

Mariola Mendrycka^{1*}, Katarzyna Mucha¹, Sylwester Stawarz¹

¹ Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Katedra Technologii Materiałów Organicznych, Zakład Produktów Naftowych, ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Źródła i sposoby rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń w glebie 3. Metody biodegradacji związków ropopochodnych 4. Mikroorganizmy genetycznie modyfikowane biorące udział w degradacji związków ropopochodnych 5. Mechanizmy biodegradacji węglowodorów ropopochodnych 5.1. Intradiolowe rozszczepienie pierścienia aromatycznego (typu „*orto*”) 5.2. Ekstradiolowe rozszczepienie pierścienia aromatycznego (typu „*meta*”)

Bioremediation of petroleum compounds and their biodegradation pathways

Abstract: In recent years, crude oil and its derivatives are one of the main sources of water pollution and land in Poland. Among the chemical compounds the most toxic and carcinogenic effects on living organisms have polycyclic aromatic hydrocarbons and compounds such as benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes (BTEX). Biotechnological methods, using hydrocarbon-degrading bacteria seem to be the most justified for environmental reasons and economic considerations. This technology is the introduction of suitable strains of bacteria and providing mineral and organic substances necessary for life to microorganisms exist and then a rapid multiplication of microorganisms in the soil. Great importance in removing xenobiotics from the environment gained in recent years by biological and biochemical methods. Development of science and a deeper understanding of biochemical mechanisms related to the disposal of organic waste by different microbes allows the use of specialized bacteria, fungi and plants to combat waste. Biodegradation pathways are constantly known. Particular attention is given to mixtures of compounds of microbial degradation of artificially produced by man, which naturally do not occur in nature. Progressive accumulation of toxic mixtures in the environment is harmful to biological systems. Study of degradation pathways of these compounds often leads to recognition of new enzyme reactions. Due to the large variety of degradative pathways, it seems an interesting presentation of known microbial degradation pathways of alkanes and the characteristics of their key enzymes. Understanding the mechanisms of decomposition of these compounds will enable a better use of microorganisms in the remediation of contaminated environments.

1. Introduction. 2. Sources and methods of the contaminants spread in soil. 3. Methods of petroleum compounds biodegradation. 4. Genetically modified micro-organisms involved in the degradation of petroleum compounds. 5. Mechanisms of biodegradation of petroleum hydrocarbons. 5.1. Intradiolic cleavage of the aromatic ring (such as “*ortho*”). 5.2. Extradiolic cleavage of the aromatic ring (such as “*meta*”)

Słowa kluczowe: bioremediacja, szlaki metaboliczne, związki ropopochodne

Key words: bioremediation, metabolic pathways, petroleum compounds

1. Wprowadzenie

Ropa naftowa jest mieszaniną węglowodorów o różnicowanych właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych, zawierających niewielkie ilości (do 3%) związków organicznych tlenu (kwasy karboksylowe, fenole), siarki, azotu oraz metali ciężkich (do 1%) [26]. W skład ropy naftowej wchodzi następujące grupy węglowodorów [46]:

- alkany, parafiny – węglowodory łańcuchowe nasycone o łańcuchu prostym (n-parafiny) lub rozgałęzionym (izoparafiny),
- alkeny, olefiny – węglowodory łańcuchowe nienasycone,
- cykloalkany, cykloparafiny lub nafteny – węglowodory o budowie pierścieniowej,

- węglowodory aromatyczne, areny – jednopierścieniowe (JWA) – reprezentowane głównie przez grupę związków zwanych w skrócie BTEX: benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA).

Węglowodory aromatyczne, będące składnikami ropy naftowej oraz obecne w środowisku, wywierają teratogenne, cytotoksyczne, immunotoksyczne, mutagenne i nowotworowe działanie na organizmy żywe, z uwagi na możliwość kumulowania się tych związków w roślinach i przedostawania się do kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego [4–6, 14, 17–18, 62].

W ostatnich latach ropa naftowa i jej pochodne są jednym z głównych źródeł zanieczyszczeń wód i gruntów w Polsce [25]. Ciągłe postępująca industrializacja, jak i rozwój motoryzacji przyczyniają się do większego

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. Kazimierza Pułaskiego w Radomiu, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Katedra Technologii Materiałów Organicznych, Zakład Produktów Naftowych, ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom; tel.: +48-48-361-75-82; fax.: +48-48-361-75-98; mariolamendrycka@poczta.onet.pl

zapotrzebowania na produkty naftowe. Ponadto wzrost wydobywania, przetwórstwa i zużycia ropy naftowej nieuchronnie pociąga za sobą zwiększenie przypadków zanieczyszczenia środowiska tymi związkami [42].

Składniki ropy naftowej w środowisku gruntowo-wodnym ulegają mikrobiologicznym i chemicznym przekształceniom a kierunki tych przemian uzależnione są od przebiegu takich procesów jak: utlenianie, odparowanie, emulsyfikacja, sedimentacja, dyspersja, adsorpcja oraz rozpuszczanie w wodach gruntowych i powierzchniowych [21].

Szybkość rozkładu ropopochodnych zanieczyszczeń, w istniejących układach środowiskowych, zależy nie tylko od stężenia związku, ale również od jego struktury chemicznej. Dane literaturowe dowodzą, że najłatwiej biodegradacji ulegają liniowe alkanany C_{10} - C_{25} , następnie węglowodory gazowe C_2 - C_4 , alkanany C_5 - C_9 , alkanany rozgałęzione do C_{12} , alkeny C_2 - C_{11} , rozgałęzione alkeny, cykloalkany, węglowodory monoaromatyczne oraz poliaromatyczne. W tej samej kolejności maleje również ilość izolowanych drobnoustrojów, które są zdolne do namnażania, w obecności wymienionych grup substratów [1, 30, 43].

Poza wymienionymi czynnikami środowiskowymi, które wpływają na szybkość rozkładu węglowodorów, bardzo ważny jest także dobór odpowiednich parametrów fizykochemicznych, takich jak: zawartość tlenu, temperatura, odczyn oraz obecność substancji pokarmowych i ksenobiotyków. Jednak za najważniejszy parametr w procesie biodegradacji uznaje się wskaźnik pH, który powinien mieścić się w przedziale pomiędzy 6,5 a 8 [32, 45]. Produkty ropopochodne obecne w glebie mogą obniżać jej pH, gdyż podczas degradacji węglowodorów powstają kwasy. Dlatego w celu podwyższenia jej odczynu zaleca się wapnowanie gleby [61]. Pierwiastki biogenne, takie jak: azot i fosfor, mają efektywny wpływ na proces bioremediacji, często jednak występują w glebie w ilościach ograniczających namnażanie się drobnoustrojów, dlatego konieczne jest wzbogacanie gleby tymi związkami. Stosunek C:N:P powinien wynosić 100:10:1. Należy jednak pamiętać, że substancje ropopochodne przyczyniają się do wzrostu stosunku węgla do azotu, co z kolei wpływa niekorzystnie na metabolizm mikroorganizmów. Natomiast, gdy rozkład węglowodorów ropopochodnych następuje w warunkach beztlenowych ważne jest wprowadzanie do gleby azotanów i siarczanów jako akceptorów elektronów [13, 58, 60, 66, 76, 83]. Kolejnym ważnym czynnikiem jest woda, która umożliwia rozpuszczanie węglowodorów i z tego względu zaleca się zraszanie gleby wodą lub wprowadzanie jej do gruntu. Produkty ropopochodne często powodują powstanie w glebie stref beztlenowych stąd korzystnie wpływa wprowadzanie w głąb gruntu tlenu bądź stosuje się oranie gleby.

Wszystkie te zabiegi przyczyniają się do wzrostu efektywności procesów bioremediacji [61]. Mimo to

ciągle poszukuje się nowych technik oczyszczania ścieków i unieszkodliwiania odpadów. W ciągu ostatnich 30 lat wzrosło zainteresowanie pracami badawczymi, prowadzonymi nad wykorzystaniem metod biotechnologicznych w biodegradacji wielu niepożądanych substancji organicznych [27]. W celu zwiększenia wydajności biologicznej oczyszczania ścieków, jak i skażonej gleby, podjęto próby wdrażania metod biooczyszczania *in situ*, połączonych ze szczypaniem paliwa [25]. Dużą popularnością cieszą się też techniki oparte na wprowadzaniu gotowych biopreparatów, zawierających wyizolowane odpowiednie szczepy bakteryjne [41, 56] bądź izolowaniu mikroflory autochtonicznej z oczyszczanego gruntu i zaadaptowywaniu ich do dużych stężeń substancji skażającej [24]. Ponadto w procesach bioremediacji stosowane są inne rozwiązania technologiczne oparte na fitoremediacji, kompostowaniu, uprawie gruntu (landfarming), remediacji w bioreaktorach oraz ryzoremediacji. Główne strategie intensyfikujące procesy bioremediacji opierają się na takich technikach jak: biostymulacja, wykorzystanie zjawisk kometabolizmu bakteryjnej chemotaksji, wspomaganie enzymami, wprowadzenie środków powierzchniowo-czynnych [48]. Efektywność usuwania szkodliwych zanieczyszczeń zwiększa się także poprzez zastosowanie ozonowania. Silne zdolności utleniające ozonu powodują całkowitą lub częściową eliminację niebezpiecznych i często niepodatnych na rozkład biologiczny substancji chemicznych. Często wstępne zabiegi polegające na utlenianiu zanieczyszczeń sprawiają, że są one bardziej przyswajalne dla drobnoustrojów, co czyni je bardziej podatnymi na dalszy mikrobiologiczny rozkład [29, 31, 49, 78].

Lepsze poznanie mechanizmów biodegradacji związków ropopochodnych w danych układach środowiskowych pozwoli na opracowanie bardziej skutecznych i bezpiecznych metod eliminacji tych skażeń.

2. Źródła i sposoby rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń w glebie

Na ziemię opada większość wyemitowanych do powietrza WWA, stąd w glebie znajduje się aż 90% całkowitej ilości tych związków, które występują w środowisku [12, 72, 82].

Większość produktów ropy naftowej, które przedostają się do gruntu pochodzi z małych wycieków. Jednak skażenia znajdujące się w gruncie osiągają bardzo wysoki poziom, który często przekracza dopuszczalne normy. Ponadto związki organiczne, zawarte w paliwach i olejach, w których rozpuszczone są toksyczne dodatki uszlachetniające, chlorowcopochodne i wielopierścieniowe węglowodory, wykazują tendencję do migracji, zagrażając w ten sposób wodom gruntowym

i powierzchniowym. Niebezpieczne są zanieczyszczenia zbiorników wodnych substancjami ropopochodnymi z uwagi na tworzenie się błonki na powierzchni wody, która odcina dostęp tlenu i spowalnia procesy samooczyszczania. Zanieczyszczenie wody olejami jest łatwo wykrywalne na powierzchni wód i gruntu, ze względu na ich bardzo małą rozpuszczalność w wodzie. Oleje smarowe w kontakcie z wodą tworzą emulsje lub zawiesiny. Oleje doprowadzone do cieków wodnych mają tendencję do oblepiania roślin i opadania na dno. Powoduje to zwiększenie ilości osadów dennych i spowolnienie życia biologicznego w środowisku wodnym [70–71].

Źródła potencjalnych zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi koncentrują się przede wszystkim wokół takich obiektów jak [11, 54, 64, 73]:

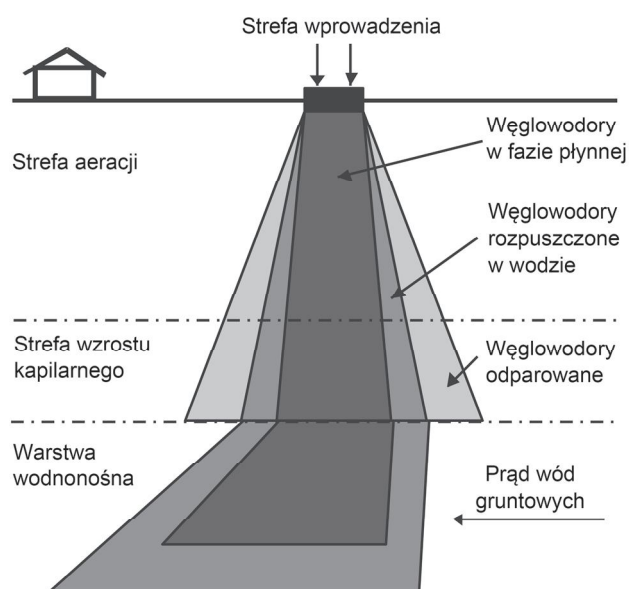
- stacje paliw (ponad 6 tys.), gdzie często dochodzi do pęknięcia zbiorników, nieszczelności rurociągów doprowadzających paliwo do dystrybutorów i niewłaściwa obsługa przy poborze paliwa
- rafinerie, przede wszystkim źle oczyszczone ścieki rafineryjno-paliwowe dostając się do wody mogą spowodować zanieczyszczenie związkami toksycznymi na większą skalę
- instalacje wydobywcze ropy naftowej;
- urządzenia poszukiwawcze (wiertnie lądowe, śródlądowe, morskie);
- bazy magazynowe, niesprawny system gromadzenia i zagospodarowania zużytych olejów i smarów, zaolejonych ziem, trocin itp.;
- bazy przeładunkowe, nieszczelne rurociągi przesyłowe, czasem celowo uszkodzone w wyniku działalności przestępczej;
- tereny przemysłowe i poprzemysłowe, erozja zbiorników, rozszczelnienia złącz, przypadkowe rozlania, przenikanie WWA ze ścieków przemysłowych, miejsc składowania odpadów odlewniczych i materiałów, które są stosowane w budownictwie;
- lotniska, bazy wojskowe;
- torowiska, bocznice kolejowe;
- pojazdy samochodowe, mikrowycieki paliw występujące podczas kolizji pojazdów, wymywanie WWA z powierzchni dróg, gdzie obecne są duże ilości związków pochodzące ze spalin samochodowych, ze ścierania opon gumowych przy hamowaniu oraz samego asfaltu, który bogaty jest w różnorakie węglowodory;
- urządzenia indywidualnego użytku domowego.

Wśród innych źródeł zanieczyszczeń można wymienić również ścieki bytowo-gospodarcze, gdzie w Polsce około 20% ścieków wykorzystuje się do nawożenia pól uprawnych [47].

Biorąc pod uwagę sposoby, jakimi WWA przedostaje się do gleby, szacuje się, że największe ilości tych związków mogą występować w ziemi pochodzącej ze źródeł bezpośredniego skażenia [22]. Potwierdzeniem tych przypuszczeń są dane porównujące zawartość WWA

w glebach pobranych z dala od potencjalnych źródeł zanieczyszczeń z glebą pochodzącą z dużych ośrodków przemysłowych. W glebach, które oddalone są znacznie od źródeł emisji, poziom najczęściej występujących szesnastu WWA wynosi zwykle od 1,5 do 5 mg/kg suchej masy, zaś stężenie benzo[a]pirenu od 0,001 do 0,01 mg/kg suchej masy [36, 64].

Skażenia w gruncie osiągają niekiedy bardzo wysoki poziom, przekraczający dopuszczalne normy. Często mogą one sięgać aż do 30 m głębokości, co stwierdzono na byłych terenach poradzieckich lotnisk wojskowych [61, 64]. Istniejące tam związki organiczne, takie jak paliwa i oleje, a także rozpuszczone w nich toksyczne uszlachetnicze oraz chlorowcopochodne i wielopierścieniowe węglowodory wykazują tendencję do migracji, przez co stwarzają zagrożenie dla wód gruntowych i powierzchniowych (rys. 1).



Rys. 1. Rozprzestrzenianie się związków ropopochodnych

W zależności od budowy geologicznej podłoża gruntowego oraz intensywności przestrzennego ruchu wód gruntowych, zanieczyszczenia te są rozprawdane, rozcieńczane i przekształcane w wyniku procesów chemicznych i biologicznych [16].

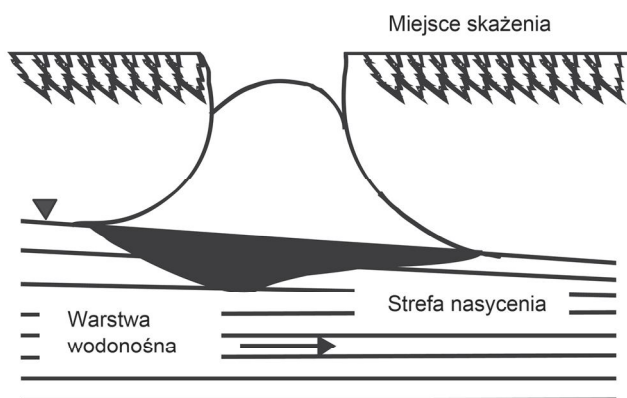
Podczas rozlewu paliwo wnika w grunt i jest rozprzestrzeniane w wyniku działania sił: ciężkości, kapilarnych oraz adsorpcyjnych [64]. Penetracja benzyny w gruncie jest znacznie szybsza niż wody, od 6 do 10 razy. Sposób przemieszczania się wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych w glebie zależy od jej rodzaju, przepuszczalności oraz czynników klimatycznych, m.in. od: opadów deszczu, nasłonecznienia, wiatru, temperatury [22].

Szybkie wsiąkanie w głąb profilu glebowego rozlanych na powierzchnię substancji naftopochodnych zagraża zwłaszcza glebom piaszczystym (Tab. I) [50, 81].

Tabela I
Prędkość rozchodzenia się substancji ropopochodnych
w gruntach [m/dobę] [77–78]

Rodzaj gruntu	Etylina	Olej
Piasek gruby	164,16	220,96
Piasek gruby z domieszką drobnego	11,23	0,96
Piasek gruby zagliniony	0,82	0,60
Piasek średni	2,80	0,004
Piasek pylasty	0,008	0,08
Gлина	0,18	

Migracja tych zanieczyszczeń może zachodzić w pionie i/lub w poziomie. W gruncie dobrze przepuszczalnym penetracja zachodzi w pionie, a następnie, gdy osiągnie już poziom zwierciadła wód podziemnych dalej odbywa się w kierunku poziomym. Jest to bardzo niebezpieczne, gdyż zanieczyszczone wody są niekiedy rezerwuarem wody pitnej (rys. 2).



Rys. 2. Migracja produktów naftowych w środowisku wodno-gruntowym [16]

W gruncie produkty naftowe mogą występować w trzech fazach: gazowej (produkty lotne), ciekłej (produkty nie mieszające się z wodą lub rozpuszczone w wodzie) i „stałej” (produkty gazowe bądź ciekłe zaadsorbowane przez materiał skalny) [55].

Zanieczyszczenia naftowe mogą mieć też różną trwałość, która zależy nie tylko od właściwości gleby i warunków klimatycznych, ale również od stężenia zanieczyszczeń i ich składu. Badania Głazowskiej i Pikowskiego [28] wykazały, że przywrócenie pierwotnej żyzności gleb trwa niekiedy dość długo, czasami od 1 roku a nawet do 12 lat. W zależności od parametrów gleby i substancji ropopochodnych można opracować odpowiedni model ułatwiający pracę nad walką z substancjami ropopochodnymi występującymi w gruncie.

Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Białymstoku opracował modele oceny zanieczyszczeń środowiska substancjami ropopochodnymi [78]:

- modele przepływu i transportu zanieczyszczeń z gruntu do wód podziemnych,

- modele emisji zanieczyszczeń gazowych z gruntu do powietrza,
- procedur analizy i oceny ryzyka zdrowotnego,
- modele rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń, bilansowania ilości zanieczyszczeń w gruntach wraz z analizą niepewności i błędów,
- analiz geostatystycznych dla potrzeb kartowania i modelowania zanieczyszczeń w środowisku,
- systemu identyfikacji i inwentaryzacji terenów zdegradowanych.

3. Metody biodegradacji związków ropopochodnych

Bioremediacja to proces usuwania zanieczyszczeń (min. substancji ropopochodnych) z gleby i wód podziemnych za pomocą żywych prowadzące zazwyczaj do transformacji różnego rodzaju zanieczyszczeń w formy mniej szkodliwe. W bioremediacji wykorzystywane są naturalne zdolności mikroorganizmów do rozkładu węglowodorów ropy naftowej. Proces ten może być prowadzony z udziałem mikroorganizmów w warunkach [23, 59, 75]:

- **tlenowych** – biodegradacja odbywa się w obecności tlenu z udziałem m. in.: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium*;
- **beztlenowych** – biodegradacja bez dostępu tlenu, obecnie istnieje duże zainteresowanie mikroorganizmami beztlenowymi wykorzystywanymi w procesie bioremediacji PCBs w osadach rzecznych, w dechloracji trichloroetyleny (TCE) czy chloroformu.

Ponadto, bioremediacja może być prowadzona z udziałem:

- **grzybów ligninolitycznych** – *Phanaerochaete chrysosporium*, mikroorganizmy te są zdolne do degradacji bardzo trwałych związków chemicznych;
- **metylotrofów** – tlenowych bakterii, degradujących metan, wykorzystując związek ten jako źródło węgla i energii. Enzymem inicjującym proces degradacji metanu jest monooksygenaza metanowa, która również ma szerokie zastosowanie w degradacji wielu związków nieorganicznych.

W Tabeli II i III zestawiono przykłady wykorzystanych technologii bioremediacji w procesie degradacji wielu substancji chemicznych, będących składnikami m.in. związków ropopochodnych.

Zdolność drobnoustrojów do degradacji kształtowała się na przestrzeni kilku lat, i jest wynikiem adaptacji mikroorganizmów do warunków panujących w zanieczyszczonym środowisku na skutek szerokiego wykorzystania produktów petrochemicznych w wielu gałęziach przemysłu [7,34]. W rurociągach gromadzą się liczne gatunki głównie bakterii, dla których węglowodory są głównym źródłem węgla. Mikroflora ta najczęściej rozwija się na granicy faz: wodnej i olejowej. Rozwojowi

Tabela II

Rodzaje biodegradacji wybranych związków chemicznych [39]

Związki chemiczne	Przykłady	Przykłady
Węglowodory aromatyczne	benzen, toluen	tlenowa, beztlenowa
Ketony i estry	aceton	tlenowa, beztlenowa
Węglowodory ropy naftowej	paliwa kopalne	tlenowa
Rozpuszczalniki chloropochodne	trichloroetylen, chloroetylen	tlenowa, beztlenowa
Węglowodory poliaromatyczne	antracen, benzo(a) piren, krezol	tlenowa
PCBs	1,2,3-trichloro-4-(2,3,4-trichlorofenilo)benzen	tlenowa

Tabela III

Bioremediacja gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi [23, 37, 75]

Frakcja olejowa	Zastosowana technologia	Wykonanie bioremediacji	Piśmien- nictwo
Surowa frakcja węglowodorów ropy naftowej	Bakteryjna degradacja w warunkach laboratoryjnych – testy z udziałem szczepów: <i>Bacillus subtilis</i> DM-04, <i>Pseudomonas aureginosa</i> oraz szczep NM	Bioaugmentacja węglowodorów ropy naftowej z udziałem szczepów: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M i NM oraz <i>B. subtilis</i> . Widoczna znaczna redukcja węglowodorów	[23]
Gleba zanieczyszczona paliwem	3 etapy eliminacji zanieczyszczeń: – wykorzystanie surfaktantów, – traktowanie odczynnikami Fentona, – przeprowadzenie właściwej biodegradacji	Zastosowanie Simple Green™ (SG), utlenianie (6% H ₂ O ₂) – 15% chemiczna degradacja węglowodorów oraz 80% biodegradacja	[75]
Gleba zanieczyszczona olejem napędowym	Degradacja w warunkach laboratoryjnych z udziałem szczepu <i>Candida catenulata</i> CM1	Po 13 dniach kompostowania (prowadzonego w bioreaktorze) – 84% paliwa ulega degradacji	[37]

tych drobnoustrojów towarzyszy również dostęp tlenu. W środowisku glebowym natomiast mamy do czynienia z mikroflorą charakterystyczną dla gruntów. Mikroorganizmy wykształciły odpowiednie systemy enzymatyczne by likwidować substancje toksyczne zagrażające ekosystemowi glebowemu. W procesach bioremediacji terenów zanieczyszczonych duże znaczenie mają enzymy oraz nanotechnologie [39].

W technologiach bioremediacji główną rolę odgrywają peroksydazy, które mogą transformować takie związki jak: policykliczne hydrowęglowodory (PAH) s, PCBs, związki fenolowe, (2,4,6-trinitrotoluen) TNT, barwniki, a także wiele innych trwałych związków aromatycznych [33].

Charakterystyczne jest to, że z gleby można izolować mikroorganizmy wyspecjalizowane w degradacji określonych ksenobiotyków. W procesach bioremediacji wykorzystuje się zarówno bakterie, i grzyby [38, 51, 57]. Mikroorganizmy te występują w wodach słodkich, morskich, o różnych temperaturach i na różnej głębokości. Ekosystemy wodne obfite są w bakterie i drożdże, natomiast w gruntach obserwuje się zwiększony udział grzybów i promieniowców [77]. Mikroorganizmy, które wykorzystują jako jedyne źródło węgla węglowodory jest niewielki procent. Do grupy mikroorganizmów wykazujących zdolność do degradacji składników ropy naftowej lub wybranych jej frakcji należą m.in. bakterie: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcalige-*

nes, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, drożdże: *Candida*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, grzyby: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Varicospora*. Z doniesień literaturowych wynika, że żaden z wymienionych drobnoustrojów nie jest zdolny do biodegradacji węglowodorów wszystkich grup, mogą jedynie przyswajać wybrane rodzaje związków, o określonych strukturach chemicznych [3, 52, 68].

Warunkiem skutecznej bioremediacji jest wybór odpowiednich mikroorganizmów. Wiedza na temat aktywności degradacyjnej bakterii wpływających na kontrolę procesu jest istotna ze względu na określenie właściwej strategii remediacji oraz kontrolę postępów i skuteczności bioremediacji [2, 10, 15, 20, 51, 52].

4. Mikroorganizmy genetycznie modyfikowane biorące udział w degradacji związków ropopochodnych

Drobnoustroje odgrywają dużą rolę w utylizacji związków ropopochodnych, jednakże szybkość tych procesów jest niewystarczająca w stosunku do potrzeb. W literaturze znajduje się wiele informacji na temat

Tabela IV

Degradacja związków ropopochodnych przez mikroorganizmy genetycznie modyfikowane [3, 67, 69, 77, 84]

Związki	Enzymy	Geny	Szczep	Piśmiennictwo
Toluen, TCE	4-monooksygenaza toluenowa	TomA	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	[67]
Toluen, TCE	dioksygenaza toluenowa	TodC1C2BA	<i>Pseudomonas putida</i> F1	[84]
Toluen, TCE	2-monooksygenaza toluenowa	tmoABCDE	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	[77]
BTEX (benzen, toluen, etylenobenzen, ksylen)	2,3-dioksygenaza katecholowa	xylE	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	[3]
Naftalen	dioksygenaza naftalenowa	nahAcd	<i>Pseudomonas putida</i> G7	[73]

degradacji toksycznych związków, bardzo trudno i wolno degradowanych, przez mikroorganizmy [1, 4, 14, 18, 30, 41, 45–46, 60–62, 76]. Wyizolowane ze środowisk naturalnych lub pochodzące z kolekcji mikroorganizmy charakteryzują się wysoką aktywnością metaboliczną i innymi cechami technologicznymi często niewystarczającymi do zastosowania w procesie produkcyjnym. O efektywności procesu przemysłowego w równej mierze z technologią decyduje również doskonalenie cech drobnoustrojów przemysłowych [9, 44]. Jednym ze sposobów doskonalenia takich mikroorganizmów jest mutageniza i selekcja mutantów o cechach korzystnych dla danego procesu biotechnologicznego [19].

Niezmierzalnie istotna w procesie bioremediacji jest zdolność szczepu do degradacji wielu trudno degradowanych związków, ale nie zawsze mikroorganizmy wyizolowane ze środowisk naturalnych posiadają właściwy potencjał i właściwości genetyczne umożliwiające skuteczną biodegradację trwałych zanieczyszczeń. Dlatego wiele badań laboratoryjnych prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych na świecie skoncentrowanych jest na prowadzeniu modyfikacji genetycznej tych szczepów pod kątem skutecznej biodegradacji ksenobiotyków. Obecnie największe znaczenie odgrywa tzw. „diagnostyka molekularna” [40, 64].

Diagnostyka molekularna szczepów wykorzystywanych w procesie bioremediacji dotyczy analizy wyizolowanego z komórek mikroorganizmów DNA oraz poznania aparatu genetycznego umożliwiającego ocenę zdolności szczepów do degradacji ksenobiotyków.

W literaturze na temat mechanizmów dotyczących degradacji związków ropopochodnych wiadomo, że u bakterii: *Burkholderia cepacia* G4, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas mendocina* KR1 istnieją geny xylE kodujące białka odpowiedzialne za degradację grupy związków naftalenu czy niektórych chloropochodnych (TCE). Geny te zostały sklonowane i zlokalizowane w chromosomalnym DNA tych bakterii i nazwane TomA dla *Burkholderia cepacia* G4 [67] TodC1C2BA dla *Pseudomonas putida* F1 [84] tmoABCDE dla *Pseudomonas mendocina* KR1 [77]. Bakterie *Pseudomonas putida* mt-2 posiadają geny xylE kodujące białka odpowiedzialne za degradację grupy związków

BTEX [44]. Natomiast naftalen jest degradowany przez dioksygenazę naftalenową szczepu *Pseudomonas putida* G7, gen kodujący białka odpowiedzialne za tę transformację to nahAcd [57]. W tabeli 3 zestawiono związki występujące w ropie naftowej, które są degradowane przez mikroorganizmy genetycznie modyfikowane.

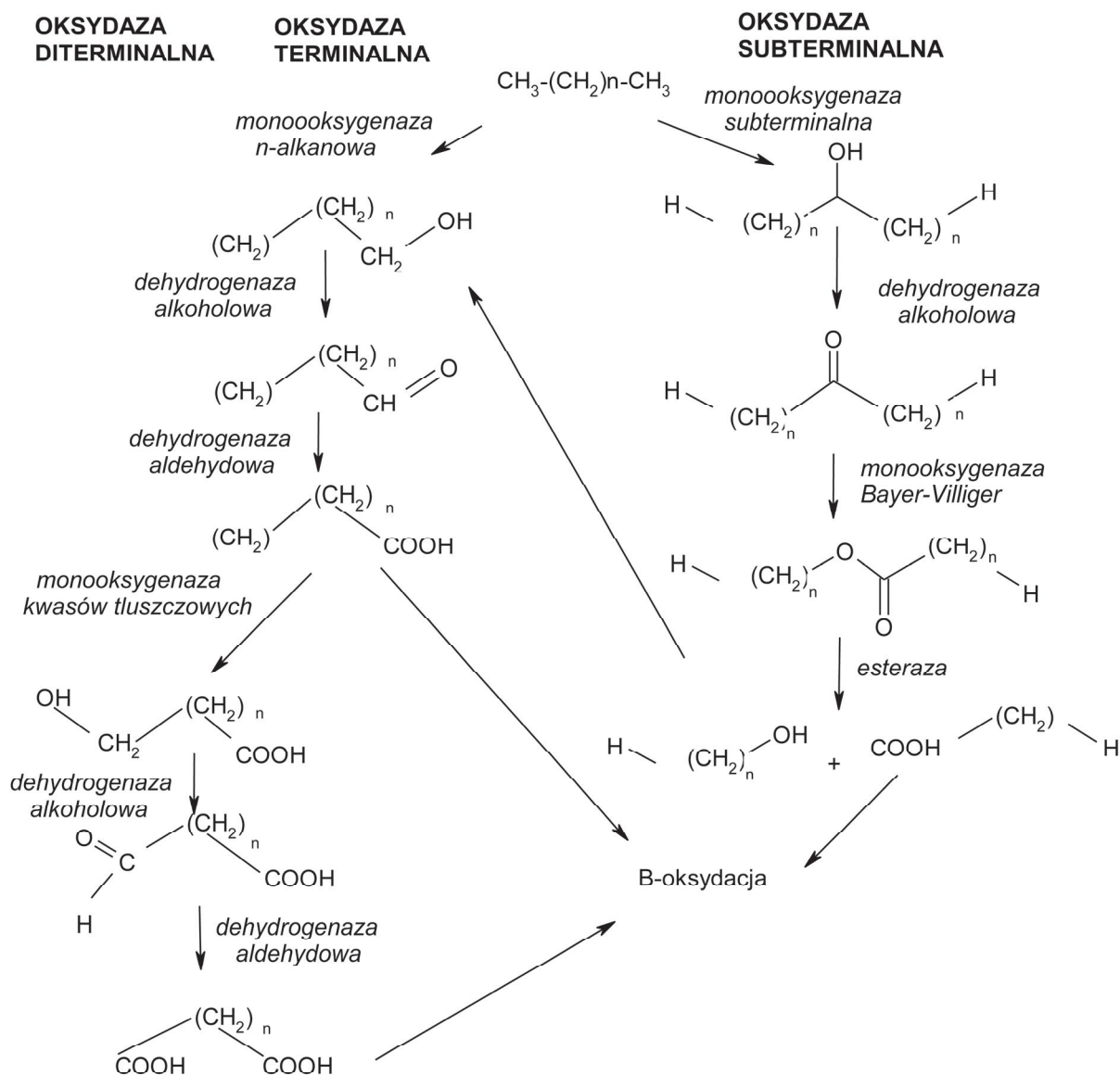
5. Mechanizmy biodegradacji węglowodorów ropopochodnych

Ropa naftowa to wysoce złożona mieszanina wielu tysięcy węglowodorów, które można sklasyfikować w trzech grupach: węglowodory alifatyczne, aromatyczne i związki polarne. Wśród węglowodorów alifatycznych wyróżnia się węglowodory prostolącuchowe, rozgałęzione oraz związki cykliczne. Węglowodory aromatyczne występują w formie związków jednopierścieniowych (np. benzen, toluen) oraz związków poliaromatycznych, np. naftalen, fenantren czy piren [53].

Biodegradacja alkanów prostolącuchowych może przebiegać w wyniku oksydacji:

- terminalnej,
- subterminalnej,
- diterminalnej.

Podczas oksydacji terminalnej dochodzi do insercji aktywnego tlenu do wolnego końca łańcucha alkilowego z wytworzeniem alkoholu pierwszorzędowego. Natomiast podczas oksydacji subterminalnej utlenieniu ulega wewnętrzna grupa metylenowa, w wyniku czego powstaje alkohol drugorzędowy [53, 30, 62, 65]. W obu szlakach działa dehydrogenaza alkoholowa, która utlenia alkohole pierwszorzędowe do aldehydów, zaś związki drugorzędowe transformowane są do ketonów. Kolejną reakcję, podczas oksydacji terminalnej, katalizuje dehydrogenaza aldehydowa, która utlenia grupę aldehydową do karboksylowej. W oksydacji subterminalnej działa monooksygenaza Baeyer-Villiger, która przekształca ketony do estrów, włączając atom tlenu do łańcucha węglowego. Estry ulegają hydrolizie pod wpływem esteraz [8,35]. Produktami tego rozszczepienia są kwasy karboksylowe (włączane w centralny metabolizm) oraz alkohol, który na drodze oksydacji terminal-



Rys. 3. Szlaki tlenowej biodegradacji alkanów prostołańcuchowych [30]

nej zostaje przekształcony do kwasu karboksylowego. Trzecim szlakiem degradacji jest oksydacja diterminalna, inaczej β -oksydacja, czyli oksydacja obu końców łańcucha węglowego. W procesie tym, po utlenieniu jednej z końcowych grup alkanu włącza się monooxygenaza kwasów tłuszczowych, utleniająca końcowy węgiel po przeciwnej stronie. Następnie, w wyniku działania dehydrogenaz alkoholowej i aldehydowej, powstaje kwas dikarboksylowy. Kwas tłuszczowy powstałe w każdym z opisanych szlaków podlegają aktywacji z udziałem syntetazy acylo-CoA i w tej postaci wchodzi do szlaku β -oksydacji, który generuje cząsteczki acetylo-CoA (rys. 3) [54, 77].

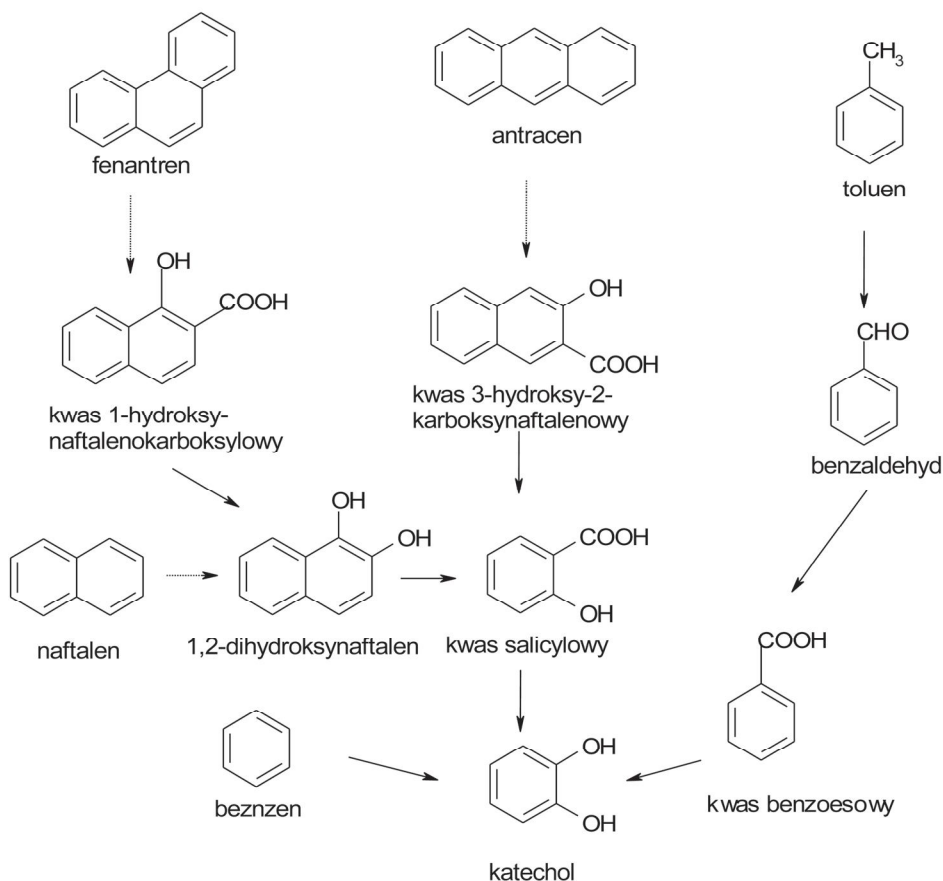
Większość wyizolowanych mikroorganizmów degradujących węglowodory cykliczne posiada enzymy utleniające związki zawierające od 5 do 7 atomów węgla w pierścieniu. Na rysunku 4 przedstawiono szlak biodegradacji cykloheksanu występujący u *Acinetobacter*, *Bre-*

vibacterium i *Arthrobacter* [1,72]. Biodegradacja cykloalkanów u tych mikroorganizmów przebiega poprzez: cykloheksanol, cykloheksanon, kaprolakton, kwas 6-hydroksyheksanowy, kwas 6-okso-heksanowy oraz kwasu heksanodiowego [3].

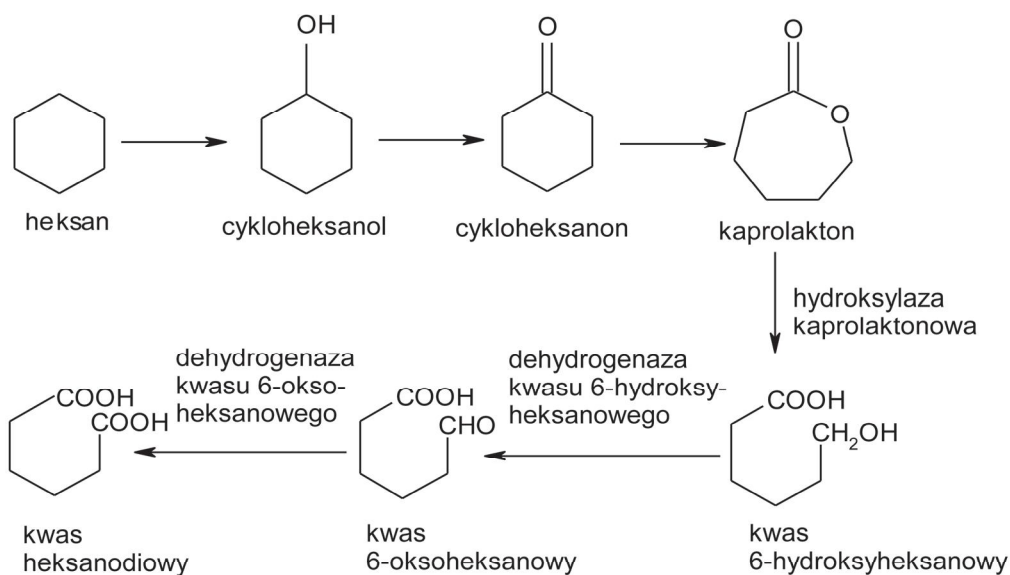
Większość węglowodorów ropopochodnych należy do związków aromatycznych ulegających biodegradacji do katecholu i kwasu protokatechowego. Oba te związki posiadają dwa typy szlaków biodegradacji:

- 1) szlak intradiolowy – rozszczepienie pierścienia między dwoma sąsiadującymi atomami węgla, co prowadzi do powstania kwasów dikarboksylowych;
- 2) szlak ekstradiolowy – rozszczepienie pierścienia między hydroksylowym i niehydroksylowym atomem węgla.

Związki takie jak: benzen, toluen, fenantren i antracen w pierwszej fazie procesu biodegradacji są przekształcane do katecholu (rys. 5) [65].



Rys. 4. Szlak biodegradacji cykloheksanu

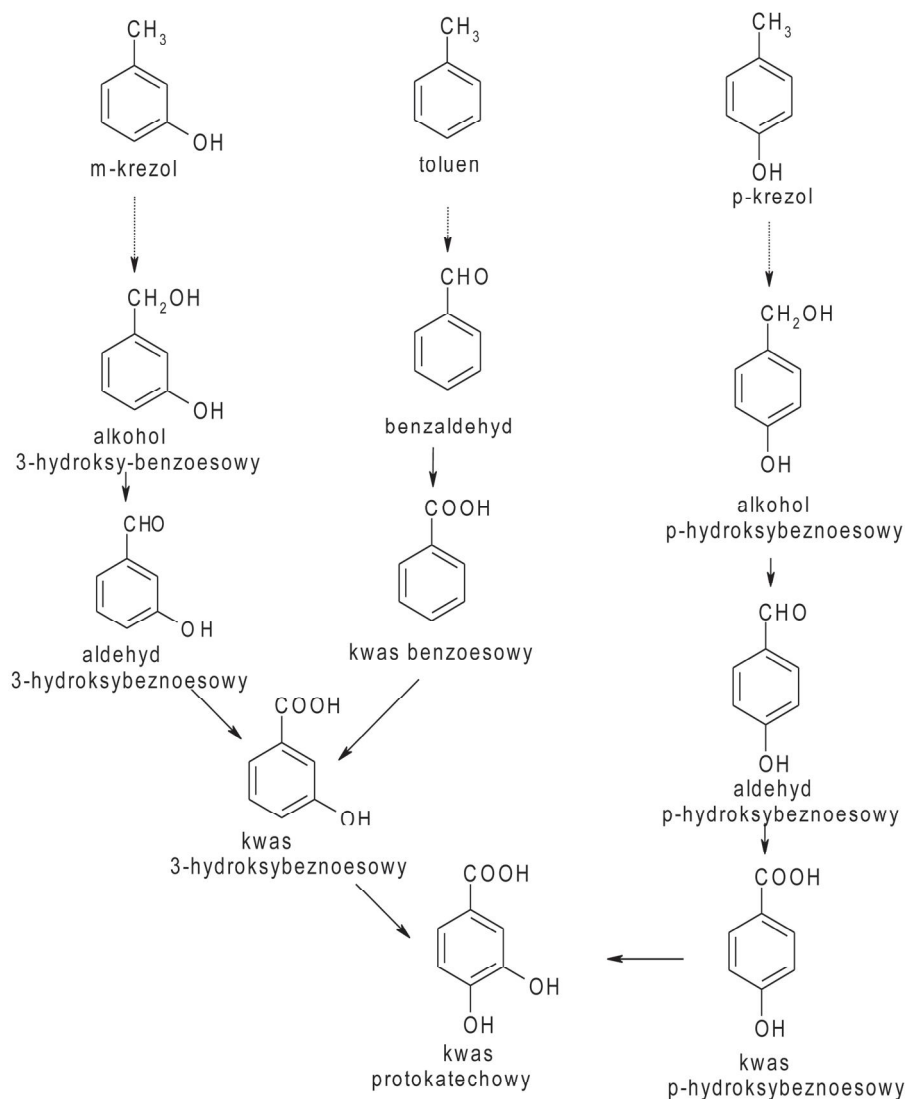


Rys. 5. Degradacja związków aromatycznych do katecholu

Do kwasu protokatechowego są przekształcane pierścienie aromatyczne podwójnie podstawione w pozycjach 1,2-, 1,3- i 1,4- np.: w *m*-krezolu, *p*-krezolu, jak również pierścienie podstawione wielokrotnie. We wszystkich przypadkach do pierścienia włączają się grupy hydroksylowe (rys. 6) [69].

Podsumowanie

W procesie bioremediacji terenów skażonych związkami ropopochodnymi duże znaczenie odgrywiają mikroorganizmy jednak z naukowego punktu widzenia ważnym jest poznanie szlaków biodegradacji tych



Rys. 6. Degradacja związków aromatycznych do kwasu protokatechowego

związków. Nie mniej istotna pozostaje również ocena czy powstałe w wyniku rozkładu metabolity pośrednie nie stanowią większego niż substancje wyjściowe zagrożenia dla środowiska przyrodniczego. Z prowadzonych badań dotyczących biodegradacji związków toksycznych, wynika, że związki powstałe w procesie degradacji są bardziej toksyczne niż substraty, z których powstały. Ze względów bezpieczeństwa organizmów żywych, procesy te powinny być bardziej kontrolowane i badane. Postępujący stan zanieczyszczenia środowiska, spowodowany niezwykle intensywnym rozwojem technologii, sprawia, że większość prowadzonych obecnie prac badawczych skupiona jest na znalezieniu skutecznych i bezpiecznych metod eliminacji toksycznych dla środowiska związków. Jednym z głównych celów badań wielu zespołów naukowych na świecie jest poznanie mechanizmów degradacji związków ropopochodnych. Zachorowalność na różne nowotwory ciągle rośnie, jedną z przyczyn takiego stanu jest wciąż postępujące zanieczyszczenie środowiska. Dlatego w prezentowanej pracy przeglądowej celowym stało

się poświęcenie uwagi problemom rozprzestrzeniania się substancji ropopochodnych, omówieniem mechanizmów ich biodegradacji oraz charakterystyką mikroorganizmów biorących w nich udział.

Piśmiennictwo

1. Abed R.M.M., Safi N.M.D., Köster J., de Beer D., El-Nahhal Y., Rullkötter J., Garcia-Pichel F.: Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environment. Microbiology*, **68**, 1674–1683 (2002)
2. Aichberger H., Hasinger M., Braun R., Loibner A.P.: Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil. *Biodegradation*, **16**, 115–125 (2005)
3. Assinder S.J., Williams P.A.: The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* **31**, 1–69 (1990)
4. Baek K.H., Yoon B.D., Oh H.M., Kim H.S., Lee I.S.: Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Nocardia* sp. H17-1, *Geomicrobiology J.* **23**, 253–259 (2006)

5. Bajaj M., Gallert C., Winter J.: Treatment of phenolic wastewater in an anaerobic fixed bed reactor (AFBR) – Recovery after shock loading. *J. Hazard. Mater.* **162**, 1330–1339 (2009)
6. Barański A., Gworek B.: Ocena ryzyka zdrowotnego i środowiskowego pochodzącego od gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi. Monografia. Instytut Ochrony Środowiska w Warszawie, 2004
7. Baxter J., Cummings S.P.: The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek*, **90**, 1–17 (2006)
8. Beam M.P., Bosserman M.A., Noinaj N., Wehenkel M., Rohr J.: Crystal structure of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway. *Biochemistry*, **48**, 4476–4487 (2009)
9. Bednarski W., Fiedurek J.: Podstawy biotechnologii przemysłowej, WNT, Warszawa, 37–76, 2007
10. Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.: Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technology*, **96**, 1049–1055 (2005)
11. Biedrowski Z., Troć M.: Zanieczyszczenie gruntów i wód gruntowych substancjami ropopochodnymi na wybranych stacjach paliw CPN w Wielkopolsce. W: Współczesne Problemy Hydrogeologii. Górski J., Liszkowska E. [red.]. Tom VIII, 261–264, Wrocław 1997
12. Bilek M.: Zanieczyszczenie środowiska naturalnego przez WWA. *Biuletyn Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Krakowie*, **6** (2004).
13. Cardinali A., Otto S., Vischetti C., Brown C., Zanin G.: Effect of pesticide inoculation, duration of composting, and degradation time on the content of compost fatty acids, quantified using two methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** (19), 6600–6606 (2010)
14. Carmona M., Zamorro M.T., Blazquea B., Durante-Rodriguez G., Juarez J.F., Valderrama J.A., Barragan M.J.L., Garcia J.L., Diaz E.: Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 71–133 (2009)
15. Cerniglia C.E.: Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **19**, 324–333 (1997)
16. Cęckiewicz S.: Zanieczyszczenie środowiska produktami i odpadami naftowymi. *Biuletyn ITN*, **3/96**, 27 (1996)
17. Chang B.V., Lu Z.J., Yuan S.Y.: Anaerobic degradation of nonylphenol in subtropical mangrove sediments. *J. Hazard. Mater.* **165**, 162–167 (2009)
18. Chen K.F., Kao C.H.M., Chen C.H.W., Surampalli R.Y., Lee M.S.: Control of petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater by intrinsic and enhanced bioremediation. *J. Environ. Sci.* **22**, 846–871 (2010)
19. Chmiel A. Biotechnologia, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 231–259, 1998
20. Çinar Ö.: Biodegradation of central intermediate compounds produced from biodegradation of aromatic compounds. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **26**, 341–345 (2004)
21. Czechowski F., Kołwzan B.: Biodegradacja ropy naftowej z otworu Radoszyn – 1 przez mikroorganizmy glebowe. *Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska*. 69–74 (2008)
22. Czop M., Wandrasch J.W.: Procesy ruchu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach. Bioakumulacja. Monografia: *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*. Wyd. IOŚ, Warszawa, **31**, 144–148 (2007)
23. Das K., Mukherjee A. K.: Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* **98**, 1339–1345 (2007)
24. Fabiszewska T., Fabiszewska-Bajer J.: Biotetoksykacja gruntów skażonych substancjami ropopochodnymi. *Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii*, **27**, 219 (1993)
25. Fabiszewska T., Fabiszewska-Bajer J.: Mikrobiologiczne oczyszczanie gruntu metodą „in situ”. *Forum Chemiczne*, **97**, 71 (1997)
26. Falatko D.M., Novak J.T.: Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environment Research*, **64**, 163–169 (1992)
27. Farbiszevska T., Sudoł T., Fabiszewska-Bajer J., Sowa J., Marcjasz I.: Porównanie metody biosanacji gleby z oleju napędowego z innymi metodami. *Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii*, **32**, 157–163 (1998)
28. Głazowska M.A., Pikowskij J.I.: Kompleksnyj eksperyment po izuczeniju faktorow samooczyszczeniya i rekultiwacii zagraznionnykh neftiju poczw w rozlicznykh prirodnykh zonach, Trudy III Wsesojuznogo Sowiewieszczaniya Migracija zagrazniajuszczich wieszczestw w poczwach i sopriedielnykh sriedach, Leningrad, *Gidrometeoizdat*, 185–191 (1985)
29. Goi A., Trapido M., Kukik N., Palmroth M.R.T., Tuhkanen T.: Ozonization and Fenton treatment for remediation of diesel fuel contaminated soil. *Ozone – Sci. Eng.* **28**, 37–46 (2006)
30. Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M.: Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych. *Nafta-Gaz*, **56**, 1019–1027 (2010)
31. Haapea P., Tuhkanen T.: Integrated treatment of PAH contaminated soil by soil washing, ozonation and biological treatment. *J. Hazard. Mater.* **136**, 244–250 (2006)
32. Harrisom, Roy M. El Medio Ambiente: Introducción a la química medioambiental y a la contaminación. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA S.A. p. 214 (2003)
33. Husain S., Siddique M., Sleem M.: Bioremediation and phytoremediation of pesticides: recent advances. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **39**, 843–907 (2009)
34. Iranzo M., Sainz-Pardo I., Boluda R., Sañchez J., Mormeneo S.: The use of microorganisms in environmental remediation. *Ann. Microbiol.* **51**, 135–143 (2001)
35. Iwaki H., Wang S., Grosse S., Bergeron H., Nagahashi A., Lertvorachon J., Yang J., Konishi Y., Hasegawa Y., Lau P.C.K.: *Pseudomonas cyclopentadecanone* monooxygenase displaying an uncommon spectrum of Baeyer-Villiger oxidations of cyclic ketones. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2707–2720 (2006)
36. Jacobs M.A., Waldron D.F. M.: Approaches to sheltered-water oil spills. *Sea Techn.* **36** (10), 34–38 (1996)
37. Joo H.S., Ndegwa P.M., Shoda M., Phae C.G.: Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulate* and food waste. *Environ. Pollut.* **156**, 245–254 (2008)
38. Juhasz A.L., Naidu R.: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegr.* **45**, 57–88 (2000).
39. Juwarkar A., Singh S., Mudhoo A.: A comprehensive overview of elements in bioremediation, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **9**, 215–288 (2010)
40. Katsoyiannis A., Terzi E., Cai Q.Y. On the use of PAH molecular diagnostic ratios in sewage sludge for the understanding of the PAH sources. Is this use appropriate? *Chemosphere*, **69**, 1337–1339 (2007)
41. Kiepuski J.: Efekty zastosowania kultur bakteryjnych do rozkładu ropopochodnych w istniejących układach środowiskowych. *Inżynieria Ekologiczna Nr 2. Technologie odolewania gruntów, odpadów, ścieków*. Materiały konferencji naukowo-technicznej. Wysowa Zdrój 20–22 wrzesień 2000, 97–101
42. Klimiuk E., Łebkowska M.: Biotechnologia w ochronie środowiska. Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003
43. Koma D., Hasumi F., Yamamoto E., Ohta T., Chung S.-Y., Kubo M.: Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste

- oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 94–96 (2001)
44. Kononowicz K.A., Bielecki S., Chmiel A., Podstawy biotechnologii. Wyd. Naukowe PWN SA, Warszawa, s. 197–209, 2011
 45. Kopytko M., Ibarra Mojica D.M.: Możliwość biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach zanieczyszczonych przez przemysł naftowy. *Inżynieria Mineralna*, **7–12**, 31–48 (2009)
 46. Korzeniowska-Rejmer E.: Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na charakterystykę geotechniczną gruntów stanowiących podłoże budowlane. *Inżynieria Morska i Geotechnika*, **2**, (2001)
 47. Kowalik P.: "Ochrona środowiska glebowego", PWN, W-wa, 2001
 48. Krasowiak K., Śmigielski K., Kwapisz E., Marchut O.: Remediacja gleby zanieczyszczonej węglowodorami naftowymi. *Scientific Bulletin of the Technical University of Lodz. Ford Chemistry and Biotechnology*, **72 (1029)**, 89–97 (2008)
 49. Kulik N., Goi A., Trapido M., Tuhkanen T.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *J. Environ. Manage.*, **78**, 382–391 (2006)
 50. Kurek E., Król M.J., Zielewicz-Dukowska J., Perzyński A.: Rozkład produktów naftowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny. *Ekologia w przemyśle rafineryjnym* 2001, Konferencja Naukowo-Techniczna Kielce 10-12.10.2001
 51. Kwapisz E., Patek M., Polak J., Piotrowicz-Wasiak M., Galas E.: *Zesz. Nauk. Politech. Śląsk*, **45**, 285–292 (2000)
 52. Kwapisz E., Polak J., Wojdowska W., Wasiak M., Bielecki S.: Charakterystyka szczepu *Gordonia alkanivorans* S7 degradującego węglowodory oleju napędowego w obecności azotanów. *Ochrona przed korozją*, **9S/A**, 47–49 (2006)
 53. Kwapisz E.: Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej. *Biotechnologia*, **73**, 166–188 (2006)
 54. Lattuat A., Metzger P., Acquaviva M., Bertrand J.C., Largeau C.: n-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17: long chain β -hydroxy acids as indicator of bacterial activity. *Organic Geochemistry*, **33**, 37–45 (2002)
 55. Lyman W.J., Noonan D.C.: Cleanup of petroleum contaminated soils at underground storage tanks, NDC, Park Ride, (NJ), 1990
 56. Malicka M.: Biotechnologiczne metody oczyszczania gleb skażonych związkami ropopochodnymi i innymi toksycznymi związkami organicznymi. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, **2**, 4 (1994)
 57. Małachowska-Jutcz A., Mrozowska J., Kozielska M., Miksch K.: *Biotechnologia*, **1(36)**, 79–91 (1997)
 58. Manuel Carmona M., Zamarro M.T., Blázquez B., Durante-Rodríguez G., Juárez J. F., Valderrama J. A., Barragán M. J. L., García J. L., Díaz E.: Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **73(1)**, 71–133 (2009)
 59. Margesin R., Hammerle M., Tschernko D.: Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microb. Ecol.*, **53**, 259–69 (2007)
 60. Margesin R., Schinner F.: Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3127–3133 (2001)
 61. Nowak J.: Bioremediacja gleb z ropy i jej produktów. *Biotechnologia*, **1 (80)**, 97–108 (2008)
 62. Okoh A.I.: Biodegradation alternative in the clean up of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, **1**, 38–50 (2006)
 63. Pastewski S., Czachorowski P., Mędrzycka K.: Usuwanie hydrofobowych zanieczyszczeń ropopochodnych z gleby metodą odmywania za pomocą roztworów związków powierzchniowo czynnych. Polska Inżynieria Środowiska pięć lat po wstąpieniu do Unii Europejskiej, red. J. Ozonek, M. Pawłowska. Lublin, Monografie Polskiej Akademii Nauk Komitet Inżynierii Środowiska. T. 1, **58**, 183–189 (2009)
 64. Ritalahti K.M., Löffler F.E., Rasch E.E., Koenigsberg S.: Bioaugmentation for chlorinated ethene detoxification: bioaugmentation and molecular diagnostics in the bioremediation of chlorinated ethene-contaminated sites. *Ind Biotechnol.*, **1**, 114–118 (2005)
 65. Rojo F.: Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.*, **11**, 2477–2490, (2009)
 66. Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R.: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Poll.*, **112**, 269–283 (2001)
 67. Shield M.S., Montgomery S.O., Cuskey S.M., Chapman P.J., Pritchard P.H.: Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene – degrading bacterium 04. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1624–1629 (1989)
 68. Simon M.J., Osslund T.D., Saunders R., Esley B., Suggs S., Harcourt A., Suen W.C., Cruden D.L., Gibson D.T., Zylstra G.J.: Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, **127**, 31–37 (1993)
 69. Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Beilen J.B. *Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. J. Bacteriol.*, **184**, 1733–1742, 2002
 70. Steliga T.: Gospodarka wodami i ściekami kopalnianymi podczas eksploatacji ropy naftowej i gazu ziemnego. WUG „Bezpieczeństwo pracy i ochrona środowiska w górnictwie”, **3**, 29–31 (1997)
 71. Steliga T.: Sposoby oczyszczania ścieków i wód złożowych w kopalniach ropy naftowej i gazu ziemnego. *Inżynieria Ekologiczna Nr 2. Technologie odolewania gruntów, odpadów, ścieków. Materiały konferencji naukowo-technicznej. Wysowa Źródł* 20–22 wrzesień 2000, 14–22
 72. Szczepocka A., Prędecka A., Pawlak A., Dmochowski D.: Wpływ infrastruktury drogowej na zanieczyszczenie gleb WWA i substancjami ropopochodnymi na przykładzie giełdy samochodowej w Słomczynie. Bioakumulacja. Monografia: *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*. Wyd. IOŚ, Warszawa, **31**, 149–153 (2007)
 73. Sztompka E.: Biodegradation of engine oil in soil. *Acta Microbiol. Pol.*, **48**, 185–196 (1999)
 74. Throne-Holst M., Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.-K., Zotchev S.B.: Identification of novel genes involved in longchain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874. *Appl. Environment. Microbiol.*, **73**, 3327–3332 (2007)
 75. Tsai T.T., Kao C. M., Yeh T.Y. Liang S.H., Chien H.Y.: Remediation of fuel oil-contaminated soils by a three-stage treatment system. *Environ. Eng. Sci.*, **26**, 1779–1485 (2009)
 76. Vidali M.: Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, **73**, 1163–1172 (2001)
 77. Warhurst A. M., Fewson C. A.: Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 29–73 (1994)
 78. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Białymstoku: „Współczesne metody lokalizacji i oceny zanieczyszczeń środowiska substancjami ropopochodnymi”, Seminarium Ratownicze, Adamowo (2006)
 79. Yen K.M., Karl M.R., Blatt L.M., Simon M.J., Winter R.B., Fausset P.R., Lu H.S., Harcourt A.A., Chen K.K.: Cloning and characterization of *Pseudomonas mendocina* KRI gene cluster encoding toluene -4- monooxygenase. *J. Bacteriol.*, **173**, 5315–5327 (1991)

80. Yu D.Y., Nangoo K., Wookeun B., Banks M.K.: Characteristics in oxidative degradation by ozone for saturated hydrocarbons in soil contaminated with diesel fuel. *Chemosphere*, **66**, 799–807 (2007)
81. Zadroga B., Oleńczuk-Neyman K.: Ochrona i rekultywacja podłoża gruntowego. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk (2001)
82. Zamorska J., Papciak D.: Usuwanie związków ropopochodnych z gruntu – mikroorganizmy i warunki prowadzenia procesu. *Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska* z. 38, **218**, 159–169 (2004)
83. Zhang C., Bennett G.N.: Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 600–618 (2005)
84. Zylstra G.J., Gibson D.T.: Toluene degradation by *Pseudomonas putida* FI, nucleotide sequence of the tod CICBADE genes and their expression in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 149400–149446 (1989)