

EFEKTY ZASTOSOWANIA BIOPREPARATÓW NATURALNYCH
I KOMERCYJNYCH W BIOREMEDIACJI GRUNTÓW
ZANIECZYSZCZONYCH SUBSTANCJAMI ROPOPOCHODNYMI

EWA ZABŁOCKA-GODLEWSKA, KORNELIUSZ MIKSCH

Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej, 44-101 Gliwice, ul. Akademicka 2

Keywords: petroleum hydrocarbons, polluted soils, biopreparations, bioremediation.

EFFECTS OF USING NATURAL AND COMMERCIAL BIOPREPARATIONS
IN BIOLOGICAL RECLAMATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS
POLLUTED SOILS

The effects of using three different biopreparations (one natural N2 and two commercial K1 and K2) in petroleum hydrocarbons age-polluted clay soil were studied. The samples of soil were taken from refinery in Czechowice-Dziedzice and classified as heavily degraded in proportion C:N = 100:0,7. Changes after introducing biopreparations into soil (bioaugmentation), their influence on microflora development and effects of removing polluting substances were studied. Bioaugmentation did not result in intensive growth of bacterial number, which was on the control sample's level during experiment. Soil's biodegradation activity also increased in level smaller than expected.

Streszczenie

Prezentowana praca obejmuje badania wpływu zastosowania trzech różnych biopreparatów (jednego naturalnego N2 oraz dwóch komercyjnych – K1 i K2) w glebie gliniastej o wieloletnim skażeniu substancjami ropopochodnymi. Badaną glebę pobrano z terenu rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach i zaklasyfikowano, jako silnie zdegradowaną o stosunku C:N = 100:0,7. Badano wpływ wprowadzonych szczepionek na rozwój mikroflory oraz efekty usunięcia substancji skażających. Stwierdzono, że wprowadzenie biopreparatów nie spowodowało intensywnego wzrostu liczebności bakterii, utrzymujących się przez większy okres eksperymentu na poziomie kontroli. Aktywność biodegradacyjna badanej gleby również wzrosła w stopniu mniejszym od oczekiwanego.

WPROWADZENIE

Większość substancji ropopochodnych zanieczyszczających środowisko gruntowo-wodne ulega procesom biologicznym przemian, polegających na ich biotransformacji lub biodegradacji. Zakres i szybkość ich rozkładu uzależnione są od wielu czynników środowiskowych i mikrobiologicznych, właściwości gleby, „wieku” zanieczyszczenia, jego stężenia, obecności substancji towarzyszących oraz przede wszystkim właściwości tych związków. W zależności od układu tych czynników trwałość substancji ropopochodnych w glebach – określana na podstawie ich czasu połowicznego rozkładu – może wahać się

w granicach od kilku dni do kilkunastu lat [8, 14, 18, 19, 24]. Struktura chemiczna, niska rozpuszczalność w wodzie i silna, wzrastająca z upływem czasu, adsorbpcja (zwłaszcza WWA), na elementach glebowych sprawia, że biologiczna degradacja staje się trudnym wyzwaniem dla biocenoz glebowych [3]. Przyjmuje się, że rekultywacja metodami biologicznymi jest możliwa wówczas, gdy stężenie substancji ropopochodnych w gruncie nie przekracza 10% [12].

Według danych literaturowych w glebie skażonej WWA ilość mikroorganizmów aktywnych w rozkładzie ropopochodnych nie powinna być niższa od 10^5 kom./g s.m. gleby [11, 16]. W gruntach silnie skażonych substancjami o niskiej podatności na biodegradację, zaleca się wzbogacanie naturalnej mikroflory poprzez wprowadzenie biopreparatów, czyli zestawów wyselekcjonowanych drobnoustrojów – bakterii, drożdży i grzybów, wykazujących specyficzną aktywność w stosunku do danego skażenia i współdziałających z autochtoniczną mikroflorą danego środowiska w jego usuwaniu. Imitując przyrodę biopreparaty inicjują procesy biodegradacji wszędzie tam, gdzie zostały one zahamowane lub się nie rozpoczęły [12, 15, 17, 21, 24].

METODYKA BADAŃ

Do badań użyto glebę o „zastarzałym” zanieczyszczeniu substancjami ropopochodnymi, pobraną z terenu wysypiska odpadów ropopochodnych rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach. Materiał pobrany z warstwy 0–30 cm zaklasyfikowano jako glebę gliniastą. Założono hodowle wazonowe, w których przez cały okres trwania badań utrzymywano wilgotność na poziomie 25% wagowych (co stanowiło 71% cpw).

Wykonano oznaczenia analityczne zawartości frakcji ciężkich węglowodorów (metoda wagowa), WWA (HPLC z detekcją fluorescencyjną), niepolarnych węglowodorów alifatycznych TPH (chromatografia gazowa), węgla organicznego, azotu ogólnego i pH [23].

Oznaczenia mikrobiologiczne obejmowały oznaczenia metodą posiewu powierzchniowego ogólnej liczby bakterii heterotroficznych na podłożu YS [21] i bakterii z rodzaju *Pseudomonas* na podłożu selektywnym firmy Oxoid (*Pseudomonas* C-F-C Selective Supplement, Code SR103E) oraz grzybów pleśniowych na podłożu Czapek-Doxa [23].

Próby glebowe poddano, przewidzianym w eksperymencie, modyfikacjom polegającym na zaszczepieniu biopreparatem naturalnym oznaczonym jako N2 oraz biopreparatami komercyjnymi oznaczonymi jako K1 i K2. Biopreparat naturalny N2 stanowiła mieszanina mikroorganizmów autochtonicznych, wyizolowanych z badanej gleby, których wprowadzona biomasa odpowiadała wartości $6,5 \times 10^5$ komórek na gram suchej masy gleby. Drugim użytym w badaniach biopreparatem był biopreparat komercyjny BIO AQUA KALGON + PG; kod: 401, który oznaczono jako biopreparat K2, trzecim biopreparatem był również biopreparat komercyjny BIO ACTIV HGS; kod 208, który oznaczono jako biopreparat K1. Biopreparaty komercyjne przygotowano i wprowadzono do odpowiednich prób zgodnie z zaleceniami producenta.

WYNIKI I DYSKUSJA

Grunty uznaje się za zanieczyszczone węglowodorami ropopochodnymi, jeżeli w poziomie próchnicznym zawierają powyżej 0,04% ekstraktu eterowego [24]. Innym kryterium oceny stopnia zanieczyszczenia jest koncentracja sumy WWA w zależności od zawartości materii organicznej. Zawartość WWA do 1000 mg/kg gleby w gruntach o 2% zawartości

materii organicznej klasyfikuje je jako grunty o „podwyższonej koncentracji” WWA, a powyżej jako skażone [19]. Zawartość substancji ropopochodnych w badanej glebie wskazywała na jej silną degradację. Główny ładunek zanieczyszczeń stanowiły tu frakcje ciężkie – ok. 16%, TPH – 1,9% oraz relatywnie niewielka zawartość WWA 2-6 pierścieniowych, których suma wynosiła 32,135 mg/kg s.m. gleby (0,0032%) (Tab. 1). Istotnym kryterium oceny zdegradowania gleby jest stosunek zawartości węgla do zawartości azotu w próchnicznej warstwie gleby [24]. Na ogół przyjmuje się optymalny dla biodegradacji stosunek C:N jako 250:10, zaleca się również proporcję 100:10 [15, 24]. Stosunek C:N = 100 : 0,7 (Tab. 2) i brak szaty roślinnej w miejscu poboru próby wskazuje na silną degradację badanej gleby.

Tabela 1. Zawartość węglowodorów ropopochodnych w glebie gliniastej (TPH, frakcje ciężkie i WWA)
Contents of petroleum hydrocarbons in clay soil (TPH, heavy fractions and PAH)

TPH [g/kg suchej masy] TPH [g/kg dry matter]	Frakcje ciężkie [g/kg suchej masy] Heavy fractions [g/kg dry matter]	WWA [g/kg s.m.] PAH [g/kg dry matter]	
19,11	159,11	0,032	
		2-3 p WWA 2-3 cyclic PAH	4-6 p WWA 4-6 cyclic PAH
		0,011	0,021

Tabela 2. Zawartość węgla organicznego i azotu ogólnego oraz pH zanieczyszczonej gleby gliniastej
Contents of organic carbon and total nitrogen and pH in polluted clay soil

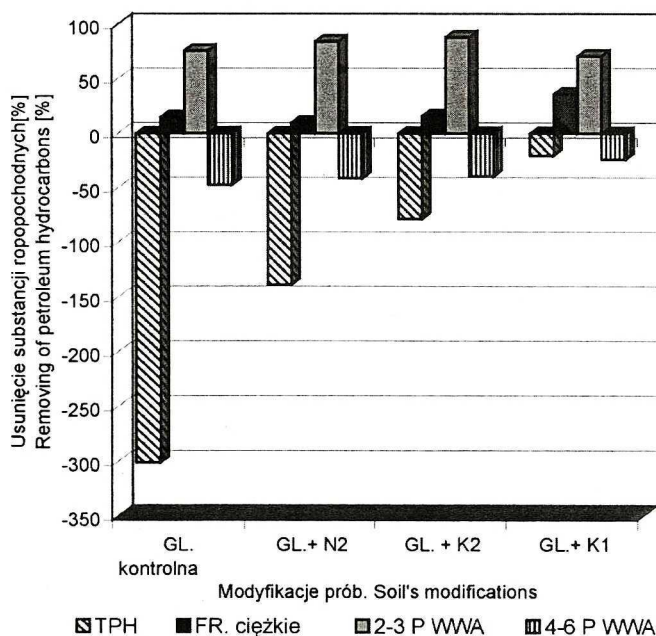
Rodzaj modyfikacji Samples modifications	N _{og} [g N _{og} /kg gleby.] Total N [g N/kg soil]				C [gC/ kg gleby.] Organic C [gC/ kg soil]				pH			
	0 t.*	4 t.	8 t.	12 t.	0 t.	4 t.	8 t.	12 t.	0 t.	4 t.	8 t.	12 t.
Kontrola Control soil	1,24	1,06	1,13	1,18	175	182	164	201	5,8	6,3	6,6	6,0
Gl. + biopreparat N2 Soil. + biopreparation N2		1,43	1,62	1,55		165	236	182		6,4	6,3	6,5
Gl. + biopreparat K2 Soil + biopreparation K2		1,10	1,13	1,18		159	190	171		6,3	6,5	6,4
Gl. + biopreparat K1 Soil + biopreparation K1		1,20	1,08	1,20		154	177	158		6,4	6,3	6,0

t* - tydzień eksperymentu

t* - week of experiment

Z doniesień literaturowych [19, 24, 25] wynika, że wieloletni charakter zanieczyszczenia gruntów substancjami ropopochodnymi sprzyja ich silnej sorpcji w obrębie elementów glebowych, co powoduje obniżenie efektywności procesów bioremediacyjnych na skutek zmniejszonej dostępności zanieczyszczeń. W glebach takich poważnym problemem, wpływającym na utrudnienie procesów bioremediacyjnych, jest również skład zanieczyszczenia, który najczęściej stanowią trudno rozkładalne frakcje reszkowe.

Pomimo silnego skażenia, badana gleba zachowała aktywność biologiczną i zdolność rozkładu zanieczyszczeń. W niemodyfikowanej próbce kontrolnej, stwierdzono bowiem usunięcie frakcji ciężkich na poziomie 14,9% i 2-3 pierścieniowych WWA na poziomie 75,9%, jednocześnie po 16 tygodniach trwania eksperymentu stwierdzono wzrost zawartości TPH (301,0%) i 4-6 pierścieniowych WWA (47,0%) w stosunku do wartości początkowej (Rys. 1). Pobrana do badań gleba była przesuszona. Deficyt wody jest jednym z czynników wpływających na wzrost sorpcji węglowodorów w glebie przez jej organiczny i mineralny kompleks sorpcyjny, co utrudnia ekstrakcję zanieczyszczeń w postępowaniu analitycznym [1, 18, 19, 25]. Czynnikiem, który wpłynął na zmianę warunków glebowych kontroli było dobre nawilżenie próby (utrzymywanie wilgotności na poziomie zbliżonym do 25% wagowych), co najprawdopodobniej spowodowało desorpcję zanieczyszczeń, umożliwiając ich ekstrakcję i oznaczenie.



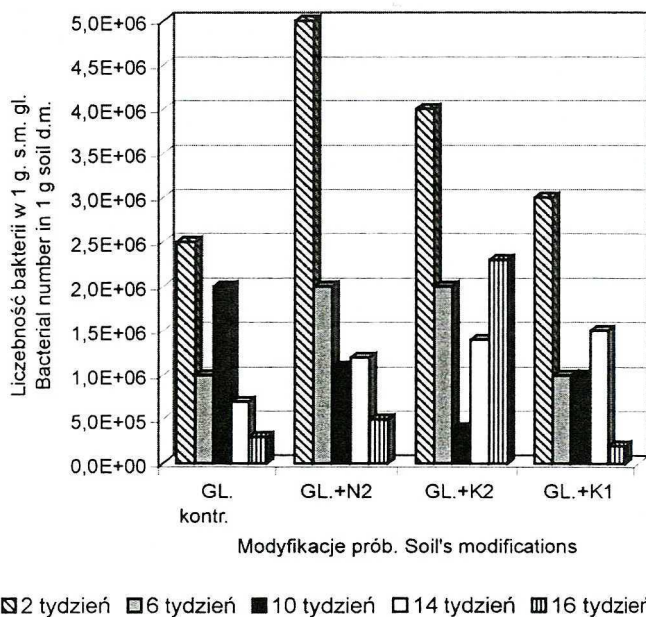
Rys. 1. Usunięcie substancji ropopochodnych z gleby gliniastej o wieloletnim skażeniu po 16 tygodniach trwania eksperymentu
Percentage removing of petroleum hydrocarbons from polluted and modified soil after 16 weeks of experiment

Wzrost efektywności procesów biodegradacji można uzyskać poprzez zabiegi sprzyjające zwiększeniu liczebności i aktywności mikroflory degradacyjnej m.in. w wyniku bioaugmentacji, czyli zaszczerpienia skażonego gruntu mikroorganizmami dobrze zaadaptowanymi do rozkładu danych zanieczyszczeń [4, 11, 14, 16, 24]. Wśród bakterii szczególnie aktywnych w procesach rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych wymienia się m.in. gatunki z rodzajów: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobakter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Bacillus* [3, 6, 7, 10, 24].

Zgodnie z danymi literaturowymi [3, 4, 9] najcenniejszym źródłem mikroorganizmów do sporządzania biopreparatów są środowiska naturalne o określonym poziomie skażenia

węglowodorami. Zasilenie badanej gleby dodatkową porcją mikroorganizmów jej właściwych, poprzez wprowadzenie biopreparatu naturalnego N2, spowodowało początkowo znaczny wzrost ich liczebności, po czym obserwowano wyraźną tendencję spadkową ogólnej liczby bakterii, jak i bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (Rys. 2 i 3). Zwraca jednak uwagę fakt, że udział tych ostatnich w ogólnej liczbie bakterii wzrastał (Rys. 4). Wprowadzenie biopreparatu naturalnego, a co za tym idzie, sztuczne zagęszczenie biocenozy najprawdopodobniej spowodowało zaostrenie konkurencji i antagonizmów między mikroorganizmami autochtonicznymi i „wypromowanie” w tych trudnych warunkach grupy lepiej przystosowanej, w tym wypadku m.in. grupy *Pseudomonas*.

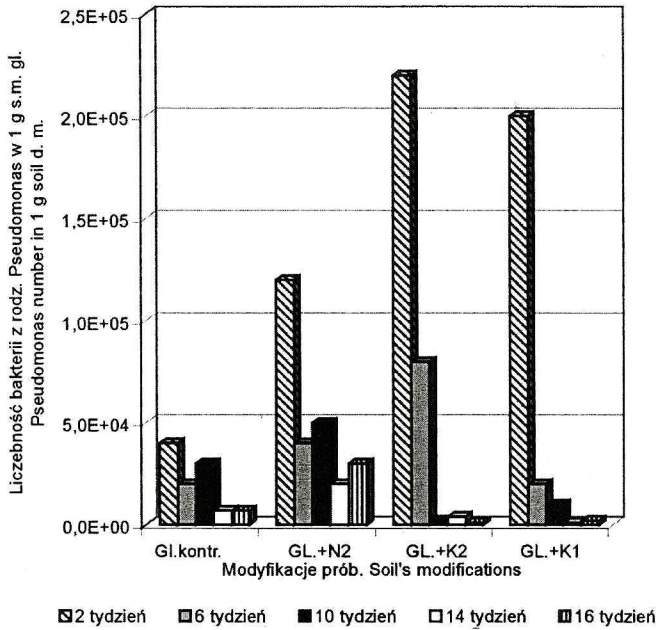
W próbie zaszczepionej biopreparatem N2 stwierdzono mniejszą aniżeli w kontroli desorpcję TPH (+138,5%) i 4-6 pierścieniowych WWA (+41,04%), co wobec zachowania identycznych warunków prowadzenia eksperymentu dla wszystkich prób mogłoby wskazywać na intensywniejsze procesy rozkładu desorbowanych frakcji w próbie z biopreparatem N2. Wzrosło również usunięcie 2-3 pierścieniowych WWA (84,34%), słabiej aniżeli w kontroli rozkładane były natomiast frakcje ciężkie (10,0%) (Rys. 1).



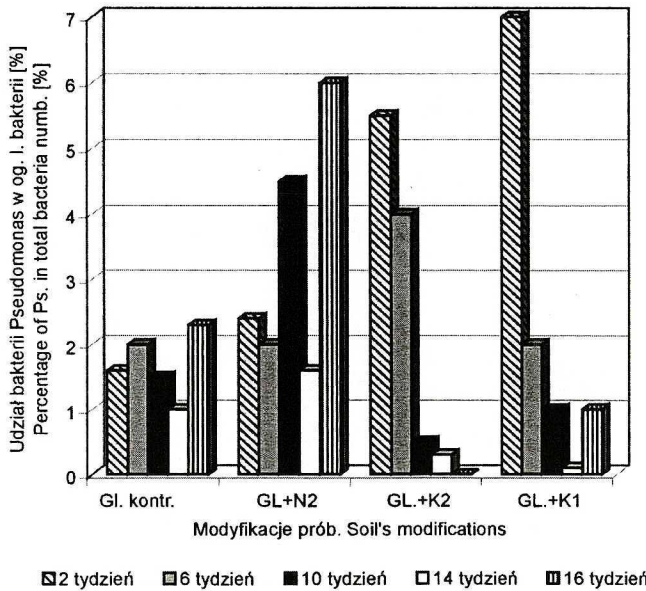
Rys. 2. Zmiany ogólnej liczebności bakterii w glebie gliniastej o wieloletnim skażeniu substancjami ropopochodnymi

Changes of total bacteria number in age-petroleum hydrocarbons-polluted clay soil

Po wprowadzeniu biopreparatów komercyjnych początkowo również stwierdzono wzrost ogólnej liczby bakterii i bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Obserwowane później fluktuacje miały charakter wyraźnie spadkowy w przypadku biopreparatu K1, w przypadku zaś biopreparatu K2 od 14 tygodnia widoczna była wyraźna tendencja wzrostowa (Rys. 2 i 3).



Rys. 3. Zmiany liczebności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie gliniastej o wieloletnim skażeniu substancjami ropopochodnymi
Changes of *Pseudomonas* bacteria number in age-petroleum hydrocarbons-polluted clay soil

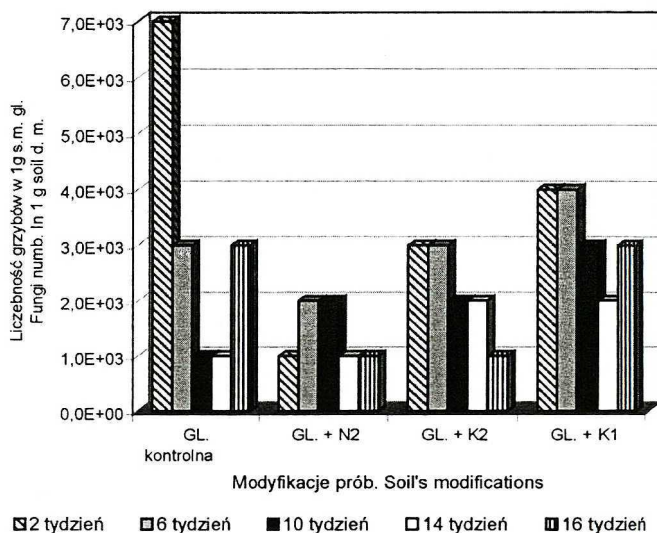


Rys. 4. Procentowy udział bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w ogólnej liczbie bakterii w glebie gliniastej o wieloletnim skażeniu substancjami ropopochodnymi
Percentage of *Pseudomonas* bacteria number in total bacteria number in age-petroleum hydrocarbons-polluted clay soil

W przypadku obu biopreparatów komercyjnych początkowo stwierdzono wysoki udział rodzaju *Pseudomonas* w ogólnej liczbie bakterii (kontrola – 1,6%, ; K1 – 7%; K2 – 5,5%) (Rys. 4). Wskazuje to na obecność tej grupy bakterii w biopreparatach K1 i K2. Obserwowane później drastyczne spadki grupy *Pseudomonas* sugerują brak możliwości zasiedlenia nowego środowiska, ze względu na zbyt ostrą konkurencję ze strony autochtonów lub wyczerpanie się przyswajalnych składników pokarmowych, w tym azotu, w pierwszym okresie eksperymentu lub też nagromadzenie się toksycznych metabolitów. Obserwowany w 14 tygodniu wzrost liczebności bakterii w próbie z biopreparatem K2 może wynikać z długiego okresu potrzebnego do wyselekcjonowania się mikroflory najlepiej zaadaptowanej do powstałych warunków lub, co bardziej prawdopodobne, usunięcia powstałych w początkowych etapach eksperymentu toksycznych metabolitów.

Zakładając, że przy zachowaniu dla wszystkich prób tych samych warunków eksperymentu, mniejsza desorpcja może być wynikiem większego tempa biodegradacji, zastosowanie biopreparatu K1 dało najbardziej zadawalające wyniki, gdyż desorpcja TPH była tylko na poziomie 20% (w kontroli 301%), 4-6 pierścieniowych WWA 23,67% (w kontroli 47%). W przypadku biopreparatu K2 odnotowano przyrost TPH na poziomie 78,4%, 4-6 pierścieniowych WWA 39,49%. Frakcje ciężkie najlepiej usuwane były w próbie z biopreparatem K1 (36%), zaś 2-3 pierścieniowe WWA najlepiej usuwane były w próbie z biopreparatem K2 (Rys. 1).

Spadkom liczebności bakterii w próbach towarzyszyły najczęściej wzrosty liczebności grzybów pleśniowych (Rys. 5). Takie fluktuacje mogą być wynikiem synergistycznych zależności pomiędzy tymi grupami mikroorganizmów. Wynikiem tych zależności jest prawdopodobnie sekwencyjność reakcji rozkładu zanieczyszczeń [16].



Rys. 5. Zmiany liczebności grzybów pleśniowych w glebie gliniastej o wieloletnim skażeniu substancjami ropopochodnymi
Changes of fungi number in age-petroleum hydrocarbons-polluted clay soil

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie biopreparatów – zarówno naturalnego N₂, jak i komercyjnych K1, K2 – spowodowało wzrost ogólnej liczby bakterii i bakterii z rodzaju *Pseudomonas* tylko w początkowym okresie eksperymentu. Późniejszym fluktuacjom liczebności bakterii o wyraźnej tendencji spadkowej towarzyszyły również fluktuacje liczebności grzybów pleśniowych, jednakże zależności te były odwrotnie proporcjonalne. Długi okres skażenia (kilkadziesiąt lat) przyczynił się do ustalenia w tych trudnych warunkach równowagi biologicznej na pewnym poziomie. Ingerencja w tak ukształtowaną biocenozę poprzez wprowadzanie aktywnej biomasy, czy to specyficznych dla tej gleby, czy też obcych organizmów, napotyka na trudności. Większy ubytek substancji ropopochodnych w próbach bioaugmentowanych wskazuje jednak, że wprowadzenie biopreparatów spowodowało zmiany w biocenozach, które wpłynęły na wzrost aktywności biodegradatorów. Może to być wynikiem wyselekcjonowania się grup najlepiej przystosowanych do trudnych warunków egzystencji i konkurencji o nisze ekologiczne. Nie można również wykluczyć hipotezy, że wprowadzone biopreparaty, pomimo trudności z zasiedleniem badanej gleby, spełniły swoją rolę, aktywując mikroflorę naturalną poprzez dostarczenie łatwo przyswajalnego źródła węgla (istotnego w procesach kometabolicznych) i deficytowego azotu w postaci wprowadzonej biomasy, a w przypadku biopreparatów komercyjnych również pożywki aktywującej.

LITERATURA

- [1] Bastiaens L., D. Springael, L. Diels, P. Wattieu, H. Verachtert: *Isolation of new polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading bacteria by use of PAH sorbing carriers*, Int. Symp. Env. Biot., Ostende, April 1997, 237–330.
- [2] Bastiaens L., D. Springael, G. Remes., J. Vereecken, L. Diels, H. Verachtert: *Metabolization and cometabolization of single PAHs and PAH mixtures i liquid cultures, soil slurries and dry solid reactors (DSR)*, Int. Symp. Env. Biot., Ostende, April 1997, 109–112.
- [3] Bieszkiewicz E., A. Pakuła, H. Boszczyk-Maleszak, R. Mycielski: *Badania nad rozkładem frakcji olejowej pochodzącej z mechanicznej oczyszczalni ścieków rafinerijno-petrochemicznych przez szczepy bakterii wyizolowane z osadu czynnego*, Materiały VI Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wrocław 1999, 39–45.
- [4] Bauman-Kaszubska H., B. Ciarcińska: *Zastosowanie biopreparatów z własnych hodowli oraz biopreparatów handlowych*, Materiały II Sympozjum Naukowego „Zastosowanie biopreparatów bakteryjnych do oczyszczania wody, ścieków i gruntów”, Płock 1997, 13–21.
- [5] Bouchez M., D. Blanchet, J. P. Vandecasteele: *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **43**, 156–164 (1995).
- [6] Galas E., E. Kwapisz, A. Oryńska-Rosa, M. Wasiak: *Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil by Micrococcus sp. R51.*, Int. Symp. Env. Biot., Ostende, April 1997, 5–8.
- [7] Galas E., E. Kwapisz, J. Polak, M. Wasiak, A. Walczak: *Wpływ źródła azotu na szybkość biodegradacji węglowodorów ropy naftowej i produkcję biosurfaktantów przez szczepy Pseudomonas sp. BP i Micrococcus sp. R51.*, Materiały V Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 1997, 1–9.
- [8] Gemoets J., L. Bastiaens, D. Van Houtven, D. Springael, L. Diels: *Bioremediation of mineral oil, PAH and PCB in dry solid reactors*, Int. Symp. Env. Biot., Ostende, April 1997, 417–419.
- [9] Grosser R. J., D. Warshawsky, J. R. Vestal: *Mineralization of polycyclic and n-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon contaminated soils*, Environmental Toxicology and Chemistry, **14**, 3, 375–382 (1995).
- [10] Huesemann H. M.: *Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent recalcitrance?*, Bioremediation Journal, 1 (1), 27–39, Battelle Memorial Institute (1997).

- [11] Kańska Z., M. Lebkowska, E. Sztompka: *Eliminacja zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntu*, Bioinżynieria, zesz. 1, Politechnika Warszawska, Warszawa 1997, 231–242.
- [12] Kołwzan B., T. Traczewska, K. Piekarska, M. Juchniewicz: *Mikrobiologiczna ocena możliwości bioremediacji gruntów skażonych produktami naftowymi*, Materiały V Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 1997, 11–16.
- [13] Korzeniowska E.: *Zanieczyszczenia gruntów substancjami ropopochodnymi oraz wpływ zanieczyszczeń na zmianę pierwotnych własności gruntów*, Materiały Politechniki Krakowskiej (1995).
- [14] Kurek E., A. Stec, D. Staniak: *Bioremediacja ex situ gleby skażonej produktami ropopochodnymi*, Ekoinżynieria, 9 (34), 5–11 (1998).
- [15] Kwapisz E.: *Problemy biodegradacji węglowodorów ropy naftowej*, Materiały VI Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wrocław 1999, 227–229.
- [16] Lebkowska M.: *Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym*, Gaz, Woda i Technika Sanitarna, 3/96, 117–119 (1996).
- [17] Lebkowska M., E. Sztompka, E. Karwowska: *Zastosowanie immobilizowanych mikroorganizmów do usuwania produktów naftowych z gruntów*, Materiały II Ogólnopolskiego Symp. Nauk.-Techn. „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 1995, 95–103.
- [18] Maliszewska-Kordybach B.: *Związki organiczne w środowisku i metody ich oznaczania; Problemy zanieczyszczenia środowiska glebowego wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi i metody ich analizy*, Wyd. Bibl. Monitoringu Środowiska, Warszawa 1994, 123–139.
- [19] Maliszawska-Kordybach B.: *The relationship between the properties of PAH and the rate of their disappearance from different soils*, Toxicol. Environ. Chem., **66**, 47–52 (1998).
- [20] Maliszewska-Kordybach B., B. Smreczak: *Policyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in agricultural soils in Eastern Poland*, Toxicol. Environ. Chem., **66**, 53–58 (1998).
- [21] Muszyński A., E. Karwowska, M. Kaliszewski: *Bioremediacja gleby z produktów ropopochodnych przy zastosowaniu mikroorganizmów immobilizowanych na nośnikach stałych*, Gaz, Woda i Technika Sanitarna, 8/96, 299–301 (1996).
- [22] Ostrowska A., S. Gawliński, Z. Szczubiałka, *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*, Warszawa 1991.
- [23] Praca zbiorowa pod red. J. Mrozowskiej: *Laboratorium z mikrobiologii ogólnej i środowiskowej*, Skrypt Politechniki Śląskiej, nr 2144, Wydawnictwo Polit. Śl., Gliwice 1999.
- [24] Siuta J.: *Biodegradacja ropopochodnych składników w glebach i w odpadach*, Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 1993.
- [25] Totsche K.U., I. Kogel-Knabner: *Estimating PAH dissipation in contaminated soils*, Int. Symp. Env. Biot., Ostende, April 1997, 431–434.

Wpłynęło: 24 lutego 2003, zaakceptowano do druku: 14 lipca 2003.