

ZMIANY AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ GLEBY
W PROCESIE BIODEGRADACJI ZANIECZYSZCZEŃ
ROPOPOCHODNYCH PRZY ZASTOSOWANIU
BIOPREPARATÓW

WIOLETTA PRYZYTAŚ, KORNELIUSZ MIKSCH,
ANNA MAŁACHOWSKA-JUTSZ

Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej,
ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice

Keywords: enzymatic activity, petroleum contamination, bioremediation, biodegradation.

CHANGES IN ENZYMATIC ACTIVITY IN BIOREMEDIATION
OF PETROLEUM – CONTAMINATED SOIL WITH USE OF
BIOLOGICAL PREPARATIONS

Changes in activity of amylase, cellulase, protease and dehydrogenase during biodegradation of petroleum contaminants were investigated in laboratory studies. Refinery soil polluted for a long time was modified by commercial biological preparation and natural biological preparation (prepared from this soil). These modifications did not influence cellulase and protease activity. Activity of amylase and dehydrogenase changed in these samples. In the sixth week the highest activity of dehydrogenase was noticed, especially in soil with commercial biological preparation. Modifications had a great influence on contaminants degradation.

The highest elimination of TPH (20,4%) and heavy fractions (10,5%) took place in soil modified by commercial biological preparation. The highest PAH elimination was in soil with natural bacterial preparation.

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie przydatności testów enzymatycznych do kontroli procesu biodegradacji substancji ropopochodnych. Oceniano zmiany aktywności wybranych enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy glebowe (dehydrogenaz, celulaz, proteaz i amylaz) w trakcie procesu degradacji zanieczyszczeń ropopochodnych. Podczas doświadczenia wazonowego stosowano glebę pochodzącą z terenu rafinerii, narażoną na długotrwałe działanie ropopochodnych. Jako modyfikacje, mające na celu polepszenie warunków usuwania zanieczyszczeń, wprowadzono biopreparat naturalny i biopreparat dostępny w handlu. Zastosowane modyfikacje nie wywarły wyraźnego wpływu na aktywność celulaz i proteaz. W przypadku amylaz i dehydrogenaz zaobserwowano

natomiast znaczne wahania ich aktywności w próbach zmodyfikowanych. Zastosowanie biopreparatów wpłynęło jednak w znaczący sposób na stopień usunięcia węglowodorów ropopochodnych. W glebie z biopreparatem handlowym zostało usuniętych najwięcej frakcji ciężkich – 10,5% i węglowodorów ropopochodnych TPH – 20,4%, w glebie z biopreparatem naturalnym natomiast odnotowano najwyższy stopień usunięcia WWA, zwłaszcza tych o dużej liczbie pierścieni.

WSTĘP

Coraz częściej w codziennej prasie pojawiają się informacje o skażeniu środowiska substancjami ropopochodnymi. Zagrożenie stanowią zakłady rafinerijne i petrochemiczne oraz terminale paliw płynnych, eksploatacja górnictwa, transport, magazynowanie, manipulacja i dystrybucja produktów ropopochodnych, a także transport samochodowy i kolejowy [13]. Silne skażenie gruntów ropą naftową powoduje obniżenie plonowania roślin, destrukcję materiału siewnego, zmianę warunków geotechnicznych i powietrzno-wodnych w glebie [7]. Substancje ropopochodne działają toksycznie na florę i faunę. Akumulując się w tkankach powodują zatrucia i śmierć organizmów żywych [13], gdyż zanieczyszczona gleba traci swoją aktywność biologiczną i nie odzyskuje jej nawet po upływie kilkunastu lat [9, 11, 13].

Ważną grupę wskaźników aktywności biologicznej gleb stanowią procesy metaboliczne drobnoustrojów, a wśród nich pomiary ilości CO₂ uwolnionego w procesach oddychania, mierzenie poziomu ATP oraz określenie aktywności enzymatycznej. Aktywność enzymatyczna może być miarą żyzności i produktywności gleby bardziej niż inne wskaźniki biologiczne, np. liczebność mikroorganizmów [9]. Reakcje enzymatyczne są podstawą metabolizmu glebowego, decydują o szybkości i kierunku przemian metabolicznych zachodzących w glebie [9, 11]. Wszystkie procesy zachodzą w środowisku o określonych parametrach fizykochemicznych, a zmiana jakiegokolwiek z nich ma swoje konsekwencje – m.in. w zmianie szybkości procesów enzymatycznych [9].

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania prowadzono na glebie skażonej substancjami ropopochodnymi pochodzącej z terenu rafinerii.

Powietrznie suchą glebę, przesianą przez sito o średnicy oczek 1 mm, umieszczono w postaci dwukilogramowych naważek w wiadrach i doprowadzono do wilgotności 25% wagowych (wilgotność na tym poziomie utrzymywano przez cały czas trwania eksperymentu). Tak przygotowane próbki pozostawiono w temperaturze pokojowej przez siedem dni w celu uaktywnienia mikroflory i ustalenia się równowagi biologicznej w glebie.

Do uaktywnionej gleby wprowadzono następujące modyfikacje:

- biopreparat naturalny,
- biopreparat handlowy.

Jako biopreparat naturalny zastosowano najbardziej aktywną mikroflorę z naturalnie bytujących w badanej glebie, namnożoną na pożywce YS z wycią-

giem glebowym. Całość doprowadzono do gęstości optycznej odpowiadającej 70% transmitacji i w ilości 100 cm³ wiano do 2 kg gleby.

Jako biopreparat handlowy zastosowano preparat BIO ACTIV HGS (nr atestu PZH HK/III–6/632/94) przeznaczony dla przemysłu naftowego, który miał degradować węglowodory, smary, ropopochodne i związki siarki. Wprowadzono go w ilości zalecanej przez producenta.

We wstępnych badaniach liczebności mikroorganizmów w modyfikowanych próbach stwierdzono obecność 10⁶ bakterii w gramie gleby.

Wykonano następujące pomiary aktywności:

– celulaz C_x – metodą wiskozymetryczną opartą na pomiarze spadku lepkości roztworu karboksymetylocelulozy po jej hydrolizie przez celulazę C_x [10];

– proteaz – metodą wiskozymetryczną opartą na pomiarze spadku lepkości żelatyny po jej rozkładzie przez proteazy [10];

– amylaz – kolorymetrycznie metodą Nelsona opartą na oznaczeniu cukrów redukujących powstałych po enzymatycznej hydrolizie skrobi [10];

– dehydrogenaz – metodą kolorymetryczną z użyciem chlorku 2,3,5-trójfenylotetrazolowego (TTC) jako akceptora wodoru w łańcuchu oddechowym [6].

Oznaczenia aktywności enzymów glebowych wykonano pięciokrotnie w odstępach dwutygodniowych.

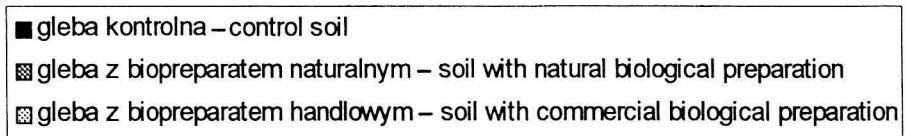
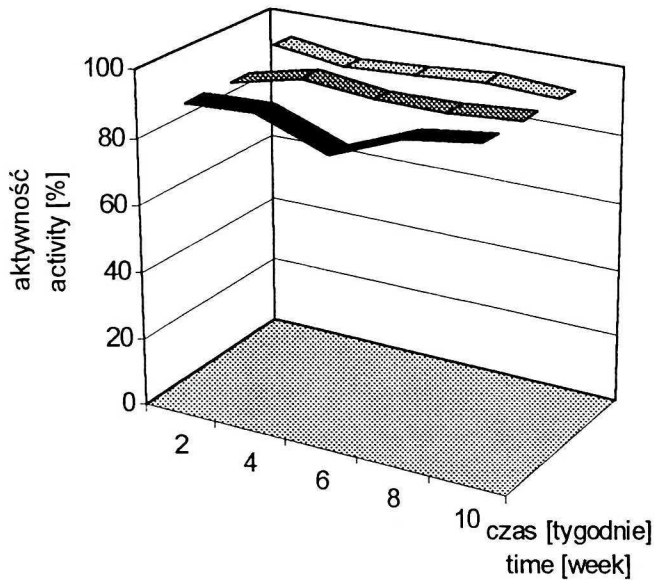
Na wstępie i po zakończeniu badań przeprowadzono analizę gleby pod względem zawartości WWA (15 węglowodorów aromatycznych) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z detekcją fluorescencyjną, frakcji ciężkich – metodą wagową, i węglowodorów ropopochodnych TPH metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID.

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Wprowadzone do gleby modyfikacje nie wywarły wyraźnego wpływu na aktywność proteaz. Zmiany aktywności tych enzymów przedstawiono na rysunku 1. Zaobserwowano, że we wszystkich próbach przez cały okres badań aktywność proteaz była zbliżona i wynosiła około 92% – zarówno w próbach, gdzie zaobserwowano znaczny stopień usunięcia zanieczyszczeń, jak i w próbie kontrolnej, gdzie ich eliminacja była niewielka.

Należy pamiętać, że proteoliza zachodzi dzięki enzymom wydzielanym przez mikroorganizmy żyjące w glebie oraz enzymom zaadsorbowanym na koloidach glebowych [5]. Prawdopodobnie właśnie takie właściwości tych enzymów oraz to, iż proces ten prowadzony jest przez różne drobnoustroje, wśród których znajdujemy wszystkie podstawowe grupy mikroorganizmów, wpłynęły na tak wysoką i stałą ich aktywność. Proteazy są bowiem wytwarzane zarówno przez grzyby, jak i przez bakterie [5, 11].

Takimi samymi właściwościami charakteryzują się celulazy. To właśnie mogło spowodować, iż w przypadku tych enzymów również nie zaobserwowa-

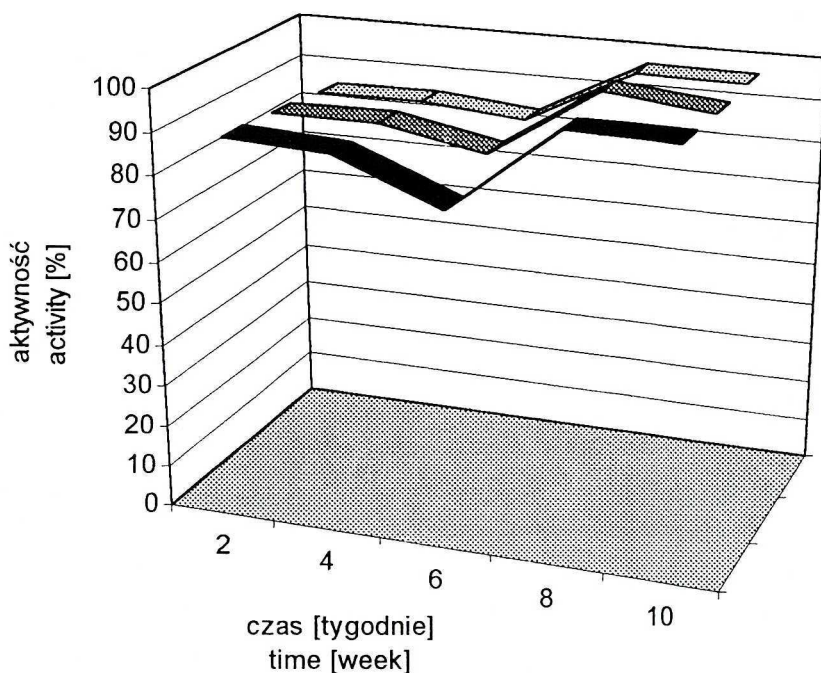


Rys. 1. Zmiany aktywności proteolitycznej w czasie badań
Changes in activity of protease

no wyraźnego wpływu zastosowanych modyfikacji (Rys. 2) na ich aktywność. Aktywność celulolityczna wszystkich prób pod koniec procesu osiągnęła zbliżony poziom, niezależnie od rodzaju zastosowanej modyfikacji. Nie zaobserwowano wpływu procesu degradacji zanieczyszczeń na aktywność celulaz.

W przypadku aktywności celulolitycznej również znanych jest wiele form mikroorganizmów zdolnych do rozkładu celulozy. W rozkładzie celulozy udział biorą bakterie tlenowe i beztlenowe, termo- i mezofilne, liczne gatunki grzybów, promieniowce i pierwotniaki, a celuloza dla większości z tych organizmów jest jednym z wielu możliwych źródeł węgla i energii [11]. Celulazy również mogą być sorbowane przez minerały ilaste i substancje humusowe i w ten sposób zabezpieczone przed czynnikami destrukcyjnymi [9, 11]. Dzięki wiązaniu się z tymi substancjami odwracalnie na zasadzie wymiennicy jonowych aktywność enzymów może być stymulowana lub obniżana. Wiązanie takie zapobiega degradacji enzymów przez mikroorganizmy glebowe lub przynajmniej procesy te spowalnia [9].

Zmiany aktywności amylaz przedstawiono na rysunku 3. W drugim tygodniu badań zaobserwowano znacznie wyższą aktywność amylaz w glebie z biopreparatem naturalnym i w glebie z biopreparatem handlowym niż w glebie kontrolnej. Aktywność amylolityczna w glebie kontrolnej w czasie ekspery-



- gleba kontrolna – control soil
- ▨ gleba z biopreparatem naturalnym – soil with natural biological preparation
- ▩ gleba z biopreparatem handlowym – soil with commercial biological preparation

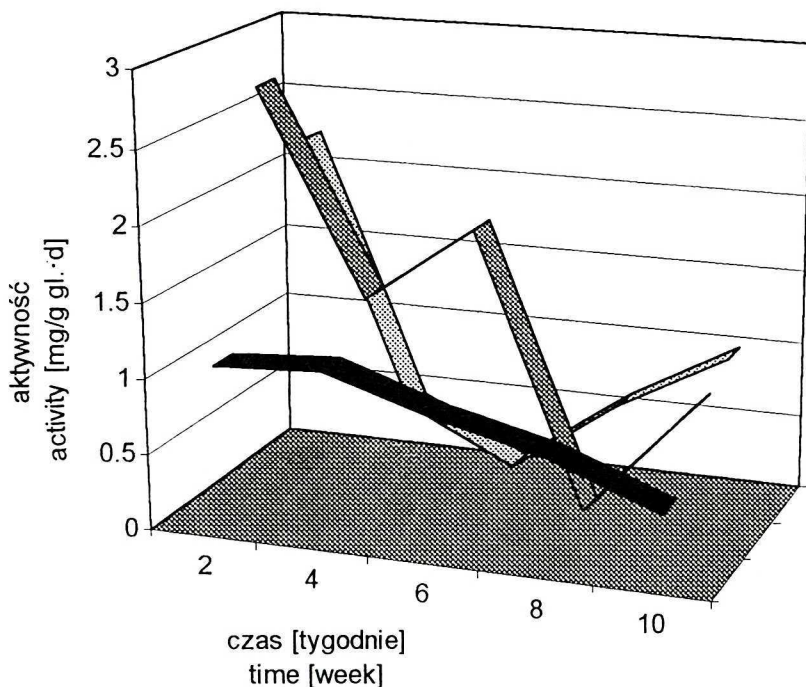
Rys. 2. Zmiany aktywności celulolitycznej w czasie badań
Changes in activity of cellulase

mentu stopniowo spadała. Najwyższą aktywność amylaz w glebie z biopreparatem naturalnym i w glebie z biopreparatem handlowym odnotowano w pierwszym tygodniu badań. Pod koniec procesu była ona dwukrotnie niższa.

Wahania aktywności amylaz podczas eksperymentu w tych dwóch próbach najprawdopodobniej były spowodowane wyczerpaniem się składników pokarmowych dla mikroorganizmów o zdolnościach amylolytycznych oraz selekcją prowadzącą do wyparcia mikroorganizmów o takich właściwościach. Na ich aktywność mogła mieć wpływ również adsorpcja badanych enzymów na koloïdach glebowych [5].

Zmiany aktywności dehydrogenaz przedstawiono na rysunku 4. Aktywność dehydrogenaz ulegała znacznym wahaniom. W drugim tygodniu eksperymentu zaobserwowano znacznie wyższą aktywność dehydrogenaz w glebie kontrolnej niż w glebach z biopreparatami, gdzie odnotowano najwyższy stopień usunięcia zanieczyszczeń.

Wpływ zastosowanych biopreparatów odnotowano również w szóstym tygodniu badań. Wtedy to stwierdzono znacznie wyższą aktywność dehydroge-



- gleba kontrolna – control soil
- ▨ gleba z biopreparatem naturalnym – soil with natural biological preparation
- ▩ gleba z biopreparatem handlowym – soil with commercial biological preparation

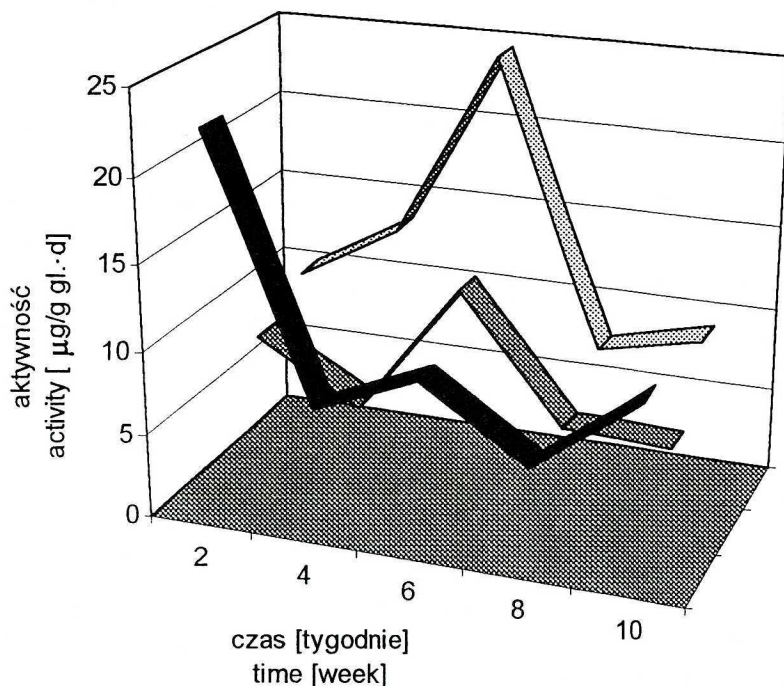
Rys. 3. Zmiany aktywności amylolitycznej w czasie badań
Changes in activity of amylase

na w próbie z biopreparatem handlowym, najniższą zaś w glebie kontrolnej. Związane jest to z dodaniem do gleby mikroorganizmów zdolnych do rozkładu substancji ropopochodnych. Znaczne różnice w aktywności tych enzymów w zależności od użytych biopreparatów mogą wynikać z tego, iż biopreparat handlowy zawierał w sobie pożywki aktywujące mikroorganizmy. Pod koniec procesu nastąpił spadek aktywności dehydrogenaz związany najprawdopodobniej z wyczerpaniem się łatwo przyswajalnych źródeł węgla.

W próbach z biopreparatami zaobserwowano również znaczny stopień usunięcia zanieczyszczeń. Powodem spadku aktywności dehydrogenaz mogło więc być również nagromadzenie toksycznych i często trudniej degradowalnych intermediatów rozkładu zanieczyszczeń – zwłaszcza WWA [3].

Zaobserwowano znaczny wpływ zastosowanych modyfikacji na stopień usunięcia zanieczyszczeń. Procentowy spadek zawartości poszczególnych zanieczyszczeń gleby przedstawiono na rysunkach 5–7.

W glebie kontrolnej zawartość węglowodorów ropopochodnych (TPH) spadła w trakcie prowadzenia badań o 14,4%. Gleba z biopreparatem natural-



- gleba kontrolna – control soil
- ▨ gleba z biopreparatem naturalnym – soil with natural biological preparation
- ▩ gleba z biopreparatem handlowym – soil with commercial biological preparation

Rys. 4. Zmiany aktywności dehydrogenaz w czasie badań
Changes in activity of dehydrogenase

nym wykazała nieznacznie wyższy ubytek zawartości węglowodorów ropopochodnych niż próba kontrolna (16,2%). Większy ubytek ropopochodnych odnotowano w próbie z biopreparatem handlowym (spadek zawartości TPH o 20,4%).

W przypadku frakcji ciężkich w glebie kontrolnej ich zawartość prawie w ogóle nie spadła (0,6%). Dla pozostałych modyfikacji ubytek frakcji ciężkich był znacznie większy – 9,6% dla biopreparatu naturalnego i 10,5% dla biopreparatu handlowego. Taki stopień usunięcia tych zanieczyszczeń w próbach zmodyfikowanych wynika z faktu, iż biopreparaty dostarczają namnożonych mikroorganizmów zaadaptowanych do zanieczyszczeń występujących w glebie. Wyższy stopień usunięcia w przypadku biopreparatu handlowego może być spowodowany tym, że preparat ten zawierał nie tylko związane na nośnikach mineralnych wyselekcjonowane mikroorganizmy o ukierunkowanym działaniu, ale także specjalne odżywki reaktywujące.

W glebie kontrolnej nastąpił najmniejszy spadek zawartości WWA – o 6,36%, z czego największy ubytek przypada na 2- i 3-pierścieniowe wę-

glowodory. Około trzykrotnie większy spadek zawartości WWA w stosunku do próby kontrolnej odnotowano w glebie z biopreparatem handlowym (19,0%). Największy ubytek odnotowano dla węglowodorów 2- i 3-pierścieniowych, a najmniejszy dla węglowodorów 4-, 5- i 6-pierścieniowych. W przypadku węglowodorów o większej ilości pierścieni szybkość biodegradacji maleje bowiem wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej i jest uzależniona od ilości pierścieni – im więcej jest ich w strukturze związku, tym trudniej ulegają biodegradacji [2, 12]. Zaobserwowano, że im wyższa masa cząsteczkowa i większa liczba pierścieni, tym WWA są silniej adsorbowane [8]. WWA adsorbują się w huminach i kwasach huminowych [2, 3]. Sorpcja węglowodorów w cząstkach gleby utrudnia pełną remediację [3, 12].

Tabela 1. Właściwości fizyczno-chemiczne gleby [5]

Physical and chemical soil properties [5]

Oznaczenie Determination	Jednostka Unit	Badania wstępne Preliminary tests	Gleba kontrolna Control soil				Gleba + biopreparat naturalny Soil with natural biological preparation			Gleba + biopreparat handlowy Soil with commercial biological preparation		
			Tydzień Week	0	3	6	10	3	6	10	3	6
	pH	7,14	6,59	7,04	7,06	6,75	6,80	7,11	6,77	6,92	7,12	
ckw*	[me/100 g]	1	1	śląd	śląd	1	śląd	śląd	1	śląd	śląd	
H _b **		1,53	2,46	2,00	1,94	2,04	1,82	2,11	1,74	1,89	1,85	
S***		29,15	32,38	41,76	27,94	33,50	42,60	29,61	31,36	42,08	29,22	
poj. sorpc ¹		30,68	34,84	43,76	29,88	35,54	44,42	31,72	33,10	43,97	31,07	
sub. organ ²	[g/kg]	141,09	165,93	140,94	156,78	143,86	143,06	158,94	140,57	126,85	138,20	
C		52,50	52,35	52,75	48,19	51,89	71,50	68,24	54,57	72,35	70,45	
P		0,35	0,77	0,78	0,75	1,28	1,05	0,57	1,47	0,81	0,20	
N _{og}		1,98	1,82	1,98	1,99	1,93	1,96	1,99	1,95	2,02	1,96	
N _{NH₄}		0,55	1,17	1,57	1,49	1,43	1,50	1,47	1,41	1,64	1,45	
N _{NO₂}		0,416	0,074	0,031	0,026	0,03	0,039	0,027	0,033	0,016	0,031	
N _{NO₃} kw.		0,66	0,58	0,36	0,46	0,46	0,41	0,48	0,50	0,36	0,46	
huminowe humic acids		3,43	3,26	4,66	4,03	3,40	3,34	3,35	3,75	4,02	4,05	

* całkowita kwasowość wymienna – total exchange acidity

** kwasowość hydrolityczna – hydrolytic acidity

*** suma zasad w kompleksie sorpcyjnym – base complex exchange

¹ pojemność sorpcyjna – absorbing capacity² substancje organiczne – organic matter

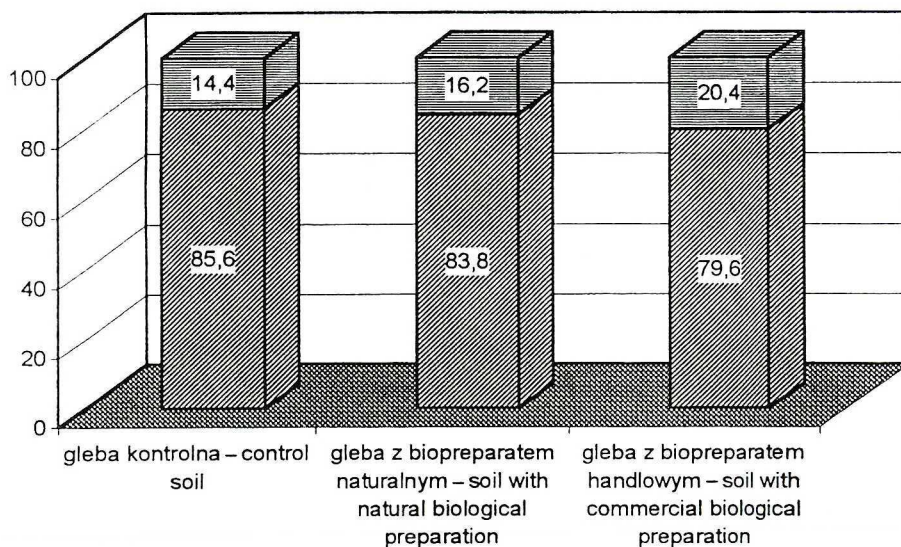
W glebie z biopreparatem naturalnym zawartość WWA zmniejszyła się o około 32%. Równie wysoki stopień usunięcia uzyskano dla węglowodorów o 2, 3 i więcej pierścieniach.

Różnice między biopreparatami, zwłaszcza w stopniu usunięcia wyższych WWA, mogą wynikać ze sposobu adaptacji do zanieczyszczeń. Prawdopodobnie biopreparat handlowy, w przeciwieństwie do mikroflory naturalnie bytującej w tym środowisku, nie był przystosowany do tak ogromnej ilości węglowodorów aromatycznych o dużej liczbie pierścieni (4-6). Stanowiły one w tej glebie około 80% całkowitej ilości WWA.

Węglowodory trzypierścieniowe mogą być nie tylko rozkładane, ale i wykorzystywane przez bakterie glebowe jako źródło węgla i energii, podczas gdy węglowodory czteropierścieniowe mogą ulegać rozkładowi tylko w procesach kometabolizmu [1]. Obserwowany udział procesów kometabolizmu, podczas którego mogą powstawać toksyczne produkty rozkładu WWA, mógł mieć wpływ na aktywność enzymatyczną gleby, zwłaszcza na znaczne wahania aktywności dehydrogenaz.

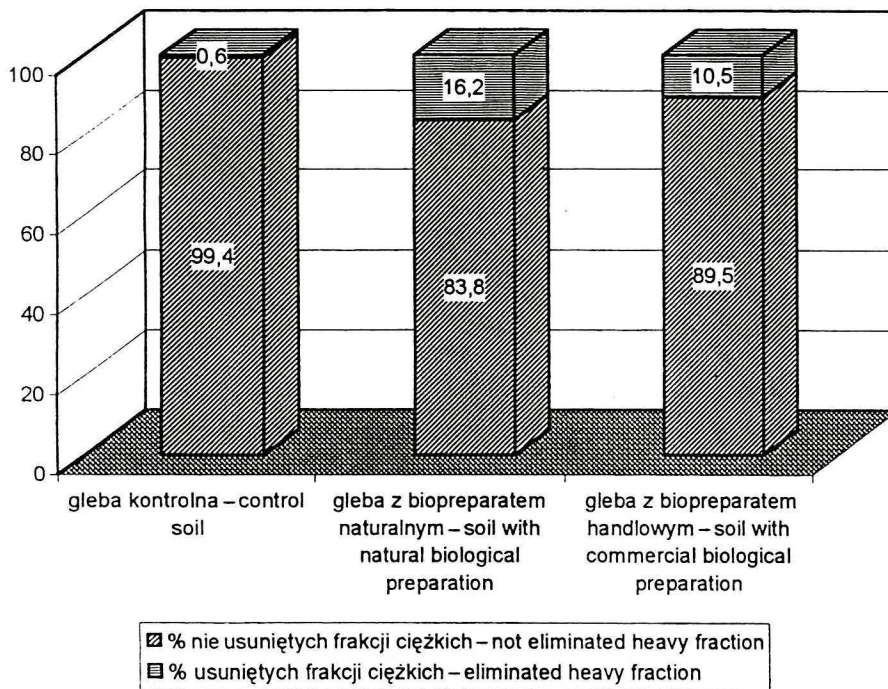
Niedobór azotu i fosforu – pierwiastków niezbędnych do budowy biomasy i funkcjonowania procesów katabolicznych drobnoustrojów – również mógł wpływać hamująco na biodegradację węglowodorów w glebie oraz na aktywność enzymatyczną [12].

Zapotrzebowanie bakterii wywołujących proces bioremediacji gruntów na azot i fosfor odpowiada stosunkowi zawartości tych pierwiastków w komórkach bakteryjnych (C:N:P = 100:10:1) [3]. W przypadku badanej gleby stosunek ten był nieco inny – C:N:P = 100:3,8:0,7 i niewiele się zmienił w trakcie badań [4]. Zmiany właściwości fizyczno-chemicznych gleby przedstawiono w tabeli 1.

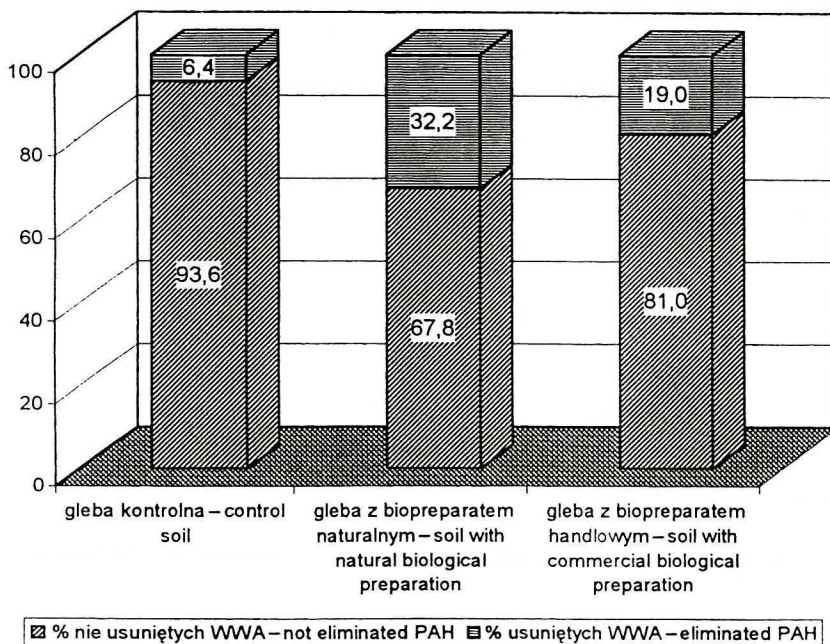


▨ % nie usuniętych TPH – not eliminated TPH ■ % usuniętych TPH – eliminated TPH

Rys. 5. Procentowy stopień usunięcia węglowodorów ropopochodnych TPH
Elimination of TPH [%]



Rys. 6. Procentowy spadek zawartości frakcji ciężkich
Elimination of heavy fractions [%]



Rys. 7. Procentowy spadek zawartości WWA
Elimination of PAH [%]

PODSUMOWANIE

1. Nie zaobserwowano wyraźnego wpływu zastosowanych biopreparatów na aktywność proteolityczną i celulolityczną gleby, mimo zdecydowanego ich wpływu na stopień usunięcia zanieczyszczeń. We wszystkich próbach aktywność tych enzymów utrzymywała się na zbliżonym poziomie przez cały okres badań.

2. W trakcie badań stwierdzono znaczne wahania aktywności amylaz w próbach z biopreparatami, jedynie w próbie kontrolnej następował powolny jej spadek.

3. Zaobserwowano znaczne zmiany aktywności dehydrogenaz (zwłaszcza w próbach, w których zaobserwowano największą eliminację zanieczyszczeń). Najwyższą ich aktywność odnotowano w drugim tygodniu badań w glebie kontrolnej (22,60 $\mu\text{g/g}\cdot\text{d}$) i w szóstym tygodniu w glebie z biopreparatem naturalnym (12,80 $\mu\text{g/g}\cdot\text{d}$) oraz w glebie z biopreparatem handlowym (24,60 $\mu\text{g/g}\cdot\text{d}$). W miarę upływu czasu aktywność malała.

4. Zastosowane biopreparaty miały wyraźny wpływ na stopień usunięcia węglowodorów ropopochodnych, frakcji ciężkich i WWA. Największy ubytek węglowodorów ropopochodnych i frakcji ciężkich stwierdzono w próbach z biopreparatem handlowym, zastosowanie biopreparatu naturalnego spowodowało natomiast najwyższy stopień usunięcia WWA.

LITERATURA

- [1] Jones K.C., J.A. Stratford, P. Tidridge, K.S. Waterhouse, A.E. Johnston: *Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: Long-term changes in profile distribution*, Environmental Pollution, **56**, 337–351 (1989).
- [2] Kosinkiewicz B., M. Mokrzycka: *Transformacja i wykorzystanie antracenu przez mikroorganizmy glebowe*, Arch. Ochr. Środ., **1–2**, 133–141 (1988).
- [3] Łebkowska M.: *Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym*, Gaz, Woda i Technika Sanitarna, **3**, 117–118 (1996).
- [4] Małachowska-Jutcz A., K. Miksch, W. Przysaś: *Wpływ ryzosfery na stopień usunięcia WWA, węglowodorów ropopochodnych TPH oraz frakcji ciężkich z gleby narażonej na długotrwałe działanie tych związków*, Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Bioremediacja Gruntów”, Wisła–Bukowa 1998, 157–170.
- [5] Małachowska-Jutcz A., J. Mrozowska, J. Kozielska, K. Miksch: *Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi w procesie jej detoksykacji*, Biotechnologia, **1** (36), 79–91 (1997).
- [6] Miksch K.: *Laboratorium Podstaw Biochemii*, Skrypt Politechniki Śląskiej, Gliwice 1980.
- [7] Muszyński A., E. Karwowska, M. Kaliszewski: *Bioremediacja gleby z produktów ropopochodnych przy zastosowaniu mikroorganizmów immobilizowanych na nośnikach stałych*, Gaz, Woda i Technika Sanitarna, **8**, 299–301 (1996).
- [8] Reilley K.A., M.K. Banks, A.P. Schwab: *Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere*, J. Environ. Qual., **25**, 212–219 (1996).
- [9] Rosik-Dulewska C.: *Aktywność biologiczna gleb podgrzewanych ciepłem odpadowym z elektrowni – cz. 2*, Arch. Ochr. Środ., **2**, 113–123 (1992).

- [10] Russel S.: *Metody oznaczania enzymów glebowych*, Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Warszawa 1972.
- [11] Russel S.: *Drobnoustroje a życie gleby*, PWN, Warszawa 1974.
- [12] Sztompka E.: *Biodegradacja paliwa Diesla w glebie*, Materiały III Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń – Jaszowiec 1995, 147 – 155.
- [13] Zienko J.: *Substancje ropopochodne w środowisku przyrodniczym*, Ekologia i Technika, 1 (19), 18 – 23 (1996).

Wpłynęło: 27 sierpnia 1999, zaakceptowano do druku: 10 grudnia 1999.