

ZESZYTY NAUKOWE
POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ

Anna MAŁACHOWSKA-JUTSZ

**MIKORYZACJA ROŚLIN
A EFEKTYWNOŚĆ FITOREMEDIACJI
GRUNTÓW ZANIECZYSZCZONYCH WĘGLOWODORAMI**



GLIWICE 2008

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
ZESZYTY NAUKOWE
Nr 1782



P3355/2008

Anna MAŁACHOWSKA-JUTSZ

**MIKORYZACJA ROŚLIN
A EFEKTYWNOŚĆ FITOREMEDIACJI
GRUNTÓW ZANIECZYSZCZONYCH WĘGLOWODORAMI**

GLIWICE

2008

02.33070

Opiniodawcy

Prof. dr hab. Renata KOCWA-HALUCH

Prof. dr hab. Barbara MALISZEWSKA-KORDYBACH

Kolegium redakcyjne

REDAKTOR NACZELNY – Prof. dr hab. inż. Andrzej BUCHACZ

REDAKTOR DZIAŁU – Prof. dr hab. inż. Jolanta BOHDZIEWICZ

SEKRETARZ REDAKCJI – Mgr Elżbieta LEŚKO

Projekt okładki

Anna WIECHETEK

Wydano za zgodą

Rektora Politechniki Śląskiej

PL ISSN 0867-6038

© Copyright by

Wydawnictwo Politechniki Śląskiej

Gliwice 2008

Utwór w całości ani we fragmentach nie może być powielany ani rozpowszechniany za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych, kopiujących, nagrywających i innych, w tym również nie może być umieszczany ani rozpowszechniany w postaci cyfrowej zarówno w Internecie, jak i w sieciach lokalnych bez pisemnej zgody posiadacza praw autorskich.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	11
1. WSTĘP	13
2. CEL, TEZY I ZAKRES PRACY	16
3. ZANIECZYSZCZENIE GRUNTU SUBSTANCJAMI ROPOPOCHODNYMI - PRZEGLĄD LITERATURY	18
3.1. Charakterystyka zanieczyszczeń ropopochodnych.....	18
3.1.1. Ropa naftowa i produkty naftowe.....	18
3.1.2. Źródła zanieczyszczenia środowiska produktami naftowymi	19
3.2. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na właściwości środowiska gruntowego ...	20
3.2.1. Wpływ skażenia gleby produktami naftowymi na jej właściwości fizyko- chemiczne	20
3.2.2. Wpływ skażenia gleby produktami naftowymi na mikroorganizmy glebowe	22
3.3. Czynniki wpływające na szybkość rozkładu substancji ropopochodnych w gruncie...24	
3.3.1. Właściwości fizykochemiczne zanieczyszczeń.....	24
3.3.2. Czynniki biologiczne.....	25
3.3.3. Czynniki środowiskowe	28
3.4. Remediacja gruntów skażonych substancjami ropopochodnymi	33
3.4.1. Metody remediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi	33
3.4.1.1. Metody fizykochemiczne	33
3.4.1.2. Metody biologiczne	34
3.4.2. Rola mikroorganizmów ryzosferowych w bioremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi	38
3.5. Ocena ekotoksykologiczna gleb	42
4. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ	46
4.1. Materiały	46
4.1.1. Gleba.....	46
4.1.2. Odcieki glebowe	46
4.1.3. Materiały biologiczne	46
4.2. Metody analityczne.....	47
4.2.1. Metody analiz materiału glebowego.....	47

4.2.1.1. Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA).....	47
4.2.1.1.1. Oznaczanie WWA w glebie.....	47
4.2.1.1.2. Oznaczanie WWA w odciekach gleb	49
4.2.1.2. Oznaczanie węglowodorów ropopochodnych w glebie metodą spektrometrii w podczerwieni.....	49
4.2.1.3. Oznaczanie węglowodorów ropopochodnych w odciekach glebowych metodą spektrometrii w podczerwieni.....	50
4.2.1.4. Oznaczanie frakcji ciężkich	50
4.3. Testy ekotoksyczności	51
4.3.1. Testy fitotoksyczności	51
4.3.1.1. Hamowanie wzrostu korzeni	51
4.3.1.2. Hamowanie wzrostu roślin	52
4.3.1.3. Inhibicja glonów <i>Scenedesmus quadricauda</i>	52
4.3.2. Testy na dżdżownicach z gatunku <i>Eisenia fetida</i>	53
4.3.3. Testy na ślimakach z gatunku <i>Physa acuta</i> <i>Drap</i>	53
4.3.4. Testy mikrobiologiczne	54
4.3.4.1. Ogólna liczebność mikroorganizmów	54
4.3.4.2. Mikroorganizmy rozkładające związki bezazotowe.....	54
4.3.4.3. Genotoksyczność – test na zdolność do reperacji DNA u <i>Bacillus subtilis</i> ..	54
4.4. Analizy mikroskopowe.....	55
4.5. Opis doświadczeń	56
4.5.1. Schemat doświadczeń.....	56
4.5.2. Badanie wpływu procesu samooczyszczania gleby A na zmianę jej ekotoksyczności – doświadczenia laboratoryjne	57
4.5.2.1. Opis doświadczeń wazonowych	57
4.5.2.2. Metodyka doświadczeń lizymetrycznych.....	57
4.5.3. Badanie procesu fitoremediacji wspomaganą biopreparatami	58
4.6. Statystyczna ocena wyników badań	60
5. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE	61
5.1. Porównanie właściwości gleby zanieczyszczonej węglowodorami (gleba A) i gleby nie zanieczyszczonej (gleba kontrolna – B)	61
5.2. Wpływ procesu samooczyszczania na ekotoksyczność gleby A (ocena funkcji siedliskowej).....	64

5.2.1. Ocena fitotoksyczności gleby	64
5.2.1.1. Test hamowania wzrostu korzeni roślin „ <i>in vitro</i> ”	64
5.2.1.2. Test hamowania wzrostu roślin „ <i>in vitro</i> ”	66
5.2.2. Rozwój roślin w glebie skażonej substancjami ropopochodnymi	69
5.2.2.1. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na budowę systemów korzeniowych roślin.....	72
5.2.2.2. Porównanie budowy korzeni roślin jednoliściennych pochodzących z różnych gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi.....	75
5.2.3. Wpływ gatunku rośliny na liczebność mikroorganizmów ryzosferowych.....	77
5.2.4. Oznaczenie stopnia mikoryzacji roślin wyhodowanych w kulturach wazonowych	80
5.2.4.1. Ilościowa i jakościowa analiza spor grzybów mikoryzowych.....	84
5.2.5. Ocena wpływu na dżdżownice z gatunku <i>Eisenia fetida</i>	87
5.2.6. Ocena genotoksyczności gleby	87
5.3. Wpływ procesu samooczyszczania na właściwości ekotoksyczne odcieków gleby A (na funkcje retencyjne)	88
5.3.1. Ocena fitotoksyczności odcieków	88
5.3.1.1. Wpływ na wzrost korzeni	88
5.3.1.2. Wpływ na wzrost glonów <i>Scenedesmus quadricauda</i>	91
5.3.2. Ocena zootoksyczności odcieków	91
5.3.3. Ocena genotoksyczności odcieków	91
5.4. Wpływ procesu samooczyszczania na właściwości fizykochemiczne gleby A oraz odcieków glebowych	92
5.5. Fitoremediacja gruntu wspomagana biopreparatami.....	96
5.5.1. Wpływ dodatku biopreparatów na proces fitoremediacji gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi.....	96
5.5.2. Wpływ szczepienia gleby biopreparatami na liczebność bakterii zdolnych do degradacji węglowodorów	99
5.5.3. Ocena ekotoksykologiczna gleby po procesie fitoremediacji wspomaganej biopreparatami	100
6. Dyskusja wyników badań	103
6.1. Wpływ procesu samooczyszczania na ekotoksyczność gleby skażonej produktami naftowymi i jej odcieków	103
6.1.1. Fitotoksyczność gleby i odcieków	104

6.1.2. Zootoksyczność gleby i odcieków	107
6.1.3. Genotoksyczność gleby i odcieków	109
6.2. Fitoremediacja gleby A.....	110
6.2.1. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na budowę morfologiczną korzeni roślin i frekwencję mikoryzową.....	110
6.2.2. Wpływ obecności grzybów mikoryzowych na rozwój mikroorganizmów ryzosferowych w glebie	112
6.2.3. Wpływ zastosowanych modyfikacji gleby na rozwój mikroorganizmów degradujących węglowodory	114
6.2.4. Wpływ zastosowanych modyfikacji gleby na efekt usunięcia zanieczyszczeń ropopochodnych.....	115
6.2.5. Toksyczność gleby po procesie fitoremediacji	118
6.3. Aspekty prawne i podsumowanie uzyskanych efektów bioremediacji	120
7. WNIOSKI	125
LITERATURA	127
STRESZCZENIE.....	149
SPIS TABEL I RYSUNKÓW	153
ZAŁĄCZNIKI	157

CONTENTS

ABBREVIATIONS	11
1. INTRODUCTION	13
2. THESIS, AIMS AND SCOPE OF DISSERTATION	16
3. CONTAMINATION OF SOIL WITH PETROLEUM SUBSTANCES - LITERATURE SURVEY	18
3.1. Characteristic of petroleum contaminants	18
3.1.1. Petroleum oil and petroleum products	18
3.1.2. Sources of environmental pollution with petroleum products	19
3.2. The influence of petroleum contamination on terrestrial environment properties	20
3.2.1. The influence of petroleum contamination on physical-chemical properties	20
3.2.2. The influence of petroleum contamination on soil microorganisms	22
3.3. The factors influencing degradation rate of petroleum products in soil	24
3.3.1. Physical-chemical properties of contaminations	24
3.3.2. Biological factors	25
3.3.3. Environmental factors	28
3.4. Remediation of soil contaminated with petroleum products	33
3.4.1. Methods of remediation of soil contaminated with petroleum products	33
3.4.1.1. Physical-chemical methods	33
3.4.1.2. Biological methods	34
3.4.2. The role of rhizosphere microorganisms in bioremediation of soil contaminated with petroleum products	38
3.5. Ecotoxicological evaluation of soil quality	42
4. MATERIALS AND METHODS	46
4.1. Materials	46
4.1.1. Soil	46
4.1.2. Soil leachates	46
4.1.3. Biological materials	46
4.2. Analytical methods	47
4.2.1. Analytical methods of soil samples	47
4.2.1.1. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	47
4.2.1.1.1. Determination of PAHs concentration in soil	47

4.2.1.1.2. Determination of PAHs concentration in soil leachates	49
4.2.1.2. Determination of petroleum hydrocarbons content in soil by infrared spectrometry (IR) method	49
4.2.1.3. Determination of petroleum hydrocarbons content in soil leachates by infrared spectrometry (IR) method	50
4.2.1.4. Determination of heavy fractions	50
4.3. Ecotoxicological tests	51
4.3.1. Phytotoxicity tests.....	51
4.3.1.1. Roots growth inhibition test.....	51
4.3.1.2. Plants growth inhibition test	52
4.3.1.3. Algae <i>Scenedesmus quadricauda</i> growth inhibition test	52
4.3.2. Acute toxicity test with earthworms <i>Eisenia fetida</i>	53
4.3.3 Acute toxicity test with snails <i>Physa acuta</i> Drap.....	53
4.3.4. Microbiological analysis.....	54
4.3.4.1. Determination of the number of microorganisms.....	54
4.3.4.2. Microorganisms degrading compounds without nitrogen	54
4.3.4.3. „Rec-assay" genotoxicity test with <i>Bacillus subtilis</i>	54
4.4. Microscopic analysis.....	55
4.5. Description of experiments.....	56
4.5.1. Schema of experiments.....	56
4.5.2. Determination of the influence of soil A self-cleaning on its' ecotoxicity changes - lab. experiments	57
4.5.2.1. Methods of pots experiments.....	57
4.5.2.2. Method of experiments with lysimeters.....	57
4.5.3. Investigation of phytoremediation enhanced with biopreparats	58
4.6. Statistical analysis.....	60
5. RESULTS	61
5.1. Comparison of properties of soil contaminated with hydrocarbons (A) and noncontaminated soil (control B)	61
5.2. The influence of self-cleaning process on toxicity of soil A (evaluation of habitat function of soil).....	64
5.2.1. Phytotoxicity of soil.....	64
5.2.1.1. Roots growth inhibition test „in vitro"	64
5.2.1.2. Plants growth inhibition test „in vitro"	66

5.2.2. Development of plants in soil contaminated with petroleum products	69
5.2.2.1. The influence of petroleum contaminations on roots system structure	72
5.2.2.2. The comparison of roots structure of monocotyledonous plants collected from different sites polluted with petroleum products.....	75
5.2.3. The influence of plant specie on the count of ryzosphere microorganisms.....	77
5.2.4. Determination of micorrhization degree of plants cultivated in pot experiment...80	
5.2.4.1. Quantitative and qualitative analysis of mycorrhizal fungi spores.....	84
5.2.5. The influence of petroleum products on earthworm species <i>Eisenia fetida</i>	87
5.2.6. Genotoxicity of soil contaminated with petroleum products.....	87
5.3. The influence of self-cleaning process on ecotoxicity of soil A leachates (retention function)	88
5.3.1. Phytotoxicity of soil leachates	88
5.3.1.1. The influence on roots growth	88
5.3.1.2. The influence on growth of algae <i>Scenedesmus quadricauda</i>	91
5.3.2. Zootoxicity of soil leachates	91
5.3.3. Genotoxicity of soil leachates.....	91
5.4. The influence of self-cleaning process of soil A on physical-chemical properties of soil and soil's leachates.....	92
5.5. Phytoremediation of soil amended with inoculum	96
5.5.1. The influence of soil inoculation on the phytoremediation of soil contaminated with hydrocarbons.....	96
5.5.2. The influence of soil inoculation on the amount of hydrocarbons-degrading bacteria.....	99
5.5.3. Ecotoxicological evaluation of soil after phytoremediation enhanced by inoculation	100
6. DISCUSSION.....	103
6.1. The influence of self-cleaning process on toxicity of soil and soil's leachates	103
6.1.1. Phytotoxicity of soil and soil leachates.....	104
6.1.2. Zootoxicity of soil and soil leachates	107
6.1.3. Genotoxicity of soil and soil leachates	109
6.2. Phytoremediation of soil A.....	110
6.2.1. The influence of petroleum contaminants on morphological structure of plant's roots and micorrhization degree	110

6.2.2. The influence of micorrhizal fungi on growth of rhizosphere microorganisms in soil.....	112
6.2.3. The influence of modification of soil on the development of petroleum degrading microorganisms.....	114
6.2.4. The influence of modification of soil on the removal effect of petroleum contaminants	115
6.2.5. Toxicity of soil after phytoremediation process	118
6.3. Law aspects and summary of obtained results of bioremediation	120
7. CONCLUSIONS	125
REFERENCES	127
ABSTRACT.....	151
TABLES AND FIGURES	153
ATTACHEMENTS	157

WYKAZ SKRÓTÓW

ζ	– gęstość objętościowa gruntu
ζ_s	– gęstość właściwa szkieletu gruntowego
c	– spójność gruntu
w_L	– granica płynności
NADH	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
WHC	– całkowita pojemność wodna
WWA/PAH	– wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
ATP	– adenylozotrójfosforan
C:N:P	– stosunek ilości węgla/azotu/fosforu
DDT	– dichlorodifenylotrichloroetan
TNT	– trinitrotoluen
TCE	– trichloroetan
PCP	– pentachlorofenol
PCBs	– polichlorowane bifenyle
AMF	– grzyby mikoryzy arbuskularnej
VAM	– mikoryza arbuskularno-wezikularna
WSA	– stabilność wodna agregatów glebowych
gcp	– glina ciężka pylasta
HPLC	– metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej
Fl	– fluoranten
Pir	– piren
BaA	– benzo(a)antracen
Chr	– chryzen
BbF	– benzo(b)fluoranten
BkF	– benzo(k)fluoranten
BaP	– benzo(a)piren
BghiP	– benzo(ghi)perylene
DiaA	– dibenzo(a,h)antracen
IP	– indeno(1,2,3-c,d)piren
CM	– dichlorometan
s.m.g.	– sucha masa gleby
U_R	– niepewność rozszerzona metody
OECD	– Organizacja Współpracy i Rozwoju Gospodarczego
DNA	– kwas dezoksyrybonukleinowy
ISO	– Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna
PN	– Polska Norma
DMSO	– dimetylosulfotlenek
SD	– odchylenie standardowe
K_{ow}	– współczynnik podziału oktanol/woda

1. WSTĘP

Jednym z najważniejszych odnawialnych bogactw naturalnych Ziemi i podstawą funkcjonowania wszystkich istniejących na niej ekosystemów lądowych są gleby. Będąc zewnętrzną, powierzchniową warstwą litosfery są one narażone na degradację w wyniku gospodarczej działalności człowieka. Powodem takiego stanu rzeczy jest intensyfikacja rolnictwa i przemysłu. Zanieczyszczenia kumulujące się w glebach stanowią aktualne oraz potencjalne zagrożenie - nie tylko dla ekosystemów lądowych, ale również dla wód powierzchniowych, gruntowych i podziemnych oraz dla zdrowia i życia człowieka. Powszechnie znany jest fakt, że działalność człowieka narusza równowagę biosfery. Ochrona zasobów przyrody stanowi obecnie problem globalny. Wielu autorów wskazuje na przyczyny kryzysu ekologicznego, przytaczając coraz dokładniejsze dane na ten temat. Niemniej jednak nawet bardzo dobra znajomość danych liczbowych nie da nam wyczerpujących odpowiedzi na pytania: jak żyć, aby zachować równowagę w środowisku i harmonię w obrębie ekosystemu, jak osiągnąć harmonię z innymi ludźmi, z samym sobą, z roślinami i zwierzętami. Współczesny człowiek, aby zaspokoić swoje potrzeby bytowe, konsumuje zasoby środowiska zapominając, że jest od niego zależny zarówno w sposób biologiczny, jak i gospodarczy. Takie właśnie postępowanie doprowadziło w wielu miejscach naszego globu do nieodwracalnych zmian.

Istotny udział wśród zanieczyszczeń gleb i wód gruntowych mają substancje ropopochodne (Surygała, 2000). Po długim okresie bez troski o środowisko naturalnego wprowadzone zostały w Polsce regulacje prawne, określające zasady postępowania z terenami zdegradowanymi oraz standardy, będące podstawą do interpretacji, co jest terenem zanieczyszczonym, a co jeszcze nie. Wprowadzono również katalog odpadów, w którym znalazły się grunty zanieczyszczone różnymi substancjami. Podstawowymi aktami prawnymi regulującymi procesy użytkowania gruntów i ich rekultywacji są: Ustawa Prawo Ochrony Środowiska z dnia 27 kwietnia 2001 r. (DzU Nr 62, poz. 627) wraz z późniejszymi zmianami (DzU Nr 190, poz. 1865; DzU Nr 49, poz. 464; DzU Nr 113, poz. 954; DzU Nr 50, poz. 360), Ustawa o wprowadzeniu ustawy – Prawo Ochrony Środowiska, ustawy o odpadach oraz zmianie niektórych ustaw z dnia 10 marca 2006 r. (DzU 2006 Nr 63, poz. 441), Ustawa o Odpadach z dnia 27 kwietnia 2001 r. (DzU Nr 62, poz. 628) wraz z późniejszymi zmianami (DzU Nr 7, poz. 78; DzU Nr 116, poz. 1208; DzU Nr 175, poz. 1458; DzU Nr 63, poz. 441) oraz Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz

standardów jakości ziemi z dnia 9 września 2002 r. (DzU 02.165.1359 z dnia 4 października 2002 r.). Praktyka jednak wykazuje, że im więcej obowiązuje regulacji prawnych, tym więcej jest niejasności i rozbieżności interpretacyjnych. Problemy pojawiają się zarówno przed władającymi terenami zdegradowanymi, którzy są zobligowani do ich rekultywacji, jak i organami wydającymi decyzje, a także firmami prowadzącymi prace rekultywacyjne. W związku z tym w podejmowanych decyzjach o zakresie rekultywacji zwykle nakazuje się jej prowadzenie aż do osiągnięcia standardów czystości gruntów zgodnych z przeznaczeniem terenu zapisanym w miejscowym planie zagospodarowania przestrzennego. Podejmując taką decyzję, starosta nie wnika w jej skutki ekonomiczne. Najczęściej nie posiada też wystarczającej wiedzy o przyrodniczych skutkach występowania zanieczyszczenia. Na podstawie Art. 103 POŚ (DzU Nr 100, poz. 1085) ma jednak prawo do wydania takiej decyzji.

Znane są takie obiekty, w obrębie których strefa zanieczyszczonych gruntów ma szerokość 100 – 200 metrów, długość przekracza 1 kilometr, a miąższość warstwy zanieczyszczonej wynosi 4 – 6 metrów, przy czym zalega ona na głębokości kilkunastu metrów. W takim przypadku trudno nawet liczyć koszty całkowitej rekultywacji, gdyż są one niewyobrażalne, a z technicznego punktu widzenia pełna rekultywacja, zgodna z zapisami POŚ, jest praktycznie niemożliwa do przeprowadzenia. W takiej sytuacji możliwe jest zastosowanie rekultywacji ograniczonej jako rozwiązania kompromisowego, bardziej racjonalnego z ekonomicznego punktu widzenia i zgodnego z obowiązującym ustawodawstwem. Daje do tego podstawę cytowana we wstępie tzw. Ustawa wprowadzająca, której artykuł 13 brzmi następująco: „Jeżeli podmiot obowiązany do rekultywacji zanieczyszczenia gleby lub ziemi wykaże, że zanieczyszczenie nastąpiło przed dniem 1 września 1980 roku, rekultywacja może być ograniczona do przeprowadzenia działań, które wykluczają:

- zagrożenie życia lub zdrowia ludzi bądź powstanie innych szkód,
- możliwości rozprzestrzeniania się zanieczyszczenia;

w tym przypadku przepisów art. 103 ust. 2 Prawa Ochrony Środowiska nie stosuje się”.

W takiej sytuacji nie muszą być spełnione wymogi Rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi z dnia 9 września 2002 r. (DzU 02.165.1359 z dn. 4 października 2002 r.).

W Polsce bardzo wiele instalacji przemysłowych, które spowodowały zanieczyszczenia środowiska gruntowo – wodnego, funkcjonowało długo przed 1980 rokiem i przepis ten winien być stosowany powszechnie (Wołkowicz, 2005). Niemniej jednak takie podejście do

sprawy nie rozwiązuje zaistniałego problemu. Zasadne jest więc stałe poszukiwanie jak najbardziej efektywnych metod usuwania, unieszkodliwiania zanieczyszczeń (w tym ropopochodnych) ze środowiska.

Wysoki stopień akceptacji społecznej mają metody biotechnologiczne, wykorzystujące zarówno rośliny, jak również różnego rodzaju mikroorganizmy glebowe. Prawidłowy rozwój roślin na terenach zanieczyszczonych wymaga wytworzenia przez nie odpowiednich mechanizmów obronnych i ochronnych, w których specyficzną rolę odgrywają grzyby mikoryzowe. Współzależność między roślinami i grzybami jest bardzo istotna w procesach fitoremediacji gruntów. Ze względu na łatwe wdrożenie i stosunkowo niskie nakłady fitoremediacja stanowi atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnych metod rekultywacji zanieczyszczonych gruntów. Przed zastosowaniem wybranej metody oczyszczania konieczne jest jednak przeprowadzenie badań laboratoryjnych potwierdzających słuszność jej wyboru. Pozwala to uniknąć ewentualnych błędów i nieprzewidzianych kosztów.

Problem likwidacji zanieczyszczeń naftowych ze środowiska wodno-gruntowego był do tej pory przedmiotem wielu analiz naukowych, jednakże są one trudne do interpretacji ze względu na wielką złożoność interakcji zachodzących w tym środowisku. Czasem koszty usuwania zanieczyszczeń są bardzo wysokie, np. tereny byłych poligonów armii radzieckiej w Polsce zanieczyszczone substancjami ropopochodnymi stanowią zaledwie 0,7% ogółu terenów, ale koszt ich rekultywacji pochłania 69% całkowitych kosztów sanacji gruntów.

Świadomość problemu spowodowała rozwój wielu metod i technik, w tym biotechnologicznych, mających na celu usunięcie produktów naftowych. Przekonanie o tym, że procesy biotechnologiczne są skutecznymi, tanimi i ekologicznie przyjaznymi sposobami ochrony środowiska, jest coraz powszechniejsze na świecie. Wyrazem tego jest szereg projektów narodowych i międzynarodowych, wśród których przeszło połowa jest związana z jakością wody i bioremediacją gruntów. Metody biologicznego oczyszczania gruntów są jednymi z najbardziej „przyjaznych” dla środowiska przyrodniczego, gdyż wykorzystuje się w nich procesy samoistnie zachodzące w tych ekosystemach. Pomimo dużej liczby opracowań dotyczących monitorowania wycieków produktów naftowych, zastosowania określonych metod oczyszczania wód i sanacji gruntów w zależności od stopnia zanieczyszczenia oraz od przewidywanego sposobu wykorzystania terenu, istnieje jeszcze wiele problemów do rozwiązania i procesów wymagających optymalizacji.

2. CEL, TEZY I ZAKRES PRACY

Celem podjętych badań była ocena roli bakterii autochtonicznych i grzybów mikoryzowych w intensyfikacji procesów fitoremediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi.

Badania efektywności remediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi prowadzono w trzech aspektach:

- samooczyszczania,
- fitoremediacji,
- fitoremediacji wspomaganej biopreparatami.

Wydajność i skuteczność remediacji oceniano na podstawie pomiarów:

- zmian stężenia zanieczyszczeń w glebie,
- zmian ekotoksyczności w stosunku do przedstawicieli producentów, reducentów i konsumentów,
- zmian genotoksyczności.

Tezy pracy:

- Zwiększenie skuteczności oraz szybkości procesu bioremediacji gruntów zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi można osiągnąć dzięki uprawie roślin o rozbudowanych systemach korzeniowych sprzyjających rozwojowi mikroorganizmów ryzosferowych.
- Szczerzenie grzybami mikoryzowymi gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi sprzyja ukorzenieniu roślin oraz ich wzrostowi, jak również stymuluje rozwój i aktywność mikroorganizmów ryzosferowych.
- Dla rzetelności oceny jakości gruntów poddawanych oczyszczaniu z substancji ropopochodnych – oprócz analiz fizykochemicznych – wskazane są badania ekotoksykologiczne uwzględniające wpływ zanieczyszczeń oraz ich metabolitów na organizmy żywe.

Zakres pracy obejmował:

- analizę zanieczyszczeń w wybranych próbkach gleb i ocenę ich ekotoksyczności,
- izolację z gruntów zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi aktywnych szczepów mikroorganizmów degradujących węglowodory,

- izolację żywych spor grzybów mikoryzowych z gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi,
- porównanie efektywności wspomagania procesów fitoremediacji przez dodatek preparatów bakteryjnych i grzybowych.

3. ZANIECZYSZCZENIE GRUNTU SUBSTANCJAMI ROPOPOCHODNYMI - PRZEGLĄD LITERATURY

3.1. Charakterystyka zanieczyszczeń ropopochodnych

3.1.1. Ropa naftowa i produkty naftowe

Ropa naftowa znana jest już od zamierzchłych czasów jako olej wydzielający się samoczynnie z wnętrza ziemi. Starożytni Egipcjanie stosowali produkty ropy naftowej do balsamowania zwłok oraz do oświetlania pomieszczeń. Fenicjanie uszczelniali asfaltem statki, zaś Herodot w roku 450 p.n.e. wspomina o źródłach ropy naftowej znajdujących się w Persji. W chińskich kronikach z okresu 200 lat p.n.e. jest już mowa o kopalniach ropy naftowej. W późniejszych wiekach stosowano ropę naftową w celach leczniczych oraz jako środek zmniejszający tarcie (Gierak, 1995).

Ropa naftowa to mieszanina związków o zróżnicowanej budowie. Jest ruchliwą, oleistą cieczą o charakterystycznym zapachu i barwie od bursztynowej, przez ciemnozieloną do prawie czarnej. W grupie paliw, po gazie ziemnym, zawiera najwięcej wodoru: $9,9 \div 14,6\%$ masowych. Zawartość węgla pierwiastkowego w ropach naftowych waha się w granicach $82,4 \div 87,0\%$ masowych (Speight, 1991). Z fizykochemicznego punktu widzenia ropa naftowa jest roztworem substancji polarnych (związki heteroorganiczne) w niepolarnej mieszaninie węglowodorów. Materiałem wyjściowym, z którego powstały węglowodory w okresie prekambryjskim, były archeobakterie, sinice, pierwsze grzyby, pierścienice i jamochłony (Surygała, 2000). Charakter ropy naftowej oraz ocenę jej przydatności technologicznej warunkuje skład frakcyjny (odzwierciedlony przez zakres temperatur wrzenia i przebieg krzywej destylacji) oraz skład grupowy (udział głównych grup związków chemicznych). Głównymi składnikami ropy naftowej są łańcuchowe węglowodory alifatyczne (parafinowe) i pierścieniowe węglowodory alifatyczne (cykloparafinowe – inaczej naftenowe), które stanowią w sumie $27 \div 72\%$, a także węglowodory aromatyczne ($6 \div 14\%$) oraz cykloalkany ($22 \div 67\%$) (Dylewski, 1997). Węglowodory olefinowe w ropie naftowej praktycznie nie występują. Oprócz węglowodorów w ropie naftowej występują związki heteroorganiczne łańcuchowe i pierścieniowe, obejmujące połączenia zawierające siarkę (merkaptany, siarkowodór, siarczki, tiofeny itp.), azot (pirydynę, chinolinę, benzopiren, karbazol, piren i in.), tlen (kwasy naftenowe, fenole), jak również związki zawierające dwa lub trzy heteroatomy (Kajdas, 1979). Nieorganiczne składniki ropy naftowej to przede wszystkim

metale występujące w postaci soli kwasów organicznych i nieorganicznych oraz związków kompleksowych. Główną grupę niewęglowodorowych składników ropy naftowej stanowią związki żywiczny-asfaltenowe, występujące na ogół w ilościach do 25% masowych, ale zdarza się, że ich zawartość w ropie naftowej wynosi nawet 50% masowych (Dylewski, 1997).

Ropa naftowa jest cennym surowcem, z którego uzyskuje się wiele niezbędnych produktów. Niektóre z nich są klasyfikowane przez Główny Inspektorat Ochrony Środowiska jako substancje niebezpieczne, stwarzające nadzwyczajne zagrożenie dla środowiska (Surygała, 2000). Produkty otrzymane z ropy naftowej różnią się między sobą właściwościami fizycznymi i chemicznymi, toksycznością, zawartością dodatków uszlachetniających oraz odmiennym oddziaływaniem na środowisko przyrodnicze. Z tego względu produkty naftowe zostały podzielone na cztery klasy, w obrębie których wyróżniono grupy i rodzaje (Surygała, 2000):

- paliwa
 - paliwa benzynowe,
 - oleje napędowe,
 - paliwa lotnicze,
 - oleje opałowe,
- oleje smarowe,
- smary plastyczne,
- przetwory naftowe do użytku przemysłowego i domowego
 - rozpuszczalniki,
 - woski naftowe,
 - asfalty naftowe,
 - przetwory naftowe do oświetlenia,
 - oleje o różnym przeznaczeniu,
 - inne przetwory naftowe.

3.1.2. Źródła zanieczyszczenia środowiska produktami naftowymi

Ropa naftowa użytkowana jest przeważnie w formie przetworzonych, oczyszczonych i uszlachetnionych produktów, głównie paliw (Surygała, 2000). Otrzymywanie produktów handlowych wymaga wielu operacji technologicznych obejmujących m. in. procesy przeróbki zachowawczej, konwersji produktów pierwotnych, ulepszenia produktów, ich oczyszczania oraz komponowania (Ulmann, 1991; Molenda, 1997; Surygała, 2000). Wymagania

jakościowe stawiane produktom naftowym ciągle rosną, co wiąże się z koniecznością wprowadzania bardziej zaawansowanych procesów technologicznych, dodatków uszlachetniających itp. W związku z powyższym wzrasta zagrożenie zwiększoną emisją do środowiska przetwarzanego materiału, jak również produktów pośrednich powstających podczas jego produkcji (Surygała, 2000). Istnieje wiele źródeł stwarzających ryzyko przedostania się do środowiska glebowego substancji ropopochodnych. Są to głównie rafinerie, bazy paliwowe, stacje obsługi pojazdów, wiele źródeł na terenach portowych i lotniczych, rurociągi przesyłowe, bazy wojskowe i magazynowe, zakłady przemysłowe, szyby wiertnicze itp. (Gierak, 1995). Według danych światowych szacuje się, iż w wyniku przypadkowych zdarzeń do środowiska przyrodniczego trafia 0,1 ÷ 0,25% wszystkich zużywanych produktów naftowych, co daje ok. 9 mln ton w ciągu roku (Surygała, 2000). Dokładne ilości przedostających się do środowiska produktów ropopochodnych nie są znane, gdyż tylko „megawycieki” są rejestrowane i bilansowane, a tysiące małych wycieków, niemających świadków i niepowodujących lokalnych uszkodzeń ekosystemu, są wręcz ukrywane (Surygała, 2000). Z danych GIOŚ wynika, że zanieczyszczenie gruntów produktami ropopochodnymi w Polsce udokumentowano na obszarze ok. 406 ha, a łączna objętość tych gruntów wynosi ok. 18,43 mln m³ (Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, 1994).

3.2. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na właściwości środowiska gruntowego

3.2.1. Wpływ skażenia gleby produktami naftowymi na jej właściwości fizykochemiczne

Właściwości fizykochemiczne substancji ropopochodnych determinują charakter i intensywność ich oddziaływań z gruntami. Rozpatrując odporność gleb na zanieczyszczenia węglowodorami należy uwzględnić dwie grupy zagadnień:

- odporność gruntów na migrację tych zanieczyszczeń,
- odporność ekosystemu glebowego na obecność zanieczyszczeń naftopochodnych.

Najbardziej narażone na intensywną penetrację zanieczyszczeń ropopochodnych są gleby piaskowe, przepuszczalne i suche. Gleby te jednak wyjątkowo szybko ulegają procesowi samooczyszczania, gdyż nie sorbują silnie węglowodorów. W glebach mineralnych wytworzonych z glin i ilów, a także w glebach torfowych silna sorpcja węglowodorów przez

koloidy glebowe i mniejsza porowatość utrudniają szybki rozkład mikrobiologiczny zanieczyszczeń (Olańczuk-Neyman i in., 1994).

Niepolarne cząsteczki węglowodorów wiązane są na powierzchni minerałów ilastych siłami Van Der Waalsa. Nie wchodzą w przestrzenie międzypakietowe, ponieważ nie są w stanie przewyciężyć sił jonowo-elektrostatycznych łączących pakiety ani też wyprzeć zaadsorbowanej wody. Niska wartość stałej dielektrycznej węglowodorów powoduje, że w środowisku cieczy ropopochodnych następuje zmniejszenie zarówno grubości podwójnej warstwy dyfuzyjnej wokół cząsteczki iłowej, jak i spadek sił wzajemnego oddziaływania pomiędzy cząstkami gruntu. Według Kaya i Fang (2000) redukcja sił odpychania jest większa niż sił przyciągania, co wywołuje flokulację cząstek iłowych i tworzenie się agregatów. W wyniku zmniejszenia sił oddziaływań pomiędzy cząstkami gruntu kohezyjne nabierają cech gruntów drobnoziarnistych niespoistych. Korzeniowska-Rejmer (2001) stwierdziła, że dodatek substancji ropopochodnych do piasków gliniastych, pyłów i glin pylastych powodował istotne zmiany w rozkładzie uziarnienia tych gruntów. W porównaniu z próbkami kontrolnymi odnotowano spadek zawartości frakcji piaskowej i iłowej o ok. 10 ÷ 15%, a wzrost udziału cząstek pyłowych. Inni badacze (Izdebska-Mucha, 2003) wykazali, że w wyniku nasycenia podłoża węglowodorami o gęstości mniejszej niż woda następuje adsorpcja cząsteczek węglowodorów na szkielecie mineralnym gruntu, wskutek czego maleje gęstość objętościowa gruntu (ζ) i gęstość właściwa szkieletu gruntowego (ζ_s). Prowadzi to do spadku spójności gruntu (c). W gruntach zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi zmniejsza się również granica płynności (w_L) (Richards, 1979; Izdebska-Mucha, 2003). Substancja organiczna w glebie, a zwłaszcza jej najaktywniejsza część – próchnica, ma bardzo dużą pojemność sorpcyjną. W odróżnieniu od koloidów mineralnych koloidy organiczne sorbują nie tylko związki polarne, ale także substancje niepolarne, do których zaliczamy węglowodory. Niektóre frakcje próchnicy rozpuszczają się w węglowodorach. Pogarsza to strukturę poziomów próchnicznych, gdyż część gruzełek rozpada się, co z kolei prowadzi do zmniejszenia ich natlenienia. Z drugiej strony, znaczna część zanieczyszczeń naftopochodnych przy udziale mikroorganizmów wchodzi w skład kwasów huminowych (próchnicznych), zwiększając ich zawartość w glebie.

Związki ropopochodne z reguły alkalizują gleby. Może to być związane głównie z procesami redukcji wielu związków w glebie (Olańczuk-Neyman i in., 1994). Poziomy podpróchnicze gleby przybierały odcień szarozielony, co świadczyło o zredukowaniu związków żelaza. Równocześnie z tą reakcją następują zmiany polegające na redukcji związków manganu, azotu, siarki i węgla. Ich skutkiem jest pogorszenie się warunków

wzrostu i rozwoju roślin oraz silne zmniejszenie zdolności gleby do mikrobiologicznego samooczyszczenia się z węglowodorów. W profilu glebowym pogarszają się warunki pionowej migracji powietrza i wody w obu kierunkach z powodu wytrącania się koloidalnych wodorotlenków żelaza na granicy faz - kontaktu warstwy zredukowanej z tlenem, co powoduje zatykanie się porów glebowych (Surygała, 2000). Zmiany parametrów fizykochemicznych pociągają za sobą zmiany w ilości, jakości i aktywności mikroorganizmów zasiedlających glebę.

3.2.2. Wpływ skażenia gleby produktami naftowymi na mikroorganizmy glebowe

Liczne populacje drobnoustrojów w glebie żyją w tzw. stanie równowagi niestąłej, co oznacza, że rozwój każdej jednostki danej zbiorowości jest równoważony rozwojem innej z nią sąsiadującej. Każda zmiana w układzie czynników ekologicznych, zwłaszcza w dopływie energii, powoduje zakłócenie tej równowagi. Zmiany składu fizykochemicznego pociągają za sobą zmiany w składzie biologicznym. Przede wszystkim następuje masowe obumieranie organizmów zwierzęcych zasiedlających powierzchniowe warstwy gleby i gwałtowny wzrost azotowej substancji organicznej. Zmniejsza się liczba gatunków, zwłaszcza tlenowych - giną bakterie nityfikacyjne albo ich liczba drastycznie się zmniejsza, maleje liczba bakterii wiążących azot atmosferyczny w warunkach tlenowych, a także liczba bakterii utleniających błonnik oraz liczba grzybów. Rozwijają się natomiast formy asymilujące węglowodory i ich elementy. Nagromadzenie dużych ilości organicznych substancji azotowych w glebie skażonej ropą naftową pociąga za sobą wzrost liczebności bakterii amonifikacyjnych, co przy braku lub ograniczonej liczbie bakterii nityfikacyjnych, powoduje wzrost zawartości amoniaku. Równocześnie następuje wzrost liczby bakterii redukujących azotany (V) do azotanów (III) lub azotu cząsteczkowego, bakterii fermentujących błonnik i redukujących siarczany. Wielu autorów podkreśla fakt, że w glebach świeżo zanieczyszczonych produktami naftowymi gwałtownie rośnie liczba mikroorganizmów zdolnych do rozkładu tego typu zanieczyszczeń (Joergensen, 1995; Brohon, 2001). Zbyt duża koncentracja zanieczyszczeń naftopochodnych w glebie prowadzi początkowo do wzrostu, a następnie do gwałtownego zmniejszenia aktywności mikroflory (Przystaś i in., 2000; 1999; Surygała, 2000; Małachowska-Jutcz i in., 2001b). Niektórzy autorzy podczas przeprowadzanych badań zaobserwowali stymulację aktywności dehydrogenaz, ureaz oraz fosfataz po wprowadzeniu do gleby węglowodorów (Frankenberger i Johanson, 1982; Małachowska-Jutcz, 1999; Traser-Cepeda i in., 2000; Caravaca i Roldan, 2003).

Przy niedoborze pierwiastków biogenych a nadmiarze węgla mikroorganizmy degradujące węglowodory konkurują o sole mineralne z roślinami. Według Bieszkiewicz i in. górna granica efektywnej mineralizacji zanieczyszczeń olejowych wynosi 1500 mg/dm^3 (Surygała, 2000).

Zakłócenie równowagi biologicznej gleb prowadzi do ostrych deficytów tlenu oraz przyswajalnych dla roślin form azotu i fosforu, przy jednoczesnym nadmiarze źródeł węgla. To ostatnie ogranicza w znacznej mierze możliwość rozwoju i aktywności biochemicznej drobnoustrojów utleniających węglowodory ropy naftowej, a więc i ich rozkład mikrobiologiczny w glebie (Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska, 1994; Surygała, 2000). Szkodliwość oddziaływania produktów naftowych wynika nie tylko z ich bezpośredniej toksyczności, ale także ze zmiany właściwości fizykochemicznych środowiska gruntowego, pociągających za sobą m. in. zakłócenie relacji wodnych panujących w glebie, co prowadzi do ograniczenia rozwoju roślinności na terenach skażonych. Zdaniem Łackiej-Pilaszek (1996) wschody roślin zbożowych i motylkowych są opóźnione, a następne ich fazy rozwojowe są przyspieszone. Notuje się również zmiany w budowie anatomicznej korzeni i części nadziemnych, m.in. splazmolizowanie i deformację komórek korzeni pierwotnych i wtórnych, a w tkance przewodzącej - zaczopowanie naczyń ksylemu. Zahamowanie wzrostu korzeni powoduje obniżenie zdolności pobierania wody i soli mineralnych przez roślinę. Nadziemne części roślin wykazują objawy chlorozy. Często charakteryzują się występowaniem drobnych liści o małej powierzchni asymilacyjnej, ich łodygi są krótkie, cienkie i słabo rozwinięte. Merkl i in. (2005) zauważyli, że w glebach zanieczyszczonych niewielkimi ilościami produktów naftowych (5%) długość korzeni testowanych roślin była mniejsza niż w glebie kontrolnej, jednak powierzchnia ryzosfery, średnica korzeni i ich objętość były większe w porównaniu z roślinami z gleby czystej. Wyjaśnienie tego zjawiska podaje Benough (1990). Twierdzi on, że w przypadku zanieczyszczenia gleb produktami naftowymi zmienia się ich przepuszczalność oraz wilgotność. Wzrost średnicy korzeni roślin rosnących w glebach skażonych ropopochodnymi przy jednoczesnej redukcji ich długości jest morfologiczną adaptacją roślin do „stresu wodnego”. Ponadto, temperatura gleb zanieczyszczonych tymi substancjami jest wyższa niż gleb niezanieczyszczonych, co również wpływa na wzrost i rozwój korzeni roślin. Bowen (1991) podaje, że maksymalna temperatura dla prawidłowego wzrostu korzeni roślin wynosi 40°C , podczas gdy w powierzchniowej warstwie (do 15 cm) gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi oraz gleb stref tropikalnych temperatury znacznie przekraczają tę wartość.

3.3. Czynniki wpływające na szybkość rozkładu substancji ropopochodnych w gruncie

Czynniki decydujące o szybkości rozkładu produktów naftowych w gruncie (glebie) można podzielić na trzy grupy:

- właściwości fizykochemiczne zanieczyszczeń,
- czynniki biologiczne,
- czynniki środowiskowe.

3.3.1. Właściwości fizykochemiczne zanieczyszczeń

Substancje ropopochodne różnią się między sobą szeregiem właściwości fizykochemicznych, m. in. lotnością, rozpuszczalnością w wodzie, stopniem skomplikowania budowy, długością łańcuchów węglowych, obecnością pierścieni aromatycznych, stopniem polimeryzacji, obecnością bądź brakiem podstawników (grupy nitrowe, aminowe, halogeny, sulfonowe itp.). Obecność tlenu w cząsteczce jest czynnikiem zwiększającym podatność substancji na biodegradację, dlatego też aldehydy oraz kwasy tłuszczowe należą do związków łatwo biodegradowalnych.

W przypadku węglowodorów alifatycznych o podatności na rozkład biologiczny w dużej mierze decyduje długość łańcucha. Alkany o długości łańcucha od C_{10} do C_{24} są substancjami najchętniej i najczęściej wykorzystywanymi przez bakterie (Fritsche i Hofrichte, 2004). Alkany krótkołańcuchowe, zawierające do 9 atomów węgla w łańcuchu, są toksyczne dla wielu mikroorganizmów, poza tym charakteryzują się małą rozpuszczalnością w wodzie. Usuwane są ze środowiska gruntowego głównie w wyniku procesów abiotycznych. Węglowodory posiadające w cząsteczce więcej niż 30 atomów węgla należą do tzw. trwałych zanieczyszczeń (Surygała, 2000). Alkany gazowe ($C_1 \div C_4$) są rozkładane tylko przez niektóre grupy mikroorganizmów (Kołwzan, 2005). Warunkiem uruchomienia procesu biodegradacji węglowodorów łańcuchowych jest jednoczesna obecność alkanu, tlenu, enzymu (mono- lub di- oksygenazy) oraz koenzymu NADH (Brock i Madigan, 1988).

Węglowodory rozgałęzione (izoalkany) są mniej podatne na proces biologicznego rozkładu. Biodegradacja przebiega w obrębie każdego z terminalnych łańcuchów. Wraz ze wzrostem ilości rozgałęzień spada tempo procesu biodegradacji, co jest spowodowane m.in. hamowaniem procesu przez produkty utleniania n-alkanów (Fritsche i Hofrichte, 2004).

Cykloalkany są raczej odporne na rozkład mikrobiologiczny. Brak rozgałęzień w cząsteczce oraz grup metylowych nie sprzyja rozkładowi biologicznemu (Fritsche i Hofrichte,

2004). Znanych jest zaledwie kilka gatunków mikroorganizmów zdolnych do wykorzystywania cykloalkanów jako jedyne źródła węgla (Fritsche i Hofrichte, 2004). Dlatego też związki te są wykorzystywane jako substrat pokarmowy jedynie w wyjątkowych przypadkach, zwykle w procesach kometabolizmu (Surygała, 2000).

Węglowodory monoaromatyczne charakteryzują się wysoką toksycznością, jednak –gdy występują w niskich stężeniach – są szybko metabolizowane przez wiele grup mikroorganizmów (Surygała, 2000).

Węglowodory wielopierścieniowe, zawierające w cząsteczce od 2 do 4 pierścieni benzenowych, są nieco mniej toksyczne i ulegają biodegradacji z szybkością odwrotnie proporcjonalną do stopnia kondensacji pierścienia. Węglowodory o pięciu lub większej liczbie skondensowanych pierścieni należą do trudno rozkładalnych biologicznie i w związku z tym są bardzo wolno usuwane ze środowiska, a pierwsze etapy ich rozkładu (o ile taki zachodzi) przebiegają zawsze w procesie kometabolizmu (Surygała, 2000).

Asfalteny i żywice są grupą różnorodnych związków stosunkowo słabo poznanych, charakteryzujących się dużymi masami cząsteczkowymi oraz małą lotnością i rozpuszczalnością. Dzięki specyficznej strukturze chemicznej związki te odznaczają się bardzo dużą trwałością w środowisku (Surygała, 2000).

3.3.2. Czynniki biologiczne

Proces degradacji węglowodorów ropopochodnych w gruncie przebiega głównie przy współdziałaniu mikroorganizmów glebowych. Zespół mikroorganizmów glebowych składa się z przedstawicieli przeróżnych gatunków bakterii heterotroficznych, grzybów, promieniowców oraz pierwotniaków. Stosunki ilościowe tych organizmów układają się zmiennie, w zależności od czynników środowiskowych (Providenti i in., 1993; Stotzky, 1997, Yu i in., 2005). Drobnoustroje gromadzą się przede wszystkim w powierzchniowej warstwie gleby oraz wokół korzeni roślin. Tam bowiem znajduje się najwięcej tlenu i substancji odżywczych (Sorensen, 1997; Yang i Crowley, 2000; Marschner i in., 2004). Według Torsvik i in. (1994) w masie 1 g żyznej gleby może znajdować się około 13 000 różnych gatunków mikroorganizmów. Oczywiście, ich liczba jest różna: od 1 komórki/1 g gleby w przypadku niektórych rzadszych gatunków do 10^8 komórek innych. Spośród tak wielkiej ilości mikroorganizmów zaledwie $0,1 \div 0,3\%$ to organizmy zdolne do rozkładu ksenobiotyków. W gruntach zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi liczba organizmów zdolnych do ich rozkładu może zwiększyć się nawet kilkaset razy. Dzieje się tak dzięki zachodzącym tu

zjawiskom adaptacji i selekcji (Pries i in., 1994; Thompson i in., 1999). Substancje ropopochodne zanieczyszczające glebę mogą być rozkładane przez bakterie, grzyby i promieniowce zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Stwierdzono, że około 100 gatunków mikroorganizmów reprezentujących 30 rodzajów posiada zdolność rozkładu węglowodorów (Surygała, 2000). Wśród bakterii najczęściej wymieniane są: *Acinetobacter* (Wild i Jones, 1993; Marin i in., 1996; Chaineau i in., 1999; Vaneechoutte i in., 1999; Lamb i in., 2000), *Aeromonas* (Cerniglia, 1981; Rahman i in., 2002; Samanta i in., 2002), *Achromobacter* (Cerniglia, 1981; Chaineau i in., 1999), *Alcaligenes* (Cerniglia, 1981; Derecova i in., 1996), *Arthrobacter* (Chaineau i in., 1999), *Bacillus* (Chaineau i in., 1999; Marquez-Rocha i in., 2001; Rahman i in., 2002), *Brevibacterium* (Wild i Jones, 1993; Chaineau i in., 1999), *Corynebacterium* (Wild i Jones, 1993; Chaineau i in., 1999; Samanta, 2001), *Flavobacterium* (Cerniglia, 1981; Chaineau i in., 1999; Rahman i in., 2002), *Methylococcus* (Śliwka i in., 2000), *Micrococcus* (Holland, 1995; Rahman i in., 2002), *Mycobacterium* (Stingley i in., 2004; MacLeod i Daugulis, 2005), *Pseudomonas* (Chaineau i in., 1999; Marquez-Rocha i in., 2001; Samanta, 2001; Rahman i in., 2002), *Rhizobium* (Suominen i in., 2000; Chen i in., 2004), *Rhodococcus* (Warhurst i Fewson, 1994; Chaineau i in., 1999), *Spirillum* (Cerniglia, 1981), *Vibrio* (Cerniglia, 1981; Samanta, 2001). Wśród promieniowców: *Actinomyces* (Cerniglia, 1981; Wild i Jones, 1993; Chaineau i in., 1999) i *Nocardia* (Chaineau i in., 1999; Samanta, 2001), a wśród grzybów: *Aspergillus* (Cerniglia, 1981; Wild i Jones, 1993; Chaineau i in., 1999), *Candida* (Ijah, 1998; Huaa, 2003; Chaillan i in., 2004), *Cladosporium* (Samanta, 2001; Giraud i in., 2004; Potin i in., 2004), *Penicillium* (Wild i Jones, 1993; Chaineau i in., 1999; Potin i in., 2004) oraz *Trichoderma* (Chaineau i in., 1999; Giraud i in., 2001; Potin i in., 2004). Częstość występowania wymienionych rodzajów wśród grzybów glebowych waha się w zakresie 0,13 ÷ 50%, a wśród bakterii glebowych - 6 ÷ 82% w stosunku do ogólnej liczby mikroorganizmów (Surygała, 2000).

Wiele węglowodorów ulega biodegradacji dopiero po okresie adaptacji drobnoustrojów, w którym wytwarzają one enzymy indukcyjne. Na proces ten ma wpływ m.in. stężenie węglowodorów jako substratów pokarmowych; zbyt niskie ogranicza lub wręcz uniemożliwia produkcję tych enzymów, a zbyt wysokie działa toksycznie (Karl, 1992; Olivera i in., 1997; Lindstrom i in., 1999). Olivera i in. (1997) izolowali szczepy aktywnych mikroorganizmów zarówno z gleb zanieczyszczonych węglowodorami, jak i czystych, a następnie wykorzystywali je do rozkładu n-alkanów. Na podstawie badań stwierdzili, że po 48 godzinach inkubacji stężenia węglowodorów zarówno w próbkach z dodatkiem szczepów adaptowanych jak i nie-adaptowanych były niemalże identyczne. Znaczące różnice w stężeniach

analizowanych węglowodorów pojawiły się po 120 godzinach inkubacji. W próbach zaszczipionych mikroorganizmami adaptowanymi średni stopień rozkładu n-alkanów wynosił $28 \pm 42\%$, natomiast w przypadku mikroorganizmów nieadaptowanych po 240 godzinach inkubacji stopień rozkładu węglowodorów wynosił zaledwie $5\pm 10\%$ (Olivera i in., 1997). Maliszewska-Kordybach (1991) przypuszcza, iż zwiększenie efektywności rozkładu węglowodorów w glebie zanieczyszczonej ściekami rafineryjnymi nie było spowodowane wcześniejszą adaptacją mikroorganizmów glebowych, ale wzrostem ich liczby oraz większą dostępnością substratu węglowego w glebie zawierającej substancje ropopochodne.

O szybkości przebiegu procesu rozkładu węglowodorów decyduje również aktywność biochemiczna mikroorganizmów degradujących węglowodory. Reakcje rozkładu węglowodorów zachodzą sekwencyjnie, z udziałem wielu gatunków mikroorganizmów synergistycznie zależnych od siebie. Często zdarza się, że pojedynczy testowany szczep wykazuje małe zdolności degradacyjne, natomiast w obecności innych mikroorganizmów jego aktywność wzrasta (Łebkowska, 1996; Guo i in., 2005). Bakterie potrafią bezpośrednio wykorzystać produkty ropopochodne jako jedyne źródło węgla, natomiast rozkład węglowodorów przez grzyby następuje prawie wyłącznie w wyniku procesów kometabolizmu (Leahy i Colwell, 1990; Bennett i in., 1996; Komukai-Nakamura i in., 1996; Zadrazil i Martens, 1996; Richard i Vogel, 1999; Juhasz i Naidu, 2000; Kasai i in. 2005, Kulik i in., 2006).

Duże znaczenie w przebiegu biodegradacji węglowodorów ma rozpowszechnienie w środowisku glebowym i wodnym różnych drapieżników i pasożytów bakterii. Przyczyniają się one do zmniejszenia liczebności bakterii i ich zdolności do odnawiania populacji. Obecność naturalnych wrogów często sprawia, że mikroorganizmy nie są w stanie osiągnąć liczebności zapewniającej uzyskanie dużej efektywności procesu biodegradacji (Małachowska-Jutcz, 1999; Kołwzan, 2005). Często w praktyce zdarza się, że wprowadzenie do gleby inokulantów w postaci biopreparatów nie przynosi zamierzonych rezultatów. Dzieje się tak dlatego, iż flora autochtoniczna może wydzielać do podłoża substancje uniemożliwiające wzrost mikroflory allochtonicznej. Dlatego też najlepiej pozyskiwać aktywne szczepy mikroorganizmów degradujących substancje ropopochodne ze środowisk, które zamierzamy oczyszczać.

3.3.3. Czynniki środowiskowe

Wilgotność

Zawartość wody w glebie należy do podstawowych czynników decydujących zarówno o rozwoju mikroflory glebowej, jak i o sorpcji organicznych substancji niepolarnych, do których należą produkty naftowe będące mieszaniną różnych węglowodorów (Steinberg i in., 1996; Fine i in., 1997). Na podstawie badań (Maliszewska-Kordybach, 1990; 1993; Zienko, 1996) stwierdzono, że największą trwałość zanieczyszczenia ropopochodne wykazują w glebie powietrznie suchej (1% WHC – maksymalna pojemność wodna). Zwiększenie wilgotności gleby do poziomu 65% WHC wyraźnie intensyfikowało degradację węglowodorów, natomiast dalszy wzrost zawartości wody prowadził do obniżenia szybkości procesu. Z badań Chiou (1989) wynika, że w glebach o niskim poziomie wilgotności sorpcja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) jest silniejsza niż w układach uwodnionych, gdyż w tych warunkach hydrofobowe związki organiczne mogą być sorbowane nie tylko przez materię organiczną gleby, ale i przez minerały ilaste. Równocześnie aktywność drobnoustrojów w glebach pozbawionych wilgoci ulegała znacznemu zahamowaniu. Zwiększenie zawartości wody w glebie prowadziło do zmniejszenia sorpcji węglowodorów przez mineralne frakcje ilaste. Efektem tego był wzrost stężenia węglowodorów w roztworze glebowym, a tym samym zwiększona ich dostępność dla mikroorganizmów glebowych (Maliszewska-Kordybach, 1990). Niemniej jednak należy podkreślić fakt, że zawartość wody w glebie nie jest równoznaczna z jej dostępnością. O dostępności wody decydują siły jej wiązania w roztworze glebowym (Zawadzki, 1999).

Temperatura

Temperatura wpływa na aktywność mikroorganizmów, a tym samym na szybkość mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów (Maliszewska-Kordybach, 1993). Od temperatury zależna jest szybkość wszystkich reakcji chemicznych i biochemicznych (Nedwell, 1999). Temperatura wyższa o kilka stopni od temperatury naturalnych środowisk bytowania mikroorganizmów jest czynnikiem wpływającym zwykle korzystnie na ich wzrost. Należy jednak pamiętać, że pod względem zapotrzebowania na ciepło każdy gatunek ma swoje wymagania (Kunicki-Goldfinger, 1994). Rozkład węglowodorów może przebiegać w bardzo szerokim zakresie temperatur. Według Chiou (1979) sorpcja węglowodorów wzrasta ze wzrostem temperatury. Przeciwnego zdania są Bulman, Tateya oraz Hulscher (Bulman i in., 1985; Tateya i in., 1988; Hulscher i Cornelissen, 1996), którzy stwierdzili, że spadek temperatury gleby powodował zwiększenie efektu sorpcji fizycznej węglowodorów przez

koloidy glebowe oraz zmniejszenie rozpuszczalności i ciśnienia par węglowodorów. W wyniku tego ulatnianie węglowodorów oraz ich dostępność dla mikroorganizmów były bardzo ograniczone. Temperatura wpływała w największym stopniu na trwałość mniej lotnego, silniej sorbowanego, ale stosunkowo dobrze rozpuszczalnego i biorozkładalnego pirenu. Rozkład nielotnego i bardzo słabo rozpuszczalnego w wodzie chryzenu był ograniczony nawet w 25⁰C. Na tej podstawie uznano, że wzrost temperatury o kilka stopni zmniejsza trwałość WWA o małej liczbie pierścieni, natomiast w przypadku WWA zawierających powyżej 5 pierścieni aromatycznych w cząsteczce temperatura nie ma tak istotnego wpływu na szybkość procesu degradacji.

Obecność tlenu

Większość drobnoustrojów rozkładających węglowodory to organizmy tlenowe, wykorzystujące tlen cząsteczkowy w procesie utleniania substratu przez oksygenazy (Cuypers, 2001; Joner i in., 2006). Utlenianie węglowodorów tą drogą może prowadzić do całkowitej mineralizacji, której produktami końcowymi są woda, dwutlenek węgla i energia zmagazynowana w ATP. Swobodna wymiana powietrza pomiędzy środowiskiem wodno-gruntowym a powietrzem atmosferycznym jest czynnikiem wpływającym na szybkość biodegradacji węglowodorów ropopochodnych. Zapotrzebowanie mikroorganizmów na tlen jest znaczne i wynosi około 3 kg O₂/kg utlenianych węglowodorów. Tlen może być pobierany przez mikroorganizmy z wody, jednak jej efektywność jako nośnika tlenu jest ograniczona jego niewielką rozpuszczalnością (ok. 10 g O₂/m³ w temp. 10⁰C). Alternatywnie mogłyby być stosowane takie utleniacze, jak ozon lub nadtlenek wodoru, jednakże w dużych stężeniach działają one bakteriobójczo (Blackburn i Hafker, 1993).

Proces degradacji węglowodorów może zachodzić również w warunkach beztlenowych. Mikroorganizmy wykorzystują tu inne niż tlen akceptory elektronów, którymi mogą być azotany, siarczany lub związki organiczne. Niedobór tych związków w warunkach beztlenowych będzie prowadził do istotnego zmniejszenia tempa i zakresu biodegradacji (Kołwzan, 2005).

Odczyn

Odczyn gleb jest jednym z istotniejszych parametrów wpływającym m.in. na aktywność katalityczną enzymów drobnoustrojów glebowych. Nadmierne stężenie jonów hydroniowych (H₃O⁺) lub wodorotlenowych (OH⁻) hamuje szereg przemian, powodując zakłócenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem a zużywaniem ATP w komórce, a także spadek wydajności produkcji biomasy z jednostki zużytego węgla i energii. W glebach

o odczynie zbliżonym do obojętnego dominują bakterie, zaś w kwaśnym – grzyby (Kunicki-Goldfinger, 2006). Od odczynu uzależniony jest więc skład ilościowy i jakościowy drobnoustrojów gleby. Konsekwencją tego jest powstanie określonych produktów końcowych w procesie rozkładu węglowodorów. Rozkład węglowodorów ropopochodnych przez dominujące w środowisku kwaśnym grzyby może prowadzić do powstania kancerogennych form epoksydowych, podczas gdy w wyniku rozkładu bakteryjnego z reguły węglowodory ulegają pełnej mineralizacji do CO₂ i H₂O (Fritsche i Hofrichte, 2004). Optymalny odczyn, przy którym rozkład węglowodorów zachodzi najintensywniej, waha się w przedziale pH od 6,5 do 7,5. W warunkach tych Nievas i in. (2005) stwierdzili największą aktywność enzymów emulgujących. Dodatek węgla wapnia do gleby zmienia jej właściwości i wpływa na przebieg większości zachodzących w niej procesów, w tym na biodegradację oraz sorpcję węglowodorów. Zmiany odczynu gleby wywołane wapniowaniem oraz sorpcją jonów Ca²⁺ przez grupy hydroksylowe i karboksylowe koloidów organicznych prowadzą do zmian fizycznych właściwości próchnicy glebowej, co może wpływać na zakres sorpcji węglowodorów przez substancje organiczne gleby, a więc i na szybkość ich rozkładu (Maliszewska-Kordybach, 1991; Małachowska-Jutcz, 1999).

Źródła węgla organicznego

Nawożenie organiczne odgrywa dużą rolę w kształtowaniu żyzności gleb oraz w przeciwdziałaniu ich degradacji. Substancje organiczne wprowadzone do gleb wraz z tego typu nawozami mają ogromne znaczenie w procesach sorpcji ksenobiotyków. Wprowadzenie kompostu powoduje wzrost zawartości substancji organicznych, przez co może wzrastać sorpcja (Block i in., 1993; Thorsen i in., 2004). Istotne znaczenie ma tu skład wprowadzanych substancji organicznych. Największą zdolnością sorpcyjną w stosunku do niepolarnych ksenobiotyków charakteryzują się huminy, znacznie mniejszą kwasy huminowe, a najslabszą kwasy fulwowe. Gleba jako całość sorbuje niepolarne związki organiczne około dwa razy efektywniej niż wydzielone z niej kwasy huminowe. Dodatek kompostu do gleby może stymulować rozwój mikroflory glebowej, jednak dostępność innych, łatwiej przyswajalnych źródeł węgla może spowalniać biodegradację węglowodorów (Block i in., 1993). Wprowadzenie do gleby dojrzałego kompostu prekondycjonowanego węglowodorami powoduje znaczne zwiększenie efektu mineralizacji węglowodorów w porównaniu z próbkami gleb bez jego dodatku oraz z dodatkiem prekondycjonowanego kompostu świeżego (Martens, 1982; Kästner i Mahro, 1996). Efekt ten może być związany z ogromną ilością różnych mikroorganizmów zasiedlających kompost, charakteryzujących się

posiadaniem bardzo różnorodnych systemów enzymatycznych umożliwiających degradację zróżnicowanych substancji organicznych. Poza tym dodatek kompostu do gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi poprawia warunki wilgotnościowe, zdolności buforowe oraz strukturę gleb. Jest również źródłem łatwo przyswajalnych substancji odżywczych, dzięki czemu wzrasta aktywność kataboliczna mikroorganizmów.

Stężenie związków biogenych

Do rozwoju mikroorganizmów konieczna jest synteza białek. Nie może ona prawidłowo przebiegać w przypadku braku azotu, fosforu, siarki oraz węgla. Zapotrzebowanie mikroorganizmów na te pierwiastki odpowiada stosunkowi zawartości tych biogenów w ich komórkach (C:N:P = 100:10:1). W glebach skażonych produktami ropopochodnymi zmienia się stosunek między węglem, azotem, fosforem oraz siarką (Małachowska-Jutcz i in., 1997; Ward i in., 2003). Mikroorganizmy nie mogą w pełni korzystać z obfitości energii zawartej w węglowodorach, ponieważ nie mają do dyspozycji wystarczających ilości azotu, fosforu czy też siarki (Małachowska-Jutcz i in., 1997; Janssen i Willigen, 2006). Stąd też konieczne jest wzbogacenie środowisk skażonych produktami ropopochodnymi w te pierwiastki w celu efektywniejszego przebiegu procesu remediacji. Nie bez znaczenia jest przy tym postać wprowadzonych soli (Małachowska-Jutcz, 1999; Kołwzan, 2005). Należy zwrócić uwagę na to, iż dla bakterii dostępny jest jedynie fosfor w formie rozpuszczalnej (najczęściej w postaci PO_4^{3-}), natomiast w badaniach często określa się tzw. sumę fosforu, co może maskować rzeczywisty deficyt tego pierwiastka przy pozornie dobrych wynikach analiz (Surygała, 2000).

Właściwości fizykochemiczne gleb

Zanieczyszczenia ropopochodne trafiające do gruntu mogą w nim występować w trzech formach: w postaci kropli zawieszonych w porach gruntu, jako warstwa przyklejona do wody błonkowej otaczającej cząsteczkę gruntu oraz jako warstwa bezpośrednio przyklejona do cząstki gruntu (Olańczuk-Neyman i in., 1994). Ponieważ grunt jest układem wielofazowym (składającym się z substancji mineralnej, powietrza gruntowego, roztworu gruntowego oraz substancji organicznej), zasadniczy wpływ na szybkość rozprzestrzeniania się oraz na szybkość rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych w tym środowisku będą miały wpływ takie parametry, jak: porowatość, gęstość nasypowa i szkieletowa, skład granulometryczny, powierzchnia właściwa, wodoprzepuszczalność i gazoprzepuszczalność, zawartość wody, temperatura, zawartość substancji organicznej, głębokość do lustra wody, ilość opadów, udział kamieni i skał. Zawartość wody gruntowej oraz ilość opadów wpływają na ilość

węglowodorów przechodzących do fazy rozpuszczonej. Z kolei wyższa temperatura gleby sprzyja zwiększeniu ilości węglowodorów przechodzących do fazy gazowej, jak również ich rozpuszczalności w roztworze glebowym. Maleje przy tym ich lepkość, co powoduje wzrost mobilności fazy ciekłej. Im większa jest głębokość do lustra wód gruntowych, tym większa jest ilość zanieczyszczeń zatrzymywanych w strefie aeracji i lepsza ochrona wód gruntowych przed skażeniem. Obecność substancji organicznej w glebie ma decydujący wpływ na zachowanie substancji ropopochodnych w gruntach. Im więcej substancji organicznych, tym silniejsza jest ich sorpcja i mniejsza mobilność (Surygała, 2000). Grunty drobnoziarniste zatrzymują większe ilości zanieczyszczeń niż grunty gruboziarniste. Przykładowo, koncentracja reszkowa zanieczyszczeń ropopochodnych w żwirach wynosi ok. 3000 mg/kg suchego gruntu, a w drobnym i pylastym piasku jest do 10 razy wyższa (Olańczuk-Neyman i in., 1994). Bardzo duży wpływ na trwałość węglowodorów w glebie ma kwasowość hydrolityczna H_h oraz zawartość frakcji koloidalnej (Maliszewska-Kordybach, 1993). Zawartość frakcji koloidalnej, w skład której wchodzi również substancje organiczne gleby, odzwierciedla sorpcyjne właściwości gleby. Natomiast kwasowość hydrolityczna (H_h) w sposób pośredni charakteryzuje zarówno sorpcyjne właściwości gleb w stosunku do węglowodorów, jak i warunki biodegradacji tych związków. W większości gleb wielkości H_h skorelowane są zarówno z odczynem gleby decydującym o aktywności mikroorganizmów glebowych, jak i z zawartością próchnicy wpływającą na procesy sorpcji. Stwierdzono, że trwałość węglowodorów w glebach wzrasta ze wzrostem kwasowości hydrolitycznej (Maliszewska-Kordybach, 1993; 1995).

Obecność innych substancji toksycznych

W gruntach zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi często spotyka się również inne substancje toksyczne, w tym jony metali ciężkich i pozostałości środków ochrony roślin oraz ich metabolitów. Oprócz DDT (dichlorodifenylotrichloroetan; Boopathy, 2000) wykrywano także TNT (trinitrotoluen), TCE (trichloroetan), PCP (pentachlorofenole), PCBs (polichlorowane bifenyle) itp. (Fritsche i Hofrichte, 2004). Obecność tych substancji w glebie może wpływać na przebieg degradacji węglowodorów, przyczyniając się do ograniczenia stopnia ich rozkładu lub całkowitego zahamowania aktywności enzymów uczestniczących w tym procesie (Boopathy, 2000). Należy jednak pamiętać o tym, że toksyczność ksenobiotyków nie zależy tylko i wyłącznie od ich stężenia w glebie, ale także od ich rozpuszczalności w wodzie, mobilności, biodostępności oraz właściwości fizykochemicznych (Cuypers, 2001; Fernandez i in., 2005).

3.4. Remediacja gruntów skażonych substancjami ropopochodnymi

Silne zanieczyszczenie gleby substancjami ropopochodnymi powoduje daleko idącą degradację szaty roślinnej, aż do całkowitego jej zaniku włącznie (Surygała, 2000). Pierwszym etapem przed rozpoczęciem likwidacji zanieczyszczenia jest dokładne rozpoznanie miejsca, przyczyny, zasięgu skażenia oraz identyfikacji samego skażenia. Dokładność rozpoznania decyduje o wyborze metody remediacji gruntu i sposobie usunięcia/likwidacji zanieczyszczenia (Kościelniak i in., 1994). Znane są różnorodne metody likwidacji zanieczyszczeń produktami ropopochodnymi (Mrozowska, 1999; Clapperton 2000; Turnau i in., 2002).

Termin „remediacja” pochodzi od angielskiego słowa „remedy” i oznacza dosłownie „uzdawianie”. W zależności od stopnia zanieczyszczenia oraz charakteru rekultywowanego środowiska remediacja może odbywać się metodą *in situ* (w miejscu zanieczyszczenia) oraz *ex situ* (metoda ta polega na wydobyciu zanieczyszczonego gruntu lub wody, a następnie przetransportowaniu ich w miejsce docelowe, gdzie będą poddawane procesowi remediacji).

W obrębie metod *in situ* można wyróżnić:

- remediację obejmującą: płukanie gruntu (washing soil), wentylację gruntu (soil venting), metody termiczne (desorpcja gorącą parą wodną, ogrzewanie mikrofalowe) oraz metody wykorzystujące zjawiska elektrokinetyczne;
- bioremediację obejmującą uprawę gleby (landfarming), kompostowanie, wykorzystanie metod z użyciem bioreaktorów.

Do metod *ex situ* zaliczamy:

- remediację obejmującą aktywną wentylację gruntu, iniekcję powietrza, płukanie gruntu, metody ekstrakcji, metody adsorpcyjno-flotacyjne oraz metody termiczne (ogrzewanie, spalanie),
- bioremediację wykorzystującą landfarming, procesy bioekstrakcji, bioremediację stymulowaną wodą, bioremediację stymulowaną powietrzem (Surygała, 2000).

3.4.1. Metody remediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi

3.4.1.1. Metody fizykochemiczne

Obejmują one metody termiczne (ogrzewanie, spalanie), ekstrakcję, przedmuchiwanie gruntu parą wodną lub powietrzem z jednoczesnym odsysaniem, metody wykorzystujące zjawiska elektrokinetyczne (elektroforeza, elektroosmoza, elektroliza).

Metody termiczne zapewniają najwyższą skuteczność usuwania zanieczyszczeń z gruntu (99,9%). Procesy niskotemperaturowe ($260 \div 360^{\circ}\text{C}$) polegają na odparowaniu zanieczyszczeń ze złoża i ich usunięciu metodą adsorpcyjną. Spośród procesów wysokotemperaturowych najczęściej stosowana jest termiczna likwidacja zanieczyszczeń w piecach obrotowych lub urządzeniach ze złożem fluidalnym w temp. 1100°C . Metody termiczne *in situ*, jak odkażanie mikrofalowe oraz witrifikacja (zeszklenie zanieczyszczonej gleby za pomocą wytworzonej temperatury $1600 \div 2000^{\circ}\text{C}$) znajdują się obecnie w fazie eksperymentalnej. Wadą tych metod są wysokie koszty oraz utrata aktywności biologicznej gleb (Lee i in., 1998; Greinert i Greinert, 1999).

Ekstrakcja (mycie gruntu) umożliwia uwolnienie gruntu zarówno od zanieczyszczeń organicznych, jak i nieorganicznych (metale ciężkie). W skład roztworów myjących mogą wchodzić kwasy i zasady nieorganiczne, związki kompleksujące, jak również środki powierzchniowo czynne. Proces ten obejmuje mieszanie zanieczyszczonej gleby z roztworem myjącym, oddzielenie oczyszczonej gleby od roztworu, regenerację roztworu myjącego i utylizację osadu zawierającego usunięte zanieczyszczenia i cząstki gruntu. Stosowanie tych metod jest zalecane w przypadku gruntów piaszczystych o zawartości frakcji ilastych i substancji humusowych nieprzekraczających $10 \div 15\%$ (Greinert i Greinert, 1999; Rahman i in., 2002).

Wentylacja gruntu pozwala na usuwanie lotnych frakcji zanieczyszczeń. Dalsze procesy obejmują skraplanie i kondensację węglowodorów oraz zabiegi filtracji, adsorpcji lub flotacji.

Metody wykorzystujące zjawiska elektrokinetyczne to przede wszystkim elektroforeza, elektroosmoza oraz elektroliza. W metodach tych stosuje się pole elektryczne, które wymusza migrację zanieczyszczeń w określonym kierunku (Virkuitye i in., 2002).

3.4.1.2. Metody biologiczne

Biologiczne oczyszczanie gruntów z substancji ropopochodnych związane jest z możliwością biodegradacji zanieczyszczeń przez mikroorganizmy glebowe oraz z warunkami środowiskowymi, które odgrywają kluczową rolę w procesach mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów. Bioremediację można przeprowadzić sposobem *in situ* lub *ex situ*, stymulując rozwój autochtonicznych bakterii lub wprowadzając do gruntu preparaty mikrobiologiczne zawierające mikroorganizmy aktywne w rozkładzie zanieczyszczeń ropopochodnych (Greinert i Greinert, 1999). Bioremediację gruntów *in situ* stosujemy wówczas, gdy zanieczyszczenie gleby produktami naftowymi jest powierzchniowe

lub gdy jest ono na tyle głębokie, że sięga wód gruntowych, a także wtedy, kiedy lokalizacja zanieczyszczenia uniemożliwia wybranie gruntu.

Do sposobów bioremediacji gruntów *in situ* zaliczamy:

- uprawę gleby (landfarming),
- bioekstrakcję,
- biowentylację,
- fitoremediację.

Landfarming stosuje się w przypadku zanieczyszczenia powierzchniowego gruntu do głębokości 50 cm. Uprawa polega na okresowym oraniu, bronowaniu i zraszaniu wodą. Dzięki temu zapewnia się odpowiednie warunki tlenowe i odpowiednią wilgotność wewnątrz warstwy ziemi. Dodatkowe przyspieszenie rozkładu zanieczyszczeń można uzyskać stosując biopreparaty zawierające aktywne szczepy mikroorganizmów wyspecjalizowanych w rozkładzie substancji ropopochodnych.

Bioekstrakcja to technika wykorzystywana do oczyszczania głębokich warstw gruntu o dobrej przepuszczalności. W bioekstrakcji roztwór płuczący grunt z dodatkiem biogenów zasilany jest hodowlą mikroorganizmów. Woda recyrkulowana odprowadzana jest okresowo do kanalizacji bądź kierowana do reaktora biologicznego.

Biowentylacja polega na wprowadzeniu powietrza do gruntu. Powietrze ułatwia parowanie i wydmuchiwanie lotnych frakcji węglowodorów. Przyspiesza również procesy tlenowego rozkładu zanieczyszczeń. Przepływ powietrza odbywa się w sposób wymuszony podciśnieniem lub nadciśnieniowo. Biowentylację można wspomagać bioekstrakcją.

Fitoremediacja jest to rozwinięta w latach dziewięćdziesiątych XX wieku technologia oczyszczania środowiska (gleby, wód gruntowych i powierzchniowych, osadów ściekowych i powietrza), która wykorzystuje naturalne zdolności roślin do pobierania i gromadzenia substancji zanieczyszczających lub do ich biodegradacji (rozkładu wewnątrz tkanek roślinnych). W zależności od charakteru procesów biologicznych, które są zaangażowane w oczyszczanie środowiska, wyróżnia się cztery mechanizmy (a zarazem typy) fitoremediacji:

- **fitoekstrakcja** (lub fitoakumulacja) - pobieranie zanieczyszczeń (szczególnie pierwiastków śladowych) z gleby przez korzenie i ich kumulacja w tkankach organów nadziemnych. Rośliny wykazujące bardzo duże zdolności akumulacji zanieczyszczeń określane są terminem **hiperakumulatorów**. Do roślin o takich właściwościach należą wierzba witwa (*Salix vitaminalis*), gryka, kukurydza, lucerna, perz, turzyca owłosiona, bylica, bielun, rzeżusznik Hallera, kapusta sitowata, tobołki alpejskie, smagliczki.

Odmianą fitoekstrakcji jest **ryzofiltracja**, zachodząca w zanieczyszczonym środowisku wodnym, w którym zanurzone są korzenie roślin;

- **fitoodparowanie** - zjawisko pobierania wody z zanieczyszczeniami i ich transpiracji poprzez liście. Mechanizmy tego zjawiska nie są do końca poznane, ale wykazano doświadczalnie, że rtęć, selen i lotne węglowodory mogą być w ten sposób odparowywane (LeDuc i Terry, 2005; Meagher i Heaton, 2005);
- **fitodegradacja** - zjawisko rozkładu zanieczyszczeń wewnątrz tkanek roślinnych pod wpływem wytwarzanych przez rośliny enzymów, które katalizują procesy degradacji. Istotną rolę odgrywają m.in. nitroreduktazy - uczestniczące w rozkładzie środków wybuchowych, dehydrogenazy - biorące udział w rozkładzie organicznych chlorowcopochodnych, nitylazy - rozkładające fosforany organiczne i peroksydazy - uczestniczące w rozkładzie fenolu.

Fitoremediacja niesie ze sobą wielkie nadzieje z powodu niskich kosztów, nieznacznego przekształcenia istniejących warunków środowiskowych i wizualnej atrakcyjności. Uważa się, że redukcja zanieczyszczeń uzyskana drogą fitoremediacji jest porównywalna do efektu oczyszczania poprzez techniczną remediację. Fitoremediację przeprowadza się na miejscu występowania zanieczyszczenia, co znacznie obniża koszty oczyszczania. Efektem końcowym fitoremediacji jest przywrócenie oczyszczanej glebie produktywności.

Czynnikami ograniczającymi zastosowanie fitoremediacji są:

- ograniczenie efektywnego działania do płytkich warstw gleby,
- wymaganie odpowiednio dużych powierzchni do stosowania zabiegów agrotechnicznych,
- powolny wzrost i specyficzne wymagania pokarmowe i wilgotnościowe wielu hiperakumulatorów oraz zróżnicowana tolerancja na inne zanieczyszczenia i na zasolenie gleby,
- zależność szybkości pobierania zanieczyszczeń lub ich degradacji od zmiennych warunków pogodowych i obecności innych skażeń,
- zbyt wysokie koncentracje zanieczyszczeń wywołujące ostre uszkodzenia roślin i powodujące ich szybkie zamieranie (fitoremediacja powinna być raczej uzupełnieniem innych technik oczyszczania gleby),
- nieznanne w wielu przypadkach działanie toksyczne produktów biodegradacji i właściwości biologiczne,
- niska efektywność w przypadku zanieczyszczeń silnie zaabsorbowanych na cząstkach gleby.

Do metod bioremediacji *ex situ* zalicza się bioremediację agrotechniczną oraz przyzmoianie.

Bioremediacja agrotechniczna obejmuje identyczne czynności, jak landfarming *in situ*. Oczyszczanie gruntu przez uprawę gleby polega na ułożeniu jej warstwy na geomembranie (folia z tworzyw sztucznych, glina, asfalt) izolującej podłoże od skażonego gruntu. Warstwa powinna być zaopatrzona w urządzenia do zbierania odcieków glebowych. Proces ten często jest stymulowany dodatkiem do skażonej gleby preparatów bakteryjnych, wody oraz składników odżywczych (Greinert i Greinert, 1999).

Przymowanie prowadzi się w warstwie gleby o wysokości 1 ÷ 2 m i szerokości 5 ÷ 8 m, ułożonej na geomembranie i zaopatrzonej w drenaż pozwalający napowietrzać złożę i odprowadzać odcieki. Do warstwy doprowadza się wraz z wodą mikroorganizmy i substancje biogenne. Można również wprowadzić drobnoustroje immobilizowane na nośnikach w postaci warstw lub mieszać immobilizat z gruntem (Greinert i Greinert, 1999).

W tabeli 1 podano przybliżone koszty oczyszczania gruntów z zastosowaniem różnych metod remediacji.

Tabela 1

Porównanie kosztów w zależności od zastosowanej metody remediacji gruntu (Buzea i DeStefanis, 1999; EPA, 2000)

Technologia remediacji	Przybliżony koszt oczyszczenia 1 tony gruntu
Biologiczne oczyszczanie fazy stałej (Solid phase biological treatment)	< 150 \$
Biologiczne oczyszczanie fazy ciekłej oraz osadów (Slurry phase biological treatment)	80 +230 \$
Mycie gleby (Soil washing)	55 ÷ 165 \$
Odsalanie (Dehalogenation)	> 450 \$
Ekstrakcja chemiczna (Chemical extraction)	65 ÷ 300 \$
Desorpcja zanieczyszczeń w niskich temperaturach (Low temperature desorption)	< 150 \$
Chemiczna redukcja/utlenianie (Chemical reduction/oxidation)	150 ÷ 450 \$
Desorpcja zanieczyszczeń w wysokich temperaturach (High temperature desorption)	150 ÷ 450 \$
Spalanie (Incineration)	120 ÷ 1175 \$
Wydobycie i składowanie (Excavation and disposal)	70 ÷ 550 \$
Zestalenie/stabilizacja (Solidification/stabilization)	70 ÷ 200 \$
Witryfikacja (vitrification)	770 \$

3.4.2. Rola mikroorganizmów ryzosferowych w bioremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi

Prawidłowy rozwój roślin na terenie zanieczyszczonym wymaga wytworzenia właściwych systemów ochronnych przed toksycznym działaniem owych zanieczyszczeń. W rozwoju roślin na terenach skażonych pomagają dobrze wykształcony ekosystem glebowy, który pozytywnie oddziałuje na system korzeniowy rośliny. Aktywność mikroorganizmów w strefie korzeniowej jest jednym z czynników warunkujących wzrost roślin i ich odporność na zanieczyszczenie. Strefa obejmująca glebę otaczającą korzeń, jego powierzchnię i komórki kory, często skolonizowane przez mikroorganizmy, nazywana jest ryzosferą (Leyval i in., 1997; Turnau i in., 2002; Jeffries i in., 2003).

Z badań nad mikroorganizmami ryzosferowymi wynika, że w warstwie gleby przyległej do korzeni roślin spotyka się bakterie i grzyby w wielokrotnie większej ilości (od kilku nawet do kilkuset razy) niż w glebie poza zasięgiem korzeni. W ryzosferze można wyróżnić kilka stref o różnym zagęszczeniu mikroorganizmów:

- endoryzosferę - stanowią ją mikroorganizmy wnikające do epidermy i kory korzenia, zwane często endofitami;
- ektoryzosferę - obszar gleby bezpośrednio przylegającej do komórek epidermy wraz z mikroorganizmami, o grubości do kilku milimetrów;
- rizoplan - strefę mikroorganizmów, które przylegają ściśle do korzeni (Mrozowska, 1999).

W ryzosferze występuje ścisła zależność między rośliną, glebą i mikroorganizmami. Jest ona zasilana w bogate energetycznie wydzieliny korzeniowe, składające się z produktów fotosyntezy rośliny, m. in. cukrów, aminokwasów, kwasów organicznych, a także witamin i enzymów, co sprawia, że strefa ta jest dogodnym siedliskiem do rozwoju mikroorganizmów. Każdy gatunek rośliny posiada inny skład wydzielin korzeniowych, a ilość i jakość tych wydzielin determinuje skład gatunkowy „społeczności” ryzosfery. Bakterie i grzyby wykorzystują te produkty i martwe komórki korzeni do swojego wzrostu i rozwoju (Clapperton, 2000). Badania gleb zanieczyszczonych ropą naftową oraz roślinności pól naftowych pozwoliły na wyróżnienie grupy roślin zwanej naftofitami. Są to rośliny, które doskonale przystosowały się do życia w skrajnych warunkach zanieczyszczenia produktami ropopochodnymi. Tolerują one bardzo wysokie stężenia ropy naftowej, eliminując inne gatunki roślin. Naftofity wyraźnie przyspieszają degradację zanieczyszczeń ropopochodnych, absorbują, kumulują i metabolizują węglowodory (zanieczyszczenia naftowe mogą stanowić

7 ÷ 15% masy rośliny), silnie rozrastają się i krzewią, produkując dużo biomasy. Gęste systemy korzeniowe naftofitów zapewniają stabilność gruntu, uniemożliwiają jego rozmywanie i wymywanie toksycznych węglowodorów do masy glebowej, powstrzymują procesy erozyjne. Przykładami naftofitów są m. in.: turzycza owłosiona (*Carex hirta* L.), śmiełek darniowy (*Deschampsia caespitosa* (L.) P.B.), stokłosa (*Bromus spp.*), kupkówka pospolita (*Dactylis glomerata* L.), wiechlina roczna (*Poa annua* L.), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica* L.), jaskier rozłogowy (*Ranunculus repens* L.), czeremcha pospolita (*Prunus padus* L.), wierzba iwa (*Salix caprea* L.), (Róžański, 2002).

Jedną z ważniejszych grup organizmów ryzosferowych, obok bakterii, są grzyby mikoryzowe. Zajmują one szczególne miejsce wśród mikroorganizmów strefy korzeniowej, gdyż są szeroko rozpowszechnione. Są określane mianem biotrofów, co oznacza, że tylko okresowo mogą rosnąć bez kontaktu z korzeniami roślin. Przez pojęcie mikoryzy rozumiemy wzajemnie korzystne współżycie roślin i specyficznych grzybów symbiotycznych, nawiązujących bezpośredni kontakt z korzeniami rośliny-gospodarza (Badura, 2004). Mikoryzy są wysoce rozwiniętymi zależnościami mutualistycznymi między grzybami glebowymi i korzeniami roślin, w których grzyby czerpią korzyści pobierając związki węgla wytworzone przez roślinę w procesie fotosyntezy, a ta z kolei dzięki współdziałaniu otrzymuje mineralne substancje odżywcze (www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/intro.html). Partnerami tej symbiozy są członkowie królestwa grzybów (*Fungi*), należący do typów: podstawczaki (*Basidiomycota*), workowce (*Ascomycota*), sprzężniaki (*Zygomycota*) i rośliny naczyniowe (*Plantae vasculares*) (Trouvelot i in., 1986; Berg in., 2000). Poszczególne gatunki roślin współżyją z różnymi gatunkami grzybów mikoryzowych, często należących do różnych taksonów. Z tego względu wyróżnia się kilka podstawowych typów mikoryz, uwzględniających zarówno morfologię korzeni rośliny mikoryzowej oraz fizjologię symbiozy, jak i wspomniane zależności gatunkowe. Bardzo rzadko zdarza się, by w obrębie jednej rodziny roślin wystąpiły dwa różne typy mikoryzy (<http://mycorrhiza.ag.utk.edu>).

Endomikoryza (mikoryza wewnętrzna) jest najbardziej rozpowszechnioną mikoryzą, zasiedlającą 80 ÷ 90% roślin żyjących na Ziemi. Wyróżnia się jej dwa rodzaje: mikoryzę arbuskularną (arbuscular mycorrhizal fungi AMF) lub mikoryzę wezikularno - arbuskularną (vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi VAM) (Borkowska, 2004). Grzyby, tworzące mikoryzę arbuskularną, to głównie przedstawiciele rzędu *Glomales*, należący do typu sprzężniaki (*Zygomycota*) (www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/intro.html). Cechą charakterystyczną tego rodzaju mikoryzy jest zdolność penetracji zarówno przestrzeni

międzykomórkowych, jak i wnętrza żywych komórek kory korzenia (Turnau i in. 2002). Oprócz arbuskul tworzone są również pęcherzyki (wezikule). Uważa się, że w pęcherzykach gromadzone są substancje zapasowe, które w skrajnych warunkach mogą być udostępnione roślinom (Borkowska, 2004).

Ektomikoryza występuje na 3 ÷ 5% roślin, głównie drzewiastych, zarówno nagolazdkowych (*Gymnospermae*), jak i okrytozalazdkowych (*Angiospermae*) (Turnau i in., 2002). Mikoryzy te tworzą głównie gatunki nalezające do podstawczaków (*Basidiomycota*), rzadziej workowców (*Ascomycota*). Znalaziono tez kilka gatunków nalezających do sprzeczniaków (*Zygomycota*) (Borkowska, 2004). Grzyby tworzace mikoryze zewnetrzną wykształcają strzeczki przylegające do korzenia i wrastające między komórki epidermy wierzchołków mlodych, aktywnie rosnących korzeni. Na powierzchni korzeni tworzy się mniej lub bardziej gęsty spłot, zwany opilśnią czy mufką grzybniową, której wlasności zalezają od gatunku grzyba symbiotycznego, zdolności do chłonięcia wody oraz syntezy kwasów organicznych (Turnau i in., 2002). Grzybnia wrasta także do wnętrza korzenia pomiędzy komórki kory pierwotnej tworząc zawilą strukturalę, zwaną siecia Hartiga (www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/intro.html).

Ektendomikoryza (mikoryza arbutoidalna) jest morfologicznie bardzo zbliżona do ektomikoryzy, a upodabnia ją obecność mufki grzybniowej i sieć Hartiga, lecz posiada również cechy endomikoryzy, takie jak penetracja śródkomórkowa, która charakteryzuje się brakiem arbuskul i pęcherzyków. Tworzą ją wyłącznie grzyby nalezające do podstawczaków (*Basidiomycota*) (Kendrick, 2001). Szczególnym rodzajem ektendomikoryzy jest mikoryza monotropoidalna, w której grzyby kolonizują nieposiadające chlorofilu rośliny z rodziny *Monotropaceae* (np. *Monotropa uniflora*), wytwarzając sieć Hartiga i mufkę. Te same grzyby tworzą tez stowarzyszenia ektomikoryzowe z innymi drzewami, tworząc łacze, przez które substancje odzywczel mogają płynąć od samożywnej rośliny głównej do cudzożywnej rośliny pasożytniczej (David i in., 2005).

Mikoryze erikoidalną formują grzyby nalezające do workowców (*Ascomycota*) u roślin nalezających do rodziny wrzosowatych (*Ericaceae*) (David i in., 2005). Strzeczki grzybni wrastają do korzeni, rozgalezając się w przestrzeniach międzykomórkowych. Grzybnia rozrasta się na zewnatrz korzeni, tworząc strukturalę zastępujące włósniki, których brak u tej grupy roślin. Nie tworzy jednak mufki ani sieci Hartiga. Mikoryza ta nigdy nie tworzy tez galazek (arbuskul) i pęcherzyków (wezikul) (Borkowska, 2004). Strzeczki grzyba są

„upakowane” w komórkach kory korzenia i są przystosowane do występowania na korzeniach roślin preferujących gleby kwaśne czy torfowe (David i in., 2005).

Mikoryzę storczykową formują grzyby należące do podstawczaków (*Basidiomycota*) u roślin z rodziny storczykowatych (*Orchidaceae*). Grzybnia tworzy w korzeniach zwoje wewnątrz komórek, lecz nie tworzy charakterystycznych dla endomikoryz arbuskul i wezikul. Młode rośliny, a często nawet dorosłe, są całkowicie zależne od grzybów mikoryzowych, które potrzebne są im do przeżycia. Zauważono, że hodowane w warunkach szklarniowych storczyki, odizolowane od partnera grzybowego, nie rosną (Kendrick, 2001).

Zdolność systemu korzeniowego roślin do współżycia z mikroorganizmami, a w szczególności do tworzenia mikoryz, pozwala przetrwać roślinom, a nawet akceptować stresy wywołane patogenami glebowymi, suszą, wahaniami odczynu gleby czy skażeniami. Jest to związane ze zmianą właściwości fizycznych korzeni. Mikoryza modyfikuje architekturę korzeni: wtórne metabolity o charakterze hormonów stymulują wyraźnie rozrost korzeni (Dick i in., 1997; Badura, 2004); system korzeniowy jest bardziej rozgałęziony, zawiera więcej bocznych korzeni, zajmuje większą objętość podłoża. Dzięki temu penetracja gleby jest lepsza, co powoduje lepsze zakotwiczenie roślin i wiąże się z wydajniejszym pobieraniem składników pokarmowych oraz wody z roztworu glebowego. W rezultacie następuje obniżenie kosztów energetycznych rośliny i jako wtórny efekt obserwuje się stymulację wzrostu jej zielonej części (Borkowska, 2004). Czynnikiem ten jest szczególnie ważny na terenach skażonych, gdyż pozwala na łatwiejsze przystosowanie się roślin do warunków niekorzystnych, wynikających z oddziaływania ksenobiotyków. Kolonizacja wnętrza korzeni przez strzępki grzybów mikoryzowych powoduje zmiany zarówno morfologiczne, jak i fizjologiczne u obu symbiontów, w tym zmianę składu i ilości wydzielin korzeniowych oraz produkcję w strzępkach grzybowych białkowej substancji organicznej – glomaliny (Wright i Upadhyaya, 1999; Rillig i in., 2002a). Glomaliny, nazywane często „klejem glebowym”, to glikoproteiny produkowane przez grzyby mikoryzy wezikularno-arbuskularnej. Ta glebowa substancja organiczna została odkryta w latach 90. XX wieku przez Sarę Wright (Wright i Upadhyaya, 1996; Wright i in., 1996; Wright i Upadhyaya, 1998). Swoją nazwę zawdzięcza grzybom mikoryzy wezikularno-arbuskularnej zaliczanych do rzędu *Glomaceae* (Rillig i in., 2002b; Leśniak, 2006). Do tej pory nie udało się ustalić dokładnej budowy molekularnej tego białka. Wiadomo tylko, że jest to glikoproteina z N-końcowym łańcuchem oligosacharydowym, silnie hydrofobowa, zawierająca 1÷9% żelaza w cząsteczce (Nichols, 2004). W glomalinach koncentruje się blisko 30% węgla zawartego w glebie. Ich masa stanowi ok.

2% ogólnej masy agregatów glebowych. Glomaliny magazynowane są w strzępkach grzybów mikoryzowych, a w chwili pobierania wody i składników odżywczych przez grzybnie, glomaliny chronią końcówki strzępek. Kiedy transport składników odżywczych ustaje, glomaliny zostają „wyrzucone” na zewnątrz, gdzie opłaszczają cząsteczki glebowe i łączą je ze sobą, tym samym uczestnicząc w tworzeniu gruzełkowatej struktury gleby. Ułatwiają zlepianie cząstek mineralnych, powodują wzrost odporności gleb na erozję. Ponadto adsorbują składniki pokarmowe i opóźniają rozkład materii organicznej. Glomaliny odpowiadają również za stabilność wodną agregatów glebowych (WSA) (Rilling i in., 2001). Zabiegi uprawowe oraz zmiany środowiskowe nie sprzyjają produkcji glomalin (Rillig i in., 2003).

Wykształcenie pokrywy roślinnej na terenie skażonym substancjami ropopochodnymi uwarunkowane jest pojawieniem się symbiotycznych grzybów (Orłowska i in., 2005). Samoistna kolonizacja korzeni przez grzyby mikoryzowe jest jednak długotrwała, dlatego wskazane jest zaszczerpienie podłoża zarodnikami wyselekcjonowanych szczepów tychże grzybów. Ważne jest przy tym, by wprowadzane gatunki były odporne na skażenie występujące w glebie, a także by potrafiły przeżyć w konkurencji z innymi organizmami mogącymi pojawić się na danym terenie.

3.5. Ocena ekotoksykologiczna gleb

Duże zróżnicowanie składu ilościowego i jakościowego zanieczyszczeń środowiska gruntowego utrudnia lub wręcz uniemożliwia ocenę istniejącego stanu zagrożenia, a także przewidywanie skutków skażenia oraz ocenę postępów procesu bioremediacji. Pojawiają się problemy z doбором odpowiednich metod analitycznych służących do wykrywania i szacowania ilości substancji toksycznych występujących w środowisku. W takiej sytuacji najlepszym rozwiązaniem jest stosowanie metod monitoringu biologicznego (Kańska i Łebkowska, 1994). Biomonitoring można podzielić na trzy typy:

- biomonitoring typu 1, który polega na badaniu oddziaływania zanieczyszczenia na zespoły organizmów w badanym ekosystemie,
- biomonitoring typu 2 obejmuje badania biokoncentracji zanieczyszczeń w organizmach danego ekosystemu,
- biomonitoring typu 3 dotyczy opisu oraz prognozowania skutków oddziaływania substancji zanieczyszczających na organizmy i ekosystemy (Walker i in., 2002).

W szerokim rozumieniu biomonitoring obejmuje zarówno bioindykację (łac. *indicare* - wskazywać), czyli wykorzystanie wybranych organizmów wskaźnikowych do oceny skażenia środowiska, jak i rejestrowanie stanu przyrody ożywionej w danym środowisku. W zakres tego typu badań wchodzi testy toksykologiczne prowadzone w laboratoriach, badania w modelowych mikro- i makrozespołach oraz badania w warunkach polowych. Toksykologiczne badania laboratoryjne stanowią pierwszy krok do poznania szkodliwości związków chemicznych, ich mieszanin i produktów metabolizmu. Na podstawie testów toksykologicznych dokonywana jest ocena zagrożenia dla badanych populacji w zakresie śmiertelności, wzrostu, reprodukcji i zaburzeń w procesach fizjologicznych (Kańska i Lebkowska, 1994). Szkodliwe działanie na ożywioną część ekosystemu może wpływać zarówno na jego funkcjonowanie, jak i na strukturę. Przez pojęcie „funkcjonowanie” należy rozumieć złożone zależności niezbędne do utrzymania ekosystemu. Zasadniczą rolę w funkcjonowaniu ekosystemów odgrywają zależności troficzne, w tym przekazywanie składników pokarmowych i energii. Z tego też powodu istotne jest, aby badania uwzględniały przedstawicieli reprezentujących wszystkie ogniwa łańcucha pokarmowego, tj. producentów pierwotnych, wtórnych, konsumentów oraz reducentów - organizmy odpowiedzialne za rozkład materii. Zaburzenia w środowisku spowodowane jego zanieczyszczeniem na ogół zaznaczają się jako zmiany ilościowe lub/ oraz w postaci zmian biomasy składników. Należy w tym przypadku rozróżnić skutki działania biodepresyjnego (śmiertelność, zahamowanie wzrostu i rozmnażania) od skutków działania biostymulującego (eutrofizacja, wystąpienie nowych gatunków itp.). Oba te efekty mogą wywierać szkodliwe działanie na ekosystem (OECD, 1997). Dobór biotestów zależy przede wszystkim od sposobu użytkowania i funkcji gleby (tab. 2). Bezpośrednie badanie gleb umożliwia ocenę ich jakości jako miejsca wzrostu roślin oraz bytowania biocenozy glebowej (funkcja habitatu). Analiza wodnych wyciągów glebowych pozwala na kontrolę zanieczyszczeń wymywanych ze środowiska glebowego, które w wyniku infiltracji lub spływów powierzchniowych mogą przedostawać się do wód, oddziałując w ten sposób na rozwój biocenozy wodnej (Kołwzan, 2005).

W środowisku przyrodniczym organizmy są często narażone na działanie złożonej mieszaniny substancji skażających środowisko. W badaniach toksykologicznych zakłada się ich działanie addytywne (o ile nie ma niezbitych dowodów o działaniu przeciwnym). Innymi słowy, toksyczność mieszaniny związków powinna być zbliżona do sumy toksyczności jej pojedynczych składników. Z reguły jednak toksyczność mieszanin jest znacząco wyższa niż toksyczność addytywna (Walker i in., 2002).

Ocena ekotoksykologiczna wymaga interdyscyplinarnego podejścia obejmującego zarówno badania fizykochemiczne, toksykologiczne, jak i ekologiczne. Studia ekotoksykologiczne koncentrują się głównie na ekologicznych i toksykologicznych efektach obserwowanych z perspektywy czasu, dzięki czemu możliwy jest do zarejestrowania związek przyczynowo - skutkowy pomiędzy substancją a efektem jej obecności w środowisku. Sam biomonitoring jest jednak niewystarczającym narzędziem, aby móc zidentyfikować przyczynowe czynniki naruszenia równowagi środowiska. Podobnie również samoistna analiza chemiczna zanieczyszczeń występujących w ekosystemach tylko pośrednio świadczy o zagrożeniu toksykologicznym w stosunku do organizmów żywych. Tylko zintegrowane badania uwzględniające analizę skażenia środowiska, występujących w nim i przewidywanych stężeń ksenobiotyków, ich toksyczności, biodostępności, dróg migracji, a także podatności na biodegradację pozwala prawidłowo rozeznąć oraz ocenić ryzyko związane z zagrożeniem spowodowanym przez te substancje (Fent, 2004).

Kryteria selekcji biotestów w zależności od przewidywanego sposobu użytkowania gleby (DECHEMA, 2001)

Sposób użytkowania gleby	Funkcja gleby		
	Funkcja retencyjna	Funkcja habitatu (siedliskowa)	
		Miejsce wzrostu roślin	Miejsce bytowania biocenozy glebowej
System prowadzonych testów biologicznych	Testy na organizmach wodnych	Testy na organizmach glebowych	
Grunty znajdujące się poniżej terenów uszczelnionych	nie	nie	nie
Tereny nieuszczelnione wykorzystywane przemysłowo	tak	nie	nie
Gleba służąca do pokrywania lub uzupełniania powierzchni	tak	tak	nie
Tereny zielone, parki i tereny rekreacyjne	tak	tak	tak
Tereny użytkowane ogrodniczo i rolniczo	tak	tak	tak
Typy organizmów wskaźnikowych	bakterie luminescencyjne, glony: <i>Selenastrum capricornutum</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , skorupiaki: <i>Daphnia magna</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Thamnocephalus platyurus</i> , <i>Heterocypris incongruens</i> , pierwotniaki: <i>Tetrahymena thermophila</i> , ryby: <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Brachydanio rerio</i>	rośliny wyższe: I kategoria: rajgras (<i>Lolium perenne</i>), ryż (<i>Oryza sativa</i>), owies (<i>Avena sativa</i>), pszenica (<i>Triticum aestivum</i>), sorgo (<i>Sorghum saccharatum</i>) II kategoria: gorczyca (<i>Brassica alba</i>), rzepak (<i>Brassica napus</i>), rzodkiew (<i>Raphanus sativus</i>), rzepa (<i>Brassica rapa</i>), kapusta chińska <i>Brassica campestris</i> , III kategoria: wyka (<i>Vicia sativa</i>), fasola złota (<i>Phaseolus aureus</i>) koniczyna czerwona <i>Trifolium pretense</i> , Kozieradka pospolita <i>Trifolium ornithopodiodes</i> , sałata (<i>Lactuca sativa</i>), rzeżucha <i>Lepidium sativum</i> , Do badań używa się co najmniej trzech gatunków roślin po jednym z każdej kategorii.	bakterie luminescencyjne, nityfikacyjne, procesy oddechowe, dżdżownice <i>Eisenia fetida</i> , skoczogonki <i>Collembola</i> , <i>Folsomia candida</i> , stonogi <i>Crustacea: Isopoda</i> , <i>Oniscidea, Oniscus asellus</i>

4. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

4.1. Materiały

4.1.1. Gleba

Badania obejmowały eksperymenty prowadzone zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i naturalnych. W doświadczeniach wykorzystano próbki gleb pobranych z dwóch miejsc, które oznaczono jako:

- **gleba A** – Czechowice–Dziedzice, teren rafinerii (w pobliżu dołów kwasowych),
- **gleba B** – Czechowice–Dziedzice, w odległości ok. 150 m od płotu ograniczającego teren rafinerii.

Próbki gleb pobierano z głębokości $0 \div 30$ cm, suszono na powietrzu i przesiewano przez sito o średnicy oczek 2 mm w celu ujednorodnienia badanego materiału. Tak przygotowane materiały nawilżano wodą redestylowaną do uzyskania wilgotności ok. 70% całkowitej pojemności wodnej (z ang. water-holding capacity – WHC), zwracając uwagę na dokładne ich wymieszanie. Dla uaktywnienia mikroflory glebowej pojemniki z próbkami wstawiono na 7 dni do komory fitotronowej, gdzie utrzymywano temperaturę na poziomie $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.1.2. Odcieki glebowe

Próbki gleb o masie 10 kg, przygotowane w sposób opisany w p. 4.1.1, umieszczono w lizymetrach (długość, 40 cm, średnica 15 cm) z perforowanym dnem (średnica otworów 1 mm). Pod lizymetrami umieszczono pojemniki, do których spływały odcieki glebowe (rys. 2).

4.1.3. Materiały biologiczne

W doświadczeniach wykorzystywano kwalifikowany materiał roślinny zakupiony w firmie Herbador (Bydgoszcz) oraz w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarnictwa (Skiernewice). Było to sześć gatunków roślin wyższych – dwa należące do jednoliściennych: pszenica zwyczajna (*Triticum vulgare* V.) i żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.) oraz cztery należące do dwuliściennych: rzeżucha łąkowa (*Cardamine pratensis* L.), koniczyna biała (*Trifolium repens* V.), gorczyca biała (*Sinapis alba* L.) i ogórek siewny (*Cucumis sativus* L.). Glony *Scenedesmus quadricauda* zakupiono w firmie MicroBioTest w Belgii.

W testach zootoksyczności używano dżdżownic z gatunku *Eisenia fetida*, pochodzących z hodowli Siudzińskich w Konstancinie-Jeziornej. Ślimaki *Physa acuta* Drap

pochodziły z hodowli własnej Katedry Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

4.2. Metody analityczne

4.2.1. Metody analiz materiału glebowego

Oznaczenia podstawowych właściwości materiału glebowego wykonano zgodnie z metodyką wg Ostrowskiej i in. (1991). Oznaczono:

- skład granulometryczny – metodą areometryczną Cassagrande w modyfikacji Prószyńskiego,
- odczyn (pH) gleby w roztworze wodnym 1 M KCl,
- kwasowość hydrolityczną – metodą Kappena,
- sumę kationów metali o charakterze zasadowym – metodą Kappena,
- pojemność sorpcyjną,
- węgiel organiczny utleniały – metodą Tiurina,
- fosfor ogólny – metodą molibdenowanadofosforanową,
- azot ogólny – zmodyfikowaną metodą Kjeldahla,
- azot amonowy – metodą destylacji,
- azot azotynowy – metodą destylacji,
- azot azotanowy – metodą destylacji,
- zawartość kwasów huminowych wg Schnitzera (1982).

Suchą masę próbek glebowych określano metodą prażenia w 105⁰C do stałej masy.

4.2.1.1. Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA)

Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w glebie oznaczono w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowanych (IETU) w Katowicach metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC/FID) zgodnie z procedurą PB-06 IETU (1999).

4.2.1.1.1. Oznaczanie WWA w glebie

Próbki gleby do analizy suszono w suszarce w temperaturze ok. 30°C, a następnie przesiewano przez sito o średnicy oczek 1 mm.

W zależności od spodziewanego stopnia zanieczyszczenia gleb do ekstrakcji odważano (z dokładnością 0,0001 g) próbki o masie: 10g gleby w przypadku gleb słabo zanieczyszczonych WWA lub 1-5 g w przypadku gleb silnie zanieczyszczonych. Ekstrakcję

prorowadzono dichlorometanem (CH_2Cl_2) w automatycznym ekstraktorze Soxtherm (firmy Gerhardt), w temperaturze 135°C przez 3 godziny. Ekstrakty przenoszono ilościowo do zlewek o pojemności 25 cm^3 i zatężano w temperaturze pokojowej w łagodnym strumieniu azotu do objętości około 1 cm^3 . Tak przygotowane zatężone ekstrakty oczyszczano na szklanych kolumnkach o średnicy 1 cm, wypełnionych 1 g Florisilu (deaktywowanego 4% wody). Frakcję zawierającą WWA wymywano ze złoża, przemywając je dwukrotnie dichlorometanem, tak aby uzyskać 10 cm^3 eluatu. Eluat zatężano w temperaturze pokojowej w łagodnym strumieniu azotu do objętości około 1 cm^3 .

Oznaczenia ilościowe i jakościowe WWA w ekstraktach glebowych wykonywano metodą HPLC z wykorzystaniem chromatografu cieczowego HP1050 z detektorem fluorescencyjnym HP 1046A firmy Hewlett-Packard.

Rozdział mieszaniny WWA prowadzono na kolumnie chromatograficznej BAKERBOND PAH 16-Plus o wymiarach: długość 250 mm, średnica wewnętrzna 3 mm, wypełnionej fazą niepolarną C18 o średnicy ziaren $5\text{ }\mu\text{m}$, z przedkolumną firmy Baker. Kolumnę termostatowano w 27°C . Do rozdziału mieszaniny 15 WWA stosowano elucję gradientową w mieszaninie metanol/woda (75% metanolu i 25% wody). Czas rozdziału mieszaniny na kolumnie wynosił 30 min, przepływ fazy ruchomej przez kolumnę - $0,5\text{ cm}^3/\text{min}$, objętość analizowanej próbki - $2\text{ }\mu\text{l}$.

Oznaczenia jakościowe badanych WWA wykonano stosując długości fali odpowiednie dla poszczególnych związków. Rejestrację danych wykonywano za pomocą systemu komputerowego z oprogramowaniem Chemstation w środowisku Windows 95. Do analizy ilościowej WWA zastosowano metodę wzorców zewnętrznych. Roztwory wzorcowe przygotowano z mieszaniny węglowodorów PAH Mix PM-611 Ultra Scientific rozpuszczonych w dichlorometanie. Każdy roztwór wzorcowy wstrzykiwano pięciokrotnie, wyniki oznaczeń uśredniano i sporządzono krzywą kalibracyjną. Krzywe kalibracyjne dla poszczególnych WWA w zakresie stężeń $0,05\div 1,20\text{ ng}/\mu\text{l}$ miały charakter liniowy o współczynniku korelacji powyżej 0,998, a współczynnik zmienności w całym zakresie stężeń nie przekraczał 20%.

Dokładność zastosowanej metody określono przez wyznaczenie błędu względnego, który nie przekraczał 15% oraz precyzji, która mieściła się w zakresie od 30,4 do 34,8%. Wielkość odzysku dla poszczególnych WWA mieściła się w zakresie od 83,2 do 101,7%. Granice oznaczalności [w mg/kg s.m. gleby] wynosiły odpowiednio: 0,006 dla naftalenu (Naft); 0,005 dla acenaftenu (Ace); 0,003 dla fluorenu (Fl); 0,046 dla fenantrenu (Fen); 0,001 dla antracenu (Antr); 0,009 dla fluorantenu (Fl); 0,007 dla indeno(1,2,3-c,d) pirenu (IP); 0,005

dla pirenu (Pir), benzo(b)fluorantenu (BbF), dibenzo(a,h)antracenu (DiahA); 0,043 dla chryzenu (Chr); 0,004 dla benzo(a)antracenu (BaA), benzo(k)fluorantenu (BkF), benzo(a)pirenu (BaP) i benzo(ghi)perylenu (BgHiP). W każdej serii oznaczeń stosowano odpowiednie ślepe próbki odczynnikowe oraz okresowo badano certyfikowany materiał odniesienia CRM 104-100 firmy RT Corporation (USA).

4.2.1.1.2. Oznaczanie WWA w odciekach gleb

Do oznaczania WWA w ekstraktach glebowych zastosowano metodykę podobną do wykorzystywanej w analizach gleby (p. 4.2.1.1.1). Różnica polegała jedynie na sposobie ekstrakcji węglowodorów z matrycy.

Próbki odcieków glebowych o określonej objętości (min. 100 cm³) przed ekstrakcją utrwalono metanolem (1 cm³/1 dm³), a następnie przepuszczano przez szklane kolumnienki o pojemności 8 cm³, wypełnione podwójną fazą C18/NH₂ o wielkości ziarna 40 μm. Przed wprowadzeniem ekstraktów kolumnienki kondycjonowano metanolem (2 razy po 3 cm³), następnie 5 cm³ 2-propanolu. Bezpośrednio przed ekstrakcją do kolumnienek wprowadzono po 5 cm³ mieszaniny 2-propanol:woda w stosunku objętościowym 2:98. Do analizowanych próbek odcieków glebowych dodawano 2-propanol w ilości 10% objętości próbki i całość dobrze mieszano. Następnie sączono próbkę ekstraktu glebowego przez kolumnienkę (z szybkością około 4-6 cm³/min). Po ekstrakcji kolumnienkę przemywano wodą (2 cm³) i suszono podciśnieniowo z użyciem pompki wodnej przez 20 min. Elucję WWA prowadzono, przepuszczając przez każdą kolumnienkę dichlorometan: 2 razy po 3 cm³ i raz 2 cm³. Eluat zbierano w kalibrowanej probówce, następnie zatężano (w temperaturze pokojowej) w łagodnym strumieniu azotu prawie do sucha. Przed analizą do próbki dodawano 0,5 cm³ dichlorometanu, szczelnie zamykano i mieszano. Tak przygotowany ekstrakt analizowano metodą HPLC w sposób opisany w rozdziale 4.2.1.1.1.

4.2.1.2. Oznaczanie węglowodorów ropopochodnych w glebie metodą spektrometrii w podczerwieni

Zawartość węglowodorów alifatycznych oznaczono metodą spektrometrii w podczerwieni (FT-IR), zgodnie z procedurą PB-07 IETU (1999). Do analiz pobierano 10 g świeżej gleby, przesianej przez sito o średnicy oczek 2 mm. Oznaczenia wykonywano w trzech powtórzeniach.

Próbkę gleby przed ekstrakcją zakwaszano do pH~2 roztworem 1 M kwasu solnego, a następnie dodawano bezwodny siarczan sodu (ok. 10 g). Tak przygotowaną próbkę glebową

przenoszono do bibułowej gilzy ekstrakcyjnej i umieszczano w aparacie Soxhleta. Ekstrakcję węglowodorów ropopochodnych prowadzono tetrachlorkiem węgla (CCl_4) przez 4 godziny. Uzyskany ekstrakt przenoszono ilościowo do kolbki miarowej o pojemności 25 cm^3 i dopełniano CCl_4 do kreski. Ekstrakty oczyszczano stosując deaktywowany (4% wody) Florisil (60-100 mesh) w ilości 1g do każdej kolbki miarowej. Ekstrakty z Florisilem pozostawiano na 15 minut, całość kilkakrotnie wytrząsając. Następnie roztwory dekantowano i przenoszono do kuwet kwarcowych. Dla każdej serii oznaczeń wykonywano odpowiednie ślepe próbki odczynnikowe.

Oznaczenia stężenia węglowodorów alifatycznych w badanych ekstraktach glebowych wykonano z użyciem spektrometru w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) VECTOR 22 firmy BRUKER OPTIK GmbH (Niemcy). Pomiar absorpcji prowadzono w zakresie od 3200 do 2800 cm^{-1} .

4.2.1.3. Oznaczanie węglowodorów ropopochodnych w odciekach glebowych metodą spektrometrii w podczerwieni

Procedura oznaczania stężeń węglowodorów ropopochodnych w odciekach glebowych różniła się od metodyki opisanej w podrozdziale 4.2.1.2 jedynie sposobem ekstrakcji tych związków.

Odpowiednią objętość odcieku glebowego (100 cm^3) umieszczano w kolbie Erlenmeyera i zakwaszano 1M kwasem solnym do uzyskania pH roztworu około 2. Następnie dodawano $25 \text{ cm}^3 \text{ CCl}_4$ i całość wytrząsano przez 15 minut. Po rozdzieleniu odrzucano warstwę wodną, a warstwę organiczną przenoszono do cylinderka miarowego o pojemności 25 cm^3 . Następnie dodawano bezwodny siarczan sodu (2 g), całość mieszano i sączono przez filtr szklany typu GF/A (Whatman) do kolbek miarowych o pojemności 25 cm^3 i uzupełniano CCl_4 do kreski.

Oczyszczanie ekstraktów oraz oznaczanie stężeń węglowodanów alifatycznych wykonywano w taki sam sposób jak w przypadku próbek glebowych (p. 4.2.1.2).

4.2.1.4. Oznaczanie frakcji ciężkich

Zawartość frakcji ciężkich w badanych glebach oznaczono metodą wagową zgodnie z PN-86/C-04573/01.

4.3. Testy ekotoksyczności

4.3.1. Testy fitotoksyczności

4.3.1.1. Hamowanie wzrostu korzeni

Wpływ węglowodorów na wczesne stadia rozwojowe roślin (oceniany na podstawie efektu hamowania wzrostu korzeni) określano zgodnie z PN-ISO 11269-1 (1998). W badaniach wykorzystywano sześć gatunków roślin wyższych – dwa należące do jednoliściennych: pszenica zwyczajna (*Triticum vulgare* V.) i żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.) oraz cztery należące do dwuliściennych: rzeżucha łąkowa (*Cardamine pratensis* L.), koniczyna biała (*Trifolium repens* V.), gorczyca biała (*Sinapis alba* L.) i ogórek siewny (*Cucumis sativus* L.). Przed przystąpieniem do testów toksykologicznych sprawdzono zdolność kiełkowania nasion w temp. 21^oC, w ciemności. Do dalszych badań wybrano tylko te partie nasion, których zdolność kiełkowania przekraczała 90%. Stosowano nasiona niezaprawione. Badania prowadzono na płytkach Petriego, na których umieszczano bibułę nasączoną 10 ml odcieków z gleby A (p. 4.1.2), a następnie wprowadzano po 20 skielkowanych nasion (długość kiełków nie przekraczała 2 mm). Próbkki kontrolne stanowiły płytki z bibułą nasączoną odciekami z gleby B (kontrolnej) – p. 4.1.2.

W sposób analogiczny prowadzono badania z wykorzystaniem gleby. Na płytkach Petriego umieszczano próbki 60 g badanej gleby A pobieranej z wazonów (opis doświadczeń p. 4.5.2.1) po 1, 4, 8 i 12 tygodniach procesu samooczyszczania oraz po 20 skielkowanych nasion. Płytki z nieskażoną glebą B stanowiły kontrolę. Eksperyment prowadzono w komorze fitotronowej w temp. 21/18^oC (dzień/noc). Wilgotność powietrza w komorze utrzymywano na poziomie 80%, przy intensywności oświetlenia 25 000 lm/m² powierzchni w cyklu 14/10 godzin (dzień/noc).

Płytki z roślinami inkubowano przez 5 dni (120 godzin). Badania prowadzono w pięciu równoległych powtórzeniach. Ocenę toksycznego oddziaływania węglowodorów na badane rośliny przeprowadzono na podstawie pomiaru stopnia zahamowania wzrostu korzeni w porównaniu z roślinami z próbek kontrolnych.

Współczynnik inhibicji wzrostu korzeni (I_K) obliczono wg wzoru (1):

$$I_K = \frac{L_B - L_A}{L_B} \times 100 \text{ [%]}, \quad (1)$$

gdzie:

I_K – współczynnik inhibicji wzrostu korzeni roślin [%],

L_B – średnia długość korzeni roślin w próbce kontrolnej [cm],

L_A – średnia długość korzeni roślin w próbce skażonej [cm].

4.3.1.2. Hamowanie wzrostu roślin

Test hamowania wzrostu roślin prowadzono metodą wazonową zgodnie z PN-ISO 11269-1 (1998), wykorzystując rośliny opisane w p. 4.1.3. Rośliny hodowano w pojemnikach o średnicy 14 cm, wypełnionych próbkami o masie 400 g testowanej gleby A, pobieranej z wazonów (opis doświadczeń p. 4.5.2.1) po 1, 4, 8 i 12 tygodniach procesu samooczyszczania. W każdym pojemniku umieszczano po 20 skielkowanych nasion (długość kielków nie przekraczała 2 mm), które przykrywano warstwą 1,5 cm ziemi. Doświadczenie prowadzono w warunkach opisanych w p. 4.3.1.1 przez 14 dni, w pięciu powtórzeniach. Równolegle prowadzono eksperyment na próbkach kontrolnych (gleba B). Po dwóch tygodniach inkubacji rośliny wyjęto z pojemników, oczyszczono i zważono. Wynik podano jako współczynnik inhibicji średniego przyrostu całkowitej biomasy roślin (części nadziemnych i korzeni), uzyskanego we wszystkich seriach (powtórzeniach) danego wariantu doświadczenia w odniesieniu do biomasy roślin z próbek kontrolnych.

Współczynnik inhibicji wzrostu roślin (I_R) obliczono wg wzoru (2):

$$I_R = \frac{M_B - M_A}{M_B} \times 100 [\%], \quad (2)$$

gdzie:

I_R – współczynnik inhibicji wzrostu roślin [%],

M_B – średnia masa roślin w próbce kontrolnej [g],

M_A – średnia masa roślin w próbce skażonej [g].

4.3.1.3. Inhibicja glonów *Scenedesmus quadricauda*

Wpływ zanieczyszczeń zawartych w odciekach glebowych (gleba A) na glony badano zgodnie z wytycznymi OECD (1984). Badania prowadzono w kolbach Erlenmeyera o poj. 300 cm³. Próbkę 100 cm³ odcieków glebowych (p. 4.1.2) zaszczepiano 1 cm³ hodowli glonów (10 000 komórek/cm³). Hodowlę prowadzono przy natężeniu światła 9000 lux w temp. 23⁰C. Raz dziennie zawartość kolb dokładnie mieszano. Po określonym czasie hodowli (24, 48 i 72 h) liczono pod mikroskopem komórki glonów. Próbkę kontrolne stanowiły kolbki z odciekami glebowymi otrzymanymi z gleby B. Współczynnik inhibicji wzrostu glonów (I_G) obliczano wg wzoru (3):

$$I_G = \frac{I_B - I_A}{I_B} \times 100 \text{ [%]}, \quad (3)$$

gdzie:

I_G – współczynnik inhibicji wzrostu glonów [%],

I_B – średnia liczba komórek glonów w próbce kontrolnej,

I_A – średnia liczba komórek glonów w próbce badanej.

4.3.2. Testy na dżdżownicach z gatunku *Eisenia fetida*

Wpływ skażenia gleby A substancjami ropopochodnymi na faunę glebową oceniano zgodnie z normą PN-ISO 11268-1 (1997), wykorzystując dorosłe osobniki dżdżownic z gatunku *Eisenia fetida*. Test prowadzono w szklanych, cylindrycznych pojemnikach o pojemności 1,5 dm³, w których umieszczano 800 g badanej gleby oraz 10 dżdżownic (przed wprowadzeniem do gleby zwierzęta selekcionowano pod względem wagi, wielkości i wieku). W doświadczeniach wykorzystywano osobniki dorosłe z dobrze wykształconym siodełkiem, których średnia masa ciała wahała się w granicach 250 ÷ 300 mg. Próby kontrolne stanowiły cylindry wypełnione glebą B. Test prowadzono przez 14 dni w temp. 20⁰C. Wilgotność podłoża utrzymywano na poziomie 70% WHC. Stosowano naturalne oświetlenie (25 000 lm/m²), z podziałem na noc (8 godzin) i dzień (16 godzin). Po 7 i 14 dniach inkubacji określano liczbę osobników żywych i martwych, a żywe dżdżownice ważono. Wyniki wyrażano jako odsetek śmiertelności badanych zwierząt w stosunku do wartości początkowej.

4.3.3. Testy na ślimakach z gatunku *Physa acuta* Drap

Wpływ zanieczyszczeń zawartych w odciekach z gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi na ślimaki *Physa acuta* Drap badano wg Łebkowskiej i in. (1999). Do testu wykorzystywano ślimaki w czwartym stadium rozwoju, tj. młode ślimaki w 6 ÷ 7 dobie rozwoju. Test prowadzono w szklanych krystalizatorach o poj. 100 ml, do których wprowadzano 50 ml badanych odcieków (p. 4.1.2) oraz 10 ślimaków. Obserwacje prowadzono przez 8 godzin. Próbkę kontrolną stanowiły odcieki z gleby B. Badania wykonano w czterech powtórzeniach. Wyniki wyrażano jako odsetek śmiertelności badanych zwierząt w stosunku do wartości początkowej.

4.3.4. Testy mikrobiologiczne

4.3.4.1. Ogólna liczebność mikroorganizmów

Liczebność mikroorganizmów określano metodą posiewu powierzchniowego na podłożach stałych. Oznaczano raz w tygodniu przez okres 3 miesięcy, w czterech równoległych powtórzeniach. Przed przystąpieniem do badań próbki 10 g gleby z wazonów (p. 4.5.2.1) wprowadzano do 90 cm³ sterylnego roztworu soli fizjologicznej i wytrząsano przez 10 minut. Z tak przygotowanej zawiesiny sporządzano szereg rozcieńczeń dziesiętnych, wykorzystywanych do zaszczepiania podłoża hodowlanego. Ilościowe oznaczenie drobnoustrojów w badanych próbkach prowadzono na podstawie liczenia kolonii wyrosłych na podłożu hodowlanym (zakładając, że 1 żywa komórka wytworzy jedną kolonię).

Ogólną liczbę bakterii saprofitycznych oznaczano zgodnie z PN-86034/02 (1994) na podłożu agarowym (MPA), ogólną liczbę promieniowców – na podłożu z arginina (Wellington i Toth, 1999), a ogólną liczbę grzybów pleśniowych na podłożu Czapek-Doxa, zgodnie z PN-86034/07 (1994).

4.3.4.2. Mikroorganizmy rozkładające związki bezazotowe

Liczebność mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów oznaczano metodą posiewu powierzchniowego na podłożu minimalnym z ropą naftową jako jedynym źródłem węgla (Dagher i in., 1997; Daane i in., 2001).

4.3.4.3. Genotoksyczność – test na zdolność do reoperacji DNA u *Bacillus subtilis*

Do oceny genotoksycznego działania substancji ropopochodnych wykorzystano test na zdolność do reoperacji DNA u bakterii *Bacillus subtilis*, opracowany przez Kada (1980). W badaniach wykorzystywano dwa szczepy *Bacillus subtilis*: szczep M45 Rec⁻, charakteryzujący się brakiem zdolności do reoperacji DNA oraz szczep H17 Rec⁺, który posiada tę zdolność. Test polegał na posiewie smugą (na tej samej płytce Petriego) obu szczepów, ze wspólnego punktu w centrum płytki i umieszczeniu w tymże punkcie bibułowego krążka nasączonego ekstraktami zanieczyszczeń znajdujących się w glebach. Z próbek 50 g badanych gleb ekstrahowano zanieczyszczenia heksanem (stosunek objętościowy 1:1). Rozpuszczalnik odparowywano do sucha, masę ekstraktu określono metodą grawimetryczną, a następnie rozpuszczano w 10 cm³ dimetylosulfotlenku (DMSO). Rozpuszczony w DMSO ekstrakt sterylizowano przez filtrację (średnica porów 0,2 μm). Tak przygotowany ekstrakt наносzono na krążek bibułowy. Płytki inkubowano w czasie 24 h w temp. 37⁰C. Po tym okresie mierzyło się strefy zahamowania wzrostu dla szczepów H17 Rec⁺

i M45 Rec⁻ oraz określano ich różnicę. Jeżeli strefa zahamowania wzrostu szczepu M45 Rec⁻, będąca wynikiem działania badanych związków, była odpowiednio większa niż w przypadku szczepu H17 Rec⁺, uznawano, że badane substancje uszkadzają DNA, a tym samym mają właściwości mutagenne. Przy interpretacji wyników przyjęto następujący system oznaczeń (Kada, 1980):

- różnica stref zahamowania wzrostu ≤ 2 mm – brak właściwości mutagennych (-),
- różnica stref zahamowania wzrostu >2 i ≤ 4 mm – związek potencjalnie mutagenny (\pm),
- różnica stref zahamowania wzrostu >4 mm – związek mutagenny (+).

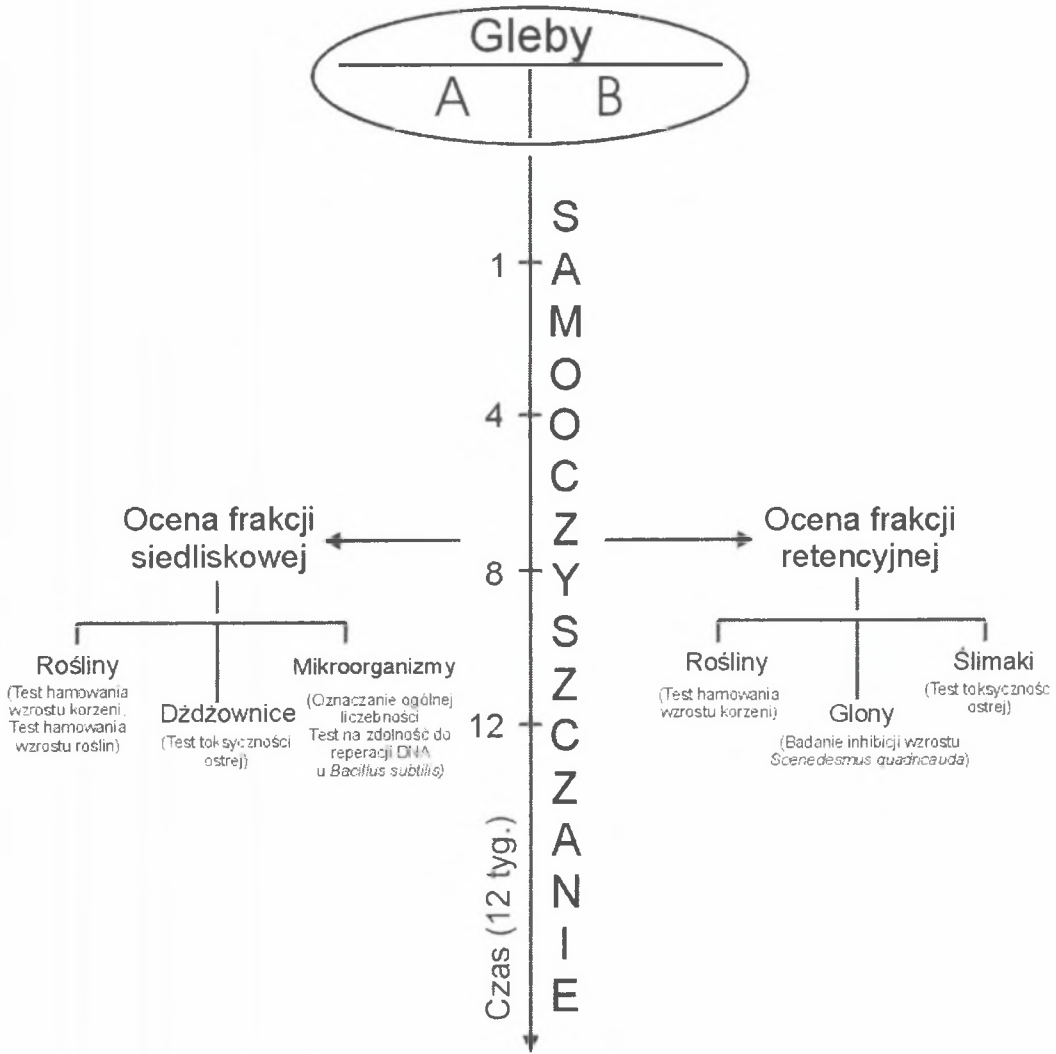
4.4. Analizy mikroskopowe

Obserwacje mikroskopowe prowadzono z użyciem mikroskopu świetlnego Motic microscopes. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na anatomię, morfologię i stopień zmikoryzowania korzeni roślin badano w preparatach barwionych barwnikiem trypan blue oraz kwaśną fuksyną wg Brundrett i in. (1994).

Część fotografii przedstawiających grzyby mikoryzowe wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego Nikon Eclipse 800 z kontrastem Nomarskiego i fluorescencją w III Campusie Uniwersytetu Jagiellońskiego dzięki uprzejmości pani prof. dr hab. Katarzynie Turnau.

4.5. Opis doświadczeń

4.5.1. Schemat doświadczeń



Rys. 1. Schemat prowadzenia doświadczeń

Fig. 1. Schematic diagram of experiment

4.5.2. Badanie wpływu procesu samooczyszczania gleby A na zmianę jej ekotoksyczności – doświadczenia laboratoryjne

W pierwszym etapie doświadczeń laboratoryjnych badano wpływ procesu samooczyszczania gleby A w czasie 12 tygodni na jej ekotoksyczność (rys. 1). Proces samooczyszczania prowadzono w wazonach oraz w lizymetrach. Ekotoksyczność gleby oceniano w stosunku do mikroorganizmów, glonów *Scenedesmus quadricauda*, roślin jednoliściennych (*Triticum vulgare* V. i *Secale cereale* L.) oraz dwuliściennych (*Cardamine pratensis* L., *Trifolium repens* V., *Sinapis alba* L., *Cucumis sativus* L.), dżdżownic *Eisenia fetida* oraz ślimaków *Physa acuta* Drap. Efektywność procesu samooczyszczania oceniano na podstawie zmian stężenia węglowodorów.

4.5.2.1. Opis doświadczeń wazonowych

Wazony wypełniono próbkami gleby A o masie 10 kg (p.4.1.1) i pozostawiono na okres 12 tygodni. Próbkami kontrolnymi były wazony wypełnione glebą B (p.4.1.1). We wszystkich próbkach badanych gleb utrzymywano wilgotność na poziomie 70% WHC przez cały czas trwania eksperymentu. Aby wyeliminować wpływ czynników zewnętrznych, proces prowadzono w komorze klimatycznej firmy TIMKO, w temp. 21/18⁰C (dzień/noc), przy wilgotności powietrza w fitotronie na poziomie 80% i intensywności oświetlenia 25 000 lm/m² powierzchni w cyklu 14/10 godzin (dzień/noc). Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach.

Materiał glebowy pobierano z wazonów po 1, 4, 8 i 12 tygodniach procesu samooczyszczania i wykorzystywano w badaniach mających na celu określenie:

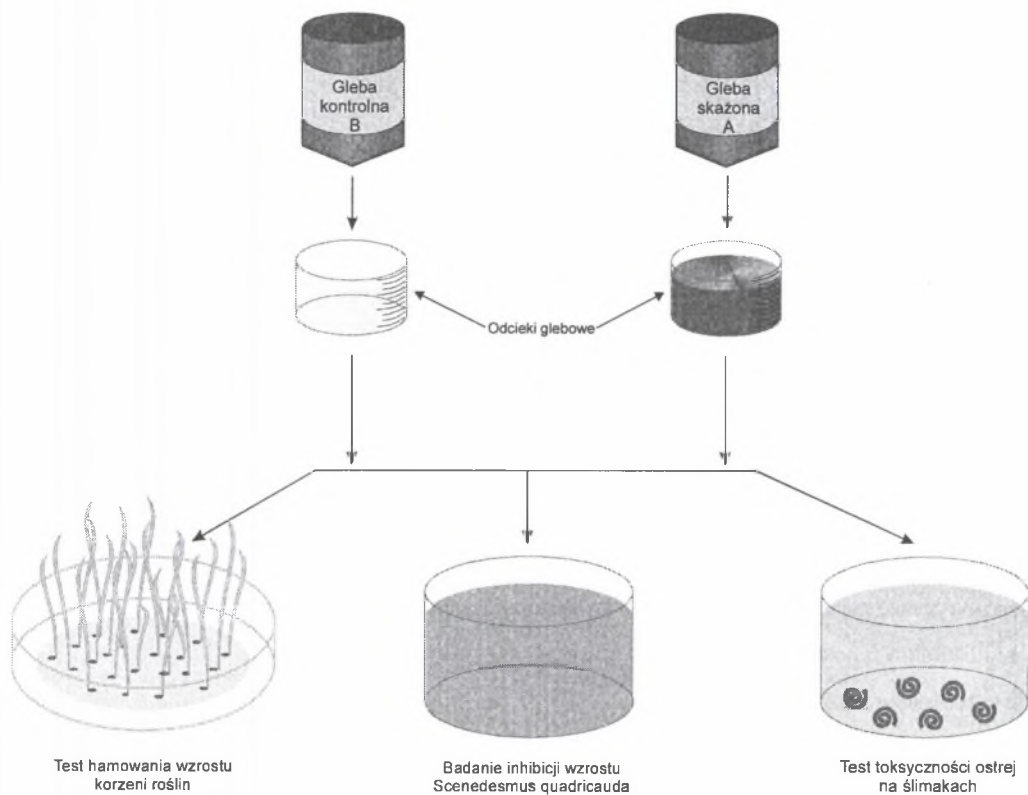
- a) fitotoksyczności,
- b) zootoksyczności,
- c) genotoksyczności.

Wyniki tych doświadczeń umożliwiły ocenę funkcji siedliskowej gleby oraz selekcję roślin najbardziej opornych na zanieczyszczenia znajdujące się w analizowanych próbkach gleb.

4.5.2.2. Metodyka doświadczeń lizymetrycznych

Próbki gleb o masie 10 kg, przygotowane w sposób opisany w p. 4.1.1, umieszczono w lizymetrach (długość, 40 cm, średnica 15 cm) z perforowanym dnem (średnica otworów 1 mm). Pod lizymetrami umieszczono pojemniki, do których spływały odcieki glebowe (rys. 2). Okresowo oznaczano poziom WHC i ewentualnie uzupełniano zawartość wody w

glebie tak, aby utrzymać jej wilgotność na poziomie 70% WHC. Badania prowadzono w pięciu równoległych seriach eksperymentalnych przez 12 tygodni. Analizy odcieków glebowych (pod kątem ilości wymywanych zanieczyszczeń oraz ich toksyczności) prowadzono dla próbek zebranych w pierwszym tygodniu badań, następnie w okresie od pierwszego do czwartego tygodnia (zebrane w tym czasie odcieki uśredniano), od czwartego do ósmego oraz od ósmego do dwunastego tygodnia eksperymentu. Wyniki otrzymane w tej części doświadczeń umożliwiły ocenę funkcji retencyjnej gleby.



Rys. 2. Schemat prowadzenia badań z użyciem lizymetrów

Fig. 2. Schematic diagram of lysimeters experiment

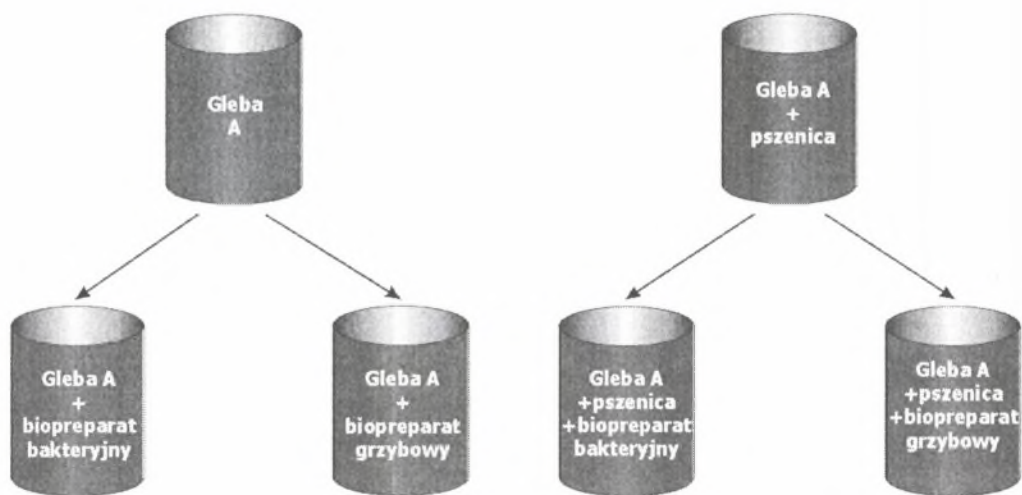
4.5.3. Badanie procesu fitoremediacji wspomagananej biopreparatami

Drugi etap badań obejmował analizę procesu fitoremediacji gleby A w aspekcie wpływu jej doszczepiania biopreparatami otrzymanymi z organizmów autochtonicznych pozyskanych

z gleb zanieczyszczonych ropą naftową i jej pochodnymi (sposób przygotowania biopreparatów oraz ich opis podano w załącznikach 1 i 2).

Badania prowadzono w warunkach naturalnych, a schemat ich prowadzenia przedstawiono na rysunku 3.

Próbki gleb o masie 10 kg, przygotowane w sposób opisany w p. 4.1.1, umieszczono w lizymetrach (długość 40 cm, średnica 15 cm) z perforowanym dnem (średnica otworów 1 mm). Pod lizymetrami umieszczono pojemniki, do których spływały odcieki glebowe. Połowę próbek w lizymetrach obsiano pszenicą, która okazała się najbardziej oporna na zanieczyszczenia wśród wszystkich testowanych roślin. Dodatkowo do odpowiednich próbek wprowadzono po 50 cm³ biopreparatu/kg gleby. Doświadczenia wykonywano w okresie letnim (od maja do sierpnia). Okresowo badano poziom WHC i ewentualnie uzupełniano zawartość wody w glebie tak, aby utrzymać jej wilgotność na poziomie 70% WHC. Badania prowadzono w trzech równoległych seriach eksperymentalnych przez 12 tygodni.



Rys.3. Schemat prowadzenia badań polowych z użyciem lizymetrów

Fig.3. Schematic diagram of field experiment with lysimeters

4.6. Statystyczna ocena wyników badań

Matematyczne opracowanie wyników prowadzono zgodnie z zaleceniami normy PN-ISO 11269-1 (1998). Obliczano:

- średnią arytmetyczną,
- odchylenie standardowe.

Do statystycznej analizy wyników uzyskanych w testach toksyczności wykorzystano test t-Dunnetta (ISO 11269-1, 1998). Niepewność rozrzerzoną U_R wyznaczono na podstawie metody walidacyjnej IETU.

Współzależność między badanymi cechami określano na podstawie współczynnika korelacji wg Zgirskiego i Gondko (1998).

5. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

5.1. Porównanie właściwości gleby zanieczyszczonej węglowodorami (gleba A) i gleby nie zanieczyszczonej (gleba kontrolna – B)

Gleba jest zasadniczym elementem ekosystemów lądowych, decydującym o utrzymaniu życia na ziemi. We współczesnym podejściu do ochrony gleb zwraca się uwagę na jej funkcje siedliskowe, związane z decydującą rolą jakości gleb w funkcjonowaniu ekosystemów nierolniczych, współtworzących krajobraz. Do ważniejszych funkcji gleb zalicza się także ich rolę retencyjną wynikającą ze zdolności sorpcyjnych i buforowych, dzięki czemu gleby spowalniają procesy migracji zanieczyszczeń w środowisku.

Badania prowadzono na próbkach gleb oznaczonych jako A (gleba zanieczyszczona) oraz B (gleba kontrolna). Ważniejsze właściwości fizykochemiczne gleb wykorzystywanych w doświadczeniach zestawiono w tabeli 3.

Na podstawie analiz granulometrycznych próbki glebowe A oraz B sklasyfikowano jako glina ciężka pylasta (gcp).

Odczyn - decydujący o mechanizmie, kinetyce i wydajności wielu procesów biologicznych i fizykochemicznych przebiegających w środowisku przyrodniczym w przypadku obu badanych gleb jest podobny i wynosi ok. 6,5. Gleba zanieczyszczona A wykazuje znacznie wyższy stopień wysycenia kompleksu sorpcyjnego oraz mniejszą pojemność sorpcyjną w stosunku do kationów aniżeli gleba B. Pojemność sorpcyjna gleb w stosunku do kationów jest wielkością zmienną i zależną od właściwości danej gleby, niemniej jednak daje pogląd na zdolność magazynowania przez nie składników pokarmowych oraz na właściwości buforowe. Według Lityńskiego (1982) gleby o zdolności sorpcyjnej $<3,5$ cmol/kg gleby są glebami słabymi.

W glebie zanieczyszczonej A oznaczono mniejsze stężenie azotu ogólnego oraz fosforu – pierwiastków niezbędnych roślinom jako materiał budulcowy białek i fosfolipidów. Jak podaje Lityński (1982), dostępność azotu dla roślin zależy od stosunku węgla do azotu w glebie. Jeżeli C:N wynosi powyżej 33:1, wówczas następuje zmniejszenie szybkości mineralizacji substancji organicznej oraz pobierania azotu przyswajalnego dla roślin. Sytuację taką mamy w glebie zanieczyszczonej A.

Właściwości fizykochemiczne gleb wykorzystywanych w badaniach

Właściwości fizykochemiczne gleb		Gleba A - skażona*	Gleba B - kontrolna*
1. Odczyn	pH	6,2 ± 0,5	6,5 ± 0,5
Kwasowość hydrolityczna	cmol/kg gleby	13,7 ± 0,9	9,1 ± 0,6
Suma kationów metali o charakterze zasadowym	cmol/kg gleby	0,6 ± 0,04	0,8 ± 0,05
Pojemność sorpcyjna gleb w stosunku do kationów	cmol/kg gleby	1,4 ± 0,08	3,5 ± 0,2
Stopień wysycenia kompleksu sorpcyjnego	cmol/kg gleby	39,0 ± 2,7	21,6 ± 1,5
Substancja organiczna	%	5,6 ± 0,4	8,9 ± 0,6
Węgiel organiczny	%	3,8 ± 0,3	2,2 ± 0,2
Zawartość próchnicy	%	6,6 ± 0,5	3,7 ± 0,3
Kwasy huminowe	%	10,3 ± 0,7	6,8 ± 0,4
Azot ogólny	g/kg gleby	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Azot amonowy	g/kg gleby	0,09 ± 0,006	0,14 ± 0,02
Azot azotanowy	g/kg gleby	0,28 ± 0,02	0,46 ± 0,01
Azot azotynowy	g/kg gleby	0,0017 ± 0,001	0,001 ± 0,0009
Fosfor ogólny	g/kg gleby	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,02
Stosunek C:N	-	100: 4	100:10

*- wartość średnia ± odchylenie standardowe (n=3)

W tabeli 4 przedstawiono stężenia podstawowych grup zanieczyszczeń węglowodorowych (alifatycznych, aromatycznych i frakcji ciężkich) występujących w analizowanych próbkach gleb, a w tabeli 5 – stężenia występujących w niej WWA.

Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że w glebie A stężenia węglowodorów alifatycznych i aromatycznych są ponad 200 razy wyższe niż w glebie B, a frakcji ciężkich prawie 3000 razy wyższe.

Na podstawie Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w Sprawie Standardów Jakości Gleby oraz Standardów Jakości Ziemi. (DzU z dnia 4 października 2002 r.) dopuszczalne sumaryczne stężenie 9 WWA w glebach zakwalifikowanych do grupy C (tereny przemysłowe, użytki kopalne, tereny komunikacyjne) dla poziomu 0-2 m ppt nie powinno przekraczać 250 mg WWA/kg s.m.g, a pojedynczych węglowodorów należących do tej grupy 50 mg/kg s.m.g. Próbki gleb A i B używanych w badaniach mieszczą się w tych standardach.

Stężenia zanieczyszczeń węglowodorowych występujących w analizowanych próbkach glebowych

Rodzaj zanieczyszczenia	Stężenia węglowodorów [g/kg s.m.g.**]	
	Gleba A – skażona	Gleba B - kontrolna
Węglowodory alifatyczne	54,9 ± 6,6	0,2 ± 0,02
Węglowodory aromatyczne	10,4 ± 1,3	0,05 ± 0,01
Fracje ciężkie	117,7 ± 2,5	0,04 ± 0,001

* – wartość średnia ± U_R (n=3)

**s.m.g. – suchej masy gleby

U_R – niepewność rozszerzona

Stężenie WWA w próbkach gleb wykorzystywanych do badań

WWA	Stężenie WWA * [mg/kg s.m.g.**]	
	Gleba A - skażona	Gleba B - kontrolna
Naftalen	1,00 ± 0,30	pgo
Acenaften	0,22 ± 0,06	pgo
Fluoren	0,21 ± 0,06	0,02 ± 0,006
Fenantren	3,73 ± 1,10	0,07 ± 0,02
Antracen	2,76 ± 0,81	0,02 ± 0,006
Fluoranten	4,82 ± 1,40	0,34 ± 0,10
Piren	9,08 ± 2,56	0,10 ± 0,03
Benzo(a)antracen	3,98 ± 1,11	0,03 ± 0,008
Chryzen	12,60 ± 3,52	0,11 ± 0,03
Benzo(b)fluoranten	3,92 ± 1,13	0,23 ± 0,07
Benzo(k)fluoranten	1,72 ± 0,49	0,06 ± 0,02
Benzo(a)piren	2,72 ± 0,76	0,44 ± 0,12
Benzo(ghi)perylene	2,62 ± 0,81	0,24 ± 0,07
Dibenzo(a,h)antracen	0,84 ± 0,26	0,10 ± 0,03
Indeno(1,2,3-cd)piren	3,42 ± 0,95	0,80 ± 0,22
Σ 9 WWA	27,61	1,31

* – wartość średnia ± U_R (n=3)

**– s.m.g. suchej masy gleby

U_R – niepewność rozszerzona

Σ 9 WWA (naftalen, fenantren, antracen, fluoranten, chryzen, benzo(a)antracen, benzo(a)piren, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perylene)

pgo – poniżej granicy oznaczalności

5.2. Wpływ procesu samooczyszczania na ekotoksyczność gleby A (ocena funkcji siedliskowej)

5.2.1. Ocena fitotoksyczności gleby

Wyniki badań umożliwiających ocenę funkcji siedliskowej gleby zostały przedstawione w podrozdziałach 5.2 ÷ 5.3.

5.2.1.1. Test hamowania wzrostu korzeni roślin „in vitro”

Wyniki badania długości korzeni roślin rosnących w glebie kontrolnej B i w glebie skażonej A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni zamieszczono w tabeli 6. Zawarto w niej także wyniki analizy statystycznej (z zastosowaniem testu Dunetta) istotności różnic długości korzeni roślin rosnących w glebach skażonych (A) i w glebie kontrolnej (B). Zmiany fitotoksyczności (wyrażonej przez współczynnik inhibicji wzrostu korzeni roślin I_K) gleby A zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi, poddanej procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni, przedstawiono na rys. 4.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że przeciętna długość korzeni roślin rosnących w glebie A była ok. dwukrotnie mniejsza od obserwowanej w przypadku roślin rosnących w kontrolnej, nieskażonej glebie B (tab. 6). Zanieczyszczenia znajdujące się w glebie A powodowały istotną inhibicję wzrostu korzeni roślin (rys. 4). Fitotoksyczność zanieczyszczeń zawartych w glebie A nie zmieniła się znacząco podczas procesu samooczyszczania gleby (rys. 4) i w dwunastym tygodniu badań pozostawała nadal wysoka, o czym świadczy ok. 40% inhibicja wzrostu korzeni pszenicy i gorczycy, 50% - ogórka, ponad 60% - żyta i ok. 70% - rzeżuchy i koniczyny. W przypadku pszenicy i ogórka stopień zahamowania wzrostu korzeni roślin nie był uzależniony od czasu trwania procesu samooczyszczania. W przypadku żyta i gorczycy odnotowano istotnie mniejszą fitotoksyczność gleby A po jej samooczyszczaniu przez co najmniej 4 tygodnie. Efekty fitotoksyczności gleby A poddawanej samooczyszczaniu w czasie 4, 8 i 12 tygodni utrzymywały się mniej więcej na stałym poziomie. Zaskakującym efektem była większa inhibicja wzrostu korzeni koniczyny w glebie A poddanej długotrwałemu procesowi samooczyszczania (8-12 tygodni), w porównaniu z glebą oczyszczaną w czasie 1-4 tygodni. Rośliną najbardziej odporną na zanieczyszczenia znajdujące się w glebie A była pszenica (rys. 4).

Zmiany długości korzeni roślin pod wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych, pozostałych w glebie A po jej samoczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni; statystyczną istotność różnic długości korzeni oceniano testem Dunnetta

Rośliny	Długość korzeni roślin w glebie kontrolnej B i w glebie skażonej A (po jej samoczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni)											
	1 tydzień			4 tydzień			8 tydzień			12 tydzień		
	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D
Jednoliścienne												
Pszenica	7,17±0,62	4,42±0,45	+	7,55±0,45	5,17±0,55	+	7,02±0,64	4,66±0,32	+	7,31±0,62	4,46±0,47	+
Żyto	6,76±0,53	1,68±0,98	+	5,93±0,49	2,56±0,31	+	6,98±0,51	2,69±0,36	+	6,34±0,55	2,32±0,17	+
Dwuliścienne												
Rzeżucha	4,40±0,31	1,92±0,19	+	4,40±0,5	1,78±0,08	+	5,63±0,44	2,05±0,17	+	4,92±0,37	1,51±0,09	+
Koniczyna	1,04±0,08	0,73±0,54	+	0,98±0,07	0,66±0,07	+	1,27±0,09	0,4±0,06	+	1,13±0,15	0,34±0,02 7	+
Gorzycza	4,9±0,32	1,49±0,11	+	6,09±0,33	3,24±0,39	+	6,47±0,03 8	3,96±0,27	+	5,52±0,61	3,24±0,41	+
Ogórek	5,92±0,61	3,53±0,29	+	6,06±0,54	3,23±0,21	+	4,48±0,5	2,42±0,29	+	5,6±0,40	2,73±0,19	+

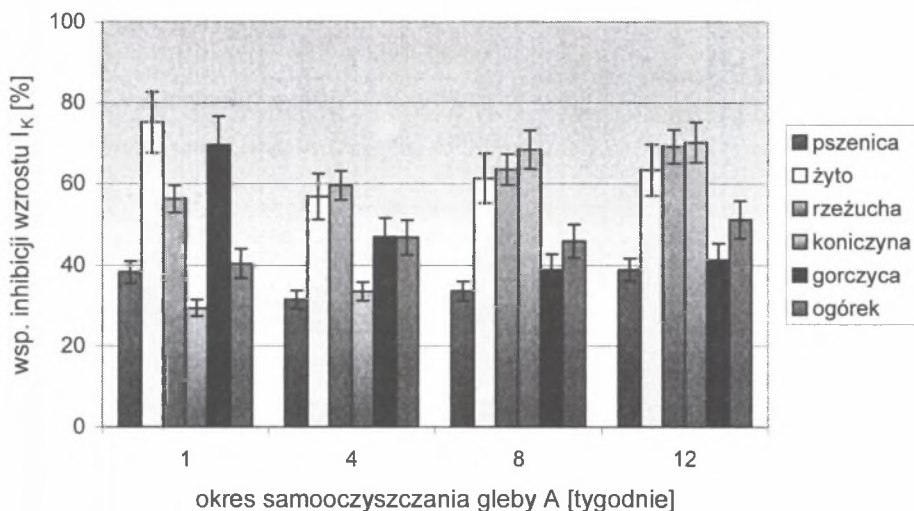
L_B – średnia długość korzeni roślin w próbce gleby B – kontrolnej [cm]

L_A – średnia długość korzeni roślin w próbce gleby A – skażonej [cm]

SD – odchylenie standardowe [cm]

t_D – test istotności Dunnetta (ocena istotności różnic długości korzeni)

+ – różnica długości korzeni roślin pomiędzy próbkami A i B istotna statystycznie przy poziomie ufności 95% i n=25



Rys. 4. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję wzrostu korzeni roślin względem roślin z próbek kontrolnych

Fig. 4. The influence of residual petroleum contaminations during self-cleaning process after 1, 4, 8 and 12 weeks on the plants roots growth inhibition in comparison to plants from control samples

5.2.1.2. Test hamowania wzrostu roślin „in vitro”

Zmiany fitotoksyczności gleby A zanieczyszczonej węglowodorami ropopochodnymi poddanej procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni przedstawiono w tab. 8 oraz na rys. 6. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że zanieczyszczenia znajdujące się w glebie A powodowały istotną inhibicję wzrostu roślin (rys. 5, tab. 7). W przypadku pszenicy już po pierwszym tygodniu procesu samooczyszczania odnotowano istotnie mniejszą fitotoksyczność gleby A.

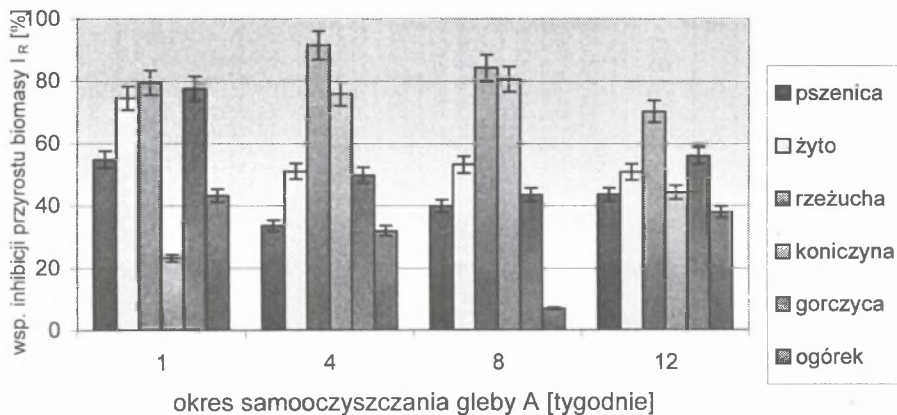
Zanieczyszczenia pozostałe w glebie A po pierwszym tygodniu samooczyszczania powodowały ok. 75% inhibicję przyrostu biomasy żyta. Współczynnik inhibicji I_R uległ zmniejszeniu o ok. 20% w przypadku roślin uprawianych na glebie oczyszczanej przez 4 tygodnie. Dalsze wydłużanie czasu samooczyszczania gleby A nie powodowało istotnych zmian efektu hamowania wzrostu żyta.

W przypadku koniczyny uprawianej na glebie A poddanej procesowi samooczyszczania w czasie 4 i 8 tygodni zaobserwowano większą fitotoksyczność gleby w porównaniu z glebą oczyszczaną w czasie 1 i 12 tygodni. Wartość współczynnika inhibicji przyrostu biomasy

koniczyny dla roślin uprawianych na glebie A po 1 tygodniu procesu samooczyszczania wzrosła z ok. 23% do 85% w tygodniu 8, po czym spadła o połowę po 12 tygodniu (rys. 5).

Rośliną najbardziej wrażliwą na zanieczyszczenia znajdujące się w glebie skażonej A była rzeżucha. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały bardzo wysoki współczynnik inhibicji przyrostu biomasy, wynoszący ok. 80% i utrzymujący się przez cały czas trwania procesu samooczyszczania gleby mniej więcej na stałym poziomie ($\pm 10\%$).

Rośliną najbardziej odporną na zanieczyszczenia znajdujące się w glebie A obok pszenicy był ogórek. Wartość współczynnika inhibicji przyrostu biomasy tej rośliny pozostawała stosunkowo niska i wynosiła ok. 38% przez cały okres doświadczenia (wyjątek stanowił okres po 8 tygodniach procesu samooczyszczania, kiedy to odnotowano najniższą jego wartość, wynoszącą 7%), (rys. 5).



Rys. 5. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję przyrostu biomasy roślin względem roślin z próbek kontrolnych

Fig. 5. The influence of residual petroleum contaminations during self-cleaning process after 1, 4, 8 and 12 weeks on the plant's biomass inhibition in comparison to plants from control samples

Tabela 7

Zmiany biomasy roślin pod wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych, pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni; statystyczną istotność różnic biomasy roślin oceniano testem Dunnetta

Rośliny	Biomasa roślin w glebie kontrolnej B i w glebie skażonej A (po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni)											
	1 tydzień			4 tydzień			8 tydzień			12 tydzień		
	$M_B \pm SD$	$M_A \pm SD$	t_D	$M_B \pm SD$	$M_A \pm SD$	t_D	$M_B \pm SD$	$M_A \pm SD$	t_D	$M_B \pm SD$	$M_A \pm SD$	t_D
Jednoliścienne												
Pszenica	1,077±0,097	0,487±0,041	+	1,444±0,146	0,958±0,073	-	1,543±0,099	0,928±0,087	-	1,78±0,210	1,004±0,081	-
Żyto	1,044±0,13	0,265±0,031	+	1,121±0,087	0,548±0,036	+	1,015±0,113	0,475±0,032	+	1,272±0,085	0,625±0,050	+
Dwuliścienne												
Rzeżucha	0,282±0,017	0,058±0,006	+	0,278±0,032	0,024±0,003	+	0,141±0,021	0,022±0,003	+	0,308±0,024	0,091±0,011	+
Koniczyna	0,169±0,014	0,130±0,019	-	0,144±0,012	0,035±0,004	+	0,289±0,022	0,056±0,006	+	0,15±0,017	0,083±0,009	+
Gorczyca	0,594±0,042	0,133±0,009	+	0,56±0,044	0,281±0,032	+	0,604±0,058	0,341±0,038	+	0,811±0,071	0,357±0,028	+
Ogórek	3,18±0,36	1,805±0,137	+	3,123±0,275	2,123±0,172	+	2,367±0,216	2,204±0,154	-	3,25±0,222	2,014±0,173	+

M_B – średnia masa roślin w próbce gleby B - kontrolnej [g]

M_A – średnia masa roślin w próbce gleby A - skażonej [g]

SD – odchylenie standardowe [g]

t_D – test istotności Dunnetta (ocena istotności różnic długości korzeni)

+ – różnica masy roślin próbek A i B istotna statystycznie przy poziomie ufności 95%, dla n=25

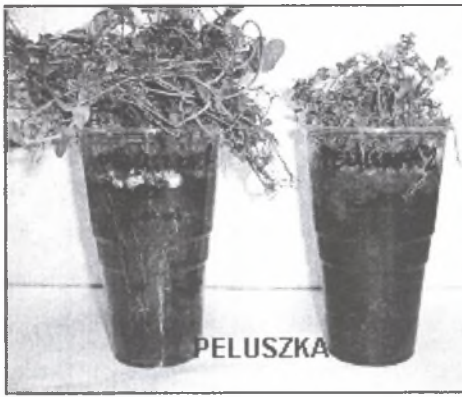
-- różnica masy roślin próbek A i B nieistotna statystycznie przy poziomie ufności 95%, dla n =25

5.2.2. Rozwój roślin w glebie skażonej substancjami ropopochodnymi

Aby w pełni potwierdzić wyniki testów fitotoksyczności prowadzonych zgodnie z p. 4.3.1.2, przeprowadzono eksperyment, w którym rośliny hodowano w pojemnikach o średnicy 14 cm wypełnionych próbkami gleby A o masie 400 g. W każdym pojemniku umieszczano 20 skielkowanych nasion (długość kiełków nie przekraczała 2 mm), które przykrywano warstwą 1,5 cm ziemi. Doświadczenie prowadzono w warunkach opisanych w p. 4.3.1 przez 3 miesiące, w pięciu powtórzeniach. Równolegle prowadzono eksperyment na próbkach kontrolnych (gleba B). Wyniki uzyskane w poprzednim etapie doświadczeń sugerowały, że rośliny jednoliścienne charakteryzują się dużą odpornością na toksyczne działanie węglowodorów. Z tego względu w dalszych badaniach wykorzystano, oprócz pszenicy (*Triticum vulgare*), także owies (*Avena sativa*) oraz jęczmień (*Hordeum vulgare*). Spośród roślin dwuliściennych wybrano te, które są stosowane jako typowy poplon, tj. groch siewny - peluszkę (*Pisum arvense*), gorczycę białą (*Sinapis alba*) i łubin żółty (*Lupinus luteus*).

W eksperymencie tym oceniano nie tylko wpływ zanieczyszczeń zawartych w glebie A na wzrost i rozwój testowanych roślin, lecz również oddziaływanie zanieczyszczeń na budowę ich systemów korzeniowych, a także możliwość adaptacji roślin w wyniku wytworzenia ścisłych zależności pomiędzy nimi a organizmami ryzosferowymi.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że zanieczyszczenia ropopochodne zawarte w glebie A wpływały negatywnie na wzrost i rozwój wszystkich badanych roślin, a w szczególności dwuliściennych. Roślinami najbardziej wrażliwymi były łubin i gorczyca, które po wykiełkowaniu nie były zdolne wykształcić prawidłowych systemów korzeniowych i zamierały. Rośliną bardzo wrażliwą na zanieczyszczenia ropopochodne okazała się również peluszka, u której stwierdzono znaczną redukcję zarówno systemu korzeniowego, jak i części nadziemnych (rys. 6).



gleba B

gleba A



gleba B

gleba A

Rys. 6. Porównanie wzrostu peluszek na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi

Fig. 6. The comparison of field pea growth in uncontaminated soil B and soil A contaminated with petroleum products

Jęczmień rosnący w glebie A wytworzył najbardziej rozbudowany system korzeniowy, jednakże zanieczyszczenie spowodowało jego redukcję w odniesieniu do roślin z gleby kontrolnej B (rys. 7). Rośliny w glebie A rozwijały się nieco szybciej niż w glebie B, ale po początkowym okresie intensywnego wzrostu obserwowano zasychanie i obumieranie części nadziemnych.



gleba B

gleba A



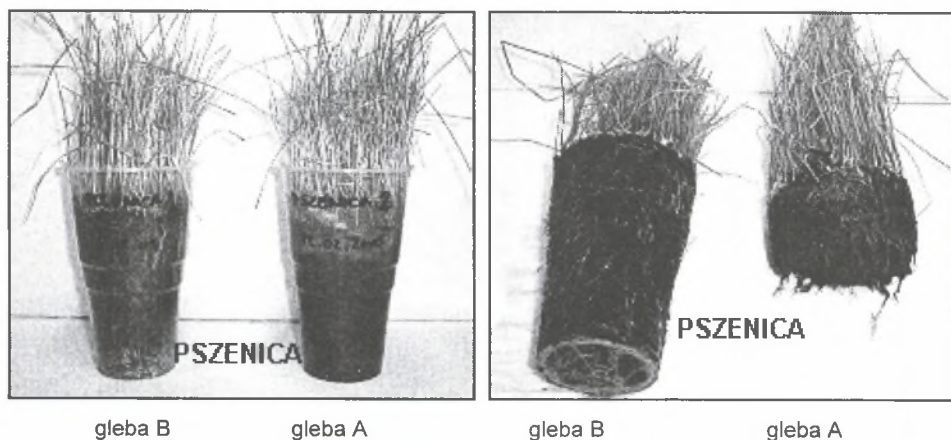
gleba B

gleba A

Rys. 7. Porównanie wzrostu jęczmienia na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi

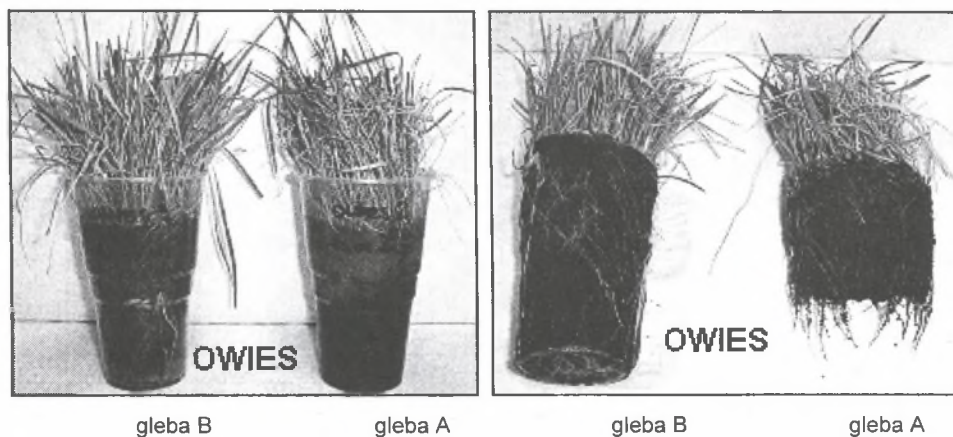
Fig. 7. The comparison of barley growth in uncontaminated soil B and soil A contaminated with petroleum products

W przypadku pszenicy rosnącej na zanieczyszczonej glebie A stwierdzono wprawdzie znaczną redukcję systemu korzeniowego, w porównaniu z roślinami z próbki kontrolnej (na glebie B), jednak nie zaobserwowano negatywnego wpływu zanieczyszczeń na część nadziemną (rys. 8).



Rys. 8. Porównanie wzrostu pszenicy na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi
 Fig. 8. The comparison of wheat growth in uncontaminated soil B and soil A contaminated with petroleum products

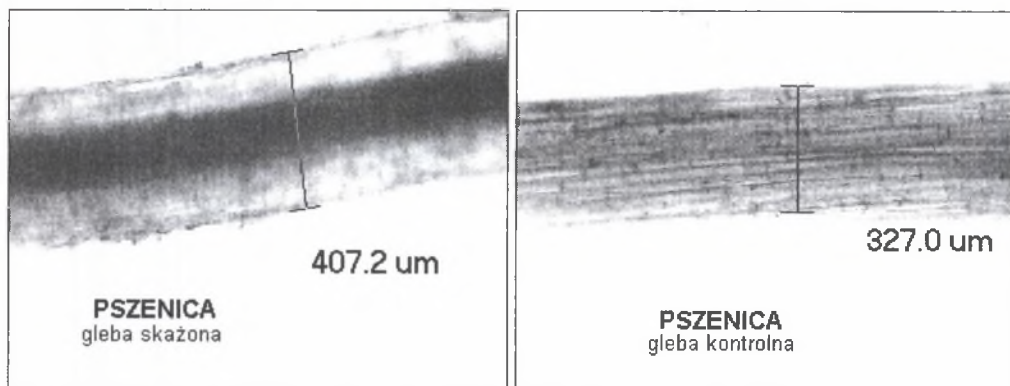
System korzeniowy owsa rosnącego na glebie A charakteryzował się prawie dwukrotnie mniejszą masą w porównaniu z roślinami z gleby B, natomiast zanieczyszczenia obecne w glebie A w małym stopniu wpłynęły na wzrost i rozwój części nadziemnej roślin (rys. 9).



Rys. 9. Porównanie wzrostu owsa na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi
 Fig. 9. The comparison of oat growth in uncontaminated soil B and soil A contaminated with petroleum products

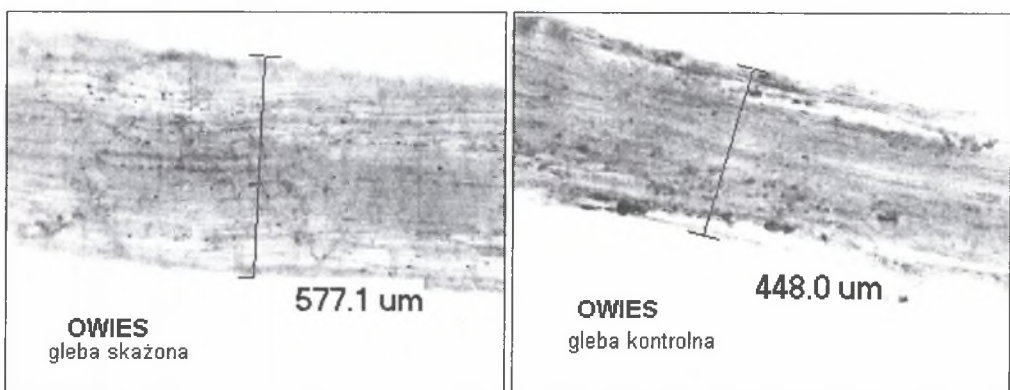
5.2.2.1. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na budowę systemów korzeniowych roślin

Na podstawie przeprowadzonych analiz mikroskopowych korzeni badanych roślin stwierdzono istotny wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na ich budowę morfologiczną. Zaobserwowano skrócenie długości korzeni roślin (rys. 6÷9) z jednoczesnym wzrostem ich grubości, co pokazano na przykładzie pszenicy (rys. 10) i owsa (rys. 11). Do szczególnie niekorzystnych efektów można zaliczyć zacopowanie naczyń przewodzących, a także deformację i plazmolizę niektórych komórek skórki, kory pierwotnej i endodermis (rys. 10 i 11).



Rys. 10. Porównanie grubości korzeni pszenicy z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x)

Fig. 10. The comparison of roots' diameter of wheat from contaminated soil A and control soil B (magnification 100x)



Rys. 11. Porównanie grubości korzeni owsa z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x)

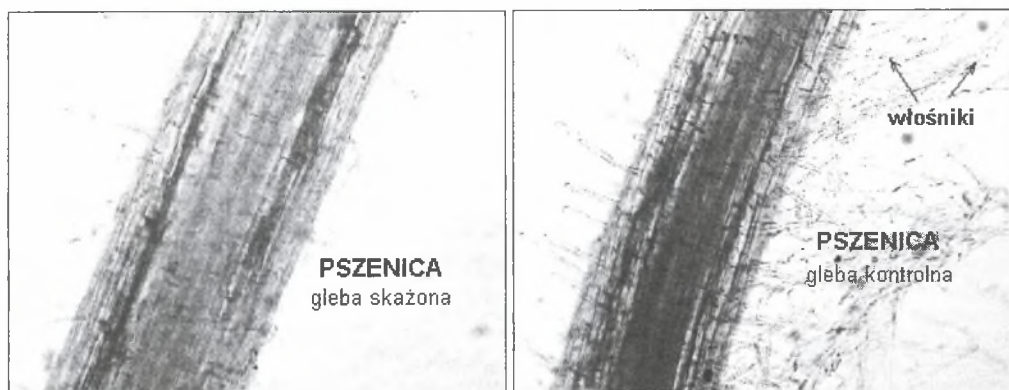
Fig. 11. The comparison of roots diameter of oat from contaminated soil A and control soil B (magnification 100x)

Rośliny narażone na długotrwały kontakt z substancjami ropopochodnymi posiadały zmodyfikowane korzenie (rys. 12÷15). Komórki skórki korzeniowej nie wytwarzały

włośników, co pociągało za sobą redukcję strefy włosnikowej lub całkowity jej zanik. Stwierdzono również zmniejszone rozgałęzianie korzeni bocznych.



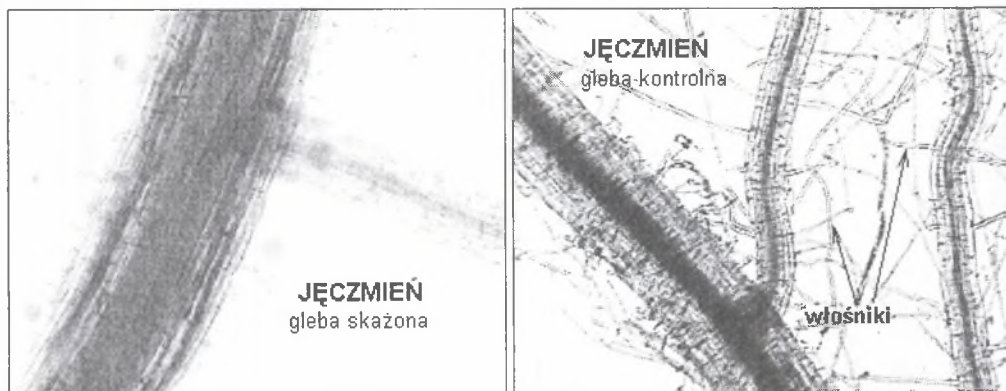
Rys. 12. Zmodyfikowany korzeń peluszki z gleby skażonej A (powiększenie 400x)
Fig. 12. Modified root of field pea from contaminated soil A (magnification 400x)



Rys. 13. Zmodyfikowany korzeń pszenicy z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x)
Fig. 13. Modified root of wheat from contaminated soil A and from control soil (magnification 100x)

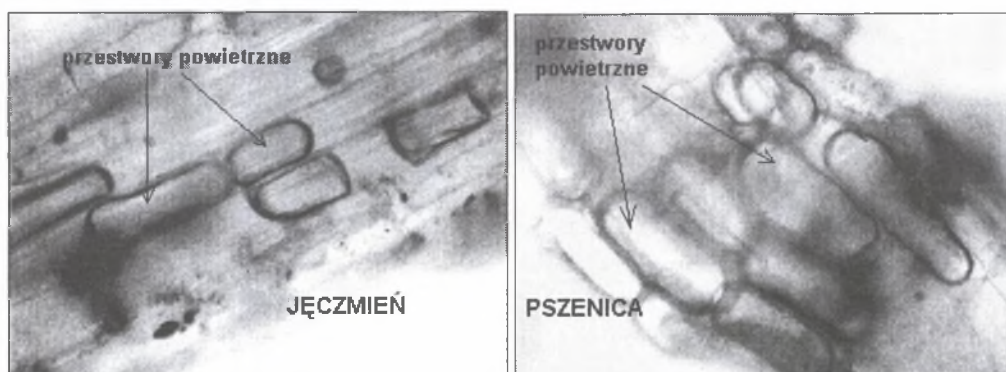


Rys. 14. Zmodyfikowany korzeń jęczmienia z gleby skażonej A (powiększenie 100x)
Fig. 14. Modified root of barley from contaminated soil A (magnification 100x)



Rys. 15. Zmodyfikowany korzeń jęczmienia z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x)
 Fig. 15. Modified root of barley from contaminated soil A and control soil B (magnification 100x)

W przeciwieństwie do roślin z próbek gleby B kontrolnej w korzeniach roślin rosnących na glebie A zanieczyszczonej produktami naftowymi tworzy się tkanka powietrzno-aerenchymatyczna, o czym świadczy obecność licznych przestworów powietrznych (rys. 16). Przestwory te występowały głównie u roślin jednoliściennych.



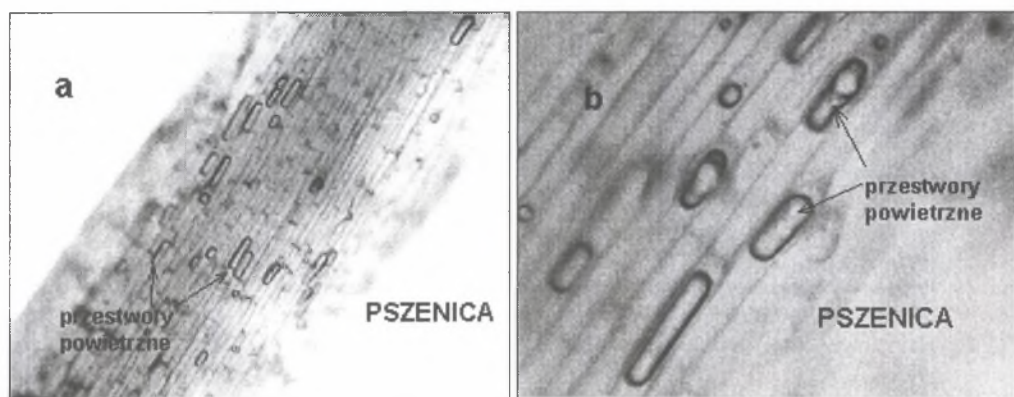
Rys. 16. Przestwory powietrzne aerenchymy wytworzonej w korzeniach roślin hodowanych na glebie skażonej A (powiększenie 400x)
 Fig. 16. Aerenchyma formations in plant's roots growing at contaminated soil A (magnification 400x)

Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że spośród testowanych gatunków roślin na największą uwagę zasługują owies oraz pszenica, które jako jedyne wytworzyły wprawdzie zredukowany, ale odporny na zanieczyszczenia zawarte w glebie A system korzeniowy. Ponadto wytworzony przez nie aparat asymilacyjny nie różnił się zasadniczo od nadziemnej części roślin w próbkach kontrolnych (na nieskażonej glebie B).

5.2.2.2. Porównanie budowy korzeni roślin jednoliściennych pochodzących z różnych gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi

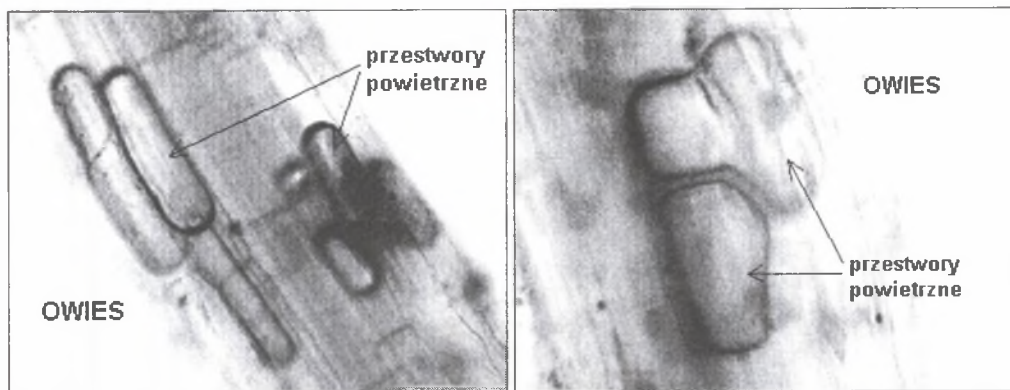
Aby potwierdzić wyniki badań wazonowych dotyczących wpływu zanieczyszczenia gleby substancjami ropopochodnymi na morfologię korzeni roślin, zwłaszcza jednoliściennych, przeprowadzono dodatkowe badania porównawcze, obejmujące obserwację mikroskopową korzeni wybranych roślin pochodzących z terenów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Rośliny pozyskano z miejsc znajdujących się wokół stacji paliw, terenów baz transportowych oraz pól uprawnych zlokalizowanych przy trasach komunikacyjnych.

Wyniki przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych korzeni pszenicy (rys. 17), owsa (rys. 18) i traw (rys. 19, 20) pobranych z różnych środowisk zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi wykazały redukcję strefy włośnikowej korzeni roślin, a także obecność licznych przestworów powietrznych, co stanowi potwierdzenie wyników badań wazonowych przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych (p. 5.2.2; rys. 16).



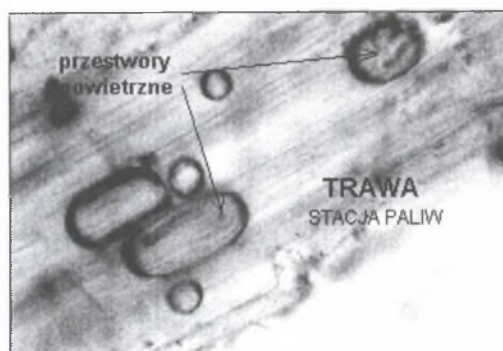
Rys. 17. Przestwory powietrzne aerenchymy w korzeniach pszenicy uprawianej przy trasie komunikacyjnej (powiększenie - a: 100x; b: 400x)

Fig. 17. Aerenchyma formations in wheat roots planted nearby the communication rout (magnification - a: 100x; b: 400x)



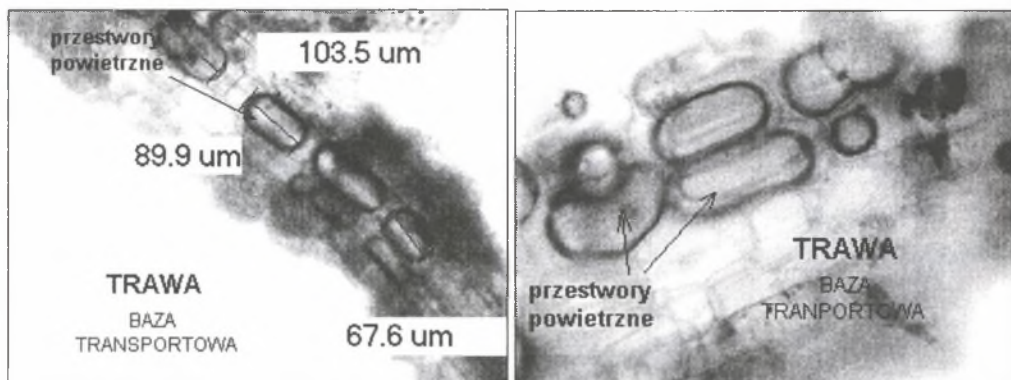
Rys. 18. Przestwory powietrzne aerenchymy w korzeniach owsa uprawianego przy trasie komunikacyjnej (powiększenie 400x)

Fig. 18. Aerenchyma formations in oat roots planted nearby the communication rout (magnification 400x)



Rys. 19. Przestwory powietrzne aerenchymy w korzeniach traw zebranych na terenie stacji paliw (powiększenie 400x)

Fig. 19. Aerenchyma formations in grass roots collected at the area of on petrol station (magnification 400x)



Rys. 20. Przestwory powietrzne aerenchymy w korzeniach traw zebranych na terenie bazy transportowej (powiększenie 400x)

Fig. 20. Aerenchyma formations in grass roots collected at the area of transport base (magnification 400x)

5.2.3. Wpływ gatunku rośliny na liczebność mikroorganizmów ryzosferowych

Badania wpływu gatunku rośliny na ilość mikroorganizmów ryzosferowych prowadzono w kulturach wazonowych przez dwanaście tygodni. Do testów użyto gleby kontrolnej B oraz gleby A skażonej substancjami ropopochodnymi. W każdej z badanych gleb przed założeniem hodowli wazonowych oznaczono ogólną liczbę bakterii saprofitycznych (OLB), ogólną liczbę grzybów pleśniowych (OLG) oraz promieniowców (P). Następnie próbki gleb A i B umieszczono w wazonach, które obsiano jęczmieniem, owsem, pszenicą i peluszką.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że rośliny (niezależnie od ich gatunku) stymulowały wzrost i rozwój mikroorganizmów ryzosferowych w porównaniu z próbkami bez roślin (tab. 8). Największy przyrost ilości bakterii wystąpił w ryzosferze jęczmienia - zarówno w glebie skażonej A (wzrost o 5 rzędów wielkości), jak i czystej B (wzrost o 4 rzędy wielkości), natomiast najmniejszy (o 3 rzędy wielkości) w ryzosferze owsa rosnącego na glebie A oraz w ryzosferze pszenicy uprawianej na glebie B.

Mimo początkowej ilości bakterii w glebie A mniejszej o rząd w porównaniu z glebą B, po dwunastotygodniowym okresie uprawy roślin odnotowano większą liczbę bakterii saprofitycznych w ryzosferze roślin hodowanych na glebie A zanieczyszczonej produktami naftowymi niż w ryzosferze roślin z gleby kontrolnej B (wyjątek stanowił owies – tab. 8).

Po dwunastu tygodniach uprawy roślin w glebie B stwierdzono wzrost ogólnej liczby grzybów o rząd wielkości w ryzosferze peluszkii i jęczmienia, natomiast w przypadku

pszenicy był on niespełna dwukrotny (tab. 8). W ryzosferze owsa ilość grzybów nieznacznie zmalała (ok. dwukrotnie).

Rośliny posadzone w glebie A stymulowały również wzrost i rozwój grzybów - w porównaniu z próbkami bez roślin (tab. 8). Gleba A przed założeniem uprawy roślin posiadała ok. 14 razy mniej promieniowców aniżeli gleba B. Po 6 tygodniach wzrostu roślin w glebie B nastąpił przyrost liczby promieniowców o 2-4 rzędy wielkości w ryzosferze owsa, a najmniejszy w ryzosferze peluski (tab. 8).

W próbkach gleb A i B obsianych roślinami oznaczono liczebność bakterii zdolnych do wykorzystywania węglowodorów jako źródła węgla (tab. 9). Okazało się, że liczba mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów w glebie zanieczyszczonej A była ok. 30 razy większa niż w glebie B. Po obsianiu próbek gleb roślinami dysproporcje te jeszcze bardziej wzrosły, np. w wazonach z pszenicą w glebie zanieczyszczonej liczba tych mikroorganizmów była ponad 200 razy większa w porównaniu z glebą czystą; w wazonach z owsem – niespełna 200 razy; z jęczmieniem ok. 170 razy, a z peluszką niespełna 40 razy (tab. 9).

Tabela 8

Wpływ gatunku rośliny na ilość mikroorganizmów w glebie

Obecność roślin		Średnia liczba bakterii w glebie [kom./1g s.m.g]				Średnia liczba grzybów w glebie [propagul/1g s.m.g]				Średnia liczba promieniowców w glebie [propagul/1g s.m.g]			
		Gleba B		Gleba A		Gleba B		Gleba A		Gleba B		Gleba A	
		$X_{\text{śr.}}$	SD	$X_{\text{śr.}}$	SD	$X_{\text{śr.}}$	SD	$X_{\text{śr.}}$	SD	$X_{\text{śr.}}$	SD	$X_{\text{śr.}}$	SD
Przed założeniem hodowli roślin (czas 0 tygodni)		$1,43 \cdot 10^5$	$0,58 \cdot 10^4$	$2,41 \cdot 10^4$	$6,46 \cdot 10^3$	$3,98 \cdot 10^4$	$2,75 \cdot 10^3$	$1,77 \cdot 10^4$	$1,41 \cdot 10^3$	$2,65 \cdot 10^3$	$2,07 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^2$	$0,12 \cdot 10^2$
(czas 6 tygodni)	Pszenvica	$1,08 \cdot 10^8$	$0,71 \cdot 10^5$	$6,31 \cdot 10^8$	$5,01 \cdot 10^7$	$6,64 \cdot 10^4$	$7,971 \cdot 10^3$	$6,09 \cdot 10^5$	$5,24 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^6$	$8,93 \cdot 10^4$	$2,15 \cdot 10^6$	$2,56 \cdot 10^5$
	Owies	$3,25 \cdot 10^8$	$5,66 \cdot 10^7$	$6,43 \cdot 10^7$	$3,54 \cdot 10^6$	$1,80 \cdot 10^4$	$2,12 \cdot 10^2$	$3,69 \cdot 10^5$	$4,06 \cdot 10^4$	$1,12 \cdot 10^7$	$12,32 \cdot 10^5$	$4,9 \cdot 10^6$	$3,92 \cdot 10^5$
	Jęczmień	$1,21 \cdot 10^9$	$2,83 \cdot 10^7$	$1,25 \cdot 10^9$	$1,37 \cdot 10^8$	$3,24 \cdot 10^5$	$2,12 \cdot 10^2$	$3,82 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^4$	$3,92 \cdot 10^6$	$2,67 \cdot 10^5$	$6,37 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^4$
	Peluszka	$2,88 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^7$	$7,81 \cdot 10^8$	$7,03 \cdot 10^7$	$5,68 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^4$	$6,46 \cdot 10^5$	$6,33 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^5$	$5,02 \cdot 10^4$	$1,72 \cdot 10^4$	$0,18 \cdot 10^4$

 $X_{\text{śr.}}$ – średnia arytmetyczna (n=5)

SD – odchylenie standardowe

Liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów w glebie czystej B i skażonej A

Obecność roślin	Gleba B		Gleba A	
	$X_{\text{sr.}}$	SD	$X_{\text{sr.}}$	SD
	Liczba komórek/1g s.m.g.			
Przed założeniem hodowli roślin	$1,7 \cdot 10^4$	$1,19 \cdot 10^3$	$0,54 \cdot 10^6$	$0,43 \cdot 10^5$
Pszenica	$5,0 \cdot 10^4$	$3,59 \cdot 10^3$	$8,9 \cdot 10^6$	$10,0 \cdot 10^5$
Owies	$4,2 \cdot 10^4$	$4,45 \cdot 10^3$	$7,8 \cdot 10^6$	$8,27 \cdot 10^5$
Jęczmień	$3,7 \cdot 10^4$	$3,63 \cdot 10^3$	$6,2 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^5$
Peluszka	$1,8 \cdot 10^4$	$1,42 \cdot 10^3$	$0,67 \cdot 10^6$	$0,47 \cdot 10^5$

 $X_{\text{sr.}}$ – średnia arytmetyczna (n=5)

SD – odchylenie standardowe

s.m.g. – sucha masa gleby

5.2.4. Oznaczenie stopnia mikoryzacji roślin wyhodowanych w kulturach wazonowych

Badanie obejmowało obserwację mikroskopową i pomiar barwionych korzeni pięciu losowo wybranych roślin pochodzących z kultur wazonowych z glebą kontrolną B i skażoną A oraz ich porównanie. Określano średnią długość korzeni, średnią długość korzeni objętych mikoryzą, a następnie obliczono procentowy udział korzeni zmikoryzowanych.

Zanieczyszczenie gleby produktami naftowymi ma istotny wpływ na stopień mikoryzacji roślin. We wszystkich przypadkach był on znacznie większy u roślin wyhodowanych na glebie A w porównaniu z korzeniami roślin z gleby B (tab. 10).

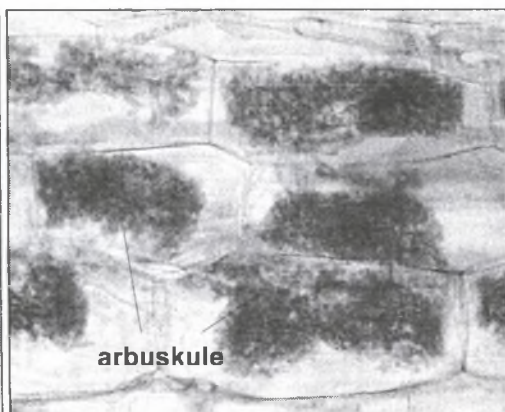
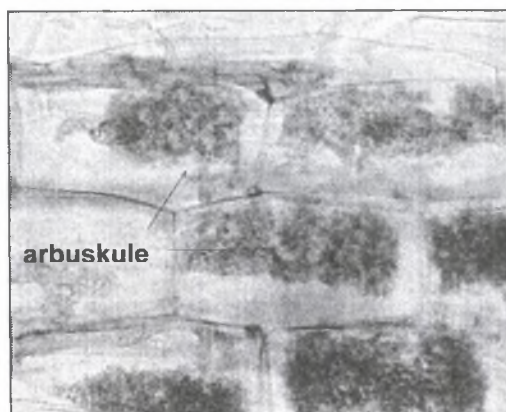
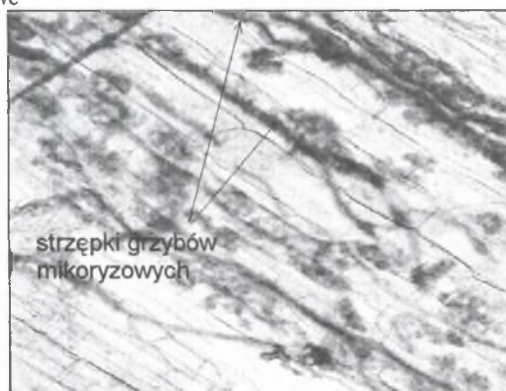
Najwyższy wskaźnik frekwencji mikoryzowej zarówno w glebie A (28,9%), jak i B (5,3%) posiadała pszenica. Średnia długość zmikoryzowanych korzeni w glebie skażonej A była przeszło 5 razy większa niż w glebie czystej B (tab. 10). W korzeniach tej rośliny obserwowano również wiele form wskazujących na rozległą penetrację komórek korzeni przez grzyby mikoryzowe, jak np. obecność dużej ilości wezikul oraz arbuskul (rys. 21).

Procentowy udział korzeni roślin objętych mikoryzą w glebie czystej B i skażonej A

Gatunek rośliny	Średnia długość korzeni [cm]				Udział korzeni objętych mikoryzą [%]			
	Gleba A		Gleba B		Gleba A		Gleba B	
	$\bar{X}_{sr.}$	SD	$\bar{X}_{sr.}$	SD	$\bar{X}_{sr.}$	SD	$\bar{X}_{sr.}$	SD
Pszenica	78,9	7,6	254,7	24,5	28,9	3,8	5,3	0,5
Owies	129,3	8,8	272,9	10,6	26,0	2,03	4,5	0,3
Jęczmień	149,5	5,6	286,4	17,2	21,0	1,96	4,9	0,4
Peluszka	88,3	6,5	184,8	20,7	18,6	1,8	3,1	0,2

$\bar{X}_{sr.}$ – średnia arytmetyczna (n=5)

SD – odchylenie standardowe



Rys. 21. Formacje mikoryzowe w korzeniach pszenicy pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie: 100 i 400x)

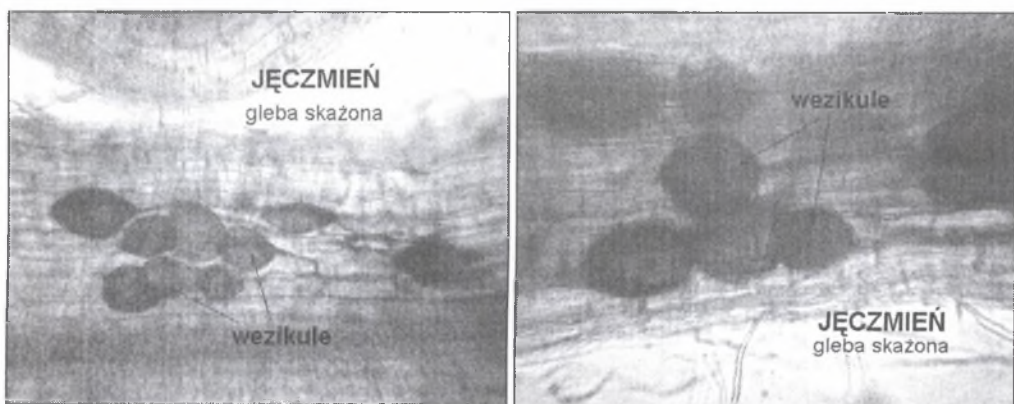
Fig. 21. Micorrhizal formations in wheat roots from contaminated soil A (magnification: 100 and 400x)

Gatunkiem rośliny ulegającej mikoryzacji w nieco mniejszym stopniu aniżeli pszenica był owies. Chociaż wskaźnik frekwencji mikoryzowej w glebie A w tym przypadku był prawie 6 razy większy w porównaniu z glebą B i wynosił ok. 26%. Stopień kolonizacji korzeni jęczmienia przez grzyby mikoryzowe w glebie B wynosił ok. 5%, natomiast w glebie skażonej A był ponad 4 razy większy i wynosił ok. 21%. Na rysunkach 22 i 23 widoczne są formacje mikoryzowe w korzeniach odpowiednio owsa i jęczmienia.



Rys. 22. Formacje mikoryzowe w korzeniach owsa pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie 400x)

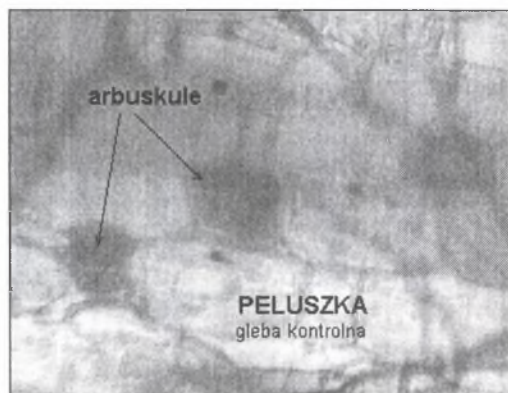
Fig. 22. Micorrhizal formations in oat roots from contaminated soil A (magnification 400x)



Rys. 23. Formacje mikoryzowe w korzeniach jęczmienia pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie 200x i 400x)

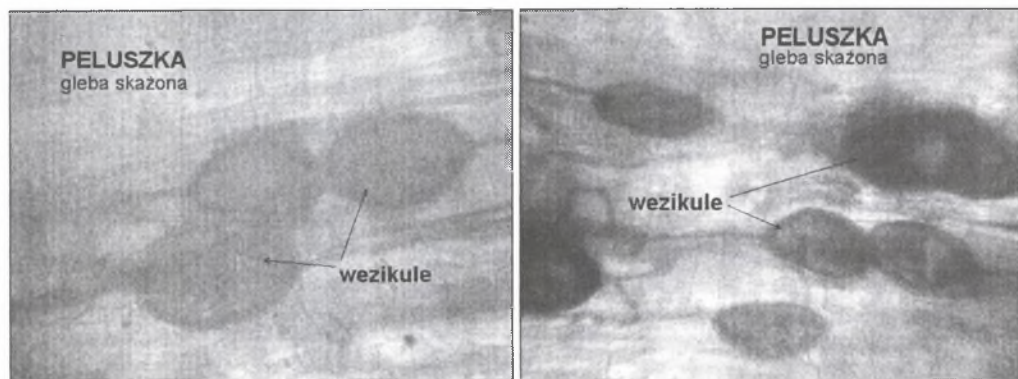
Fig. 23. Micorrhizal formations in barley roots from contaminated soil A (magnification 200x and 400x)

Rośliną wykazującą najniższy stopień mikoryzacji zarówno w glebie skażonej (18,6%), jak i czystej (3,1%) była peluszka (tab. 10). Stopień mikoryzacji w glebie skażonej A był ponad 6 razy większy niż w glebie czystej B, co stanowi krotność największą wśród wszystkich badanych roślin. Formacje mikoryzowe w korzeniach peluszki rosnącej na glebie czystej B uwidoczniiono na rys. 24, natomiast w korzeniach pochodzących z gleby skażonej A – rys. 25.



Rys. 24. Formacje mikoryzowe w korzeniach peluszki pochodzących z gleby czystej B (powiększenie 400x)

Fig. 24. Micorrhizal formations in field pea roots from unpolluted soil B (magnification 400x)



Rys. 25. Formacje mikoryzowe w korzeniach peluszki pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie 400x)

Fig. 25. Micorrhizal formations in field pea roots from contaminated soil A (magnification 400x)

5.2.4.1. Ilościowa i jakościowa analiza spor grzybów mikoryzowych

Przeprowadzono również badania mające na celu określenie ilości i jakości spor grzybów mikoryzowych w glebie A, zanieczyszczonej produktami naftowymi oraz w glebie B, wolnej od tego rodzaju zanieczyszczeń. Uzyskane wyniki wykazały, że liczba spor grzybów arbuskularnych w 1 kilogramie gleby czystej wynosiła średnio ok. $4,7 \cdot 10^6$ (tab. 12), natomiast w glebie A zanieczyszczonej wynosiła średnio ok. $8,45 \cdot 10^6$ (tab. 11). Zatem w glebie A skażonej substancjami ropopochodnymi całkowita ilość spor była większa o prawie 80% w porównaniu z glebą czystą B. W celu określenia jakości spor występujących w glebie zanieczyszczonej A i w glebie czystej B podzielono je według wielkości i kolorów oraz obliczono ich procentowe udziały (tab. 11 i 12). W glebie A zanieczyszczonej produktami naftowymi (tab. 11) nie stwierdzono obecności spor w kolorze szarym, natomiast w glebie czystej B (tab. 12) udział tych spor wynosił ok. 10,6%. W glebie skażonej A spory brązowe stanowiły ok. 28,69%, w czystej – 51,07%, spor białych odpowiednio 26,93% i 20, 21%; czarnych – 44,38% i 18,08%.

Tabela 11

Koncentracja poszczególnych grup spor grzybów arbuskularnych w próbkach gleby zanieczyszczonej A

Kolor spory	Średnica spory [µm]	Liczba spor/kg s.m.g.		Udział procentowy [%]
		X _{śr.}	SD	
Brązowy	>250	$125,0 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^4$	14,79
	100-250	$82,5 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$	9,76
	<100	$35,0 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^4$	4,14
Biały	>250	750360	$7,4 \cdot 10^4$	8,88
	100-250	800215	$6,2 \cdot 10^4$	9,47
	<100	725010	$4,3 \cdot 10^4$	8,58
Czarny	>250	$135,0 \cdot 10^4$	13,8(104)	15,98
	100-250	$162,5 \cdot 10^4$	13,9(104)	19,23
	<100	$77,5 \cdot 10^4$	6,9(104)	9,17

X_{śr.} – średnia arytmetyczna (n=3)

SD – odchylenie standardowe

s.m.g. – sucha masa gleby

Tabela 12

Koncentracja poszczególnych grup spor grzybów arbuskularnych w próbkach gleby czystej B

Kolor spory	Średnica spory [μm]	Liczba spor/kg s.m.g.		Udział procentowy [%]
		XŚr.	SD	
Brązowy	>250	120,0(104)	12,72(104)	25,53
	100-250	60,0(104)	4,68(104)	12,77
	<100	60,0(104)	3,98(104)	12,77
Biały	>250	25,0·10 ⁴	2,58·10 ⁴	5,32
	100-250	70,0·10 ⁴	5,25·10 ⁴	14,89
	<100	0	0	0
Szary	>250	0	0	0
	100-250	10,0(104)	1,2(104)	2,13
	<100	40,0(104)	3,96(104)	8,51
Czarny	>250	55,0(104)	6,87(104)	11,70
	100-250	0	0	0
	<100	30,0(104)	2,55(104)	6,38

XŚr. – średnia arytmetyczna (n=3)

SD – odchylenie standardowe

s.m.g. – sucha masa gleby

Ocenie poddano również „żywołność” spor, określając udział spor martwych i porażonych przez pasożyty i uszkodzonych. Na tej podstawie obliczono procentowy udział spor niezdolnych do kiełkowania (tab. 13).

Tabela 13

Liczba spor grzybów arbuskularnych niezdolnych do kiełkowania w glebie skażonej A oraz czystej B

Średnica spory [μm]	Gleba A			Gleba B		
	l.s./kg s.m.g.		[%]	l.s./kg s.m.g.		[%]
	XŚr.	SD		XŚr.	SD	
>250	50,36(104)					
100-250	62,49(104)	26,9·10 ⁴	40,30	129,3·10 ⁴	11,63·10 ⁴	27,50
<100	52,35(104)	46,5·10 ⁴	50,00	0	0	0
		36,4·10 ⁴	41,89	108,5·10 ⁴	13,02·10 ⁴	23,08

XŚr. – średnia arytmetyczna (n=3)

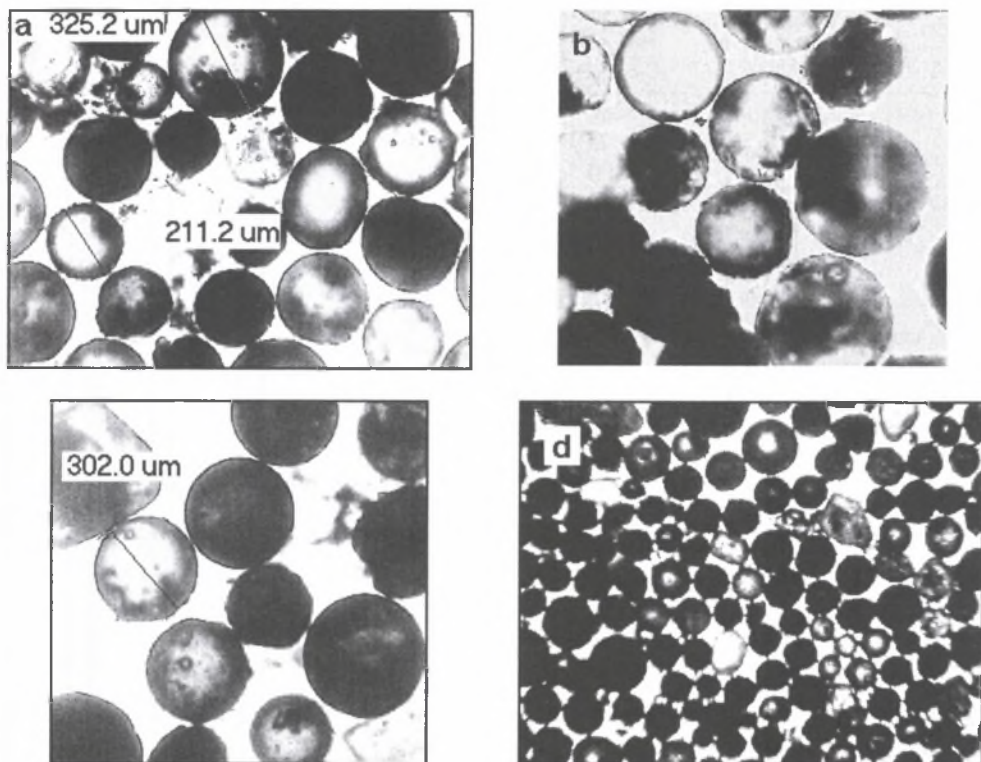
l.s. – liczba spor

[%] – udział procentowy

s.m.g. – sucha masa gleby

SD – odchylenie standardowe

Dane zawarte w tabelach 11–13 pokazują, że zanieczyszczenia substancjami ropopochodnymi wpływają na jakość i ilość spor grzybów arbuskularnych występujących w środowisku glebowym. Pomimo znacznie większej ich liczby w glebie A zanieczyszczonej produktami naftowymi obserwowano mniejszą ich różnorodność (tab. 11) w porównaniu z glebą B (tab. 12), a także dużo większy udział spor porażonych przez pasożyty i martwych (tab. 13, rys. 26).



Rys. 26. Spory grzybów arbuskularnych wyizolowane z gleby skażonej A (powiększenie a ÷ c: 400x; d: 100x)

Fig. 26. Arbuscular mycorrhizal fungi spores isolated from contaminated soil A (magnification a ÷ c: 400x, d: 100x)

Na podstawie cech zarodników grzybów i tworzonej przez nie mikoryzy określono ich rodzaje. Dominujące były grzyby z rodzaju *Glomus*, gatunku *Glomus mosseae*. Oznaczono również grzyby gatunków: *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* oraz *Glomus lamellosum*.

5.2.5. Ocena wpływu na dżdżownice z gatunku *Eisenia fetida*

Aktywność dżdżownic oceniano na podstawie reakcji na dotyk, rozmieszczenia na powierzchni pojemników oraz chęci ucieczki. Po pierwszym tygodniu procesu samooczyszczania gleby A dżdżownice w niej umieszczone cechowała mała aktywność ruchowa i brak wyraźnej reakcji na dotyk. Zaobserwowano także ich nierównomierne rozmieszczenie w podłożu. Po 7 dniach badań stwierdzono średnio 40% śmiertelność badanej populacji dżdżownic, a po 14 dniach śmiertelność wzrosła do 70%. W glebie kontrolnej B po 14 dniach testu wszystkie testowane zwierzęta były żywe, wykazywały prawidłową aktywność i reakcje czuciowe. Przeprowadzony test istotności Dunnetta wykazał znaczący wpływ zanieczyszczeń znajdujących się w glebie A z terenów rafinerii na dżdżownice.

Po 12 tygodniach procesu samooczyszczania gleby A pochodzącej z terenów rafinerii powtórzono test toksyczności ostrej z wykorzystaniem dżdżownic. Okazało się, że efekt toksycznego oddziaływania pozostałych w glebie A zanieczyszczeń był podobny jak na początku procesu. Po 7 dniach testu stwierdzono średnio 35% śmiertelność badanej populacji dżdżownic, a po 14 dniach aż 73%.

5.2.6. Ocena genotoksyczności gleby

Badania genotoksyczności przeprowadzono na dwóch szczepach bakterii *Bacillus subtilis*: M45 Rec⁻, który nie ma zdolności do reparacji DNA i H17 Rec⁺, który posiada tę zdolność. Wyniki tych badań (tab. 14) wykazały potencjalną genotoksyczność (różnica średnic stref zahamowania wzrostu bakterii mieści się w zakresie 2-4 mm) związków zawartych w ekstraktach pochodzących zarówno z próbek gleby skażonej A, poddawanych procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni, jak i kontrolnej gleby B. Jedynie próbki gleby B poddawane procesowi samooczyszczania w czasie 12 tygodni nie wykazywały genotoksyczności. Na podstawie przeprowadzonego testu istotności stwierdzono, że statystycznie istotna różnica pomiędzy próbkami A i B występowała jedynie po 12 tygodniach procesu samooczyszczania.

Wpływ zanieczyszczeń zawartych w glebach A i B na ich genotoksyczność – test z wykorzystaniem dwóch szczepów *Bacillus subtilis*: M45 (Rec⁻) i H17 (Rec⁺)

OS [tyg.]	Zmiany stref zahamowania wzrostu <i>B. subtilis</i> [mm]							
	Gleba A				Gleba B			
	X _{Rec-}	X _{Rec+}	ΔX	SD _{ΔX}	X _{Rec-}	X _{Rec+}	ΔX	SD _{ΔX}
1	13,5÷15,2	15,8÷17,2	2,3	0,18	15,7÷16,5	17,6÷18,3	1,9	0,13
4	17,0÷20,3	19,5÷23,1	2,6	0,16	16,4÷21,3	18,5÷23,4	2,0	0,18
8	18,9÷21,3	21,7÷24,1	2,7	0,20	17,7÷21,7	19,9÷24,1	2,3	0,19
12	21,3÷22,5	24,7÷26,1	3,5	0,19	19,4÷24,2	21,3÷26,1	1,8	0,16

OS – okres samooczyszczania gleby A (1, 4, 8, 12 tygodni)

X_{Rec-} – strefa zahamowania wzrostu *B. Subtilis* M45 (Rec⁻)

X_{Rec+} – strefa zahamowania wzrostu *B. Subtilis* H17 (Rec⁺)

ΔX – średnia różnica stref zahamowania wzrostu *B. Subtilis* [M45 (Rec⁻)- H17 (Rec⁺)] dla n=5

SD_{ΔX} – odchylenie standardowe ΔX

5.3. Wpływ procesu samooczyszczania na właściwości ekotoksyczne odcieków gleby A (na funkcje retencyjne)

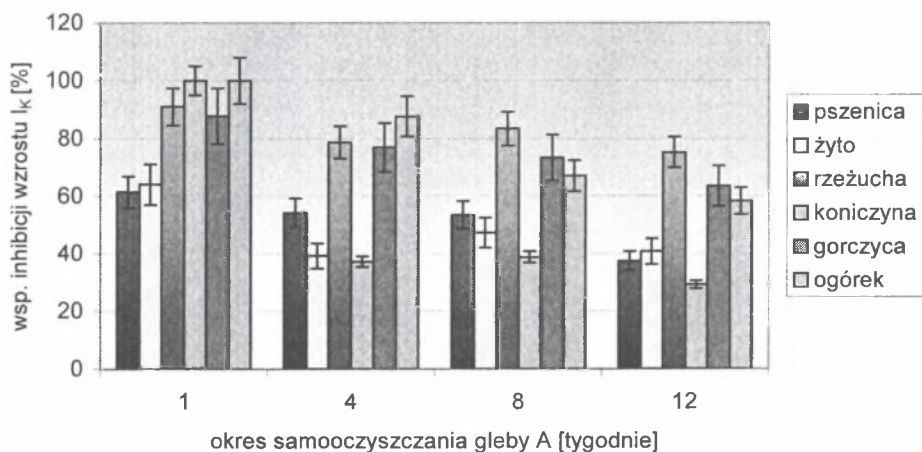
5.3.1. Ocena fitotoksyczności odcieków

Omówienie wyników badań umożliwiających ocenę funkcji retencyjnej gleby zamieszczono w podrozdziałach 5.3 ÷ 5.4.

5.3.1.1. Wpływ na wzrost korzeni

Wpływ zanieczyszczeń zawartych w odciekach pochodzących z próbek gleby A skażonych produktami naftowymi, poddawanych procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni, na wczesne stadia rozwojowe roślin przedstawiono w tab. 15 oraz na rys. 27. Zanieczyszczenia w próbkach odcieków pochodzących z gleby A po pierwszym tygodniu procesu samooczyszczania działały szczególnie niekorzystnie na rośliny dwuliścienne – powodowały całkowitą inhibicję (I_K 100%) wzrostu korzeni ogórka i koniczyny i średnio ok. 90% inhibicję wzrostu korzeni rzeżuchy i gorczycy. Średnie wartości współczynnika I_K obliczone dla roślin jednoliściennych (pszenica i żyto) wynosiły ok. 60%. W glebach po 4 tygodniach samooczyszczania wykiełkowały wszystkie rośliny, jednakże wzrost ich korzeni był znacznie mniejszy w porównaniu do roślin kontrolnych. Obliczony współczynnik I_K był szczególnie duży dla roślin dwuliściennych i wynosił dla ogórka: 87,6%, dla gorczycy – ok. 77% i dla rzeżuchy – 78,6%. Zaskakujący był efekt ok. dwukrotnie mniejszej inhibicji

wzrostu korzeni innej rośliny dwuliściennej – koniczyny ($I_K \cong 37\%$). Podobny efekt obserwowano w przypadku jednoliściennego żyta i nieco większe wielkości $I_K (\cong 53\%)$ w przypadku jednoliściennej pszenicy. W miarę upływu czasu toksyczność zanieczyszczeń zawartych w odciekach glebowych nieznacznie malała. Po 12 tygodniach procesu samooczyszczania odcieki glebowe charakteryzowały się nadal bardzo wysoką fitotoksycznością w stosunku do bardziej wrażliwych roślin dwuliściennych (I_K ok. 75% dla rzeżuchy, ok. 63% dla gorczycy i ok. 58% dla ogórka). Średnia inhibicja wzrostu korzeni koniczyny nie przekraczała 30%, a dla obu badanych roślin jednoliściennych (pszenica i żyto) wynosiła ok. 40% (rys. 27).



Rys. 27. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję wzrostu korzeni roślin względem roślin z próbek kontrolnych

Fig. 27. The influence of residual petroleum contaminations during self-cleaning process after 1, 4, 8 and 12 weeks on the plant's roots growth inhibition in comparison to plants from control samples

Tabela 15

Zmiany długości korzeni roślin pod wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych, w odciekach z gleby A podczas procesu samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni; statystyczną istotność różnic długości korzeni oceniano testem Dunnetta

Rośliny	Długość korzeni roślin w glebie kontrolnej B i w glebie skażonej A (po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni)											
	1 tydzień			4 tydzień			8 tydzień			12 tydzień		
	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D	$L_B \pm SD$	$L_A \pm SD$	t_D
Jednoliścienne												
Pszonica	7,7±0,55	3,0±0,42	+	7,5±0,52	3,4±0,35	+	8,1±0,72	3,8±0,4	+	7,8±0,83	4,8±0,59	+
Żyto	8,1±0,34	2,9±0,11	+	7,9±0,4	4,8±0,38	+	8,0±0,63	4,2±0,27	+	7,5±0,45	4,4±0,37	+
Dwuliścienne												
Rzeżucha	6,6±0,71	0,6±0,09	+	6,3±0,71	1,4±0,2	+	6,7±0,22	1,1±0,09	+	6,5±0,58	1,6±0,09	+
Koniczyna	6,8±0,54	0±0	+	6,5±0,67	4,1±0,33	+	6,5±0,48	4,0±0,53	+	6,8±0,71	4,8±0,24	+
Gorczyca	6,4±0,5	0,8±0,06	+	6,1±0,45	1,4±0,08	+	6,2±0,73	1,7±0,08	+	6,4±0,4	2,3±0,11	+
Ogórek	6,6±0,49	0±0	+	6,5±0,7	0,8±0,06	+	6,9±0,79	2,3±0,33	+	7,2±0,87	3,0±0,34	+

L_B - średnia długość korzeni roślin w próbce gleby B - kontrolnej [cm]

L_A - średnia długość korzeni roślin w próbce gleby A - skażonej [cm]

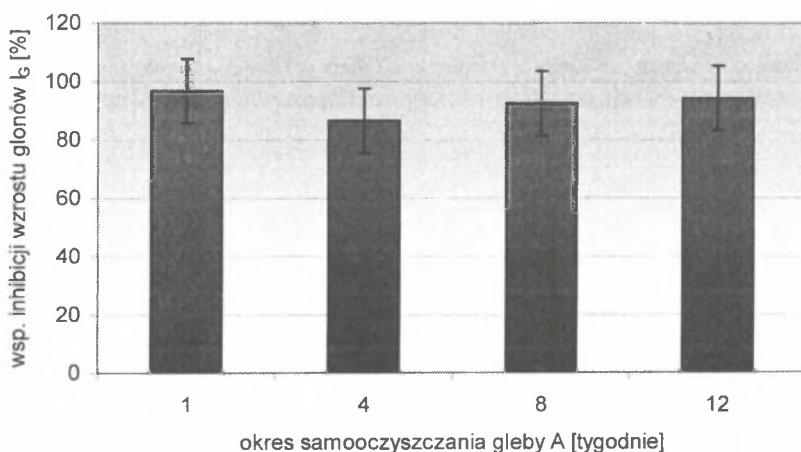
SD - odchylenie standardowe [cm]

t_D - test istotności Dunnetta (ocena istotności różnic długości korzeni pomiędzy próbkami A i B)

+ - różnica długości korzeni roślin istotna statystycznie przy poziomie ufności 95%, dla n=25

5.3.1.2. Wpływ na wzrost glonów *Scenedesmus quadricauda*

Wpływ zanieczyszczeń zawartych w odciekach z próbek gleby A, poddawanych procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni, na wzrost glonów *Scenedesmus quadricauda* przedstawiono na rys. 28. Podczas 12 tygodni procesu samooczyszczania gleby A obserwowano niezmiennie bardzo wysoką toksyczność odcieków glebowych, objawiającą się średnio ponad 90% inhibicją wzrostu testowanego glonu.



Rys. 28. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych w odciekach z gleby A podczas procesu samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję wzrostu glonów *Scenedesmus quadricauda* względem glonów z próbek kontrolnych

Fig. 28. The influence of residual petroleum contaminations during self-cleaning process after 1, 4, 8 and 12 weeks on the algae *Scenedesmus quadricauda* growth inhibition in comparison to algae from control samples

5.3.2. Ocena zootoksyczności odcieków

Badania zootoksyczności z udziałem ślimaków - przedstawicieli gatunku *Physa acuta* Drap - wykazały, że wszystkie odcieki pochodzące z gleby A powodowały 100 % śmiertelność badanych zwierząt, niezależnie od czasu trwania procesu samooczyszczania gleby A.

5.3.3. Ocena genotoksyczności odcieków

Przeprowadzone badania genotoksyczności na szczepach bakterii *Bacillus subtilis*: M45 Rec⁻ oraz H17 Rec⁺ wskazują na potencjalną genotoksyczność lub nawet mutagenność substancji ropopochodnych zawartych w odciekach pochodzących z próbek gleby A (tab. 16).

Stwierdzono przy tym wzrost genotoksyczności odcieków gleby A wraz z wydłużeniem procesu jej samooczyszczania do 8-12 tygodni. Genotoksyczność odcieków z gleby B (tab. 16) kształtowała się podobnie jak genotoksyczność samej gleby B poddawanej procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni (tab. 14). Przeprowadzony test istotności wykazał, iż odcieki pochodzące z gleby A oraz gleby B istotnie różniły się między sobą przez cały okres procesu samooczyszczania.

Tabela 16

Wpływ zanieczyszczeń zawartych w odciekach gleb A i B na ich genotoksyczność – test z wykorzystaniem dwóch szczepów bakterii *Bacillus subtilis*: M45 (Rec⁻) i H17 (Rec⁺)

OS [tyg.]	Zmiany stref zahamowania wzrostu <i>B. subtilis</i> [mm]							
	Gleba A				Gleba B			
	X _{Rec-}	X _{Rec+}	ΔX	SD _{ΔX}	X _{Rec-}	X _{Rec+}	ΔX	SD _{ΔX}
1	17,8÷20,2	21,1÷23,7	3,6	0,18	17,2÷21,3	19,3÷23,2	1,9	0,13
4	17,6÷20,3	20,7÷23,6	3,2	0,16	19,3÷22,1	21,5÷24,6	2,3	0,18
8	17,9÷19,8	21,7÷24,1	4,1	0,37	20,1÷23,4	22,7÷26,3	2,6	0,29
12	17,3÷22,3	21,4÷26,7	4,5	0,45	20,2÷22,6	21,8÷24,5	1,8	0,16

OS – okres samooczyszczania gleby A (1, 4, 8, 12 tygodni)

X_{Rec-} – strefa zahamowania wzrostu *B. Subtilis* M45 (Rec⁻)

X_{Rec+} – strefa zahamowania wzrostu *B. Subtilis* H17 (Rec⁺)

ΔX – średnia różnica stref zahamowania wzrostu *B. Subtilis* [M45 (Rec⁻) - H17 (Rec⁺)] dla n=5

SD_{ΔX} – odchylenie standardowe ΔX

5.4. Wpływ procesu samooczyszczania na właściwości fizykochemiczne gleby A oraz odcieków glebowych

Gleba A charakteryzowała się zapachem typowym dla produktów naftowych. Przeprowadzone analizy fizykochemiczne pozwoliły określić zakres zmian zachodzących w niej podczas 12 tygodni samooczyszczania. Wyniki podstawowych oznaczeń zebrano w tabeli 17.

W miarę postępującego procesu samooczyszczania gleby A nastąpiły w niej istotne zmiany - wzrost kwasowości hydrolitycznej (o ok. 32%), spadek zawartości węgla organicznego (o ok. 15%) i substancji organicznej (o ok. 21%), wzrost zawartości kwasów huminowych (o ok. 70%) - w stosunku do wartości początkowych. Podczas badań stwierdzono również ok. 13-krotny wzrost zawartości azotu amonowego i niewielki (o ok.

18%) przyrost ilości azotu ogólnego, czemu towarzyszył ok. 3-krotny spadek koncentracji azotanów.

Tabela 17

Zmiana właściwości fizykochemicznych gleby A po 12 tygodniach jej samooczyszczania

Rodzaj oznaczenia	Jednostka	Wartość początkowa*	Wartość końcowa**
Odczyn	pH	6,20 ± 0,45	5,9 ± 0,44
Azot ogólny	g N _{og} /kg	1,51 ± 0,09	1,78 ± 0,13
Azot amonowy	g N _{NH4} /kg	0,09 ± 0,006	1,15 ± 0,08
Azot azotanowy	g N _{NO3} /kg	0,28 ± 0,02	0,09 ± 0,005
Azot azotynowy	g N _{NO2} /kg	0,017 ± 0,001	0,02 ± 0,001
Węgiel organiczny	g C/kg	38,10 ± 2,79	32,20 ± 2,29
Fosfor ogólny	g PO ₄ ³⁻ /kg	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Substancja organiczna	g/kg	111,10 ± 7,31	87,6 ± 6,11
Kwasowość hydrolityczna	cmol/100g	13,70 ± 0,90	18,08 ± 1,09
Kwasy huminowe	% wag.	10,30 ± 0,73	17,50 ± 1,22

* - średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe na początku badań (n=3)

** - średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe po 12 tygodniach procesu samooczyszczania (n=3)

Stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych zawartych w próbkach gleby A przed i po procesie jej samooczyszczania w czasie 12 tygodni zamieszczono w tabeli 18.

Na podstawie przeprowadzonych analiz ustalono, że w glebie A wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne stanowiły 0,5% wszystkich węglowodorów aromatycznych, przy czym rakotwórcze i mutagenne węglowodory o pięciu oraz sześciu pierścieniach aromatycznych w cząsteczce stanowiły ok. 18% wszystkich WWA, węglowodory dwupierścieniowe – ok. 2%, trójpierścieniowe – ok. 13%, a czteropierścieniowe ok. 67 %. Wśród zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie A dominowały bardzo trudno rozkładalne frakcje ciężkie, które stanowiły prawie 12% masowych w glebie, podczas gdy węglowodory alifatyczne stanowiły 6% masowych, a aromatyczne - ok. 1,5% (tab. 18).

Po 12-tygodniowym procesie samooczyszczania gleby A stwierdzono, że zawartość węglowodorów alifatycznych zmalała o ok. 15%, węglowodorów aromatycznych o ok. 6%, WWA o ok. 6%, a frakcji ciężkich o ok. 0,5% w stosunku do wartości początkowej.

Stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie A przed i po procesie samooczyszczania

Rodzaj oznaczenia	Jednostka	Wartość początkowa*	Wartość końcowa**
Węglowodory alifatyczne	g/kg s.m.g.	54,87 ± 6,59	46,70 ± 5,60
Węglowodory aromatyczne	g/kg s.m.g.	10,44 ± 1,25	9,78 ± 1,17
Fracje ciężkie	g/kg s.m.g.	117,68 ± 2,47	117,00 ± 2,46
Naftalen	mg/kg s.m.g.	1,00 ± 0,30	0,40 ± 0,12
Acenaften	mg/kg s.m.g.	0,22 ± 0,06	0,17 ± 0,05
Fluoren	mg/kg s.m.g.	0,21 ± 0,06	0,20 ± 0,06
Fenantren	mg/kg s.m.g.	3,73 ± 1,10	3,31 ± 0,98
Antracen	mg/kg s.m.g.	2,76 ± 0,81	2,62 ± 0,77
Fluoranten	mg/kg s.m.g.	4,82 ± 1,40	4,78 ± 1,39
Piren	mg/kg s.m.g.	9,08 ± 2,56	8,84 ± 2,49
Benzo(a)antracen	mg/kg s.m.g.	3,98 ± 1,11	3,75 ± 1,05
Chryzen	mg/kg s.m.g.	12,60 ± 3,52	12,57 ± 3,51
Benzo(b)fluoranten	mg/kg s.m.g.	3,92 ± 1,13	3,90 ± 1,12
Benzo(k)fluoranten	mg/kg s.m.g.	1,72 ± 0,49	1,71 ± 0,48
Benzo(a)piren	mg/kg s.m.g.	2,72 ± 0,76	2,65 ± 0,74
Benzo(ghi)perylene	mg/kg s.m.g.	2,62 ± 0,81	2,55 ± 0,79
Dibenzo(a,h)antracen	mg/kg s.m.g.	0,84 ± 0,26	0,81 ± 0,25
Indeno(1,2,3-cd)piren	mg/kg s.m.g.	3,42 ± 0,95	3,29 ± 0,91
Σ 9 WWA	mg/kg s.m.g.	38,15	34,34

* - średnia arytmetyczna ± U_R na początku badań (n=3)

** - średnia arytmetyczna ± U_R po 12 tygodniach procesu samooczyszczania (n=3)

U_R - niepewność rozszerzona

Σ 9 WWA (naftalen, fenantren, antracen, fluoranten, chryzen, benzo(a)antracen, benzo(a)piren, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perylene)

Podobne analizy przeprowadzono dla odcieków zbieranych do pojemników umieszczonych pod lizymetrami. Na podstawie wyników tych badań (tab. 19) stwierdzono, że po 12 tygodniach procesu samooczyszczania masy 1 kg gleby A potencjalnie do wód gruntowych mogły w sumie przedostać się następujące ilości zanieczyszczeń:

- węglowodory alifatyczne – ok. 42 mg, co stanowi ok. 0,07% ilości znajdującej się w badanych próbkach gleby,
- frakcje ciężkie – 27,7 mg, co stanowi 0,024% ilości znajdującej się w glebie,
- węglowodory 2 pierścieniowe – 0,19 µg, co stanowi 0,02% ilości znajdującej się w badanych próbkach gleby,

- węglowodory 3-pierścieniowe – 2,09 µg, co stanowi 0,036% ilości znajdującej się w badanych próbkach gleby,
- węglowodory 4-pierścieniowe – 6,01 µg, co stanowi 0,012% ilości znajdującej się w badanych próbkach gleby,
- węglowodory 5-i 6-pierścieniowe – 3,6 µg, co stanowi 0,036% ilości znajdującej się w badanych próbkach gleby.

Tabela 19

Stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych w odciekach z gleby A podczas procesu samooczyszczania (1, 4, 8 i 12 tygodni)

Rodzaj oznaczenia	Jednostka	Stężenie ± U _R *			
		Czas (tygodnie)			
		1	4	8	12
Węglowodory alifatyczne	mg/l	6,68 ± 0,80	10,20 ± 1,22	8,81 ± 1,06	9,30 ± 1,12
Fracje ciężkie	mg/l	5,16 ± 0,11	6,80 ± 0,14	5,10 ± 0,11	6,02 ± 0,13
Naftalen	µg/l	<0,012 ± 0,004	<0,012 ± 0,004	0,054 ± 0,019	0,078 ± 0,028
Acenaften	µg/l	0,077 ± 0,027	0,025 ± 0,009	0,038 ± 0,013	0,017 ± 0,006
Fluoren	µg/l	<0,020 ± 0,007	0,032 ± 0,011	<0,020 ± 0,007	0,048 ± 0,017
Fenantren	µg/l	<0,023 ± 0,008	0,107 ± 0,038	0,660 ± 0,233	0,236 ± 0,083
Antracen	µg/l	0,236 ± 0,083	0,048 ± 0,017	0,084 ± 0,030	0,068 ± 0,024
Fluoranten	µg/l	<0,022 ± 0,008	0,046 ± 0,016	0,094 ± 0,033	0,093 ± 0,033
Piren	µg/l	0,917 ± 0,260	0,080 ± 0,023	0,398 ± 0,113	0,511 ± 0,145
Benzo(a)antracen	µg/l	0,540 ± 0,140	0,036 ± 0,009	0,115 ± 0,030	0,177 ± 0,046
Chryzen	µg/l	0,068 ± 0,016	0,022 ± 0,005	0,091 ± 0,022	0,186 ± 0,044
Benzo(a)fluoranten	µg/l	0,988 ± 0,225	0,046 ± 0,010	0,169 ± 0,039	0,223 ± 0,051
Benzo(k)fluoranten	µg/l	0,074 ± 0,017	0,006 ± 0,001	0,037 ± 0,009	0,067 ± 0,015
Benzo(a)piren	µg/l	0,596 ± 0,098	0,023 ± 0,004	0,108 ± 0,018	0,265 ± 0,043
Benzo(ghi)perylene	µg/l	0,486 ± 0,122	0,027 ± 0,007	0,060 ± 0,015	0,136 ± 0,034
Dibenzo(a,h)antracen	µg/l	0,240 ± 0,055	0,011 ± 0,003	0,060 ± 0,014	0,056 ± 0,013
Indeno(1,2,3-cd)piren	µg/l	0,573 ± 0,144	0,022 ± 0,006	0,112 ± 0,028	0,216 ± 0,054
Σ 9 WWA	µg/l	2,971	0,367	1,435	1,462

* - wartość średnia stężenia zanieczyszczenia ± U_R (n=3)

U_R - niepewność rozszerzona

Σ 9 WWA (naftalen, fenantren, antracen, fluoranten, chryzen, benzo(a)antracen, benzo(a)piren, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perylene)

5.5. Fitoremediacja gruntu wspomagana biopreparatami

W kolejnym etapie badań oceniano wybrane rośliny pod kątem możliwości ich wykorzystania w procesach fitoremediacji gleb skażonych substancjami ropopochodnymi. Badano także wpływ dodatku biopreparatu bakteryjnego oraz grzybowego na wzrost i rozwój tych roślin, a także na stopień usunięcia zanieczyszczeń ropopochodnych z gleby.

5.5.1. Wpływ dodatku biopreparatów na proces fitoremediacji gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi

Wyniki przeprowadzonych badań laboratoryjnych sugerowały celowość podjęcia próby fitoremediacji gleby A wspomaganej dodatkiem biopreparatów w warunkach polowych. Doświadczenie prowadzono przez 3 miesiące. Do badań wybrano pszenicę ze względu na najkorzystniejszy skład mikroorganizmów ryzosferowych, wysoki współczynnik infekcji mikoryzowej oraz na zdolność adaptacji tej rośliny do wzrostu w glebach zanieczyszczonych produktami naftowymi. Wyniki przedstawione w tab. 20 wykazują, że roślina oraz biopreparaty powodowały istotny wzrost efektu usunięcia węglowodorów z analizowanych próbek gleby A.

Najwyższy był ubytek węglowodorów dwupierścieniowych, sięgający po 3 miesiącach ponad 96% w próbkach, w których zastosowano łącznie biopreparaty oraz rośliny. Wraz ze wzrostem liczby pierścieni w cząsteczce WWA malała ich podatność na biodegradację. Zastosowanie samego biopreparatu bakteryjnego bądź grzybowego oraz samej rośliny nie przynosiło tak dobrych rezultatów, jak użycie ich w połączeniu. Obsianie gleby pszenicą spowodowało wzrost stopnia usunięcia węglowodorów alifatycznych (w porównaniu do próbek bez roślin) średnio o ok. 26%. Dodatkowe wprowadzenie biopreparatu otrzymanego z zespołu bakterii autochtonicznych spowodowało zwiększenie efektywności rozkładu tych zanieczyszczeń o ok. 30%, a wprowadzenie inokulum grzybów mikoryzowych o ok. 44% w porównaniu z próbkami obsianymi samą pszenicą. W próbkach z roślinami i biopreparatem grzybowym uzyskano 10-krotnie większy stopień usunięcia węglowodorów aromatycznych niż w próbkach gleby A bez roślin i bez biopreparatów (tab. 20).

W próbkach gleb obsianych pszenicą stwierdzono także wzrost stopnia usunięcia węglowodorów aromatycznych (w porównaniu do próbek bez roślin) o ok. 27%, stymulowany istotnie obecnością biopreparatów (dodatkowy wzrost efektywności bioremediacji o ok. 17% i 33%, odpowiednio dla próbek z biopreparatem bakteryjnym i grzybowym).

Zastosowane biopreparaty w połączeniu z roślinami podniosły także efektywność usuwania frakcji ciężkich średnio 13,5 razy w porównaniu z próbkami bez roślin (tab. 20).

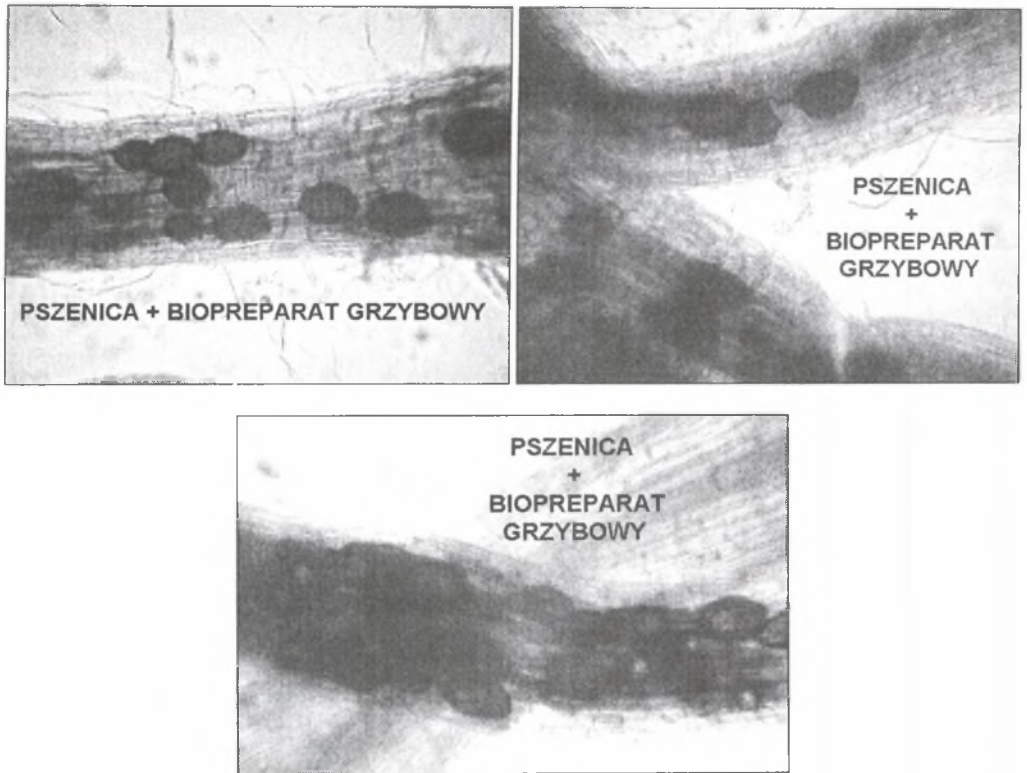
Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że najłatwiej rozkładającym się zanieczyszczeniem w analizowanych próbkach gleby A był naftalen. W próbkach, w których zastosowano łącznie pszenicę i biopreparaty, ubytek tego zanieczyszczenia sięgał ponad 96%.

Analizując rozkład węglowodorów 3-pierścieniowych stwierdzono, że obsianie gleby pszenicą powodowało wzrost stopnia usunięcia tych związków o ok. 39% (w porównaniu do próbek bez roślin i biopreparatów), natomiast wprowadzenie dodatkowo biopreparatu bakteryjnego zwiększało efektywność tego procesu o ok. 27%, a biopreparatu grzybowego o ok. 41%. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku węglowodorów 4-, 5- i 6-pierścieniowych. W próbkach, w których zastosowano bioremediację z udziałem roślin i biopreparatów, procentowy efekt usunięcia tych zanieczyszczeń był średnio wyższy o ok. 40÷80% w porównaniu z próbkami bez roślin i biopreparatów (tab. 20).

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały wysokie współczynniki korelacji między stopniem zmikoryzowania korzeni roślin a liczbą bakterii degradujących węglowodory (0,899) oraz między liczbą bakterii degradujących węglowodory a stopniem ich usunięcia (powyżej 0,92). Nie stwierdzono istotnych zależności między stopniem zmikoryzowania roślin a ogólną liczbą bakterii saprofitycznych i grzybów, natomiast wysoką korelację ujemną (-0,91) obserwowano pomiędzy stopniem zmikoryzowania roślin a liczbą promieniowców.

Efekt usunięcia [%] zanieczyszczeń z gleby A po zastosowaniu różnych wariantów remediacji

Rodzaj oznaczenia	Gleba A	Gleba A + + pszenica	Gleba A + + biopreparat bakteryjny	Gleba A + + biopreparat grzybowy	Gleba A + + pszenica + + biopreparat bakteryjny	Gleba A + + pszenica + + biopreparat grzybowy
Węglowodory alifatyczne	14,89	40,5	39,8	21,9	70,6	84,1
Węglowodory aromatyczne	6,3	33,6	21,3	18,0	50,9	66,8
Fracje ciężkie	0,58	2,56	1,13	0,97	6,92	8,6
Naftalen	59,68	89,7	91,6	74,6	96,7	98,9
Węglowodory dwupierścieniowe	59,68	89,7	91,6	74,6	96,7	98,9
Acenaften	20,56	62,5	59,6	44,1	82,1	89,7
Fluoren	12,43	42,17	34,9	23,9	72,9	86,3
Fenantren	11,32	58,3	47,9	19,8	78,1	91,9
Antracen	4,95	33,17	34,5	11,9	69,7	85,1
Węglowodory trójpierścieniowe	9,11	47,92	42,53	17,55	74,72	88,95
Fluoranten	0,9	31,26	27,8	33,2	46,4	72,1
Piren	2,59	30,29	25,6	27,4	59,7	67,4
Benzo(a)antracen	5,69	33,4	22,9	26,4	61,2	75,9
Chryzen	0,2	23,1	21,3	25,6	54,8	70,6
Benzo(b)fluoranten	0,5	22,8	11,6	19,1	50,6	75,1
Benzo(k)fluoranten	0,5	27,6	16,9	13,3	39,6	69,4
Węglowodory czteropierścieniowe	1,54	27,31	22,16	25,86	54,44	71,01
Benzo(a)piren	2,69	19,8	13,8	9,8	44,8	58,9
Benzo(ghi)perylen	2,67	11,2	17,6	10,2	34,6	51,1
Węglowodory pięciopierścieniowe	2,68	15,58	15,66	9,99	39,79	55,07
Dibenzo(a,h)antracen	3,78	24,3	14,3	12,5	31,5	44,2
Indeno(1,2,3-cd)piren	3,71	11,6	16,4	9,8	29,7	46,1
Węglowodory sześciopierścieniowe	3,72	14,11	15,98	10,33	30,05	45,72



Rys. 29. Formacje mikoryzowe w korzeniach pszenicy zaszczipionej biopreparatem grzybowym (powiększenie 200x)

Fig. 29. Micorrhizal formations in wheat's roots amended with fungi inoculation (magnification 200x)

5.5.2. Wpływ szczepienia gleby biopreparatami na liczebność bakterii zdolnych do degradacji węglowodorów

Wyniki badania wpływu szczepienia gleby biopreparatami na liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów zamieszczono w tabeli 21.

Dane zawarte w tabeli 21 pokazują, że obsianie gleby A pszenicą spowodowało wzrost liczby bakterii degradujących węglowodory ponad 20 razy w porównaniu z glebą bez roślin, wprowadzenie biopreparatu bakteryjnego - 19 razy, a grzybowego - 1,7 razy. Po zastosowaniu rośliny w połączeniu z biopreparatem bakteryjnym analizowany efekt był 3000 razy większy, a z biopreparatem grzybowym - 3800 razy większy w porównaniu z samą glebą A (tab. 21).

Liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów w glebie A w zależności od zastosowanego wariantu bioremediacji

Wariant bioremediacji	Liczba mikroorganizmów [liczba kom./g s.m.g]	
	X _{sr.}	SD
Gleba A (samooczyszczanie)	0,46(106)	0,045(106)
Gleba A+pszenica	10,1(106)	1,03(106)
Gleba A+biopreparat bakteryjny	8,7(106)	0,68(106)
Gleba A+biopreparat grzybowy	0,8(106)	0,06(106)
Gleba A+pszenica+ biopreparat bakteryjny	13,8(108)	173,88(106)
Gleba A+pszenica+ biopreparat grzybowy	17,5(108)	204,75(106)

X_{sr.} – średnia arytmetyczna (n=5)

s.m.g. – sucha masa gleby

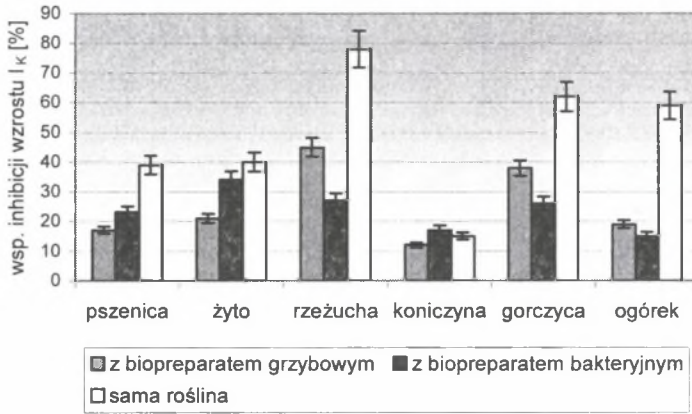
SD – odchylenie standardowe

5.5.3. Ocena ekotoksykologiczna gleby po procesie fitoremediacji wspomaganiej biopreparatami

Po trzymiesięcznym okresie fitoremediacji gleby A, wspomaganiej biopreparatami, przeprowadzono testy toksykologiczne mające na celu porównanie toksyczności próbek gleb, do których wprowadzono biopreparat bakteryjny, jak i grzybowy. Testy prowadzono z wykorzystaniem przedstawicieli producentów: pszenicy zwyczajnej (*Triticum vulgare* V.), żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.), rzeżuchy łąkowej (*Cardamine pratensis* L.), koniczyny białej (*Trifolium repens* V.), gorczycy białej (*Sinapis alba* L.) i ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.) - zgodnie z p. 4.3.1.1 i 4.3.1.2 - oraz konsumentów dżdżownic z gatunku *Eisenia fetida* (wg p. 4.3.2; funkcja siedliskowa gleby). Przeprowadzono również testy toksyczności wyciągów glebowych, uwzględniające funkcję retencyjną gleby, ze względu na możliwość przedostawania się zanieczyszczeń do odbiorników wodnych. Wykorzystano tu ślimaki *Physa acuta* Drap (p. 4.3.3) oraz glony *Scenedesmus quadricauda* (p. 4.3.1.3).

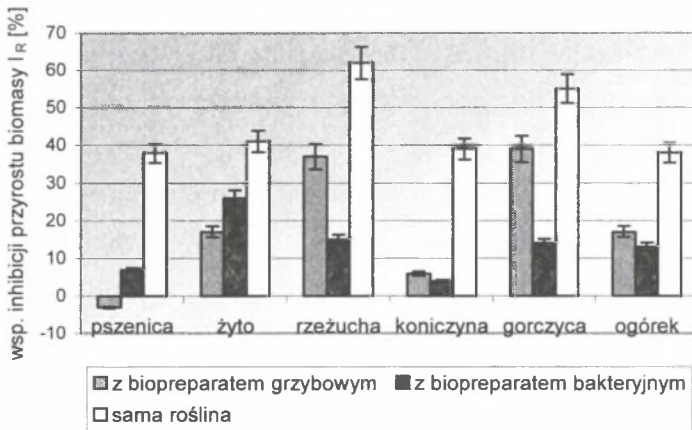
Wartości współczynnika inhibicji wzrostu korzeni I_K roślin w glebie A po procesie fitoremediacji wahały się w granicach 13 ÷ 44% (rys. 30). Najwyższą inhibicję odnotowano w przypadku rzeżuchy i gorczycy. W próbkach gleby z dodatkiem biopreparatu bakteryjnego stwierdzono większy stopień inhibicji wzrostu roślin jednoliściennych, natomiast w próbkach do których wprowadzono biopreparat grzybowy – roślin dwuliściennych (wyjątek stanowiła koniczyna). Dodatek biopreparatów, zarówno bakteryjnego, jak i grzybowego, spowodował istotne zmniejszenie toksyczności w stosunku do pszenicy, rzeżuchy, gorczycy oraz ogórka. Podobne zjawisko odnotowano porównując przyrost biomasy roślin (rys. 31), przy czym

w przypadku pszenicy wspomaganej biopreparatem grzybowym obserwowano większy przyrost biomasy.



Rys. 30. Porównanie efektu zahamowania wzrostu korzeni roślin po procesie fitoremediacji wspomaganej biopreparatami

Fig. 30. The comparison of plant's biomass inhibition after phytoremediation process supported with bacteria and fungi inoculation



Rys. 31. Porównanie efektu zahamowania przyrostu biomasy roślin po procesie fitoremediacji wspomaganej biopreparatami

Fig. 31. The comparison of plant's biomass inhibition after phytoremediation process supported with bacteria and fungi inoculation

W glebie A po procesie bioremediacji, zarówno w próbkach, do których dodano biopreparat bakteryjny, jak i grzybowy, w teście toksyczności ostrej stwierdzono znaczną

śmiertelność testowanych dżdżownic. W glebie z biopreparatem bakteryjnym wynosiła ona średnio 37% populacji, a z biopreparatem grzybowym – 42%. Dżdżownice, które przeżyły były apatyczne, nierównomiernie rozmieszczone w podłożu, a zabarwienie ich naskórka było sinofioletowe.

W testach przeprowadzonych na wyciągach glebowych z użyciem ślimaków oraz glonów nie stwierdzono znaczących różnic toksyczności pomiędzy próbkami z dodatkiem biopreparatu bakteryjnego, jak i grzybowego. Rekultywowana gleba charakteryzowała się nadal dość wysoką toksycznością, np. średnia śmiertelność ślimaków w odciekach pochodzących z próbek gleb z dodatkiem bakterii wynosiła 4,7 osobników na 10, z dodatkiem grzybów – 5,2/10. Doświadczenia z użyciem glonów *Scenedesmus quadricauda* jako organizmu testowego wykazały toksyczne działanie wyciągów glebowych, np. po 72 h inkubacji w próbkach wyciągów pochodzących z gleby z dodatkiem biopreparatu grzybowego stopień zahamowania wzrostu w stosunku do kontroli wynosił prawie 70%, zaś z dodatkiem biopreparatu bakteryjnego 56%. Na tak toksyczne oddziaływanie prawdopodobnie największy wpływ miały metabolity powstające w trakcie rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych lub desorpcja (trwale do tej pory związanych) zanieczyszczeń.

6. Dyskusja wyników badań

6.1. Wpływ procesu samooczyszczania na ekotoksyczność gleby skażonej produktami naftowymi i jej odcieków

Właściwością ekosystemów naturalnych zarówno lądowych, jak i wodnych jest przepływ energii i obieg materii. Postępująca industrializacja przyczyniła się do tego, że do obiegu pierwiastków na niespotykaną skalę zostały włączone ksenobiotyki. Są to związki chemiczne obce dla organizmów zasiedlających środowisko przyrodnicze i dla organizmu człowieka, które w istotny sposób zakłócają lub zmieniają przebieg naturalnych procesów zachodzących w ekosystemach.

W glebie A pobranej z terenu rafinerii Czechowice-Dziedzice, skażonej produktami naftowymi, wśród WWA przeważały węglowodory czteropierścieniowe stanowiące 67% wszystkich WWA. Węglowodory pięcio- i sześciopierścieniowe stanowiły 18% WWA, natomiast sumaryczny udział węglodorów dwu- i trójpierścieniowych wynosił 15%. Niekorzystną właściwością tej gleby była wysoka zawartość frakcji ciężkich – ok. 118 g/kg s.m.g. i znaczna koncentracja węglodorów alifatycznych – 55 g/kg s.m.g. oraz węglodorów aromatycznych – 10,5 g/kg s.m. (tab. 4, 5, 18). Poza tym były to stare zanieczyszczenia, w związku z czym ich biodostępność była w znacznym stopniu ograniczona. Dodatkowym utrudnieniem bioremediacji była duża toksyczność analizowanego materiału glebowego.

Procesy bakteryjnego utleniania produktów naftowych, w tym WWA, są dobrze poznane i opisane. Do lat 80. XX wieku sądzono, że bakterie są w stanie metabolizować WWA zawierające w cząsteczce maksymalnie trzy pierścienie benzenowe. Przełomem stały się wyniki opublikowane przez Heitkamp i Cerniglia (1988), którzy opisali wyizolowaną przez siebie Gram-dodatnią bakterię zdolną do rozkładu węglodorów 4-pierścieniowych w procesach kometabolizmu. Rok później Mueller i współpracownicy (Mueller i in., 1989) zademonstrowali po raz pierwszy w historii konsorcjum składające się z siedmiu szczepów bakteryjnych, które miało zdolność wykorzystywania węglodorów 4-pierścieniowych jako jedyne źródła węgla i energii. Od tego czasu opublikowano wiele wyników badań potwierdzających zdolność bakterii do degradowania węglodorów zawierających w cząsteczce co najmniej 4 pierścienie aromatyczne (Mahaffey i in., 1988; Kelley i Cerniglia, 1991; Trzesicka-Młynarz i Ward, 1995; Potter i in., 1999; Churchill i in., 1999). Niektóre

źródła literaturowe podają, że rozkład węglowodorów 5-pierścieniowych przez bakterie jest możliwy, jednak okres ich mineralizacji jest bardzo długi i może wynosić od 3 do 60 i więcej lat (Goodin i Webber, 1995; Schneider i in., 1996).

Badanie efektywności procesu samooczyszczania opisanego w niniejszej pracy prowadzono zgodnie z zaleceniami DECHEMA (1995), oceniając toksyczność gleby z uwzględnieniem jej funkcji jako siedliska oraz jej funkcji retencyjnej. Zanieczyszczenie ekosystemu glebowego stanowi bowiem bezpośrednie zagrożenie nie tylko dla jego biocenozy, ale również pośrednio dla organizmów wodnych oraz dla wielu organizmów (w tym człowieka) korzystających z gleby jako bazy pokarmowej.

W testach toksyczności wykorzystywano przedstawicieli należących do trzech poziomów troficznych: producentów, reducentów oraz konsumentów. Przeprowadzono również badania mające na celu ocenę właściwości mutagennych skażonej gleby. Wyniki przeprowadzonych testów wykazały, że wrażliwość reprezentantów należących do poszczególnych grup była zróżnicowana.

Spśród metod wykorzystujących rośliny w celu określenia toksyczności zanieczyszczonych gleb najczęściej stosuje się testy kiełkowania roślin i zahamowania ich wzrostu. Testami najczęściej przeprowadzanymi na zwierzętach są testy toksyczności ostrej, testy unikania oraz testy reprodukcji. W biomonitoringu toksyczności gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi oraz WWA podczas procesu ich bioremediacji stosuje się głównie testy ostre z wykorzystaniem dżdżownic uzupełnione testami kiełkowania nasion. Testy te są użyteczne ze względu na prostą metodykę, umiarkowaną wrażliwość bioindykatorów w stosunku do toksykantów oraz możliwość użycia ich w warunkach *ex situ* (Maila i Cloete, 2005).

6.1.1. Fitotoksyczność gleby i odcieków

Badania fitotoksyczności gleby A skażonej produktami naftowymi wykazały, że zanieczyszczenia pozostałe w glebie A po pierwszym tygodniu samooczyszczania powodowały ok. 75% inhibicję przyrostu biomasy żyta i gorczycy, ok. 57% inhibicję przyrostu biomasy rzeżuchy, prawie 40% – ogórka i pszenicy i 30% – koniczyny. Wydłużanie czasu samooczyszczania gleby A nie powodowało istotnych zmian współczynnika inhibicji. W przypadku koniczyny zaobserwowano nawet większą fitotoksyczność gleby po procesie samooczyszczania w czasie 4 i 8 tygodni w porównaniu z glebą oczyszczaną przez okres 1 i 12 tygodni. Rośliną najbardziej wrażliwą na

zanieczyszczenia zawarte w analizowanych próbkach gleby A była rzeżucha, natomiast najbardziej odporne okazały się pszenica i ogórek (rys. 5, tab. 7).

Większy efekt fitotoksyczny zaobserwowano w przypadku odcieków glebowych (tab. 15, rys. 27). Zanieczyszczenia obecne w próbkach odcieków pochodzących z gleby A po pierwszym tygodniu procesu samooczyszczania powodowały całkowitą inhibicję wzrostu korzeni ogórka i koniczyny i średnio ok. 90% inhibicję wzrostu korzeni rzeżuchy i gorczycy. Średnie wartości współczynnika I_K obliczone dla roślin jednoliściennych (pszenica i żyto) wynosiły ok. 60%. Po 12 tygodniach procesu samooczyszczania odcieki glebowe charakteryzowały się nadal bardzo wysoką fitotoksycznością w stosunku do bardziej wrażliwych roślin dwuliściennych (I_K ok. 75% dla rzeżuchy, ok. 63% dla gorczycy i ok. 58% dla ogórka). Średnia inhibicja wzrostu korzeni roślin jednoliściennych (pszenica i żyto) wynosiła ok. 40% (tab. 15, rys. 27).

Dużą wrażliwość rzeżuchy na toksyczne działanie węglowodorów odzwierciedlają badania przeprowadzone przez Maila i Cloete (2002), którzy testowali zdolność kiełkowania nasion rzeżuchy w glebach zanieczyszczonych WWA w sposób „celowy” i w glebach zanieczyszczonych „historycznie”. W glebach dawno zanieczyszczonych węglowodorami nasiona rzeżuchy w ogóle nie kiełkowały, natomiast w zanieczyszczonych celowo przy poziomie zanieczyszczenia 300 mg WWA/kg s.m.g. odsetek kiełkujących roślin małał o ok. 90 w porównaniu z próbami kontrolnymi. Jak podają Henner i in. (1999), WWA o niskiej masie cząsteczkowej w znacznie większym stopniu oddziałują toksycznie na rośliny niż węglowodory o dużych masach. Autorzy ci zaobserwowali, że roślinami bardziej odpornymi na toksyczne działanie węglowodorów były rośliny jednoliścienne (żyto i kukurydza) niż dwuliścienne (koniczyna i gorczyca). W próbkach gleb silnie zanieczyszczonych (pochodzących z terenów rafinerii) rośliny dwuliścienne (gorczyca, lucerna i koniczyna) w ogóle nie kiełkowały, natomiast poziom kiełkowania jednoliściennych wahał się w zakresie 9÷30%. Po dwóch miesiącach uprawy roślin w glebach zanieczyszczonych węglowodorami autorzy odnotowali skrócenie długości korzeni roślin w porównaniu z roślinami z próbek kontrolnych.

Podobny efekt zaobserwowano w badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy (rys. 6÷16). Obserwacje mikroskopowe korzeni roślin rosnących na terenach zanieczyszczonych węglowodorami wykazały redukcję strefy włósnikowej korzeni, skrócenie ich długości przy jednoczesnym wzroście średnicy, a także obecność bardzo dużej ilości przestworów powietrznych aerynychymy.

Potwierdzenie celowości przeprowadzania testów wzrostu roślin, a nie tylko ich kiełkowania przy wyborze roślin używanych w procesie fitoremediacji, można odnaleźć w artykule Smitha i in. (2006). Autorzy testowali 4 gatunki traw (*Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Festuca rubra* oraz *Lolium perenne*) i trzy gatunki roślin motylkowych (*Lotus corniculatus*, *Trifolium pratense*, *Trifolium repens*). W eksperymencie wykorzystano gleby zanieczyszczone węglowodorami: glebę skażoną WWA (1000 mg WWA/kg s.m.g.), glebę zanieczyszczoną smołą pogazową (węglową; 1600 mg/kg s.m.g.), glebę z terenu koksowni (5000 mg węglowodorów/kg s.m.g.). W przeprowadzonym teście kiełkowania roślin pomimo tak znacznych stężeń i dużej różnorodności zanieczyszczeń nie zaobserwowali oni istotnych różnic w efektywności kiełkowania nasion między próbkami gleb skażonych i kontrolnych, natomiast w teście wzrostu roślin odnotowali istotną redukcję biomasy roślin rosnących na glebach zanieczyszczonych w porównaniu z glebą kontrolną.

Obserwowany przez wielu autorów i wykazany także w niniejszej pracy większy efekt fitotoksyczny próbek odcieków glebowych w porównaniu z próbkami gleby wynika najprawdopodobniej z różnej biodostępności zanieczyszczeń obecnych w glebie i roztworach. Zanieczyszczenia występujące w glebach oddziałują z matrycą glebową, wskutek czego część z nich jest trwale sorbowana na koloidach glebowych i tym samym jest niedostępna dla mikroorganizmów, roślin i zwierząt (Lanno i in., 2004).

Odpowiedź bioindykatorów na zanieczyszczenia organiczne zmienia się w zależności od gatunku testowanych roślin (Wang, 1991). Siciliano i wsp. (1997) obserwowali ponad dziesięciokrotną różnicę między współczynnikami inhibicji wzrostu roślin różnych gatunków traw rosnących w glebach zanieczyszczonych substancjami chloroorganicznymi. Według Cairns i Chapman (1993, 1995) użycie organizmów autochtonicznych w charakterze bioindykatorów powoduje wzrost niezawodności biotestów.

Istotne różnice w toksyczności gleb mogą także być skutkiem obecności w nich niektórych specyficznych substancji. W przeprowadzonych przeze mnie badaniach dużo większa toksyczność gleby A w porównaniu z glebą B mogła wynikać z obecności naftalenu (tab. 5). Jak podają Henner i in. (1999), fitotoksyczność gleb zanieczyszczonych węglowodorami jest dużo większa w obecności znacznych stężeń substancji lotnych, zwłaszcza naftalenu. Związki o małej masie cząsteczkowej powinny być stosunkowo łatwo usuwane z gleby, np. w procesie odparowania. Wyniki uzyskane w trakcie realizacji niniejszej pracy wykazują, że po 12 tygodniach samooczyszczania sumaryczna koncentracja 9 WWA praktycznie nie uległa zmianie, natomiast stężenie naftalenu spadło o połowę (tab. 18).

Wysoka ekotoksyczność gleby A mogła być wynikiem nie tylko zanieczyszczenia jej węglowodorami, lecz również niekorzystnego stosunku stężenia węgla do stężenia azotu. Jak podaje Lityński (1982), dostępność azotu w glebie dla roślin jest ograniczona i maleje wraz ze wzrostem stosunku C:N.

6.1.2. Zootoksyczność gleby i odcieków

Do badań toksyczności ostrej jako przedstawiciela konsumentów wybrano dżdżownice z gatunku *Eisenia fetida*. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń zaobserwowano, że dżdżownice umieszczone w pojemnikach wypełnionych glebą A po pierwszym tygodniu procesu samooczyszczania były mało aktywne i nie wykazywały wyraźnej reakcji na dotyk. Ich rozmieszczenie w podłożu było nierównomierne. Po 14 dniach testu śmiertelność dżdżownic wynosiła 70%. Test toksyczności ostrej z wykorzystaniem dżdżownic powtórzono po 12 tygodniach procesu samooczyszczania gleby A. Okazało się, że efekt toksycznego oddziaływania zanieczyszczeń pozostałych w glebie A był podobny, jak na początku procesu (p. 5.2.5). Obserwacje te są zbieżne ze spostrzeżeniami Małachowskiej-Jutsz (2002), dokonany podczas realizacji badań z wykorzystaniem przepacowanego oleju silnikowego. Stężenie węglowodorów alifatycznych w oleju wynosiło ok. 1074 mg/kg oleju. Do podłoża glebowego wprowadzano 1, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 i 200 g oleju/kg gleby, a następnie prowadzono test toksyczności ostrej na dżdżownicach. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenia wyższe od 1 g oleju/kg gleby uniemożliwiały prawidłowy przyrost biomasy dżdżownic, a stężenia powyżej 175 g/kg gleby powodowały śmierć zwierząt.

Badania laboratoryjne przeprowadzone przez Kiepas-Kokot (1999) na dżdżownicach gatunku *Eisenia fetida* dowiodły, że niskie stężenia substancji ropopochodnych w podłożu hodowlanym działają wabiąco, szczególnie na osobniki dorosłe. Testy atrakcyjności pokarmowej, przeprowadzone przez autorkę wykazały, że atrakcyjność ta rosła wraz z upływem czasu. Efekt ten był prawdopodobnie skutkiem nie tylko adaptacji, ale przede wszystkim degradacji najlżejszych frakcji substancji ropopochodnych. Mimo wabiącego oddziaływania składników ropopochodnych na dżdżownice podłoża z dodatkiem tych substancji uniemożliwiały prawidłowy przyrost biomasy dżdżownic, a także powodowały ich śmiertelność. Do podobnych wniosków doszła Schaefer (2001), która badała wpływ przepacowanego oleju na śmiertelność, reprodukcję i unikanie skażonego podłoża przez dżdżownice. W podłożu zanieczyszczonym olejem o stężeniu węglowodorów 1g/kg gleby śmiertelność dżdżownic nie przekraczała 6%, podczas gdy w teście reprodukcji odnotowała

przeszło 80% spadek produkcji kokonów i ilości wylęgłego potomstwa. W glebie zanieczyszczonej 1 g oleju/kg gleby biomasa dżdżownic była ok. 10% niższa w porównaniu ze zwierzętami w próbkach kontrolnych. W teście unikania aż 84% dżdżownic unikało skażonego podłoża.

Wyniki badań własnych wykazały, że gleba A poddawana procesowi samooczyszczania w czasie 12 tygodni nadal zawierała wysokie stężenia węglowodorów alifatycznych (ok. 47 g/kg gleby), aromatycznych (ok. 8 g/kg gleby) i frakcji ciężkich (ok. 117 g/kg gleby) (tab. 18). W szczególności węglowodory aromatyczne mogą być odpowiedzialne za efekt toksyczności ostrej w glebach. Jak podają Dorn i Salanitro (2000), Tang i in. (1999) oraz Tomlin (1983), toksyczny potencjał węglowodorów aromatycznych wynika z ich zdolności do wiązania się z niepolarnymi elementami błon biologicznych, powodując ich dezintegrację. Niskie stężenia tych węglowodorów w glebach zasobnych w substancję organiczną w niewielkim stopniu wpływały na organizmy grzebiące w glebie, np. dżdżownice, które są zdolne do unikania niedogodnych dla siebie siedlisk glebowych dzięki dużej liczbie chemoreceptorów zlokalizowanych w prostomium.

Na podstawie badań przeprowadzonych w trakcie realizacji niniejszej pracy z wykorzystaniem ślimaków ustalono, że zanieczyszczenia zawarte w próbkach odcieków glebowych - niezależnie od czasu trwania procesu samooczyszczania gleby A - powodowały 100% śmiertelność badanych zwierząt. Wysoką wrażliwość mięczaków na toksyczne działanie węglowodorów obserwował także Wake (2005).

Ponieważ gleba A była pobierana z terenu rafinerii, obok oznaczanych podczas badań zanieczyszczeń mogła zawierać i inne związki o charakterze toksycznym. Ścieki pochodzące z rafinerii (w zależności od zastosowanego procesu technologicznego) mogą zawierać różne zanieczyszczenia, m. in. fenole, amoniak, cyjanki, związki azotowe, metale ciężkie (chrom, żelazo, nikiel, miedź, molibden, selen, wanad i cynk), parafiny, cykloalkany, alkeny, węglowodory aromatyczne i inne (Wake, 2005).

Zanieczyszczenia zawarte w odciekach glebowych mogły oddziaływać na organizmy testowe w różny sposób. Przykładowo związki niepolarne, tj. węglowodory, mogły tworzyć powłokę (warstwę) oblepiającą ślimaki i uniemożliwiającą im oddychanie, wskutek czego zwierzęta dusiły się. Bardzo prawdopodobne wydaje się również, że wysoka toksyczność odcieków wobec ślimaków wynikała z ich bezpośredniego kontaktu z zanieczyszczeniami będącymi truciznami dobrze rozpuszczalnymi w wodzie. Teza ta znajduje poparcie w pracach Wake'a (2005), Buikema i in. (1981), którzy wykazali, że spośród zanieczyszczeń wchodzących w skład sztucznej mieszaniny substancji ropopochodnych największą

toksycznością charakteryzował się olej napędowy, a w dalszej kolejności – siarczki, amoniak, fenol i chrom. Wysoką toksyczność zanieczyszczeń ropopochodnych w stosunku do organizmów wodnych potwierdzają również prace innych autorów, m. in. Bleckmann (1995).

6.1.3. Genotoksyczność gleby i odcieków

Ocena stopnia zanieczyszczenia gleb w większości przypadków oparta jest na analizach chemicznych. W glebach silnie zanieczyszczonych różnorodnymi substancjami, np. metalami ciężkimi, węglowodorami, pestycydami itp. oznaczenie wszystkich występujących w glebie zanieczyszczeń i ich stężeń nastęrcza wiele trudności analitycznych i nie zawsze daje pogląd o zagrożeniach wynikających z ich obecności. Dlatego też niezbędne, a nawet pożądane wydaje się włączenie testów z wykorzystaniem bioindykatorów, wśród których coraz większą popularnością cieszą się testy wykazujące mutagenn lub kancerogenne działanie zanieczyszczeń (Monareca i in., 2002). Ze względu na rodzaj ocenianego parametru testy genotoksyczności dzielimy na: testy wykrywające uszkodzenia DNA (np. naprawcza synteza DNA, pomiar fragmentacji jedno- lub dwuniciowego DNA, kowalencyjne wiązanie badanego związku lub jego metabolitów z DNA); testy wykrywające mutacje genowe (np. test Ames, test recesywnej letalności); testy wykrywające aberracje chromosomowe (np. test aberracji anafazy *Allium cepa*) (Barański, 1995). Przeszło 37,6% publikowanych opracowań dotyczących genotoksycznego wpływu substancji wykorzystuje testy na *Salmonelli*, a 13,4% to testy mutagenności i testy uszkodzeń DNA na innych bakteriach (np. test na *Bacillus*, SOS Chromotest, Mutatox) (White i Claxton, 2004).

W niniejszej pracy badania genotoksyczności przeprowadzono na dwóch szczepach bakterii *Bacillus subtilis*: M45 Rec⁻, który nie ma zdolności do reperacji DNA i *Bacillus subtilis* H17 Rec⁺, który posiada tę zdolność. Wyniki tych badań (tab. 14) wykazały potencjalną genotoksyczność związków zawartych w próbkach skażonej gleby A, poddawanych procesowi samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni, jak i kontrolnej gleby B. Działanie genotoksyczne zaobserwowano także w przypadku próbek odcieków glebowych (tab. 16). Wielu autorów, np. Goggleman i Spitzauer (1982), Brown i in. (1985) oraz Knize i in. (1987) wskazuje na aktywność mutagenną nie tylko próbek gleb pobranych z terenów uprzemysłowionych, lecz również z terenów rolniczych i próbek gleb nie zanieczyszczonych. Knize i in. (1987) oraz Kool i in. (1989) tłumaczą mutagenność gleb niezanieczyszczonych jako wynik aktywności metabolicznej mikroorganizmów glebowych, zwłaszcza grzybów pleśniowych wytwarzających aflatoksyny o charakterze kancerogennym. Wyniki badań przeprowadzonych przez Jonesa i Peace (1989) nie tylko wykazały

genotoksyczność gleb zanieczyszczonych WWA, ale także wskazały na korelację między wysokimi stężeniami węglowodorów aromatycznych w glebie a jej aktywnością mutagenną. Wśród najbardziej mutagennych węglowodorów, obok benzo(a)pirenu wymieniane są również benzo(a)antracen, dibenzo(a,h)antracen, benzo(b)fluoranten, chryzen, fluoranten (White i Claxton, 2004). Węglowodory te występowały również w analizowanych próbkach gleb zarówno przed, jak i po procesie samooczyszczania (tab. 18).

Genotoksyczność odcieków pochodzących z gleby A oraz gleby B istotnie różniły się między sobą przez cały okres procesu samooczyszczania (tab. 16). Wraz z postępującym procesem samooczyszczania odnotowano wzrost genotoksyczności odcieków gleby A. Wyjaśnienie tego efektu można wiązać z mechanizmem biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, podczas której metabolitami pośrednimi mogą być formy chinonowe lub epoksydowe o właściwościach mutagennych. Philips i wsp. (2000) podają, że pomimo zmniejszania się stężenia węglowodorów w zanieczyszczonych glebach podczas ich bioremediacji testy prowadzone z użyciem dżdżownic, roślin oraz testy genotoksyczności wskazywały na wzrastającą toksyczność badanych próbek gleb. Sugeruje to, iż produkty pośrednie powstające podczas bioremediacji były bardziej toksyczne i mutagenne, aniżeli substraty.

6.2. Fitoremediacja gleby A

6.2.1. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na budowę morfologiczną korzeni roślin i frekwencję mikoryzową

Stosowane dotychczas biologiczne metody usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntów wykorzystują głównie bakterie i grzyby saprofityczne, podczas gdy rola grzybów mikoryzowych była i jest dotąd niedoceniana. Tymczasem prawidłowo wykształcona mikoryza przyczynia się do zwiększenia przeżywalności roślin w trudnych warunkach. Jej obecność sprzyja zwiększeniu dostępności biogenów, obniżeniu stresu związanego z małą dostępnością wody oraz wzmożeniu odporności na patogeny, a także wzmożeniu produkcji fitohormonów oraz poprawie struktury podłoża. W efekcie może nastąpić znaczne zwiększenie efektywności procesu bioremediacji.

Jednym z najpoważniejszych ograniczeń fitoremediacji jest często szybkie zamieranie roślin na terenach mocno zdegradowanych. W swoich badaniach skupiłam się nad znalezieniem roślinie „partnera”, który umożliwiłby jej przeżycie i rozwój w tak niesprzyjających warunkach.

Przeprowadzone studia literaturowe sugerowały możliwość wykorzystania zdolności różnych rodzajów grzybów do metabolizowania skomplikowanych struktur węglowodorów, w tym również WWA z pięcioma, a nawet sześcioma pierścieniami aromatycznymi w cząsteczce (Field i in., 1992; Hammel, 1995; Gramss i in., 1999; Steffen i in., 2003; D'Annibale i in., 2005). Analiza dostępnych danych stała się przyczynkiem do podjęcia badań nad możliwością zwiększenia efektywności procesu fitoremediacji przez zastosowanie szczepionek bakteryjnych i grzybowych.

Mikoryza to mutualistyczna zależność pomiędzy żywymi komórkami korzeni roślin, a niepatogenicznymi, wysoko wyspecjalizowanymi grzybami zasiedlającymi glebę. Symbioza polega tutaj głównie na uzupełnieniu składników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania obydwu organizmów. Grzyby mikoryzowe wydzielają na zewnątrz m. in. kwas węglowy oraz enzymy, które powodują przejście unieruchomionych w glebie związków fosforowych, wapniowych, magnezowych i mikroelementów w formy przyswajalne dla roślin. Grzyby mikoryzowe, rozkładając materię organiczną, uwalniają związki azotowe i fosforowe, które następnie są wykorzystywane przez rośliny. Wszystko to powoduje, że zmikoryzowane rośliny pobierają przeciętnie około 90% więcej azotu, 75% potasu i przeszło 200% więcej fosforu niż rośliny rosnące bez partnera grzybowego (Badura, 2004; Borkowska, 2004).

Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań potwierdziły istotny, korzystny wpływ grzybów mikoryzowych na „utrzymanie się” roślin na terenach zanieczyszczonych węglowodorami. Okazało się, że stopień mikoryzacji roślin rosnących na terenach zanieczyszczonych był średnio prawie sześciokrotnie wyższy, niż w glebach czystych (tab. 10, rys. 21÷25). Z gleb zanieczyszczonych węglowodorami izolowano również znacznie więcej spor grzybów mikoryzowych, średnio o 44% (tab. 11, rys. 26). Większa wartość współczynnika mikoryzacji w glebie skażonej A mogła być częściowo skutkiem nieco mniejszej zawartości fosforu (0,16 g/kg s.m.) w porównaniu z glebą kontrolną B (0,24 g/kg s.m.) (tab. 3). Dowiedziono bowiem, że wraz ze wzrostem ilości fosforu w glebie maleje znaczenie mikoryzacji dla roślin (White i Charvat, 1999), a grzyby mikoryzowe najlepiej rozwijają się przy niewielkim deficycie tego pierwiastka (Gryndler i Lipavsky, 1995; Różański, 2002).

Rośliny korzystają z dwóch alternatywnych strategii wzrostu i rozwoju. Pierwszą jest wytworzenie rozbudowanego systemu korzeniowego z dobrze rozwiniętą strefą włośnikową. Zjawisko takie obserwowano w przypadku roślin rosnących w glebie kontrolnej B (rys. 6÷9). Inną jest wytworzenie zależności mikoryzowych z obecnymi w glebie grzybami, przy czym

korzystne efekty dotyczą głównie roślin rosnących na glebach zanieczyszczonych. Obydwie strategie wiążą się z dużymi wydatkami energetycznymi ze strony rośliny. Dlatego rośliny nie dopuszczają do jednoczesnego wytworzenia mikoryz o wysokim poziomie kolonizacji korzeni i mocno rozbudowanego, aktywnego systemu korzeniowego (rys. 21÷25) z powodu zbyt wysokiego kosztu utrzymania tych dwóch elementów. Rośliny z obszernym systemem korzeniowym (mocno rozgałęzionymi, długimi korzeniami z licznymi włośnikami) często czerpią małe korzyści z mikoryz i odwrotnie (www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza).

Efekt ten zaobserwowano także u roślin wykorzystywanych w przeprowadzonych badaniach. Wykazano, że systemy korzeniowe zmikoryzowanych roślin uprawianych na glebie zanieczyszczonej A były znacznie krótsze - średnio o ok. 50% w przypadku jęczmienia, peluski i owsa oraz prawie 70% w przypadku pszenicy. Korzenie te wykazywały zanik strefy włośnikowej i zredukowaną ilość korzeni bocznych, a także obecność przestworów powietrznych wytworzonej tkanki powietrznej - aerenchymy (rys. 12÷16). Wyniki analiz mikroskopowych wykazały również wzrost grubości korzeni roślin rosnących w glebach zanieczyszczonych (rys. 10 i 11). Efekt ten można wytłumaczyć tym, że ropa naftowa i jej pochodne, będąc mieszaniną związków hydrofobowych rozprzestrzenia się w gruntach nierównomiernie, pogarszając warunki pionowej migracji wody i powietrza w obu kierunkach, co powoduje zatykanie porów glebowych (Surygała, 2000). W związku z tym w gruntach zanieczyszczonych tymi substancjami spotykamy miejsca z niedoborem wody (Davies i Bacon, 2003). Konsekwencją tego może być adaptacja morfologiczna korzeni roślin, polegająca m. in. na redukcji ich długości oraz wzroście średnicy. Innym czynnikiem wpływającym na modyfikację systemów korzeniowych może być dostępność składników odżywczych. W swoich badaniach Davies i Bacon (2003) obserwowali zwiększoną średnicę korzeni roślin uprawianych w glebach z niedoborem fosforu, jak również w glebach zanieczyszczonych produktami naftowymi. Efekt ten tłumaczą tym, iż podczas biologicznego rozkładu węglowodorów wzrasta zapotrzebowanie mikroorganizmów na składniki mineralne, w związku z czym rozpoczyna się konkurencja o nie pomiędzy roślinami a mikroorganizmami. Konsekwencją niedostatecznej ilości składników mineralnych w glebie jest wzrost średnicy korzeni roślin z jednoczesną redukcją ilości włośników.

6.2.2. Wpływ obecności grzybów mikoryzowych na rozwój mikroorganizmów ryzosferowych w glebie

Zmiany morfologiczne korzeni roślin pociągają za sobą zmiany w składzie i ilości mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę. Różne mikroorganizmy ryzosferowe, takie jak:

bakterie wspomagające wzrost roślin (PGPR – plant growth promoting rhizobacteria), bakterie uczestniczące w rozpuszczaniu fosforanów (P-solubilizing bacteria), bakterie wspomagające wytwarzanie mikoryz (MHB – mycorrhizal helping bacteria) oraz arbusku-larne grzyby mikoryzowe (AMF – arbuscular mycorrhizal fungi) są zdolne do inicjacji specyficznych procesów przez nie przeprowadzanych tylko i wyłącznie wtedy, gdy osiągną odpowiednią koncentrację w glebie (Khan, 2005). Wykazano (tab. 8), że rośliny (niezależnie od ich gatunku) stymulowały wzrost i rozwój mikroorganizmów ryzosferowych. Po 12 tygodniach wzrostu badanych roślin największy przyrost liczby bakterii wystąpił w ryzosferze jęczmienia zarówno w glebie skażonej (od $2,41 \cdot 10^4$ do $1,25 \cdot 10^7$ kom./kg suchej masy gleby), jak i czystej (z $1,43 \cdot 10^5$ do $1,21 \cdot 10^7$). Przyrost liczby bakterii był najmniejszy w ryzosferze owsa rosnącego w glebie A (od $2,41 \cdot 10^4$ do $6,43 \cdot 10^5$) oraz pszenicy uprawianej w glebie B (od $1,43 \cdot 10^5$ do $1,08 \cdot 10^6$). Liczba grzybów pleśniowych – podobnie, jak liczba bakterii – wzrosła po obsianiu gleby roślinami. Największy przyrost ich ilości stwierdzono w ryzosferze jęczmienia i pszenicy – od $1,77 \cdot 10^4$ do odpowiednio $6,46 \cdot 10^5$ i $6,09 \cdot 10^5$ j.t.k./kg s.m.g. (tab. 8). Roślinami, które najbardziej stymulowały wzrost i rozwój promieniowców, były owies i pszenica (tab. 8).

Mimo początkowej mniejszej (średnio o rząd) liczebności bakterii w glebie A w porównaniu z glebą B, po dwunastotygodniowym okresie uprawy roślin okazało się, że ryzosfera roślin uprawianych na glebie A zanieczyszczonej produktami naftowymi zawierała większą liczbę bakterii niż ryzosfera roślin z gleby kontrolnej B (wyjątek stanowił owies – tab. 8). Podobny efekt odnotowano w przypadku grzybów saprofitycznych. Porównując liczbę promieniowców zaobserwowano, że co prawda rośliny stymulowały ich wzrost i rozwój, niemniej jednak liczebność tych mikroorganizmów w ryzosferze roślin uprawianych na glebie skażonej A była mniejsza niż w glebie czystej B (tab. 8). Wzrost liczebności mikroorganizmów ryzosferowych w glebie A może być związany m.in. z większym stopniem mikoryzacji badanych roślin, umożliwiającej obniżenie wydatku energetycznego związanego z pozyskiwaniem składników odżywczych z gleby, a także na ich przyswajalność (Khan, 2005).

Przeprowadzone badania potwierdziły, że mikroorganizmy ryzosferowe, a w szczególności grzyby mikoryzowe odgrywają istotną rolę w ekosystemach zdegradowanych, przyczyniając się do utrzymania właściwej żyzności gleby.

6.2.3. Wpływ zastosowanych modyfikacji gleby na rozwój mikroorganizmów degradujących węglowodory

Joner i in. (2001 i 2006) w swoich badaniach zaobserwowali, że obecność grzybów mikoryzowych wpływa na zmianę jakości i ilości mikroorganizmów ryzosferowych, czego dowodem jest zmiana profilu fosfolipidowego kwasów tłuszczowych w próbkach z grzybami mikoryzowymi. Efekt ten tłumaczą m. in. tym, że każdy gatunek rośliny wydziela specyficzne i tylko sobie właściwe wydzieliny korzeniowe, które determinują obecność określonych grup, a nawet gatunków mikroorganizmów ryzosferowych. Ponadto, mikoryzacja powoduje wzrost biomasy korzeni. Czynniki te mogą sprzyjać wytworzeniu specyficznej mikroflory, np. zdolnej do intensywnego rozkładu WWA. Grzyby mikoryzowe modyfikują strukturę korzeni i ich wydzielin. Dowiedziono, że w ryzosferze zmikoryzowanych roślin stężenie związków fenolowych jest wyższe aniżeli w ryzosferze roślin bez partnera grzybowego. Wszystko to może powodować indukcję metabolizmu węglowodorów przez mikroorganizmy w sposób podobny do udokumentowanego w przypadku salicylanów (Chen i Aitken, 1999).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały wzrost ilości mikroorganizmów zdolnych do degradacji węglowodorów w ryzosferze zmikoryzowanych roślin (tab. 9 i 21). Liczba mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów w glebie zanieczyszczonej A była aż 31 razy większa niż w glebie B. Po obsianiu próbek gleb roślinami różnice te były jeszcze bardziej wyraźne, np. w wazonach z pszenicą w glebie A zanieczyszczonej liczba tych mikroorganizmów była większa 228 razy w porównaniu z glebą czystą; w wazonach z owsem – 185 razy, z jęczmieniem – 168 razy, a z peluszką 37 razy (tab. 9).

Grzyby mikoryzowe, kolonizując korzenie roślin, powodują formowanie dodatkowych obfitych miceliów ($5 \div 50$ m strzępek grzybni/g gleby), co wpływa bezpośrednio na zmianę struktury gleby. Strzępki grzybów mikoryzowych ze względu na małe rozmiary ($2 \div 15$ μ m) mają dostęp do mikroporów glebowych, do których nie docierają korzenie roślin. Wszystko to powoduje, że gleba przerośnięta przez żyjące strzępki grzybów mikoryzowych ma inne właściwości fizykochemiczne aniżeli bez nich. Wyniki badań Jonera i in. (2001) wykazały wyższe stężenia glomaliny i zewnątrzkomórkowych enzymów (mogących stanowić substraty pokarmowe dla mikroorganizmów) w bezpośrednim sąsiedztwie zmikoryzowanych korzeni roślin. Ze względu na stosunkowo krótki okres życia strzępki grzybów mikoryzowych mogą być po śmierci źródłem łatwo przyswajalnego N, P i C, co może wpływać na wzrost aktywności mikroorganizmów (w tym także degradujących węglowodory).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że dodatkowe szczepienie gleby zarówno biopreparatem bakteryjnym, jak i grzybowym - w połączeniu ich z roślinami - wpływało na

wzrost i rozwój mikroorganizmów zdolnych do degradacji węglowodorów (tab. 20). Wykazano, że wprowadzenie do gleby A biopreparatu bakteryjnego spowodowało 19-krotny wzrost liczebności bakterii mających zdolność degradacji węglowodorów w porównaniu z samą glebą A, zaś wprowadzenie biopreparatu grzybowego – zaledwie 1,7 razy. Przy zastosowaniu rośliny w połączeniu z biopreparatem bakteryjnym koncentracja mikroorganizmów degradujących węglowodory wzrosła 3000 razy, a z biopreparatem grzybowym – 3800 razy w porównaniu z samą glebą A (tab. 21). Wyniki te znajdują swoje odzwierciedlenie w analizach chemicznych pokazujących największy ubytek węglowodorów w glebie A z roślinami wspomaganymi przez biopreparat grzybowy (tab. 20).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały także, że zastosowanie samego biopreparatu bakteryjnego lub samej rośliny daje porównywalne efekty w zakresie stopnia usunięcia węglowodorów oraz koncentracji bakterii zdolnych do degradacji węglowodorów. W pierwszym przypadku mikroorganizmy degradujące węglowodory pochodzą z biopreparatu, a w drugim – ze stymulacji wzrostu i rozwoju tej grupy mikroorganizmów przez specyficzne wydzieliny korzeniowe rośliny zastosowanej do fitoremediacji (tab. 20).

Znane są liczne oddziaływania zarówno pośrednie, jak i bezpośrednie mikroorganizmów ryzosferowych, które mogą przekazywać roślinom syntetyzowane przez siebie składniki pokarmowe lub też ułatwiać ich pobieranie przez rośliny ze środowiska. Szczególnie przydatne w tym zakresie są bakterie wiążące azot atmosferyczny, bakterie produkujące siderofory kompleksujące jony żelaza, mikroorganizmy syntetyzujące fitohormony (np. auksyny i cytokinininy), bakterie produkujące enzymy rozkładające etylen produkowany przez rośliny w warunkach stresowych i wiele innych (Glick, 2003).

6.2.4. Wpływ zastosowanych modyfikacji gleby na efekt usunięcia zanieczyszczeń ropopochodnych

Na podstawie informacji literaturowych (Meulenberg i in., 1997; Tabak i in., 2003; Huesemann i in., 2004) można przyjąć, że rozkład węglowodorów w glebach zachodzi w dwóch etapach: początkowo, gdy węglowodory są łatwo dostępne dla mikroorganizmów, stosunkowo wysoka szybkość biodegradacji jest kontrolowana przez szybkość pobierania zanieczyszczeń i szybkość ich metabolizowania przez mikroorganizmy glebowe. Podczas procesu biodegradacji następuje stopniowe wyczerpywanie łatwo dostępnych węglowodorów, w związku z czym szybkość biodegradacji maleje, a cały proces jest limitowany przez szybkość desorpcji zanieczyszczeń z koloidów glebowych lub ich wymywanie. Generalnie

przyjmuje się, że biodostępność zanieczyszczeń podczas biodegradacji jest ograniczana przez ich rozpuszczalność oraz szybkość desorpcji z koloidów.

W pracy badano wpływ dodatku biopreparatów – bakteryjnego oraz grzybowego – w połączeniu ich z roślinami na stopień usunięcia zanieczyszczeń z gleby A.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały największy ubytek węglowodorów dwupiersścieniowych (sięgający ponad 96%) w próbkach, w których zastosowano łącznie biopreparat oraz rośliny. Zastosowanie samego biopreparatu bakteryjnego bądź grzybowego lub samej rośliny nie przynosiło tak dobrych rezultatów, jak użycie ich w połączeniu (tab. 20). Najlepsze efekty wykorzystania biopreparatów oraz roślin w celu przyspieszenia procesów biodegradacji węglowodorów ropopochodnych zaobserwowano w przypadku węglowodorów trój-, cztero-, pięcio- i sześciopiersścieniowych. Skuteczność ich usunięcia w próbkach gleby A, w których zastosowano modyfikacje w porównaniu z „surową” glebą A, była średnio wyższa o ok. $42 \div 80\%$. W mniejszym stopniu usuwane były z gleby frakcje ciężkie. I tak np. w glebie bez modyfikacji frakcje ciężkie zostały usunięte w zaledwie 0,58%. Po zastosowaniu rośliny z biopreparatem bakteryjnym uległo usunięciu ok. 7% węglowodorów tej frakcji, a rośliny i biopreparatu grzybowego – 8,6% (tab. 20).

Liczne badania wykazały, że szybkość biodegradacji węglowodorów maleje wraz ze wzrostem ich masy cząsteczkowej i stopniem komplikacji struktury cząsteczki (Harms i Bosma, 1997; Hinga, 2003; Peressutti i in., 2003). Węglowodory dwupiersścieniowe mogą być usuwane ze środowiska glebowego nie tylko w procesach biologicznych, lecz również fizycznych, np. w wyniku ulatniania lub fotooksydacji (Cerniglia, 1984). Może to tłumaczyć efekt najmniejszego wpływu zastosowanych modyfikacji na stopień ich usunięcia z gleby A (tab. 20). Trwałość węglowodorów w środowisku glebowym zależy również od ich adsorpcji na koloidach oraz związkach humusowych (Smith, 1990; Haigh, 1996; Nam i Kim, 2002; Sivagurunathan i in., 2003, Tabak i in., 2003). Mikroorganizmy mogą w bardzo niewielkim stopniu wykorzystywać węglowodory nierozpuszczone w fazie wodnej (Eriksson i in., 2000; Margesin i Schinner, 2001; Johnsen i in., 2005).

Każda roślina może wpływać na szybkość rozkładu ksenobiotyków w glebie. Efekt ten wiąże się ze specyficznym oddziaływaniem systemu korzeniowego roślin na drobnoustroje glebowe. Korzenie roślin nie uczestniczą bezpośrednio w procesach rozkładu zanieczyszczeń organicznych, ale poprzez oddziaływanie na drobnoustroje mogą przyczyniać się do intensyfikacji lub spowalniania tych procesów. Przebieg procesu fitoremediacji zależy m.in. od syntezy i aktywności oksydoreduktaz, których ilość i aktywność wzrasta w obecności grzybów mikoryzowych w zanieczyszczonej ryzosferze (Muratowa i in., 2003). Właściwości

poszczególnych części roślin mają zasadniczy wpływ na pobieranie hydrofobowych, a lipofilowych węglowodorów z gleby. Badania przeprowadzone przez Gao i Zhu (2004) dowodzą, że WWA pobierane z powietrza przez liście roślin, nie są transportowane do ich korzeni. Można więc wnioskować, że obecność tych zanieczyszczeń w korzeniach roślin jest wynikiem ich pobierania z gleby i kumulacji. Badacze ci stwierdzili, że koncentracja WWA w korzeniach roślin zależy od ich stężenia w glebie, a zawartość tłuszczów w korzeniach roślin może być wskaźnikiem zdolności korzeni do akumulacji WWA. Obserwacje te zostały potwierdzone przez Chiou i wsp. (2001). W innych badaniach Petersen i in. (2002) wykazali, że przenikanie lipofilowych zanieczyszczeń do epidermy korzeni zależy od współczynnika podziału oktanol/woda (K_{ow}). Przeprowadzone przez Gao i Zhu (2004) doświadczenia wykazały, że 32÷96% pobranego przez korzenie fenantrenu i 22÷95% pirenu było transportowane do części nadziemnych roślin. Efekt ten związany jest najprawdopodobniej ze stosunkowo wysokimi stałymi podziału K_{ow} obu zanieczyszczeń.

Zmniejszanie się stężenia zanieczyszczeń w glebach z roślinami jest sumą procesów przebiegających z udziałem czynników abiotycznych, procesów fizycznych, biodegradacji przez mikroorganizmy i pobierania węglowodorów przez korzenie roślin. Procesy biotransformacji węglowodorów przez rośliny są nieistotne i do tej pory ich przebieg nie został poparty wiarygodnymi badaniami.

Zastosowanie samych roślin w analizowanych próbkach gleb spowodowało zwiększenie efektywności procesu (w porównaniu do próbek bez roślin) średnio o ok. 25,6% w przypadku do węglowodorów alifatycznych, 27% – węglowodorów aromatycznych i 2% w przypadku frakcji ciężkich (tab. 20). Wpływ metabolitów powstających w wyniku transformacji węglowodorów na tkanki roślin jest wciąż niewyjaśniony i mało poznany. Niektórzy autorzy sugerują, że istotne znaczenie w procesie fitoremediacji ma gatunek rośliny i ekotyp, który determinuje mikroflorę ryzosfery (Binet i in., 2000). W badaniach dotyczących ryzodegradacji związków organicznych, m. in. WWA, Corgie i in. (2003) wykazali, że wydzieliny korzeniowe stymulują wzrost i rozwój mikroorganizmów ryzosferowych, przez co wpływają na proces mikrobiologicznego rozkładu zanieczyszczeń. Ubytek fenantrenu w odległości 0-3 mm od korzeni roślin wynosił 86%, w strefie 3÷6 mm – 48%, a 6÷9 mm – 36%. Interesujące było przy tym przestrzenne zróżnicowanie ilości i jakości mikroorganizmów w glebach obsianych roślinami, w przeciwieństwie do próbek gleb bez roślin.

Jak dotąd nie wykazano u AMF żadnego specyficznego fizjologicznego mechanizmu przyczyniającego się do bezpośredniej degradacji węglowodorów. Według Binet i in. (2000)

grzyby mikoryzowe mogą powodować zwiększenie tolerancji roślin na zanieczyszczenia, przyczyniając się do zmniejszenia absorpcji zanieczyszczeń w ich korzeniach poprzez nieznaną dotąd mechanizm fizjologiczny (Binet i in., 2000). W innych badaniach sugeruje się, że grzyby mikoryzowe mogą brać udział w stabilizacji i unieruchamianiu węglowodorów w glebie. Jeffries i in. (2003) w swoich pracach podają, że najbardziej prawdopodobnym mechanizmem stabilizacji węglowodorów jest ich akumulacja w sporach grzybów mikoryzowych. Mogłoby to tłumaczyć zjawisko mniejszej zdolności kiełkowania spor wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych (tab. 13, rys. 26). Sugeruje się także, że biomasa grzybów mikoryzowych może być pośrednim czynnikiem wpływającym na większą syntezę oksydoreduktaz odpowiedzialnych za degradację/transformację węglowodorów w ryzosferze (Rilling i Steinberg, 2002).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że połączenie rośliny z biopreparatem sporządzonym z grzybów mikoryzowych jest korzystniejsze aniżeli z biopreparatem bakteryjnym. W pierwszym przypadku średnia efektywność usunięcia węglowodorów trój-, cztero-, pięcio- i sześciopierścieniowych, węglowodorów aromatycznych i alifatycznych była większa o ok. 15% w porównaniu z próbkami, w których użyto roślin w połączeniu z biopreparatem bakteryjnym (tab. 20). Efekt ten można wyjaśnić tym, że obecność grzybów mikoryzowych wpływa na wydzielanie przez korzenie roślin zewnątrzkomórkowych enzymów (ich jakość, ilość i aktywność). Transformacja węglowodorów przez mikroorganizmy i rośliny katalizowana jest przez różnego rodzaju oksydoreduktazy (np. peroksyazy, lakkazy, dioksygenazy, monooksygenazy itp.). Peroksydazy należą do jednych z najlepiej poznanych enzymów wydzielanych przez korzenie roślin, a biorących udział m. in. w utlenianiu węglowodorów. Badania przeprowadzone przez Criquet i in. (2000) potwierdzają wzrost aktywności peroksydaz w korzeniach zmikoryzowanych roślin. Taka właśnie stymulacja aktywności peroksydaz, a także wzrostu i aktywności metabolicznej mikroorganizmów ryzosferowych uwarunkowanych obecnością grzybów mikoryzowych mogła być przyczyną korzystniejszego efektu usunięcia zanieczyszczeń w próbkach z biopreparatem grzybowym i roślinami w porównaniu do próbek z biopreparatem bakteryjnym i roślinami.

6.2.5. Toksyczność gleby po procesie fitoremediacji

W kolejnym etapie zbadano toksyczność oczyszczanych próbek gleby A, przy czym porównywano jedynie wyniki eksperymentów, w których zastosowano modyfikacje: roślina + biopreparat bakteryjny oraz roślina + biopreparat grzybowy. Wybór tych dwóch kombinacji

wynikał przede wszystkim ze świadomości odmiennych dróg transformacji węglowodorów przez bakterie i grzyby.

Transformacja i wykorzystanie dowolnego WWA przez bakterie polega na utlenieniu go do cis-dwuhydrodiolu przez włączenie dwóch atomów tlenu cząsteczkowego do pierścienia aromatycznego (Stingley i in., 2004; Johansen i in., 2005; Luan i in., 2006). Reakcja ta katalizowana jest przez dioksygenazę. Następnie cis-dwuhydrodiol ulega procesowi rearomatyacji, dając pochodną z dwiema grupami hydroksylowymi. Dalsze utlenianie prowadzi do powstania katecholi, które ulegają dalszemu utlenianiu aż do całkowitej mineralizacji włącznie. Proces rozkładu WWA przez grzyby polega na przyłączeniu jednego atomu tlenu.

Proces katalizowany jest przez układ monooksygenaz. W wyniku tego powstają formy epoksydowe o charakterze elektrofilowym. W dalszych przemianach na drodze enzymatycznej mogą powstawać z nich transdwuhydrodiole, a na drodze nieenzymatycznej – przejściowe formy fenolowe, które wykazują właściwości toksyczne (Cerniglia, 1984; Ignat i in., 2002; Kotterman i in., 2003; Johnsen i in., 2005, Christophe, 2006).

Biodegradacja węglowodorów w glebie może przebiegać trzema szlakami:

- asymilacyjnym, polegającym na wykorzystaniu węglowodorów jako źródła węgla i energii, a prowadzącym do całkowitej lub częściowej mineralizacji związku;
- wewnątrzkomórkowej detoksykacji, której celem jest przeprowadzenie hydrofobowych węglowodorów w formy rozpuszczalne w wodzie, dzięki czemu możliwe będzie ich wydalenie; wydaje się, że wewnątrzkomórkowe utlenianie i hydroksylacja WWA u bakterii są początkowymi etapami służącymi rozerwaniu pierścienia aromatycznego i asymilacji węgla, podczas gdy u grzybów procesy te są początkowym etapem detoksykacji;
- kometabolizmu polegającego na degradacji WWA bez wytwarzania energii i węgla dla potrzeb komórki (Johnsen i in., 2005).

Na podstawie przeprowadzonych badań nie wykazano istotnych różnic pomiędzy toksycznością próbek gleby A, do których wprowadzono biopreparat bakteryjny, a tymi, w których użyto biopreparat z grzybów mikoryzowych (rys. 30, 31). Gleba po procesie remediacji nadal wykazywała toksyczność wynikającą najprawdopodobniej z dwóch przyczyn: po pierwsze z dużej toksyczności produktów pośrednich powstających w czasie rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych, a po drugie – z uwolnienia w wyniku zachodzących procesów biologicznych wielu zanieczyszczeń do tej pory trwale związanych z matrycą glebową. Jak podają Dragun (1998), Stumm (1992) i Winegardner (1995),

zanieczyszczenia organiczne charakteryzujące się ograniczoną rozpuszczalnością w wodzie są zazwyczaj sorbowane na cząsteczkach materii organicznej i koloidach glebowych. Poziom sorpcji jest początkowo funkcją całkowitej rozpuszczalności w wodzie i zawartości materii organicznej, a całkowite ciśnienie par i zawartość cząsteczek gliniastych odgrywa mniejszą rolę. Potencjał sorpcyjny danego związku w wybranej glebie jest zazwyczaj wyrażony jako K_d – spadek liniowej izotermy sorpcji. Sorpcja zanieczyszczeń organicznych jest zależna również od współczynnika podziału oktanol-woda K_{ow} , np. potencjał mobilności substancji o współczynniku $K_{ow} \geq 1000$ jest zwykle zbliżony do zera. Sorpcja zanieczyszczeń organicznych może wpływać na toksyczność tych zanieczyszczeń poprzez redukcję biodostępności oraz narażenia na ten czynnik.

6.3. Aspekty prawne i podsumowanie uzyskanych efektów bioremediacji

Większość krajów Unii Europejskiej stara się rygorystycznie przestrzegać limitów emisji zanieczyszczeń do środowiska, niemniej jednak często okazuje się, że przyjęte normy są i tak zbyt „łagodne” w aspekcie negatywnego wpływu czynników antropogenicznych na epigeosferę.

Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 „Prawo Ochrony Środowiska” (DzU Nr 62, poz. 627 i nr 115, poz. 1229 oraz z 2002 r. Nr 74 poz. 676, Nr 113, poz. 984 i Nr 153, 1271) określa zasady i warunki dokumentacji zagrożeń i degradacji środowiska. Ważnym aktem prawnym umożliwiającym prawidłowe działanie ustawy w odniesieniu do środowiska gruntowego jest opublikowane w dniu 4 października 2002 r. (DzU 02.165.1359) Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. Wprowadzenie standardów miało na celu stworzenie skutecznego instrumentu ochrony gleb przed degradacją w wyniku zanieczyszczenia ich substancjami chemicznymi pochodzącymi ze źródeł antropogenicznych. W Rozporządzeniu zawarte są również prawne podstawy do egzekwowania obowiązku przywrócenia właściwej jakości gleb w zależności od sposobu ich użytkowania i funkcji gleby. Takie podejście do problemu jest zgodne z praktyką stosowaną w innych krajach europejskich. W 2003 r. Unia Europejska utworzyła Komitet Techniczny ds. Charakterystyki Gleb, którego głównym zadaniem jest koordynowanie oraz wyznaczanie kierunków prac dla Komitetu Technicznego Międzynarodowej Komisji Normalizacyjnej „Jakość gleby” (ISO/TC 190 „Soil Quality”) (Stuczyński i in., 2004).

Jednym z pierwszych krajów, w którym wprowadzono ustawowy obowiązek kontroli jakości gleb i wód, była Holandia. Pierwsze wydane tam akty prawne (VROM, 1995)

przyjmowały zasadę wielofunkcyjności gleby (stosowanie ujednoczonych kryteriów jakości dla wszystkich gleb niezależnie od sposobu ich użytkowania), co okazało się rozwiązaniem zbyt kosztownym i niejednokrotnie niemożliwym do wykonania. Nowsze podejście w dziedzinie ochrony gleb zakłada ocenę jakości gleby pod względem przydatności do określonego sposobu użytkowania. Podobnie w chwili obecnej jest w Niemczech, Wielkiej Brytanii, Dani, Szwajcarii i Polsce (Maliszewska-Kordybach, 2003).

W standardach jakości gleb podaje się tzw. wartości graniczne stężeń zanieczyszczeń. W różnych krajach europejskich wartości te powiązane są z różnymi parametrami glebowymi, np. w Polsce istotnymi parametrami są przewodność hydrauliczna oraz głębokość, a w Niemczech – zawartość materii organicznej, stężenie metali ciężkich i skład granulometryczny gleb.

Na podstawie Rozporządzenia Ministra Ochrony Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (DzU 02.165.1359), rozpatrując sumę stężeń 9 WWA, analizowane próbki gleb A oraz B (tab. 4 i 5) mieszczą się w standardach przewidzianych dla gleb zakwalifikowanych do grupy C (tereny przemysłowe, użytki kopalne, tereny komunikacyjne) dla poziomu 0-2 m ppt (ppt – pod poziomem terenu). Stężenia WWA w próbkach gleb A i B nie przekraczają również dopuszczalnych wartości granicznych przewidzianych dla gleb grupy B (grunty zaliczone do użytków rolnych z wyłączeniem gruntów pod stawami i gruntów pod rowami, grunty leśne oraz zadrzewione i zakrzewione, nieużytki, a także grunty zabudowane i zurbanizowane z wyłączeniem terenów przemysłowych, użytków kopalnych oraz terenów komunikacyjnych) pobieranych z głębokości 0,3÷15,0 m ppt o współczynniku wodoprzepuszczalności gruntów mniejszym niż 1×10^{-7} m/s (tab. 5). Niestety, suma stężeń węglowodorów aromatycznych i alifatycznych w glebie skażonej A przekraczała dopuszczalne stężenie tych zanieczyszczeń dla gleb zakwalifikowanych do grupy C blisko 17 razy, co uzasadnia celowość remediacji gleby A (tab. 4).

Warto zauważyć, że tereny zanieczyszczone zarówno w Polsce, jak i w innych krajach europejskich stanowią niewielką część całkowitego obszaru, niemniej w regionach silnie uprzemysłowionych i zurbanizowanych obserwuje się procesy degradacji gleb związane z nadmiernym nagromadzeniem szkodliwych substancji. Przykładowo Adamczewska i in. (2000) oznaczyli w próbkach gleb pobranych w pobliżu stacji benzynowej w Poznaniu stężenie benzo(a)pirenu przekraczające wartość 12 880 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m., a suma stężeń 16 WWA przekraczała 763 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.m. Z kolei Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach

(2003) podają, że suma stężeń 13 WWA w glebach użytkowanych rolniczo, zlokalizowanych w pobliżu koksowni przekraczała poziom 50 000 µg/kg s.m.

Podjęcie decyzji o biologicznym oczyszczaniu gleby związane jest z oceną zarówno możliwości biodegradacji zanieczyszczeń przez rodzime mikroorganizmy glebowe, jak i warunków środowiska. Szczególnie istotne znaczenie mają czynniki takie, jak: odczyn, temperatura, wilgotność, stężenie tlenu i związków mineralnych, obecność substancji toksycznych, a także rodzaj, dostępność i stężenie produktów naftowych oraz ilość i jakość mikroorganizmów, które mają decydujący wpływ na procesy mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów (Cerniglia, 1984; Sparling i in., 1985; Walworth i in., 1997; Piatt i Brusseau, 1998; Margesin i in., 2000; Walworth i in., 2001; Samanta i in., 2002).

Badania przeprowadzone w ramach realizacji niniejszej pracy wykazały, że po trwającym 12 tygodni procesie samooczyszczania gleby A stężenie WWA praktycznie nie uległo zmianie (tab. 18). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku najtrudniej rozkładalnych frakcji ciężkich. Stężenie węglowodorów alifatycznych zmalało o ok. 15% w stosunku do wartości początkowej.

Przeprowadzone testy toksyczności wykazały, że wydłużanie czasu samooczyszczania gleby A skażonej produktami ropopochodnymi nie powodowało istotnych zmian ekotoksyczności tej gleby. Okazało się przy tym, iż największą wrażliwością na zanieczyszczenia ropopochodne charakteryzowały się organizmy należące do grupy konsumentów (dżdżownice z gatunku *Eisenia fetida* oraz ślimaki *Physa acuta* Drap), a mniejszą do grupy producentów (rys. 4, 5, tab. 6, 7, 15). Uzyskane wyniki są zgodne z opisanymi przez innych autorów (Dorn i in., 1998; Saterbak i in., 1999; Fernandez i in., 2005; Płaza i in., 2005).

Ograniczoność efektu samooczyszczania gleb oraz wód skażonych ksenobiotykami, w tym także substancjami ropopochodnymi zmusza do opracowania skutecznych metod likwidacji skażeń. Stanowi to jedno z najpoważniejszych wyzwań związanych ze zrównoważonym gospodarowaniem zasobami naturalnymi. Wykorzystywane w tych celach technologie bazujące na procesach fizykochemicznych mają różne wady oraz ograniczenia i w związku z tym nie spełniają wszystkich naszych oczekiwań. Alternatywą są coraz częściej biologiczne metody oczyszczania gruntów, które stanowią bardzo intensywnie rozwijający się kierunek biotechnologii środowiskowej. Świadczy o tym chociażby ilość i zakres prac prezentowanych na odbywającej się w USA co dwa lata prestiżowej konferencji „In Situ and On-Site Bioremediation”, a także na krajowym sympozjum „Bioremediacja Gruntów”.

Spośród wielu proponowanych technologii bioremediacji gruntów do najbardziej obiecujących można zaliczyć procesy fitoremediacji wspomaganej mikroorganizmami autochtonicznymi zasiedlającymi zanieczyszczoną glebę.

Sama fitoremediacja jest metodą wykorzystującą rośliny do unieszkodliwiania zanieczyszczeń gleb. Z kolei wiele metod wykorzystujących jedynie rodzime mikroorganizmy do bioremediacji gruntów skażonych wielopiersścieniowymi węglowodorami aromatycznymi jest nieefektywnych. Spośród ogromnej ilości mikroorganizmów naturalnie bytujących w glebie zaledwie 0,1÷0,5% to organizmy zdolne do rozkładu WWA (Pries i in., 1994; Thompson i in., 1999; Surygała, 2000). Zostało to poparte także wynikami niniejszej pracy, uzyskanymi dla próbek gleby A skażonej produktami naftowymi poddanej procesowi samooczyszczania bez stosowania jakichkolwiek dodatkowych modyfikacji (tab. 20). Dalsze badania wykazały, że uprawa roślin powoduje nie tylko wzrost ilości bakterii w strefie korzeni roślin (tab. 8, 9, 21), ale wpływa również na poprawę stosunków powietrzno-wodnych i struktury gleby, co wydaje się szczególnie ważne w przypadku gleby skażonej produktami naftowymi.

Po trwającym 3 miesiące procesie fitoremediacji wspomaganej biopreparatami uzyskano 10-krotnie większy stopień usunięcia węglowodorów aromatycznych w próbkach z roślinami i biopreparatem grzybowym niż w próbkach gleby A oczyszczanych bez użycia roślin i biopreparatów (tab. 20). W próbkach gleb obsianych roślinami obserwowano także zwiększenie efektywności usunięcia węglowodorów aromatycznych (w porównaniu do próbek bez roślin) o ok. 27%. Dodatkowe wprowadzenie biopreparatów spowodowało wzrost efektywności bioremediacji o ok. 17% i 33%, odpowiednio dla próbek z biopreparatem bakteryjnym i grzybowym. Zastosowanie biopreparatów w połączeniu z roślinami spowodowało także zwiększenie efektywności usuwania frakcji ciężkich – średnio 13,5 razy w porównaniu z próbkami bez roślin (tab. 20). W rezultacie 3-miesięcznej fitoremediacji wspomaganej biopreparatami uzyskano zmniejszenie efektu 17-krotnego przekroczenia dopuszczalnej wartości sumarycznej stężenia węglowodorów alifatycznych i aromatycznych do poziomu przekroczenia niespełna 3-krotnego w stosunku do wartości normatywnej dla gleb należących do grupy C.

Należy zdawać sobie sprawę z tego, iż zakres stosowania fitoremediacji – mimo wielu korzyści – jest ograniczony. Przede wszystkim fitoremediacji nie powinno się wykorzystywać do oczyszczania gruntów, w których zanieczyszczenia zalegają poniżej głębokości korzenienia się roślin. Istotnym ograniczeniem jest również stężenie związków toksycznych

w glebie. Należy także uwzględnić możliwość stosunkowo małej efektywności fitoremediacji w przypadku zamiaru unieszkodliwiania związków silnie zaabsorbowanych w glebach.

Do niewątpliwych zalet fitoremediacji gleby wspomaganej biopreparatami – tak bakteryjnym, jak i grzybowym – należy zwiększenie efektywności procesu oczyszczania i jego przyspieszenie dzięki wytworzeniu odpowiednich warunków sprzyjających wzrostowi roślin oraz rozwojowi mikroorganizmów ryzosferowych, a także możliwość rekultywacji dużych powierzchni zanieczyszczonych gruntów bez konieczności przemieszczania olbrzymich mas ziemi.

Metody bioremediacyjne nie są technologiami, które można stosować w dowolnych miejscach i okolicznościach. Uniwersalne pozostają jedynie główne założenia tych technologii, natomiast szczegóły rozwiązań technologicznych są determinowane przez warunki atmosferyczne, hydrologiczne i geologiczne, charakterystyczne dla obszaru, który ma być poddany procesowi bioremediacji. Procesy bioremediacji, mimo znacznych wysiłków ze strony technologów, nie zawsze umożliwiają całkowite oczyszczenie gruntu. Z tego względu wskazanie możliwości zwiększenia efektywności procesu oczyszczania chociażby o kilka procent (np. z zastosowaniem metod proponowanych w niniejszej pracy) ma istotne znaczenie dla „zdrowia” całego ekosystemu, a saldo korzyści – nie tylko ekonomicznych – w porównaniu z innymi metodami, zwłaszcza fizyczno-chemicznymi, wskazuje na zasadność ich szerszego rozpropagowania i celowość podejmowania dalszych badań nad zwiększaniem ich skuteczności.

7. WNIOSKI

1. Kolonizacja korzeni roślin przez grzyby mikoryzowe w glebie skażonej węglowodorami wpływa korzystnie na wzrost i rozwój korzeni.
2. Intensyfikację długotrwałego procesu samoistnej kolonizacji grzybami mikoryzowymi podłoża zanieczyszczonego wysokimi stężeniami węglowodorów można osiągnąć przez wprowadzenie do gleby żywych spor grzybów mikoryzowych w formie inokulum.
3. Grzyby mikoryzowe korzystnie wpływają na rozkład zanieczyszczeń przez inne organizmy ryzosfery.
4. Zastosowanie rośliny jednoliściennej zaszczepionej grzybami mikoryzowymi do bioremediacji gleby skażonej substancjami ropopochodnymi powoduje w niej istotny wzrost (ok. 3800 razy) liczby bakterii degradujących węglowodory. Obsianie zanieczyszczonej gleby roślinami jednoliściennymi i wprowadzenie do gleby biopreparatu bakteryjnego otrzymanego z mikroorganizmów autochtonicznych przyczynia się do istotnego zwiększenia (ok. 10 razy) efektywności bioremediacji w porównaniu z glebą ulegającą samooczyszczaniu dzięki aktywności rodzimych mikroorganizmów.
5. Efektywność eliminacji węglowodorów z gruntu zależy od rodzaju zastosowanego sposobu modyfikacji metody fitoremediacji, tj. rośliny i biopreparatu (bakteryjnego lub grzybowego). Najlepsze rezultaty uzyskuje się w procesie bioremediacji prowadzonej z wykorzystaniem rośliny jednoliściennej oraz inokulantów grzybów mikoryzowych izolowanych z zanieczyszczonej gleby.
6. Symbioza grzybów mikoryzowych z roślinami jednoliściennymi powoduje zwiększenie efektywności usuwania węglowodorów: 2-, 3-, 4-, 5-pierścieniowych o ok. 40% i 6-pierścieniowych o ok. 30% w porównaniu z próbkami, w których zastosowano same rośliny. Wydajność usuwania węglowodorów wielopierścieniowych (3-, 4-, 5- i 6-pierścieniowych) w próbkach gleb, w których zastosowano rośliny z biopreparatem grzybowym, była przeciętnie o 15% większa, aniżeli w próbkach, w których zastosowano rośliny wspomagane biopreparatem bakteryjnym.
7. Prowadzenie bioremediacji gleby z zastosowaniem rośliny jednoliściennej oraz biopreparatu grzybowego umożliwia istotne zwiększenie efektywności usuwania także najtrudniej degradowalnych zanieczyszczeń – frakcji ciężkich. W warunkach prowadzenia eksperymentu w omawianym wariantcie uzyskano ok. 15-krotne zwiększenie

- efektywności bioremediacji w odniesieniu do próbki kontrolnej i prawie 4-krotne w porównaniu z próbką, w której użyto samej rośliny.
8. Spośród wielu analizowanych wariantów metody bioremediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi najbardziej efektywna jest fitoremediacja z zastosowaniem rośliny jednoliściennej poddanej mikoryzacji, przy czym najkorzystniejszymi „partnerami” dla analizowanej rośliny wydają się grzyby z rodzaju *Glomus*, zwłaszcza gatunków *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* oraz *Glomus lamellosu*.
 9. Wydłużanie czasu samooczyszczania gleby „dawno” skażonej produktami naftowymi nie wpływa w istotny sposób na jej ekotoksyczność.
 10. Zanieczyszczenia ropopochodne wpływają negatywnie na wzrost i rozwój roślin, zwłaszcza dwuliściennych. Spośród testowanych roślin najbardziej wrażliwe na węglowodory ropopochodne były rzeżucha i gorczyca, natomiast najbardziej oporna okazała się pszenica.
 11. Organizmy zwierzęce (dżdżownice oraz ślimaki) były bardziej czułymi bioindykatorami w ocenie ekotoksyczności gleb aniżeli biowskaźniki roślinne.
 12. Zastosowanie procesu fitoremediacji wspomaganej biopreparatami przyczynia się do wyraźnego zmniejszenia toksyczności gleby.
 13. Postęp procesu bioremediacji gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi powinien być kontrolowany z użyciem metod fizykochemicznych, a ich ekotoksyczność z użyciem metod biologicznych. Wykazano, że najbardziej wrażliwymi bioindykatorami wykorzystywanymi do oceny ekotoksyczności gruntów zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi podczas procesu bioremediacji są konsumenci (dżdżownice), producenci (rzeżucha i gorczyca) oraz reducenty (bakterie degradujące węglowodory).
 14. Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy proponuje się wprowadzenie standaryzowanej procedury badań ekotoksyczności gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi, obejmującej test hamowania wzrostu rzeżuchy i gorczycy, test toksyczności ostrej na dżdżownicach (dodatkowo test unikania oraz reprodukcji), test mutagenności oraz pomiary aktywności mikrobiologicznej z użyciem testu TTC.
 15. Do zalet fitoremediacji wspomaganej biopreparatami wykorzystywanej do oczyszczania gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi można zaliczyć prostotę, niewielkie nakłady finansowe oraz dużą efektywność procesu przy minimalnej ingerencji w środowisko przyrodnicze.

LITERATURA

1. Adam G., Duncan H. 2000. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution* 120(2), 363-370.
2. Adamczewska M., Siepak J., Gramowska H. 2000. Studies of levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils subjected to anthropopressure in the city of Poznan. *Polish Journal of Environmental Studies* 9, 305-321.
3. Badura L. 2004. Bioróżnorodność i jej znaczenie dla funkcjonowania ekosystemów, *Roczniki Gleboznawcze* 40(1), 321-335.
4. Badura L. 2004. Czy znamy wszystkie uwarunkowania funkcji mikroorganizmów w ekosystemach lądowych? *Kosmos* 53(3-4), 264-265.
5. Barański B. 1995. Metody oceny toksyczności genetycznej substancji. Wydawnictwo Instytutu Medycyny Pracy, Łódź, 9.
6. Bennett J., Childress A., Wunsch K. 1996. Fungi in bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 37(3-4), 244-245.
7. Benough A. 1990. Root growth and function in relation to soil structure, composition, and strength. [in:] *Root ecology*. DeKroon H., Visser E. (eds), Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, 151-234.
8. Berg V., Martin D., Villee C. 2000. *Biologia*. Oficyna Wydawnicza Multico, Warszawa.
9. Binet Ph., Portal J., Leyval C. 2000. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil* 227(1-2), 207-213.
10. Blackburn J., Hafker W. 1993. The impact of biochemistry, bioavailability, and bioactivity on the selection of bioremediation technologies. *TIB Tech.* 11, 328-333.
11. Blackmann C., Rabe B., Edgmon S., Fillingame D. 1995. Aquatic toxicity variability for fresh-and saltwater species in refinery wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 1219-1223.
12. Block R., Stroo H., Swett G. 1993. Bioremediation - why doesn't it work sometimes?. *Chemical Engineering Progress* 89(8), 44-50.
13. Boopathy R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Biosource Technology* 74, 63-67.
14. Borkowska H. 2004. Dlaczego mikoryza jest szansą sukcesu dla roślin ogrodniczych i leśnych? Wydawnictwo *Wiś Jutra* 2(55), 3-7.
15. Bowen G. 1991. Soil temperature, root growth and plant function. Chapter 9, [in:] *Plant roots – The hidden half*. Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (eds), Marcel Dekker, New York, 309-330.

16. Brock T., Madigan T. 1988: Microbial ecology. [In:] Biology of Microorganisms, 5th Edition, Brock T., Madigan T. (eds), Prentice Hall, New Jersey, 598-656.
17. Brohon B., Delolme C., Gourdon R. 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 883-891.
18. Brown K., Donnelly K., Thomas J., Davol P., Scott B. 1995. Mutagenicity of three agricultural soils. *Science of the Total Environment* 41, 173-186.
19. Brundrett M., Melville M., Peterson R. 1994. *Practical Methods in Mycorrhiza Research*, Waterloo, Canada, 487-493.
20. Buikema A., Niederlehner B., Cairns Jr. 1981. The effects of a simulated refinery effluent and its components on the estuarine Crustacean, *Mysidopsis bahia*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 10, 231-240.
21. Bulman T., Lesage S., Folie P., Webber M. 1985. The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. *Petroleum Association for Conservation of the Canadian Environment Report*, Ottawa, Canada, no. 2, 85.
22. Buzea D., DeStefanis E. 1999. Accelerated bioremediation as an alternative to conventional remedial technologies. Leggette, Brashears & Graham, Inc. White Plains, New York, *Environmental Expert* com articles (<http://www.environmental-center.com/articles/article1034>).
23. Cairns J. 1993. Environmental science and resource management in the 21st century: scientific perspective. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12, 1321-1329.
24. Caravaca F., Roldán A. 2003. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. *Geoderma* 117, 53-61.
25. Cerniglia C. 1981. Aromatic hydrocarbons: Metabolism by bacteria, fungi and algae. [In:] *Biochemical Toxicology*, vol.3, Hodgson E., Bend J., Philpot R. (eds), Elsevier, North Holland, N.Y. 321-361.
26. Cerniglia C. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology* 30, 31-71.
27. Chaillan F., Le Flèche A., Bury E., Phantavong YH., Grimont P., Saliot A., Oudot J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155(7), 587-595.

28. Chaineau C., Morel U., Dupont J., Bury E., Oudot J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *The Science of the Total Environment* 227(2-3), 237-247.
29. Chapman P. 1995. Extrapolating laboratory toxicity results to the field. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14, 927-930.
30. Chen S., Aitken M. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science and Technology* 33, 435-439.
31. Chen W-M., Chang J-S., Wu Ch.-H., Chang S.-Ch. 2004. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in Microbiology* 155(8), 672-680.
32. Chiou C. 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. [in:] *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Special Publication, Sawhney B., Brown K. (eds), No. 22, 1-29.
33. Chiou C., Peters L., Freed V. 1979. A physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds. *Science* 206, 831-832.
34. Chiou C., Sheng G., Manes M. 2001. A partition-limited model for plant uptake of organic contaminants from soil and water. *Environmental Science and Technology* 35, 1437-1444.
35. Christophe P., Rast C., Veber A.-M, Poupin P., Féraud J-F. 2006. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp. strain SNP11. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(2), 151-158.
36. Churchill S., Harper J., Churchill P. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three and four ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2), 549-552.
37. Clapperton J. 2000. The Real Dirt on no-till soil. [in:] *Conference Proceedings FarmTech 2004*, Mayfield Inn, Edmonton AB, 36-42.
38. Corgie S., Joner E., Leyval C. 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil* 257, 143-150.
39. Crépineau-Ducoulombier C., Rychen G. 2003. Assessment of soil and grass polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination levels in agricultural fields located near a motorway and an airport. *Agronomie* 23(4), 345-348.

40. Criquet S., Joner E., Leglize P., Leyval C. 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology letters* 22, 1733-1737.
41. Cuypers C. 2001. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments: Prediction of bioavailability and characterization of organic matter domains. *Praca doktorska wykonana w Wageningen University, The Netherlands*, 14-25.
42. D'Annibale A., Ricci M., Leonardi V., Quartino D., Mincione E., Petruccioli M. 2005. Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* 90(6), 723-731.
43. Daane L., Harjono I., Zylstra G., Haggblom M. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2683-2691.
44. Dagher F., Deziel E., Lirette P., Paquette G., Bisailon J., Villemur R. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 368-377.
45. David M., Fuhrman J., Hartel P., Zuberer D. 2005. Principles and applications of soil microbiology. 2nd. Edition, Prentice Hall, 5-18.
46. Davies W., Bacon M. 2003. Adaptation of roots to drought. Chapter 7 [in:] *Root Ecology*. de Kroon H., Visser E. (eds), Springer Verlag Ecological Studies Heidelberg 173-192.
47. DECHEMA, Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen. *Chemische Technik und Biotechnologie. Bioassays for soils/Ad-Hoc-Committee Methods for toxicological/ Ecotoxicological Assessment of soils*. 1995.. Kreysa G., Wiesner J. (eds), DECHEMA, Frankfurt am Main.
48. DECHEMA. 2001. *Methods for toxicological/ecotoxicological assessment of soil*. 7th Report of the interdisciplinary DECHEMA committee "Environmental Biotechnology – Soil", Frankfurt am Main, Germany.
49. Derecova K., Haluska L., Balaz S. 1996. Degradation of Polychlorinated Biphenyls (PCB) in different soils by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 37(3-4), 251.
50. Dick R. 1997. Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. [in:] *Biological Indicators of Soil Health*. Pankhurst C., Doube B., Gupta V. (eds), Wallingford, USA7 CAB International, 121-156.

51. Dorn P., Salanitro J. 2000. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere* 40, 419-426.
52. Dorn P., Vipond T., Salanitro J., Wiśniewski H. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox and plants. *Chemosphere* 37(5), 845-860.
53. Dragun J. 1998. *The Soil Chemistry of Hazardous Materials*, Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA, 862.
54. Dunnett C. 1956. A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *Journal of the American Statistical Association* 50(272), 1096-1121.
55. Dylewski R. (red.), 1997. *Technologia chemiczna-surowce*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 28-50.
56. EPA Remediation Technology Cost Compendium – Year 2000 United States.
57. Eriksson M., Dalhammar G., Borg-Karlson A. 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53(5), 619-626.
58. Fent K. 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* 205(3), 223-240.
59. Fernandez M., Cagigal E., Vega M., Urzelai A., Babin M., Pro J., Tarazona J. 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(2), 174-184.
60. Field J., de Jong E., Costa G. Feijoo, de Bont J. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 58(7), 2219-2226.
61. Fine P., Graber E., Yaron B. 1997. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. *Soil Technology* 10(2), 133-153.
62. Frankenberger W., Johanson J. 1982. Influence of crude oil and refined petroleum products on soil dehydrogenase activity. *Journal of Environmental Quality* 11, 602-607.
63. Fritsche W., Hofrichte M. 2004. Aerobic degradation by microorganisms. [in:] *Environmental Biotechnology: Concepts and Applications*, Jördening H-J. Winter J. (eds), Jena, Germany, 145-155.
64. Gao Y., Zhu L. 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* 55, 1169-1178.
65. Gierak A. 1995. Zagrożenie środowiska produktami ropopochodnymi. *Ochrona Środowiska* 2(57), 31-34.

66. Giraud F., Guiraud P., Kadri M., Blake G., Steiman R. 2001. Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Research* 35(17), 4126-4136.
67. Glick B. 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* 21, 383-393.
68. Goodin J., Webber M. 1995. Persistence and fate of anthracene and benzo[a]pyrene in municipal sludge treated soil. *Journal of Environmental Quality* 24(2), 271-278.
69. Goggleman W., Spitzauer P. 1982. Mutagenic activity in agricultural soils. [in:] *Carcinogenes and mutagen in the environment*. Stich H., ed. CRC Press, Orlando, FL, tom 3, 178-183.
70. Gramss G., Voigt K., Kirsche B. 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation* 10(1), 51-62.
71. Greinert H., Greinert A. 1999. *Ochrona i rekultywacja środowiska glebowego*. Wydawnictwo Politechniki Zielonogórskiej, Zielona Góra.
72. Gryndler M., Lipavsky J. 1995. Effect of phosphate fertilization on the populations of arbuscular mycorrhizal fungi. *Rostlinna Vyroba* 41(11), 533-540.
73. Guo C., Zhou H., Wong Y., Tam N. 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Marine Pollution Bulletin* 51(8-12), 1054-1061.
74. Haigh S. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soil. *The Science of the Total Environment* 185(1), 161-170.
75. Hammel K. 1995. Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health Perspectives* 103(5), 41-43.
76. Harms H., Bosma T. 1997. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18(2-3), 97-105.
77. Heitkamp M., Cerniglia C. 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Applied and Environmental Microbiology* 54(6), 1612-1614.
78. Henner P., Schiavon M., Druelle V., Lichtfouse E. 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry* 30, 963-969.
79. Hinga K. 2003. Degradation rates of low molecular weight PAH correlate with sediment TOC in marine subtidal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 46(4), 466-474.

80. Holland K. 1995. Process for degradation of keratin, keratinaceous material, collagen and collagenaceous material with enzyme material, cell-free culture or cell culture from *Micrococcus sedentarius*. *Biotechnology Advances* 13(3), 589-590.
81. <http://mycorrhiza.ag.utk.edu/>
82. <http://invam.caf.wvu.edu/>
83. <http://www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/intro.html>
84. Huaa Z., Chen J., Lun S., Wang X. 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Research* 37(17), 4143-4150.
85. Huang X., Zeiler L., Dixon D., Greenberg B. 1996. Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar region of *Brassica napus* (canola) and *Cucumis sativus* (cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35(2), 190-197.
86. Huesemann M., Hausmann T., Fortman T. 2004. Does bioavailability limit biodegradation?. A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. *Biodegradation* 5(4), 261-274.
87. Hulscher T., Cornelissen G. 1996. Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants - a review. *Chemosphere* 32(4), 609-626.
88. Ignat A., Rachev R., Donev T., Petrova M. 2002. A biodegradation activity of microbial associations. *Journal of Culture Collections* 3(1), 43-47.
89. Ijah U. 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management* 18(5), 293-299.
90. Izdebska-Mucha D. 2003. Wpływ benzyny i oleju napędowego na właściwości reformacyjne monomineralnych iłów wzorcowych oraz gruntów spoistych. Rozprawa doktorska, Wydział Geologii UW, Warszawa.
91. Janssen B., Willigen P. 2006. Ideal and saturated soil fertility as bench marks in nutrient management: 1. Outline of the framework. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 116(1-2), 132-146.
92. Jeffries P., Gianinazzi S., Perotto S., Turnau K., Barea J.-M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37(1), 1-16.
93. Joergensen R., Schmadeke F., Windhorst K., Meyer B. 1995. Biomass and activity of micro-organisms in a fuel oil contaminated soil *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1137-1143.

94. Johnsen A., Wick L., Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* 133(1), 71-84.
95. Joner E., Johansen A., Loibner A., Dela Cruz A., Szolar O., Portal J., Leyval C. 2001. *Environmental Science and Technology* 35, 2773-2777.
96. Joner E., Leyval C. 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10, 155-159.
97. Joner E., Leyval C., Colpaert J. 2006. Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. *Environmental Pollution* 142(1), 34-38.
98. Jones K., Peace E. 1989. The Ames mutagenicity assay applied to a range of soils. *Chemosphere* 18, 1657-1664.
99. Juhasz A., Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45(1-2), 57-88.
100. Kada T., Hirano K., Shirasu Y. 1980. Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. [in:] *Chemical Mutagens*, vol. 6, de Serres F. (eds), Hollaender, Plenum Publishing Corp., New York, 149-173.
101. Kajdas C. 1979. *Chemia i fizyka ropy naftowej*, WNT, Warszawa.
102. Kańska Z., Łebkowska M. 1994. Badania toksykologiczne dla kontroli jakości wód. *Biotechnologia* 2(25), 98-113.
103. Karl D. 1992. The grounding of the Bahia Paraiso: Microbial ecology of the 1989 Antarctic oil spill. *Microbial Ecology* 24(1), 77-89.
104. Kasai Y., Takahata Y., Hoaki T., Watanabe K. 2005. Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. *Environmental Microbiology* 7(6), 806-818.
105. Kästner M., Mahro B. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44(5), 668-675.
106. Kaya A., Fang H. 2000. The effects of organic fluids on physicochemical parameters of fine-grained soils. *Canadian Geotechnical Journal* 37, 943-950.
107. Kelley I., Cerniglia C. 1991. The metabolism of fluoranthene by species of *Mycobacterium*. *Journal of Industrial Microbiology* 7(1), 19-26.

108. Kendrick B. 2001. The Fifth Kingdom. Pictorial suplement: Mycorrhizae – mutualistic plant-fungus symbioses. Mycologue Publication, Sidney (on CD-ROM).
109. Khan A. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(4), 355-364.
110. Kiepas-Kokot A. 1999. Reakcje dżdżownic *Eisenia fetida* i rzepiku ozimego na zanieczyszczenia gleb substancjami ropopochodnymi. Materiały VI Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wrocław, 47-55.
111. Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B. 2003. Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. *Water, Air and Soil Pollution* 145, 169-186.
112. Knize M., Takemoto B., Lewis P., Felton J. 1987. The characterization of the mutagenic activity of soil. *Mutation Research* 192, 23-30.
113. Kołwzan B. 2005. Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną. Seria „Monografie”. Prace naukowe Instytutu Inżynierii i Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
114. Komukai-Nakamura S., Sugiura K., Yamauchi-Inomata Y., Toki H., Venkateswaran K., Yamamoto S., Tanaka H., Harayama S. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 82 (6), 570-574.
115. Kool H., Van Kreyll C., Persad S. 1989. Mutagenic activity in groundwater in relation to mobilization of organic mutagens in soil. *Science of the Total Environment* 84, 185-199.
116. Korzeniowska-Rejmer E. 2001. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na charakterystykę geotechniczną gruntów stanowiących podłoże budowlane. *Inżynieria Morska i Geotechnika* 2, 83-86.
117. Kościelniak S., Adamski A., Bil J., Hac B., Kobczyk W., Pulman-Bortnowska M. 1994. Wskazówki metodyczne do oceny zanieczyszczenia gruntów i wód podziemnych produktami ropopochodnymi i innymi substancjami chemicznymi w procesach rekultywacji. Wydawnictwo TRIO, Warszawa.
118. Kotterman M., Rietberg H., Hage A., Field J. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering* 57(2), 220-227.

119. Kulik N., Goi A., Trapido M., Tuhkanen T. 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management* 78(4), 382-391.
120. Kunicki-Goldfinger W. 2006. *Życie bakterii*. Baj J., Markiewicz Z. (Red.), PWN, Warszawa.
121. Lamb D., Kelly D., Masaphy S., Jones G., Kelly S. 2000. Engineering of heterologous cytochrome P450 in *Acinetobacter* sp.: Application for pollutant degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276(2), 797-802.
122. Lanno R., Wells J., Conder K., Bradham K., Basta N. 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 39-47.
123. Leahy J., Colwell R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in environment. *Microbiological Reviews* 54(3), 305-315.
124. LeDuc D.L., Terry N. 2005. Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 514-520.
125. Lee J.K.D., Kim B.U., Dong J.-I., Lee S. 1998. Remediation of petroleum-contaminated soils by fluidized thermal desorption. *Waste Management*, 18, 503-507.
126. Leśniak A. 2006. Budowa i właściwości glomalin. Materiały XIII Ogólnopolskiego Seminarium Studentów i Doktorantów „Biotechnologia Środowiskowa”, Wisła-Jarzębata, 91-96.
127. Leyval C., Turnau K., Haselwandter K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139-153.
128. Lindstrom J., Barry R., Braddock J. 1999. Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology and Biochemistry* 31(12), 1677-1689.
129. Lityński T., Jurkowska H. 1982. *Żyźność gleby i odżywanie się roślin*. PWN, Warszawa, 15-145.
130. Luan T., Yu K., Zhong Y., Zhou H., Lan C., Tam N. 2006. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere* 65, 2289-2296.
131. Łącka-Pilaszek B. 1996. Biodegradacja substancji ropopochodnych w osadach ściekowych płockiej petrochemii. Międzynarodowe Sympozjum naukowo-szkoleniowe „Technika dla środowiska”. Arka-Konsorcjum, Poznań.
132. Lebkowska M. 1996. Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* 3, 117-118.

133. Łebkowska M., Załęska-Radziwiłł M., Słomczyńska B. 1999. Toksykologia środowiska. Ćwiczenia laboratoryjne. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
134. MacLeod C., Daugulis A. 2005. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochemistry* 40(5), 1799-1805.
135. Mahaffey W., Gibson D., Cerniglia C. 1988. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Applied and Environmental Microbiology* 54(10), 2415-2423.
136. Maila M., Cloete T. 2002. Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50(2), 107-113.
137. Maila M., Cloete T. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a revive. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55, 1-8.
138. Maliszewska-Kordybach B. 1990. Wpływ poziomu wilgotności gleby piaskowej na zakres i szybkość rozkładu fluorenu, antracenu i pirenu, *Roczniki Gleboznawcze* 41 (1-2), 47-57.
139. Maliszewska-Kordybach B. 1991. Biodegradacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach narażonych uprzednio na wpływ tych związków, *Archiwum Ochrony Środowiska* 2, 139-149.
140. Maliszewska-Kordybach B. 1991. Wpływ wapnowania na trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach, *Archiwum Ochrony Środowiska* (3-4), 69-78.
141. Maliszewska-Kordybach B. 1993. Trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie. Seria „Monografie”. Praca wykonana w Zakładzie Gleboznawstwa i Ochrony Gruntów pod kierownictwem prof. dr. hab. T. Witka, Puławy.
142. Maliszewska-Kordybach B. 1995. The persistence of carcinogenic micropollutant – pyrene in soils of different organic matter content. *Archiwum Ochrony Środowiska* 2, 183-190.
143. Maliszewska-Kordybach B. 2003. Soil quality criteria for polycyclic aromatic hydrocarbons – current information and problems. *Frasenius Environmental Bulletin* 12(8), 919-924.

144. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International* 28(8), 719-728.
145. Małachowska-Jutsz A. 1999. Zmiany aktywności enzymatycznej mikroorganizmów w procesie detoksykacji gleby skażonej ropą naftową i jej pochodnymi. Rozprawa doktorska, Politechnika Śląska, Gliwice.
146. Małachowska-Jutsz A. 2002. Wpływ skażenia gleby przepracowanym olejem silnikowym na przeżywalność dżdżownic *Eisenia fetida*. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 5(1), 37-44.
147. Małachowska-Jutsz A., Miksch K., Kulczyk P. 2001a. Wpływ sorpcji gleby na aktywność dehydrogenaz wyznaczoną przy użyciu testu TTC. Materiały konferencyjne VII Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wisła-Jarzębata, 305-314.
148. Małachowska-Jutsz A., Miksch K., Przysaś W. 2001b. Wpływ ryzosfery rośliny motylkowej i niemotylkowej na zmiany aktywności enzymatycznej w glebie narażonej na długotrwałe działanie substancji ropopochodnych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 4(1), 117-130.
149. Małachowska-Jutsz A., Mrozowska J., Kozielska M., Miksch K. 1997. Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi w procesie jej detoksykacji. *Biotechnologia* 1(36), 79-92.
150. Margesin R., Schinner F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(5-6), 650-663.
151. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40(4), 339-346.
152. Marin M., Pedregosa A., Rios S., Laborda F. 1996. Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38(2), 69-75.
153. Marquez-Rocha F., Hernandez-Rodriguez V., Lamela M. 2001. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Water, Air and Soil Pollution* 128(3-4), 313-320.
154. Marschner P., Crowley D., Yang Ch. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil* 261(1-2), 199-208.

155. Martens R. 1982. Concentrations and microbial mineralization of four to six ring polycyclic aromatic hydrocarbons in composted municipal waste. *Chemosphere* 11(35), 761-770.
156. Meagher R.B., Heaton A. C. 2005. Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 502-513.
157. Merkl N., Schultze-Kraft R., Infante C. 2005. Phytoremediation in the tropics influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution* 138, 86-91.
158. Meulenberg R., Rijnaarts H., Doddema H., Field J. 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters* 52(1), 45-49.
159. Modern soil microbiology. Van Elsas J., Trevours J., Wellington E. (eds), Marcel Dekker, Inc., New York 1997.
160. Molenda J. 1997. *Technologia chemiczna*. WSiP, Warszawa.
161. Monareca S., Feretti D., Zerbini I., Alberti A., Zani C., Resola S., Gelatti U., Nardi G. 2002. Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses. *Environmental Research Section A* 88, 64-69.
162. Mrozowska J. (red.) 1999. *Laboratorium z mikrobiologii ogólnej i środowiskowej*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice.
163. Mueller J., Chapman P., Pritchard P. 1989. Action of fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Applied and Environmental Microbiology* 55(12), 3085-3090.
164. Muratowa A., Hubner T., Narula N., Wand H., Turkovskaya O., Kusch P., Jahn R., Merbach W. 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological Research* 158(2), 151-161.
165. Nam, K., Kim, J. 2002. Role of loosely bound humic substances and humin in the bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environmental Pollution* 118(3), 427-433.
166. Nedwell D. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 30(2), 101-111.
167. Nichols K. 2004. Characterization of glomalin a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. *Agriculture, Soil Science* 81, 123-129.

168. Nieves M., Commendatore M., Esteves J., Bucala V. 2005. Effect of pH modification on bilge waste biodegradation by a native microbial community, *International Biodeterioration and Biodegradation* 56(3), 151-157.
169. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej z dn. 4 lipca 2006 r. W sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy Prawo Ochrony Środowiska (DzU Nr 129, poz. 902).
170. OECD Wytyczne do badań substancji chemicznych. 1984. Metoda 201 – Glony, badanie hamowania wzrostu.
171. OECD Wytyczne do badań substancji chemicznych. Tom I, 1997. Przekład oficjalnej wersji wydania w j. angielskim. Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec.
172. Olańczuk-Neyman K., Prejzner J., Topolnicki M. 1994. Chemiczna i bakteriologiczna ocena skażenia gruntów stacji przeładunku paliw produktów naftowych. Wydawnictwa Hydrotechniczne Politechniki Gdańskiej, *Biotechnologia* 2(25), 50-60.
173. Olivera N., Esteves J., Commendatore M. 1997. Alkane Biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia. Argentina, *International Biodeterioration and Biodegradation* 40(1), 75-79.
174. Orłowska E., Ryszka P., Jurkiewicz A., Turnau K. 2005. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) strains in colonisation of plants involved in phytostabilisation of zinc wastes. *Geoderma* 129, 92-98.
175. Ostrowska A., Gawliński S., Szczubiałka Z. 1991. Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin. Katalog, Warszawa.
176. Peressutti S., Alvarez H., Pucci O. 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52(1), 21-30.
177. Petersen L., Larsen E., Bruun P. 2002. Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils. *Environmental Science and Technology* 36, 3057-3063.
178. Petroleum refining technology and economics. Gary J., Handwerk G. (Eds), 4th Edition, Marcel Dekker, New York, 2001.
179. Piatt J., Brusseau M. 1998. Rate-limited sorption of hydrophobic organic compounds by soils with well characterized organic matter. *Environmental Science and Technology* 32(11), 1604-1608.

180. Płaza G., Nałęcz-Jawecki G., Ulfig K., Brigmon R. 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59(2), 289-296.
181. PN-86/C-04573/01. 1986. Badanie zawartości substancji ekstrahujących się rozpuszczalnikami organicznymi.
182. PN-86034/02. 1994. Microbial testing. Determination of numerous bacteria by the plate dilution method.
183. PN-86034/07. 1994. Microbial testings. Determination of numerous fungi by the plate dilution method.
184. PN-ISO 11268-1. 1997. Jakość gleby. Wpływ zanieczyszczeń na dżdżownicę (*Eisenia fetida*). Oznaczanie ostrej toksyczności z zastosowaniem sztucznego podłoża glebowego.
185. PN-ISO 11269-1. 1998. Jakość gleby. Oznaczenie wpływu zanieczyszczeń na florę glebową. Metoda pomiaru hamowania wzrostu korzeni.
186. Potin O., Rafin C., Veignie E. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54(1), 45-52.
187. Potter C., Glaser J., Chang L., Meier J., Dosani M., Herrmann R. 1999. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons under bench-scale compost conditions. *Environmental Science and Technology* 33(10), 1717-1725.
188. Pries F., Van der Ploeg J., Dolfing J., Janssen D. 1994. Degradation of halogenated aliphatic compounds: the role of adaptation. *FEMS Microbiology Reviews* 15(2-3), 279-295.
189. Procedura PB-O6: 1999. Oznaczanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej, Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Katowice.
190. Procedura PB-O7: 1999. Oznaczanie węglowodorów alifatycznych metodą spektrometrii w podczerwieni, Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Katowice.
191. Providenti M., Lee H., Trevors J. 1993. Selected factors limiting microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 12, 379-395.
192. Przysaś W., Miksch K., Małachowska-Jutcz A. 2000. Zmiany aktywności enzymatycznej gleby w procesie biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych przy zastosowaniu biopreparatów. *Archiwum Ochrony Środowiska* 26(2), 59-70.

193. Rahman K., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat I. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 85(3), 257-261.
194. Richard J., Vogel T. 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44(2-3), 141-184.
195. Richards B. 1979. *Wstęp do ekologii gleby*. PWN, Warszawa.
196. Rillig M., Ramsey P., Morris S., Paul E. 2003. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant and Soil* 253, 293-299.
197. Rillig M., Steinberg P. 2002a. Glomalin production of an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification?. *Soil Biology and Biochemistry* 34(9), 1371-1374.
198. Rillig M., Wright S., Eviner V. 2002b. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant and Soil* 238, 325-333.
199. Rillig M., Wright S., Kimball B., Leavitt S. 2001. Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Global Change Biology* 7, 333-337.
200. Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi z dnia 9 września 2002 r. (DzU 02.165.1359 z dnia 4 października 2002 r.).
201. Różański H. 2002. Możliwość wykorzystania naftofitów do bioremediacji gleb i wód zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. (www.rozanski.gower.pl/ekotoksykologia).
202. Salanitro J., Dorn P., Huesemann M., Moore K., Rhodes I., Jackson L., Vipond T., Western M., Wiśniewski H. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology* 31(6), 1769-1776.
203. Samanta S. 2001. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphtol. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 55(1), 627-631.
204. Samanta S., Singh O., Jain R. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 20(6), 243-249.
205. Saterbak A., Toy R., Wong D., McMains B., Williams M., Dorn P., Brzussy L., Chai E., Salanitro J. 1999. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-

- contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(7), 1591-1607.
206. Schaefer M. 2001. Earthworms on crude oil contaminated soils: toxicity tests and effects on crude oil degradation. *Soil, Sediment and Water* 8, 35-37.
207. Schaefer M. 2003. Behavioural endpoints. [in:] *Earthworm ecotoxicology, evaluation of different test systems in soil toxicity assessment*. *Journal Soils and Sediments* 3(2), 79-84.
208. Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W., Warshawsky D. 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Applied and Environmental Microbiology* 62(1), 13-19.
209. Schnitzer M. 1982. Organic Matter Characterization. [In:] *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Agronomy Monograph No. 9, 2nd Edition, 581-594.
210. Siciliano S., Germida J., Headley J. 1997. Evaluation of prairie grass species as bioindicators of halogenated aromatics in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 521-527.
211. Sivagurunathan M., Martin A., Helleur R. 2003. Biological waste-treatment of hydrocarbon residues: effects of humic acids on the degradation of toluene. *Applied Energy* 75(3-4), 267-273.
212. Smith M. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* 1(2-3), 191-206.
213. Smith M., Flowers T., Duncan H., Alder J. 2006. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PHAs residues. *Environmental Pollution* 141, 519-525.
214. Sorensen J. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. W: *Modern soil microbiology*, Elsas J.D., Trevors J.T., Wellington E.M.H. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, 21-42.
215. Sparling G., West A., Whale K. 1985. Interference from plant roots in the estimation of soil microbial ATP, C, N, and P. *Soil Biology and Biochemistry* 17(3), 275-278.
216. Speight J. 1991. *The chemistry and technology of petroleum*. Marcel Dekker, Inc., New York.

217. Steffen K., Hatakka A., Hofrichter M. 2003. Degradation of benzo[*a*]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7), 3957-3964.
218. Steinberg S., Schmeltzer J., Keramer D. 1996. Sorption of benzene and trichloroethylene (TCE) on a desert soil: Effects of moisture and organic matter. *Chemosphere* 33(5), 961-980.
219. Stephen J., Kowalchuk G., Burns M., McCaig A., Philips C., Embley T., Posser J. 1998. Analysis of β -subgroup proteobacterial ammonia oxidizer population in soil by denaturing gradient gel electrophoresis analytical and hierarchical phylogenetic probing. *Applied and Environmental Microbiology* 64(8), 2958-2965.
220. Stingley R., Khan A., Cerniglia C. 2004. Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322(1), 133-146.
221. Stotzky G. Soil as an environment for microbial life. W: *Modern soil microbiology*, Elsas J.D., Trevors J.T., Wellington E.M.H. (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, 1-18.
222. Stuczyński T., Siebielec G., Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., Gawrysiak L. 2004. Wyznaczenie obszarów, na których przekroczone są standardy jakości gleb. *Poradnik metodyczny dla administracji. Inspekcja Ochrony Środowiska. Biblioteka Monitoringu Środowiska*, Warszawa.
223. Stumm W. 1992. *Chemistry of the Solid-Water Interface. Processes at the Mineral-Water and Particle-Water Interface in Natural Systems*, John Wiley and Sons Inc., New York, NY, 448.
224. Suominen L., Jussila M., Makelainen K., Romantschuk M., Lindstrom K. 2000. Evaluation of the *Galega-Rhizobium galegae* system for the bioremediation of oil-contaminated soil. *Environmental Pollution* 107(2), 239-244.
225. Surygała J. (red.) 2000. *Zanieczyszczenia naftowe w gruncie*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
226. Ślimak K. 1997. Avoidance response as sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta*). *Soil Biology and Biochemistry* 29(3-4), 713-715.
227. Śliwka E., Kołwzan B., Surygała J. 2000. Ocena przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego w glebie. *Biuletyn ITN* 12 (2), 100-104.
228. Tabak H., Lazorchak J., Lei L., Khodadoust A., Anita J., Bagchi R., Suidan M. 2003. *Studies on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments:*

- bioavailability, biodegradability, and toxicity issues. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(3), 473-482.
229. Tang J., Liste H., Alexander M. 1999. Chemical assays of availability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 48(1), 35-42.
230. Tateya S., Tanabe S., Tatsukawa R. 1988. PCBs on the globe: possible trend of future levels in the open ocean environment [in:] *Toxic contamination in large lakes*. Schmidtke N. (ed.). Vol. 3, Sources, fate and controls of toxic contaminants. Lewis Publ., Inc. Chelsea, Michigan USA, 237-281.
231. Thompson I., Bailey M., Ellis R., Maguire N., Meharg A. 1999. Response of soil microbial communities to single and multiple doses of an organic pollutant. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 95-105.
232. Thorsen W., Copew G., Shea D. 2004. Bioavailability of PAHs: Effects of soot carbon and PAH source. *Environmental Science and Technology* 38(7), 2029-2037.
233. Tomlin A. 1983. Earthworm baits market in North America [in:] *Earthworm ecology*. Satchell J. (ed.), Chapman and Hall, London, 331-338.
234. Torsvik V., Goksyr J., Daae F., Sorheim J., Michalsen J., Salte K. 1994. Use of DNA analysis to determinate the diversity of microbial communities [in:] *Beyond the biomass*. Ritz K., Dighton J., Giller K. (eds), Wiley Chichester, England, 39.
235. Traser-Cepeda C., Leirós M., Seoane S., Gil-Sotres F. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32(13), 1867-1875.
236. Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. [in:] *Physiological and genetic aspects of mycorrhizae*. Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. (eds) INRA, Paris, 217-221.
237. Trzesicka-Młynarz D., Ward O. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology* 41(6), 470-476.
238. Turnau K., Jurkiewicz A., Grzybowska B. 2002. Rola mikoryzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych. *Kosmos* 51(2), 185-194.
239. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 1995. Pelc H., Elvers B., Hawkins S., Harrer R., Pikart-Müller M. (eds), Vol. B7. Environmental protection and industrial safety I. Weise E. (ed.), Weinheim.
240. Ustawa o Odpadach z dnia 27 kwietnia 2001 r. (DzU Nr 62, poz. 628).

241. Ustawa o wprowadzeniu ustawy – Prawo ochrony środowiska, ustawy o odpadach oraz zmianie niektórych ustaw z dnia 27 lipca 2001 r. (DzU Nr 100, poz. 1085).
242. Ustawa Prawo Ochrony Środowiska z dnia 27 kwietnia 2001 r. (DzU Nr 62, poz. 627).
243. Ustawa z dnia 10 marca 2006 r. zmieniająca ustawę o zmianie ustawy o odpadach oraz o zmianie niektórych innych ustaw (DzU 2006 Nr 63, poz. 441).
244. Ustawa z dnia 18 maja 2005 r. o zmianie ustawy - Prawo ochrony środowiska oraz niektórych innych ustaw (DzU Nr 113, poz. 954 oraz z 2006 r. Nr 50, poz. 360).
245. Ustawa z dnia 19 grudnia 2002 r. o zmianie ustawy o odpadach oraz niektórych innych ustaw (DzU 2003 Nr 7, poz. 78).
246. Ustawa z dnia 19 lutego 2004 r. o zmianie ustawy - Prawo ochrony środowiska oraz niektórych innych ustaw (DzU Nr 49, poz. 464).
247. Ustawa z dnia 20 kwietnia 2004 r. o zmianie ustawy o odpadach (DzU 2004 Nr 116, poz. 1208).
248. Ustawa z dnia 24 lutego 2006 r. o zmianie ustawy - Prawo ochrony środowiska oraz niektórych innych ustaw (DzU Nr 50, poz. 360) oraz zmian wynikających z przepisów ogłoszonych przed dniem 4 lipca 2006 r.
249. Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o zmianie ustawy o odpadach oraz o zmianie niektórych innych ustaw (DzU Nr 175, poz. 1458 oraz z 2006 r. Nr 63, poz. 441).
250. Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o zmianie ustawy o odpadach oraz o zmianie niektórych innych ustaw (DzU 2005 Nr 175, poz. 1458).
251. Ustawa z dnia 3 października 2003 r. o zmianie ustawy - Prawo ochrony środowiska oraz niektórych innych ustaw (DzU Nr 190, poz. 1865).
252. Vanechoutte M., Tjernberg I., Baldi F., Pepi M., Fani R., Sullivan E., van der Toorn J., Dijkshoorn L. 1999. Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as '*Acinetobacter venetianus* sp. nov.' belong to the same genomic species. *Research in Microbiology* 150(1), 69-73.
253. Virkutyte J., Sillanpaa M., Latostenmaa P. 2002. Electrokinetic soil remediation — critical overview. *The Science of the Total Environment*, 289, 97-121.
254. Wake H. 2005. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment 62, 131-140.
255. Walker C., Hopkin S., Sibly R., Peakall D. 2002. Podstawy ekotoksykologii. Migula P. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 221-242.

256. Walworth J., Braddock J., Woolard C. 2001. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of critic soils. *Cold Regions Science and Technology* 32(2-3), 85-91.
257. Walworth J., Braddock J., Woolard C., Reynolds C. 1997. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: an approach to determining optimum levels. *Journal of Soil Contamination* 6(5), 465-480.
258. Wang W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air and Soil Pollution* 59(3-4), 381-400.
259. Ward O., Singh A., Van Hamme J. 2003. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(5), 260-270.
260. Warhurst A., Fewson C. 1994. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Critical Reviews in Biotechnology* 14(1), 29-73.
261. Wellington E., Toth I. 1999. Actinomycetes. [in:] *Methods in soil analysis*. Weaver R. (Ed.), Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. SSSA Book Ser. 5. Madison, WI, 269-290.
262. White J., Charvat I. 1999. The mycorrhizal status of an emergent aquatic, *Lythrum salicaria* L. at different levels of phosphorus availability. *Mycorrhiza* 9(4), 191-197.
263. White P., Claxton L. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research* 567, 227-345.
264. Wild S., Jones K. 1993. Biological and abiotic losses of polynuclear hydrocarbons from soils freshly amended with sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12(1), 5-12.
265. Winegardner D. 1995. *An Introduction to Soils for Environmental Professionals*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 270.
266. Wołkowicz S. 2005. *Rekultywacje terenów zdegradowanych – teoria i praktyka*. Państwowy Instytut Geologiczny, Warszawa.
267. Wright S. F., Franke-Snyder M., Morton J. B., Upadhyaya A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181, 193-203.
268. Wright S. F., Upadhyaya A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science* 161, 575-586.

269. Wright S. F., Upadhyaya A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198, 97-107.
270. Wright S., Upadhyaya A. 1999. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza* 8, 283-285.
271. Yang Ch., Crowley D. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 345-351.
272. Yu S., Ke L., Wong Y., Tam N. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International* 31(2), 149-154.
273. Zadrazil F., Martens R. 1996. Degradation of xenobiotics (PAH's) by fungi and its utilization in soil decontamination. *International Biodeterioration and Biodegradation* 37 (3-4), 237-243.
274. Zawadzki S. (red.) 1999. *Gleboznawstwo*. Wyd. IV, PWRiL, Warszawa.
275. Zgirski A., Gondko R. 1998. *Obliczenia biochemiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
276. Zienko J. 1996. Substancje ropopochodne w środowisku przyrodniczym. Cz. I. Kryteria i ocena stopnia zanieczyszczenia. *Ekologia i Technika* 1(19), 18-23.

Mikoryzacja roślin a efektywność fitoremediacji gruntów zanieczyszczonych węglowodorami

Streszczenie

Konieczność likwidacji zanieczyszczeń ropopochodnych ze środowiska wodno-gruntowego spowodowała rozwój wielu metod i technik, w tym biotechnologicznych, mających na celu detoksykację produktów naftowych. Metody biologicznego oczyszczania gruntów są jednymi z najbardziej „przyjaznych” dla środowiska przyrodniczego, gdyż wykorzystują one naturalne procesy zachodzące w ekosystemach wodnych i gruntowych z udziałem roślin i mikroorganizmów.

Prawidłowy rozwój roślin na terenach zanieczyszczonych wymaga wytworzenia przez nie odpowiednich mechanizmów obronnych. Wśród wielu strategii przetrwania roślin w niekorzystnych warunkach istotne znaczenie ma ich symbioza z grzybami mikoryzowymi.

Celem podjętych badań była ocena roli bakterii autochtonicznych i grzybów mikoryzowych w fitoremediacji gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi oraz ocena ekotoksykologiczna uwzględniająca toksyczność zanieczyszczeń na poziomie reducentów, producentów i konsumentów.

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych i naturalnych. W doświadczeniach wykorzystywano próbki gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, które pobrano na terenie rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach

Pierwszy etap badań obejmował ocenę zmian ekotoksyczności gleb zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi podczas procesu samooczyszczania. Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych przez okres 12 tygodni. Ekotoksyczność gleb oceniano z wykorzystaniem organizmów reprezentujących różne ogniwa łańcucha troficznego.

W drugim etapie badań oceniano wpływ inokulum przygotowanego z odpowiednich szczepów bakterii i grzybów wyizolowanych z gleb na proces ich fitoremediacji. Wykorzystując doświadczenia lizymetryczne, badano ekotoksyczność gleb w stosunku do mikroorganizmów, glonów *Scenedesmus quadricauda*, roślin (jednoliściennych: *Triticum vulgare* V. i *Secale cereale* L. oraz dwuliściennych: *Cardamine pratensis* L., *Trifolium repens* V., *Sinapis alba* L., *Cucumis sativus* L.), a także dżdżownic *Eisenia fetida* oraz ślimaków *Physa acuta* Drap.

Analizę przebiegu wszystkich procesów prowadzono na podstawie pomiarów jakościowych i ilościowych zmian zawartości węglowodorów oraz badań ekotoksyczności

gleb. W badaniach oceniano procesy rozkładu węglowodorów ropopochodnych w glebach, gdzie prowadzono fitoremediację z wykorzystaniem inokulum opartego na autochtonicznych szczepach mikroorganizmów w stosunku do gleb poddanych procesom samej fitoremediacji oraz samooczyszczaniu.

Wykazano, że w glebie skażonej węglowodorami kolonizacja korzeni roślin przez grzyby mikoryzowe wpłynęła korzystnie na wzrost i rozwój korzeni, a także na rozkład zanieczyszczeń przez inne organizmy ryzosfery. Efektywność eliminacji węglowodorów z gruntu zależała od zastosowanego wariantu modyfikacji metody fitoremediacji, tj. rodzaju rośliny i biopreparatu (bakteryjnego lub grzybowego). Wykazano przy tym, iż najlepsze rezultaty można uzyskać w procesie bioremediacji prowadzonej z wykorzystaniem rośliny jednoliściennej oraz inokulantów grzybów mikoryzowych izolowanych z zanieczyszczonej gleby. Udowodniono, że symbioza grzybów mikoryzowych z roślinami jednoliściennymi powoduje zwiększenie efektywności usuwania węglowodorów 2-, 3-, 4- i 5-pierścieniowych o ok. 40%, natomiast 6-pierścieniowych o ok. 30% w porównaniu z próbkami, w których zastosowano same rośliny. Wykazano przy tym, że prowadzenie bioremediacji gleby z zastosowaniem rośliny jednoliściennej oraz biopreparatu grzybowego umożliwia istotne zwiększenie efektywności usuwania także zanieczyszczeń najtrudniej degradowalnych – frakcji ciężkich. W warunkach prowadzenia eksperymentu w omawianym wariantcie uzyskano ok. 15-krotne zwiększenie efektywności bioremediacji w odniesieniu do próbki kontrolnej i prawie 4-krotne w porównaniu z próbką, w której użyto same rośliny.

Uzyskane wyniki ujawniły, że współzależność między roślinami i grzybami ma istotne znaczenie w procesach fitoremediacji gruntów. Opracowano metodę intensyfikacji fitoremediacji gleb zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi z wykorzystaniem grzybów mikoryzowych (fitoremediacji + bioaugmentacja). Ze względu na łatwość wdrożenia i stosunkowo niskie nakłady finansowe metoda ta może stanowić atrakcyjną alternatywę dla tradycyjnych metod odnowy terenów zanieczyszczonych produktami naftowymi.

Plant micorrhization versus effectiveness of phytoremediation of soil polluted with hydrocarbons

Abstract

Rising needs of petroleum contaminants removal from water-soil environment induced development of new methods and techniques, including biotechnology, aimed in detoxication of petroleum products. Biological methods of the soil remediation belong to the most environmentally friendly maintenances in which advantage is taken of natural, spontaneous processes, which usually occur with microorganisms and plants in natural aquatic and terrestrial ecosystems. It was discovered that proper growth and development of plants at contaminated area requires induction of specific protective and defensive mechanisms. Amongst many strategies of plant survival under disadvantageous conditions, special role is played by their symbiosis with mycorrhizal fungi.

The aim of presented study was to evaluate the influence of autochthonous bacteria and mycorrhizal fungi inoculation on phytoremediation progress in soil contaminated with petroleum oil. Ecotoxicological evaluation was also performed with regard to contaminants' toxicity at different food chain levels: producers, consumers and reducers.

Researches were conducted under laboratory and field conditions. Contaminated soil was sampled from the area of oil refinery in Czechowice Dziedzice. In first stage of laboratory research, changes in toxicity of soil contaminated with petroleum products during self-cleaning process were determinate. Research were conducted 12 weeks. Ecotoxicity of soil was evaluated with organisms representing different levels of trophic chain.

The second stage of experiment was focused on detection of influence of inoculum prepared from selected bacteria and fungi stains isolated from soil on phytoremediation process. In lysimeter experiments ecotoxicity of soil to microorganisms, algae *Scenedesmus quadricaud*, plants (monocotyledonous- *Triticum vulgare* V. i *Secale cereale* L. and dicotyledonous - *Cardamine pratensis* L., *Trifolium repens* V., *Sinapis alba* L., *Cucumis sativus* L.) as well as earthworm's *Eisenia fetida* and snails *Physa acuta* D. was tested. Analysis of all processes was based on qualitative and quantitative measurements of hydrocarbons concentration and ecotoxicity tests. During the research degradation of petroleum hydrocarbons was assessed in soil where phytoremediation was enhanced by inoculum prepared from autochthonous microorganisms and compared with degradation in soil where only phytoremediation and self-cleaning occurred.

It was shown that colonization of rhizosphere by mycorrhizal fungi had beneficial effect on plant roots' growth and development, as well as on the hydrocarbons degradation by accompanying organisms. It was revealed that efficiency of hydrocarbons removal was dependent on the adopted modification of phytoremediation method e.g. plant and inoculums (bacterial and/or fungal). Experiment allowed to point out that the best results were obtained after application of monocotyledonous plant and inoculation with mycorrhizal fungi isolated from contaminated soil. It has been proved that symbiosis between monocotyledonous plants and mycorrhizal fungi resulted in increased efficiency of hydrocarbons removal: 2-, 3-, 4- and 5-cyclic at a rate of about 40% and 6-cyclic at a rate of about 30%, in comparison to the samples where only plants were introduced. It was also indicated that bioremediation enhanced by monocotyledonous plant cultivation and fungi inoculation leads to significant increase in the hydrocarbons' heavy fractions removal from soil. Efficiency of these fractions removal increased in discussed experiment 15 times as compared to the control sample (where remediation was not applied) and almost 4 times as compared to the sample where only plants were introduced.

Obtained results showed that symbiosis between plants and fungi is a key factor in the soil phytoremediation. Method for intensification of phytoremediation of soils contaminated with petroleum compounds was developed and based on the application of mycorrhizal fungi (phytoremediation + bioaugmentation). Because of relatively low cost and simplicity of procedure, this method could be attractive alternative for more traditional techniques of remediation sites contaminated with petroleum products.

SPIS TABEL I RYSUNKÓW

Tabela 1. Porównanie kosztów w zależności od zastosowanej metody remediacji gruntu (Buzea i DeStefanis, 1999; EPA, 2000).....	37
Tabela 2. Kryteria selekcji biotestów w zależności od przewidywanego sposobu użytkowania gleby (Dechema, 1995)	45
Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne gleb wykorzystywanych w badaniach	62
Tabela 4. Stężenia zanieczyszczeń węglowodorowych występujących w analizowanych próbkach glebowych	63
Tabela 5. Stężenie WWA w próbkach gleb wykorzystywanych do badań	63
Tabela 6. Zmiany długości korzeni roślin pod wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych, pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni; statystyczną istotność różnic długości korzeni oceniano testem Dunnetta	65
Tabela 7. Zmiany biomasy roślin pod wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych, pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni; statystyczną istotność różnic biomasy roślin oceniano testem Dunnetta	68
Tabela 8. Wpływ gatunku rośliny na ilość mikroorganizmów w glebie.....	79
Tabela 9. Liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów w glebie czystej B i skażonej A	80
Tabela 10. Procentowy udział korzeni roślin objętych mikoryzą w glebie czystej B i skażonej A	81
Tabela 11. Koncentracja poszczególnych grup spor grzybów arbuskularnych w próbkach gleby zanieczyszczonej A	84
Tabela 12. Koncentracja poszczególnych grup spor grzybów arbuskularnych w próbkach gleby czystej B.....	85
Tabela 13. Liczba spor grzybów arbuskularnych niezdolnych do kiełkowania w glebie skażonej A oraz czystej B	85
Tabela 14. Wpływ zanieczyszczeń zawartych w glebach A i B na ich genotoksyczność – test z wykorzystaniem dwóch szczepów <i>Bacillus subtilis</i> : M45 (Rec-) i H17 (Rec+) ...	88
Tabela 15. Zmiany długości korzeni roślin pod wpływem zanieczyszczeń ropopochodnych, pozostałych w odciekach z gleby A podczas procesu samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni; statystyczną istotność różnic długości korzeni oceniano testem Dunnetta.....	90

Tabela 16. Wpływ zanieczyszczeń zawartych w odciekach gleb A i B na ich genotoksyczność – test z wykorzystaniem dwóch szczepów bakterii <i>Bacillus subtilis</i> : M45 (Rec ⁻) i H17 (Rec ⁺).....	92
Tabela 17. Zmiana właściwości fizykochemicznych gleby A po 12 tygodniach jej samooczyszczania.....	93
Tabela 18. Stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie A przed i po procesie samooczyszczania.....	94
Tabela 19. Stężenia zanieczyszczeń ropopochodnych w odciekach z gleby A podczas procesu samooczyszczania (1,4,8 i 12 tygodni).....	95
Tabela 20. Efekt usunięcia [%] poszczególnych zanieczyszczeń z gleby A po zastosowaniu różnych wariantów remediacji	98
Tabela 21. Liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów w glebie A w zależności od zastosowanego wariantu bioremediacji.....	100

Rysunek 1. Schemat prowadzenia doświadczeń.....	56
Rysunek 2. Schemat prowadzenia badań z użyciem lizymetrów	58
Rysunek 3. Schemat prowadzenia badań polowych z użyciem lizymetrów.....	59
Rysunek 4. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję wzrostu korzeni roślin względem roślin z próbek kontrolnych.....	66
Rysunek 5. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję przyrostu biomasy roślin względem roślin z próbek kontrolnych.....	67
Rysunek 6. Porównanie wzrostu peluszkki na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi.....	70
Rysunek 7. Porównanie wzrostu jęczmienia na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi.....	70
Rysunek 8. Porównanie wzrostu pszenicy na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi.....	71
Rysunek 9. Porównanie wzrostu owsa na glebie nieskażonej B oraz glebie A zanieczyszczonej produktami ropopochodnymi.....	71
Rysunek 10. Porównanie grubości korzeni pszenicy z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x).....	72
Rysunek 11. Porównanie grubości korzeni owsa z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x).....	72
Rysunek 12. Zmodyfikowany korzeń peluszkki z gleby skażonej A (powiększenie 400x).....	73
Rysunek 13. Zmodyfikowany korzeń pszenicy z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x).....	73
Rysunek 14. Zmodyfikowany korzeń jęczmienia z gleby skażonej A (powiększenie 100x).....	73
Rysunek 15. Zmodyfikowany korzeń jęczmienia z gleby skażonej A oraz kontrolnej B (powiększenie 100x).....	74
Rysunek 16. Przewody powietrzne aerenchymy wytworzonej w korzeniach roślin hodowanych na glebie skażonej A (powiększenie 400x).....	74
Rysunek 17. Przewody powietrzne aerenchymy w korzeniach pszenicy uprawianej przy trasie komunikacyjnej (powiększenie - a: 100x; b: 400x).....	75
Rysunek 18. Przewody powietrzne aerenchymy w korzeniach owsa uprawianego przy trasie komunikacyjnej (powiększenie 400x).....	76

Rysunek 19. Przesławy powietrzne aerenchymy w korzeniach traw zebranych na terenie stacji paliw (powiększenie 400x).....	76
Rysunek 20. Przesławy powietrzne aerenchymy w korzeniach traw zebranych na terenie bazy transportowej (powiększenie 400x)	77
Rysunek 21. Formacje mikoryzowe w korzeniach pszenicy pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie: 100 i 400x).....	81
Rysunek 22. Formacje mikoryzowe w korzeniach owsa pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie 400x).....	82
Rysunek 23. Formacje mikoryzowe w korzeniach jęczmienia pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie 200x i 400x).....	82
Rysunek 24. Formacje mikoryzowe w korzeniach peluszki pochodzących z gleby czystej B (powiększenie 400x).....	83
Rysunek 25. Formacje mikoryzowe w korzeniach peluszki pochodzących z gleby skażonej A (powiększenie 400x).....	83
Rysunek 26. Spory grzybów arbuskularnych wyizolowane z gleby skażonej A (powiększenie a , c: 400x; d: 100x).....	86
Rysunek 27. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w glebie A po jej samooczyszczaniu w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję wzrostu korzeni roślin względem roślin z próbek kontrolnych.....	89
Rysunek 28. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych pozostałych w odciekach z gleby A podczas procesu samooczyszczania w czasie 1, 4, 8 i 12 tygodni na inhibicję wzrostu glonów <i>Scenedesmus quadricauda</i> względem glonów z próbek kontrolnych	91
Rysunek 29. Formacje mikoryzowe w korzeniach pszenicy zaszczerpionej biopreparatem grzybowym (powiększenie 200x).....	99
Rysunek 30. Porównanie efektu zahamowania wzrostu korzeni roślin po procesie fitoremediacji wspomaganiej biopreparatami.....	101
Rysunek 31. Porównanie efektu zahamowania przyrostu biomasy roślin po procesie fitoremediacji wspomaganiej biopreparatami.....	101

ZALĄCZNIK 1

Izolacja spor grzybów mikoryzowych

Spory grzybów arbuskularnych izolowane były zarówno z gleb czystych, jak i zanieczyszczonych produktami naftowymi. Schemat izolacji spor grzybów mikoryzowych przedstawiono na rysunku 1. W celu wyizolowania spor grzybów próbki 100 g badanej gleby przesiewano przez serię sit o wielkości oczek od 1 mm do 38 μm , zgodnie z metodą opisaną przez Kendricka (Kendrick, 2001). Zawartość sit o większych średnicach oczek (powyżej 50 μm) była przemywana wodą i przenoszona na płytki Petriego, a następnie analizowana mikroskopowo pod kątem ewentualnej obecności spor. Materiał, który pozostawał na sitach o średnicy oczek mniejszej niż 50 μm przenoszono do zlewek splukując dokładnie sita wodą dejonizowaną. Mieszaninę rozdzielano do plastikowych probówek o pojemności 100 cm^3 , które wirowano przy prędkości 3000 obrotów/min. przez 4 min. Supernatant dekantowano. Do probówek z osadem dodawano 60% roztwór sacharozy i dokładnie mieszano. Probówki zamykano, a następnie wirowano w czasie 1 min przy prędkości 2500 obr/min. Tak uzyskany supernatant z zawieszonymi cząstkami organicznymi oraz żywymi sporami grzybów ostrożnie przelewano na sito o mniejszej średnicy oczek (w stosunku do tych, z którego materiał glebowy był przenoszony do probówek), a następnie płukano wodą destylowaną przez 1 ÷ 2 min. Tak spreparowany materiał przenoszono na płytki Petriego, a następnie izolowano spory (wg koloru, wyglądu, średnicy) z użyciem pipety pasteurowskiej i liczone ich ilość. W podobny sposób izolowano spory z kultur wazonowych (rys. 1).

Badania przynależności taksonomicznej wyizolowanych spor grzybów mikoryzowych wykonał kierownik Katedry Fitopatologii Akademii Rolniczej w Szczecinie prof. dr hab. Janusz Błaszowski.

Biopreparat grzybowy

Biopreparat grzybowy sporządzono z żywych spor grzybów mikoryzowych wyizolowanych z mieszaniny gleb zanieczyszczonych produktami naftowymi. Próbka 100 cm^3 biopreparatu zawierała 10^7 spor. Dominujące były spory grzybów z rodzaju *Glomus*, zwłaszcza gatunków *Glomus mosseae*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus claroideum* oraz *Glomus lamellosu*. Do odpowiednich prób gleb wprowadzano 50 cm^3 zawiesiny biopreparatu/kg gleby.

namnożyć wyizolowane szczepy. Po 72 h inkubacji w temp. 20°C określono ogólną liczbę komórek bakterii w 1 cm³ uzyskanej zawiesiny, traktowanej jako biopreparat bakteryjny. Liczba komórek bakterii w biopreparacie wynosiła 6·10⁹ komórek/1 cm³ zawiesiny. Do odpowiednich prób wprowadzono 50 cm³ biopreparatu/kg gleby.

Tabela 1

Cechy diagnostyczne szczepów na podstawie testu API 20 NE

Cecha	Szczep 1	Szczep 2	Szczep 3	Szczep 4
redukcja azotanów do azotynów	-	+	-	-
redukcja azotynów do azotu	-	+	-	-
wytwarzanie indolu (tryptofan)	-	-	-	-
fermentacja glukozy	-	-	-	+
wytwarzanie dihydrolazy argininy	+	+	-	-
wytwarzanie ureazy	-	-	-	+
hydroliza eskuliny (wytwarzanie β-glukozydazy)	-	-	-	-
hydroliza żelatyny (wytwarzanie proteazy)	-	-	-	-
wytwarzanie β-galaktozydazy (para-nitrofenylo-βD-galaktopiranozydazy)	-	-	-	-
asymilacja glukozy	+	+	-	+
asymilacja arabinozy	+	+	-	-
asymilacja mannozy	-	+	-	-
asymilacja manitolu	-	+	-	+
asymilacja N-acetylo-glukozaminy	-	+	-	-
asymilacja maltozy	-	-	-	-
asymilacja glukonianu potasu	+	+	-	-
asymilacja kwasu dekadowego	+	+	+	-
asymilacja kwasu adypinowego	-	-	+	-
asymilacja jabłczanu	+	+	-	-
asymilacja cytrynianu trisodowego	+	+	-	-
asymilacja kwasu fenylooctowego	+	-	+	-
wytwarzanie oksydazy cytochromowej	+	+	-	-

Na podstawie cech diagnostycznych szczep 1 zidentyfikowano jako *Pseudomonas putida*, szczep 2 - *Pseudomonas fluorescens*, szczep 3 - *Acinetobacter radioresistens*. Ponieważ w przypadku szczepu 4 wyniki testu API 20 NE były wątpliwe, przeprowadzono dodatkowo test - API Coryne, na podstawie którego zidentyfikowano szczep 4 jako *Rhodococcus* sp.

WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ
ul. Akademicka 5, 44-100 Gliwice, tel./faks (0-32) 237-13-81
www.wydawnictwopolitechniki.pl

Sprzedaż i Marketing
tel. (0-32) 237-18-48
wydawnictwo_mark@polsl.pl

Nakł. 100 + 50

Ark. wyd. 14

Ark. druk. 10,125

Papier offset. 70x100, 80g

Oddano do druku 18.06.2008 r.

Podpisano do druku 18.06.2008 r.

Druk ukończono w lipcu 2008 r.

Wydrukowano w Zakładzie Graficznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach, ul. Kujawska 1
zam. 241/08