

VILNIAUS UNIVERSITETAS

LILIJĄ KALĖDIENĖ

GRUNTO BIOREMEDIACIJOS MIKROBIOLOGINIAI TYRIMAI

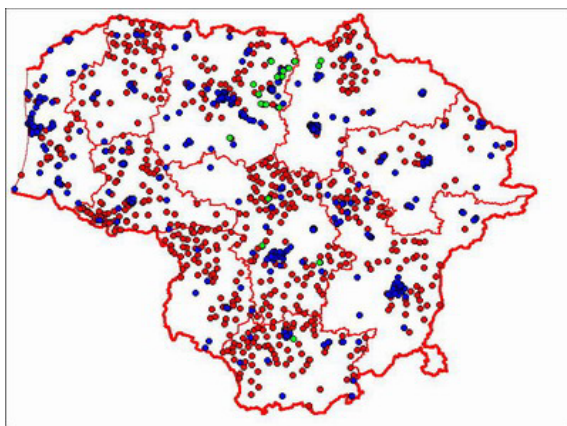
Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslo darbų apžvalga
Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2009

ISBN 978-9955-33-417-0

IVADAS

Mokslo ir technikos pažanga, gamybos plėtra ne tik sukuria didelius pramonės objektus, bet siekia efektyviai sumažinti pramoninių ir buitinių atliekų kiekius. Ekologinė situacija diktuoja naujus reikalavimus, kurie remiasi pigesnėmis ir saugesnėmis technologijomis. Mikrobiologinis teršalų skaidymas, kitaip nei cheminė degradacija, vyksta palyginti švelniomis sąlygomis ir nereikalauja didelių piniginių investicijų, todėl žaliosios biotechnologijos yra pakankamai veiksmingos ir perspektyvios. Atsižvelgiant į tai, kad aplinkos savaiminio apsivalymo galimybės yra labai ribotos ir be kryptingo žmogaus įsikišimo ksenobiotinių junginių nukenksminimas aplinkoje nėra efektyvus ir kelia ekologinį pavojų aplinkai ir žmonių sveikatai, atliekų tvarkymas Lietuvoje priskirtas prioritetinėms aplinkos apsaugos kryptims, ypač pabrėžiant grunto ir vandens apvalymą nuo pavojingų naftos teršalų (1 paveikslas).



1 pav. Geologinės aplinkos taršos židinių tipai: ● pramonės, energetikos, transporto ir paslaugų objektai; ● teršiančių medžiagų kaupimo ir regeneravimo objektai; ● gyvulininkystės objektai (iš LT 2006 veiklos ataskaitos).

Šiandien bioremediacija suprantama kaip aplinką valanti technologija, kuri teršalų valymui naudoja biologinį potencialą. Šiose technologijose naudojami mikroorganizmai, transformuojantys ar pilnai skaldantys aplinkos teršalus. Idėja panaudoti

mikroorganizmus teršalų pašalinimui iš aplinkos nėra nauja. Tačiau, terminas bioremediacija, mokslininkų žodyne yra pakankamai naujas. Bioremediacija remiasi nuostata, kad visi organizmai naudoja aplinkoje esančius substratus savo augimui ir metabolizmui palaikyti. Daugelis bakterijų, pirmuonių ir grybų gali skaldyti daugybę sudėtingų molekulių, o jų skilimo produktus panaudoti savo reikmėms. Bioremediacija ne tik teršalų skaldymas, bet ir jų šalinimas iš aplinkos be ardymo.

Bioremediacinėms technologijoms priskiriamas bioaugmentacijos metodas, kurio pagalba, teršalai šalinami panaudojant gyvus organizmus arba jų fermentines sistemas; biofiltracijos metodas, kuriame per komposto kaupus arba gruntą, praturtintą aktyviais mikroorganizmais, leidžiamos užterštos dujos; bioreaktoriai - užpildyti mikroorganizmais ar jų fermentais; biostimuliacijos metodas, naudojantis mitybinius substratus ir įvairias mineralines medžiagas, kurios stimuliuoja aplinkoje esančius mikroorganizmus. Bioremediacijoje taip pat sėkmingai naudojamas teršalų kompostavimas, kompostą praturtinant mikroorganizmais; grunto papildymas deguonimi; fitoremediacija, naudojanti augalus teršalų valymui iš grunto ir kiti metodai.

Žaliavos, medžiagos, pramonės produktai gali būti vertinami kaip naujos specifinės mikroorganizmų ekonišos. Dirva, vandens telkiniai, buitiniai, pramoniniai nutekamieji vandenys ir pan. yra kompleksinės, dinamiškos sistemos su joms būdingais bruožais: sudėtingos ir santykinai specifinės mikroorganizmų bendrijos, heterogeniška aplinka su tam tikrų elementų pertekliumi, mikroorganizmų bendrijų gebėjimas išlaikyti savo struktūrinį ir funkcinį vientisumą, nepriklausomai nuo periodinių ir neperiodinių aplinkos sąlygų kitimo. Užterštoje aplinkoje mikroorganizmų augimas ant ksenobiotinių junginių dažnai nėra optimalus. Dėl neįprastų substratų pilnai nerealizuojamos biocheminės reakcijos, sutrinka koreliaciniai ryšiai tarp energetinių ir biosintezės reakcijų, slopinamas mikroorganizmų augimas ir dauginimasis, susidaro įvairesnių šalutinių metabolizmo produktų. Biodegradacijos procesuose lemiamą vaidmenį vaidina ne patys žalingiausi organizmai, o rūšys su gerai išvystytais adaptacinėmis savybėmis.

Darbo tikslai ir naujumas. Šiame darbe buvo siekiama: ištirti mikroorganizmų įtaką užteršto grunto bioremediacijai vidutinio klimato sąlygomis, laboratorinėmis ir *ex-situ* sąlygomis įvertinti atskirų mikroorganizmų ir jų grupių įtaką struktūriškai skirtingų medžiagų degradacijai, išanalizuoti abiotinių ir biotinių veiksnių įtaką teršalų šalinimui

iš aplinkos. Tyrimuose buvo siekiama gilesnės analizės apie žemiausios trofinės grandies-mikroorganizmų asociacijų formavimąsi ir funkcionavimą užterštame grunte, jų panaudojimą, kuriant naujas bioremediacijos technologijas. Darbe buvo norima įvertinti biostimuliacijos, bioaugmentacijos, kompostavimo ir kitų metodų efektyvumą grunto teršalų bioremediacijai, tyrimų rezultatus pritaikant grunto valymui *ex-situ* sąlygomis.

Kryptingi ir ilgalaikiai tyrimai padėjo atrinkti naujus aktyvius mikroorganizmų kamienus, skaidančius įvairius, struktūriškai skirtingus junginius, palyginti jų savybes, iširti metabolizmo produktus ir jų įtaką naftos produktų degradacijai, įvertinti mitybinių elementų reikšmę, intensyvinant mikroorganizmų vystimąsi užterštame grunte.

Gauti atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad pagal specifinius kriterijus atrinktų mikroorganizmų panaudojimas, kryptingas jų veiklos reguliavimas, parenkant ir sudarant optimalias sąlygas jų funkcionavimui, įgalina pagreitinti naftos produktų ir kitų ksenobiotinių medžiagų utilizaciją grunte. Du *Penicillium* genties rūšių kamienai (*P. decumbens* Thom 4.5 VNB-AMFK ir *P. frequentans* Westling 6.4 PNB-AMFK (dabartinis *P. glabrum* (Wehmer) Westlig), aktyviai skaldantys naftos angliavandenilius, įregistruoti Lietuvos Respublikos valstybiniame patentų biure (LT Patentas 4791, 2001). Išskirtų aktyvių mikroorganizmų pagrindu sukurtas biopreparatas, sėkmingai naudojamas *ex-situ* VŠĮ „Grunto valymo technologijos“ naftos produktais užteršto grunto bioremediacijai. Nustatytas termofilinėms bakterijoms naujas, iki šiol mokslinėje literatūroje neaprašytas, naftaleno metabolizmo kelias. Gauti duomenys teikia naujas galimybes plačiau panaudoti termofilines bakterijas, utilizuojant naftos produktų atliekas.

1. Gamtinių ir sintetinių polimerų mikrobiologinės degradacijos tyrimai

Teršalai, kurių didžiąją dalį sudaro ksenobiotikai, patekę į aplinką, iš esmės keičia biologinių sistemų funkcionavimo sąlygas: keičiasi terpės sudėtis, pH, aeracija, toksiškai veikiami organizmai. Tai lemia toje ekosistemoje egzistuojančių dalies mikroorganizmų veiklos prislopinimą ar visišką išnykimą, kitų išsivyravimą arba naujų rūšių atsiradimą. Mikroorganizmai, sugebantys įsisavinti ksenobiotinį junginį, įgyja pirmumą vystytis užterštoje aplinkoje.

Polimerinių medžiagų ir mikroorganizmų tarpusavio sąveikos rezultatai yra svarbūs keliais aspektais. Visų pirma, būtina apsaugoti naujus gaminius nuo mikrobiologinių pažeidimų, tačiau, techniniams dirbiniams netekus naudojimo vertės, reikia juos kuo greičiau utilizuoti, kad nebūtų teršiama aplinka. Mikroorganizmai gali pagreitinti jų destrukcijos ir įjungimo į bendrą gamtoje vykstantį medžiagų apykaitos ratą.

Ilgalaikių tyrimų metu ištirtas daugiau nei 500 sudėtinių polimerinių medžiagų atsparumas mikroorganizmų poveikiui (Lugauskas, Kalėdienė, 1996). Daugelis šių medžiagų, patekę į aplinką kaip teršalai, gali tapti naujomis ekologinėmis nišomis skirtingoms mikroorganizmų grupėms. Oligotrofija - viena svarbiausių savybių vertinant mikroorganizmų augimą ant įvairių substratų. Oligotrofai vystimuisi gali išnaudoti minimalius anglies ir energijos šaltinius (Parkinson et al., 1990; Golovchenko et al., 2002). Mikromicetai gali išgyventi labai ilgą laiką nepalankiose sąlygose, gaudami minimalius mitybos medžiagų kiekius (Kalėdienė ir kt., 1989) arba naudodami augimui netinkamus ksenobiotinius substratus (Zhdanova et al., 2004). Išskirtinis oligotrofų privalumas, kad jie augdami, ardydami arba transformuodami sunkiai degraduojamus junginius, laipsniškai sudaro sąlygas kopiotrofų vystimuisi bei tolesnei efektyviai junginių biodegradacijai.

Medžiagos paviršiaus struktūra yra labai svarbi pirmajam kontaktui tarp mikroorganizmo ir medžiagos. Lygūs ir slidūs medžiagų paviršiai mažiau užteršti mikrobais. Daug greičiau mikroorganizmai adhezuoja prie porėtų ar pažeistų paviršių. Kontaktas tarp medžiagų ir mikroorganizmų tuo glaudesnis, kuo lengviau mitybos poreikiams naudojamos sudedamosios medžiagų ar junginių dalys. Jų hidrofobines savybes, o tuo pačiu ir atsparumą mikroorganizmų poveikiui, mažina aplinkos veiksniai, tokie kaip šviesa, temperatūra, ozonas, rūgštūs lietūs ir pan. Yra duomenų, kad kietuosius

paviršius greičiau kolonizuoja bakterijos nei mikromicetai, tačiau prireikia daugiau energijos šalinant pastaruosius nuo substratų paviršių (Beckett et al., 1990).

Mikroorganizmų ląstelių ir kieto medžiagos paviršiaus sąveika, pirmiausia, priklauso nuo adhezijos efektyvumo, kurį lemia ląstelių dydžiai, kontakto laikas, išskiriami adheziniai (baltymai, glikoproteinai, mukopolisacharidai ir kt.), sugeriamo vandens kiekis medžiagoje (Lugauskas, Kalėdienė, Pečiulytė, 1995). Mikrobinė adhezija ant inertinių medžiagų yra sąlygojama nespecifinės sąveikos tarp ląstelių paviršiaus ir substrato. Tiek substrato, tiek ir ląstelių hidrofobiškumas ir elektrostatiniai krūviai yra svarbiausi adhezijos veiksniai, kolonizuojant inertiškus paviršius (Webb et al., 1999; Abu-Lail, Camesano, 2003; Dupres et al., 2004; Rosenberg, 2006). Dėl įvairių fizikinių ir cheminių paviršių struktūrų, gana sudėtinga įvertinti organizmo ar junginio dominavimą adhezijoje. Dar sudėtingiau adhezijos efektyvumą įvertinti *in situ* sąlygomis.

Mūsų tyrimuose nuo įvairių sudėtingų polimerinių medžiagų, kurios kaip pramonės įmonių, žemės ūkio arba komunalinės atliekos dažniausiai kaupiasi aplinkoje, buvo išskirtos skirtingos mikromicetų rūšys. Buvo analizuojamas mikromicetų/substrato adhezijos efektyvumas, paviršių kolonizavimo lygis (Lugauskas, Kalėdienė, Pečiulytė, 1995). Mikromicetų pradų ir substrato sukibimo galia tiesiogiai priklausė nuo paviršiaus aktyvaus vandens (a_w) kiekio, kultūrų amžiaus, morfologinių savybių. Nuo sunkiai degraduojamų medžiagų, tokių kaip polietilenas, tetrafluoretilenas, epoksidinės ir formaldehidinės dervos, polivinilchloridas ir kt., dažniausiai buvo išskiriamos mikromicetų rūšys, atsparios nepalankioms aplinkos sąlygoms, kurių dauguma priklausė *Dematiaceae* šeimai.

Tiriant mikromicetų adhezijos efektyvumą ant kai kurių polimerinių medžiagų, pavyzdžiui, ant polivinilchloridinės plėvelės, buvo įvertintas skirtingų mikromicetų rūšių gebėjimas kolonizuoti polivinilchloridinių (PVC) medžiagų paviršius (1 lentelė).

Greičiausiai ant tiriamųjų paviršių adhezavo pigmentą melaniną turintys *Aspergillus niger* ir *Cladosporium herbarum* rūšių mikromicetai. Šių organizmų prisitvirtinusių konidijų kiekis buvo didžiausias, kitų rūšių sukibusių su paviršiumi konidijų kiekiai buvo mažesni ir atitinkamai sudarė: *Fusarium moniliforme* - 20-25%, *Ulocladium oudemansii* - 30-31%, *Trichoderma viride* - 33% .

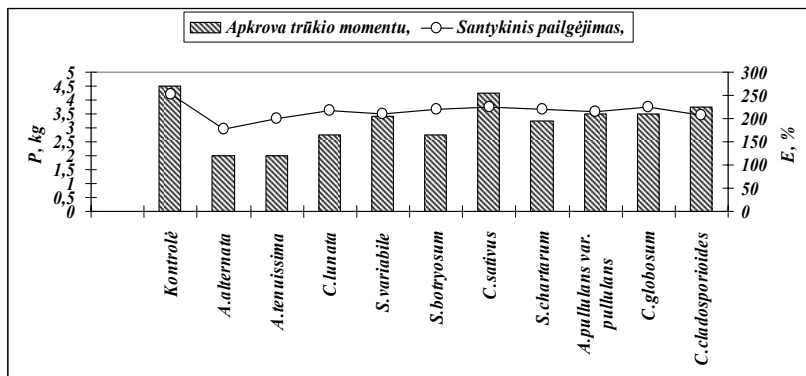
1 lentelė. Mikromicetų konidijų kiekis (%) sukibęs su PVC paviršiais

Mikromicetų rūšis	Konidijų dydis, μm	Sukibusių konidijų kiekis, %	
		plėvelė	Elastinė juosta
<i>Alternaria alternata</i>	20-70 x 9-30	43.6±12.8	55.6±14.2
<i>Aspergillus niger</i>	4-5	80.4±9.2	85.6±13.2
<i>Cladosporium herbarum</i>	3-7	78.5±11.2	81.3±10.2
<i>Fusarium moniliforme</i>	20-70 x 2.0-4.5	20.2±6.2	25.4±8.1
<i>Penicillium verruculosum</i>	2.8-3.5	45.3±8.6	48.3±5.3
<i>Microascus brevicaulis</i>	5.8-5.7	60.7±19.4	74.8±13.6
<i>Trichoderma viride</i>	3.6-4.5	33.2±6.7	30.4±7.1
<i>Ulocladium oudemansii</i>	18-34 x 9-17	39.5±8.9	31.4±7.9

Reikia pastebėti, kad kopiotrofams tarpusavyje konkuruojant dėl mitybinio substrato, adhezijos laikas yra labai svarbus veiksnys. Aplinka, kurioje trūksta substrato, tampa ekstremalia daugeliui mikroorganizmų, pirmiausia kopiotrofams. Galimybė įsisavinti ne visada augimui tinkamas medžiagas siejasi su įvairiais procesais, kurie pradžioje priklauso nuo adhezijos stiprumo. Atsižvelgiant į mikroorganizmų ir kietų paviršių sukibimo galią, ją galima taikyti kaip mikroorganizmų – destruktorių atrankos kriterijų iš vienos pusės, ir kaip medžiagų atsparumo mikroorganizmams rodiklį, iš kitos pusės. Rezultatai parodė, kad, priklausomai nuo rūšies, skyrėsi ir konidijų adhezijos laikas. Vienų rūšių, pavyzdžiui, *P.verruculosum*, konidijų adhezijos laikas ant tirtų polimerinių substratų buvo trumpas, iki 10 min, kitų – *A. alternata* net iki 80 min.

Mikroorganizmų poveikis medžiagoms priklauso nuo jų sisteminės priklausomybės, pradų skaičiaus, gebėjimo sintetinti įvairius fermentus, skirti į aplinką organines rūgštis ir kitus metabolitus. Žinoma beveik 400 mikroorganizmų fermentų, dalyvaujančių įvairių medžiagų katabolizmo procesuose. (Barclay et al., 1998; Tünde, Tien, 2000; Ellis et al., 2001). Jų įtakoje keičiasi medžiagų fizikinės-cheminės savybės. Koreliaciniais ryšiais apibrėžtas mikroorganizmų gebėjimas vystytis ant įvairių medžiagų ir pastarųjų destrukcijos.

Tarp daugiau nei 50 ištirtų mikromicetų rūšių, oligotrofinės *Dematiaceae* šeimos rūšys daugiausia įtakojo tirtų polimerinių medžiagų fizikinius - mechaninius pokyčius (2 paveikslas).



2 pav. Mikromicetų įtaka poliuretano fizikinių-mechaninių savybių pokyčiams

Koreliacija tarp mikromicetų augimo ant poliuretano ir jo destrukcijos tyrimų metu siekė 0.93. Mikromicetais užkrėtų medžiagų IR spektrai, jau po 30 parų patvirtino biogeninę medžiagų destrukcijos kilmę (Lugauskas, Kalėdienė, Pečiulytė, 1995).

Sudėtingų medžiagų atsparumą mikroorganizmams mažino aplinkos veiksniai ir įvairūs struktūriniai priedai: pigmentai, plastifikatoriai, minkštikliai, stabilizatoriai, dažai, gamtinių junginių priedai (Lugauskas, Kalėdienė, 1996). Homogeniniai didelės molekulinės masės junginiai, kitaip nei mažos molekulinės masės, buvo atsparesni mikroorganizmų poveikiui.

Planuojant bioremediacijos strategijas įvairūs mikroorganizmai, ypačiai melanino turinčių mikroorganizmų grupė, dėl savo išskirtinio atsparumo nepalankiems aplinkos veiksniams, gali būti sėkmingai naudojama ksenobiotikų utilizacijai iš grunto.

Odos apdirbimo ir gamybos pramonė – stipriai aplinką teršianti pramonės šaka. Kartu su įprastais teršalais į aplinką patenka tam tikrų cheminių medžiagų (pesticidų, paviršiaus aktyvių medžiagų, organinių tirpiklių ir kt.). Chrominės drožlės ir chrominės odos atraižos šiuo metu neturi plataus pritaikymo ir dažniausiai yra išvežamos į sąvartyną.

Tiriant odos apdirbimo pramonės atliekas, Šiaulių „Elnio“ (dabartinis “TDL ODA”) ir Kėdainių „Guoto“ (“Natūrali oda”) fabrikuose, buvo išskirta apie 300 mikroorganizmų kultūrų, kurių daugumą (apie 200) sudarė mikromicetai (Kalėdienė, 1996). Daugumą mikromicetų, išskirtų iš atliekų, sudarė *Penicillium* genties atstovai (iki 35%), 34% sudarė *Dematiaceae* rūšys, 31% kitos gentys. Nors *Penicillium* gentis labai gausi gamtoje, ji neatspindi substrato specifiškumo. Iš 190 tirtų mikromicetų, dauguma pasižymėjo

proteolitinio aktyvumu, tačiau vos 10% nustatytas lipazinis aktyvumas. Didesnė dalis bakterijų buvo lipolitiškai aktyvios.

23 mikromicetų kultūros buvo išskirtos iš šarminių atliekų (pH 11-13), kuriose buvo $\text{Na}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$. Laboratorinėmis sąlygomis mikromicetų augimas terpėse su 0.5 - 1.1% Cr prilygo kontrolei arba buvo didesnis. Terpėse su 3% ir 5% Cr mikromicetų augimas atitinkamai siekė 50-80% ir 13-44%. Atspariausios Cr buvo *T.harzianum*, *P. sclerotiorum*, *P. simplicissimum* ir *P. decumbens* rūšys. Naudojant sausą *P. decumbens* rūšies mikromicetų biomasę, kaip sorbentą metalų surišimui iš terpės, *P. decumbens* akumuliuo nuo 12.5% iki 37.5% Cr absoliučiai sausos biomasės vienetai (palyginus su 5.5% - 15.4% drėgnoje biomasėje).

Tiriant riebalinių atliekų degradaciją lauko sąlygomis, atliekos buvo kompostuojamos su aukštapelkių durpėmis, lengvu durpių ir dirvožemio substratu, šiaudais (viso 10 skirtingų kompostų). Mikroorganizmų įvairovė keitėsi bręstant kompostams. Kompostuose su šiaudais ir lengvu durpių substratu vyravo mikromicetai, riebalinių atliekų ir sunkaus grunto kompostuose didėjo bakterijų skaičius ir intensyviai vyko puvinimo procesai. Tyrimų metu buvo sudaryti keli mikroorganizmų kompleksai, kurie buvo pritaikyti utilizuojant Panevėžio mėsos perdirbimo įmonėje sukauptas organines atliekas (Lugauskas ir kt., 1993).

2. Naftos angliavandenilių mikrobiologinės utilizacijos laboratoriniai tyrimai

Nafta yra kompleksiausias angliavandenilių šaltinis. Tai yra sudėtingas alifatinių, aliciklinių, aromatinių angliavandenilių ir dervų kompleksas. Esant mišriam substratui, sunkiau įvertinti junginių atsparumą biodegradacijai. Naftos produktų cheminė sudėtis ir aplinkos sąlygos įtakoja biodegradacijos intensyvumą. Biodegradacija gali vykti 0-70°C temperatūrose. Vanduo yra būtinas biodegradacijai, bet minimaliam procesui jo užtenka 0.1% (Roffey, 1989; Löser et al., 1999). Angliavandenilių biodegradacijos greitį riboja žemesnė temperatūra. Vidutinio klimato sąlygomis natūrali naftos produktų degradacija vyksta lėtai. Didesnėse temperatūrose stebimas konkrečių angliavandenilių toksiško poveikio bakterijoms didėjimas, kuris gali selektyviai inhibuoti mišrias mikroorganizmų kultūras. Tai lemia populiacijos dydžio ir rūšinės sudėties pokyčius.

Skirtingas angliavandenių biodegradabilumas lemia tai, kad skaldymo metu įvairūs komponentai bus skaldomi skirtingu greičiu. Vienu atveju, angliavandenių mišinyje gali būti skaldomi lengviausiai degraduojami komponentai, kitu atveju, substratas gali būti skaldomas tik kometabolinės oksidacijos būdu. Netolygus kelių mikroorganizmų vystimasis terpėje, be kita ko, aiškinamas jų buvimu viename mitybos lygmenyje (Koronelli, Nesterova 1990).

Sugebėjimas naudoti naftos angliavandenilius kaip energijos ir anglies šaltinius būdingas ne kokioms nors siaurai specializuotoms formoms, o daugelio mikroorganizmų grupių atstovams (Korda et al., 1997). Į angliavandenilius oksiduojančius mikroorganizmus verta žiūrėti kaip į svarbią, anglies apykaitos cikle dalyvaujančių, organizmų grupę. Yra žinoma virš 70 mikroorganizmų genčių, kurių atstovai skaldo angliavandenilius (Prince, 2005). Joks angliavandenilius skaldančių mikroorganizmų rūšių sąrašas negali būti pilnas ir galutinis, kadangi dėl naujų metabolizmo kelių formavimosi ir fermentinio specifškumo pokyčių išsivysto nauji biodegradacinių požiūriu vertingi mikroorganizmų kamieniai. Mikroorganizmų sporos, ramybės struktūros, didesnė katabolizmo kelių įvairovė lemia didesnę atsparumą nepalankioms aplinkos sąlygoms, geresnes adaptacines savybes.

Tarp tirtų mikromicetų buvo identifikuota nemažai degraduojančių naftos produktus rūšių. Naftos produktais užterštame degalinių grunte vyravo *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliomastix*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor* genčių rūšys (Lugauskas ir kt., 1997; Kalėdienė, 1999; Kalėdienė, 2003)

Bioaugmentacijos įtaka grunto bioremediacijai

Sprendžiant aplinkos taršos nafta ir naftos produktais ir grunto bioremediacijos problemas, vienas svarbiausių klausimų yra mikroorganizmų gebėjimas įsisavinti naftos angliavandenilius kaip vienintelį mitybos ir energijos šaltinį. Laboratorinėmis sąlygomis tirtas 33 mikromicetų rūšių, dominavusių užterštame naftos bazių grunte, gebėjimas augti ant naftos angliavandenių kaip vienintelio anglies ir energijos šaltinio (2 lentelė).

Lietuvos didžiųjų miestų naftos bazių teritorijų grunte tarp išskirtų ir identifikuotų mikromicetų rūšių vyravo *Penicillium* genties rūšys: *P. decumbens*, *P. expansum* *P. verrucosum*, *P. lanosum*, *P. glabrum* (= *P. frequentans*), *P. citrinum*, *P. paxilli* ir kt. (≈

24% visų išskirtų rūšių). Naftos bazių ir šalia esančių teritorijų grunto pavyzdžiuose buvo aptikta daug tamsiai pigmentuotų *Dematiaceae* šeimos mikromicetų rūšių, kurios, kaip žinoma, dominuoja nepalankiose aplinkos sąlygose (Kalėdienė, 1996; 1999)

Mažos molekulinės masės alkanai dažniausiai nėra mikroorganizmų panaudojami augimui, kadangi sugeba ištirpti ląstelių membranose arba su membrana asocijuotų baltymų struktūrose, ypač tų membranų, kurios susiję su šių substratų transportu ir oksidacija (Einsele, 1983). Todėl alkanai dažniausiai toksiškai veikia mikroorganizmų ląsteles. Iš aplinkos tokie n-alkanai greitai išgaruoja, todėl šalinimas iš grunto, iš dalies, netenka didesnės prasmės.

2 lentelė. Mikromicetų biomasės kiekis (mg/ml) skystoje Čapeko terpėje be sacharozės su 0,5% naftos angliavandenilių, kaip vieninteliais anglies šaltiniais.

	Rūšys				
Čapeko terpė su angliavandeniliu	<i>Penicillium glabrum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium canescens</i>	<i>Gliomastix murorum</i> var. <i>murorum</i> *	<i>Trichoderma harzianum</i>
heptanas C ₇ H ₁₆	1,17±0,62	29,50±2,94	8,50±1,78	2,67±0,85	3,00±0,41
tetradekanas C ₁₄ H ₃₀	12,50±1,47	39,00±5,49	15,83±1,93	6,83±0,24	0,85±0,20
heksadekanas C ₁₆ H ₃₄	100,17±10,74	25,33±2,25	13,67±2,25	2,50±0,50	0,65±0,14
dokošanas C ₂₂ H ₄₆	108,00±12,50	65,00±6,68	114,17±17,56	12,38±1,34	10,50±0,43
dokošanas ir tetradekanas C ₂₂ H ₄₆ +C ₁₄ H ₃₀	51,67±4,99	111,17±7,00	72,63±5,99	0,50±0,05	11,00±0,82
toluenas CH ₃ C ₆ H ₅	1,33±0,47	15,00±2,86	10,67±0,47	2,50±0,50	1,50±0,41
ksilenas (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄	5,67±0,62	7,50±0,71	5,17±0,62	0,67±0,24	0,30±0,14
benzenas C ₆ H ₆	7,17±0,82	0,55±0,07	2,50±0,41	7,33±0,62	4,00±0,82
difenilmetanas (C ₆ H ₄) ₂ CH ₂	14,17±0,85	10,75±0,75	12,17±1,25	6,50±1,22	1,17±0,62
dizelinis kuras	4,80±0,92	2,50±0,82	5,25±0,25	2,50±0,50	0,83±0,47
I Kontrolė Čapeko terpė be sacharozės	14,70±1,70	14,83±1,55	10,67±0,85	12,33±0,94	4,33±0,85
II Kontrolė Čapeko terpė su sacharoze	210,00±10,35	195,67±16,56	129,83±11,03	136,33±10,22	196,17±9,46

Gliomastix murorum var. *murorum** (= *Acremonium murorum*)

Heptanas, toluenas, ksilenas slopino beveik visų tirtų mikromicetų augimą, išskyrus *P. citrinum*, kurio biomasės kiekis, lyginant su kiekiu ant Čapeko terpės be sacharozės, buvo didesnis daugiau kaip 2 kartus. Terpėse su tetradekanu, heksadekanu, dokošanu, dokozano ir tetradekano mišiniu *Penicillium* genties mikromicetų biomasės kiekiai, lyginant su kontrole, didėjo nuo 0,8 iki 10 kartų.

Mažiausiu toksiškumu pasižymi tiek n-alkanai, tiek aromatiniai junginiai, turintys nuo C₁₀ iki C₂₂ anglies atomų grandinėje (Morgan, Watkinson, 1989). Jie greičiausiai sunaudojami mikroorganizmų. Silpnas toksiškumas būdingas angliavandeniliams, kurių grandinėje yra daugiau nei C₂₂ anglies atomų. Tokį toksiškumą gali sąlygoti ribotas angliavandenilių tirpumas vandenyje ar kietas būvis, netinkamas aktyviai biotransformacijai. Cikliniai alkanai, kurių naftoje yra apie 30% - 60%, yra labai atsparūs mikroorganizmų poveikiui. Kai kurių autorių nuomone (Laborda et al., 1997), cikloalkanų biodegradacijoje turi dalyvauti dvi ar daugiau mikroorganizmų rūšys (sinergetinė kooperacija).

Mikroorganizmai, utilizuojantys naftos angliavandenilius, gamtoje aptinkami beveik visuose dirvožemių tipuose. Tačiau naftos angliavandenilius skaidančių mikroorganizmų buvimas dirvoje dar negarantuoja naftos teršalų degradacijos. Todėl labai svarbu atrinkti tuos naftą oksiduojančius mikroorganizmų kamienus, kurie gebėtų naudoti naftos angliavandenilius kaip mitybos medžiagas (Lugauskas ir kt., 1993; Kalėdienė, 2003).

Tiriant atrinktų mikromicetų rūšių įtaką mazuto degradacijai grunte, kaip ir reikėjo tikėtis, aktyviausiai buvo skaldomos lengvosios mazuto frakcijos (3 lentelė).

3 lentelė. Mazuto frakcijų degradacija grunte su įterptu mikromicetų *Penicillium canescens*, *P. glabrum* ir *P. citrinum* kompleksu

Frakcijos	Svoris grunte, g/g			Degradacijos lygis, %
	neinokuliuotas gruntas	inokuliuotas gruntas	skirtumas	
Bendras svoris	0,0986	0,0989		
Parafinai	0,0095	0,0083	-0,0012	12,63
Aromatiniai junginiai	0,0589	0,0531	-0,0058	9,85
Dervos	0,0303	0,0375	+0,0072	

Tačiau, kaip parodė tyrimai, bendras dervų kiekis linkęs didėti ir gali sudaryti virš 50% pradinio frakcijų kiekio (Kalėdienė, 2003). Greičiausiai, dervų kaupimosi priežastys susiję su polimerizacijos reakcijomis, kurių metu oksiduotos sunkiosios frakcijos gali jungtis su humuso ir kitomis dirvožemio dalelėmis. Sunkiųjų frakcijų kaupimasis dirvožemyje patvirtintas ir kai kurių autorių darbuose (Bossert, Bartha, 1984, Kästner, 2000).

Dirvožemio ėminiuose bendras mazuto degradacijos lygis varijavo priklausomai nuo inokuliuoto rūšies ir siekė 6-24% (4 lentelė) (Kalėdienė, Giedraitytė, 2000; 2003).

4 lentelė. Mazuto degradacija dirvožemyje su skirtingomis mikromicetų rūšimis

Rūšis	Mazuto kiekis grunte, g/kg	Degraduoto mazuto kiekis g/kg	Degradacijos lygis, %
Kontrolė	40,49		
<i>Penicillium canescens</i>	35,84	4,65	11.49
<i>P. glabrum</i>	34,36	6,13	15.14
<i>P. citrinum</i>	37,91	2,58	6.37
<i>Trichoderma harzianum</i>	35,01	5,48	13.54
<i>P.glabrum</i> + <i>P.canescens</i> + <i>P.citrinum</i>	30,91	9,58	23.66

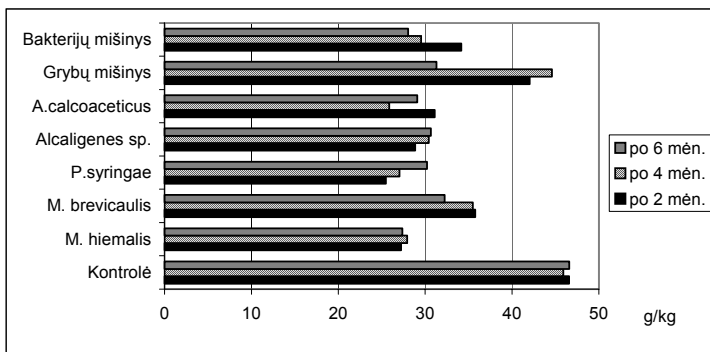
Tyrimų duomenys parodė, kad švarių dirvožemių heterogeninėje mikrobiotoje yra natūraliai susiformavusios angliavandenilių destruktorių populiacijos. Naftai patekus į dirvą selektyviai pagausėja mikroorganizmų grupės bendrija, geriau prisitaikanti ir utilizuojanti naują substratą. Terpėse su įvairiais angliavandeniliais žymiai geriau augo mikromicetai, išskirti iš nafta ir naftos produktais užterštos aplinkos, nei vietinės, neužterštos aplinkos rūšys, *T.harzianum* ir *G. murorum var. murorum*. Tiriant atskirus mikroorganizmų kamienus, naudojančius naftos angliavandenilius, reikia atsižvelgti į faktą, kad šių kultūrų išskyrimas iš dirvos siejasi su degradacinio potencialo mažėjimu, ilgesniu vystimosi periodu. Dažnai mikroorganizmų degradacinės savybės priklauso nuo jų augimo mišrioje kultūroje.

Heterogeniškoje, substrato ir mikroorganizmų prasme, aplinkoje sunku įvertinti kiekvieno mikroorganizmo įtaką atskirų junginių degradacijai. Neretai, procesų metu netinkamo mikroorganizmų augimui substrato struktūra oksiduojama iki paprastesnių,

lengviau įsisavinamų formų, panaudojant mikroorganizmų įprastus junginius – kosubstratus.

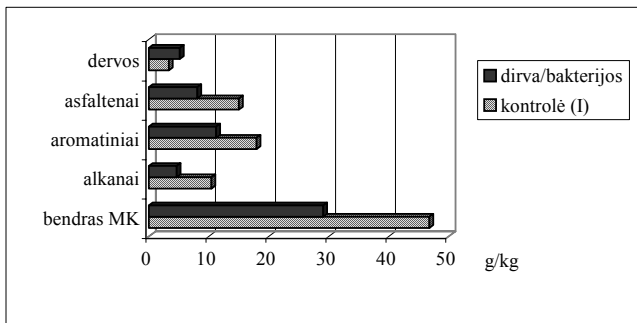
Nežiūrint didelio mikroorganizmų potencialo palankiomis sąlygomis ardyti įvairius organinius junginius, nei viena atskirai paimta rūšis negali skaldyti visų naftoje esančių komponentų. Dabar žinomi mikroorganizmai galintys ardyti vieną, arba, geriausiu atveju, kelis naftos ar jos produktų komponentus. Todėl efektyviai grunto bioremediacijai reikalingas kompleksas skirtingų mikroorganizmų, kurių kiekvienas metabolizuotų vieną arba kitą junginį. Šiuo metu geriau ištirtos bakterijos, pirmiausia, dėl jų greitesnio augimo, didesnio skaičiaus joms taikomų molekulinį tyrimo metodų, gebėjimo ardyti chloro junginius. Tačiau daugelis junginių lengvai metabolizuojami *in vitro*, dažnai sunkiai skaldomi užterštoje aplinkoje. Heterogeniška aplinka keičia mikroorganizmų augimo ir mitybos charakteristikas.

Laboratorinių tyrimų metu buvo ištirta virš 150 mazutu užteršto grunto ėminių, paimtų įvairiu metu laiku iš grunto valymo aikštelės Kiškėnuose (Klaipėdos raj.), kuriuose buvo tirta mikroorganizmų įtaka mazuto degradacijai, įvertinant aktyviausius štamus. Tyrimai parodė, kad bendras teršalų kiekis pastebimai mažėjo per pirmuosius 2-4 mėnesius (3 paveikslas). Po 6 mėnesių mazuto kiekiai mažai skyrėsi nuo rezultatų gautų po 4 tyrimo mėnesių (Kalėdienė et al., 2005). Rezultatai parodė, kad mikroorganizmų kultūras įterpus į naftos produktais užterštą gruntą, vidutinio klimato sąlygomis jų aktyvumas išlieka apie tris mėnesius. Todėl teršalų šalinimas naudojant bioaugmentaciją yra prasmingas vėlyvo pavasario-vasaros mėnesiais.



3 pav. Mazuto kiekio (g/kg) mažėjimas grunte per 6 mėnesius, grunte su įterptomis grynomis mikroorganizmų kultūromis arba jų kompleksais.

Dideli mazuto kiekiai lėtina biodegradacijos procesus. Lietuvoje didžiausios leistinos naftos produktų teršalų koncentracijos įvairių tipų grunte neviršija 50mg/kg sauso grunto (Lietuvos higienos norma, 2004). Gruntą valančiose įmonėse sukauptame grunte naftos produktų kiekiai šimtus ir tūkstančius kartų viršija leistinas normas. Todėl, tokio grunto bioremediacija ir grąžinimas į švarią aplinką reikalauja ypatingai efektyvių metodų. Remiantis mūsų tyrimų duomenimis, mazutu užterštuose grunto pavyzdžiuose, naudojant atrinktų mikroorganizmų kultūras, galima tikėtis, kad iki 45% - 60% alkanų, 37% - 80% aromatinių junginių ir 46%- 50% asfaltenuų frakcijų būtų galima pašalinti iš grunto per pirmuosius sanacijos mėnesius (4, 5 paveikslai).



4 pav. Įterpto bakterijų komplekso įtaka atskirų mazuto frakcijų kaitai stipriai mazutu užterštame grunte, po 6 tyrimo mėnesių. Bendras mazuto kiekis (MK) kontroliniuose bandiniuose (I) - 46.44 g/kg grunto.



5 pav. Įterpto bakterijų komplekso įtaka atskirų mazuto frakcijų kaitai stipriai mazutu užterštame grunte, po 6 tyrimo mėnesių. Bendras mazuto kiekis (MK) kontroliniuose bandiniuose (II) – 25,18 g/kg grunto.

Grunto pavyzdžiuose, surinktuose iš Kiškėnų valymo aikštelės (Klaipėdos raj.), mazuto kiekis svyravo nuo 25 g/kg iki 47g/kg. Jie buvo papildyti bakterijų ir mikromicetų kompleksais. Tyrimai parodė, kad mažiau užterštame grunte (iki 25 g/kg) su įterptais mikroorganizmais biodegradacijos procesas vyko beveik 1.6 karto aktyviau nei daugiau (47 g/kg) užterštame grunte. Tačiau bendras dervų kiekis daugelyje grunto ėminių didėdavo ir sudarydavo apie 50% pradinio frakcijos kiekio (Kalėdienė et al., 2005). Atrodo, kad dervų kaupimosi priežastys gali būti susiję su polimerizacijos reakcijomis, kurių metu oksiduotos sunkiosios frakcijos gali jungtis su dirvožemio humuso dalelėmis. Sunkiųjų frakcijų kaupimasis aplinkoje patvirtintas ir kai kurių autorių, kurių nuomone jų didėjimas susijęs su kondensacijos reakcijomis, kurių metu įvairios angliavandenilių frakcijos transformuojamos į asfaltenus (Bossert, Bartha, 1984, Andersen, Birdi, 1991; Kästner et al., 1999).

Sunku vienareikšmiškai vertinti introdukuotų grynų ir mišrių mikroorganizmų kultūrų įtaką naftos angliavandenilių biodegradacijai. *Ex-situ* sąlygomis, kompostuojant užterštą gruntą, efektyvesnės laboratorijose iširtos ir pagausintos grynos mikroorganizmų kultūros (Philp et al., 1995; Robinson et al., 1998; Sharma et al., 1997; Kalėdienė, 2003; Kalėdienė, Giedraitytė, 2000; 2003), *in-situ* – mikroorganizmų kompleksai (Cunningham, Philp., 2000; Semprini et al., 2007).

Iš naftos produktais užteršto grunto mes išskyrėme *Acinetobacter* ir *Pseudomonas* genčių bakterijų kultūras, kurios buvo pagausintos ir pakartotinai introdukuotos į mazuto užterštą gruntą. Šios abi kultūros taip pat pasirodė perspektyvios mazuto utilizacijai grunte (Kalėdienė, 2003; Kalėdienė, Giedraitytė, 2003).

Kai kurių autorių nuomone, jeigu aplinkoje nėra augimui tinkamo substrato, o temperatūra žemesnė už optimalią, sumažėja genčių, tokių kaip *Pseudomonas*, *Acinetobacter* bakterijų skaičius, bet lieka nepakitęs *Rhodococcus* ir *Arthrobacter* genčių bakterijų skaičius (Koronelli, 1996). Tačiau, tarp introdukuojamų mikroorganizmų rūšių, dažniausiai minimi *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* bakterijų genčių atstovai ir mikromicetai, priklausantys *Trichoderma*, *Cunninghamella*, *Candida*, *Penicillium* gentims (Atlas, Bartha, 1998; Richard, Vogel, 1999; Gallego et al., 2001; D'Annibale et al., 2006). Nemaža dalis publikacijų nurodo, kad šie mikroorganizmai yra aktyvūs tik šilto klimato sąlygomis ir naudodami lengvesnes naftos angliavandenilių frakcijas.

Mūsų išskirti kamienai efektyviai degradavo mazutą ir vidutinio klimato sąlygomis. Mazutu užterštame grunte mikroorganizmų įvairovė, aktyvumas, adaptacinės savybės ir bioremediacijos eiga įtakojami žymiai griežtesnių aplinkos sąlygų. Taigi, šiame kontekste, mūsų išskirti mikroorganizmai gali būti labai sėkmingiau naudojami mazutu užteršto grunto bioremediacijai vidutinio klimato sąlygomis.

Biostimuliacijos įtaka grunto bioremediacijai

Mikroorganizmų vystimasis nafta ir jos produktais užterštoje aplinkoje yra ribojamas eilės veiksnių: teršalo struktūros, teršalo koncentracijos, temperatūros, biogeninių elementų stygiaus (pirmiausia, azoto ir fosforo), sumažėjusio deguonies kiekio, padidėjusio dirvos rūgštingumo. Vandens aplinkai svarbesni pirmieji du veiksniai, dirvožemiui – visi paminėti. Egzistuoja daugybė rekomendacijų, kaip pagerinti naftos angliavandeniliais užteršto grunto bioremediaciją. Viena veiksmingesnių siūlomų bioremediacijos priemonių – vietinių, autochtoninių mikroorganizmų biostimuliacija, kurios metu gerinamos mitybos sąlygos, aktyvuojama jų veikla (Deviny, Chang, 2000; Seklemova et al., 2001; Atagana, 2006).

Mūsų tyrimuose įvairios trąšos (šlapalas, amofosas, K ir Na nitratai, fosfatai) stimuliuo mikromicetų degradacinį aktyvumą, tačiau trąšos nerodė didesnio poveikio lygiagrečiai tiriamiems bakterijų kompleksams. Naudojant kombinuotas trąšas, kuriose N, P, K santykis buvo 12:12:18, mikromicetų kompleksas, sudarytas iš *Penicillium* ir *Trichoderma* genties mikromicetų, naftos kiekį dirvožemyje sumažino daugiau kaip 60%. Mažiausią įtaką mikromicetų aktyvumui turėjo K_2HPO_4 (5 lentelė).

5 lentelė. Naftos degradacija grunte su mikromicetų *P. decumbens*, *P. glabrum*, *P. citrinum* ir *T. harzianum* kompleksu ir įvairiomis trąšomis (2,5g/kg dirvos).

Trąšos	Naftos kiekis prieš stimuliaciją g/kg	Naftos kiekis po stimuliacijos, g/kg	Utilizuotas naftos kiekis, g/kg, (%)
$NaNO_3$	39,57	21,32	18,25 (46,1)
KNO_3	39,57	24,76	14,81 (37,4)
Multi-1	39,57	14,20	25,37 (64,1)
NH_2CONH_2	39,57	22,88	16,69 (42,2)
K_2HPO_4	39,57	27,88	11,69 (29,5)
$(NH_4)_2HPO_4$	39,57	24,33	15,24 (61,5)

Tirdami biostimuliacijos efektyvumą grunto bioremediacijai, mes negavome vienareikšmio atsakymo apie stimuliuojančią mineralinių trąšų įtaką mikroorganizmų biodegradacinėms savybėms (Kalėdienė, Giedraitytė, 2000; Kalėdienė, 2003; Kalėdienė ir kt., 2005). Vienų autorių nuomone, papildomi N ir P kiekiai gali labai efektyviai padidinti naftos angliavandenilių skaidymo intensyvumą (Gallego et al., 2001) ir yra įprasta praktika, didinanti angliavandenilių biodegradaciją (Atlas, Bartha, 1998), kitų - azoto ir fosforo papildai neturi jokios įtakos teršalų skaidymo intensyvumui (Seklemova et al., 2001). Apie sėkmingą biostimuliacijos efektą dažniausiai rašoma, tiriant bioremediacijos procesus šilto klimato sąlygomis (Mishra et al., 2001).

Mitybos medžiagų deficitas priverčia įvairias mikroorganizmų rūšis naudoti tuos pačius substratus, bet transformuoti juos į skirtingus junginius. Heterogeniškoje, mikroorganizmų ir cheminių junginių prasme, aplinkoje, mineraliniai papildai gali ir neįtakoti aktyvesnės teršalų biodegradacijos. Taigi, biostimuliacija priklauso nuo vietinės mikroorganizmų populiacijos ir aplinkoje esančių organinių medžiagų. Keičiant aplinkos sąlygas, keičiasi ir vietinių mikroorganizmų vystimasis. Svarbu, įvertinti indėlį atskirų mikroorganizmų ir jų asociacijų visumoje. Žinios apie maisto medžiagų įsisavinimą būtinos planuojant efektyvią bioremediacijos strategiją. Reikia pažymėti, kad finansinės sąnaudos naudojant minėtą strategiją yra pakankamai didelės.

Bioaugmentaciją lyginant su biostimuliacija pastaroji turi keletą privalumų. Koncentruota atrinktų mikroorganizmų populiacija, įterpta į gruntą, gali nedelsiant pradėti skaidyti teršalus. Stimuliuojant, reikalingas papildomas laikas maisto medžiagoms pasklisti tarp mikroorganizmų. Metodo kaštai yra ženkliai mažesni, nei taikant tiksliai biostimuliaciją. Stimuliuojančios medžiagos nėra specifinės, todėl medžiagų paskirstyme ir įsisavinime dalyvauja visi mikrobai, mažindami norimą selektyvų poveikį. Taigi, geriausių rezultatų galima tikėtis bendrai naudojant bioaugmentaciją ir biostimuliaciją.

Biopreparatų įtaka užteršto grunto bioremediacijai (*ex-situ* tyrimai)

Norint suprasti angliavandenilius oksiduojančias biocenozes, svarbu žinoti jų sudarančių mikroorganizmų ekologines charakteristikas. Angliavandeniliai, būdami redukuoti ir

vandeninėje terpėje mažai tirpūs junginiai, keičia juos naudojančių mikroorganizmų ekologines charakteristikas (Koronelli, Nesterova, 1990).

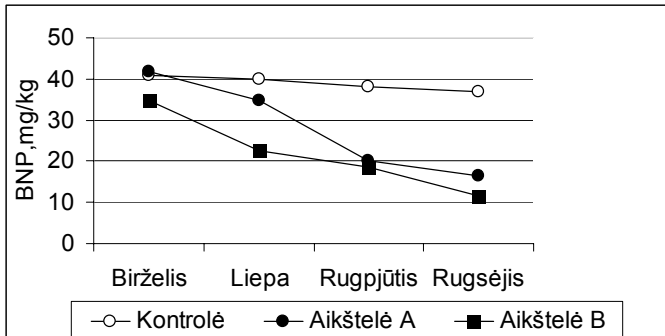
Mikroorganizmų kiekis ir rūšinė įvairovė grunte priklauso nuo naftos angliavandenilių kiekio bei cheminės sudėties. Pavyzdžiui, dyzelinu, benzinevežiu garinimo produktais, transmisiniais tepalais užterštame smėlingame dirvožemyje labai sumažėja mikroorganizmų skaičius (Roffey, 1989). Rūšinė įvairovė taip pat skiriasi nuo tos, kuri aptinkama švariam smėlingame dirvožemyje. Nafta užterštoje aplinkoje didelę dalį vietinės mikroorganizmų populiacijos sudaro naftą oksiduojantys mikroorganizmai. Vietovėse, kur įvyksta atsitiktinės naftos ar jos produktų išsiliejimo avarijos, vietinė mikroflora, veikiamą didelių naftos angliavandenilių kiekių, dėl chemotaksio užleidžia vietą šalia egzistuojančioms naftą oksiduojančioms rūšims (Korda et al., 1997). Paprastai, užterštų vietų mikroorganizmų įvairovė mažesnė nei neužterštų. Tokiame grunte dažniausiai dominuoja gamneigiamos bakterijos (Kanaly, Harayama, 2000). Chemotaksis yra selektyvus privalumas degraduojančioms bakterijoms užimti atitinkamas, užterštas nišas (Pandey, Jain, 2002).

Iki šiol esminis kamienų atrankos kriterijus yra jų gebėjimas skaldyti teršalus, nekreipiant dėmesio į jų proliferaciją ir aktyvumą tam tikrame grunte. Tačiau kamienai, atrinkti iš mažo skaitlingumo populiacijos, turi mažai galimybių tapti tinkamu inokuliatu, lyginant su pastoviai erdvės ir laiko prasme sutinkamais mikroorganizmais. Kaip jau minėta, atskirai, daugelis mikroorganizmų rūšių nepasizymi didesniu poveikiu naftos produktų teršalams, kuriuos sėkmingai skaldo mikroorganizmų grupės. Tokias grupes gali sudaryti kelios ar keliolika mikroorganizmų rūšių.

Naftos ir jos produktų cheminės sudėties skirtumai skatina kurti įvairius biopreparatus, sudarytus iš aktyvių mikroorganizmų kamienų, kuriuose mikroorganizmų skaičius svyruoja nuo dviejų iki keleto mikroorganizmų kamienų-destruktorių, kurių kiekvienas degraduoja tam tikrus atskirus naftos angliavandenilius, o bendrai, vykdo efektyvią naftos ir jos produktų degradaciją. (Jankevičius ir kt., 2003; Kalėdienė ir kt., 2005; 2007).

Lauko tyrimai *ex-situ* buvo atlikti Kiškėnų grunto valymo aikštelėje. Vidutinė grunto tarša naftos produktais pasirinktuose plotuose sudarė : 41 g/kg (kontrolinė aikštelė C), 42 g/kg (aikštelė A) ir 35 g/kg (aikštelė B).

Tyrimams buvo naudotas biopreparatas (GVT) iš liofilizuotų naftą oksiduojančių bakterijų (VMSF Nr. 1059, 2001; Jankevičius ir kt., 2003). Papildomai į gruntą buvo įterpiamos mineralinės trąšos (0,7g/kg) (6 paveikslas). Bendras angliavandenilių kiekis taip pat greičiau mažėjo mažiau užterštame grunte. Kontrolinėje aikštelėje (41g/kg) be biopreparato, naftos produktų biodegradacija vyko lėtai.



6 pav. Bendro naftos produktų (BNP) kiekio mažėjimas mazutu užterštame grunte su biopreparatu (*ex-situ* tyrimai)

VG TU mokslininkų paskelbtoje publikacijoje (Ignatavičius, Oškiniš, 2007) nurodoma, kad mazuto biodegradacijos metu ėminiuose naftą oksiduojančių mikroorganizmų buvo daugiausia ir efektyviausias skaidymas – naudojant biopreparatą GVT. Mazuto kiekis ėminiuose sumažėjo 81,5%-86%.

Mūsų tyrimai parodė, kad gruntą užteršus naftos produktais, jau po mėnesio ir per visus 6 tyrimo mėnesius, dominuoja gramneigiamos bakterijos, kurios vėliau užleidžia vietą vietinėms gramteigiamoms bakterijoms (6 lentelė)

6 lentelė. Bakterijų skaičiaus kaita, į mazutu užterštą gruntą įterpus biopreparatą: bendras bakterijų skaičius - (BB), naftą oksiduojančios bakterijos - (NOB)

Variantas	Bakterijų skaičius (10^6 KSV/g)									
	2002.05		2002.06		2002.07		2002.08		rugsėjis	
	BB	NOB	BB	NOB	BB	NOB	BB	NOB	BB	NOB
Kontrolė	2.9	1.8	4.7	3.5	7.1	7.0	12.1	10.5	6.6	2.4
Aikštelė, A	2.7	2.5	18.8	18.9	58.1	60.7	22.1	13.3	19.0	19.2
Aikštelė, B	3.1	3.1	24.9	22.1	132.8	105.7	135.7	109.9	24.9	15.7

Tyrimai parodė, kad įterpti mikroorganizmai geriau adaptavosi grunte su 35 g/kg mazuto. Kaip nurodo kai kurie autoriai, į gruntą įterpus naftos produktus, naftos angliavandenilių oksiduojančių bakterijų skaičius po 2 mėnesių gali pasiekti 100% bendro mikroorganizmų kiekio (Song, Bartha, 1990). Grunte, kuriame daug lengvųjų angliavandenilių frakcijų, dominuoja gramneigiamos bakterijos. Tačiau vėliau, oksiduoti naftos angliavandeniliai, įskaitant fenolį, salicilatą, fenantreną ir kt., yra metabolizuojami gramteigiamų bakterijų, demonstruojančių platesnį metabolinių savybių spektrą (Il'inskii et al. 1998).

Kaip jau buvo minėta, daugelis introdukuotų mikroorganizmų yra aktyvūs apie 3 mėnesius (Kalėdiene, Giedraityte, 2003; 2004; Kalėdienė ir kt., 2007). Vėliau, naftos produktų destrukcijos greitis mažėja, kartu mažėjant ir naftą oksiduojančių mikroorganizmų skaičiui. Mažėjimą gali įtakoti sumažėjęs teršalų kiekis, aplinkos sąlygos, bendras mikrobiologinis fonas, vietinė mikroflora, laipsniškai išstumianti introdukuotus mikroorganizmus bei biopreparate esančių ląstelių išsiplovimas iš paviršinių grunto horizontų. Tyrimai rodo, kad organiniuose-mineraliniuose dirvožemiuose mikrobinės bendrijos atsparesnės, geba greičiau daugintis, prisitaikyti prie nepalankių veiksnių, lyginant su skurdžių mineralinių dirvožemių bendrijomis (Sidorov ir kt., 1998; Girvan et al., 2005).

Paprastai biologiniai naftos produktų skaidymo metodai taikomi tuomet, kai naftos angliavandenilių kiekis yra per mažas, kad juos būtų galima pašalinti mechaniniu būdu, bet per didelis, kad dirvožemį arba vandenį, užterštus naftos produktais, naudoti ūkiniais tikslams. Tokioje užterštoje dirvoje naftos produktai galėtų sudaryti apie 5 % nuo dirvožemio svorio. Dažniausiai taikomi keli naftos angliavandenilių grunte utilizacijos metodai: biostimuliacija, bioaugmentacija ir biopreparatų pavidalu į gruntą įterpiamos aktyvios naftą oksiduojančios mikroorganizmų rūšys. Egzistuoja daug įvairiausių bioremediacijos strategijų, tačiau adaptuoti vietiniai (autochtoniniai) mikroorganizmai vertinami kaip perspektyviausia ir efektyviausia priemonė.

3. Mikrobinų metabolitų panaudojimo galimybės grunto bioremediacijai **Mikroorganizmų paviršiaus aktyvios medžiagos**

Pagrindinė priežastis, kodėl naftos produktai ilgai išlieka gamtoje kaip teršalai, yra jų

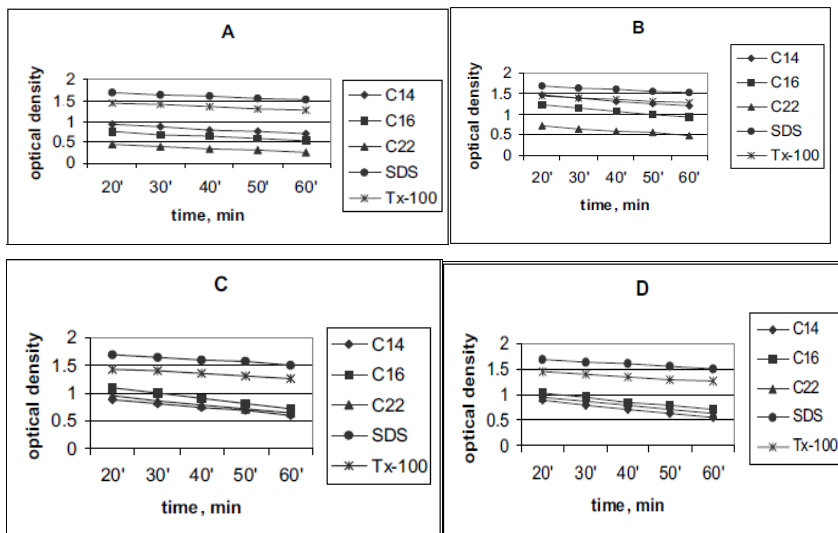
mažas tirpumas vandenyje. Tokie teršalai kaip trichloretilenas, daugiažiedžiai aromatiniai junginiai, chlorinti bifenilai yra mažai tirpūs. Grunto bioremediacijai *ex-situ* arba *in-situ* siūloma teršalus išplauti vandeniu arba tirpikliais (Mulligan et al., 2001). Kaip viena iš priemonių, rekomenduojama naudoti sintetines arba natūralias paviršiaus aktyvias medžiagas (PAM). Pastarąsias gali sintetinti mikroorganizmai, augdami ant įvairių substratų: angliavandenių, aliejų, angliavandenilių ir kitų. Mikroorganizmų gebėjimas išskirti PAM yra vienas iš požymių, rodantis, kad organizmas gali asimiliuoti ir angliavandenilius. Mikroorganizmai gali sintetinti PAM ir panaudoti jas substrato emulsavimui. Mokslininkai nurodo (Mulligan et al., 2001), kad žinomi du mechanizmai, kurių pagalba gerinamas biodegradacijos aktyvumas. Vienu atveju, didinamas substratų tirpumas, kitu, pagerinama sąveika su ląstelės paviršiumi.

Padidėjęs paviršiaus hidrofobiškumas pagerina kontaktą su hidrofobiniu substratu. Dėl ląstelių sienelės struktūros hidrofobiškumo jos gali akumuliuoti didelius naftos teršalų kiekius. Terpėje esantys angliavandeniliai paprastai gali padidinti mikroorganizmų išskiriamų PAM kiekį, dėl kurių padidėja ir pačių angliavandenilių soliubilizacija.

7 lentelė. Paviršiaus aktyvių medžiagų (PAM) emulsavimo aktyvumas

Kultūros	Anglies šaltinis	OD (0,5val)	OD (1val)	Kd	ODmax
<i>Micrococcus</i> sp. 1a*	C ₁₄ H ₃₀	0,86	0,71	0,30	0,95
	C ₁₆ H ₃₄	0,69	0,53	0,32	0,80
	C ₂₂ H ₄₆	0,39	0,26	0,26	0,50
<i>Arthrobacter</i> sp.2a	C ₁₄ H ₃₀	1,40	1,18	0,40	1,52
	C ₁₆ H ₃₄	1,15	0,95	0,40	1,26
	C ₂₂ H ₄₆	0,66	0,52	0,36	0,75
<i>Micrococcus</i> sp. 1d	C ₁₄ H ₃₀	0,80	0,60	0,40	0,94
	C ₁₆ H ₃₄	0,94	0,74	0,40	1,12
	C ₂₂ H ₄₆	0,85	0,68	0,34	1,00
<i>Bacillus</i> sp. 5.1	C ₁₄ H ₃₀	0,71	0,56	0,32	0,82
	C ₁₆ H ₃₄	0,75	0,51	0,30	0,80
	C ₂₂ H ₄₆	0,53	0,39	0,26	0,65
<i>Bacillus</i> sp. 1.2	C ₁₄ H ₃₀	0,80	0,58	0,44	0,98
	C ₁₆ H ₃₄	0,94	0,71	0,40	1,05
	C ₂₂ H ₄₆	0,85	0,63	0,40	1,00
Kontrolė	SDS	1,64	1,52	0,24	1,72
	Triton	1,40	1,28	0,24	1,48
	X-100				

Tirdami bakterijų augimą terpėse su įvairiais naftos angliavandeniliais ir jų gebėjimą skirti į aplinką paviršiaus aktyvias medžiagas (7 lentelė) nustatėme, kad tirtų angliavandenilių biodegradacijos lygis buvo susijęs su susidariusių emulsijų dispersijos laipsniu ir skilimo konstanta: kuo didesnė biodegradacija, tuo mažesnė dispersinės sistemos skilimo konstanta ir didesnis susidariusios emulsijos dispersijos laipsnis (7 paveikslas) (Giedraitytė et al., 2001).



7 pav. Bakterijų paviršiaus aktyvių medžiagų įtaka heksadekano mikroemulsijų stabilumui: A. - *Micrococcus* sp. 1a., B. - *Arthrobacter* sp. 2a., C. - *Micrococcus* sp. 1d., D. - *Bacillus* sp. 1.2 palyginus su SDS ir Triton (Tx)-100.

Mūsų tyrimuose didžiausiu degradaciniu potencialu pasižymėjo *Micrococcus* sp. 1a. Kaip nurodo kai kurie autoriai, lyginant tarpusavyje įvairių bakterijų gebėjimą utilizuoti naftos produktus, dažnai aktyvesni yra kokai, kurie gali “įsiorbti” substratą visu ląstelės paviršiumi, mažiau tam procesui eikvodami energijos (Maier, Soberon-Chavez, 2000).

Deja, iki šiol mažai ištirtas ląstelių kontaktas su hidrofobiniu substratų paviršiumi. Mikroorganizmų PAM gali būti panaudoti ir naftos išgavimui padidinti (Kalėdienė, 2004; Liužinas ir kt., 2005).

Termofilinių bakterijų naftaleno metabolizmo tyrimai

Grunto bioremediacija, pagrįsta fermentų naudojimu, per pastaruosius kelerius metus tapo patrauklia alternatyva įprastiems grunto bioremediacijos metodams. Fermentų naudojimas yra paprastesnis būdas nei viso organizmo naudojimas (Atlas, Bartha, 1992). Daugybė ksenobiotikų gali būti panaudoti fermentinėje bioremediacijoje, pradedant daugiažiedžiais aromatiniais angliavandeniliais ir baigiant pesticidais, sintetiniais dažais ir medienos konservantais (kreozotu, pentachlorfenoliu). Svarbiausias klausimas - surasti mikroorganizmus, galinčius naudoti vieną ar kitą teršalą ir sutelkti dėmesį į jų fermentų, dalyvaujančių teršalų skaidyme, nustatymą.

Istoriškai, labiausiai ištirti bakteriniai fermentai: mono- ir dioksigenazės, reduktazės, dehalogenazės, citochromo P450 monooksigenazės, mikromicetų lakazės, lignino ir mangano peroksidazės. Daugėja publikacijų, kuriose rašoma apie mikroorganizmų galimybes utilizuoti daugiažiedžius aromatinius angliavandenilius, įskaitant tris, keturis ir daugiau žiedų turinčius junginius (Cerniglia, 1997; Juhasz, Naidu, 2000; Smith, 1990; Sutherland, 1992). Naftalenas, antracenas, fluorantenas, pirenas ir chrizenas mikroorganizmų gali būti naudojami kaip vieninteliai anglies ir energijos šaltiniai. Kai kurie autoriai pažymi, kad ilgą laiką aplinkoje su daugiažiedžiais aromatiniais angliavandeniliais išbuvusių bakterijų augimą stimuluoja naftalenas, tačiau kaip bebūtų paradoksalu, slopina gliukozę (Dawn et al., 2006). Mikroorganizmų kamienai išnaudoja monooksigenazes ir/arba dioksigenazes, metabolizuodami vieną žiedą turinčius aromatinius angliavandenilius (Kolb et al., 1994; Tongpim, Pickard, 1999). Nors iki šiol nėra aiškaus patvirtinimo apie mikroorganizmų gebėjimą utilizuoti daugiau nei keturis žiedus turinčius aromatinius angliavandenilius, tačiau publikacijų apie keturis žiedus turinčių junginių mikrobinę utilizaciją skaičius gerokai išaugo per pastaruosius 10 metų. Tačiau kaip vyksta visų šių metabolizmo kelių kontrolė genetiniame lygmenyje, tebėra didelis klausimas.

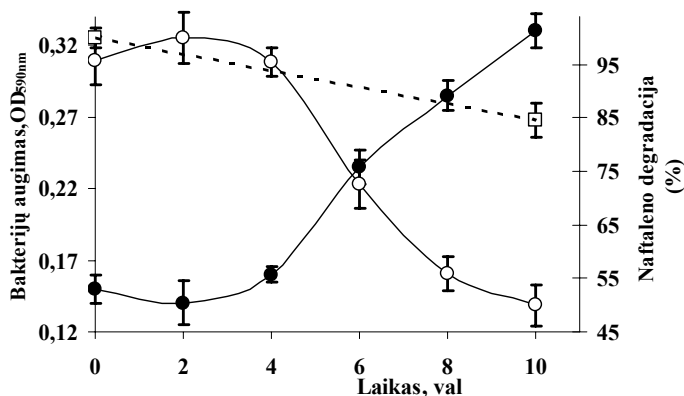
Aplinkoje esantys žmogaus sukurti ksenobiotikai gana gerai utilizuojami mikroorganizmų, jeigu jų struktūra artima gamtiniams analogams. Aromatiniai junginiai sudaro dalį gyvų organizmų t.y. aromatinės aminorūgštys, fenoliai ar chinonai. Todėl daugybėje mikroorganizmų nustatyti įvairūs aromatinų junginių katabolizmo keliai, kuriuose įvairūs aromatiniai junginiai fermentų pagalba konvertuojami į gamtinius

tarpinius junginius: katecholį ir protokatechuatą. Paprastai aromatinuose angliavandeniliuose žiedas skeliamas dviem skirtingais keliais: katecholio 1,2-dioksigenazė katalizuoja intradiolinį žiedo skėlimą (*orto* keliu), arba katecholio 2,3-dioksigenazė – ekstradiolinį skėlimą (*meta* keliu). Iki šiol geriausiai ištirta mezofilinių organizmų veikla (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Candida*), skaldant daugiažiedžius aromatinis angliavandenilius „švelniomis“ sąlygomis (Smith, 1990; Cerniglia, 1992; Muller et al., 1998; Samanta et al., 1999; Doddamani, Niunekar, 2000; Mishra, Lal, 2001; Kang et al., 2003). Tačiau, apie termofilų metabolizmo kelius ir fermentus, dalyvaujančius aromatinių junginių degradacijoje, žinių trūksta. Aprašytas termofilų augimas ant benzoinės rūgšties, fenolių (Adams, Ribbons 1988; Mutzel et al., 1996; Bask et al., 1998).

Nežiūrint didelio pramonės susidomėjimo temperatūrai atspariais termofilų fermentais, iki šiol buvo išgrynintas tik fermentas katecholio 2,3-dioksigenazė iš *Bacillus termoleovorans* (Milo et al., 1999), *B. stearothermophilus* (Studholme et al., 1999) ir protokatechuato 2,3 –dioksigenazė iš *Geobacillus* (Cashion et al., 1977). Nustatyta, kad *Bacillus termoleovorans* utilizuoja naftaleną ir, kad jo metabolizmo kelias skiriasi nuo mezofilams įprasto kelio (Annweiler et al., 2000). Iki šiol nebuvo informacijos apie naftaleno degradaciją termofilinėse bakterijose.

Mūsų laboratorijoje iš geoterminių naftos gręžinių išskirtos bakterijos, kurios pakankamai gerai augo ant mineralinių terpių su antracenu, protokatecho rūgštimi, benzeno 1,3- dioliu, fenoliu ir benzeno kaip vieninteliais anglies šaltiniais. Atskirais atvejais, terpėje su gliukoze, kai kurių bakterijų augimas buvo visiškai inhibuojamas. Iš visų tirtų bakterijų *Geobacillus* sp., nuosaiki termofilinė bakterija, pasižymėjo didžiausia tirtų aromatinių junginių degradacija (Giedraitytė, Kalėdienė, 2004).

Ištyrus šios bakterijos neląstelinio ekstrakto fermentinius aktyvumus, nustatytas indukuojamas protokatechuato 3,4-dioksigenazė aktyvumas (Bubinas et al., 2004). Tyrimų metu identifikuoti biodegradacijos tarpiniai metabolitai – protokatecho ir ftalio rūgštys. Tokie tarpiniai metabolitai ir fermentai būdingi protokatecho rūgšties *orto* skaidymo būdai, kuris skiriasi nuo mezofilinėse bakterijose žinomo būdo. Bakterijos augimo charakteristikos pateiktos 8 paveiksle.



8 pav. *Geobacillus* sp. G27 biomasės koncentracija (●) ir naftaleno biodegradacija skystoje mineralinėje terpėje su 2.5 mM naftaleno. Punktyrinė linija žymi abiotinę naftaleno degradaciją (□).

Dujų chromatografija – masės spektrometrija nustčius (DC/MS) degradacijos metabolitus (8 lentelė) buvo patvirtinta, kad bakterijos kamienas *Geobacillus* sp. G27 naftaleno degradaciją vykdo indukuodamas protokatechuito 3,4 –dioksigenazę; nei protokatechuito 4,5 –dioksigenazės, nei protokatechuito 2,3 –dioksigenazės nustatyti nepavyko (Bubinas et al., 2008).

8 lentelė. Naftaleno metabolitai nustatyti su DC/MS.

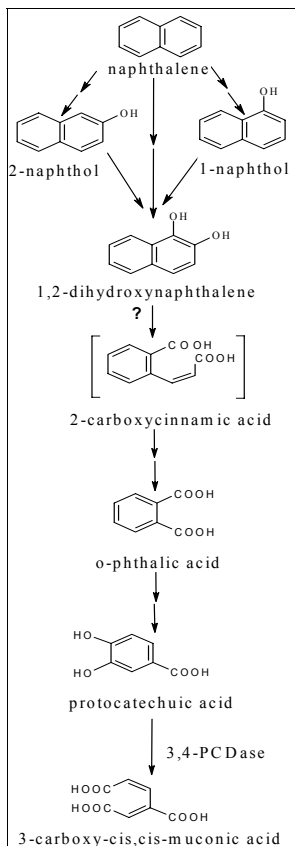
Užlaikymas (min)	Junginys	Masės ir krūvio santykis (m/z) pagrindiniuose jonų pikuose (%)
11.2	Naftalenas (substratas)	128(M ⁺) (100),122(2),102(7)101(2),81(1),75(3),74(3),64(4),51(8)
14.5	o-Ftalio rūgštis	166(M ⁺) (2),148(37),104(100),76(85),50(43)
20.3	2-Naftolis	144(M ⁺) (100),145(10),116(28),115(62),89(8),72(2),63(9),57(10)
20.8	1-Naftolis	144(M ⁺) (100),145(11),116(42),115(76),88(10),74(4),63(10),54(7),52(5)
26.4	Protokatecho rūgštis	154(M ⁺) (100),138(11),137(10)109(34),81(12),63(7),55(6),51(9)

Aptikti tarpiniai metabolitai, tokie kaip o-ftalio ir protokatecho rūgštis, patvirtino, kad naftaleno skaidymas termofilinėje bakterijoje *Geobacillus* sp. G27 gali vykti *orto* skėlimo būdu.

Fermentas protokatechuato 3,4-dioksigenazė (EC 1. 13. 11. 3), kuri katalizuoja aromatinio žiedo skėlimo reakciją, įtraukiant į ją du deguonies atomus, buvo išgrynintas 24 kartus panaudojus amonio sulfato frakcionavimo ir kolonėlės chromatografijos metodus (DEAE-celiuliozė ir hidroksiapatitą). Išgryninto fermento specifinis aktyvumas siekė 34,2 U/mg baltymo. Gelfiltracijos metodu nustatyta termofilinio fermento santykinė molekulinė masė buvo 480 kDa. Protokatechuato 3,4-dioksigenazės specifinio aktyvumo temperatūros ir pH optimumai buvo atitinkamai 60 °C ir 8. Fermentas netekdavo pusės savo aktyvumo 60 °C temperatūroje po 40 minučių. Buvo nustatytos pagrindinės fermento kinetinės konstantos K_m reikšmės: kai substratas buvo protokatechuatas – 7 μ M, kai catecholis – 33 μ M (Bubinas, Giedraitytė, Kalėdienė, 2007).

Tyrimų metu buvo išgrynintas *Geobacillus* sp. G27 kamieno fermentas, catechol 1,2- dioksigenazė. Bakterija auginta mineralinėje druskų terpėje su oksiduotu naftaleno dariniu α -naftoliu, kuris įsisavinamas β -ketoadipato keliu. Catechol 1,2- dioksigenazė išgryninta 18 kartų panaudojus amonio sulfato frakcionavimą, kolonėlės chromatografijos metodus (DEAE-celiuliozė, Sephadex G-150). Išgryninto fermento specifinis aktyvumas siekė 7.42 U/mg baltymo. Termofilinio fermento santykinė molekulinė masė buvo 96kDa. Specifinio aktyvumo temperatūros ir pH optimumai buvo atitinkamai 60°C ir 7. Fermentas netekdavo pusės savo aktyvumo 60°C temperatūroje po 40 minučių. Pagrindinės fermento kinetinės konstantos K_m reikšmė, kai substratas buvo catecholis – 29 μ M (Giedraityje, Kalediene, 2009).

Naftaleno degradacija, kuri buvo aptikta bakterijoje *Geobacillus* sp. G27, skyrėsi nuo iki šiol žinomos naftaleno degradacijos termofilinėse bakterijose. Naftaleno metabolizmo kelias labiausiai panašus į Annweiler ir bendraautorių aprašytą (2000) kelią, kurį jie aprašė tirdami bakteriją *B. thermoleovorans*. Autoriai nerado catecholio ir salicilo rūgšties, tačiau jiems pavyko nustatyti karboksicinamono ir ftalio rūgštis. Remiantis gautais rezultatais mes pateikėme galimą naftaleno degradacijos kelią termofilinėje bakterijoje *Geobacillus* sp. G27 (9 paveikslas).



9 pav. Galima naftaleno degradacijos schema bakterijoje *Geobacillus* sp. G27. Laužtiniuose skliaustuose pateikti Annweiler ir bendraautorių (2000) nustatyti metabolitai.

Naujų metabolizmo kelių formavimasis, jau esančių kelių reguliacijos pokyčiai arba fermentų specifškumo kitimai lemia naujų, biodegradaciniu požiūriu vertingų kaminų atsiradimą (Zylstra, Gibson, 1989; Spain, 1997; Kanaly, Harayama, 2000; Ma et al., 2006). Ir termofilų, ir psichofilų mikroorganizmų fermentai dažnai pasižymi neįprastomis savybėmis, kurios gali būti panaudotos kaip galingas katalizatorius šalinant iš grunto teršalus. Nors termofilų aromatinių junginių katabolizmo keliai nėra iki galo iširti, tačiau pripažįstama, kad termofilų fermentai yra atsparesni fizinei/cheminei denatūracijai lyginant su mezofilais. Termofilinės degradacijos sąlygos yra pranašesnės, kalbant apie greitesnius metabolizmo procesus, didesnę teršalų tirpumą, mažesnę klampą. Aromatinius junginius skaidantys organizmai ir jų fermentai gali būti panaudoti bioreaktoriuose, įtraukti į diagnostikos sistemas ir biologinius jutiklius.

PERSPEKTYVOS

Gauti rezultatai leidžia apibrėžti tolimesnių tyrimų kryptis ir perspektyvas.

Užteršto nafta ir naftos produktais grunto ir vandens bioremediacija Lietuvoje yra prioritetinga aplinkos apsaugos sritis. Todėl, remiantis ilgamečiais mikroorganizmų tyrimais, numatoma toliau ieškoti efektyvių biologinių priemonių grunto bioremediacijos problemoms spręsti. Pirmiausia, šios priemonės turės remtis naujų, aktyvių mikroorganizmų kamienų paieška, jų savybių analize. Gauti tyrimų rezultatai galėtų turėti platų pritaikymą aplinkos biologiniam valymui.

Numatoma tęsti tyrimus, analizuojant termofilinių bakterijų metabolizmo ypatumus, skaidant aromatinius ir daugiažiedžius aromatinius naftos angliavandenilius.

Planuojama nagrinėti kitus termofilinių mikroorganizmų fermentus (dehidrogenazes, hidrolazes), kurie gali būti svarbūs maisto pramonei, žemės ūkiui, atliekų perdirbimui.

IŠVADOS

Tiriant mikroorganizmų įtaką grunto bioremediacijai ir jų ypatumus, utilizuojant struktūriškai skirtingus substratus, nustatyta:

1. mikrobiologinės grunto bioremediacijos efektyvumas priklauso nuo grunte esančių mikroorganizmų skaičiaus, jų adaptacijos, funkcionavimo specifiškumo, augimui tinkamų mitybos medžiagų, teršalų struktūros, bei grunto fizikocheminių savybių;
2. vidutinio klimato sąlygomis, tinkamai parinkti ir introdukuoti į naftos produktais užterštą gruntą mikroorganizmai, išlieka aktyvūs apie tris mėnesius, per kuriuos gali ženkliai sumažinti bendrą naftos teršalų kiekį;
3. mikrobiologinis užteršto grunto valymas yra efektyvesnis, naudojant kompleksines bioremediacijos priemones. Kiekvieno atskiro bioremediacijos metodo, kaip ir kiekvienos atskiros mikroorganizmų rūšies, įtaka nėra pakankama užteršto grunto atkūrimui;

Tiriant mikrobinių metabolitų panaudojimo galimybes grunto bioremediacijai, nustatyta:

1. terpėje esantys naftos angliavandeniliai didina mikroorganizmų išskiriamų paviršiaus aktyvių medžiagų kiekį, nuo kurio tiesiogiai priklauso angliavandenilių degradacijos lygis;
2. nustatytas naujas galimas termofilinių bakterijų naftaleno *orto* skaidymo kelias, kuris skiriasi nuo iki šiol žinomo termofilinėse bakterijose ir gali turėti įtakos platesniam naftos angliavandenilių utilizavimui grunte.

GRUNTO BIOREMEDIACIJOS MIKROBIOLOGINIAI TYRIMAI

SANTRAUKA

Bioremediacija suprantama kaip aplinką valanti technologija, kuri teršalų šalinimui naudoja biologinį potencialą. Apžvalgoje nagrinėjami įvairių polimerinių ir natūralios kilmės junginių biodegradacijos procesų ypatumai, mikrobiologinės grunto bioremediacijos efektyvumo priklausomybė nuo įvairių abiotinių ir biotinių veiksnių. Pateikta analizė apie žemiausios trofinės grandies-mikroorganizmų asociacijų formavimąsi ir funkcionavimą užterštame grunte, aptariamas bioaugmentacijos, biostimuliacijos, biopreparatų efektyvumas naftos produktais užteršto grunto bioremediacijai. Aptariamas naujas ištirtas termofilinių bakterijų naftaleno skaidymo kelias. Gautų duomenų pagrindu apžvalgoje daromos išvados, kad mikroorganizmai gali būti sėkmingai naudojami valant stipriai užterštą gruntą *ex-situ* sąlygomis. Bioremediacijos technologijos suteikia galimybes pagausinti vietines mikroorganizmų populiacijas, sustiprinti mikroorganizmų veiklą, naudojant papildomas maisto medžiagas, stimuliuoti aktyvių metabolitų sintezę.

Raktiniai žodžiai: bioremediacija, mikroorganizmai, angliavandeniliai, dioksigenazės

MICROBIOLOGICAL RESEARCH OF SOIL BIOREMEDIATION

SUMMARY

Bioremediation is the application of biological processes for the clean up of pollutants present in the environment. The scope of the review encompasses the following subjects: biodegradation of various polymeric and natural origin compounds; the applications of microorganisms to laboratory scale and field scale soil bioremediation, with a focus on petroleum hydrocarbons; bioaugmentation and characterization of microbial communities; the factors affecting soil bioremediation processes including: availability of microbes, accessibility of contaminants, and a heterogeneous environment; the use of microbial metabolites, such as surfactants to improve availability of contaminants. From this review it can be concluded that microorganisms are an effective *ex situ* technology that can be used for bioremediation of problematic soils. Bioremediation technology allows for the convenient manipulation and control of several environmental parameters that could lead to enhanced and faster treatment of polluted soils: nutrient source (biostimulation), inocula (bioaugmentation), increased availability of pollutants by inducing biosurfactant production inside the microorganisms, etc. Bioremediation also encompasses *ex situ* methods like enzyme catalyzed pollutant breakdown. The data on the degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a novel pathway, through protocatechuate are presented.

Keywords: microorganisms, bioremediation, hydrocarbons, dioxygenases

Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslo darbų sąrašas

STRAIPSNIAI

leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) duomenų bazes ir į kitas tarptautines duomenų bazes, patvirtintas Lietuvos mokslo tarybos

1. Giedraitytė G., L. Kalėdienė. Catechol 1,2-dioxygenase from α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties // Central European Journal of Biology, 2009, 4(1), p.68-73 ISI Web Science
2. Bubinas A., G. Giedraitytė, L. Kalėdienė, O. Nivinskiene, R. Butkiene. Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway, through protocatechuic acid // Central European Journal of Biology, 2008, (3)1, p. 61-68 ISI Web Science
3. Bubinas A., G. Giedraitytė, L. Kalėdienė. Protocatechuic 3,4-dioxygenase from thermophilic *Geobacillus* sp. strain // Biologija ISSN 1392-0146, 2007, nr. 1, p. 31-34 ISI (Master Journal List)
4. Motiejūnaitė O., L. Kalėdienė. Antimicrobial activity of *Lamiaceae* plant essential oils on *Aspergillus niger* growth //ISSN: 0867-1656 Bulletin of the Polish Academy of Sciences. Biological sciences, 2003, v. 51, no. 3, p. 237 – 242. ISI (Master Journal List)
5. Kalėdienė L. Research of microorganisms utilizing leather industry waste //Biodeter Biodegrad. 1996, v. 133, p. 543 – 549 ISI Web Science
6. Lugauskas A., Kalėdienė L. Micromycetes deteriorating polycomponental polymeric materials // Biodeter Biodegrad.1996, v. 133, p. 255 – 264 ISI Web Science
7. Bubinas, G. Giedraitytė, L. Kalėdienė. Naujas termofilinių bakterijų naftaleno metabolizmo kelias // Biologija, ISSN: 1392-0146 , 2004 , 2, (1 priedas), p. 85-88 (CAB Abstract)
8. Kalėdienė L. Mikroorganizmai naftos išgavimo procese// Geologijos akiračiai 2004, 3, p. 35-37 (GeoRef Serials)
9. Kalėdienė L., G. Giedraitytė. Application of indigenous microorganisms in bioremediation of soil contaminated by fuel oil // Biologija 2003, 4, p. 17 – 21 (CAB abstract)
10. Kalėdienė L., G. Giedraitytė. Influence of mineral fertilisers on microbial degradation of fuel oil in soil //Biologija 2000, nr.4, p. 41-45 (CAB abstract)
11. Lugauskas A., Kalėdienė L., Pečiulytė D. Microbial deterioration of technical materials // Cheminė technologija. 1995, nr. 2, p. 41 - 50.(Chemical abstract CAplus)
12. Lugauskas A., Pečiulytė D., Kalėdienė L., Levinskaitė L. Mėsos pramonės atliekų mikrobiologinė utilizacijos galimybės //Biologija, 1993, nr. 4, p. 40 - 44. (CAB)

Straipsniai recenzuojamuose periodiniuose ir kituose mokslo leidiniuose

1. Giedraitytė G., L. Kalėdienė, A. Bubinas. Correlation between biosurfactant synthesis and microbial degradation of crude oil hydrocarbons. Ekologija. 2001. Nr.3, p. 38 – 41

2. Kalėdienė L. Naftos angliavandenilių mikrobiologinė degradacija.// Ekologija. 1999. Nr.3, p. 55 - 59.
3. Motiejūnaitė O., Kalėdienė L. Mikromicetų, produkuojančių proteolitinius fermentus atranka. // 1991. Biologija, 30, p. 128 - 133.
4. Kalediene L.P., Zhdanova N.N., Lugauskas A. J. The effect of some environmental factors on melanin-containing micromycetes // Mikologiya i fitopatologiya (rus.), 1989, 23, 1, p. 55 – 62
5. Jankevičius K., Kalėdienė L., Liužinas R. Nafta ir jos produktais užteršto vandens ir grunto biologinis valymas. //Aplinkos biologinis valymas. Sud. K. Jankevičius, R. Liužinas. Monografija, V.: Apyaušris, 2003, 7-16. ISBN 9955-609-00-1
6. Kalėdienė L. Naftą oksiduojantys mikroorganizmai.//Aplinkos biologinis valymas. Sud. K. Jankevičius, R. Liužinas. Monografija, V.: Apyaušris, 2003, 99-108. ISBN 9955-609-00-1
7. Jankevičius K., Kalėdienė L. , Liužinas R., Lugauskas A., Valickas A. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų preparato gamybos principai.// Aplinkos biologinis valymas. Sud. K. Jankevičius, R. Liužinas. Monografija, V.: Apyaušris, 2003, p. 122-127 . ISBN 9955-609-00-1
8. Kalėdienė L. Genetiškai modifikuoti organizmai. //Žvilgsnis į mikroorganizmų pasaulį. Vilnius: ŠCA, 2007, 23-29.
9. Kalėdienė L., G. Giedraitytė, R. Liužinas. Effectiveness of bioremediation process in hydrocarbon-contaminated soils. // Important aspects of environmental bioremediation. Eds. K.Jankevičius, R.Liužinas. Vilnius, ISBN 9955-609-14-1, 2005, p. 7-13.
10. Kalediene L., G. Giedraityte . Bioremediation Problems of Oil-Polluted Soil in Lithuania. Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium (Orlando, FL; June 2003), Ed. RC Sims, J. Sims, D. Sorensen, and J. McLean, Battelle, Florida. Paper A10(on CD), 2004. ISBN:1-57477-139-6
11. Kalėdienė L., G. Giedraitytė, R. Liužinas. Effectiveness of bioremediation process in hydrocarbon contaminated soils. Proceedings of Kalmar ECO-TECH'03. Bioremediation and leachate treatment. 2003, 101-108.
12. Kalėdienė L. Micromycetes in oil polluted environment.// Ecological effects of microorganism action. Material of International Conference., Vilnius, 1997. p. 24 - 28.
13. Kalėdienė L. Odų pramonės atliekų mikrobiologinės utilizacijos galimybių paieška // Ekologija kaip socialinis procesas. Tarptaut. konferencijos straipsnių rinkinys, Šiauliai, 1996. P. 128 – 132

Literatūros sąrašas

1. Abu-Lail N.I., T.A. Camesano. Role of ionic strength on the relationship of biopolymer conformation, DLVO contributions, and steric interactions to bioadhesion of *Pseudomonas putida* KT2442. // *Biomacromolecules*, 2003, 4, 1000-1012
2. Adams D., D.W. Ribbons. The metabolism of aromatic compounds by thermophilic bacilli. // *Appl Biochem Biotechnol*, 1988, 17, 231-244
3. Andersen S.I., K.S. Birdi. Aggregation of asphaltene as determined by calorimetry. // *J Colloid Interface Sci*, 1991, 142, 497-502.
4. Annweiler E., H.H. Richnow, S. Hebenbrock, G. Antranikian, C. Garms, W. Francke, W. Michaelis. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene derived carbon into the biomass by the thermophilic *Bacillus thermoleovorans*. // *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66, 518-523
5. Atagana H. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. // *World J Microbiol Biotechnol* 2006, 22 (11), 1145-1153
6. Atlas, R.M. and R. Bartha. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Cummings Science Publishing, 1998, 694
7. Barclay M., V.A. Tett, C.J. Knowles. Metabolism and enzymology of cyanide/metalloacyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. // *Enzym. Microbial Technol*, 1998, 23 (5), 321-330
8. Bask A., M.K. Nayak, A.K. Chakraborti. Chemoselective o-metylation of phenols under non-aqueous condition. *Tetrahedron Lett*, 1998, 39, 4883-4886
9. Beckett A., J.A. Tatnell, M. Taylor. Adhesion and preinvasion behaviour of uredinospores of *Uromyces viciae* during germination on host and synthetic surfaces. // *Mycol Res*, 1990, 94 (7), 865 - 875
10. Bossert, I. R. Bartha. The fate of petroleum in soil ecosystems. /Ed. Atlas, R.M. *Petroleum Microbiology*, Macmillan Publishing Co, New York, 1984, 435-473
11. Bubinas A., G. Giedraitytė, L. Kalėdienė, O. Nivinskiene, R. Butkiene. Degradation of naphthalene by thermophilic bacteria via a pathway, through protocatechuic acid. // *Centr Europ J Biol*, 2008, (3)1, 61-68
12. Bubinas A., G. Giedraitytė, L. Kalėdienė. Protocatechuate 3,4-dioxygenase from thermophilic *Geobacillus* sp. strain // *Biologija*, 2007, 1, 31-34
13. Bubinas, G. Giedraitytė, L. Kalėdienė. Naujas termofilinių bakterijų naftaleno metabolizmo kelias // *Biologija*, 2004, 2(1), 85-88.
14. Cashion P., M.A. Holder-Franklin, J. McCully, M. Franklin. A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. // *Anal Biochem*, 1977, 81, 461-466
15. Cerniglia C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. // *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, 19, 324-333
16. Cunningham C.J., J.C. Philp. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination and Reclamation*, 2000, 8 (4), 261-269;

17. D'Annibale A., F. Rosetto, V. Leonardi, F. Federici, M. Petruccioli. Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons.// *Appl Environmen Microbiol*, 2006, 72 (1), 28-36
18. Dawn M., M.Castle, T. Montgomery, D.L. Kirchman. Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary.// *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 56 , 55–63
19. Devinny J., S.H. Chang. Bioaugmentation for soil bioremediation./ In: Wise D.L., Trantolo D.J. (eds.) *Bioremediation of contaminated soils*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000, 465-488.
20. Doddamani H.P., H.Z. Niunekar. Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species, *Curr Microbiol*, 2000, 41, 11–14.
21. Dupres V., T.A. Camesano, D.Langevin, P. Guenoun, A. Checco. Atomic force microscopy imaging of hair. Correlations between surface potential and wetting at the nanometer scale. // *J Colloid Interface Scien*, 2004, 269, 329-335
22. Einsele A. Biomass from higher *n*-alkanes./ In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology - a Comprehensive Trestise* 1983, 3, (8). Verlag Chemie, Weinheim, 43–81.
23. Ellis L.B.M., C. D. Hershberger, E. M. Bryzan, L. P. Wackett The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: emphasizing enzymes. // *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(1), 340-343
24. Gallego J.R., J. Loredó, J.F. Llamas, F. Vazquez, J. Sanchez. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation.// *Biodegradation*, 2001, 12, 325–335
25. Giedraitytė G., L. Kalėdienė, A. Bubinas. Correlation between biosurfactant synthesis and microbial degradation of crude oil hydrocarbons.// *Ekologija*, 2001, 3, 38 – 41
26. Giedraitytė G., L. Kalėdienė. Catechol 1,2-dioxygenase from α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties // *Centr Europ J Biol*, 2009, 4(1), 68-73
27. Girvan M.S., D. Campbell, Killham, I. Prosser, L. A. Glover. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. // *Environm Microbiol*, 2005, 7(3), 301–313.
28. Golovchenko A.V., T.A. Semenova , A.V. Polyakova, L.I. Inisheva. The Structure of the Micromycete Complexes of Oligotrophic Peat Deposits in the Southern Taiga Subzone of West Siberia. // *Microbiology*, 2002, 71(5), 575-581
29. Ignatavičius G, Oškinis V. Investigation of black oil and diesel biodegradation in water. // *Ekologija*, 2007, 53 (4), 90–94
30. Jankevičius K., L.Kalėdienė, R.Liuzinas, A.Lugauskas, A.Valickas. Naftą oksiduojančių mikroorganizmų preparato gamybos principai. // *Aplinkos biologinis valymas*. Monografija. Sud. K.Jankevičius, R.Liuzinas, V.: Apyaušris, 2003, 122-127
31. Juhasz A. L., R. Naidu. Bioremediation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene.// *Int Biodet Biodeg*, 2000, 45:57-88
32. Kalėdienė L. Research of microorganisms utilizing leather industry waste //10th International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation, sep. 15-18,

- 1996 Hamburg, Germany. biodeterioration and biodegradation. Book Series: Dechema Monographs //1996, 133, 543 – 549
33. Kalėdienė L. Odų pramonės atliekų mikrobiologinės utilizacijos galimybių paieška // Ekologija kaip socialinis procesas. Tarptaut. konferencijos straipsnių rinkinys, Šiauliai, 1996. P. 128 - 132
 34. Kalėdienė L. Naftos angliavandenilių mikrobiologinė degradacija. //Ekologija, 1999, 3, 55 – 59
 35. Kalėdienė L. Naftą oksiduojantys mikroorganizmai (NOM). / Aplinkos biologinis valymas. Monografija. Sud. K.Jankevičius, R.Liuzinas, V.: Apyaušris, 2003, 99- 108
 36. Kalėdienė L. Mikroorganizmai naftos išgavimo procese.// Geologijos akiračiai 2004, 3, 35-37
 37. Kalėdienė L., G. Giedraitytė. Influence of mineral fertilisers on microbial degradation of fuel oil in soil //Biologija 2000, 4, 41-45
 38. Kalėdienė L., G. Giedraitytė. Application of indigenous microorganisms in bioremediation of soil contaminated by fuel oil.// Biologija, 2003, 4, 17 - 21.
 39. Kalėdienė, G. Giedraityte. Bioremediation Problems of Oil-Polluted Soil in Lithuania. Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium (Orlando, FL; June 2003), Ed. RC Sims, J. Sims, D. Sorensen, and J. McLean, Battelle, Florida. Paper A10(on CD), 2004
 40. Kalėdienė L., G. Giedraitytė, R. Liuzinas. Effectiveness of bioremediation process in hydrocarbon contaminated soils. Proceedings of Kalmar ECO-TECH'03. Bioremediation and leachate treatment. 2003, 101-108
 41. Kalėdienė L., G. Giedraitytė, R. Liuzinas. Effectiveness of bioremediation process in hydrocarbon-contaminated soils. // Important aspects of environmental bioremediation. Eds. K.Jankevičius, R.Liuzinas. V.: Apyaušris, 2005, p. 7-13.
 42. Kalėdienė L., G.Giedraitytė, V.Karlavičienė. Pramoninių paviršinių nuotekų nuosėdų biologinio valymo galimybių tyrimai. Mokslinės konferencijos „Naftos ir kitų aplinką teršiančių medžiagų biodegradacija“ pranešimų medžiaga, Vilnius, 2007, 24-31.
 43. Kalediene L.P., Zhdanova N.N., Lugauskas A. J. The effect of some environmental factors on melanin-containing micromycetes // Mikologiya i fitopatologiya (ru), 1989, 23,1 , 55 – 62
 44. Kanaly R. A., S. Harayama. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria.// J Bacteriol, 2000, 182, 2059-2067
 45. Kang H., S.Y. Hwang, Y.M. Kim, E. Kim, Y.-S. Kim, S.-K. Kim, S.W. Kim, C.E. Cerniglia, K.L. Shuttleworth, G.J. Zylstra. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a Burkholderia species strain. //Can J Microbiol, 2003, 49, 139–144
 46. Kästner M. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds./ In : H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler y P. Stadler (Eds), Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination. Wiley-VCH. Weinheim, 2000, 211-240
 47. Kolb H. C., M. S. Van Nieuwenhze, K. B. Sharpless. Catalytic asymmetric dihydroxylation.// Chem. Rev, 1994, 94, 2483-2547

48. Korda A., Santas P., Tenente A., Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments // Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48, 677-686
49. Koronelli T.V. Principles and methods for raising efficiency of biological degradation // Priklad. Biochimija i Mikrobiologija, 1996, 32, 579-585.
50. Koronelli T.V., Nesterova E.D. Ecological strategies of bacteria utilizing hydrophobic substrates. // Mikrobiologija, 1990, 59(6), 993-997
51. Laborda F., A.M., Pedregosa, I.Merimo, A. Moreno, J.M. Mingiuz, B. Pelaez, M.Manin.//In: Ecolog. effects of microorganism action. Materials of International conference. Vilnius, 1997, 32-46.
52. I'inskii, V.V., O.V. Porshneva, T.I.Komarova, T.V.Koronelli. The effect of petroleum hydrocarbons on the hydrocarbon-oxidizing bacteriocenosis in the southeast part of the Mozhaiskoe water storage basin. // Microbiology 67, 220–225
53. Lietuvos higienos normos HN 60:2004 "Pavojuingų cheminių medžiagų didžiausios leidžiamos koncentracijos dirvožemyje“, 2004
54. Liužinas R., K.Jankevičius, M.Kmita, A.Paškevičius, J.Repečkienė, M.Šalkauskas, L.Kalėdienė. Search for measure reducing oil adhesion.// Important aspects of environmental bioremediation. Eds. K.Jankevičius, R.Liužinas. V.: Apyaušris, 2005, p. 96-103.
55. Löser C., H.Seidel, P. Hoffman, A. Zehnsdorf. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil.// Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51, 105-111.
56. Lugauskas A., L. Kalėdienė. Micromycetes deteriorating polycomponental polymeric materials //10th International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation, sep. 15-18, 1996 Hamburg, Germany. biodeterioration and biodegradation. Book Series: Dechema Monographs //1996, 133, 255 – 264
57. Lugauskas A., L. Kalėdienė, D. Pečiulytė. Microbial deterioration of technical materials // Cheminė technologija. 1995, 2, 41 – 50
58. Lugauskas A., D. Pečiulytė, L. Kalėdienė, L. Levinskaitė. Mėsos pramonės atliekų mikrobiologinė utilizacijos galimybės // Biologija, 1993, 4, 40 - 44.
59. Lugauskas A., D. Bridžiuvienė, L.Levinskaitė, A.Paškevičius, D.Pečiulytė, J. Repečkienė, O. Salina, R.Varnaitė. Mikrobiologiniai medžiagų pažeidimai. Vilnius, 1997
60. Ma Y., Wang L. Shao Z. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. // Environ Microbiol, 2006, 8 (3), 455-465
61. Maier R.M., G. Soberon-Chavez. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications.// Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54, 625-633
62. Milo R.E., F.M. Duffner, R. Muller. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degrading *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. // Extremophiles, 1999, 3, 185–190.
63. Mishra S., J. Jyot,R.C. , B. Lal. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. // Appl Environ Microbiol 2001, 67, 1675-1681

64. Mishra V., R. Lal. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. // Crit Rev Microbiol, 2001, 27, 133–166
65. Morgan P., R. J. Watkinson. Hydrocarbon degradation in soil and methods for soil biotreatment. // Crit Rev Biotechnol, 1989, 8 (4), 305-328
66. Muller R., G. Antranikian, S. Maloney, R. Sharp. Thermophilic degradation of environmental pollutants. // Adv. Biochem Eng Biotechnol, 1998, 61, 155–169
67. Mulligan R., N. Yong, B.F. Gibbs. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. // Engineering Geology, 2001, 60, 371–380
68. Mutzel A., U. Reinscheid, G. Atranikian, R. Muller. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* strain, that degrades phenol and cresols as sole carbon source at 70°C. // Appl Microbiol Biotechnol, 1996, 46, 593–596.
69. Ono A., R. Miyazaki, M.Sota, Y.Ohtsubo, Y.Nagata, M.Tsuda. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches.// Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 74, 501–510
70. Pandey G., R.K. Jain. Bacterial Chemotaxis toward Environmental Pollutants: Role in Bioremediation.// Appl Environ Microbiol, 2002, 5789–5795
71. Parkinson S., M. Killham, K. Wainwright. Assimilation of ¹⁴CO₂ by *Fusarium oxysporum* grown under oligotrophic conditions. // Mycol Res, 1990, 94 (7), 959-964;
72. Philp R.W., A. Bruce, A. G. Munro. The effect of water soluble Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) and Sitka Spruce (*Picea sitchensis* (Bong) Carr.) heartwood and sawwood extracts on the growth of selected *Trichoderma* species. //Internat Biodeter Biodegrad, 1995, 35 (4), 355-367
73. Prince R.C. The microbiology of marine oil spill bioremediation. / In: Petroleum Microbiology. (Ed.) B. Ollivier, M.Magot. ASM Press, 2005, 317
74. Richard J.Y., T.M. Vogel. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel.// Int Biodet Biod, 1999, 44, 93–100
75. Robinson S., J. D. Schofield, R. A. Rastall. Essential carboxyl residues in the active site of a xylanase from *T. longibrachiatum*. //Phytochemistry, 1998, 49 (7), 1867-1874
76. Roffey R. Microbial problems during long-term storage petroleum products underground in rock caverns // International biodegradation, 1989, 25, (1-3), 243-248.
77. Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH.// FEMS Microbiol Lett, 2006, 262, (2), 129-134
78. Samanta S.K., A.K. Chakraborti, R.K. Jain. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol.// Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 53, 98–107
79. Seklemova E., A.Pavlova, K. Kovacheva. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: Field demonstration. //Biodegrad, 2001, 12, 311-316
80. Sempriani L., M.E. Dolan, M.A. Mathias, G.D. Hopkins, P. L. McCarty. Bioaugmentation of Butane-Utilizing Microorganisms for the In-situ Cometabolic Treatment of 1,1-Dichloroethene, 1,1-Dichloroethane, and 1,1,1-Trichloroethane. //Europ J Soil Biol, 2007, 43, 322-327.

81. Sharma V. K., M. Canditelli, F. Fortuna, G. Cornacchia. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: review. // *Energ convers manag*, 1997, 38 (5), 453-478.
82. Sidorov D.G., I. A. Borzenkov, E. I. Milekhina, S. S. Belyaev, M. V. Ivanov. Microbial destruction of fuel oil in soil induced by the biological preparation Devoroil. (In Russian). // *Priklad biokhim i mikrobiol*, 1998, 34(3), 281-286.
83. Smith R. K. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. // *Biodegradation*, 1990, 1, 191-206
84. Song H.G., R. Bartha. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. // *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56, 646-651
85. Spain J. Synthetic chemicals with potential for natural attenuation. // *Bioremed. J.* 1997, 1, 1-9
86. Studholme D.J., R.A. Jackson, D.J. Leak. Phylogenetic analysis of transformable strains of thermophilic *Bacillus* species. // *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 172, 85-90
87. Sutherland J. B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. // *J Ind Microbiol*, 1992, 9, 53-62
88. Tongpim S., M. A. Pickard. Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene trans-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene. // *Can J Microbiol.*, 1999, 45, 369-376
89. Tünde M., M. Tien. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. // *Intern Biot Biod*, 2000, 46 (1), 51-59
90. Webb J.S., H. C. Van der Mei, M. Nixon, I. M. Eastwood, M. Greenhalgh, S. J. Read, G. D. Robson, P.S. Handley. Plasticizers Increase Adhesion of the Deteriogenic Fungus *Aureobasidium pullulans* to Polyvinyl Chloride. // *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8), 3575-3581
91. Zhdanova N.N., T. Tugay, J. Dighton, V. Zheltonozhsky, P. Mcdermott. Ionizing radiation attracts soil fungi. // *Mycol Res*, 2004, 108, 1089-1096
92. Zylstra G. J., D. T. Gibson. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* Fl: nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expression in *E. coli*. // *J Biol Chem* 1989, 264, 14940-14946

ISBN 978-9955-33-417-0

Tiražas: 15 egz.