



Biologiczne związki powierzchniowo czynne i ich zastosowanie do oczyszczania gruntów z produktów naftowych

Maria Łebkowska

Instytut Systemów Inżynierii Środowiska, Politechnika Warszawska,
Warszawa

Surface active substances and their applications for oil pollutants removal

Summary

The article covers a review of data taken from different publications which are in connection with surface active substances (SAS) generated by microorganisms and their role in biodegradation processes of petroleum pollutants. The structure and properties of selected BSAS were described. The efficiency of hydrocarbons degradation in the presence of synthetic and natural SAS was characterized. The usefulness of biosurfactant for oil pollutants removal from the soil environment was pointed out.

Key words:

biological surface active substances, bioremediation.

Adres do korespondencji

Maria Łebkowska,
Instytut Systemów
Inżynierii Środowiska,
Politechnika Warszawska,
ul. Nowowiejska 20,
00-653 Warszawa.

biotechnologia

1 (64) 43-53 2004

Biodegradacja składników zawartych w produktach naftowych zależy m.in. od rozpuszczalności w wodzie oraz stanu rozdrobnienia cząsteczek umożliwiających ich pobór przez mikroorganizmy. Rozpuszczalność węglowodorów obniża się wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej, na przykład dla n-heksanu wynosi 12,3 mg/l, dla n-dekanu – 0,05 mg/l, a dla n-eikosanu – $3,1 \times 10^{-7}$ mg/l (1). Wiele drobnoustrojów zdolnych do zużycia

węglowodorów jako źródeł węgla i energii wytwarza biologiczne związki powierzchniowo czynne (BZPC), które obniżają napięcie powierzchniowe i emulgują zanieczyszczenia ropopochodne. Mikroemulsje oraz hydrofobowa powierzchnia komórek drobnoustrojów sprzyjają asocjacji kropeł węglowodorów i ułatwiają ich transport przez hydrofobowe kanały błony cytoplazmatycznej. Ponadto BZPC przyczyniają się do desorpcji węglowodorów zaadsorbowanych w organicznych kompleksach glebowych. BZPC obniżając napięcie powierzchniowe zwiększają powierzchnię zajmowaną przez składniki hydrofobowe, podobnie jak obniżając napięcie międzyfazowe pomiędzy niemieszającymi się cieczami tworzą powierzchnię dodatkową, umożliwiając ich mieszanie. Zjawiska te wywołane są wzrostem energii swobodnej układu, wynikającym z braku możliwości tworzenia wiązań wodorowych części lipofilowej w fazie wodnej. Obniżenie energii swobodnej następuje poprzez adsorpcję części hydrofobowej na organicznej matrycy lub poprzez tworzenie miceli – po przekroczeniu krytycznego stężenia micelnego (CMC). CMC to minimalne stężenie ZPC przy którym wolne monomery tworzą agregaty miceli. W miceli fragment lipofilowy cząsteczki ZPC wnika do fazy olejowo-węglowodorowej tworząc rdzeń pseudofazy hydrofobowej, a fragment hydrofilowy jest zanurzony w fazie wodnej. Wzrasta stopień dyspersji związków niepolarnych w roztworze ponad granicę rozpuszczalności w wodzie. Film (błona) wokół cząsteczki węglowodorowej charakteryzuje się wystarczającą wartością napięcia powierzchniowego, które zabezpiecza krople przed połączeniem (koalescencją). Obecność ZPC w glebie zwiększa stężenie składników hydrofobowych w fazie wodnej. Jonowe BZPC „rozpuszczają” alkany wskutek tworzenia miceli, a obojętne BZPC – tworzą na powierzchni komórek hydrofobowy film umożliwiający przyleganie mikrokropeł węglowodorów. BZPC charakteryzują się znacznie niższymi wartościami krytycznych stężeń micelarnych aniżeli ZPC syntetyczne (tab. 1) (2).

Tabela 1

Porównanie wartości napięcia powierzchniowego (NP) i napięcia międzyfazowego (NMF) oraz krytycznego stężenia micelnego (CMC) biologicznych i syntetycznych ZPC (2)

ZPC	NP (mN/m)	NMF (mN/m)	CMC mg/l
kompleks glikolipidu <i>Rhodococcus ruber</i>	26,8	0,9	54
dikorynomykolan trehalozy <i>R. erythropolis</i>	36,0	17,0	4,0
tetraester trehalozy <i>R. erythropolis</i>	26,0	< 1,0	15
ramnolipidy <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29,0	0,25	50-200
surfaktyna <i>Bacillus subtilis</i>	27,0	1,0	23
dodecylosiarczan sodu	37,0	0,02	2120
Tween 20	30,0	4,8	600
liniowy alkilobenzenosulfonian	47,0	< 1,0	590

Na właściwości fizyczno-chemiczne BZPC i syntetycznych ZPC wpływa równoważnik hydrofilo-lipofilowy (HLB); niska wartość równoważnika wskazuje na przewagę lipofilowości, a wysoka – na lepszą rozpuszczalność w wodzie. W tabeli 2 podano wartości HLB dla niejonowych ZPC i wynikające z tych wartości – zastosowania (2).

Tabela 2

Zastosowania niejonowych ZPC w zależności od wartości HLB (2)

HLB	Zastosowanie
< 3	filmy (błony) powierzchniowe
3-6	emulsje woda w oleju
7-9	czynniki nawilżające
8-15	emulsje olej w wodzie
13-15	detergenty
15-18	solubizery

Mikroorganizmy produkują niskocząsteczkowe ZPC jak glikolipidy i lipopeptydy (tab. 3). Wśród glikolipidów wyróżnić można tetraestry trehalozy, dikorynomykolony, fruktozolipidy, soforo- i ramnolipidy. Część cukrowa połączona jest z kwasami tłuszczowymi wiązaniami glikozydowymi (2). Na rysunku 1 przedstawiono strukturę ściany komórkowej *Mycobacterium* (Mycolata) z uwzględnieniem lokalizacji kwasów mykolowych (3).

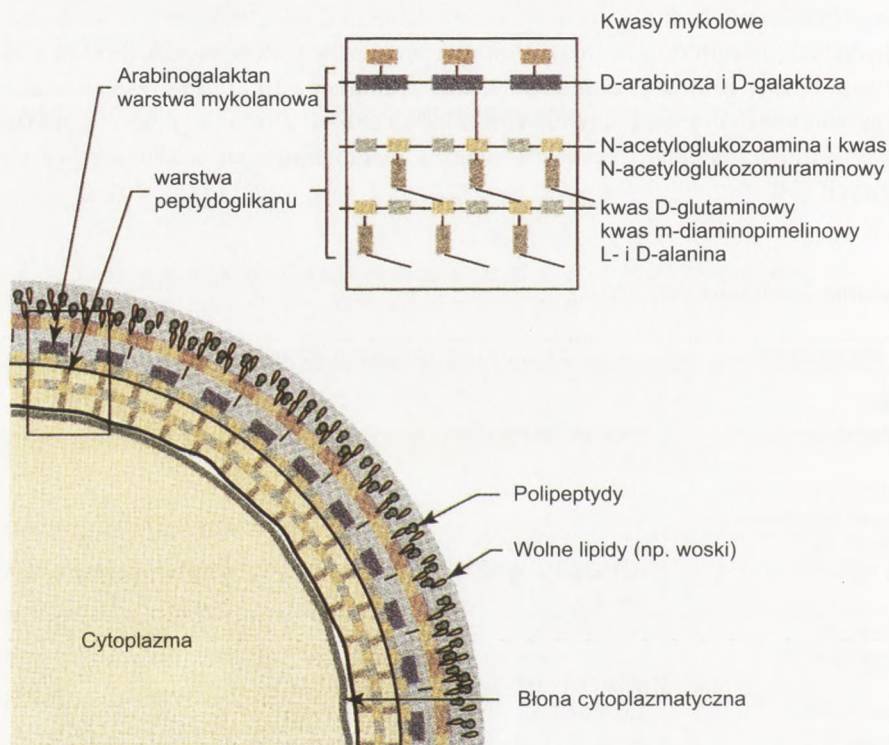
Tabela 3

Mikroorganizmy wytwarzające BZPC (2)

Mikroorganizmy 1	Typ BZPC 2
bakterie	
<i>Acinetobacter</i> spp.	emulsan (lipoheteropolisacharyd); lipopeptydy, kwasy tłuszczowe, mono- i diglicerydy
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	alasan
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	glikolipid
<i>Arthrobacter</i> spp.	glikolipidy, lipopeptydy, heteropolisacharydy
<i>Bacillus</i> spp.	surfaktyna , ramnolipidy, kompleksy hydrokarboproteinowe, polimyksyna, gramicydyna
<i>Clostridium</i> spp.	lipidy obojętne
<i>Corynebacterium</i> spp.	kwasy korynomykolowe, kwasy tłuszczowe, acylogluchoza, fosfolipidy, kompleksy polisacharydo-białkowe
<i>Mycolata-Nocardia</i>	glikolipidy, lipidy obojętne i kwasy tłuszczowe
<i>Rhodococcus</i>	dimykolony i dikorynomykolony trehalozy
<i>Pseudomonas</i> spp.	wiskozyna , ornityna , glikolipidy
<i>Serratia</i> spp.	serrawettyna , rubiwettyna
<i>Thiobacillus</i> spp.	fosfolipidy

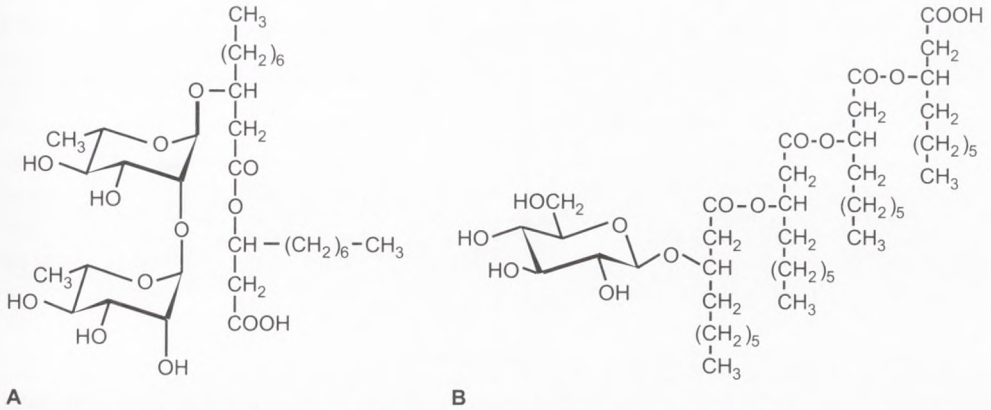
1	2
<p>grzyby <i>Candida bombicola</i> i <i>Pseudozyma</i> <i>(Candida) antarctica</i> <i>Torulopsis</i></p>	<p>liposan (głównie węglowodany), glikolipidy, soforolipidy peptydylipidy, kompleksy polisacharydów z kwasami tłuszczowymi glikolipidy, białka</p>

Do grupy Mycolata należą 3 rodziny *Actinomycetes* – *Corynebacteriaceae*, *Nocardiaceae*, (w tym rodzaj *Rhodococcus*), *Mycobacteriaceae*, które w ścianie komórkowej zawierają kwasy mykolowe. Kwasy te związane są z warstwą arabinozo-galaktozową połączoną wiązaniami fosfodiesterowymi z jednostkami kwasu muraminowego peptydoglikanu. *Nocardia* i *Rhodococcus* to tlenowe laseczki, na ogół gramdodatnie, częściowo kwasooporne. *Rhodococcus* rośnie na podłożach nieselektywnych. Lipopeptydy to m.in. surfaktyna, wiskozyna i polimyksyna. BZPC niskocząsteczkowe obniżają napięcie powierzchniowe i międzofazowe, ale na ogół nie stabilizują emulsji. Wielko-

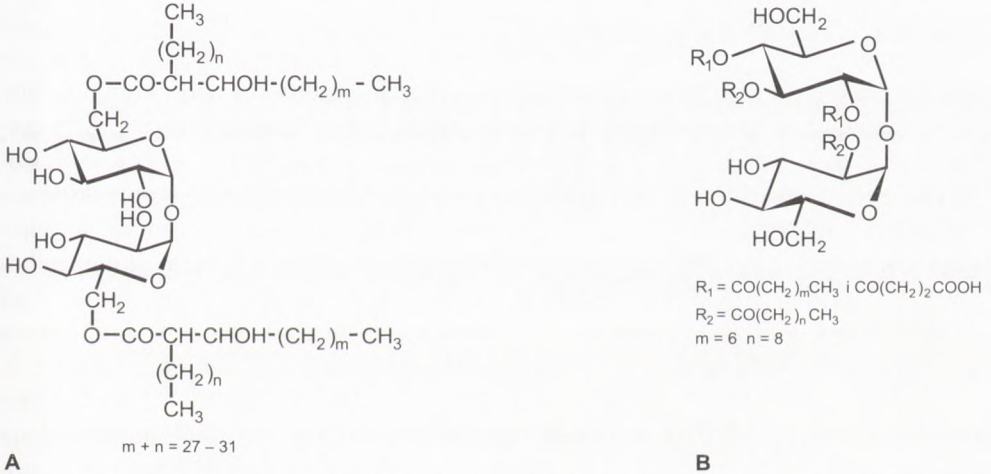


Rys. 1. Struktura ściany komórkowej *Mycolata* (*Mycobacterium* sp.).

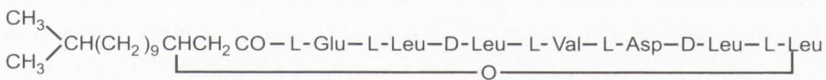
cząsteczkowe BZPC to (lipo) polisacharydy i (lipo) proteiny stabilizujące emulsje, ale nie obniżające napięcia powierzchniowego. Umożliwiają jak emulsan i liposan adhezję bakterii do powierzchni hydrofobowych. Na rysunkach 2, 3, i 4 przedstawiono budowę chemiczną wybranych BZPC (1).



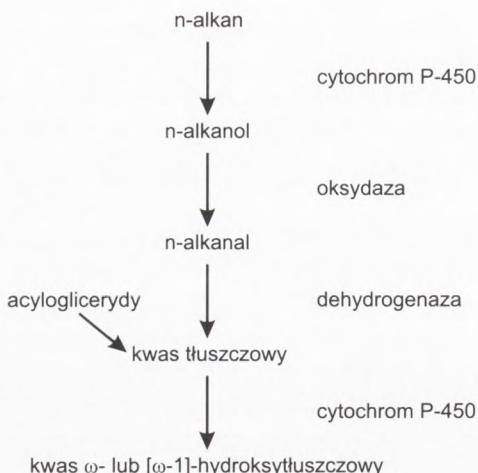
Rys. 2. A. Glikolipid *Pseudomonas aeruginosa* (1). B. Glikolipid *Alcaligenes* sp. (1).



Rys. 3. A. Dikorynomykolan trehalozy *Rhodococcus erythropolis* (1). B. Tetraester trehalozy *Rhodococcus erythropolis* (1).



Rys. 4. Surfaktyna *Bacillus subtilis* (1).



Rys. 5. Utlenianie alkanu do kwasów hydroksytłuszczowych (1).

Biosynteza BZPC obejmuje formowanie części hydrofilowej i hydrofobowej cząsteczki. Stwierdzono, że procesy te zachodzą bez- i z wykorzystaniem substratu wzrostowego. Dotyczy to zarówno równoległej syntezy obu części hydrofilowej i hydrofobowej jak i produkcji poszczególnych części BZPC.

Jedną z dróg tworzenia kwasów hydroksytłuszczowych może być wykorzystanie n-alkanu obecnego w podłożu jako substratu (rys. 5) (1). Ramnoza uzyskana z glukozy, jest prekursorem syntezy ramnolipidów wydzielanych na zewnątrz komórek. Mikroorganizmy rosnące na podłożach zawierających węglowodory tworzą estry trehalozy, fruktozy i sacharozy z kwasami mykolowymi. Kwasy te to niehydroksylowane i długołańcuchowe α -alkilo- β -hydroksylowane kwasy tłuszczowe; na przykład trimykolan trehalozy zawiera C_{67-74} . Fiebig i wsp. (4) wyizolowali mieszaninę glikolipidów z komórek *Pseudomonas cepacia* rosnących na podłożu z olejem słonecznikowym. W warunkach wzrostu limitowanego tlenem i azotem uzyskano około 7 g/l BZPC z 300 l hodowli. Drobnoustroje, oprócz estrów stanowiących komponenty ściany komórkowej wytwarzają inne składniki jak wolne kwasy korynomykolowe, lipopeptydy, fosfolipidy, tłuszcze obojętne i ich alkoholowe pochodne, wydzielane pozakomórkowo. BZPC o właściwościach emulgujących jak emulsan produkują szczepy *Acinetobacter calcoaceticus* rosnące na podłożu z węglowodorami lub etanolem. Emulsan stanowią polisacharydy, kwasy tłuszczowe i białka będące elementami ściany komórkowej. Źródłem emulgatorów u *Bacillus cereus* rosnących na podłożu z węglowodanami jest ściana komórkowa (1). Już w 1980 r. Cooper i Zajic (5) opublikowali obszerną monografię na temat wytwarzania i zastosowania BZPC.

Porównując możliwości stosowania BZPC i ZPC syntetycznych należy podkreślić, że BZPC są mniej toksyczne dla mikroorganizmów aniżeli syntetyczne (tab. 4) (2), posiadają niższe wartości CMC, ulegają biodegradacji, nie wymagają szczególnych

metod oczyszczania. W procesach przemywania zanieczyszczonego gruntu są odzyskiwane i mogą być ponownie wprowadzane do środowiska. Możliwości te są istotne z uwagi na fakt, że produkcja BZPC na skalę przemysłową jest znacznie droższa aniżeli syntetycznych ZPC. Chociaż uznaje się pogląd o niewielkiej toksyczności BZPC w odniesieniu do mikroorganizmów to jednak pojawiają się dane w piśmiennictwie o niektórych związkach posiadających znaczne właściwości antybakteryjne i antygrzybowe. Habe i wsp. (6) wyizolowali ramnolipid RL_{47T2} z komórek *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044 rosnących na ściekach zawierających olej stosowany do smażenia. Produkt wykazał obniżenie napięcia powierzchniowego do 32,8 mN/m i napięcia międzyfazowego wobec nafty do 1 mN/m, CMC = 108,8 mg/l. Wydajność produkcji ramnolipidu wynosiła 0,93 g/g białka z biomasy bakterii – 8,7 g/l. Określono wartości minimalne stężeń tego BZPC hamujące wzrost mikroorganizmów (MIC) o cechach patogennych (tab. 5). Autorzy zalecają stosowanie ramnolipidu RL_{47T2} do bioremediacji w przemyśle spożywczym i agrochemicznym.

Tabela 4

Porównanie toksyczności biologicznych i syntetycznych ZPC (2)

ZPC	EC ₅₀ (mg/l)
kompleks glikolipidu <i>Rhodococcus ruber</i> AC 235	650
dikorynomykolan trehalozy <i>R. erythropolis</i>	49
tetraester trehalozy <i>R. erythropolis</i>	286
ramnolipidy <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
nonylofenolo (-etyleno) ₉ -octan (EQ 9)	78
stearynian sacharozy (DK 50)	67
Finasol OSR-5	7
Corexit 9597	5
Inipol EAP 22	0-004

W praktyce do bioremediacji gruntów najczęściej wykorzystuje się syntetyczne ZPC, które jednak stwarzają problemy w przebiegu procesów. Mogą wywierać toksyczny wpływ na mikroorganizmy i obniżać dostępność substratów zawartych w micelach; są także dość odporne na biodegradację. Wśród wielu prac prowadzonych z użyciem syntetycznych ZPC na uwagę zasługują badania Carmichael i Pfaendera (7). Autorzy stwierdzili, że niejonowe ZPC Triton X-100 w stężeniach od 1 do 0,5% i Inipol EAP-22 w stężeniu 1,66 ml/l hamowały biochemiczny rozkład fenantrenu, wykazując raczej efekty toksyczne aniżeli oddziaływania ich stężeń przekraczających wartości CMC. Chen i wsp. (8) określili wpływ 2 anionowych ZPC (dodecylsulfianu sodu – SDS i dodecylbenzenosulfonianu sodu – SDBS) oraz 2 niejonowych ZPC (POE i CA-620) na biodegradację naftalenu i fenantrenu w glebie, jak rów-

niez oddziaływanie węglowodorów na biochemiczny rozkład tych ZPC. Wykazano, że na ogół, ZPC charakteryzowały się negatywnym wpływem na degradację naftalenu i fenantrenu, z wyjątkiem SDS, który nie hamował rozkładu naftalenu. Obecność węglowodorów obniżała efektywność biodegradacji ZPC. Należy jednak podkreślić, że w badaniach użyto znaczne stężenie SDS-600 mg/l, które stanowiło 1/4 micelarnego stężenia krytycznego. Autorzy wskazali, że do celów praktycznych należy stosować ZPC ulegające powolnej biodegradacji, ponieważ odporne na rozkład ZPC pozostają w środowisku, a szybko degradowane nie są wydajne, bo zwiększają koszty procesu bioremediacji. Spośród badanych ZPC wybrano SDS wspomagający biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych przez szczepy bakterii adaptowane do rozkładu naftalenu. Mennen i wsp. (9) nie zaobserwowali wpływu ZPC na efekt biodegradacji oleju napędowego w glebie. Dodatek ZPC do zanieczyszczonego gruntu wiąże się z koniecznością jego rozkładu. Rittmann i wsp. (10) stwierdzili, że biodegradacja liniowego alkilobenzenosulfonianu (LAS) zależy od jego sorpcji – im wyższe stężenie w zakresie 1-10 mg/l, tym efekt rozkładu był większy, ale w ciągu 30-60 min; następnie efekt rozkładu znacznie uległ obniżeniu, a autorzy tłumaczyli to zjawisko międzyfazowym transportem masy. Z kolei Yadav i wsp. (11) badając degradację LAS przez grzyby wykazali, że ulega całkowitemu rozkładowi w stężeniach ≤ 4 mg/l, a powolnej biodegradacji – w wyższych stężeniach.

Tabela 5

Mikrobiologiczne właściwości RL_{47T2} (6)

Mikroorganizmy	MIC (mg/l)
1	2
gramujemne	
<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC 16028	128
<i>Proteus mirabilis</i> CECT 170	>256
<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 689	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	64
<i>Serratia marcescens</i> CECT 274	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CECT 17832	0,5
<i>Alcaligenes faecalis</i> ATCC 8750	64
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 22636	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	256
<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 461	128
gramododatnie	
<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 8010	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	32
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoide</i> ATCC 11778	64
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9631	64
<i>Mycobacterium phlei</i> ATCC 41423	128
<i>Clostridium perfringens</i>	128

1	2
drożdże	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>256
<i>Rhodotorula rubra</i> CECT 1158	>256
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	>256
pleśnie	
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 14604	>256
<i>Chaetonium globosum</i> ATCC 6205	64
<i>Penicillium chrysogenum</i> CECE 2802	>256
<i>Penicillium funiculosum</i> CECE 2914	16
<i>Aureobasidium pullulanas</i> ATCC 9348	>256
<i>Gliocadium virens</i> ATCC 4645	32
<i>Botrytis cinerea</i>	170
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	276
<i>Rhizoctonia solani</i>	109
<i>Fusarium solani</i>	75

W ostatnich latach rozpoczęto intensywne prace nad możliwością wykorzystania BZPC w procesach remediacji gruntów. Dohse i Lion (12) udowodnili, że zewnątrzkomórkowe polimery bakterii glebowych biorą udział w desorpcji fenantrenu i jego transporcie w środowisku. Oberbremer i wsp. (13) wykazali, że BZPC ulegają biodegradacji po wyczerpaniu węglowodorów jako źródeł węgla. Page i wsp. (14) stwierdzili, że BZPC *Rhodococcus* H13-A był 35-krotnie bardziej efektywny w zwiększeniu transferu masy policyklicznych węglowodorów aromatycznych do fazy wodnej aniżeli Tween 80. Szeroki zakres badań nad BZPC *Rhodococcus* spp. wykonywano w laboratoriach Szkocji i Rosji (2). Wyizolowane szczepy tych bakterii charakteryzowały się zdolnością obniżania napięcia powierzchniowego do około 26-28 mN/m (kontrolna próba – 64 mN/m), a napięcia międzyfazowego do około 1,3-6,3 mN/m (kontrola – 38 mN/m); krytyczne stężenie micelarne zawierało się w granicach 16-128 mg/l. Wykazano, że BZPC wyizolowane z komórek *Rhodococcus ruber* AC 235 były 100-1000-krotnie mniej toksyczne aniżeli syntetyczne ZPC (Inipol EAP22, Corexit 9597, Finasol OSR-5), 2-10-krotnie mniej szkodliwe aniżeli trehalozolipidy *R. erythropolis* i 13-krotnie aniżeli ramnolipidy *Pseudomonas aeruginosa*. Wprowadzenie szczepów *Rhodococcus* zdolnych do degradacji alifatycznych i aromatycznych węglowodorów do zanieczyszczonego gruntu przyspieszyło proces biodegradacji o 20-25% i skutkowało obniżeniem zawartości ropopochodnych 75,5% w 3 miesiące (przy początkowej wysokiej ich zawartości w gruncie – 4,3%). Do ekstrakcji BZPC produkowanych przez *Rhodococcus* ssp. zastosowano eter metylo-tert butyloowy (MTBE) i sonifikację komórek. Z danych piśmiennictwa wynika, że etery, w tym MTBE, są stosowane jako dodatki tlenowe do benzyn w ilości 2,7%, zastępujące związki ołowiu i inne toksyczne komponenty (15). Stąd też w gruntach zanieczyszczonych benzyną zawierającą MTBE, do których wprowadzone są szczepy *Rhodococcus* może nastąpić wymywanie BZPC z komórek do środowiska, przyspieszając „rozpuszczanie” węglowodorów.

Podkreślić także należy, że MTBE ulega biodegradacji, m.in. przez bakterie utleniające propan. Steffan i wsp. (16) stwierdzili, że MTBE w stężeniu 20 mg/l jest rozkładany w > 60% w czasie krótszym niż 30 godzin.

Zdolność drobnoustrojów do przeżycia w mikro- i makroemulsjach „woda w oleju” oraz zachowanie aktywności katalitycznej enzymów (17) nawet przez kilka tygodni, wykazuje możliwości biodegradacji węglowodorów w gruntach w obecności emulgatorów w dłuższym czasie. BZPC wykorzystać można nie tylko do oczyszczania gruntów z produktów ropopochodnych, ale także z innych zanieczyszczeń jak PCB i metali ciężkich. Sadowski (18) w obszernej publikacji przedstawił możliwości zastosowania BZPC w procesach wydobywania ropy naftowej ze złóż w obecności solanki i gazu ziemnego. Wprowadzenie BZPC powoduje zmniejszenie napięcia międzyfazowego na granicy ropa naftowa/solanka lub woda, oderwanie filmu olejowego od powierzchni minerałów złoża i emulgację ropy. Emulgacja piasków roponośnych wymaga kolejnego etapu – deemulgacji mającej na celu uzyskanie ziaren mineralnych z granicy faz olej/woda we frakcji wodnej i przeniesienie emulgatora do fazy hydrofobowej. Stwierdzono, że BZPC jak m.in. mannan i glukomannan z drożdży i dekstran z *Leuconostoc* posiadają właściwości deemulgujące.

W świetle tych informacji, jak się wydaje, celowe jest prowadzenie badań nad sposobami hodowli mikroorganizmów produkujących BZPC i metodami uzyskiwania tych substancji na skalę przemysłową. Szeroki zakres zastosowania BZPC potwierdza celowość takich przedsięwzięć.

Literatura

1. *Biochemistry of Microbial Degradation*, (1994), Ed. Ratledge C., Kluwer-Academic Publishers, Dordrecht.
2. Christofi N., Ivshina I. B., (2002), *Journal of Applied Microbiology*, 93, 915-929.
3. Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A., (1998), *Medical Microbiology*, Mosby, St. Louis, USA.
4. Fiebig R., Schulze D., Chung J-C., Lee S-T., (1997), *Biodegradation*, 8, 67-75.
5. Cooper D. G., Zajic J. E., (1980), *Advances in Applied Microbiology*, 26, 229-253.
6. Habá E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infantes M.R., Manresa A., (2003), *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 3, 316-322.
7. Carmichael L. M., Pfaender F. K., (1997), *Biodegradation*, 8, 1-13.
8. Chen G., Strevett K. A., Vanegas B. A., (2001), *Biodegradation*, 12, 433-442.
9. Mennen G., Gerards R., Bamps S., Vriens L., Verachert H., (1995), *In-situ treatment of soil and groundwater polluted with Diesel*, Med. Fac.Landbouww. Univ. Gent, 60/4b.
10. Rittmann B. Z., Tularak P., Lee K., Federle T. W., Itrich N. P., Kaiser S. K., Shi J., McAvoy D. C., (2001), *Biodegradation*, 12, 31-37.
11. Yadav J. S., Lawrence D. L., Nuck B. A., Federle T. W., Reddy C. A., (2001), *Biodegradation*, 12, 443-453.
12. Dohse D. M., Lion L. W., (1994), *Environ. Sci. Technol.*, 28, 541-548.
13. Oberbremer A., Müller-Hurtig R., Wagner F., (1990), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 485-489.
14. Page C. A., Bonner J. S., Kanga S. A., Mills M. A., Autenrieth R. L., (1999), *Environmental Engineering Science*, 16, 465-474.

15. Merkisz J., Kozak M., (1999), *Wymagania stawiane paliwom silnikowym przez współczesne silniki spalino-*we, Materiały II Międzynarodowej Konferencji „Rozwój technologii paliw w świetle dyrektyw europejskich i narodowych uregulowań normatywnych”, Centralne Laboratorium Naftowe, Warszawa, 1-17.
16. Steffan R., McClay K., Vainberg S., Condee C. W., Zhang D., (1997), *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4216-4222.
17. Stefan A., Palazzo G., Ceglic A., Panzavolta E., Hochkoepler A., (2003), *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 3, 323-328.
18. Sadowski Z., (1995), *Wiadomości Chemiczne*, 49, 591-607.