

Agnieszka Mrozi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wpłynęło w lipcu 2015 r.  
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mikroorganizmy w bioaugmentacji. 2.1. Pojedyncze szczepy. 2.2. Konsorcja mikroorganizmów. 2.3. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie. 3. Sposoby dostarczania mikroorganizmów do środowiska. 4. Czynniki ograniczające bioaugmentację. 5. Podsumowanie

### Microorganisms in bioaugmentation of polluted environments

**Abstract:** Bioaugmentation is defined as a technique for improving the degradative capacity of contaminated soil and water by adding selected strains or consortia of microorganisms. In the treatment of environmental pollution by microorganisms, three approaches can be distinguished: autochthonous bioaugmentation, in which microorganisms isolated from contaminated site as an enriched culture are reinjected to the original environment; allochthonous bioaugmentation (bioenrichment), in which seeding material is isolated from another place and gene bioaugmentation, in which genetically engineered microorganisms equipped with genes encoding proteins related to some desired function are introduced into polluted site. In the selection of proper culture for bioaugmentation, the following features of microorganism should be taken into consideration: fast growth, ease of cultivation, capacity to withstand high concentration of contaminants and the ability to survive in a wide range of environmental conditions. The enhancement of bioaugmentation may be also achieved by delivering microorganisms on various carriers or by the use of activated soil. The efficiency of bioaugmentation is determined by abiotic and biotic factors. The first include chemical structure of contaminants, their concentration and bioavailability as well as fluctuations or extremes in temperature, pH and nutrients level. Among biotic factors, the most important are the interactions between autochthonous and added microorganisms such a competition, predation and bacteriophages. Numerous studies have demonstrated that bioaugmentation is a promising technology in remediation of soil, water and sediments polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrophenols, polychlorinated biphenyls, chlorophenols, crude oil, diesel oil and several pesticides.

Introduction. 2. Microorganisms in bioaugmentation. 2.1. Single strains. 2.2. Consortia of microorganisms. 2.3. Genetically engineered microorganisms. 3. Methods for delivering microorganisms into environment. 4. Factors limiting bioaugmentation. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** bioaugmentacja, mikroorganizmy, zanieczyszczenia

**Key words:** bioaugmentation, microorganisms, pollutants

## 1. Wprowadzenie

Wzrost zanieczyszczenia środowiska związkami ropopochodnymi, polichlorowanymi bifenylami (PCB), wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA), nitro- i chlorofenolami, pestycydami, farmaceutykami oraz metalami ciężkimi stwarza konieczność stosowania skutecznych metod ich detoksykacji i/lub eliminacji. Aby ograniczyć ilość związków toksycznych w różnych ekosystemach należy wdrażać przyjazne środowisku technologie, tańsze od metod fizykochemicznych i bardziej efektywne w przywracaniu środowiska do stanu właściwego.

Obiecującą technologią wspomagającą usuwanie zanieczyszczeń z gleby, wody, osadów dennych czy ścieków jest bioaugmentacja. Polega ona na wprowadzeniu do skażonych miejsc wyselekcjonowanych mikroorganizmów w celu wzmocnienia naturalnej aktywności degradacyjnej rodzimej mikroflory [19, 30, 45, 68]. Stosowanie bioaugmentacji zaleca się wtedy, gdy liczba

mikroorganizmów autochtonicznych degradujących określone zanieczyszczenie jest zbyt mała do ich eliminacji oraz w miejscach skażonych mieszaninami różnych toksycznych związków, wymagających dłuższego czasu aklimatyzacji i adaptacji inokulantów do rozkładu poszczególnych zanieczyszczeń [22]. Powinno się ją również stosować na obszarach, na których koszty usuwania zanieczyszczeń metodami fizykochemicznymi znacznie przewyższają koszty bioaugmentacji. Mikroorganizmy można wykorzystywać w charakterze inokulum zarówno w miejscu skażenia (*in situ*), jak i w specjalnie wyznaczonym do tego celu miejscu (*ex situ*). Dodatkowo bioaugmentację coraz częściej łączy się z innymi metodami bioremediacji inżynierskiej w celu intensyfikacji rozkładu zanieczyszczeń, na przykład z biostymulacją czy biowentylacją [1, 28, 48, 51, 66].

Bioaugmentacja nie jest nową metodą. Od wielu lat jest praktykowana w rolnictwie, leśnictwie i oczyszczaniu ścieków. Pierwsze próby inokulacji gleby przez zasiedlające korzenie roślin strączkowych bakterie z rodzaju

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009555; e-mail: agnieszka.mrozi<sup>1</sup>@us.edu.pl

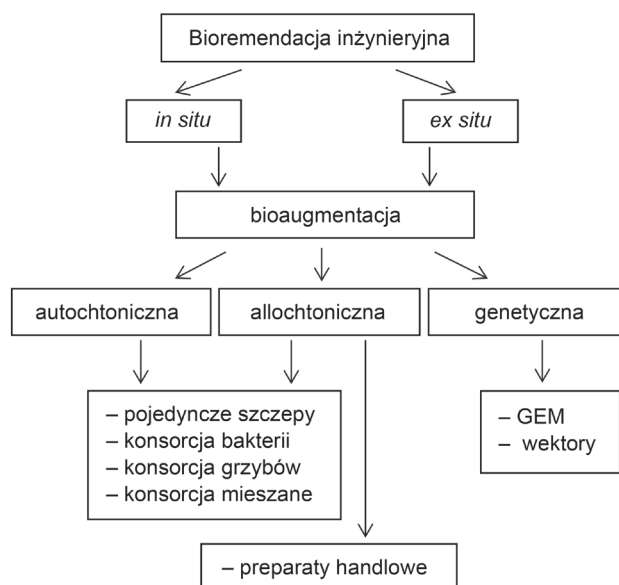
*Rhizobium* przeprowadzono w XIX wieku. W późniejszym czasie podejmowano również próby bioaugmentacji gleby z użyciem bakterii *Azotobacter* i *Azospirillum* spp. w celu zwiększenia plonów roślin uprawnych [43]. Innym sposobem intensyfikacji zbiorów było także zaszczepianie nasion roślin uprawnych mikroorganizmami promującymi wzrost roślin (plant-growth-promoting microorganisms) lub mikroorganizmami chroniącymi rośliny przed atakiem patogenów (plant-protecting microorganisms) [6, 27]. Pierwszą natomiast zakończoną sukcesem eksperymentalną bioaugmentację wód podziemnych skażonych trichloroetylenem z użyciem bakterii *Ralstonia eutropha* KT-2 przeprowadzili w 2000 roku w Japonii Nakamura i wsp. [47].

## 2. Mikroorganizmy w bioaugmentacji

Mikroorganizmy w porównaniu z innymi organizmami charakteryzują się wyjątkową zdolnością adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych i wykorzystywania związków toksycznych jako substratów energetycznych i budulcowych. Dzięki tym zdolnościom zaangażowane są w procesy transformacji i/lub eliminacji tych związków z zanieczyszczonych środowisk.

Dobór odpowiednich szczepów do bioaugmentacji nie jest zadaniem łatwym. Praktyczne ich wykorzystanie poprzedza żmudny etap ich izolacji, identyfikacji i oceny aktywności degradacyjnej komórek w stosunku do konkretnego zanieczyszczenia. Idealne mikroorganizmy do bioaugmentacji powinny charakteryzować się niezbyt długim czasem generacji, odpowiednią szybkością działania, mobilnością, zdolnością do adhezji i chemotaksji dodatniej w kierunku atraktanta, odpornością na zmiany czynników środowiskowych oraz niewielkim kosztem ich uzyskania [45, 60, 65].

Znanych jest kilka sposobów selekcji mikroorganizmów do bioaugmentacji. Jednym z nich jest izolacja mikroorganizmów o pożądanym właściwościach z zanieczyszczonego środowiska, namnożenie w warunkach laboratoryjnych i ponowne wprowadzenie do miejsca, z którego naturalnie pochodziły. Zabieg ten nosi nazwę bioaugmentacji autochtonicznej lub reinkulacji mikroorganizmami autochtonicznymi (autochthonous bioaugmentation; re-inoculation) [21, 25, 39]. Można również wprowadzać wyselekcjonowane mikroorganizmy do miejsc, w których związek stanowiący skażenie ma podobne właściwości chemiczne do tego, jaki zanieczyszczał pierwotne źródło ich pochodzenia. Metoda ta znana jest pod nazwą bioaugmentacji allochtonicznej lub biowzbogacenia (allochthonous bioaugmentation; bioenrichment) [3, 55]. Kolejną strategią jest introdukcja do środowiska mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (GEM) o wzmożonej



Rys. 1. Rodzaje bioaugmentacji jako jednej z metod bioremediacji inżynierskiej (opracowanie własne)

aktywności degradacyjnej, czy wprowadzanie wektorów niosących geny kodujące enzymy szlaków katabolicznych różnych związków, co nosi nazwę bioaugmentacji genetycznej (gene bioaugmentation) [16, 25, 32, 50]. Istnieje także możliwość stosowania gotowych preparatów handlowych (np. B8, B10 i Devoroil), zawierających mikroorganizmy i/lub biosurfaktanty [23, 58]. Opisane rodzaje bioaugmentacji ilustruje Rys. 1.

W bioaugmentacji stosuje się głównie bakterie Gram-ujemne z rodzajów: *Pseudomonas* [29, 69], *Sphingobium* [12], *Novosphingobium* [11], *Burkholderia* [36], *Alcaligenes* [26] czy *Achromobacter* [54]. Poza nimi coraz powszechniej stosowane są bakterie Gram-dodatnie, reprezentowane przez rodzaje: *Rhodococcus* [32, 72], *Bacillus* [14] czy *Paracoccus* [64]. Można również wprowadzać do skażonych środowisk grzyby mikroskopowe z rodzajów: *Achremonium* [57], *Aspergillus* [15], *Penicillium* [40] i *Mucor* [62]. Żaden z tych mikroorganizmów nie jest uniwersalnym dla potrzeb bioaugmentacji, choć wiele z nich przejawia różnorodne cechy metaboliczne i jest zdolnych do degradacji szeregu różnych zanieczyszczeń.

### 2.1. Pojedyncze szczepy

W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono wiele badań dotyczących intensyfikacji rozkładu WWA, PCB, BTEX, pestycydów, herbicydów, związków ropopochodnych i składników oleju napędowego z wykorzystaniem pojedynczych szczepów bakterii (Tabela I). Teng i wsp. [64] po inokulacji gleby silnie skażonej WWA szczepem *Paracoccus* sp. HPD-2 uzyskali po 28 dniach eksperymentu spadek ogólnej zawartości

Tabela I  
 Pojedyncze szczepy bakterii i grzybów w bioaugmentacji skażonych środowisk

Mikroorganizm	Zanieczyszczenie	Lokalizacja	Źródło
<i>Pseudomonas</i> sp. WBC-3	paration	gleba, Chiny	[69]
<i>Sphingobium</i> sp. 22B	fenantren	gleba, Argentyna	[39]
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	PCB	gleba, USA	[36]
<i>Bacillus</i> sp. PS11	fenol	gleba, Serbia	[14]
<i>Amycolatopsis tucumanensis</i>	Cu	gleba, Argentyna	[2]
<i>Paracoccus</i> sp. HPD-2	WWA	gleba, Chiny	[64]
<i>Novosphingobium</i> DY4	2,4-D	gleba, Chiny	[11]
<i>Pseudomonas</i> sp. JS150	fenol	gleba, Polska	[46]
<i>Aspergillus niger</i> ARIFCC 1053	endosulfan	gleba, Turcja	[7]
<i>Lentinus crinitus</i> CCIBt2611	PCP	gleba, Brazylia	[4]
<i>Phanerochaete velutina</i> FBCC941	WWA	gleba, Finlandia	[70]
<i>Pseudomonas monteilli</i> SB3078	BTEX	osad czynny, Dania	[17]
<i>Rhodococcus</i> sp. YYL	tetrahydrofuran	osad czynny, Chiny	[72]
<i>Sphingomonas</i> sp. TrD23	triklosan	osad czynny, USA	[74]
<i>Sphingobium</i> sp. BiD32	bisfenol A	osad czynny, USA	[74]
<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 <sup>T</sup>	ropa naftowa	woda morska, Włochy	[28]

Objaśnienia: PCB – polichlorowane bifenylole; WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne; 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; PCP – pentachlorofenol; BTEX – mieszanina benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksylenów

wszystkich WWA o 23,2% w stosunku do ich stężenia wyjściowego, w tym związków 3-, 4- i 5-pierścieniowych odpowiednio o 35,1; 20,7 i 24,3%. W innych badaniach Dai i wsp. [11] bioaugmentowali glebę skażoną herbicydem – kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D) z użyciem nowo odkrytego szczepu bakterii *Novosphingobium* DY-4. Po inokulacji gleby tymi bakteriami stwierdzili 95% ubytek 2,4-D aplikowanego do gleby w stężeniu 200 mg/kg gleby w ciągu 5–7 dni. Zakończoną sukcesem bioaugmentację gleby skażonej pestycydem parationem metylu z użyciem szczepu *Pseudomonas* sp. WBC3 przeprowadzili Wang i wsp. [69]. W ciągu 15 dni uzyskali całkowity rozkład tego związku w stężeniu 0,536 mg/s.m gleby w glebie inokulowanej bakteriami, podczas gdy w glebie kontrolnej rozkład zachodził wolniej i towarzyszył mu systematyczny wzrost stężenia *p*-nitrofenolu, głównego intermediatu pośredniego rozkładu parationu. Pomyślnie zakończoną bioaugmentację gleby skażonej pentachlorofenolem (PCP) w stężeniu 100 µg/g gleby z użyciem szczepu *Sphingobium chlorophenolicum* przeprowadzili Dams i wsp. [12]. Wykazali, że w glebie bioaugmentowanej tymi bakteriami w ciągu 2 tygodni ubyło około 80% wprowadzonej dawki PCP, podczas gdy w glebie niebioaugmentowanej – około 40%. Bioaugmentację gleby skażonej fenantrenem (2 g/kg s.m. gleby) z użyciem autochtonicznego, wysoce odpornego na suszę szczepu *Sphingobium* sp. 22B oraz tej samej gleby dodatkowo poddanej biostymulacji przeprowa-

dzili Madueno i wsp. [39]. Z badań tych wynika, że rozkład fenantrenu w glebie inokulowanej bakteriami i poddanej biostymulacji (BB) oraz w glebie biostymulowanej, niebioaugmentowanej (BN) zależał od zawartości w nich wody. Przy wilgotności gleby 10% w ciągu 150 dni nie obserwowano rozkładu tego związku w obu glebach, natomiast po jej zwiększeniu w dniu 150 z 10 do 15% w glebie BB w ciągu 11 dni ubyło około 50% wprowadzonej dawki fenantrenu, a w dniu 200–95%. W glebie BN w tym samym czasie ubyło 5 i 95% wyjściowego stężenia tego związku. Wyniki te wskazują, że skuteczniejszym od biostymulacji rozwiązaniem w eliminacji fenantrenu z gleby była bioaugmentacja połączona z biostymulacją.

## 2.2. Konsorcja mikroorganizmów

Inną strategią bioaugmentacji jest wprowadzanie do zanieczyszczonych środowisk mieszanych konsorcjów mikroorganizmów (Tabela II). Według Heinaru i wsp. [29] konsorcja efektywniej degradują zanieczyszczenia, gdyż zdolności degradacyjne poszczególnych szczepów mogą się uzupełniać. Oznacza to, że produkty pośrednie rozkładu poszczególnych związków przez jedne szczepy mogą być dalej metabolizowane przez inne szczepy. Chi i wsp. [9] wprowadzili konsorcjum trzech szczepów: *Pseudomonas* sp. WBC-3 rozkładającego *p*-nitrofenol, *Cupriavidus necator* JMP134

Tabela II  
Konsorcja mikroorganizmów w bioaugmentacji skażonych środowisk

Konsorcjum	Zanieczyszczenie	Lokalizacja	Źródło
<i>Cupriavidus necator</i> JMP134, <i>Pseudomonas</i> sp. WBC-3 i <i>Alcaligenes</i> sp. NyZ215	<i>p</i> -nitrofenol, <i>m</i> -nitrofenol <i>o</i> -nitrofenol	gleba, Chiny	[9]
<i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> i <i>Candida tropicalis</i>	ropa naftowa	gleba, Chiny	[51]
<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> , <i>Gordonia</i> sp., <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> i <i>Xantomonas</i> sp.	olej napędowy	gleba, Polska	[63]
<i>P. aeruginosa</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> i <i>Ochrobactrum intermedium</i>	diesel biodiesel	gleba, Brazylia	[10]
<i>Rhodococcus ruber</i> P25 i <i>Microbacterium</i> sp. B51	PCB	gleba, Rosja	[18]
Konsorcjum ASP	fenantren	gleba, Indie	[49]
<i>Rhizopus</i> sp., <i>Penicillium funiculosum</i> i <i>Aspergillus sydowii</i>	ropa naftowa	gleba, Meksyk	[40]
<i>Bacillus</i> B1F, B5A i B3G, <i>Chromobacterium</i> sp. 4015 <i>Enterobacter agglomerans</i> B1A, <i>Achremonium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. i <i>Verticillium</i> sp.	WWA	gleba, Brazylia	[57]
<i>B. subtilis</i> DM-4 i <i>P. aeruginosa</i> M i NM	ropa naftowa	gleba, Indie	[13]
<i>P. fluorescens</i> T1, <i>P. diminuta</i> T2, <i>P. fluorescens</i> T3, <i>Burkholderia pseudomallei</i> T4, <i>P. putida</i> T5, <i>Flavobacterium</i> sp. T6, <i>Vibrio alginolyticus</i> T7, <i>P. aeruginosa</i> T8, <i>P. stutzeri</i> T9 i <i>P. fluorescens</i> T10	HCH	gleba, Indie	[8]
Konsorcjum ENEA-LAMOSS (12 szczepów allochtonicznych)	olej napędowy, Pb, Zn	gleba, Włochy	[61]
<i>Rhodococcus</i> sp. YYL, <i>B. cereus</i> MLY1 i <i>B. aquimaris</i> MLY2	tetrahydrofuran	osad czynny, Chiny	[72]
<i>A. borkumensis</i> SK2 <sup>T</sup> i <i>Thalassolituus oleivorans</i> MIL-1 <sup>T</sup>	ropa naftowa	woda morska, Włochy	[28]

Objaśnienia: PCB – polichlorowane bifenylo; WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne; HCH – heksachlorocykloheksan

degradującego *m*-nitrofenol i *Alcaligenes* sp. NyZ215 metabolizującego *o*-nitrofenol do gleby skażonej mieszaniną wszystkich izomerów nitrofenolu w stężeniu 40 µg/g gleby każdy. Uzyskali w ten sposób całkowity ich rozkład w ciągu 8 dni, podczas gdy w glebie kontrolnej w 30 dniu oznaczyli 29% wyjściowego stężenia każdego z tych izomerów. W innych badaniach Szulc i wsp. [63] przeprowadzili w warunkach polowych bioaugmentację gleby skażonej olejem napędowym w stężeniu 8500 mg/kg gleby z użyciem konsorcjum bakterii: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Gordonia* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Rhodococcus equi*, *Stenotrophomonas maltophilia* oraz *Xantomonas fluorescens*. Po 365 dniach eksperymentu stwierdzili 95% ubytek zanieczyszczeń w glebie inokulowanej bakteriami, podczas gdy w glebie nieinokulowanej ubyło w tym czasie około 50%. Dodatkowo wykazali w osobnym eksperymencie, że dodatek do gleby bioaugmentowanej biosurfaktantów (ramnolipidów) nie miał znaczącego wpływu na tempo rozkładu oleju napędowego. Synergistyczny efekt 3 gatunków bakterii: *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens* i *Streptococcus faecalis* oraz grzyba *Candida tropicalis* w degradacji 16 różnych WWA (składników ropy naftowej) w glebie poddanej bioaugmentacji i biostymulacji obserwowali Qiao i wsp. [51]. Biostymulacja polegała na dodaniu do skażonej gleby komercyjnego nawozu (NPK),

węgla brunatnego w postaci popiołu lub organicznych ścieków przemysłowych (NovoGro) oraz wszystkich tych materiałów równocześnie. Najwyższą wydajność rozkładu 2-, 3- i 4- oraz 5- i 6-pierścienowych WWA, wynoszącą odpowiednio 35, 70 i 45%, uzyskali w glebie poddanej bioaugmentacji oraz biostymulacji z użyciem wszystkich 3 preparatów. Znane są również przykłady inokulacji osadów czynnych wybranymi szczepami bakterii. Yao i wsp. [72] wprowadzali szczepy *Rhodococcus* sp. YYL, *Bacillus cereus* MLY1 i *B. aquimaris* MLY2 do osadu czynnego zanieczyszczonego syntetycznymi ściekami zawierającymi tetrahydrofuran (THF) w stężeniu 20 mM. Stwierdzili, że szczep YYL dominował w osadzie i kolonizował powierzchnię kłaczek jedynie w obecności dwóch pozostałych szczepów, natomiast gdy wprowadzono go indywidualnie nie wykazywał takiej zdolności. Wynikiem kolonizacji i dominacji tego szczepu była efektywna eliminacja zastosowanej dawki THF (95%) w ciągu 20 dni. Z kolei Hassanshahian i wsp. [28] przeprowadzili bioaugmentację i biostymulację naturalnej wody morskiej zanieczyszczonej ropą naftową (1000 ppm) z użyciem odpowiednio 2-składnikowego konsorcjum bakterii *Alcanivorax borkumensis* SK2<sup>T</sup> i *Thalassolituus oleivorans* MIL-1<sup>T</sup> oraz składników nieorganicznych (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl i NaNO<sub>3</sub>). Z badań tych wynika, że biostymulacja okazała się skuteczniejszym zabiegiem w redukcji zanieczyszczeń niż bio-

Tabela III  
Genetycznie modyfikowane mikroorganizmy w bioaugmentacji skażonych środowisk

Mikroorganizmy/wektory	Wektory/geny kataboliczne	Zanieczyszczenia	Lokalizacja	Źródło
<i>E. coli</i> HB101 (pJP4)	plazmid pJP4	2,4-D	gleba, Japonia	[33]
<i>P. putida</i> BBC443	plazmid TOL, <i>gfp</i> mut3b	toluen	gleba, USA	[32]
<i>P. putida</i> PAW 340/pDH5	plazmid pDH5	4-CBA	gleba, Włochy	[41]
<i>P. fluorescens</i> MP	megaplazmid pJS1	2,4-DNT	gleba, Argentyna	[44]
<i>P. fluorescens</i> RE	geny <i>dntABDEG</i>	2,4-DNT	gleba, Argentyna	[44]
<i>P. putida</i> KT2442	plazmid pNF142::TnMod-OTc	naftalen	gleba, Rosja	[20]
<i>B. xenovorans</i> LB400 ( <i>ohb</i> )	<i>ohb</i> operon w wektorze pRT1	Aroclor 1242	osad denny, USA	[53]
pDOC	plazmid pDOC, <i>gfp</i> <sup>+</sup>	chlorpyrifos	gleba, Chiny	[73]

Objaśnienia: 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; 4-CBA – kwas 4-chlorobenzoesowy; 2,4-DNT – 2,4-dinitrotoluen

augmentacja. W glebie poddanej biostymulacji rozkład węglowodorów ropopochodnych nastąpił w 80%, a w glebie bioaugmentowanej w 70%. Dla porównania inokulacja wody pojedynczym szczepem *A. borkumensis* SK2<sup>T</sup> okazała się najskuteczniejszym sposobem eliminacji zanieczyszczeń (90%).

### 2.3. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie

W bioaugmentacji zanieczyszczonych środowisk można również stosować mikroorganizmy modyfikowane genetycznie (GEM) o wzmożonej aktywności degradacyjnej (Tabela III). Takie szczepy pozyskuje się drogą mutagenyzy losowej i indukowanej oraz konstruuje metodami inżynierii genetycznej. Liphay i wsp. [37] inokulowali glebę szczepem *E. coli* HB101, będącej gospodarzem plazmidu pRO103, zawierającego gen dioksygenazy kwasu 2,4-D-dichlorofenoksyoctowo/2-oksoglutarynowego. W wyniku transferu tego plazmidu do szczepu *R. eutropha* uzyskali transkonjuganty *R. eutropha* (pRO103), które lepiej przeżywały w glebie i przeprowadzały szybciej rozkład wprowadzonego do niej kwasu 2,4-D niż komórki bezplazmidowe. Wydajniejszą mineralizację kwasu 4-chlorobenzoesowego (4-CBA) w glebie inokulowanej dzikim szczepem *Arthrobacter* sp. FG1 i modyfikowanym genetycznie *P. putida* PaW340 (pDH5) obserwowali także Massa i wsp. [41]. Uzyskane rekombinanty *Arthrobacter* sp. FG1 (pDH5) z genem dehalogenazy efektywniej rozkładały 4-PCB niż w glebie inokulowanej pre-adaptowanym, dzikim szczepem. W innych badaniach Inoue i wsp. [33] wprowadzili do gleby skażonej 2,4-D szczepy *E. coli* z plazmidem pJP4 i *Pseudomonas* sp. KT2440. Plazmid ten zawierał geny kodujące enzymy rozkładu 2,4-D do 2-chloromaleiloctanu oraz geny oporności na rtęć. Mimo, że liczebność inokulantów drastycznie malała po wprowadzeniu do gleby, stwierdzono wzrost tempa rozkładu 2,4-D, będący wynikiem transferu plaz-

midu do szczepów naturalnie zasiedlających glebę. Wśród biorców plazmidu znalazły się szczepy autochtoniczne z rodzaju *Burkholderia* oraz allochtoniczny szczep *Pseudomonas* sp. KT2440. Podobne zjawisko w wyniku bioaugmentacji sterylnej gleby skażonej toluenem (4 mg/l) z użyciem szczepu *P. putida* BBC443 niosącego plazmid TOL*gfp*mut3b oraz 4 dzikich szczepów bakterii *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* i *P. fluorescens* jako potencjalnych biorców tego plazmidu obserwowali Ikuma i Gunsch [32]. Pomimo, że szczep dawcy zamierał po kilku dniach po introdukcji do gleby, tempo rozkładu toluenu systematycznie się zwiększało i w 24 dniu wynosiło 0,079 mg/g/h. Było to wynikiem wysokiej efektywności transferu i ekspresji genów odpowiedzialnych za rozkład toluenu w komórkach biorców i wzrostu ich liczebności niezależnie od przeżywalności dawcy. Szczepy modyfikowane genetycznie znalazły także zastosowanie w utlenianiu As(III) do As(V) w wodach kopalnianych [16]. Arsen (III) jest bardziej trujący od As(V), trudniejszy do usunięcia z wody oraz bardziej rozpowszechniony. Szczepy wyposażone w plazmid pA101 oraz równocześnie w dwa plazmidy pA101 i pARS były zdolne do wzrostu w tych wodach i całkowicie eliminowały z nich As(III) (0,25 mg/l) w ciągu 24 godzin.

Innym rodzajem bioaugmentacji genetycznej ograniczającej trudności związane ze słabą przeżywalnością inokulantów i niską ich aktywnością jest bezpośrednie wprowadzanie do zanieczyszczonego środowiska wektorów. Strategię taką zastosowali Zhang i wsp. [73], którzy do gleby skażonej chlorpyrifosem (200 mg/kg s.m gleby) wprowadzili plazmid pDOC, pochodzący z bakterii *Bacillus laterosporus*, niosący geny odpowiedzialne za rozkład tego insektycydu. Wynikiem tego był transfer plazmidu do szczepów rodzimych, reprezentujących rodzaje *Pseudomonas* i *Staphylococcus*, które uzyskały zdolność rozkładu chlorpyrifosu w ciągu 5 dni od momentu jego aplikacji do gleby. Częstotliwość transferu plazmidu była najwyższa

w temperaturze 30°C i przy pojemności wodnej gleby 60%. Jednocześnie stwierdzono, że liczebność potencjalnych biorców plazmidu pDOC systematycznie się zwiększała z 29 jtk/g gleby w dniu rozpoczęcia eksperymentu do 130 jtk/g gleby w dniu 14.

Użycie GEM w oczyszczaniu zanieczyszczonych środowisk budzi wielki entuzjazm naukowców, jednakże ze względu na obawy i wątpliwości związane z wprowadzaniem takich mikroorganizmów do gleby czy wód badania w tym zakresie nie są prowadzone na szeroką skalę.

### 3. Sposoby dostarczania mikroorganizmów do środowiska

Istnieje kilka sposobów dostarczania mikroorganizmów do zanieczyszczonych środowisk. Do gleby najczęściej wprowadza się je poprzez równomierne rozpylanie zawiesiny komórek na powierzchni skażonego obszaru lub dostarcza bezpośrednio w głąb gleby poprzez systemy otworów lub odwierty. Żadna z tych metod nie gwarantuje jednak właściwego rozmieszczenia i przeżywalności introdukowanych szczepów. Rozpylanie zawiesiny na powierzchni gleby ogranicza dostęp mikroorganizmów do jej głębszych warstw, a dostarczanie poprzez otwory czy odwierty nie zapewnia równomiernego rozmieszczenia komórek i może prowadzić do zablokowania przez mikroorganizmy miąższości warstwy wodonośnej. Do wód podziemnych można wprowadzać mikroorganizmy poprzez bezpośrednie iniekcje przez studnie pionowe, szyby czy dreny, ale nie są to również metody w pełni efektywne. Skuteczniejszym sposobem dostarczania mikroorganizmów do gleby czy wód wydaje się użycie komórek immobilizowanych w/na różnych nośnikach. Unieruchamianie komórek ma wiele zalet. Przedłuża czas ich życia w porównaniu do wolnożyjących komórek, zwiększa ich stabilność oraz ogranicza wpływ czynników zewnętrznych [25, 30]. Kuyukina i wsp. [34] wykorzystali komórki *Rhodococcus erythropolis* IEGM 275 i *R. ruber* IEGM 231 unieruchomione w granulach kriożelu alkoholu poliwinylowego do bioaugmentacji gleby skażonej ropą naftową (50 g/kg gleby). Stwierdzili, że w glebie z dodatkiem immobilizowanych bakterii w ciągu 14 miesięcy ubyło około 5% więcej zanieczyszczeń niż w glebie z dodatkiem zawiesiny wolnych komórek i o około 27% więcej niż w glebie kontrolnej, nieinokulowanej bakteriami. Jednocześnie wykazali, że aktywność oddechowa gleby z dodatkiem immobilizowanych komórek oraz ich przeżywalność były wyższe niż w glebie z wolnymi komórkami oraz w glebie kontrolnej. W innych badaniach Xin i wsp. [71] porównywali efekt bioaugmentacji wód podziemnych skażonych BTEX (100 mg/l) z użyciem immobilizowanego w alkoholu poliwinylowym z dodatkiem alginianu

sodu szczepu *Mycobacterium* sp. CHXY119 oraz jego mieszaniny z *Pseudomonas* sp. YATO411. Wykazali, że w wodzie z dodatkiem konsorcjum obu szczepów degradacja wszystkich składników BTEX zachodziła w 100% i w krótszym czasie niż w wodzie inokulowanej pojedynczym szczepem. Bioaugmentację wody morskiej zanieczyszczonej olejem napędowym z użyciem 2-składnikowego konsorcjum bakterii: *Rhodococcus pyridinivorans* CC-HCCH11, *Gordonia alcanivorans* CC-JG39 i *Alcaligenes piechaudii* CC-ESB2 (w różnych kombinacjach), unieruchomionych w kulkach alginianu wapnia oraz wolnych komórek przeprowadzili Liu i wsp. [38]. Najwyższą wydajność eliminacji zanieczyszczeń (78%) uzyskali w wodzie z dodatkiem immobilizowanego szczepu CC-HCCH11 i CC-JG39 w stosunku 5:1. Dla porównania wydajność rozkładu oleju w wodzie z wolnymi bakteriami w identycznym stosunku wynosiła około 50%. Shi i wsp. [56] badali zdolność degradacji karbazolu, dibenzo(f)fenolu oraz dibenzofuranu przez szczep *Arthrobacter* sp. W1 immobilizowany w różnych nośnikach: agarze,  $\kappa$ -karagenie oraz gumie gellan i inokulowany do ścieków koksowniczych. Z badań tych wynika, że najwyższą efektywność eliminacji tych związków (90%) uzyskano w ciągu 4 godzin z zastosowaniem bakterii unieruchomionych z użyciem gumy gellan. W tym samym czasie w ściekach z dodatkiem komórek immobilizowanych w agarze i  $\kappa$ -karagenie ubytek wyjściowego stężenia zanieczyszczeń mieścił się w zakresie 25–50%. Bioaugmentacja gleby czy wód z wykorzystaniem immobilizowanych mikroorganizmów o wysokim potencjale degradacji konkretnego zanieczyszczenia nie zawsze odnosi jednak oczekiwany skutek. Na przykład Maqbool i wsp. [42] nie obserwowali pozytywnego wpływu bioaugmentacji ryzosfery *Sesbania cannabina* z użyciem konsorcjum immobilizowanych bakterii *Microbacterium foliorum*, *G. alkanivorans* i *Mesorhizobium* na rozkład węglowodorów ropy naftowej. W tym przypadku biodegradacja ryzosferyczna zanieczyszczeń z udziałem allochtonicznych mikroorganizmów okazała się skuteczniejsza od bioaugmentacji gleby z użyciem immobilizowanych bakterii. Przykłady mikroorganizmów immobilizowanych w/na różnych nośnikach w bioaugmentacji różnych środowisk ilustruje Tabela IV.

Innym sposobem dostarczania do gleby mikroorganizmów o wysokim potencjale degradacji konkretnych zanieczyszczeń jest mieszanie jej z tzw. „aktywną glebą”, zawierającą populacje eksponowane przed długi okres czasu na obecność określonych związków i zaadaptowane do ich rozkładu [25]. Taki sposób wspomagania rozkładu PCP w glebie, w której rozkład tego związku nie zachodził zastosowali Barbeau i wsp. [5]. Po zmieszaniu tej gleby z „aktywną glebą”, zasiedlaną przez mikroorganizmy rozkładające PCP, w ciągu 130 dni nastąpił rozkład tego związku w 98%.

Tabela IV  
Mikroorganizmy immobilizowane w bioaugmentacji skażonych środowisk

Mikroorganizmy	Nośnik	Zanieczyszczenie	Lokalizacja	Źródło
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> CC-HCCH11, <i>Gordonia alcanivorans</i> CC-JG39 i <i>Alcaligenes piechaudii</i> CC-ESB2	alginian wapnia	olej napędowy	woda morska, Meksyk	[32]
<i>P. mendocina</i> , <i>Planomicrobium alkanoclasticum</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Arthrobacter pascens</i> i <i>A. nitrogujacolicus</i>	muszle małży, brykiety z włókna kokosowego, muszle + agar	olej napędowy	woda morska, Australia	[59]
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	chityna, chitozan	ropa naftowa	woda morska, Argentyna	[24]
<i>Mycobacterium</i> sp. CHXY119 i <i>Pseudomonas</i> sp. YATO411	alginian sodu, alkohol poliwinylowy	BTEX	wody gruntowe, USA	[71]
konsorcjum bakterii	zeolity, węgiel aktywny	ropa naftowa	gleba, Chiny	[35]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> i <i>R. ruber</i>	kriożel alkoholu poliwinylowego	ropa naftowa	gleba, Rosja	[34]
<i>Microbacterium foliorum</i> , <i>G. alkanivorax</i> i <i>Messorhizobium</i> sp.	alginian sodu z dodatkiem ziemi okrzemkowej	ropa naftowa	gleba, Chiny	[42]
<i>Sphingobium indicum</i> B90A	proszek z kolby kukurydzy	HCH	gleba, Indie	[52]

Objaśnienia: BTEX – mieszanina benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksyleneń; HCH – heksachlorocykloheksan

#### 4. Czynniki ograniczające bioaugmentację

Jednym z głównych czynników ograniczających pomyślny przebieg bioaugmentacji jest słaba przeżywalność wprowadzonych do środowiska mikroorganizmów. Ich liczebność zazwyczaj drastycznie maleje w krótkim czasie po aplikacji do skażonych miejsc. Przyczyną śmierci inokulantów może być brak zdolności konkurencyjności z rodzimą mikroflorą o związki odżywcze, produkcja antybiotyków czy bakteriocyn przez autochtoniczne mikroorganizmy, obecność inhibitorów, drapieżnictwo czy infekcja bakteriofagami [25]. Sposobami zwiększania przeżywalności introdukowanych mikroorganizmów jest wprowadzanie dużej ich biomasy w zakresie  $10^6$ – $10^9$ /g lub l [11, 28, 51, 69], kilkukrotna aplikacja mikroorganizmów (succesive bioaugmentation) w zależności od tempa rozkładu toksycznych związków [10], biostymulacja poprzez dostarczenie dodatkowych składników organicznych i nieorganicznych [48], czy unieruchamianie komórek w różnych nośnikach [34]. Do monitorowania przeżywalności i aktywności introdukowanych do środowiska mikroorganizmów służą zaawansowane metody genetyczne [17].

Niemniej ważne od doboru odpowiednich szczepów do inokulacji, sposobu ich dostarczenia do środowiska oraz wzajemnych interakcji z rodzimą mikroflorą są czynniki abiotyczne, jak: temperatura, pH, dostęp tlenu, zawartość materii organicznej, poziom substratów odżywczych i kofaktorów czy wilgotność. Z licznych prac wynika, że optymalna temperatura dla wzrostu i rozkładu wielu związków przez mikroorganizmy kształtuje się w zakresie 15–45°C. Patel i wsp. [49]

w badaniach wpływu temperatury w zakresie 30–50°C na rozkład fenantrenu w bioaugmentowanym osadzie z użyciem konsorcjum ASP wykazali, że najefektywniej rozkład tego związku (80%) przebiegał w temperaturze 37°C, a najmniej wydajnie (10%) w temperaturze 45°C. Dodatkowo stwierdzili, że optymalne pH dla rozkładu fenantrenu wynosiło 8,0. W innych badaniach Hong i wsp. [31] ustalili, że rozkład fenitrotionu w glebie inokulowanej szczepem *Burkholderia* sp. FDS-1 zachodził najintensywniej w temperaturze 30°C i pH 7,5. Innym czynnikiem limitującym rozkład zanieczyszczeń w glebie jest zawartość w niej wody. Madueno i wsp. [39] wykazali, że tempo rozkładu fenantrenu w glebie o pojemności wodnej (WHC) równej 20%, poddanej bioaugmentacji autochtonicznej, drastycznie w niej zmalało w porównaniu do tempa rozkładu tego związku w glebie o WHC – 15%. Podobnie Viñas i wsp. [67] obserwowali znacznie wydajniejszą biodegradację krezoli w glebie o WHC na poziomie 40–60% niż w glebie o WHC – 20%. Nie bez znaczenia w skutecznej eliminacji toksycznych związków z gleby jest także zawartość w niej materii organicznej. Zazwyczaj proces biodegradacji zanieczyszczeń zachodzi szybciej w glebach o większej zawartości materii organicznej, co może być związane ze zmniejszeniem ich toksycznego działania na komórki mikroorganizmów w wyniku wiązania się z frakcjami humusowymi oraz mineralnymi gleby [26]. Kompleksowe badania losów wprowadzonych do środowiska inokulantów oraz wzajemnych interakcji między introdukowanymi i rodzimymi mikroorganizmami z jednoczesnym uwzględnieniem zmieniających się warunków środowiskowych jest niezwykle trudne, ale niezbędne do pomyślnego przebiegu bioaugmentacji.

## 5. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że bioaugmentacja jest obiecującą technologią w eliminacji szkodliwych związków z różnych środowisk. Jej zaletami są łatwość przeprowadzenia, stosunkowo niskie koszty oraz duża skuteczność, natomiast ograniczeniami – słaba przeżywalność inokulantów lub zanik ich aktywności degradacyjnej po introdukcji do środowiska oraz obniżenie tempa rozkładu substancji zanieczyszczającej przez wzrost toksyczności produktów pośrednich biodegradacji. Duże nadzieje wiąże się z rozwojem nowych strategii selekcji mikroorganizmów i zachowania ich aktywności w kontakcie z mikroflorą autochtoniczną, opracowaniem innych metod dostarczania komórek do skażonych środowisk (np. z użyciem nanomateriałów) oraz zastosowaniem nowoczesnych technik molekularnych do monitorowania liczebności i aktywności inokulantów (np. qPCR, (RT)-qPCR, SIP czy eGFP-tagging). Konieczne są również dokładne badania interakcji między inokulowanymi szczepami a zespołami mikroorganizmów rodzimych na poziomie komórka-komórka w rzeczywistych warunkach oczyszczania konkretnych środowisk, gdyż wiedza w tym zakresie jest ciągle ograniczona.

## Piśmiennictwo

- Agarry S., Latinwo G.K.: Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents. *J. Ecol. Eng.* **16**, 82–91 (2015)
- Albarracin V.H., Amoroso M.J., Abate C.M.: Bioaugmentation of copper polluted soil microcosms with *Amycolatopsis tucumanensis* to diminish phytoavailable copper for *Zea mays* plants. *Chemosphere*, **79**, 131–137 (2010)
- Alvarez V.M., Marques J.M., Korenblum E., Seldin L.: Comparative bioremediation of crude oil-amended tropical soil microcosms by natural attenuation, bioaugmentation, or bioenrichment. *Appl. Environ. Soil Sci.* **2011**, 1–10 (2011)
- Ballaminut N., Gomes Machado K.M., dos Santos Oliveira L.H., Matheus D.R.: Physiological characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **57**, 561–570 (2014)
- Barbeau C., Deschênes L., Karamanev D., Comeau Y., Samson R.: Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 745–752 (1997)
- Bent E., Tuzun S., Chanway C.P., Enebak S.: Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* **47**, 793–800 (2001)
- Bhalerao T.S.: Bioremediation of endosulfan-contaminated soil by using bioaugmentation treatment of fungal inoculant *Aspergillus niger*. *Turk. J. Biol.* **36**, 561–567 (2012)
- Bidlan R., Afsar M., Manonmani H.K.: Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*, **56**, 803–881 (2004)
- Chi X-Q., Zhang J-J., Zhao S., Zhou N-Y.: Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environ. Pollut.* **172**, 33–41 (2013)
- Colla T.S., Andrezza R., Bucker F., de Souza M.M., Tramontini L., Prado G.R., Frazzon A.P.G., Camargo F.A.D.O., Bento F.M.: Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **21**, 2592–2602 (2014)
- Dai Y., Li N., Zhao Q., Xie S.: Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community structure. *Biodegradation*, **26**, 161–170 (2015)
- Dams R.I., Paton G., Killham K.: Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic system. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **60**, 171–177 (2007)
- Das K., Mukherjee A.K.: Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* **98**, 1339–1345 (2007)
- Djokic L., Narancic T., Biocanin M., Saljnikov E., Casey E., Vasiljevic B., Nikodinovic-Runic J.: Phenol removal from four different natural soil types by *Bacillus* sp. PS11. *Appl. Soil Ecol.* **70**, 1–8 (2013)
- dos Santos E.O., da Rossa C.F.C., dos Passos C.T., Sanzo A.V.L., Burkert J.F.M., Kalil S.J., Burkert C.A.V.: Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *Afr. J. Biotechnol.* **7**, 1311–1317 (2008)
- Drewniak Ł., Ciekowska M., Radlinska M., Skłodowska A.: Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *J. Biotechnol.* **196–197**, 42–51 (2015)
- Dueholm M.S., Marques I.G., Karst S.M., D'Imperio S., Tale V.P., Lewis D., Nielsen P.H., Nielsen J.L.: Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresour. Technol.* **186**, 192–199 (2015)
- Egorova D.O., Demakov V.A., Plotnikova E.G.: Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains. *J. Hazard. Mater.* **261**, 378–386 (2013)
- El Fantroussi S., Agathos S.N.: Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 268–275 (2005)
- Filonov A.E., Akhmetov L.I., Puntus I.F., Esikova T.Z., Gafarov A.B., Izmalkova T.Yu., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Boronin A.M.: The construction and monitoring of genetically marked, plasmid-containing, naphthalene-degrading strains in soil. *Microbiology*, **74**, 526–532 (2005)
- Fodelianakis S., Kalogerakis N. i wsp.: Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *J. Hazard. Mater.* **287**, 78–86 (2015)
- Forsyth J.V., Tsao Y.M., Bleam R.D.: Bioremediation: when is bioaugmentation needed? (w) Bioaugmentation for site remediation, red. R.E. Hinchee, J. Fredrickson, B.C. Alleman, Columbus Battele Press, USA, 1995, s. 1–14
- Gabbasovna Akhmetzyanova L., Nikolaevich K.I., Jurevna Selivanovskaya S.: Comparative analysis of the effectiveness of oil contaminated soil remediation by microbial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and commercial preparation “Devoroil”. *Adv. Environ. Biol.* **8**, 117–121 (2014)
- Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M., Rodriguès M.S.: Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **57**, 222–228 (2006)



25. Gentry T.J., Rensing C., Pepper I.L.: New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **34**, 447–494 (2004)
26. Haluška L., Barančíková G., Baláž Š., Dercová K., Vrana B., Paz-Wiesshaar M., Furčíová E., Bielek P.: Degradation of PCB in different soil by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *Sci. Total Environ.* **175**, 275–285 (1995)
27. Hamid M., Siddiqui I.A., Shahid Shaukat S.: Improvement of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 biocontrol activity against root-knot nematode by the addition of ammonium molybdate. *Lett. Appl. Microbiol.* **364**, 239–244 (2003)
28. Hassanshahian M., Emtiazi G., Caruso G., Cappello S.: Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: a mesocosm simulation study. *Mar. Environ. Res.* **95**, 28–38 (2014)
29. Heinaru E., Merimaa M., Viggor S., Lehiste M., Leito I., Truu J., Heinaru A.: Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**, 363–373 (2005)
30. Herrero M., Stuckey D.C.: Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review. *Chemosphere*, **140**, 119–128 (2015)
31. Hong Q., Zhang Z., Hong Y., Li S.: A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia* sp. FDS-1. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **59**, 55–61 (2007)
32. Ikuma K., Gunsch C.: Successful genetic bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for toluene degradation in soil columns. *Environ. Chem. Lett.* **11**, 365–370 (2013)
33. Inoue D., Yamazaki Y., Tsutsui H., Sei K., Soda S., Fujita M., Ike M.: Impacts of gene bioaugmentation with pJP4-harboring bacteria of 2,4-D-contaminated soil slurry on the indigenous microbial community. *Biodegradation*, **23**, 263–276 (2012)
34. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Kamenskikh T.N., Bulicheva M.V., Stukova G.I.: Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **84**, 118–125 (2013)
35. Liang Y., Zhang X., Dai D., Li G.: Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **63**, 80–87 (2009)
36. Liang Y., Meggo R., Hu D., Schnoor J.L., Mattes T.E.: Enhanced polychlorinated biphenyl removal in a switchgrass rhizosphere by bioaugmentation with *Burkholderia xenovorans* LB400. *Ecol. Eng.* **71**, 215–222 (2014)
37. Liphay J.R., Barkay T., Sorensen S.J.: Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**, 75–84 (2001)
38. Liu P.-W.G., Liou J.W., Li Y.T., Su W.L., Chen C.-H.: The optimal combination of entrapped bacteria for diesel remediation in seawater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **102**, 383–391 (2015)
39. Madueno L., Alvarez H.M., Morelli I.S.: Autochthonous bioaugmentation to enhance phenanthrene degradation in soil microcosms under arid conditions. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **12**, 2317–2326 (2015)
40. Mancera-López M.E., Esparza-García F., Chávez-Gómez B., Rodríguez-Vázquez R., Saucedo-Castañeda G., Barrera-Cortés J.: Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **61**, 151–160 (2008)
41. Massa V., Infantino A., Radice F., Orlandi V., Tavecchio F., Giudici R., Conti F., Urbini G., Di Guardo A., Barbieri P.: Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **63**, 112–115 (2009)
42. Maqbool F., Wang Z., Xu Y., Zhao J., Gao D., Zhao Y.-G., Bhatti Z.A., Xing B.: Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *J. Hazard. Mater.* **237–238**, 262–269 (2012)
43. Monib M., Abd-el-Malek Y., Hosny I., Fayed M.: Effect of *Azotobacter* inoculation on plant growth and soil nitrogen. *Zentralbl. Bakteriol. Naturwiss.* **134**, 140–148 (1979)
44. Monti M.R., Smania A.M., Fabro G., Alvarez M.E., Argaraña C.E.: Engineering *Pseudomonas fluorescens* for biodegradation of 2,4-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8864–8872 (2005)
45. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z.: Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* **165**, 363–375 (2010)
46. Mrozik A., Miga S., Piotrowska-Seget Z.: Enhancement of phenol degradation by soil bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. JS150. *J. Appl. Microbiol.* **111**, 1–14 (2011)
47. Nakamura K., Ishida H., Iizumi T., Shibuya K., Okamura K.: Quantitative PCR-detection of a phenol-utilizing bacterium, *Ralstonia eutropha* KT-1, injected to a trichloroethylene-contaminated site. *Environ. Eng. Res.* **37**, 267–278 (2000)
48. Nikolopoulou M., Pasadakis N., Kalogerakis N.: Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Mar. Pollut. Bull.* **72**, 165–173 (2013)
49. Patel V., Patel J., Madamwar D.: Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Mar. Pollut. Bull.* **74**, 199–207 (2013)
50. Pieper D.H., Reineke W.: Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 262–270 (2000)
51. Qiao J., Zhang C., Luo S., Chen W.: Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal. *Front. Environ. Sci. Eng.* **8**, 293–304 (2014)
52. Raina V., Lal R. i wsp.: Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. *Biodegradation*, **19**, 27–40 (2008)
53. Rodrigues J.L.M., Kachel C.A., Aiello M.R., Quensen J.F., Maltseva O.V., Tsoi T.V., Tiedje J.M.: Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1(fcb). *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2476–2482 (2006)
54. Ronen Z., Vasiluk L., Abeliovich A., Nejdat Z.: Activity and survival of tribromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 1643–1650 (2000)
55. Semrany S., Favier L., Djelal H., Taha S., Amrane A.: Bioaugmentation: possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds. *Biochem. Eng. J.* **69**, 75–86 (2012)
56. Shi S., Qu Y., Ma F., Zhou J.: Bioremediation of coking wastewaters containing carbazole, dibenzofuran and dibenzothipene by immobilized naphthalene-cultivated *Arthrobacter* sp. W1 in magnetic gellan gum. *Bioresour. Technol.* **166**, 79–86 (2014)
57. Silva I.S., dos Santos E.C., de Menezes C.R., de Faria A.F., Franciscon E., Grossman M., Durrant L.R.: Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour. Technol.* **100**, 4669–4675 (2009)
58. Simon M.A., Bonner J.S., Page C.A., Townsend R.T., Mueller D.C., Fuller C.B., Autenrieth R.L.: Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. *Ecol. Eng.* **22**, 263–277 (2004)

59. Simons K.L., Ansar A., Kadali K., Bueti A., Adetutu E.M., Ball A.S.: Investigating the effectiveness of economically sustainable carrier material complexes for marine oil remediation. *Bioresour. Technol.* **126**, 202–207 (2012)
60. Singer A.C., van der Gast C.J., Thompson I.P.: Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol.* **23**, 74–77 (2005)
61. Sprocati A.R., Alisi C., Tasso F., Marconi P., Sciuillo A., Pinto V., Chiavarini S., Ubaldi C., Cremisini C.: Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Proc. Biochem.* **47**, 1649–1655 (2012)
62. Szewczyk R., Długoński J.: Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **63**, 123–129 (2009)
63. Szulc A., Ambrożewicz D., Sydow M., Ławniczak Ł., Piotrowska-Cyplik A., Marecik R., Chrzanowski Ł.: The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J. Environ. Manage.* **132**, 121–128 (2014)
64. Teng Y., Luo Y., Sun M., Liu Z., Li Z., Christie P.: Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresour. Technol.* **101**, 3437–3443 (2010)
65. Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., Singer A.C.: Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* **7**, 909–915 (2005)
66. Tyagi M., M. da Fonseca M.R., de Carvalho C.C.C.R.: Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, **22**, 231–241 (2011)
67. Viñas M., Sabate J., Espuny M.J., Anna M., Vin M.: Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7008–7018 (2005)
68. Vogel T.M.: Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 311–316 (1996)
69. Wang L., Chi X-Q., Zhang J-J., Sun D-L., Zhou N-Y.: Bioaugmentation of a methyl parathion contaminated soil with *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **87**, 116–121 (2014)
70. Winquist E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen K.T., Jørgensen K.S., Tuomela M.: Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi – from laboratory to field scale. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **86**, 238–247 (2014)
71. Xin B-P, Wu C-H, Wu C-H, Lin C-W: Bioaugmented remediation of high concentration BTEX-contaminated groundwater by permeable reactive barrier with immobilized bead. *J. Hazard. Mater.* **244–245**, 765–772 (2013)
72. Yao Y., Lu Z., Zhu F., Min H., Bian C.: Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater.* **261**, 550–558 (2013)
73. Zhang Q., Wang B., Cao Z., Yu Y.: Plasmid-mediated bioaugmentation for the degradation of chlorpyrifos in soil. *J. Hazard. Mater.* **221–222**, 178–184 (2012)
74. Zhou N.A., Lutovsky A.C., Andaker G.L., Ferguson J.F., Gough H.L.: Kinetics modeling predicts bioaugmentation with Sphingomonad cultures as a viable technology for enhanced pharmaceutical and personal care products removal during wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **166**, 158–167 (2014)