

Urszula WYDRO, Dawid ŁAPIŃSKI, Piotr OFMAN,
Joanna STRUK-SOKOŁOWSKA*

WSPOMAGANIE PROCESÓW BIOREMEDIACJI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH

Celem pracy było przedstawienie warunków i możliwości wykorzystania różnych sorbentów, substratów organicznych, związków chemicznych, biopreparatów i enzymów oraz nanocząsteczek do wspomaganie procesu bioremediacji gleb zanieczyszczonych substancjami organicznymi, pestycydami czy metalami ciężkimi. Zwrócono uwagę na korzyści oraz ograniczenia stosowania różnych substancji czy preparatów do bioremediacji i fitoremediacji gleb. Podjęto temat zastosowania inżynierii genetycznej jako narzędzia do uzyskania mikroorganizmów i roślin zdolnych do efektywniejszej degradacji zanieczyszczeń oraz wskazano na zagrożenia, jakie niesie za sobą wprowadzanie roślin i mikroorganizmów transgenicznych do środowiska naturalnego.

1. WSTĘP

Intensywna industrializacja i wykorzystanie na dużą skalę metali ciężkich oraz syntetycznych ksenobiotyków, w tym organicznych i nieorganicznych powoduje, że zanieczyszczenia te mogą stworzyć liczne problemy środowiskowe, w tym mogą szkodliwie oddziaływać na obieg biogeochemiczny materii oraz mieć działanie toksyczne na organizmy, w tym na człowieka. W związku z tym, że zagrożenie związane z nagromadzeniem w środowisku zanieczyszczeń opornych na degradację jest coraz większe, konieczne jest poszukiwanie nowych, bezpiecznych, często niekonwencjonalnych metod walki z zanieczyszczeniem [14, 19].

Remediacja biologiczna przy użyciu mikroorganizmów i roślin jest ogólnie uważana za bezpieczny i mało kosztowny sposób usuwania szkodliwych zanieczyszczeń ze środowiska. Ostatnie osiągnięcia naukowe donoszą, że bioremediacja oferuje przyjazne

* Politechika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,
u.wydro@doktoranci.pb.edu.pl.

dla środowiska gospodarczo i społecznie akceptowalne usuwanie ksenobiotyków przy zastosowaniu mikroorganizmów, roślin i enzymów [19].

Mikroorganizmy biorą udział w degradacji i mineralizacji różnych ksenobiotyków, ich przyswajaniu (asymilacji) bądź przekształcania w nietoksyczne związki chemiczne (biotransformacja) [12]. Z kolei rośliny mają wrodzoną zdolność do detoksykacji niektórych ksenobiotyków (np. metali ciężkich, radionuklidów) w glebie. Kluczową rolę przy fitoremediacji pełni także system korzeniowy roślin a w szczególności system ryzosferowy i zamieszkujące tam mikroorganizmy. Interakcja pomiędzy roślinami a drobnoustrojami w strefie ryzosferowej stanowi podstawę mechanizmów fitotechnologii [24].

Głównym problemem technologii bioremediacji jest usuwanie ze środowiska najtrudniej degradalnych komponentów zanieczyszczeń oraz usunięcie tzw. zanieczyszczeń resztkowych w ostatnim procesie biodegradacji. Ciągła akumulacja w środowisku silnie toksycznych i trudnodegradalnych zanieczyszczeń powoduje, że mikroorganizmy nie są w pełni skuteczne w ochronie biosfery. Stąd w ostatnich latach naukowcy na całym świecie wskazują na możliwość modyfikacji metod bioremediacji poprzez wprowadzanie różnych preparatów i substancji (mikrobiologicznych, enzymatycznych, organicznych), które zwiększą efektywność biologicznej remediacji [14].

2. TECHNIKI BIOREMEDIACYJNE

2.1. BIOREMEDIACJA NATURALNA (PROCES SAMOOCZYSZCZANIA)

Bioremediacja naturalna zwana też bioattenuacją opiera się na naturalnej biodegradacji zanieczyszczeń z wykorzystaniem flory zamieszkującej skażone środowisko połączonej z monitoringiem stężenia ksenobiotyków. Jest to metoda stosowana najczęściej do usuwania zanieczyszczeń z gleb i wód podziemnych. Bioremediacja naturalna zachodzi w środowisku samoczynnie i związana jest z obiegiem pierwiastków w środowisku. Bioremediacja naturalna ma najpowszechniejsze zastosowanie w przypadku wycieków produktów ropy naftowej, gdzie monitorowane jest rozmieszczenie zanieczyszczeń, ślędzona migracja skażenia, tempo przyrostu i aktywności mikroflory oraz obecność pierwiastków biogennych [6].

Proces samooczyszczania środowiska może być długotrwały, co wiąże się z spontanicznym przebiegiem reakcji fizyczno-chemicznych podczas degradacji zanieczyszczeń, jak również ze specyficzną aktywnością enzymatyczną mikroorganizmów autochtonicznych. Zdolność mikroorganizmów do bioremediacji zanieczyszczeń polega na unieszkodliwianiu na drodze utlenienia i rozkładu (biodegradacji), przyswojenia (asymilacji), bądź transformacji w nietoksyczne związki chemiczne (biotransformacja) [12].

Na efektywność i szybkość degradacji zanieczyszczeń przy pomocy naturalnie występujących mikroorganizmów mają wpływ różne czynniki. Pierwszym z nich są właściwości substancji powodujących zanieczyszczenie, a więc ich masa cząsteczkowa, struktura chemiczna (łatwiej są degradowane związki proste takie jak n-alkany niż np. węglowodory posiadające w swojej budowie węgiel aromatyczny), oddziaływania hydrofilowe i hydrofobowe. Drugim czynnikiem jest otoczenie, a przede wszystkim stężenie i obecność w nim substancji toksycznych, a także wilgotność, zawartość tlenu, temperatura, pH, potencjał redox, obecność pierwiastków biogenych (głównie N, P) i soli mineralnych, trzecim czynnikiem jest potencjał środowiska, a mianowicie obecność w nim różnych mikroorganizmów, które mogą oddziaływać na siebie negatywnie, a ponadto rodzaj organizmów zasiedlających skażone środowisko, rodzaj i miejsce wydzielania enzymów, stosunek do tlenu [6, 7, 18].

2.2. BIOREMEDIACJA INŻYNIERYJNA

Bioremediacja inżynierska jest sumą zabiegów obejmującą usunięcie zanieczyszczeń przede wszystkim przez mikroorganizmy oraz rośliny. Może być ona przeprowadzana metodą *in situ* (w miejscu skażenia) oraz metodą *ex situ* (poza miejscem skażenia). Bioremediacja *ex situ* wymaga odpowiedniego przygotowania stanowiska technologicznego. W przypadku bioremediacji gruntów, może ono zachodzić w specjalnych bioreaktorach, w pryzmach (kompostowanie bądź biostosy) czy też przy zastosowaniu zabiegów agrotechnicznych (przeorywania, landfarming) [18, 19].

Bioremediacja inżynierska może obejmować biostymulację, która polega na wprowadzaniu pożywek lub innych substratów do pobudzenia mikroflory autochtonicznej, zdolnej do degradacji skażonego środowiska, bądź też bioaugmentację, polegającą na dodawaniu namnożonej mikroflory w skażone miejsce. Dodatkowo bioremediacja może być wspomagana przez dostarczenie powietrza lub tlenu (biowentylacja).

W bioremediacji może być także wykorzystana zdolność roślin do pobierania zanieczyszczeń przez organy nadziemne i podziemne oraz rozkładania ksenobiotyków w strefie ryzosferowej, czyli tzw. fitoremediacja. Fitoremediacja ma wiele zalet, przede wszystkim niskie koszty, akceptacja publiczna, zdolność do jednoczesnego usuwania związków organicznych i nieorganicznych (głównie metali ciężkich i radionuklidów, które nie mogą być przekształcone chemicznie i mogą być toksyczne dla mikroorganizmów). Unieszkodliwianie zanieczyszczeń przez rośliny może zachodzić na drodze: fitodegradacji, fitowolatyżacji (fitoparowania), fitoekstrakcji (fitoakumulacji), fitostabilizacji, fitostymulacji [13, 19].

3. METODY WSPOMAGANIA BIOREMEDIACJI

3.1. WPROWADZANIE SORBENTÓW I SUBSTRATÓW ORGANICZNYCH

Na terenach, na których występuje przemysł rafineryjny, stacje benzynowe, przepompownie i bazy paliwowe, stacje obsługi maszyn i pojazdów istnieje zagrożenie skażenia gleb związkami organicznymi zawartymi w paliwach, w których dodatkowo rozpuszczone są toksyczne dodatki takie jak chlorowcopochodne, wielopierścieniowe węglowodory i inne dodatki uszlachetniające, które w środowisku glebowym wykazują tendencję do migracji przede wszystkim do wód gruntowych i powierzchniowych powodując zagrożenie. Wnikanie paliwa do gruntu przepuszczalnego odbywa się w pionie, a po dostaniu się do wód podziemnych – w poziomie. Stąd też wydaje się uzasadnione zastosowanie sorbentów w pierwszym etapie rekultywacji gleby, wzbogaconych dodatkowo o biomasę aktywnych mikroorganizmów, o czym donoszą Łuksa i in. [12]. Zadaniem sorbentów jest przede wszystkim zahamowanie migracji toksycznych i trudnorozkładalnych substancji. Zasilenie sorbentu mikroorganizmami wspomaga bioremediację i dodatkowo poprzez przechwytywanie biogenów może być źródłem substancji odżywczych dla mikroorganizmów, zwiększając tym samym efektywność procesu.

W procesie wspomaganie procesu bioremediacji mogą być użyte sorbenty naturalne np. z mchu *Sphagnum moss*, które z dodatkiem biopreparatów mogą ulec rozkładowi. Rozwiązanie takie przedstawili w swojej pracy Łuksa i in. [12], gdzie po procesie termicznej obróbki, komórki mchu zmieniają swój charakter z hydrofilowego na hydrofobowy co umożliwi absorpcję węglowodorów. Kwasy humusowe znajdujące się w mchu reagują z węglowodorami, po czym bakterie dla których węglowodory stanowią pożywkę zaczynają ich rozkład. Produktem końcowym procesu biodegradacji jest humus.

W technologii bioremediacyjnej wykorzystane mogą być materiały w formie sproszkowanej o właściwościach biosorbentów na bazie ligninocelulozy (np. glony, grzyby m.in. *Trichoderma harzianum*), które mają właściwość adsorpcji chromu sześciowartościowego, który jest rozpuszczalny w wodzie i toksyczny, i przekształcania go w formę trójwartościową, która jest nierozpuszczalna [17].

Seja'kova' i in. [22] wykorzystali do augmentacji w badaniach własnych naturalne sorbenty organiczno-mineralne takie jak węgiel brunatny, zeolity oraz kwasy huminowe do degradacji pentachlorofenolu (PCP) w glebie. Autorzy uzyskali najlepsze efekty degradacji PCP po zastosowaniu węgla brunatnego. Obecność sorbentów, głównie węgla brunatnego, wzmacniała rozwój obecnych w glebie mikroorganizmów i ich zdolność do bioremediacji.

Na glebach zanieczyszczonych olejem napędowym stosowany był węgiel aktywowany w formie granulatu, który przyspieszył biodremediację gleby leśnej silnie zanieczyszczonej lotnymi produktami ropy naftowej. Wprowadzenie granulowanego węgla

aktywowanego zmniejszyło ponadto bio- i fitotoksyczość zanieczyszczeń naftowych gleby [23].

Wydro i in. [26] oraz Wołejko i in. [25] donoszą o możliwości wprowadzaniu do gleby substratów organicznych w postaci komunalnych osadów ściekowych o niskiej zawartości metali ciężkich. Badania Wołejko i in. [25] dotyczyły aplikacji osadów ściekowych z komunalnej oczyszczalni ścieków z terenu województwa podlaskiego do gleb w pasach zieleni wzdłuż ciągów komunikacyjnych Białegostoku. Aplikacja komunalnego osadu ściekowego do gleby pozwoliła z jednej strony na uzupełnienie substancji organicznej w glebie, z drugiej zaś dostarczyła cennych substancji odżywczych niezbędnych do prawidłowego rozwoju i wzrostu roślin, które pełnią w mieście m.in. funkcję oczyszczającą. Badania wykazały, że na obiektach nawożonych osadem ściekowym rośliny pobierały z gleby więcej Cd i Zn w porównaniu do kontroli.

Wprowadzanie sorbentów do zanieczyszczonego środowiska połączone jest zazwyczaj z inokulacją mikroorganizmów zdolnych do degradacji określonych zanieczyszczeń, które traktują dane ksenobiotyki jako źródło węgla, przez co remediacja biologiczna staje się efektywniejsza i zachodzi znacznie szybciej. Dodatkowo mogą być wprowadzane biogeny (najczęściej azot i fosfor), które wzmagają rozwój mikroorganizmów [12].

Przy stosowaniu sorbentów do wspomagania bioremediacji należy mieć na uwadze, aby użyte sorbenty mogły być unieszkodliwione nie wywierając przy tym negatywnego wpływu na środowisko, najlepiej aby ulegały rozkładowi mikrobiologicznemu [12].

3.2. WPROWADZANIE BIOPREPARATÓW I ENZYMÓW

Kiedy tempo naturalnego rozkładu zanieczyszczeń nie jest wystarczające, stosuje się wówczas stymulację rodzimej mikroflory w celu przyspieszenia tego procesu. Jedną z metod jest bioaugmentacja, czyli wprowadzanie do gleby specjalnie przygotowanych w specjalistycznych laboratoriach mikrobiologicznych szczepów, które charakteryzują się wysoką odpornością i możliwością adaptacji do środowiska skażonego oraz zdolnością do rozkładu zanieczyszczeń występujących w środowisku, do którego zostają wprowadzone. Ponadto wykorzystywane w bioaugmentacji mikroorganizmy powinny charakteryzować się mobilnością, zdolnością do adhezji, szerokim zakresem tolerancji (odpornością na zmiany pH, stężenia metali), krótką przeżywalnością w środowisku, gdzie brak ksenobiotyków powoduje ich zamieranie, a także stanowić silną konkurencję dla autochtonicznej mikroflory [2, 16]. Jednym z warunków zasilania skażonej gleby w mikroorganizmy jest to, aby biopreparaty wprowadzane do gleby były całkowicie bezpieczne dla człowieka i środowiska oraz posiadały atest Państwowego Zakładu Higieny, który gwarantuje, że wprowadzane szczepy nie są chorobotwórcze [10].

Gestel i in. [5] donoszą, że mikroorganizmy beztlenowe potrafią degradować węglowodory, takie jak benzen, toluen, etylobenzen, ksylen (BTEX) oraz heksadekan i naftalen. Z kolei szczepy rodzaju *Dechloromonas* (β Proteobacteria) całkowicie utleniają benzen w warunkach beztlenowych, wykorzystując azotan jako akceptor elektronów [4]. Rubilar i in. [20] badali zdolność grzybów powodujących białą zgniliznę (*Anthraco-phyl-lum discolour* i *Phanerochaete chrysosporium*) do degradacji pentachlorofenolu, uzyskując najlepsze wyniki dla badanych konsorcjów grzybów unieruchomionych na ziarnach pszenicy jako materiale ligninocelulozowym. Badane grzyby charakteryzowały się szybkim wzrostem i wysoką produkcją enzymów ligninolitycznych (peroksydazy manganowej i peroksydazy ligninowej) oraz efektywną degradacją zanieczyszczeń.

W technologiach bioremedycyjnnych istnieje także możliwość aplikacji szczepów bakteryjnych charakteryzujących się zdolnością do produkcji surfukantów (związków powierzchniowo czynnych). Biosurfukanty wytwarzane przez mikroorganizmy są bardziej stabilne w środowisku glebowym, stymulują procesy enzymatyczne poprawiając tym samym biodostępność zanieczyszczeń (np. WWA czy metali ciężkich). Przykładem mikroorganizmów wytwarzających te substancje są np. *Bacillus megaterium* lub też szczepy *Pseudomonas aeruginosa* UG2, które zdolne są do rozkładu mieszaniny węglowodorów [15].

Zwiększenie efektywności fitoremediacji można uzyskać poprzez wprowadzenie mikroorganizmów, które posiadają naturalną zdolność do rozkładania zanieczyszczeń. Ważne znaczenie ma strefa ryzosferowa roślin, którą zamieszkują mikroorganizmy żyjące w ścisłym związku z roślinami, a dokładniej z ich strefą korzeniową. Endofity, czyli mikroorganizmy, bakterie, grzyby, które żyją w przestrzeniach międzykomórkowych tkanek roślin, nie powodując żadnych chorób, mogą wspomagać fitoremediację zanieczyszczonych gleb np. toluenem, fenolem, trichloroetanołem (TCE) i innymi toksycznymi substancjami. Ponadto, endofity wprowadzane do gleby wspomagają wzrost roślin i podnoszą ich odporność na działanie takich czynników jak susza czy patogeny [10]. Wspomaganie fitoremediacji gleb zanieczyszczonych np. metalami ciężkimi może polegać również na wprowadzeniu drobnoustrojów zamieszkujących strefę ryzosferową, określaną jako bakterie promujące wzrost roślin (z ang. plant-growth-promoting rhizobacteria PGPR). Przykładowo, szczepy *P. putida* i *P. fluorescens* są odporne na zanieczyszczenia Cd i Pb, ponadto wspomagają fitoekstrakcję tych pierwiastków przez rośliny [27].

Stosowanie biopreparatów ma wiele zalet ale także wiele mankamentów. Biopreparaty przed wprowadzeniem wymagają ożywienia aby osiągnąć pełną aktywność degradacyjną. Ponadto, nie jest możliwe sprawdzenie przed zakupem czy mikroorganizmy zawarte w biopreparacie nie są antagonistami mikroorganizmów naturalnie występujących w glebie poddawanej remediacji. Wprowadzenie mikroorganizmów obcych może spowodować zaburzenie równowagi w ekosystemach do tego stopnia, że przywrócenie równowagi biologicznej po remediacji może okazać się

trudne. Najbardziej właściwe wydają się preparaty sporządzone na bazie mikroflory autochtonicznej, jednak w tym przypadku muszą być one indywidualnie dostosowane do każdej zanieczyszczonej gleby. Wymaga to izolacji rodzimych mikroorganizmów oraz ich selekcji w laboratorium, następnie oznacza się przynależność taksonomiczną i eliminuje drobnoustroje patogenne. Do użytku mogą być przeznaczone jedynie preparaty posiadające atest PZH. W konsekwencji przygotowanie takiego preparatu jest kosztowne i czasochłonne [11].

Wzrost ilości toksycznych związków w środowisku powoduje, że mikroorganizmy często nie mają możliwości wykształcić tak wielu szlaków metabolicznych do degradacji zanieczyszczeń. Stąd też wydaje się zasadne wykorzystanie w procesach bioremediacji nie tylko potencjału metabolicznego mikroorganizmów, ale także samych enzymów w formie preparatów. Preparaty mogą zawierać kompleksy enzymatyczne, bądź pojedyncze biokatalizatory zdolne do modyfikacji struktury lub też zmiany toksycznego charakteru zanieczyszczeń na nietoksyczny. Jest to rozwiązanie atrakcyjne z tego względu, że enzymy posiadają prostszą strukturę niż całe organizmy. Ponadto do bioremediacji mogą być wykorzystane enzymy wydzielane na zewnątrz komórki, jak też wewnątrzkomórkowe. Do enzymów bakteryjnych biorących udział w procesach bioremediacji można zaliczyć mono- i dioksygenazy, reduktazy, dehalogenazy czy monooksygenaza cytochromu P-450 [14]. Enzymy mogą również pełnić kluczową rolę przy bioremediacji gleb z pozostałości pestycydów np. liazy, monooksygenazy, dioksygenazy [21].

Przeanalizowano rolę peroksydazy w oczyszczaniu gleby z zanieczyszczeń aromatycznych. Peroksydazy katalizują degradację i transformację policyklicznych aromatycznych węglowodorów (WWA), polichlorowane bifenyle (PCB), chlorowanych węglowodorów, 2,4,6- trinitrotoluenu, związków fenolowych i barwników. Te enzymy są również zdolne do degradacji różnych rodzajów opornych związków aromatycznych [8].

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania grzybowymi enzymami mającymi zdolność do rozkładu lignin oraz enzymami z klasy hydrolaz zdolnych do rozkładu tłuszczu (np. peroksydaza ligninowa, lakkaza, lipaza) [14].

Wykorzystanie enzymów w procesie biodegradacji niesie wiele korzyści. Po pierwsze, biotransformacja przy udziale enzymów nie powoduje nagromadzenia toksycznych produktów ubocznych, a enzymy zostają wykorzystane po zakończeniu procesu przez mikroorganizmy bytujące w zanieczyszczonym środowisku. Po drugie, zwiększenie biodostępności zanieczyszczeń jest znacznie łatwiej osiągalne niż w przypadku użycia całych komórek [1].

Zarówno detoksykacja enzymatyczna jak też przy zastosowaniu biopreparatów, wymaga ścisłego kontrolowania procesu biodegradacji. Ponadto, w dalszym ciągu wymaga rozwoju metod produkcji odpowiednich preparatów enzymatycznych przeznaczonych specjalnie do celów bioremediacji oraz optymalizacji technologii produkcji enzymów pod kątem nakładów finansowych. Dlatego też wydaje się, że najefek-

tywniejszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie technik bioremediacji wiążących potencjał mikroorganizmów wraz z wykorzystaniem enzymów [14].

3.3. WPROWADZANIE ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH

W celu zwiększenia efektywności remediacji biologicznej, stosowane są różne modyfikacje, w tym także wprowadzanie do środowiska różnych związków chemicznych. Przykładem może być dodanie surfuktantów (związków powierzchniowo czynnych), które mają właściwości adsorbowania na powierzchni zanieczyszczeń, a następnie uwalniania ich, czyniąc je dostępnymi dla mikroorganizmów [8]. Surfuktanty mogą być stosowane do usuwania z gruntów substancji organicznych (m.in. WWA) oraz metali ciężkich. Środki zawierające surfuktanty stosowane są głównie do płukania zanieczyszczonych gruntów. Spośród testowanych związków najlepsze wyniki uzyskano dla roztworów płuczających zawierających cyklodekstryny bądź ramnolipidy (należące do grupy glikolipidów) [15].

Zadaniem biostymulacji jest modyfikacja środowiska zanieczyszczonego ksenobiotykami w ten sposób, aby zapewnić ich jak najefektywniejszą immobilizację i degradację zanieczyszczeń. Najczęściej polega ona na dostarczeniu składników odżywczych, makro i mikroelementów i tlenu, w wyniku czego wzrasta aktywność mikroorganizmów z różnych szczepów [9]. Kalantary i in. [9] badali wpływ dostarczenia makroskładników (N, P i K) oraz ośmiu mikroelementów (Mg, S, Fe, Cl, Zn, Mn, Cu i Na) i 4 pierwiastków śladowych (B, Mo, Co i Ni) do zanieczyszczonej gleby. Sporządzono pożywkę zawierającą różne kombinacje 11 soli mineralnych zawierających poszczególne makro- i mikroelementy, którą następnie aplikowano do gleby zanieczyszczonej WWA. Najniższe stężenie fenantrenu w glebie uzyskano przy wysokim poziomie makroskładników odżywczych w zakresie 67–87% i niskim poziomie mikroskładników (12–32%), gdzie azot był dominującym składnikiem. Najskuteczniejsza biodegradacja fenantrenu przebiegała przy sekwencji N>K>P>Cl>Na>Mg.

3.4. ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTECZEK

Przyszłościowym wspomaganiem bioremediacji mogą okazać się nanocząsteczki, czyli cząsteczki o wielkości 1–100 nm., również te występujące naturalnie (np. pył wulkaniczny). Pojawienie się nanotechnologii niesie potencjalne korzyści dla środowiska. Nanocząsteczki są łagodne dla środowiska i/lub stanowią zrównoważony (nienaruszający równowagi ekologicznej) produkt zapobiegający zanieczyszczeniom, ponadto mogą być wykorzystane do rekultywacji materiałów zanieczyszczonych substancjami chemicznymi oraz jako czujniki zmian w środowisku. Potencjał nanocząsteczek może być wykorzystany w rozkładaniu takich związków organicznych jak polichlorowane bifenyle (PCB) i chlorowane węglowodory (PCH) poprzez np.

stymulację aktywności drobnoustrojów. Przykładem zastosowania nanocząsteczek w bioremediacji jest np. stosowanie nanorurek węglowych zdolnych do silniejszej adsorpcji dioksyn w porównaniu do tradycyjnie stosowanego węgla aktywowanego. Ponadto w przypadku rekultywacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi użyto nanocząsteczki hydroksyapatytu. Badania wykazały, że cząsteczki hydroksyapatytu zmniejszyły biodostępność Cu i Zn w glebie. Potencjał do rekultywacji i usuwania trwałych zanieczyszczeń organicznych posiadają nanocząsteczki żelaza [8].

Mimo, że nanocząsteczki mają zastosowanie w różnych dziedzinach życia, istnieje obawa, że nanocząsteczki wykorzystane do remediacji po pewnym czasie mogą uwalniać niebezpieczne związki, mając negatywny wpływ na ludzi i środowisko. Nanocząsteczki mogą być łatwo wchłaniane przez błony komórkowe, przy czym ich degradacja może mieć działanie cytotoksyczne. Przykładowo nanorurki i nanowłókna mogą uszkodzić ściany komórkowe, a tym samym osłabić komórkę. Niektóre cząsteczki mogą też działać bakteriobójczo. Potencjalnie toksyczne działanie nanocząsteczek na środowisko i organizmy jest dotąd nieznanne i zapewne zostanie ujawnione w najbliższych latach. Istnieje potrzeba przeprowadzenia wielu badań, aby zrozumieć los i transport nanocząsteczek w środowisku, poznać ich trwałości i efekt toksykologiczny na różne systemy biologiczne, w tym człowieka [3].

3.5. MODYFIKACJE GENETYCZNE

Udoskonalanie roślin, mikroorganizmów i enzymów mających zdolność degradacji różnych ksenobiotyków jest dokonywane na drodze inżynierii genetycznej i technologii genomu.

Inżynieria genetyczna roślin, poprzez wstawienie lub nadekspresję konkretnych genów w genomie rośliny, zapewnia skuteczną metodę zwiększenia zdolności roślin do fitoremediacji. Większość z badanych genów jest zaangażowanych w metabolizm, wchłanianie, lub transport określonych zanieczyszczeń. Nadekspresją różnych enzymów osiągnięto dla wielu gatunków roślin w celu „stworzenia” rośliny idealnej do oczyszczania środowiska. W szczególności, ekspresja roślinnego wysokiego poziomu cytochromu P450s uważana jest za potencjalną strategię do fitoremediacji ksenobiotyków. Przykładowo, transgeniczny tytoń istotnie zwiększył zdolność metabolizowania trichloroetyleny o około 640 razy w porównaniu do kontroli. Stosowanie transgenicznych roślin do wspomaganie fitoremediacji może być bardzo skuteczne, ale często niemożliwe głównie ze względu na surowe przepisy i względy bezpieczeństwa, podobnie jak w przypadku stosowania modyfikowanych bakterii [10].

Przy zastosowaniu mikroorganizmów w procesie oczyszczania gleb, użycie inżynierii genetycznej, w celu poprawy zdolności drobnoustrojów do degradacji zanieczyszczeń, otwiera wiele ciekawych możliwości uzyskania nowych gatunków, które będą w stanie degradować różne zanieczyszczenia z wysoką wydajnością. Wielu naukowców sugeruje, że zmodyfikowane mikroorganizmy mają większy potencjał

oczyszczania środowiska niż naturalne. Szczególną uwagę przykłada się w inżynierii genetycznej do bakterii wykorzystujących hemoglobinę bakteryjną (VHB) do oczyszczania środowiska z aromatycznych związków organicznych w warunkach niedotlenienia. Ponadto stosowane są nowe techniki rekombinacji DNA w celu otrzymania mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji zanieczyszczeń. Techniki te obejmują m.in. nowe wektory ekspresyjne do przenoszenia heterologicznych genów do organizmu gospodarza czy też nowe mechanizmy kontrolujące ekspresję genów, stosowanie ukierunkowanej i przypadkowej mutagenyzy, w celu zwiększenia aktywności enzymów biodegradujących. Jednak w przypadku modyfikacji genetycznej mikroorganizmów istnieje obawa, że ich wprowadzanie do miejsc zanieczyszczonych w celu zwiększenia bioremediacji może mieć niekorzystne efekty dla środowiska, takie jak transfer genów [8].

4. PODSUMOWANIE

Coraz powszechniejsze staje się przekonanie, że metody bioremediacyjne są skutecznymi, tanimi i ekologicznie przyjaznymi sposobami ochrony środowiska. Często proces samooczyszczania środowiska nie jest jednak wystarczający i konieczne jest zastosowanie dodatkowych zabiegów oraz różnych substratów i preparatów wspomagających proces oczyszczania biologicznego.

Wspomaganie bioremediacji ma na celu przede wszystkim przyspieszenie i zwiększenie wydajności degradacji zanieczyszczeń występujących w środowisku poprzez m.in. stymulację rodzimej flory bakteryjnej w wyniku dostarczenia pożywek dla mikroorganizmów oraz tlenu lub też wprowadzenie aktywnych mikroorganizmów zdolnych do rozkładu zanieczyszczeń występujących na danym terenie.

Dzisiejsza bioremediacja inżynieryjna oferuje wiele rozwiązań pozwalających na efektywne prowadzenie remediacji biologicznej, obejmującej zarówno biostymulację jak również bioaugmentację. Coraz częściej stosowane są w tym celu różne substancje organiczne (np. osady ściekowe), sorbenty, preparaty mikrobiologiczne i enzymatyczne, substancje chemiczne pochodzenia naturalnego czy nanocząsteczki. Ważne, aby stosowane substraty czy preparaty nie wpływały niekorzystnie na środowisko i łatwo ulegały biodegradacji. Negatywną stroną w przypadku użycia takich materiałów czy substancji może okazać się nieznaną siłą skutków ich stosowania dla człowieka i środowiska. Stąd też potrzeba wielu lat badań, aby poznać los, transport i trwałość np. sorbentów czy nanocząsteczek w środowisku oraz efekt toksykologiczny na różne ekosystemy, w tym i człowieka.

Techniką wspomagającą bioremediację, wzbudzającą wiele kontrowersji jest inżynieria genetyczna. Ograniczeniem w zastosowaniu inżynierii genetycznej do remediacji są surowe przepisy i względy bezpieczeństwa, ponieważ niesie ona ryzyko

transferu genów z roślin czy mikroorganizmów transgenicznych do środowiska. W związku z tym badania genetyczne nad mikroorganizmami i roślinami zdolnymi do wydajnej bioremediacji przeprowadzane są jedynie w wyspecjalizowanych laboratoriach eksperymentalnych w systemach zamkniętych np. w specjalnych bioreaktorach, co nie do końca odzwierciedla naturalne warunki.

Stosowanie różnych technologii do wspomagania bioremediacji w dalszym ciągu wymaga przeprowadzeniu wielu badań, na skalę większą niż laboratoryjna, i łączenia wiedzy z różnych dyscyplin naukowych takich jak mikrobiologia, ekologia, biochemia, inżynieria biochemiczna i bioprosesowa. Ponadto potrzebne jest wsparcie rządu i skuteczne przepisy na prowadzenie projektów i badań pilotażowych nad skutecznością różnych technik wspomagania oczyszczania biologicznego.

Praca została sfinansowana ze środków pracy własnej nr MB/WBiIS/14/2014.

LITERATURA

- [1] ALCADE M., FERRER M., PLOU F.J., BALLESTEROS A., *Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*, Trends in Biotechnology, 2006, Vol. 24, 281–287.
- [2] AYOTAMUNO J.M. KOGBARA R.B., AGORO O.S., *Biostimulation supplemented with phytoremediation in the reclamation of a petroleum contaminated soil*, World Journal Microbiological Biotechnology, 2009, Vol. 25, 1567–1572.
- [3] CAMEOTRA S.S., *Environmental Nanotechnology: Nanoparticles for Bioremediation of Toxic Pollutants*, Bioremediation Technology, 2010, 348–374.
- [4] COATES J.D., CHAKRABORTY R., MCINERNEY M.J., *Anaerobic benzene biodegradation – a new era*, Research in Microbiology, 2002, Vol. 153, 621–628.
- [5] GESTEL K.V., MERGAERT J., SWINGS J., COOSEMANS J., RYCKEBOER J. *Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste*. Environmental Pollution, 2003, Vol. 125, 361–68.
- [6] GONCIARZ W., *Bakterie w bioremediacji gleby*. Edukacja biologiczna i środowiskowa, 2013, Vol. 3, 17–22.
- [7] <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Biodegradacja/> [data wejścia: 26.02.2015].
- [8] JUWARKAR A.A., SINGH S.K., MUDHOO A., *A comprehensive overview of elements in bioremediation*, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 2010, Vol. 9, 215–288.
- [9] KALANTARY R.R., MOHSENI-BANDPI A., ESRAFILI A., NASSERI S., ASHMAGH F.R., JORFI S., JA'FARI M., *Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil*, Journal of Environmental Health Science & Engineering, 2014, Vol. 12, 143.
- [10] KANG J.W., *Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation*, Biotechnology Letters, 2014, Vol. 36, 1129–1139.
- [11] KOŁWZAN B., *Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi*, Ochrona Środowiska, 2008, Vol. 30, No. 4, 3–14.
- [12] ŁUKSA A., MENDRYCKA M., STAWARZ M., *Bioremediacja gleb zaolejonych z wykorzystaniem sorbentów*, Nafta – Gaz, 2010, No. 9, 810–818.

- [13] MALEPSZY S. (red.), *Biotechnologia roślin*, PWN, Warszawa 2009, 579–605.
- [14] MARCHUT-MIKOŁAJCZYK O., KWAPISZ E., ANTCZAK T., *Enzymatyczna bioremediacja ksenobiotyków*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 2013, Vol. 16, No. 1, 39–55.
- [15] MILLER U., SÓWKA I., SKRĘTOWICZ M., *Zastosowanie surfaktantów w biotechnologii środowiska*, [w] Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska, pod red. T.M. TRACZEWSKIEJ i B. KAŻMIERCZAKA, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2014, 564–570.
- [16] MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., ŁABUŻEK S., *Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments*, Postępy Microbiologiczne, 2005, Vol. 44, No. 3, 227–238.
- [17] MUKHERJEE K., SAHA R., GHOSH A., GHOSH S.K., MAJI P.K., SAHA B., *Surfactant-assisted bioremediation of hexavalent chromium by use of an aqueous extract of sugarcane bagasse*, Research on Chemical Intermediates, 2014, Vol. 40, 1727–1734.
- [18] PODSIADŁO Ł., KRZYŚKO-ŁUPICKA T., *Techniki bioremediacji substancji ropopochodnych i metody oceny ich efektywności*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 2013, Vol. 16, No. 4, 459–476.
- [19] RAYU S., KARPOZAUS D.G., SINGH B.K., *Emerging technologies in bioremediation: constraints and opportunities*, Biodegradation, 2012, Vol. 23, 917–926.
- [20] RUBILAR O., TORTILLA G., CEA M., ACEVEDO F., BUSTAMANTE M., GIANFREDA L., DIEZ M.C., *Bioremediation of a Chilean Andisol contaminated with pentachlorophenol (PCP) by solid substrate cultures of white-rot fungi*, Biodegradation, 2011, Vol. 22, 31–41.
- [21] SCOTT C., PANDEY G., HARTLEY C.J., JACKSON C.J. CHEESMAN M.J., TAYLOR M.C., PANDEY R., KHURANA J.L., TEESE M., COPPIN C.W., WEIR K.M., JAIN R.K., LAL R., RUSSEL R.J., OAKESHOTT J.G., *The enzymatic basis for pesticide bioremediation*, Indian Journal of Microbiology, 2008, Vol. 48, 65–79.
- [22] SEJA KOVA Z., DERCOVA K., TO THOVA L., *Biodegradation and ecotoxicity of soil contaminated by pentachlorophenol applying bioaugmentation and addition of sorbents*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, Vol. 25, 243–252.
- [23] SEMENYUK N.N., YATSENKO V.S., STRIJAKOVA E.R., FILONOV A.E., PETRIKOV K.V., ZAVGORODNYAYA YU.A., VASILYEVA G.K., *Effect of Activated Charcoal on Bioremediation of Diesel Fuel Contaminated Soil*, Microbiology, 2014, Vol. 83, No. 5, 589–598.
- [24] SINGH A., KUHAD R.C., WARD O.P., *Biological remediation of soil: an overview of global market and available technologies*, Soil Biology. Advances in Applied of Bioremediation, 2009, 1–20.
- [25] WOŁEJKO E., WYDRO U., BUTAREWICZ A., ŁOBODA T., *Effects of sewage sludge on the accumulation of heavy metals in soil and in mixtures of lawn grasses*, Environment Protection Engineering, 2013, Vol. 39, No. 2, 67–76.
- [26] WYDRO U., WOŁEJKO E., BUTAREWICZ A., ŁOBODA T., *Warunki i możliwości wykorzystania komunalnych osadów ściekowych do nawożenia trawników miejskich*, [w] Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska, pod red. T.M. TRACZEWSKIEJ i B. KAŻMIERCZAKA, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2014, T. 4, 1014–1023.
- [27] ZAIDI A., WANI P.A., KHAN M.S., *Bioremediation: A Natural Method for the Management of Polluted Environment*, Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation, 2012, 101–114.

ASSISTANCE BIOREMEDIATION PROCESS OF CONTAMINATED SOILS

The aim of this paper was to present possibilities of using of different substrates to assist in the bioremediation of soils contaminated with organic substances, pesticides and heavy metals. Drew attention to the benefits and limitations of using different substances or preparations for bioremediation and phytoremediation of soils. Have been taken on the use of genetic engineering as a tool to obtain microorganisms and plants capable of efficient degradation of pollutants and pointed to the risks that entails the introduction of transgenic plants and microorganisms into the environment.