



Bioremediacja gleb z ropy i jej produktów

Joanna Nowak

absolwentka Wydziału Biologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Bioremediation of soil contaminated with petroleum products

Summary

Bioremediation is a process by which microorganisms degrade or transform the environmental contaminants into less toxic forms. A wide variety of bacterial and fungal genera are known to be capable of degrading, and in many cases, completely mineralizing chemical substances present in petroleum products at present. Three types of bioremediation are predominant in the industry: natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Selecting the most appropriate strategy to treat a specific site can be guided by considering three basic principles: the amenability of the pollutant to biological transformation to less toxic products, the accessibility of contaminant to microorganisms (bioavailability) and the opportunity for optimization of biological activity. Microbial activity is affected by a range of environmental factors, including nutrients, moisture content, pH, temperature, and oxygen concentration. Different aspects of bacterial degradation of petroleum contaminants in soil and how to improve the efficiency and reproducibility are discussed in this review.

Key words:

bioremediation, biostimulation, bioaugmentation, attenuation, bioavailability, polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum derivatives.

1. Wprowadzenie

Od kilkunastu lat praktycznie we wszystkich uprzemysłowionych krajach świata istnieje problem skażenia gruntów ropą naftową i jej produktami. Zanieczyszczenia te dostają się do gleb głównie w wyniku procesów wydobywczych ropy i jej przerobu w rafineriach oraz awarii podczas magazynowania paliw. W Polsce silnie skażone są tereny byłych baz i poligonów poradzieckich,

Adres do korespondencji

Joanna Nowak,
ul. Sikorskiego 1/31,
05-101 Nowy Dwór
Mazowiecki.

biotechnologia

1 (80) 97-108 2008

gdzie wylewano nigdyś zużyte oleje i smary oraz grunty w pobliżu rafinerii, stacji benzynowych, warsztatów naprawczych taboru samochodowo-kolejowego, lotnisk (1,2).

Niektóre węglowodory aromatyczne występujące w ropie (benzen, toluen, ksylen, fenol) są bardzo szkodliwe dla człowieka, ze względu na toksyczne i kancerogenne działanie (3,4). Związki te charakteryzują się bardzo dużą rozpuszczalnością w wodzie, w związku z czym łatwo przedostają się do wód podziemnych, a następnie do ujęć wodnych. Zanieczyszczenie gleb produktami ropopochodnymi wpływa niekorzystnie na produkcję roślinną oraz na jakość wód powierzchniowych i podziemnych (5).

W artykule przedstawiony zostanie aktualny stan wiedzy na temat zastosowania bioremediacji do oczyszczania gruntów z produktów ropopochodnych. W tej stosunkowo nowej technologii wykorzystuje się szlaki i cykle metaboliczne mikroorganizmów do redukcji zanieczyszczeń lub ich transformacji w formy mniej szkodliwe (6-8).

2. Czynniki warunkujące efektywność procesów bioremediacyjnych

Efektywność bioremediacji gruntów z ropy i jej pochodnych zależy od tempa rozkładu tych zanieczyszczeń przez mikroorganizmy glebowe, na które mają wpływ takie czynniki jak: budowa chemiczna, stężenie węglowodorów i ich toksyczność w stosunku do mikroflory, mikrobiologiczny potencjał gleby (stężenie biomasy, różnorodność populacji, aktywność enzymów), fizykochemiczne parametry środowiska (m.in. odczyn, temperatura, zawartość materii organicznej, wilgotność) oraz dostępność węglowodorów dla komórek mikroorganizmów (1,6,9).

Minimalna liczebność mikroorganizmów w glebie skażonej produktami ropopochodnymi konieczna dla efektywnej biorekultywacji wynosi ponad 10^5 komórek/g s.m. gruntu (1). W powierzchniowych warstwach gleby, zawierających odpowiedni stosunek C:N:P występuje od 10^7 do 10^9 komórek/g gruntu, z tego od 0,1 do 1,0% stanowią organizmy zdolne do rozkładu substancji ropopochodnych. W glebach skażonych produktami ropopochodnymi liczba bakterii może zwiększyć się od 100 do 1000 razy (5).

Większość metod biologicznego oczyszczania zaolejonych gruntów oparta jest na intensyfikacji procesu poprzez zastosowanie odpowiednio dobranych i przygotowanych zespołów współdziałających ze sobą mikroorganizmów – biocenozy lub konsorcjów mikroorganizmów, wyspecjalizowanych w rozkładzie węglowodorów nadtowych. Biocenozy te, zwane biopreparatami, zawierają specjalnie wyselekcjonowane ze środowiska naturalnego określone gatunki drobnoustrojów. Wprowadzane są do gleb jako zaszczepy biologiczne (inokulum) zawierające ok. 10^9 komórek/cm³. Takie biopreparaty znacznie wspomagają, a niekiedy warunkują, biodegradację zanieczyszczeń (10).

Właściwości i cechy środowiska w przeważającym stopniu decydują o możliwości przeprowadzenia bioremediacji *in situ* na danym terenie, bowiem wpływają na mikrobiologiczną aktywność (np. temperatura, wilgotność) oraz transport (głównie przez dyfuzję) zanieczyszczeń do wnętrza komórek drobnoustrojów (np. zawartość i jakość materii organicznej). W tabeli 1 przedstawiono główne czynniki środowiska wpływające na bioremediację gleb z produktów ropopochodnych.

Tabela 1

Główne czynniki środowiska wpływające na bioremediację gleb z produktów ropopochodnych

Czynniki środowiska	Znaczenie w bioremediacji	Zabiegi zwiększające efektywność bioremediacji	Literatura
pierwiastki biogenne	azot i fosfor występują w glebie często w ilościach limitujących wzrost mikroorganizmów; substancje ropopochodne powodują niekorzystny dla metabolizmu bakterii wzrost stosunku węgla do azotu	wzbogacanie gleby pożywkami zawierającymi azot i fosfor	(1,25)
wilgotność	woda umożliwia rozpuszczenie węglowodorów (w takiej formie są łatwiej pobierane przez mikroorganizmy) oraz zmniejsza adsorpcję słabo rozpuszczalnych WWA do powierzchni cząstek mineralnych gleby	zraszanie gleby wodą lub wprowadzanie wody do gruntu	(1,50)
temperatura	wpływa na intensywność biodegradacji oraz rozpuszczalność alifatycznych i wielopierścieniowych aromatycznych węglowodorów, a tym samym ich biodostępność	regulacja temperatury w bioreaktorze; kompostowanie	(51,52)
pH	produkty ropopochodne mogą powodować obniżenie odczynu gleby (podczas degradacji węglowodorów powstają kwasy)	wapnowanie gleby w celu zwiększenia pH	(1)
tlen	dostępność tlenu w glebie może być ograniczona w wyniku słabej przepuszczalności gruntu lub obecności łatwo rozkładalnych związków pokarmowych; produkty ropopochodne często powodują powstanie w glebie rozległych stref beztlenowych	wprowadzanie tlenu w głąb gruntu lub oranie gleby	(25,28)
dostępność akceptora elektronów	obecność akceptora elektronów jest niezbędna w procesie rozkładu węglowodorów ropopochodnych w warunkach beztlenowych	wprowadzanie do gleby akceptorów elektronów, np. azotanów, siarczanów	(49)

Dostępność węglowodorów naftowych dla komórek mikroorganizmów (biodostępność) zależy od różnych czynników fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych, które wpływają zarówno na transport tych związków, jak i migrację mikroorganizmów w glebie. Słabo rozpuszczalne węglowodory alifatyczne i aromatyczne z czterema i większą liczbą pierścieni łatwo ulegają adsorpcji na ziarnach gruntu (11). Istotną rolę w kierowaniu bakterii w stronę węglowodorów naftowych (i innych zanieczyszczeń), które uległy sorpcji na cząstkach gleby odgrywa chemotaksja (12-14). Do cząstek gleby, głównie materii organicznej i frakcji gliny (posiadają dobrze rozwiniętą i ujemnie naładowaną powierzchnię), mogą również zostać związane mikroorganizmy o hydrofobowych osłonach komórkowych (15,16).

Najlepszą metodą poprawienia transportu węglowodorów naftowych do komórek mikroorganizmów i ich biodostępności jest użycie środków powierzchniowo czynnych (SPC), które obniżają napięcie powierzchniowe i interfazowe cieczy oraz emulgują substancje lipofilowe powodując zwiększenie powierzchni wymiany i rozpuszczalności (17-19).

Liczne mikroorganizmy degradujące węglowodory naftowe produkują środki powierzchniowo czynne, zaś w literaturze przedmiotu można znaleźć wiele prac dotyczących efektywności biologicznych SPC w remediacji gleb zanieczyszczonych ropą naftową (17,20). W sprzedaży dostępne są również różnego rodzaju syntetyczne środki powierzchniowo czynne, jednak wiele z nich ma ograniczone zastosowanie w bioremediacji, ponieważ są zbyt łatwo degradowane przez mikroorganizmy lub działają toksycznie na ich komórki. Korzystniejsze jest wprowadzanie do zanieczyszczonych gruntów biologicznych SPC ze względu na ich biodegradowalność w środowisku i niską toksyczność. Jednak wysokie koszty ich produkcji sprawiają, że powszechniej wykorzystuje się syntetyczne SPC. Prowadzone są badania mające na celu skonstruowanie rekombinowanych mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów naftowych i produkujących środki powierzchniowo czynne (19,21).

Prawidłowy przebieg procesu biodegradacji może prowadzić do prawie 100% redukcji zanieczyszczeń w ciągu zaledwie kilku tygodni. Obecnie usunięcie z gruntów lekkich takich zanieczyszczeń jak paliwo Diesla, benzyna, nafta lotnicza nie stanowi żadnej kwestii. Problem pojawia się w przypadku bioremediacji gleb (w szczególności ciężkich) z czystej ropy lub frakcji ciężkich (22).

Szybkość rozkładu różnorodnych produktów ropopochodnych w powierzchniowych warstwach gruntów zachodzi z prędkością od 0,02 do ponad 0,4 g/kg gruntu/dobę, średnio od 0,09 do 0,14 g/kg gruntu/dobę. W głębszych warstwach gruntu szybkość degradacji maleje z powodu niższego stężenia tlenu oraz mniejszej liczby drobnoustrojów (5).

3. Planowanie i kontrola procesów bioremediacji

Przed zastosowaniem technik bioremediacji na określonym stanowisku powinno się ocenić podatność zanieczyszczeń na degradację (na podstawie analizy fizykochemicznej), możliwość osiągnięcia całkowitej mineralizacji, liczebność mikroorganizmów zdolnych do rozkładu zanieczyszczeń oraz określić stężenie, rozpuszczalność w wodzie i reaktywność związków wchodzących w skład skażenia z innymi składnikami środowiska.

Kontrola przebiegu procesu bioremediacji gruntów z produktów ropopochodnych polega na przeprowadzaniu analiz fizyczno-chemicznych i mikrobiologicznych. Określa się (metodami chromatografii gazowej i spektrofotometrii w podczerwieni) zmiany całkowitej ilości węglowodorów naftowych, a proces prowadzi się do uzyskania ich dopuszczalnego stężenia. Monitorowanie obejmuje również pomiary

zawartości wilgoci i składników odżywczych, pH oraz oznaczanie ilościowe i jakościowe mikroorganizmów (1).

Większość (90-99%) gatunków mikroorganizmów glebowych biorących udział w biodegradacji węglowodorów *in situ* nie tworzy koloni na podłożach hodowlanych. Stąd też poza standardowymi metodami oceny ilościowej i jakościowej stosuje się pomiary biomarkerów lipidowych, szczególnie fosfolipidów (PLFA), które informują o zmianach w biomacie bakterii gramujemnych oraz techniki molekularne. Za pomocą PCR przeprowadza się amplifikację genów kodujących enzymy kataboliczne lub 16S rDNA, które po elektroforezie w gradiencie żelu denaturującego (DGGE) analizuje się (TRF) w celu identyfikacji gatunków bakterii (14,23).

Do monitorowania bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami naftowymi można wykorzystać takie bioindykatory jak enzymy (lipazy i dehydrogenazy), liczebność lub bioluminescencję mikroorganizmów, kiełkowanie nasion oraz przeżywalność dżdżownic. Trzeba jednak zaznaczyć, że są to metody niebezpośrednie, służące raczej do oceny jakościowej, a nie ilościowej (24).

4. Strategie stosowane w procesach bioremediacji

Bioremediację gruntów można przeprowadzać sposobem *in situ* – w miejscu występowania skażenia lub *ex situ* – po wybraniu zanieczyszczonej gleby z danego terenu i umieszczeniu w specjalnie przygotowanym miejscu (25). Technologia *in situ* stosowana jest w przypadku braku możliwości usunięcia skażonej ziemi, na przykład na obszarach przeznaczonych pod budownictwo, dróg, awarii miejscowych pod rurociągami i instalacjami, skażeń dużych obszarów. Głównymi metodami bioremediacji gleb *in situ* są: uprawa gleby, biowentylacja, bioekstrakcja. Technologia *ex situ* umożliwia skuteczniejsze wykonanie procesowych zabiegów intensyfikacyjnych bioremediacji skażeń, co prowadzi do skrócenia całkowitego czasu rekultywacji. Wśród metod oczyszczania *ex situ* wymienić należy: uprawę gleby, kompostowanie, biostosy i bioreaktory (1,25-28).

Wyróżnić można trzy typy bioremediacji gleb: bioremediację naturalną (naturalną attenuację), biostymulację i bioaugmentację (29). W bioremediacji naturalnej wykorzystuje się proces naturalnej biodegradacji (określanej też naturalną attenuacją) przeprowadzanej przez mikroorganizmy i wymaga jedynie prowadzenia regularnego monitorowania stężenia zanieczyszczeń. Najpowszechniej stosowaną metodą bioremediacji gruntów jest biostymulacja polegająca na stymulowaniu wzrostu i aktywności rodzimych populacji drobnoustrojów (przyspieszaniu procesów biodegradacji zanieczyszczeń) poprzez dostarczenie im odpowiednich substancji pokarmowych lub/i tlenu. Zdarza się, że rodzime populacje na danym terenie nie wykazują pożądanej aktywności w degradacji zanieczyszczeń. Jest to spowodowane toksycznym działaniem związków wchodzących w skład skażenia lub brakiem odpowiedniej ilości i jakości organizmów. W takiej sytuacji można zastosować bioaug-

mentację (20,30). Metoda ta polega na wprowadzeniu do środowiska odpowiednich mikroorganizmów. Mogą to być wyizolowane ze skażonego gruntu i namnożone szczepy, które wykazują największą aktywność w rozkładzie zanieczyszczeń (reinkulacja), rodzime drobnoustroje o selektywnie wzmocnionych w laboratorium zdolnościach funkcjonalnych lub mikroorganizmy modyfikowane genetycznie (GMM) (6,20,25,29-31).

Genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy można wykorzystywać nie tylko do przyspieszenia biodegradacji w skażonej glebie, ale również do monitorowania obecności wprowadzonych do gruntu bakterii oraz oceny biodostępności zanieczyszczeń (biosensory) i możliwości ich eliminacji. W pierwszym przypadku bakterie są wyposażone w odpowiedni konstrukt genowy, który jest łatwo wykrywany. Wówczas gdy biodostępność zanieczyszczeń jest warunkiem koniecznym do przeprowadzenia na danym terenie biologicznego oczyszczania można wykorzystać bakterie zawierające w swoim genomie promotor indukowany przez związek, którego biodostępność jest badana. Promotor ten jest połączony z genem, którego produkt można łatwo obserwować i zmierzyć. Najpowszechniej używanymi genami reporterowymi są geny bioluminescencji (*luc*, *lux*) oraz gen *gfp* kodujący zielone białko fluorescencyjne i jego pochodne (7,9,32).

Praktyczne zastosowanie w bioremediacji gruntów z ropy i jej produktów mogą mieć bakterie ze wstawionymi do chromosomu genami enzymów uczestniczących w rozkładzie węglowodorów naftowych (np. genem *tod* kodującym dioksygenazę toluenu) czy chemotaksji (np. *NahY* kodującym białko uczestniczące w chemotaksji do naftalenu i salicylanu) lub z wprowadzonymi plazmidami degradacji węglowodorów (np. plazmidem degradacji piranu z *Mycobacterium* sp.) (9,12,23,33,34).

5. Zastosowanie metod bioremediacji gleb zaolejonych w Polsce

Zastosowanie biologicznych metod oczyszczania gruntów skażonych produktami naftowymi praktykowane jest w Polsce z dobrym skutkiem od kilkunastu lat. Jednym z pionierów usuwania z gleb zanieczyszczeń ropopochodnych jest prof. J. Siuta z Instytutu Ochrony Środowiska w Warszawie, którego grupa prowadziła bioremediację w latach 80. i 90. ubiegłego wieku. W pierwszej połowie lat 90. w wielu innych ośrodkach naukowych i we firmach komercyjnych rozwinęło stosowanie metod biologicznych do likwidacji skażeń produktami ropopochodnymi w glebie (35).

Największe doświadczenie na rynku w dziedzinie oczyszczania gleb z substancji ropopochodnych mają pracownicy Zakładu Biologii Środowiska ISiŚ na Politechnice Warszawskiej, którzy przy współpracy z firmą Hydrogeotechnika Kielce przeprowadzili do 2003 r. skuteczną bioremediację ponad 30 tys. ton gruntu (22).

Problematyką biorekultywacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi zajmują się również pracownicy Zakładu Biochemii Akademii Rolniczej w Krakowie. W swojej kolekcji drobnoustrojów zgromadzono wiele szczepów bak-

teryjnych i drożdżowych, które są wykorzystywane do konstrukcji biopreparatów, degradujących trudno rozkładalne substancje ropopochodne w gruncie. Bank mikroorganizmów w Zakładzie Biochemii został utworzony ze szczepów wyizolowanych z wielu różnych źródeł zanieczyszczonych wód i gleb, występujących na terenie całej Polski. Bank ten jest wykorzystywany do badań mających na celu opracowanie składu biopreparatów rozkładających uciążliwe zanieczyszczenia, głównie WWA i ich chlorowcopochodne. W Zakładzie Biochemii AR w Krakowie przeprowadzono we współpracy z polskimi podmiotami gospodarczymi wydajną bioremediację gleb silnie zanieczyszczonych węglowodorami naftowymi. W tabeli 2 przedstawiono wyniki wybranych projektów rekultywacji, przeprowadzonych metodą *ex* i *in situ* (10,35).

Tabela 2

Przykłady bioremediacji gruntów

Pochodzenie i charakter skażenia	Metoda oczyszczania	Początkowe stężenie węglowodorów (mg/kg s.m.)	Końcowe stężenie węglowodorów (mg/kg s.m.)	Biodegradacja (%)	Czas trwania procesu (miesiące)
Brzesko – teren byłej bazy CPN (stacja przeładunku paliw)	<i>in situ</i>	51 076	680	98,7	25
ziemia zawierająca osady i pozostałości porafineryjne	<i>ex situ</i>	23 993	6652	72,3	6
modernizacja stacji paliw w Zakopanem	<i>ex situ</i>	9367	177	98,1	7
ziemia wybrana z terenu stacji paliw w Skawinie	<i>ex situ</i>	8075	1211	85,0	0,8
wyciek spod rurociągu – baza paliwowa Olszаница*	<i>in situ</i>	2000	110	94,5	17
teren stacji transformatorowej w Brzesku (skażenie gleby po wycieku oleju transformatorowego)	<i>in situ</i>	1382	677	51,0	10

*podczas rekultywacji nastąpił dwukrotny wylew

6. Mikroorganizmy rozkładające węglowodory naftowe

Zdolność do degradacji i/lub wykorzystywania węglowodorów naftowych wykazują liczne rodzaje bakterii i grzybów, a także drożdże, niektóre *Cyanobacteria* i zielone glony (1,11). Jednak w bioremediacji gruntów, z wielu względów, wykorzystuje się przede wszystkim bakterie. Charakteryzują się one wysoką liczebnością, szybkim wzrostem i zdolnością degradacji różnorodnych zanieczyszczeń. Można je łatwo hodować oraz poddawać manipulacjom genetycznym (28). Biologiczne oczyszczanie gleb z produktów ropopochodnych zachodzi głównie w wyniku działalności bakterii tlenowych, które wykorzystują węglowodory naftowe jako źródło węgla i energii potrzebne do ich wzrostu i rozmnażania. Grzyby mają ograniczone zasto-

sowanie w bioremediacji, ponieważ transformują węglowodory naftowe najczęściej kometabolicznie, wymagając podstawowego substratu wzrostu (glukoza lub celuloza), a tempo przeprowadzanej przez nie degradacji jest niskie. Organizmy te nie potrafią dalej metabolizować produktów kooksydacji, dlatego też całkowita mineralizacja zanieczyszczeń ropopochodnych następuje w wyniku aktywności bakterii (36).

Bieszkiewicz i wsp. (37) przeprowadzili identyfikację bakterii pochodzących z zaolejonej gleby. Wśród wyizolowanych szczepów najliczniejszą grupę stanowiły bakterie należące do rodzaju *Arthrobacter*. Mniej licznie były reprezentowane bakterie z grupy *Anitratum* oraz *Flavobacterium* i *Vibrio-Aeromonas*. Największy i najszybszy przyrost liczby komórek w hodowlach płynnych na podłożu z olejami wykazywały gatunki należące do rodzaju *Arthrobacter* i *Flavobacterium*.

Boosert i Bartha w 1984 r. zaprezentowali listę (w malejącym porządku) rodzajów bakterii najbardziej aktywnych w biodegradacji węglowodorów naftowych: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia* i *Mycobacterium*. Natomiast w badaniach Sztompki najwyższą aktywność w rozkładzie 1% oleju napędowego wykazały: *Micrococcus* sp., *Chryseomonas luteola*, *Bacillus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes xylosooxidans* spp. *denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter lwoffii* (2).

Długołańcuchowe węglowodory (alkany i alkeny) są rozkładane przez wiele gatunków bakterii (z rodzaju *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Geobacillus*), a także liczne drożdże (większość gatunków *Candida*), przy czym ich liczba i intensywność degradacji wzrasta wraz z długością łańcucha (38,39). Mniej licznie występują w glebach mikroorganizmy zdolne do biodegradacji cykloalkanów, przy czym zachodzi ona przede wszystkim przy udziale konsorcjum mikroorganizmów w drodze kometabolizmu (1).

Niskocząsteczkowe (dwu- lub trójpierścieniowe) węglowodory aromatyczne są degradowane przez wiele bakterii glebowych, a także liczne rodzaje grzybów m.in. *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Psilocybe*, *Smittium*. Natomiast zdolność rozkładu wysokocząsteczkowych (z 4 i większą liczbą pierścieni) węglowodorów aromatycznych występuje stosunkowo rzadko u bakterii. Związki te są raczej rozkładane przez grzyby ligninolityczne, takie jak: *Phanaerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera* sp., *Pleurotus ostreatus* oraz nieligninolityczne np. *Cunninghamella elegant*, *Penicillium janthinellum*, *Syncephalastrum* sp. (11,40-42).

Zdolność do wzrostu na wysokocząsteczkowych wielopierścieniowych węglowodorach aromatycznych jest prawdopodobnie szeroko rozpowszechniona w obrębie rodzaju *Mycobacterium*. Odnotowano ją dla kilku gatunków np. *M. flavescens*, *M. vanbaalenii* sp. (26) i szczepów takich jak: AP-1, PYR-1, BB1, KR2, GTI-23, RJGII-135, BG1, CH1 (3,40,42,43). Wiele bakterii degradujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) z rodzaju *Mycobacterium* posiada również zdolność do rozkładu węglowodorów alifatycznych (44,45).

Mikroorganizmy beztlenowe potrafią degradować węglowodory, takie jak benzen, toluen, etylobenzen, ksylen (BTEX) oraz heksadekan i naftalen (26). Szczepy

RCB i JJ należące do rodzaju *Dechloromonas* (β -*Proteobacteria*) całkowicie utleniają benzen w warunkach beztlenowych, wykorzystując azotan jako akceptor elektronów (46). *Geobacter metallidurans* i *G. grbicum* zdolne są do beztlenowego utleniania toluenu do CO_2 z redukcją Fe(III). Znanych jest kilka organizmów łączących beztlenową degradację toluenu z oddychaniem azotanowym (*Thauera aromatica* szczepy K172 i I1, *Azoarcus* sp. szczep T, *A. tolulyticus* szczepy To14 i Td15, *Dechloromonas* szczepy RCB i JJ), nadchloranowym (*Dechloromonas* szczepy RCB i JJ) oraz siarczanyowym (*Desulfobacterium cetonicum*, *Desulfobacula toluolica*) (47). Scharakteryzowano również metanogeniczne konsorcjum degradujące toluen składające się z dwóch gatunków archeonów spokrewnionych z rodzajem *Methanosaeta* i *Methanospirillum* oraz dwóch gatunków bakterii, z których jeden spokrewniony jest z *Desulfotomaculum* (36). Na podstawie przeprowadzonej analizy za pomocą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH) denitryfikatorów degradujących alkilobenzeny i n-alkany wykazano, że są to głównie bakterie z grupy *Azoarcus/Thauera*. Stosunkowo mało wiadomo o beztlenowej biodegradacji etylobenzenu. Dotychczas opisano tylko trzy organizmy (*Thauera* szczepy EbN1, PbN1, EB1) utleniające ten związek z jednoczesną redukcją azotanów (47).

7. Mechanizmy biodegradacji węglowodorów ropopochodnych

Najpowszechniejszą drogą tlenowej degradacji n-alkanów jest utlenianie terminalne z udziałem monooksygenazy. Hydroksylacja przy końcowym węglu w łańcuchu prowadzi do wytworzenia odpowiedniego alkoholu, który jest następnie utleniany do aldehydów i kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe przechodzą proces β -oksydacji, a powstały w nim acetylo-CoA zostaje włączony w cykl Krebsa (23). Alkeny ulegają hydrolizie w miejscu podwójnego wiązania, a następnie są metabolizowane jak alkany. Krótkołańcuchowe węglowodory są trudniej degradowane z wyjątkiem metanu, który w warunkach tlenowych jest szybko wykorzystywany jako jedyne źródło węgla przez metanotroficzne bakterie (np. *Methylomonas methanica*) i drożdże (38).

Degradację cykloheksanu zapoczątkowuje hydroksylacja prowadząca do powstania cykloheksanolu, który przekształcany jest w cykloheksanon i kaprolakton. Następnie hydrolaza laktozowa otwiera pierścień i powstaje odpowiedni kwas organiczny – kwas adypinowy (1).

Bakterie i grzyby wykorzystują odmienne drogi w tlenowej biodegradacji węglowodorów aromatycznych. U bakterii początkowe utlenienie pierścienia katalizowane jest przez wieloskładnikową dioksygenazę. Powstały cis-dihydrodiol ulega rearomatyzacji (udział dehydrogenazy cis-dihydrodiolu) do pochodnych dihydroksylowych. Dalsze utlenianie prowadzi do utworzenia katecholu (1,2-dihydroksybenzen) lub kwasu protokatechowego (3,4-dihydroksybenzoesan). Potem następuje oksydacyjne otwarcie pierścienia aromatycznego (w pozycji *orto* lub *meta*) katecholu lub

kwasy protokatecholowe z udziałem dioksygenaz. Dalszy rozkład prowadzi do powstania intermediatów centralnych szlaków metabolicznych, takich jak bursztynian, acetylo-CoA, pirogronian (38).

Grzyby nieligninolityczne oraz ligninolityczne utleniają pierścień aromatyczny do tlenków arenu za pomocą monooksygenazy cytochromu P-450. Tlenki mogą następnie izomeryzować do fenoli lub ulec enzymatycznej hydroksylacji katalizowanej przez hydrolazę epoksydową z wytworzeniem trans-dihydrodioli. W przeciwieństwie do grzybów nieligninolitycznych, z których stosunkowo niewiele ma zdolność degradowania WWA do CO₂, systemy enzymatyczne grzybów ligninolitycznych potrafią ciąć i mineralizować pierścień aromatyczny. Posiadają one silne zewnętrzkomórkowe enzymy odpowiedzialne za degradację ligniny, które działają na szeroką gamę WWA (48).

Znane są, jak dotąd, dwie drogi beztlenowej degradacji alkanów. Pierwsza z nich polega na addycji fumaranu, druga zaś obejmuje karboksylację i usunięcie terminalnej dwuwęglowej jednostki, co prowadzi do powstania odpowiedniego kwasu tłuszczowego (49).

Na podstawie dotychczasowych badań wskazuje się na trzy możliwe mechanizmy początkowej aktywacji pierścienia benzenu, takich jak: karboksylacja, hydroksylacja i metylacja. Pierścień ulega przekształceniu do centralnego intermediatu – benzylo-CoA, który jest redukowany do 1,5-dien-1-karboksylo-CoA przez główny enzym – reduktazę benzoilo-CoA (49).

8. Podsumowanie

Wiele mikroorganizmów glebowych (głównie bakterie i grzyby) jest zdolnych do rozkładu węglowodorów wchodzących w skład ropy i jej produktów w warunkach zarówno tlenowych, jak i beztlenowych. Większość z nich zidentyfikowano dzięki rozwojowi technik molekularnych. W ciągu ostatnich lat odkryto geny enzymów szlaków biodegradacji składników produktów ropopochodnych i chemoreceptorów uczestniczących w kierowaniu mikroorganizmów w stronę węglowodorów naftowych. Wprowadzenie tych genów do bakterii może mieć praktyczne zastosowanie w bioremediacji. O efektywności bioremediacji *in situ* gleb skażonych produktami ropopochodnymi w dużej mierze decydują parametry fizykochemiczne środowiska. Celowe jest, jak się wydaje, prowadzenie dalszych badań nad ich wpływem na liczebność, różnorodność i aktywność drobnoustrojów oraz biodostępność węglowodorów naftowych.

Literatura

1. Klimiuk E., Łebkowska M., (2003), *Biotechnologia w ochronie środowiska*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
2. Sztompka E., (1999), *Acta Microbiol. Pol.*, 48, 185-196.

3. Boldrin B., Tiehm A., Fritzsche Ch., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1927-1930.
4. Kasai Y., Takahata Y., Hoaki T., Watanabe K., (2005), *Environ. Microbiol.*, 7(6), 806-818.
5. Olańczuk-Neyman K., Prejzner J., Topolnicki M., (1994), *Biotechnologia*, 2, 50-59.
6. Boopathy R., (2000), *Bioresource Technology*, 74, 63-67.
7. Dua M., Singh A., Suthunathan N., Johri A. K., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 143-152.
8. Watanabe K., (2001), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12, 237-241.
9. Romantschuk M., Sarand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K., Haahela K., (2000), *Environ. Poll.*, 107, 179-185.
10. Kaszycki P., Kołoczek H., (2004), *Biotechnologie stosowane w odnowie gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi*, 41-56 (<http://fundacja.ogr.ar.krakow.pl/pdf/Kaszycki%20Koloczek%20str%2041-56.pdf>)
11. Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J. M., Beck A. J., (2004), *Crit. Rev. in Environ. Sci. Technol.*, 34, 249-289.
12. Pandey G., Jain R. K., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5789-5795.
13. Parales R. E., Haddock J. D., (2004), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15, 374-379.
14. Pieper D. H., Reineke W., (2000), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 262-270.
15. Bellin C. A., Rao P. S. C., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1813-1820.
16. Ortego-Calvo J.-J., Saiz-Jimenez C., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3123-3126.
17. Cameotra S. S., Bollag J.-M., (2003), *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 30, 111-126.
18. Desai J. D., Banat J. M., (1997), *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.
19. Timmis K. N., Pieper D. H., (1999), *Trends in biotechnology*, 17, 201-204.
20. Singer A. C., van der Gast Ch. J., Thompson I. P., (2005), *Trends in Biotechnology*, 23, 74-77.
21. Christofi N., Ivshina I. B., (2002), *J. Appl. Microbiol.*, 93, 915-929.
22. Szlaski A., Wojewódka D., (2003), *Instalator*, 61, 52-53.
23. Paul D., Pandey G., Pandey J., Jain R. K., (2005), *Trends in Biotechnology*, 23, 136-142.
24. Maila M. P., Cloete T. E., (2005), *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55, 1-8.
25. Vidali M., (2001), *Pure Appl. Chem.*, 73, 1163-1172.
26. Gestel K. V., Mergaert J., Swings J., Coosemans J., Ryckeboer J., (2003), *Environ. Poll.*, 125, 361-368.
27. Jørgensen K. S., Puustinen I. J., Suortti A.-M., (2000), *Environ. Poll.*, 107, 245-254.
28. Korda A., Santas P., Tenente A., Santas R., (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 677-686.
29. Kaplan Ch. W., Kitts Ch. L., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 1777-1786.
30. Vogel T. M., (1996), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 311-316.
31. Smets B. F., Siciliano S. D., Verstraete W., (2002), *Environ. Microbiol.*, 4, 315-317.
32. Elsas J. D., Duarte G. F., Rosado A. S., Smalla K., (1998), *Journal of Microbiological Methods*, 32, 133-154.
33. Heitkamp M. A., Freeman J. P., Miller D. W., Cerniglia C. E., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2556-2565.
34. Samanta S. K., Singh O. V., Rakesh K. J., (2002), *Trends in Biotechnology*, 20, 243-248.
35. Kołoczek, Kaszycki, (2004), *Biologiczne mechanizmy oczyszczania skażeń organicznych w glebie*, 28-40, (<http://fundacja.ogr.ar.krakow.pl/pdf/Koloczek%20Kaszycki%20str%2028-40.pdf>)
36. Prenafeta-Boldo F. X., Vervoort J., Grotenhuis J. T. C., van Groenestijn J. W., (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2660-2665.
37. Bieszykiewicz E., Mycielski R., Boszczyk-Maleszak H., Wyszowska B., (1997), *Biotechnologia*, 1, 71-78.
38. Baj J., Markiewicz Z., (2006), *Biologia molekularna bakterii*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
39. Meintanis Ch., Chalkou K. I., Kormas K., A., Karagolini A. D., (2006), *Biodegradation*, 17, 105-111.
40. Bogan B. W., Lahner L. M., Sullivan W. R., Paterek J. R., (2003), *J. App. Microbiol.*, 94, 230-239.
41. Boonchan S., Britz M. L., Stanley G. A., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1007-1019.
42. Kanaly R. A., Harayama S., (2000), *J. Bacteriol.*, 182, 2059-2067.
43. Miller C. D., Hall K., Liang Y. N., Nieman K., Sorensen D., Issa B., Anderson A. J., Sims R. C., (2004), *Microbiol. Ecol.*, 48, 230-238.
44. Dandie C. E., Thomas S. M., Bentham R. H., McClure N. C., (2004), *J. Appl. Microbiol.*, 97, 246-255.
45. Solano-Serena F., Marchal R., Casarégola S., Vasnier Ch., Lebeault J.-M., Vandecasteele J.-P., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2392-2399.

46. Coates J. D., Chakraborty R., McInerney M. J., (2002), *Research in Microbiology*, 153, 621-628.
47. Chakraborty R., Coates J. D., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 437-446.
48. Bezalel L., Hadar Y., Fu P. P., Freeman J. P., Cerniglia C. E., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2547-2553.
49. Zhang Ch., Bennett G. N., (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 600-618.
50. Sikkema J., de Bont J. A. M., Poolman B., (1995), *Microbiol. Rev.*, 59, 201-22.
51. Margesin R., Schinner F., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3127-3133.
52. Semple K. T., Reid B. J., Fermor T. R., (2001), *Environ. Poll.*, 112, 269-283.