, a ostatecznie do wód podziemnych.

METODY BIOREMEDIACJI

Proces samorzutnego oczyszczania zalejonej gleby jest często długotrwały i wiąże się zarówno z przebiegiem spontanicznych reakcji fizykochemicznych, prowadzących do rozkładu zanieczyszczenia, jak i z występowaniem na danym terenie autochtonicznych organizmów żywych, przejawiających specyficzne aktywności enzymatyczne (GAO i ZHU 2004). Mikroorganizmy glebowe są zdolne

do tzw. bioremediacji zanieczyszczenia, czyli jego unieszkodliwienia w wyniku: rozkładu i utlenienia (biodegradacji), przyswojenia (asymilacji), bądź przetworzenia na nietoksyczne związki chemiczne (biotransformacji). Zanieczyszczenia, jako związki obce środowisku naturalnemu, słabo przyswajalne i trudno metabolizowane, są ksenobiotykami (MROZIK i współaut. 2005).

BIOREMEDIACJA *IN SITU* I *EX SITU*

Bioremediację można stosować *in situ*, tzn. w miejscu powstania skażenia, jak też *ex situ*, tzn. po przeniesieniu zanieczyszczonego materiału do warunków kontrolowanych.

Metody *in situ* preferowane są w sytuacji braku możliwości usunięcia skażonej gleby,

np. na obszarach przeznaczonych pod budownictwo, terenach wałów przeciwpożarowych, dróg, awarii miejscowych pod rurociągami i instalacjami, skażeń dużych obszarów itd. Wśród sposobów oczyszczania *in situ* wymienić należy: uprawę gleby, bioekstrak-

cję i biowentylację. Likwidacja skażeń tą metodą wymaga znajomości geologicznej struktury gruntu, topografii skażeń oraz kierunku przemieszania się wód gruntowych (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005).

Metody *ex situ* są stosowane przy mniej rozległych i świeżych skażeniach, które charakteryzują się jednocześnie stosunkowo wysokim stężeniem, zapobiegają „rozprzestrzenianiu” zanieczyszczenia, a przede wszystkim jego przedostawaniu się do wód gruntowych. Bioremediacja *ex situ* (obejmuje dwie metody: agrotechniczną i przyzmoiania) może być lepiej kontrolowana i łatwiej udaje się stworzyć optymalne warunki dla przebiegu tego procesu (PARALES i współaut. 2002).

Szybkość procesu bioremediacji zależy od chemicznego charakteru zanieczyszczeń oraz

od struktury środowiska glebowego; np. gleby wykazujące duży stopień spoistości, czyli gliny, ropy, mady, pyły, piaski gliniaste, wymagają dodatkowych zabiegów zwiększających ich przepuszczalność. Na sukces bioremediacji mają wpływ: fizyczno-chemiczne cechy skażonej gleby (pH, zawartość i dostępność wody oraz struktura gleby), warunki klimatyczne (głównie temperatura) oraz biodostępność zanieczyszczenia. Czynniki te są szczególnie istotne w przypadku bioremediacji *in situ*. Część z nich udaje się modyfikować w znacznym stopniu, niektórych jednak nie można zmienić w miejscu skażenia (ANDREONI i GIANFREDA 2007). Prawidłowe modyfikowanie warunków może prowadzić do pełnego wykorzystania potencjału biodegradacyjnego skażonego środowiska.

BIOLOGICZNE METODY OCZYSZCZANIA GLEB

Biologiczny rozkład trwałych, organicznych zanieczyszczeń przez mikroorganizmy jest jednym z najważniejszych i najefektywniejszych sposobów usuwania ich ze środowiska (MROZIK i współaut. 2005). Mikroorganizmy podczas biodegradacji często wykazują działanie synergistyczne (VOGEL 1996). Na zakres i szybkość przemian biodegradacyjnych wpływa: skład i aktywność flory bakteryjnej, właściwości i wiek zanieczyszczenia, obecność innych związków oraz właściwości fizykochemiczne środowiska (LORS i współaut. 2012).

Prawidłowo zastosowane metody biologiczne mogą zwiększyć przeżywalność roślin w trudnych warunkach poprzez podniesienie dostępności składników odżywczych, obniżenie stresu związanego z niską dostępnością wody, zwiększenie odporności na patogeny, wzrost produkcji fitohormonów oraz poprawę struktury podłoża. Mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową, w porównaniu z innymi organizmami, zdolnością adaptacji do nowych warunków środowiska, czyli traktowania związków niebędących produktami ich własnych przemian metabolicznych, jako substratów energetycznych i budulcowych (ANDREONI i GIANFREDA 2007).

Rozkład związków organicznych w środowisku może odbywać się przy udziale mikroorganizmów i enzymów, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Metody biologiczne polegają na stworzeniu optymalnych warunków dla rozwoju mikroorga-

nizmów glebowych zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych. Prowadzi to do przyspieszenia procesów, które już naturalnie zachodzą w środowisku. Produkty ropopochodne w wyniku aktywności metabolicznej drobnoustrojów ulegają całkowitemu lub częściowemu przekształceniu w masę bakteryjną i stabilne, nietoksyczne produkty końcowe, CO₂ i H₂O w warunkach tlenowych, a CH₄ w beztlenowych (MANAHAN 2006).

Bioremediacja wymaga zwiększenia liczności i aktywności degradacyjnej endogennej mikroflory, a w razie potrzeby wprowadzenia w postaci szczepionki mikroorganizmów intensywnie degradujących zanieczyszczenie. Ważnym elementem procesu jest przeprowadzenie wstępnych testów laboratoryjnych, których wyniki są podstawą do podejmowania dalszych decyzji co do szczegółowych rozwiązań. Badania te powinny określić rodzaj i strukturę substancji chemicznych, stanowiących skażenie, umożliwić zdefiniowanie zależności tempa procesu bioremediacji od: pH, stężenia tlenu, stężenia substancji odżywczych, temperatury, potencjału red-ox, porowatości gleby (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005). Bioremediację dzielimy na 6 rodzajów.

Bioremediacja podstawowa to monitorowanie naturalnie zachodzących procesów w miejscu skażenia. Jest to proces, podczas którego jedynie naturalna mikroflora jest wykorzystywana do obniżania koncentracji zanieczyszczenia w glebie do bezpiecznego pozio-

mu, w określonych i akceptowalnych ramach czasowych.

Biostymulacja to stymulacja rodzimej mikroflory w celu przyspieszenia procesu bioremediacji. Czynniki ograniczające naturalny proces biodegradacji to: skrajnie wysokie stężenie substancji stanowiącej skażenie, niedobór tlenu, niekorzystne pH, niedobór substancji mineralnych (zawierających azot i fosfor), zbyt niska wilgotność i niekorzystna temperatura. W celu zwiększenia tempa procesu można zastosować różne metody modyfikacji warunków środowiskowych, przede wszystkim: natlenianie i dodawanie pożywek. Procesy bioremediacji efektywniej zachodzą w warunkach tlenowych (ALEXANDER 1999). Tlen jest wbudowywany w strukturę związku w reakcji katalizowanej przez oksygenazy (WÓJCIK i TOMASZEWSKA 2005), a w rezultacie związek staje się bardziej podatny na dalszą transformację. Najczęściej stosowane procesy natleniania to:

- wentylacja, która pozwala na zwiększenie koncentracji tlenu w zanieczyszczonym gruncie poprzez wtłaczanie powietrza pod zwiększonym ciśnieniem przez układ przewodów (drenów);

- stosowanie rozcieńczonych roztworów wody utlenionej, której rozkład w gruncie powoduje uwolnienie tlenu i umożliwia aerobowy metabolizm mikroorganizmów;

- spulchnianie gruntu przez uprawę mechaniczną.

Najczęściej jednak stosuje się biowentylację, w wyniku której następuje usunięcie lotnych frakcji zanieczyszczenia (wentylacja) i przyspieszenie rozkładu cięższych (właściwa biowentylacja) (SIUTA 2003).

Tempo procesu biodegradacji może być zmniejszone przez ograniczone stężenie substancji odżywczych. Węglowodory zbudowane są głównie z węgla i wodoru, a tylko część z nich zawiera stosunkowo małe ilości azotu. To powoduje, że w tak skażonej glebie znacznie wzrasta stosunek C:N. Występujący w dużej ilości węgiel nie może być jednak w pełni wykorzystany przez mikroorganizmy jako źródło energii i przekształcany w masę bakteryjną. Wiele badań wskazuje na konieczność uzupełniania skażonego środowiska azotem i fosforem (PARALES i współaut. 2002). W warunkach, w których deficyt azotu i fosforu ogranicza efektywność procesu bioremediacji, bardzo dobre efekty daje sztuczne wzbogacanie rekultywowanego terenu, najczęściej przez zastosowanie nawozów zawierających azot i fosfor.

Bioaugmentacja to zwiększenie populacji mikroorganizmów. Wzbogacenie zanieczyszczonego terenu w specjalnie wyselekcjonowane mikroorganizmy o dużej zdolności do biodegradacji zanieczyszczeń, stosuje się w przypadku, gdy rodzima populacja drobnoustrojów na skażonym terenie nie wykazuje pożądanego tempa lub/i rozmiaru biodegradacji zanieczyszczenia. Technologię tę realizuje się poprzez bezpośrednie wprowadzenie zawiesiny mikroorganizmów o pożądanego aktywności katalitycznej, wraz z substancjami odżywczymi, (jeżeli to konieczne) do skażonej gleby (KUREK i współaut. 2001).

Bioaugmentacja wiąże się z wieloma ograniczeniami. Wprowadzone do gleby drobnoustroje: (i) nie mogą być patogenami dla roślin i zwierząt, (ii) nie powinny wytwarzać toksyn, (iii) wskazane jest, by nie były odporne na antybiotyki, (iv) nie powinny uczestniczyć w częstej wymianie genów kodujących niepożądane cechy (np. antybiotykooporności, czy produkcji toksyn) oraz (v) pożądanego jest, by były konkurencyjne w stosunku do endogennej mikroflory.

Zdarza się jednak, że przy skażeniach bardzo specyficznym związkiem, nie udaje się pozyskać populacji mikroorganizmów syntetyzujących odpowiednie enzymy, niezbędne do rozkładu zanieczyszczenia. Powstaje wtedy konieczność zastosowania szczepów skonstruowanych metodami inżynierii genetycznej. Ich wykorzystanie niesie jednak za sobą pewne ryzyko i wymaga szczegółowych badań. Dotyczy ono głównie przekazywania endogennej mikroflorze niepożądanych genów przez mikroorganizmy genetycznie zmodyfikowane (SAMANTA i współaut. 2002).

W wielu doświadczeniach stwierdzono zwiększone tempo bioremediacji przy stosowaniu odpowiedniej szczepionki drobnoustrojów glebowych. Po wprowadzeniu do gleby mieszanki bakterii z rodzajów: *Rhodococcus chlorophenolicus*, *Flavobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., stwierdzono wzmoczoną degradację pentachlorofenolu (KALLIMANIS i współaut. 2007). Podobne rezultaty uzyskano przy użyciu szczepu bakterii *Alcaligenes* sp. i grzyba *Phanerochaete chrysosporium* do degradacji fenantrenu oraz *Mycobacterium* (MOODY i współaut. 2001) oraz *Streptomyces* (CHAUDHARY i współaut. 2011). Wyraźnie większą mineralizację polichlorowanych bifenyli w glebie uzyskano dzięki wprowadzeniu szczepów bakterii z rodzajów: *Pseudomonas*

Tabela 2. Rodzaje fitoremediacji (Liste i Prutz 2006).

Nazwa metody	Mechanizm
Fitоекstrakcja	usuwanie metali ciężkich i związków organicznych dzięki akumulacji w zbieralnych częściach roślin:
ciągła	- naturalne hiperakumulatory - długi czas akumulacji
indukowana	- zwiększenie pobierania i skrócenie czasu akumulacji dzięki dodawaniu chelatorów
Fitodegradacja	rozkład substancji organicznych przez rośliny i związane z nimi mikroorganizmy
Filtracja korzeniowa	usuwanie zanieczyszczeń ze ścieków i środowisk wodnych dzięki absorpcji na korzeniach roślin
Ryzofiltracja	
Fitostabilizacja	użycie roślin w celu unieruchomienia zanieczyszczeń w glebie i zmniejszenia ich dostępności w środowisku
Fitoewaporacja	przeprowadzenie zanieczyszczeń w stan lotny
Fitostymulacja	stymulacja przez rośliny naturalnie występujących procesów degradacji mikrobiologicznej w ryzosferze
Epuwalizacja	połączenie filtracji korzeniowej z bioremediacją; rośliny korzystają ze związków mineralizowanych przez bakterie – zwiększenie produkcji biomasy roślinnej

sp. i *Azospirillum* spp. (GAŁĄZKA i współaut. 2012).

W laboratorium zwykle uzyskuje się szczepionkę o bardzo wysokiej aktywności degradacyjnej w stosunku do skażenia, ale po jej wprowadzeniu do środowiska naturalnego najczęściej jej zdolności biodegradacyjne są słabsze, ponieważ właściwości fizykochemiczne gleby oraz czynniki biologiczne, np. zawartość substancji organicznej, oddziaływania pomiędzy organizmami, w znaczny sposób zmieniają aktywność wprowadzonych mikroorganizmów. Istotną rolę odgrywają także inne czynniki biologiczne: drapieżnictwo, konkurencja z endogenną mikroflorą o zanieczyszczenie stanowiące źródło węgla i inne związki odżywcze, antybioza, represja kataboliczna itp. Na efekt bioaugmentacji wpływa także sam sposób wprowadzania mikroorganizmów oraz ich przemieszczanie się w glebie. Obecnie spore nadzieje wiąże się z immobilizacją drobnoustrojów na nośnikach stałych, co zwiększa ich przeżywalność i utrzymuje aktywność metaboliczną. Do immobilizacji wykorzystuje się ulegające biodegradacji, nietoksyczne biopolimery: alginat i kolagen. Kapsułki biopolimerów wzbogaćca się dodatkowo w składniki odżywcze i ochronne, co ułatwia bakteriom przystosowanie do niekorzystnych warunków panujących w skażonym środowisku (WANG i współaut. 2007).

Elektrobioremediacja to ogólna nazwa dużej grupy metod oczyszczania gruntu, wykorzystujących zjawiska zarówno mikrobiologiczne jak i chemiczne w celu degradacji różnego rodzaju zanieczyszczeń, a także zjawiska elektrokinetyczne w celu przyspieszenia i właściwego zorientowania transportu zanieczyszczeń lub ich pochodnych w glebie. Bezpośrednie oddziaływanie pola elektrycznego na roztwór elektrolitu znacznie przyspiesza jego przepływ przez porowatą fazę stałą i pozwala kontrolować kierunek tego przepływu. Zastosowanie pola elektrycznego, w połączeniu z odpowiednimi substancjami dodatkowymi (pożywki, akceptory elektronów), powoduje wytworzenie korzystnych warunków dla biodegradacji zanieczyszczeń podatnych na ten proces.

Fitoremediacja nazywamy technologię oczyszczania gleby wykorzystującą naturalne zdolności roślin do pobierania i gromadzenia substancji zanieczyszczających lub do ich biodegradacji, jak również zastosowanie roślin do stabilizacji podłoża i hamowania procesu erozji gleb (LISTE i FELGENTREU 2006, LISTE i PRUTZ 2006).

Metody biologiczne z użyciem roślin polegają głównie na: (i) tolerancji dużych stężeń związków toksycznych, (ii) pobieraniu, akumulacji i metabolizmie substancji toksycznych w dużych ilościach we własnych organach, (iii) stabilizacji zanieczyszczenia

w glebie bądź (iv) przekształceniu substancji toksycznych w środowisku w związki nietoksyczne. Idea użycia roślin do remediacji środowiska naturalnego wykorzystywana była od dawna, jednakże dopiero wiele odkryć w różnych dyscyplinach nauk biologicznych i rolniczych pozwoliło na zaoferowanie obiecujących wariantów tej technologii (Tabela 2) (SINGH i JAIN 2003, SEO i współaut. 2007).

Istnieje duże zróżnicowanie zarówno między, jak i wewnątrzgatunkowe w reakcji roślin na zanieczyszczenie. W praktyce wykorzystuje się głównie gatunki i odmiany gromadzące mniejsze ilości toksycznych substancji, ale tworzące znacznie większą biomasę, ponieważ ostatecznym kryterium ich przydatności jest ilość zgromadzonych przez nie zanieczyszczeń (LISTE i PRUTZ 2006).

Obecnie dominują i są rozwijane dwie zasadnicze strategie fitoremediacyjne: indukowana fitoekstrakcja (związki chelatujące) oraz fitoekstrakcja ciągła. W czasie obserwacji stanowisk naturalnych oraz poszukiwań i selekcji odpowiednich roślin przydatnych do fitoekstrakcji najczęściej potencjalnych kandydatów znaleziono w rodzinie kapustnych (Brassicaceae) (PARALES i współaut. 2002), traw (Poaceae) (MERKL i współaut. 2005) oraz wśród motylkowatych (Papilionaceae) (SMREZAK i MALISZEWSKA-KORDYBACH 2003).

W rodzinie traw dużą biomasę tworzą: kukurydza (*Zea mays*) oraz przedstawiciele rodzajów: *Festuca*, *Trifolium*, *Lolium* i *Panicum*. Polskie odmiany z tych rodzajów wykazują zróżnicowanie zarówno w zdolności do pobierania zanieczyszczeń, transportu do części nadziemnych, jak i produkcji biomasy. Mniej informacji zgromadzono na temat przydatności do fitoremediacji roślin z rodziny motylkowych, które są cenne dzięki umiejętności samozaopatrzenia się w azot. Obok gromadzących znaczną biomasę, różnych gatunków *Vicia* sp. i *Pisum arvense*, najlepiej ocenianymi fitoremedianami są *Lupinus* sp., gdyż niektóre gatunki gromadzą znaczne ilości biomasy. Ze względów agrotechnicznych i ekonomicznych na pierwszym miejscu są gatunki wieloletnie, np. *Lupinus polyphyllus*.

Większość roślin unika pobierania zanieczyszczeń do swych tkanek poprzez zatrzymanie ich na powierzchni korzeni, jednak gdy to już nastąpi, rośliny starają się zatrzymać dalszy ich transport; w konsekwencji, korzenie zawierają zwykle największe ilości zanieczyszczeń.

Bioremediacja w ryzosferze. Aktywność mikroorganizmów w strefie korzeniowej jest jednym z czynników warunkujących wzrost roślin i ich odporność na zanieczyszczenie. W warstwie gleby przylegającej do korzeni spotyka się bakterie i grzyby w wielokrotnie większej ilości (od kilku do nawet kilkunastu razy) niż w glebie poza ich zasięgiem. Strefa obejmująca glebę otaczającą korzeń, jego powierzchnię i komórki kory, często skolonizowane przez mikroorganizmy, nazywa się ryzosferą (CURL i TRUELOVE 1986) i jest to obszar intensywnej działalności mikrobiologicznej i ścisłej zależności między rośliną, glebą i mikroorganizmami. Zjawisko to po raz pierwszy zauważył Hiltner w 1904 r. w strefie korzeniowej roślin motylkowatych. Strefa korzeniowa jest siedliskiem dogodnym do rozwoju mikroorganizmów ze względu na jej zasilenie w bogate energetycznie wydzieliny korzeniowe składające się z produktów fotosyntezy roślin.

Strefa ryzosferowa roślin jest miejscem, o znacznie wyższej niż w glebie obfitości substratów pierwotnych dostarczanych przez wydzieliny korzeniowe. Obserwuje się tu zwiększone tempo bioremediacji organicznych zanieczyszczeń, w porównaniu z glebą nieryzosferową. Wiąże się to przede wszystkim z aktywnością metaboliczną mikroflory licznie zasiedlającej ryzosferę. Do najlepiej poznanych grup organizmów ryzosfery należą symbiotyczne bakterie brodawkowe roślin motylkowatych, grzyby mikoryzowe oraz bakterie i grzyby stymulujące wzrost roślin (ang. plant growth promoting rhizobacteria, PRGR) (ZHUANG i współaut. 2007).

Organizmy te budują swoistego rodzaju konsorcja, wpływające na roślinę poprzez interakcję z patogenami lub pobudzające wzrost rośliny poprzez wydzielanie witamin i hormonów. Do tej grupy między innymi należą ryzobakterie z rodzaju *Azospirillum*, wiążące wolny azot, które zalicza się do fakultatywnych endofitów zdolnych do kolonizacji zarówno zewnętrznej powierzchni korzenia, jak i wewnętrznej przestrzeni międzykomórkowej, korzystnie oddziałujących na wzrost i rozwój roślin, oraz bakterie *Pseudomonas stutzeri* (GAŁAZKA i współaut. 2012).

W wydzielinach korzeniowych roślin obecne są zarówno małowcząsteczkowe związki takie jak: cukry, aminokwasy, kwasy organiczne, hormony, witaminy, jak i związki o dużej masie cząsteczkowej, np. enzymy i spolimeryzowane węglowodany (LU i współaut. 2011, 2012). Znajdują się tu także sub-

stancje pochodzące ze zautolizowanych komórek epidermalnych korzenia. Wszystkie te substancje określane są mianem ryzodepozytów. Wiele z nich stanowi naturalne analogi składników zanieczyszczenia, co powoduje, że w glebie selekcjonuje się odpowiednia populacja mikroorganizmów zdolnych do ich rozkładu. Uważa się, że istotne znaczenie w procesie fitoremediacji mogą mieć również enzymy uwalniane do środowiska glebowego po obumarciu rośliny. Należą do nich: deha-

logenazy, nitroreduktazy, peroksydazy wykazujące znaczną aktywność katalityczną w stosunku do wielu organicznych składników zanieczyszczenia (MARCHENKO i współaut. 2001, LINDGRENA i współaut. 2014).

Penetracja gleby przez system korzeniowy poprawia stosunki powietrzno-wodne a wydzieliny korzeniowe stanowią substancję odżywczą dla drobnoustrojów glebowych. W ryzosferze zmienia się również pH i stężenie substancji mineralnych.

MIKROORGANIZMY UCZESTNICZĄCE W PROCESIE BIOREMEDIACJI

Jedynie 0,01-1% ogólnej liczby bakterii glebowych stanowią mikroorganizmy zdolne do rozkładu węglowodorów (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA. 2005). Wśród bakterii wykorzystujących węglowodory jako jedyne źródło węgla i energii są: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, a spośród grzybów rodzaje: *Candida*, *Saccharomyces*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Geotrichum*. Także wiele rodzajów promieniowców (*Acinomyces*, *Nocardia*, *Streptomyces*) oraz cyjanobakterie i glony (*Oscillatoria*, *Anabena*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Chlamidomonas*, *Scenedesmus*, *Phormidium*) (THAVAMANI i współaut. 2012, NIEPCERON i współaut. 2013) biorą udział w degradacji węglowodorów

WWA są głównie wykorzystywane jako źródło węgla i energii przez *Mycobacterium* (MOODY i współaut. 2001) i grzyby z gatunków: *Cunninghamella elegans*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Syncephalastrum racemosum*, które mają zdolność utleniania antracenu, naftalenu, fenantrenu i pirenu (SEO i współaut. 2005, PORTET-KOLTALO i współaut. 2013).

W glebach zanieczyszczonych antracem, fenantrenem i pirenem znane są przede wszystkim bakterie z rodzaju *Pseudomonas* takie jak: *P. fluorescens*, *P. putida* i *P. paucimobilis* oraz gatunek *P. stutzeri*, wiążący wolny azot w obecności różnych substratów będących źródłem węgla i energii. Natomiast mieszanka szczepów bakterii: *P. paucimobilis*, *P. vesicularis* i *Alcaligenes denitrificans* jest zdolna do degradacji fenantrenu, fluorenu i fluorantenu (GAŁĄZKA i współaut. 2012).

W glebach zanieczyszczonych związkami pirenu obecne są przede wszystkim bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, które wykorzy-

stują ten związek jako jedyne źródło węgla i energii, np. *Mycobacterium* sp. szczep PYR-1 rozkładający wszystkie związki 3-, 4- i 5-pierścieniowe WWA z wyjątkiem chryzenu, *M. flavescens* i *Mycobacterium* sp. szczep KR2. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*: *P. putida*, *P. aeruginosa* oraz *Flavobacterium* sp., wyizolowane z zanieczyszczonych gleb, są zdolne do metabolizowania fluorantenu i pirenu w pożywkach z dodatkiem węgla organicznego (YU i współaut. 2014).

Zdolność do wykorzystywania przez mikroorganizmy węglowodorów jako źródła węgla i energii, warunkuje informacja genetyczna kodująca syntezę enzymów uczestniczących w ich przemianach do acetylo-CoA (WOJCISZYŃSKA i współaut. 2005). Najczęściej jest ona zlokalizowana na pozagenomowych elementach, plazmidach lub w genomie bakterii. Dioksygenaza katecholowa jest głównym enzymem odpowiedzialnym za przekształcanie węglowodorów aromatycznych, katalizuje ona pierwszy etap ich oksydacji. W mineralizacji węglowodorów dwupierścieniowych, przede wszystkim naftalenu i bifenylu, uczestniczą liczne opisane i zbadane operony: *pah*, *nag*, *nah*, *tod*, *bph*, *dox* (ZHONG i współaut. 2007, ZHANG i współaut. 2013).

Mikroorganizmy wykazujące zdolność do biodegradacji węglowodorów wykorzystują je jako źródło węgla i energii. Warunkiem sprawnego przebiegu procesu jest dostępność węgla organicznego. Czynnikiem ograniczającym biodostępność substancji ropopochodnych jest ich relatywnie niska rozpuszczalność w wodzie, obniżająca się wraz ze wzrostem długości łańcucha lub liczbą pierścieni w cząsteczce. Stopień rozkładu zależy od katalitycznej sprawności enzymów obecnych w komórkach lub indukowanych wobec konkretnych substratów. Mikroorga-

Tabela 3. Podstawowe geny kodujące enzymy biorące udział w biodegradacji WWA (YU i współaut. 2014).

Gen	Enzym	Przedstawiciele
<i>alkB</i>	hydroksylaza alkanowa	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.
<i>catA</i>	dioksygenaza 2,3-katecholowa	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>xylE</i>	dioksygenaza 2,3-katecholowa	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>ndoB</i>	dioksygenaza naftalenowa	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> , <i>Xanthomonas maltophilia</i>
<i>todC</i>	dioksygenaza toluenowa	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>bphA</i>	dioksygenaza bifenylova	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>

nizmy aktywne w rozkładzie ksenobiotyków mają geny: *alkB*, *catA*, *xylE*, *ndoB*, *todC* czy *bphA*, które zlokalizowane są w większości przypadków na plazmidach, dzięki czemu mogą podlegać horyzontalnemu transferowi genów, a także być wykorzystywane jako markery w identyfikacji drobnoustrojów biodegradacyjnych (Tabela 3).

Pobieranie węglowodorów przez komórki mikroorganizmów może zachodzić w drodze (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005): (i) wprowadzania mikrokropki o wymiarach mniejszych niż wielkość komórki, (ii) transportu makrokropki oraz (iii) pobierania składników rozpuszczonych lub wolnych, przy czym w wodzie ulega rozpuczeniu niewielka ilość węglowodorów charakteryzujących się małym ciężarem cząsteczkowym. Wprowadzenie mikrokropki do komórek mikroorganizmów jest możliwe dzięki wytwarzaniu substancji

powierzchniowo czynnych (SPC), które emulgują cząsteczki węglowodorów i ułatwiają przenikanie tych związków przez błonę komórkową. Zastosowanie SPC powoduje nie tylko emulgację związków lipofilowych, lecz także umożliwia adhezję komórek do substratów hydrofobowych (ZHOU i ZHU 2007). Wśród biosurfaktantów wytwarzanych przez drobnoustroje znajdują się wielkocząsteczkowe kompleksy złożone z polisacharydów, kwasów tłuszczowych, białek (glikolipidy, lipopeptydy, kwasy tłuszczowe, fosfolipidy, tłuszcze obojętne). Budowa tych kompleksów jest zbliżona do ściany komórkowej bakterii, co wskazuje, że pochodzą z częściowo rozłożonych składników otoczek lub ścian komórkowych. Liczebność drobnoustrojów heterotroficznych, zdolnych do wykorzystywania węglowodorów jako jedyne źródła węgla i energii, jest różna w poszczególnych ekosystemach wodnych i lądowych. Do rozkładu kompleksowych mieszanin, takich jak ropa naftowa, zdolne są mieszane kultury drobnoustrojów o zróżnicowanej charakterystyce fizjologicznej (GAŁAZKA i współaut. 2012).

METODY BIOCHEMICZNE I GENETYCZNE W OCENIE BIORÓŻNORODNOŚCI ŚRODOWISKA

Do oceny zmian w strukturach zespołów mikroorganizmów glebowych stosowanych jest wiele metod biochemicznych i molekularnych. Jedną z metod biochemicznych jest analiza składu bakteryjnego i grzybowego fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (ang. phospholipid fatty acid analyses, PLFA) oraz metylowanych estrów kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid methyl ester, FAME). Wykorzystanie PLFA w mikrobiologii gleby opiera się na założeniu, że pewne kwasy czy grupy kwasów tłuszczowych są charakterystyczne dla danego gatunku, rodzaju lub grupy mikroorganizmów. Informacje uzyskane z analizy profilu PLFA, będącego sumą wszystkich wyizolowanych fosfolipidowych kwasów

tłuszczowych, pozwalają na monitorowanie zmian zachodzących w obrębie badanych zespołów mikroorganizmów (MARCHUT-MIKOŁAJCZYK i współaut. 2013).

Obecnie coraz częściej wykorzystuje się metody molekularne w celu identyfikacji i klasyfikacji mikroorganizmów. Najczęściej stosowana jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) wraz z jej odmianami (nested PCR, RT-PCR, Real-Time PCR, multiplex PCR). Są to techniki stosunkowo tanie i szybkie, których produkty mogą służyć w dalszych badaniach (sekwencjonowanie, RFLP, DGGE, TGGE). Analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction length fragment polymorphism, RFLP,) moż-

na wykorzystać do badania zróżnicowania genomowego bakterii, poprzez porównanie wzorów DNA uzyskanych w wyniku rozdziału elektroforetycznego fragmentów pochodzących z trawienia DNA genomowego jednym lub kilkoma endonukleazami restrykcyjnymi. Metodę RFLP można także wykorzystać w analizie wybranego fragmentu genomu, na przykład konkretnych genów, łącząc ją z reakcją PCR. Najczęściej w tego typu badaniach taksonomicznych wykorzystuje się gen kodujący 16S lub 23S rRNA. Bardzo często w mikrobiologii środowiskowej stosuje się metodę DGGE (ang. denaturing gradient gel electrophoresis) i TGGE (ang. temperature gradient gel electrophoresis). Produkty PCR rozdziela się elektroforetycznie w żelu poliakrylamidowym w obecności czynnika denaturującego. W pierwszym przypadku jest to wzrastające stężenie mocznika, w drugim, wzrastający gradient temperatury. Cząsteczki DNA, migrując w żelu w różnym stężeniu lub gradiencie czynnika denaturującego, zatrzymują się na różnej wysokości. W konsekwencji, ze względu na różnicę w sekwencji otrzymujemy w żelu tzw. fingerprint. Zasto-

sowanie odpowiednio dobranych starterów uniwersalnych lub specyficznych dla pewnych grup mikroorganizmów pozwala na ocenę bioróżnorodności w obrębie całego zespołu bakterii lub jego wybranych grup taksonomicznych (ZHONG i współaut. 2007, ZHANG i współaut. 2013).

Kolejnym, bardzo ważnym narzędziem w badaniu bioróżnorodności mikroflory glebowej jest metagenomika, dzięki której tworzone są tzw. biblioteki genomowe mikroorganizmów wyizolowanych bezpośrednio z różnego rodzaju środowisk naturalnych. Technika ta ma szczególne zastosowanie w przypadku bakterii niehodowlanych, które, jak się szacuje, stanowią ponad 99% wszystkich bakterii w środowisku glebowym. Największą na świecie bazą danych zawierającą sekwencje wszystkich organizmów żywych jest GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). W wyszukiwaniu sekwencji homologicznych, czyli tych o wspólnym pochodzeniu, najczęściej stosuje się algorytm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), który znajduje w badanych sekwencjach fragmenty o największym podobieństwie.

DEGRADACJA NA DRODZE KO-METABOLIZMU

Ko-metaboliczna degradacja węglowodorów odgrywa bardzo ważną rolę w procesie bioremediacji, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Degradowane węglowodory nie stanowią w tym przypadku źródła węgla i energii, są natomiast ko-substratami. Ich przekształcanie jest katalizowane przez enzymy uczestniczące w przemianach substratu pierwotnego, charakteryzujące się jednocześnie bardzo małą specyficznością dla substratu otrzymanego (ZHONG i współaut. 2007). Obecnie ko-metabolizm uważa się za jeden z najważniejszych mechanizmów przemian wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, np. paration jest ko-metabolizowany przez *Pseudomonas stutzeri* do 4-nitrofenolu i dietylofosforanu, a następnie fenol jest wykorzystywany, jako źródło węgla i energii, przez *P. aeruginosa*. Często, jako ko-substraty dla związków opornych na biodegradację, stosuje się fenol lub toluen. Nie oznacza to jednak, że w celu osiągnięcia maksimum wydajności procesu biodegradacji stosować należy jedynie ko-substrat oraz najaktywniejsze szczepy; często koniecznością staje się wprowadzenie bakterii prawie nieaktywnej w procesie rozkładu,

która może ułatwić innym gatunkom aktywność enzymatyczną. Określenie właściwości pojedynczych szczepów pod względem zdolności rozkładu mniej lub bardziej skomplikowanych substancji służy za punkt wyjściowy do efektywnego przeprowadzenia procesu bioremediacji (KUREK i współaut. 2001).

Rozpatrując aspekty ko-metabolicznego rozkładu WWA nie można pominąć faktu powstawania licznych metabolitów pośrednich o bardzo zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Czasami ko-metabolizm pociąga za sobą stosunkowo niewielkie modyfikacje substancji substratu wtórnego, w porównaniu z substratem pierwotnym. W procesie degradacji węglowodorów aromatycznych związki te mogą przechodzić szereg modyfikacji, a ich pochodne stanowią poważne zagrożenie w środowisku reakcji. Najczęściej degradacja węglowodorów zachodzi sekwencyjnie, przy udziale różnych grup mikroorganizmów współdziałających ze sobą. Syntetyzowane przez poszczególne szczepy enzymy, w reakcjach hydroksylacji, oksydacji, denitryfikacji, deaminacji bądź hydrolizy czy acylacji, mogą się wzajemnie uzupełniać w tworzeniu pełnych szlaków mineralizacji.

Wraz z przebiegiem procesu bioremediacji w środowisku reakcji pojawiają się liczne drobnocząsteczkowe metabolity pośrednie (KIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005). Pula metabolitów pośrednich, często występujących jako idiolity, przy współdziałaniu ko-metabolizmu wewnątrzkomórkowego, mieści się w puli zbiodegradowanego zanieczyszczenia, a przecież ich obecność może negatywnie wpływać na środowisko.

Zachodzące w dobranym zespole bakterii zjawisko kolejności wykorzystywania produktów pośrednich powoduje obniżenie zagrożenia danym skażeniem. Niemniej powstające w środowisku naturalnym metabolity pośrednie rozkładu WWA stanowią istotny czynnik ryzyka, ponieważ jak wykazano, w rezultacie biodegradacji zaznacza się istotna zmiana właściwości toksykodynamicznych w stosunku do związków wyjściowych. Odnotowuje się również wzrost różnorodności metabolitów pobiodegradacyjnych w obecności dodatkowego źródła węgla, jakim jest np. glukoza, co nasuwa przypuszczenie o zróżnicowanym rozkładzie w zależności od obecności łatwo dostępnych substratów pokarmowych (KIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005). Z drugiej jednak strony, bioremediacja niekoniecznie musi być „zieloną technologią”; wiele substancji organicznych wprowadzonych do środowiska naturalnego podlega tylko częściowej biodegradacji, a powstałe w wyniku tego procesu produkty pośrednie mogą nadal akumulować się w glebie stwarzając

duże zagrożenie. Metabolity te mogą odznaczać się większą toksycnością, mobilnością i stabilnością chemiczną niż wyjściowe substraty.

W czystych kulturach bakteryjnych produkty ko-metabolizmu mają tendencję do akumulacji i często nie ulegają dalszej degradacji. Takie związki powstające w kulturach mieszanych drobnoustrojów, które zwykle występują w środowisku, mogą służyć jako substraty dla innych organizmów, prowadząc do całkowitej biodegradacji zanieczyszczenia. Dlatego badania biodegradacji w czystych kulturach bakteryjnych zwykle mają ograniczone zastosowanie przy przewidywaniu, co stanie się w naturalnym środowisku glebowym (SIUTA 2003).

Szybkość procesu biodegradacji węglowodorów aromatycznych, występujących w środowisku glebowym w stosunkowo dużych stężeniach, zwykle nie można ekstrapolować do bardzo małych stężeń. Związane jest to ze szczególną trwałością niektórych substancji podlegających biodegradacji, a sam proces jest trudny do przeprowadzenia i długotrwały, a zadowalające rezultaty można uzyskać jedynie przy bardzo aktywnej i wyspecjalizowanej grupie mikroorganizmów zdolnych do wykorzystywania zanieczyszczeń organicznych jako jedyne źródła węgla i energii. Korzyścią w przeprowadzaniu biologicznych metod usuwania zanieczyszczeń z gleby są jednak niewątpliwie względy ekonomiczne, czyli niskie koszty wykonania.

BIOPREPARATY – AKTYWNE KONSORCJA DROBNOUSTROJÓW

Biopreparaty, czyli zespoły drobnoustrojów o określonym składzie gatunkowym i proporcjach ilościowych, wprowadzane są do środowiska jako szczepionki biologiczne (inokulum), gdzie umożliwiają dalszy efektywny rozwój aktywnej mikroflory i znacznie wspomagają, a niekiedy wręcz warunkują, procesy degradacji danego zanieczyszczenia (PODSIADŁO i KRZYŚKO-ŁUPICKA 2013). Biopreparaty tworzy się na bazie starannie dobranych szczepów drobnoustrojów, które są zazwyczaj wcześniej izolowane z naturalnych siedlisk zawierających dany rodzaj skażenia. Następnie mikroorganizmy te poddaje się starannej selekcji oraz adaptacji do środowiska zanieczyszczenia, jak również integracji z innymi szczepami, współobecny w konstruowanym biopreparacie tak, aby wszystkie występujące gatunki cechowały się dużą ży-

wotnością i jednocześnie wykazywały aktywności o charakterze synergistycznym.

Intensyfikacja procesu bioremediacji zanieczyszczeń w glebie polega na stworzeniu korzystnych warunków wzrostu mikroorganizmów, jak również na optymalizacji procesu z uwzględnieniem dodatkowych uwarunkowań środowiskowych (SEO i współaut. 2007). W przypadku biodegradacji konkretnego rodzaju zanieczyszczenia pojawia się konieczność wykonania szeregu dodatkowych testów optymalizacyjnych dla biopreparatów przeznaczonych do zastosowania. W analizach tych należy uwzględnić między innymi charakterystykę skażenia pod względem ilościowym i jakościowym, określenie szybkości procesu w różnych fazach rekultywacji gruntu oraz stwierdzenie możliwości do osiągnięcia wydajności biodegradacji, tzn. różnicy

między początkowym i końcowym stężeniem zanieczyszczenia. Należy również zwrócić uwagę na zdefiniowanie mechanizmów reakcji biochemicznych prowadzących do rozkładu skażeń, w tym stwierdzenie obecności substancji chemicznych hamujących proces, określenie zapotrzebowania mikroflory na makro- i mikroelementy, potrzeby zastosowania kosubstratów oraz dodatkowych akceptorów elektronów, jak również możliwości pojawienia się toksycznych związków pośrednich, czyli intermediatów metabolicznych (SEO i współaut. 2007). Biologiczny rozkład zanieczyszczeń w glebie z wykorzystaniem biopreparatów jest niekiedy długotrwały i – w zależności od rodzaju skażeń, ich początkowej koncentracji oraz stopnia toksyczności – może trwać nawet kilka lat. Należy podkreślić, że tzw. kinetyka procesu, czyli czasowy przebieg bioremediacji skażeń, jest zjawiskiem złożonym, wielofazowym i nieliniowym, co stanowi ważny aspekt praktyczny przy planowaniu konkretnego projektu rekultywacji. Najczęściej, po początkowym okresie najszybszej degradacji, obserwowany jest znacznie wolniejszy spadek poziomu zanieczyszczeń w glebie. Wprowadzenie inokulum aktywnych drobnoustrojów odbywa się głównie w postaci zagęszczonego biopreparatu o gęstości ok. 10^4 – 10^9 komórek/cm³, poprzez wielokrotne zraszanie powierzchniowe lub bezpośrednio do gleby (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA. 2005). Wysoka gęstość komórek w biopreparacie ułatwia ich transport w czasie wprowadzenia szczepionki do gleby. Jednocześnie powstaje możliwość intensyfikacji procesu poprzez zwiększenie gęstości inokulum, jak np. w przypadku skażeń szczególnie trudno poddających się degradacji biologicznej. Po wprowadzeniu biopreparatu do środowiska glebowego następuje dalszy, dynamiczny rozwój aktywnej mikroflory, co warunkuje skuteczność procesu biodegradacji.

Często wykorzystuje się tzw. biopreparat bazowy, który stanowi ściśle określony gatunkowo zestaw mikroorganizmów pro- i eukariotycznych autochtonicznych. W efekcie powstaje bogata, biologicznie zbalansowana biocenoza, na bazie której przygotowuje się aktywną zawiesinę drobnoustrojów służącą do rozkładu konkretnego skażenia. Główną zaletą wielogatunkowego biopreparatu bazowego jest jego bioróżnorodność, która warunkuje wysoką oporność biocenozy na heterogeniczne skażenia, duże zdolności adaptacyjne do środowiska zawierającego nowe ksenobiotyki oraz możliwość dalszej specjali-

zacji pod kątem rozkładu określonego skażenia. Jest to układ dynamiczny i jego skład gatunkowy oraz aktywność fizjologiczna może ulegać kontrolowanej zmianie i ewolucji (KLIMIUK i ŁEBKOWSKA 2005).

Biopreparaty, w zależności od składu i późniejszego zastosowania, dzieli się na: bakteryjne i enzymatyczne. Preparaty bakteryjne (mikrobiologiczne) charakteryzują się tym, że mikroorganizmy namnażają się w oczyszczanych środowiskach, natomiast preparaty enzymatyczne podawane są w określonej dawce bez możliwości ilościowego powiększenia. Jednak w każdym z przypadków biopreparat można wprowadzić do miejsc skażenia w postaci zawiesiny lub osadzić go na nośniku stałym (immobilizacja).

Znane są także prace z zastosowaniem enzymów grzybowych (m.in. peroksydaz i lakkaz) do tzw. enzymatycznej bioremediacji aromatycznych węglowodorów policyklicznych. Wśród najczęściej stosowanych w detoksykacji ksenobiotyków enzymów grzybowych wymienić można (MARCHUT-MIKOŁAJCZYK i współaut. 2013):

1. peroksydazę ligninową (LiP), szczególnie pochodzącą z *Phanerochaete chrysosporium*. Jest to zewnątrzkomórkowa hemoproteina, zależna od H₂O₂, o bardzo wysokim potencjale redox i niskim optymalnym pH. Enzym ten wykazuje niską specyficzność substratową, reagując z dużą ilością związków o strukturze zbliżonej do ligniny, jak również w stosunku do związków o strukturze od nich odmiennej. LiP wykazuje zdolność do utleniania metoksyloowanych pierścieni aromatycznych, nieposiadających wolnych grup fenolowych, generując dodatnie rodniki, które następnie mogą brać udział w wielu reakcjach m.in. otwarciu pierścienia, demetylację i dimeryzację fenoli. LiP pochodzące z różnych źródeł mogą prowadzić do mineralizowania wielu różnych związków aromatycznych i utleniania znaczącej ilości policyklicznych węglowodorów aromatycznych oraz pochodnych fenolu.

2. Mn-zależną peroksydazę, która jest enzymem należącym do grupy glikoprotein wydzielanych poza komórkę. Enzym ten wykazuje preferencję względem jonów manganu Mn(II) jako substratu do redukcji. Produkt reakcji, Mn(III), tworzy kompleks z kwasami organicznymi i dyfunduje od enzymu, by utleniać inne związki, np. ligniny. Enzym ten katalizuje reakcje utleniania niefenolowych związków ligninowych i WWA. Mn-peroksydaza z *Nematoloma frowardii* utlenia

antracen, piren, benzo(a)piren i fenantren w obecności glutationu oraz w obecności nienasyconych kwasów tłuszczowych. Rola i mechanizm działania tych substancji w reakcjach katalizowanych przez MnP nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione.

3. Lakkazy (EC 1.10.3.2) są zewnątrzkomórkowymi glikoproteinami zawierającymi 4 atomy miedzi. Enzymy te wykazują szerokie spektrum substratowe, co czyni je przydatnymi w procesach bioremediacji. Enzymy produkowane przez niektóre grzyby białej zgnilizny mają zdolność do efektywnego utleniania policyklicznych węglowodorów aromatycznych, m.in. wykazywały zdolność do usuwania wysokich stężeń fenoli. Wyizolowane oksydazy grzybowe mogą być z powodzeniem wykorzystywane w procesach biokonwersji, gdyż są stabilne w różnych warunkach i, w szczególności lakkazy, nie wymagają obecności kosztownych kosubstratów, jedynie molekularnego tlenu. Lakkaza jest enzymem biorącym udział w utlenianiu wielu związków aromatycznych do produktów mniej toksycznych i dlatego powinna mieć szerokie zastosowanie w procesach oczyszczania środowiska. Lakkaza może być wykorzystywana w procesach detoksykacji środowiska zanieczyszczonego fenolem, trichlorofenolem, pestycydami oraz wielopierścieniowymi związkami aromatycznymi, takimi jak benzo(a)piren, wykazującymi właściwości mutagenne i kancerogenne.

W związku z potrzebą ciągłego doskonalenia technik bioremediacji, badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na możliwość wykorzystania w procesach biodegradacji nie tylko potencjału metabolicznego mikroorganizmów, ale i samych enzymów (w formie preparatów), zarówno tych wydzielanych poza komórkę, jak i enzymów wewnątrzkomórkowych. Preparaty te mogą zawierać kompleksy enzymatyczne bądź pojedyncze biokatalizatory zdolne do modyfikacji struktury, zniesienia toksycznego charakteru zanieczyszczeń lub, w szczególnych przypadkach, do przeprowadzenia całkowitej mineralizacji molekuł organicznych do nieszkodliwych, nieorganicznych produktów końcowych. Z uwagi na to, iż enzymy stanowią prostsze systemy niż całe organizmy, bioremediacja enzymatyczna staje się atrakcyjnym narzędziem w biotechnologii środowiska. Bioremediacja enzymatyczna (jako uzupełnienie procesów mikrobiologicznych) daje najlepsze efekty, gdy warunki panujące w oczyszczanym środowisku są bliskie pa-

rametrom optymalnym dla zastosowanych enzymów. Zapewnienie takich warunków (pH, temperatura) jest stosunkowo łatwe w przypadku bioremediacji *ex situ*, ale może narażać wielu trudności w prowadzeniu procesu w miejscu skażenia. Ponadto, detoksykacja enzymatyczna wymaga ścisłego kontrolowania procesu biodegradacji odbywającego się z udziałem mikroorganizmów. Wdrożenie technologii enzymatycznej bioremediacji wymaga rozwoju metod produkcji odpowiednich preparatów enzymatycznych przeznaczonych specjalnie do tych celów. Dotychczas najlepiej opisanymi enzymami biorącymi udział w procesach biodegradacji zanieczyszczeń są bakteryjne mono- i dioksygenazy, reduktazy, dehalogenazy czy monooksygenaza cytochromu P-450. Jednakże bakteryjne oksygenazy nie mogą być użyte w procesach biodegradacji w formie wyizolowanej, gdyż są niestabilne, trudne do oczyszczenia, wymagają obecności kosubstratów, co w konsekwencji powodowałoby znaczne zwiększenie nakładów finansowych na proces bioremediacji prowadzony w dużej skali. Z tych względów w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania grzybowymi enzymami związanymi z rozkładem lignin oraz enzymami grzybowymi z klasy hydrolaz biorącymi udział w degradacji związków tłuszczowych. Szczególnie przydatne do tych celów wydają się być enzymy pozyskiwane z grzybów białej zgnilizny, które w naturze odpowiadają za degradację lignin w martwej tkance roślinnej.

Argumentem, który może przemawiać przeciwko stosowaniu biopreparatów, jest obawa przed wprowadzeniem do danego środowiska mikroorganizmów, które mogą wywoływać niekorzystne zjawiska, zakłócając tym samym równowagę w biocenozie.

Problematyka skażenia środowiska naturalnego w ostatnich latach wzbudza duże zainteresowanie badaczy. Świadomość występowania niekorzystnych zmian w organizmach, jakie wywołują wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, powoduje poszukiwanie i udoskonalanie metod analitycznych ich oznaczania. Zostało to w szczególności wymuszone przez przystąpienie Polski do Unii Europejskiej. W Rozporządzeniu Komisji (UE) nr 208/2005 z dnia 4 lutego 2005 r., zamieniającym rozporządzenie (UE) nr 466/2001, w odniesieniu do wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ustalono dopuszczalne stężenia benzo(a)pirenu w żywności. Z kolei w Rozporządzeniu nr

2065/2003 z dnia 10 listopada 2003r. określono dopuszczalne stężenie benzo[a]antracenu w dymach wędzarniczych. Komisja Nauki

UE zasugerowała, aby w przyszłości oznaczać 15 WWA w żywności, zgodnie z podaną listą.

ZANIECZYSZCZENIE GLEBY SUBSTANCJAMI ROPOPOCHODNYMI I BIOLOGICZNE METODY ICH OCZYSZCZANIA

Streszczenie

W ciągu ostatnich dwóch dekad przeprowadzono wiele badań w celu określenia trwałości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w różnych środowiskach naturalnych, ich biodostępności oraz wpływu mikroflory autochtonicznej na stopień rozkładu tych zanieczyszczeń. Szacuje się, że ponad 90% całkowitego zanieczyszczenia WWA znajduje się w powierzchniowej warstwie gleby. Znanych jest szereg biologicznych metod rekultywacji gleby z zanieczyszczeń substancjami ropopochodnymi. Większość procesów bioremediacyjnych polega na stymulacji wzrostu mikroorganizmów obecnych w skażonym środowisku albo wprowadzaniu do gleby nowych szczepów bakteryjnych lub grzybowych zdolnych do rozkładu zanieczyszczenia. Poprawnie przeprowadzony proces bioaugmentacji polega nie tylko na wprowadzeniu do gleby aktywnego szczepu zdolnego do katabolicznego rozkładu węglowodoru ale również zdolnego do logarytmicznego wzrostu w

warunkach skażenia. W glebie występuje najczęściej mieszanina węglowodorów aromatycznych dlatego też, degradacja zachodzi podczas licznych interakcji mikroorganizmów glebowych tj.: ko-metabolizm, indukcja. Ryzodegradacja jest procesem rozkładu zanieczyszczenia przy udziale mikroorganizmów obecnych w przykorzeniowej warstwie gleby tzw. ryzosferze. Fitoremediacja (fitoekstrakcja, fitostabilizacja, fitotransformacja) jest metodą *in situ* rozkładu węglowodoru z zastosowaniem roślin zdolnych do wzrostu na zanieczyszczonej powierzchni. Na podstawie szeregu badań dotyczących biologicznych metod oczyszczania gleb z substancji ropopochodnych można stwierdzić, iż biologiczne metody w porównaniu do metod fizykochemicznych są metodami tańszymi, bezpieczniejszymi i dającymi bardzo dobre efekty rozkładu zanieczyszczenia gleb wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi.

SOIL CONTAMINATION WITH OIL DERIVATIVES AND BIOLOGICAL METHODS OF PURIFICATION

Summary

During the last two decades numerous investigations were performed to determine the persistence of poly-aromatic hydrocarbons (PAH) in different natural environments and a possible role of indigenous microflora in the degradation of these contaminants. It is estimated that more than 90% of the total burden of PAH's resides in the surface layer of soils.

There are known many biological methods of soil reclamation from oil pollution. Bioremediation of PAH's-contaminated sites has largely been carried out either by stimulation of microorganisms already present in the contaminated site or through bioaugmentation. Successful bioaugmentation requires not only a catabolically active inoculum but also a microbial strains or consortium that can survive in the target environment. PAH's are often present in

the form of a mixture of compounds, so that their degradation may involve various interactions among PAH-degrading bacteria, such as co-metabolism, inhibition, induction. Rhizodegradation (also called enhanced rhizosphere biodegradation, phytostimulation, and plant assisted bioremediation) is the breakdown of organic contaminants in the soil enhanced by soil dwelling microbes living in the rhizosphere. Phytoremediation (phytoextraction, phytostabilization, phytotransformation) - the use of green plants able to grow in polluted sites was found to be a feasible approach for in situ clean-up of surface soils with from PAH's and diesel fuels.

Results of many comparative investigations suggest that biological methods of soil reclamation from oil pollutants look as very promising owing to their low costs.

LITERATURA

- ALEXANDER M., 1999. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, San Diego, USA.
- ANDREONI V., GIANFREDA L., 2007. *Bioremediation and monitoring of aromatic – polluted habitats*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 287–308.
- ATLAS R. M., 1995. *Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation*. Mar. Pollut. Bull. 31, 178–182.
- BARAN S., TURSKI R., 1996. *Degradacja ochrona i rekultywacja gleb*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie.
- BOSZCZYK-MALESZAK H., ZABOST A., WOLICKA D., KACIESZCZENKO J., 2006. *Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values*. Pol. J. Microbiol. 55, 69–73.

- CHAIANEU C. H., MOREL J. L., OUDOT J., 2000. *Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize*. J. Environ. Qual. 29, 569–578.
- CHAUDHARY P., SHARMA R., SINGH S. B., NAIN L., 2011. *Bioremediation of PAH by Streptomyces sp.* Bull. Environ. Contam. Toxicol. 86, 268–271.
- CHEN B., YUAN M., 2012. *Enhanced dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of fresh plant residues and their extracts.* Environ. Pollut. 161, 199–205.
- CURL E. A., TRUELOVE B., 1986. *The rhizosphere.* Springer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- CZARNOMSKI K., IZAK E., 2008. *Trwałe zanieczyszczenia organiczne w środowisku, Rozporządzenie Wspólnoty Europejskiej nr 850/2004.* Materiały Informacyjne, Warszawa.
- DYREKTYWA, 2004. *Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie arsenu, kadmu, rtęci, niklu i wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych w otaczającym powietrzu (2004/1017-PL-20.04.2009)* <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?u>
- GALAŻKA A., KRÓL M., PERZYŃSKI A., 2012. *The efficiency of rhizosphere bioremediation with Azospirillum sp. and Pseudomonas stutzeri in soils freshly contaminated with PAHs and diesel fuel.* Pol. J. Environ. Stud. 21, 345–353.
- GAO Y., ZHU L., 2004. *Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils.* Chemosphere 55, 1169–1178.
- GOGOI B. K., DUTTA N.N., GOSWAMI P., MOHAN T. R. K., 2003. *A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill.* Adv. Environ. Res. 7, 757–782.
- HU J., AITKEN M. D., 2012. *Desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from field-contaminated soil to a two-dimensional hydrophobic surface before and after bioremediation.* Chemosphere 89, 542–547.
- KABATA-PENDIAS A., PIOTROWSKA M., MOTOWICKA-TERELAK T., MALISZEWSKA-KORDYBACH B., FILIPIAK K., KRAKOWIAK A., PIETRUCH CZ., 1995. *Podstawy oceny chemicznego zanieczyszczenia gleb; metale ciężkie, siarka, WWA.* Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
- KALLIMANIS A., FRILLINGOS S., DRAINAS C., KOUKOU A. I., 2007. *Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading Arthrobacter sp. strain Sphe3.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 76, 709–717.
- KLIMIUK E., ŁEBKOWSKA M., 2005. *Biotechnologia w ochronie środowiska.* Wyd. Nauk. PWN.
- KOŁWZAN B., 2000. *Biodegradacja produktów naftowych.* [W:] *Zanieczyszczenia naftowe w gruncie.* SURYGALA J. (red.). Oficyna Wydawnicza PWr., Wrocław.
- KUBIAK M. S., 2013. *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) – ich występowanie w środowisku i w żywności.* Prob. Hig. Epidem. 94, 31–34.
- KUREK E., KRÓL M. J., ZIELEWICZ-DUKOWSKA J., PERZYŃSKI A., 2001. *Rozkład produktów naftowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny.* [W:] *Ekologia w przemyśle rafineryjnym.* Kielce, SITPNiG Oddział Warszawa, 153–162.
- LINDGRENA J. F., HASSELLÖVA I.-M., INGELA DAHLLÖF I., 2014. *PAH effects on meio- and microbial benthic communities strongly depend on bioavailability.* Aquat. Toxicol. 146, 230–238.
- LISTE H.-H., FELGENTREU D., 2006. *Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil.* Appl. Soil Ecol. 31, 43–52.
- LISTE H.-H., PRUTZ I., 2006. *Plant performance, dioxygenase – expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil.* Chemosphere 62, 1411–1420.
- LORS CH., DAMIDOT D., PONGE J.-F., PÉRIÉ F., 2012. *Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales.* Environ. Pollut. 165, 11–17.
- LU X.-Y., ZHANG T., FANG H., 2011. *Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1357–1371.
- LU X.-Y., LI B., ZHANG T., FANG H., 2012. *Enhanced anoxic bioremediation of PAHs-contaminated sediment.* Biore. Technol. 104, 51–58.
- MA B., WANG J., XU M., HE Y., WANG H., WU L., XU J., 2012. *Evaluation of dissipation gradients of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice rhizosphere utilizing a sequential extraction procedure.* Environ. Pollut. 162, 413–421.
- MAHMOUDI N., SLATER G. F., JUHASZ A. L., 2013. *Assessing limitations for PAH biodegradation in long-term contaminated soils using bioaccessibility assays.* Water Air Soil Pollut. 224, 1–11.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH B., 2005. *Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly contaminated soils – the effect of soil physicochemical properties and aging.* Water Air Soil Pollut. 168, 113–128.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH B., GALAŻKA R., KLIMKOWICZ-PAWLAS A., SMREČZAK B., ŁYSIAK M., 2012. *Czy gleby w Puławach są zanieczyszczone?* Pol. J. Agronom. 9, 7–16.
- MANAHAN S. E., 2006. *Toksykologia środowiska, aspekty chemiczne i biochemiczne.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- MAO J., LUO Y., TENG Y., LI Z., 2012. *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes.* Int. Biodeterior. Biodegrad. 70, 141–147.
- MARCHENKO A. I., VOROBYOV A. V., DYADISCHEV N. R., SOCOLOV M. S., 2001. *Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plant rhizosphere.* [W:] *Biogeochemical processes and cycling of elements in the environment.* Polish Society of Humic Substances, Wrocław, 465–467.
- MARCHUT-MIKOŁAJCZYK O., KWAPISZ E., ANTCZAK T., 2013. *Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków.* Inżynieria i Ochrona Środowiska 16, 39–55.
- MARGESIN R., SCHINNER F., 2001. *Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 650–663.
- MERKL N., SCHULTZE-KRAFT R., INFANTE C., 2005. *Assessment of tropical Grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils.* Water Air Soil Pollut. 165, 195–209.
- MOODY J. D., FREEMAN J. P., DOERGE D. R., CERNIGLIA C. E., 2001. *Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of Mycobacterium sp. strain PYR-1.* Appl. Environ. Microbiol. 67, 1476–1483.
- MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., ŁABUŹEK S., 2005. *Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments.* Postęp. Mikrobiol. 44, 227–238.
- NIEPCERON M., MARTIN-LAURENT F., CRAMPON M., PORTET-KOLTALO F., AKPA-VINCESLAS M., LEGRAS M., BRU D., BUREAU F., BODILIS J., 2013. *GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils.* Environ. Pollut. 180, 199–205.

- ORTEGA-CALVO J. J., MARCHENKO A. I., VOROBYOV A. V., BOROVICK R. V., 2003. *Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon – degrading bacteria isolated from coal – tar and oil – polluted rhizospheres*. FEMS Microbiol. Ecol. 44, 373–381.
- ORTEGA-CALVO J. J., TEJEDA-AGREDANO M. C., JIMENEZ-SANCHEZ C., CONGUA E., SUNGTHONGA R., NIQUI-ARROYO J. L., CANTOSA M., 2013. *Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation?* J. Hazard. Mat. 261, 733–745.
- PARALES R. E., BRUCE N. C., SCHMID A., WACKETT L. P., 2002. *Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4699–4709.
- PODSIADŁO Ł., KRZYŚKO-ŁUPICKA T., 2013. *Techniki bioremediacji substancji ropopochodnych i metody oceny ich efektywności*. Inżynieria i Ochrona Środowiska 16, 459–476.
- PORTET-KOLTALO F., AMMAMI M. T., BENAMAR A., WANG H., LE DERF F., DUCLAIR-POC C., 2013. *Investigation of the release of PAHs from artificially contaminated sediments using cyclolipopeptidic biosurfactants*. J. Hazard. Mat. 261, 593–601.
- ROZPORZĄDZENIE, 2002. *Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi*. Dz. U. 02.165.1359.
- SAMANTA S. K., SINGH O. V., JAIN R. K., 2002. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation*. Trends Biotechnol. 20, 243–248.
- SEMPLE K. T., MORRIS A. W. J., PATON G. I., 2003. *Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis*. Europ. J. Soil Sci. 54, 809–818.
- SEO J.-S., KEUM Y.-S., HARADA R. M., LI Q. X., 2007. *Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii*. J. Agr. Food Chem. 55, 5718–5724.
- SINGH O. V., JAIN R. K., 2003. *Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 128–135.
- SIUTA J., 2003. *Ekologiczne i prawne aspekty rekultywacji gruntów zanieczyszczonych produktami ropy naftowej*. Inż. Ekolog. 8, 1–6.
- SMRECZAK B., MALISZEWSKA-KORDYBACH B., 2003. *Wpływ niektórych traw na ubytek antracenu i pirenu w glebach zanieczyszczonych tymi związkami*. Zeszyty Post. Nauk Roln. 492, 329–339.
- SWINDELL A., REID B., 2006. *Influence of diesel concentration on the fate of phenanthrene in soil*. Environ. Poll. 140, 79–86.
- THAVAMANI P., MEGHARAJ M., NAIDU R., 2012. *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium*. Biodegradation 23, 823–835.
- VOGEL T. M., 1996. *Bioaugmentation as a soil bioremediation*. Approach. Curr. Opin. Biotechnol. 7, 311–316.
- WANG X., GONG Z., LI P., 2007. *Degradation of Pyrene in Soil by Free and Immobilized Yeasts, Candida tropicalis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 78, 522–526.
- WOJCISZYŃSKA D., GREŃ I., ŁABUŹEK S., 2005. *Dioksygenazy – kluczowe enzymy rozkładu związków aromatycznych przez drobnoustroje*. Post. Mikrobiol. 44, 63–70.
- WÓJCIK P., TOMASZEWSKA B., 2005. *Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych*. Biotechnologia 4, 156–172.
- YU H., XIAO H., WANG D., 2014. *Effects of soil properties and biosurfactant on the behavior of PAHs in soil-water systems*. Environ. Syst. Res. 3, 1–12.
- ZHANG J., YANG J., WANG R., HOU H., DU X., FAN S., LIU J.-S., DAI J.-L., 2013. *Effects of pollution sources and soil properties on distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and risk assessment*. Sci. Total Environ. 463–464, 1–10.
- ZHONG Y., LUAN T., WANG X., LAN C., TAM N. F. Y., 2007. *Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Sphingomonas sp. strain PheB4*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 175–186.
- ZHOU W., ZHU L., 2007. *Efficiency of surfactant-enhanced desorption for contaminated soils depending on the component characteristics of soil-surfactant-PAH's system*. Environ. Pollut. 147, 66–73.
- ZHUANG X., CHEN J., SHIM H., BAI Z., 2007. *New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation*. Environ. Intern. 33, 406–413.