

ROZDZIAŁ 33 DEGRADACJA ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH W ŚRODOWISKU

Agata Kot-Wasik, Dagmara Dąbrowska, Jacek Namieśnik
*Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,
ulica Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk, Polska*

STRESZCZENIE

Degradacja jest naturalnym procesem rozkładu substancji organicznych obecnych w środowisku. Związki organiczne, w zależności od elementu środowiska, w jakim występują, mogą ulegać różnorodnym przemianom pod wpływem rozmaitych czynników fizycznych, chemicznych, biologicznych czy też fotochemicznych. Przemiany takie, zachodzące w próbkach środowiskowych pobieranych do analizy przed etapem oznaczeń końcowych mogą w istotny sposób zarówno utrudnić analizę, jak i zafałszować interpretacje uzyskiwanych informacji analitycznych. Z tego względu wszelakie procesy mogące prowadzić do degradacji oznaczanych substancji powinny być dobrze poznane. W rozdziale tym omówiono drogi degradacji wybranych trwałych zanieczyszczeń organicznych w różnych warunkach oraz przedstawiono metodyki analityczne, które są wykorzystywane w tego typu badaniach.

1. WSTĘP

Od dłuższego już czasu obserwuje się wzrost zainteresowania specyficzną grupą zanieczyszczeń środowiska, a mianowicie związkami z grupy tzw. trwałych zanieczyszczeń organicznych (ang. *Persistent Organic Pollutant's – POP's*). Związki te, emitowane do środowiska głównie ze źródeł antropogenicznych charakteryzują się wysoką toksycznością, trwałością i zdolnością do bioakumulacji [1]. Do tej grupy organicznych zanieczyszczeń zalicza się między innymi: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), chlorofenole, polichlorowane bifenylole (PCB), dioksyny (PCDD, PCDF) oraz niektóre pestycydy. Związki te w zależności od elementu danego ekosystemu, w jakim występują (gleba, osady dennie, wody powierzchniowe i gruntowe), mogą ulegać powolnym przemianom w wyniku różnych procesów fizycznych, chemicznych, biologicznych czy też fotochemicznych [2, 3, 4]. W zależności od związku i medium, w jakim się on znajduje, a także czynników środowiskowych charakterystycznych dla danego medium procesy degradacyjne zachodzą z różną szybkością, a nowo powstające związki mogą stanowić mniejsze bądź większe obciążenie dla środowiska.

Mówiąc o przemianach chemicznych, należy rozpatrywać wszystkie te reakcje, które prowadzą do obniżenia stężenia związku w próbce, np. reakcje addycji, redukcji, hydrolizy, oksydacji czy też kompleksowania.

Na procesy degradacji zanieczyszczeń środowiska można spojrzeć z dwójakiego punktu widzenia:

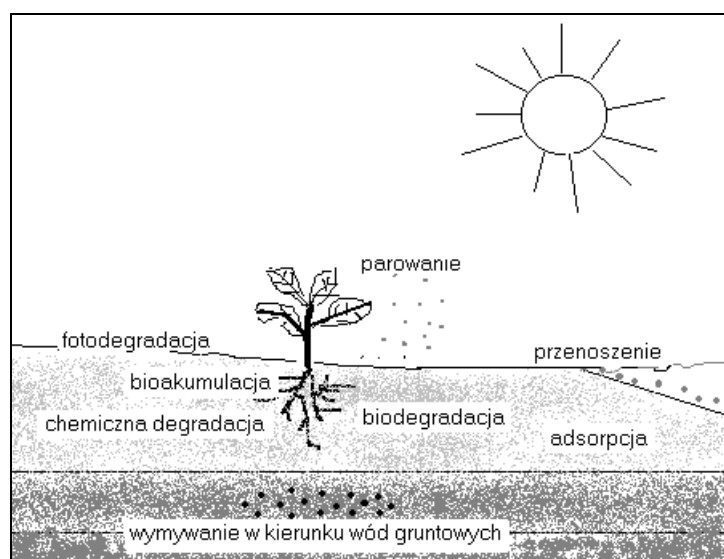
- wykorzystania tych zjawisk w naturalnych i sztucznych (opracowywanych i wprowadzanych do praktyki technologicznej) sposobach oczyszczania poszczególnych elementów środowiska (remediacji),
- zbadania wpływu tych procesów na zmiany w składzie pobieranych próbek środowiskowych; w tym przypadku procesy degradacji analitów w próbce przed

etapem oznaczeń końcowych mogą w istotny sposób utrudnić interpretację uzyskiwanych wyników mających być źródłem cennych informacji analitycznych.

W obu jednak sytuacjach konieczne jest dokładne poznanie tych procesów tak, aby można było wpływać na ich efektywność (technologie remediacyjne) oraz osłabiać (bądź też eliminować) ich wpływ na wyniki badań analitycznych.

Takie związki organiczne jak związki z grupy WWA, mogą adsorbować się na ściankach naczynia lub na cząstkach zawiesiny występującej w próbce. Adsorpcja analitów związana jest z ich rozpuszczalnością w wodzie oraz wartością współczynnika podziału oktanol- woda (K_{o-w}). Im większa jest wartość współczynnika K_{o-w} , tym związek wykazuje większą zdolność do sorpcji na materiale stałym [5, 6]. W przypadku kontaktu próbki z powietrzem atmosferycznym bądź jej oddziaływania z fazą gazową, może dochodzić do odparowywania jej lotnych substancji, np. fenoli.

Rozkład związków organicznych w środowisku może odbywać się przy udziale mikroorganizmów i enzymów, zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Ten rodzaj przemian określany jest mianem biodegradacji. W efekcie tego procesu mogą następować nie tylko modyfikacje wybranych grup funkcyjnych, ale w przeważającej większości przypadków rozpad podstawowej struktury związku prowadzący w końcu do całkowitej degradacji do dwutlenku węgla, wody i soli nieorganicznych [7]. W sposób schematyczny różne procesy degradacji zanieczyszczeń w środowisku przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Główne procesy przemian jakim ulegają trwałe zanieczyszczenia organiczne w środowisku.

Rozpatrując procesy degradacji z analitycznego punktu widzenia i związanej z tym wiarygodności uzyskiwanych wyników należy zwrócić uwagę na następujące aspekty:

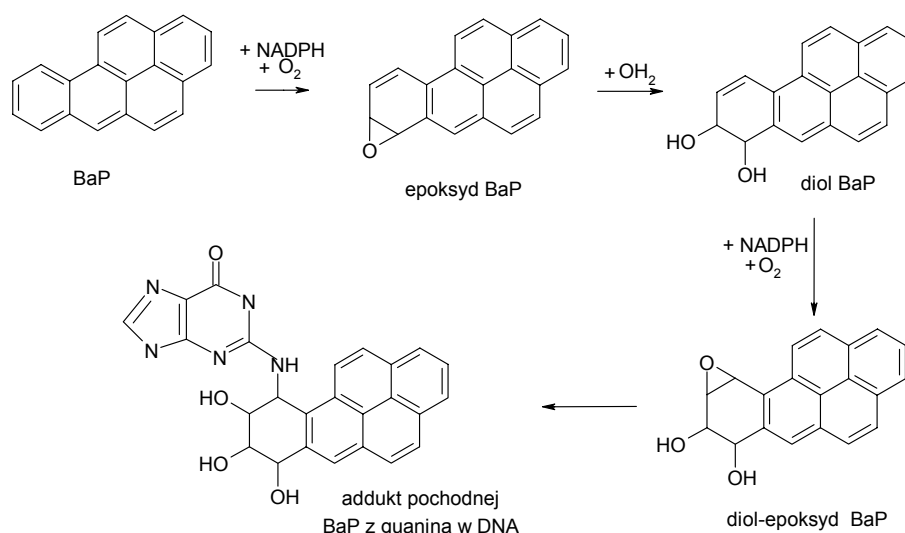
- wpływ procesów degradacji zachodzących w badanym elemencie środowiska na poziom stężenia składników śladowych,
- wpływ tych samych procesów na poziom składników śladowych już w pobranych próbkach (na etapie transportu i przechowywania przed etapem oznaczeń końcowych),

- wpływ procesów degradacji na poziom stężenia składników śladowych w uzyskiwanych ekstraktach i roztworach (po etapie przygotowania próbek do oznaczeń końcowych).

W każdym z tych przypadków znajomość trwałości substancji, oraz znajomość produktów jej rozkładu ma pierwszorzędne znaczenie dla wiarygodności i rzetelności wyników oznaczeń różnego typu analitów w poszczególnych typach próbek środowiskowych. Ważne jest, by uzyskany wynik był odzwierciedleniem stężenia związku w czasie pobierania próbki. Konieczna jest więc dokładna znajomość przemian, jakim podlegają poszczególne anality obecne w próbce tak, aby pobrana próbka spełniała wymóg reprezentatywności w stosunku do badanego obiektu materialnego aż do momentu analizy.

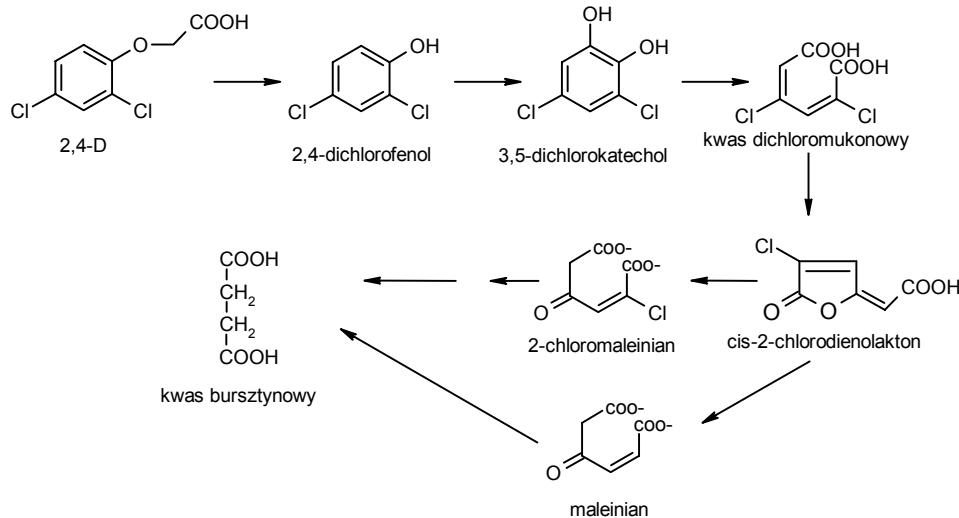
2. TOKSYCZNOŚĆ PRODUKTÓW DEGRADACJI W PORÓWNANIU DO TOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKÓW MACIERZYSTYCH.

W największym uproszczeniu degradacja zakończy się, kiedy związek organiczny ulegnie rozpadowi do naturalnie występujących w środowisku związków, takich jak CO_2 i H_2O . Zanim jednak to nastąpi, w środowisku pojawiają się produkty pośrednie rozkładu substancji. Często takie pośrednie produkty rozkładu związków organicznych wykazują znacznie większą toksyczność w stosunku do mikroorganizmów, zwierząt i ludzi niż związki wyjściowe. Klasycznym przykładem jest przemiana DDT (dichlorodifenylotrichloroetanu), insektycydu popularnego w latach 50 i 60-tych. Jeden z jego produktów degradacji – DDE charakteryzuje się dużą zdolnością do bioakumulacji oraz przewlekłą toksycznością i trwałością [8]. Innym przykładem mogą być przemiany niektórych związków z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Część tych związków ma działanie prokancerogenne tj. inicjujące powstawanie adduktów z DNA, co z kolei zapoczątkowuje procesy nowotworzenia komórek złośliwych oraz działanie promutagenne, czyli zapoczątkowujące zmiany materiału genetycznego, które przekazywane są z kolei potomstwu. Do wnętrza organizmu związki z grupy WWA dostają się przez drogi oddechowe, skórę, a przede wszystkim, przez układ pokarmowy. Następnie ulegają one enzymatycznemu utlenianiu w komórkach układu wątrobowego, a ich metabolitami są kolejno: epoksydy, diole, fenole i chinony. Szczególnie pochodne epoksydowe są bardzo groźne, gdyż posiadają zdolność tworzenia adduktów z DNA i RNA. Przemiany, jakim podlegają związki z grupy WWA można zobrazować przedstawiając przemiany benzo(a)pirenu w organizmie żywym (Rys. 2).



Rys. 2. Droga przemiany benzo(a)pirenu (BaP) w organizmach żywych [9].

Benzo(e)piren, który jest produktem mikrobiologicznego utleniania benzo(a)pirenu wykazuje silne działanie kancerogenne [10]. Badania nad efektem środowiskowym tworzących się w wyniku przemian produktów dowodzą, iż niektóre gatunki roślin czy zwierząt są bardziej wrażliwe na tworzące się metabolity niż związki macierzyste. Dżdżownice są 6 razy bardziej wrażliwe na *p*-nitrofenol niż na paration i 14 razy wrażliwsze na 2,4-dichlorofenol niż na wyjściowy 2,4-D [8]. Schemat przemian kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Schemat przebiegu procesu biodegradacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D) [11].

3. FOTODEGRADACJA

Fotodegradacja jest procesem przemiany chemicznej związków pod wpływem fotonów lub światła. Fotochemiczny rozpad związków organicznych może zachodzić w atmosferze, na powierzchni wód i gleb. Nie można natomiast mówić o fotodegradacji rozpatrując osady dennie i głęboko położone warstwy gleby. Światło słoneczne, którego promieniowanie dociera do Ziemi ma długość fali λ powyżej 286,3 nm [12]. Intensywność promieniowania UV zależy od wielu czynników, takich jak: pora roku,

pora dnia, szerokość geograficzna, wysokość nad poziomem morza, gęstość powietrza, zachmurzenie czy wielkość dziury ozonowej. Większość promieniowania UV jest absorbowana w powierzchniowej warstwie wody (do 2m), choć zachodzi również i na większej głębokości, o ile dociera tam światło. Mówiąc o przemianach fotochemicznych, musimy zdawać sobie sprawę z tego, że mamy do czynienia z dwoma rodzajami tego procesu: fotolizą bezpośrednią i pośrednią [13].

Fotoliza bezpośrednia

Bezpośrednia fotoliza polega na wzbudzeniu cząsteczki przez absorpcję fotonu, czego wynikiem jest reakcja chemiczna (zwykle utlenianie). Potencjał fotolizy zależy przede wszystkim od stopnia pokrycia się widma absorpcyjnego UV/VIS związku z widmem emisyjnym wiązki światła słonecznego o długości fali 290 – 750 nm. Bezpośrednimi efektami działania promieniowania UV może być:

- przekształcenie związków organicznych w inne,
- zerwanie wiązań chemicznych,
- całkowita degradacja substancji organicznych.

Promieniowanie UV jest również przyczyną dysocjacji związków utleniających i tworzenia się wysoce reaktywnych rodników zdolnych do degradacji organicznych zanieczyszczeń [14].

Fotoliza pośrednia

Pośrednia fotodegradacja substancji następuje poprzez reakcję z rodnikami $\cdot\text{OH}$, ozonem czy NO_3 , które stanowią najważniejsze fotoutleniacze występujące w atmosferze. Ilość reaktywnych rodników takich jak $\cdot\text{OH}$ albo tlen singletowy zmienia się podczas 24 godzinowego cyklu, począwszy od zera (w nocy) do osiągnięcia maksimum (gdy słońce jest w zenicie). Ponad 90% związków organicznych występujących w fazie gazowej w troposferze ulega przemianom w wyniku reakcji z rodnikami $\cdot\text{OH}$. Zawartość rodników $\cdot\text{OH}$ i ich zdolność do szybkiej reakcji ze związkiem zależy od intensywności światła słonecznego oraz ich koncentracji w ozonie i H_2O . Średnia zawartość rodników $\cdot\text{OH}$ w troposferze w ciągu dnia wynosi $1,6 \times 10^6$ cząsteczek na cm^3 , zaś w ciągu nocy spada do $0,013 \times 10^6$ cząsteczek na cm^3 [15-17].

Mechanizm reakcji powstawania rodników fotochemicznych można przedstawić za pomocą następujących etapów:

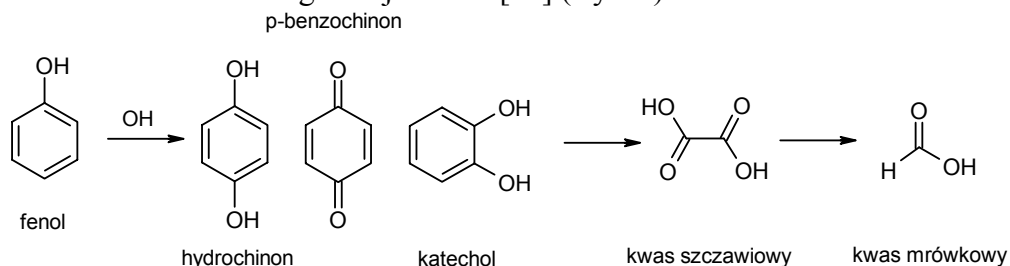
1. Absorpcja kwantu energii (fotonu) przez cząsteczkę.
2. Zerwanie wiązania chemicznego cząsteczki przez promieniowanie o dostatecznej energii (energia wzrasta wraz ze spadkiem długości fali: $E = hc/\lambda$).
3. Tworzenie się bardzo reaktywnych form przejściowych - rodników: $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{OOH}$.

Fotodegradacja związków organicznych w wodzie.

W środowisku wodnym procesy bezpośredniej i pośredniej fotolizy występują jednocześnie. Obecność mikroorganizmów, alg czy substancji humusowych przyspiesza reakcje fotochemiczne, ze względu na ich zdolność do pochłaniania światła słonecznego. Niektóre niejonowe związki organiczne, zwłaszcza pestycydy ulegają fotodegradacji znacznie szybciej w obecności fotosyntetyzujących mikroorganizmów [18]. Z badań wynika, iż większość związków z grupy WWA, ulega fotolizie dużo szybciej w obecności alg [17].

Fenol ulega degradacji na drodze bezpośredniej fotolizy, termicznej dysocjacji oraz reakcji z rodnikami hydroksylowymi $\cdot\text{OH}$. Szybkość degradacji fenolu rośnie wraz ze spadkiem wartości pH, a wzrostem stężenia rozpuszczonego w wodzie tlenu.

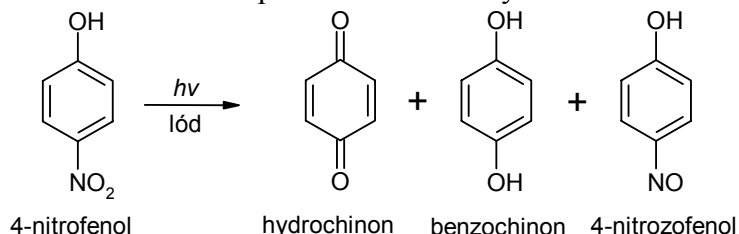
Pośrednie produkty reakcji (hydrochinon, p-benzochinon, katechol) dowodzą, że $\bullet\text{OH}$ biorą udział w mechanizmie degradacji fenolu [19] (Rys. 4).



Rys. 4. Etapy procesu degradacji fenolu w roztworach wodnych [20].

Wykazano, że głównymi produktami fotodegradacji pentachlorofenu – związku stosowanego powszechnie jako herbicyd, insektycyd i środek impregnujący drewno są produkty tworzące się podczas reakcji utleniania z rodnikami hydroksylowymi oraz produkty powstające w wyniku redukcji atomów chloru z pozycji *orto* i *para*. Tetra-, tri- i dichlorofenole to typowe produkty sukcesywnego odchlorowywania. W reakcjach dehydroksylacji, chlorowania lub odchlorowywania powstają heksachlorobenzen i pentachlorobenzen, które w wyniku utleniania przekształcają się w heksachlorochinon i tetrachlorokatechol. Dalsze utlenianie prowadzi do powstania 1,2,4-trihydroksytrichlorobenzenu. Takie produkty degradacji powstawały również, gdy proces ten prowadzono w rozpuszczalnikach organicznych tj. acetonie, jednak nie zaobserwowano ich w ogóle używając TiO_2 lub H_2O_2 jako utleniaczy. Świadczy to o tym, że w zależności od warunków fotolitycznych mogą tworzyć się różne produkty degradacji. Obok głównych produktów fotolizy obserwowano również obecność polichlorowanych difenylesterów (PCDPE) i polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn (PCDD) [21].

Fotodegradacja była obserwowana także w lodzie [22, 23]. Schemat procesu fotodegradacji 4-nitrofenolu w lodzie przedstawiono na rysunku 5.



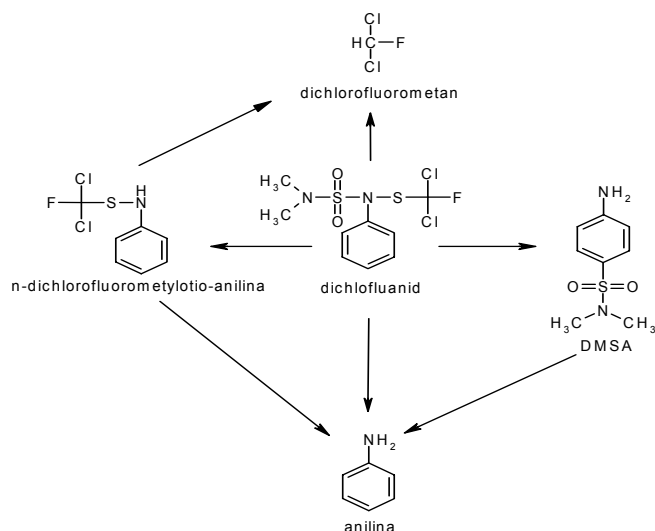
Rys. 5. Proces fotodegradacji 4-nitrofenolu w lodzie [23].

Fotoliza odgrywa znaczącą rolę w procesie przekształcania i rozpadu polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn (PCDD) i dibenzofuranów (PCDF) [24, 25]. Związki te cechuje trwałość, toksyczność i zdolność do akumulacji w organizmach żywych. Szybkość reakcji fotochemicznych zależy od ilości atomów chloru w związku, im więcej wiązań C-Cl tym mniejsza szybkość przemian. Prowadzono badania nad wybranymi związkami z grupy PCDD i PCDF poddając je ekspozycji na działanie światła UV (300nm) w laboratorium i światła słonecznego na zewnątrz. Uzyskane wyniki pokazują, że anality z grupy PCDD szybciej ulegają degradacji niż PCDF przy $\lambda=300\text{nm}$ zarówno w wodzie jak i roztworze 60%acetonitryl/woda. Szybkość fotodegradacji analitów z grupy PCDF w czystej wodzie jest większa niż w roztworze 60%acetonitryl/woda, zaś w przypadku PCDD jest odwrotnie. Przyczyna leży prawdopodobnie w budowie strukturalnej związków i w ich polaryzowalności. Związki z grupy PCDF zawierają w swojej strukturze tylko jeden atom tlenu, co powoduje, że są

bardziej polaryzowalne niż PCDD i odznaczają się większą reaktywnością w czystej wodzie niż w mniej polarnym roztworze 60%acetoniłryl/woda [24].

Fotoliza jest procesem odgrywającym znaczącą rolę w degradacji wielu związków z grupy WWA [26-29]. Według niektórych źródeł [28] fotodegradacja związków z grupy WWA uznawana jest za wstępny proces, po którym następuje rozkład związków przy pomocy mikroorganizmów. Działanie światła ułatwia powstawanie częściowo utlenionych związków pośrednich, które są bardziej podatne na procesy biodegradacji niż macierzyste związki [29]. Powszechnie uważa się, że fotodegradacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w roztworach wodnych jest procesem utleniania wywołowanym przez wysoce reaktywne foto-inicjatorowe związki. Im bardziej polarny jest rozpuszczalnik, tym szybszy proces degradacji obecnych w nim wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [30].

W literaturze dostępne są również informacje o procesie fotodegradacji pestycydów. To bardzo liczna i zróżnicowana grupa związków. Biorąc pod uwagę strukturę chemiczną, pestycydy klasyfikowane są jako związki nieorganiczne i organiczne. Do grupy pestycydów organicznych zalicza się między innymi związki fosforoorganiczne, chloroorganiczne, pochodne kwasu fenoksyoctowego, triazyny i wiele innych [31, 32]. Są one obecne we wszystkich elementach środowiska. Wymywane z gleby przedostają się nie tylko do rzek, jezior i oceanów, ale także do wód gruntowych. Badano procesy przemian fotochemicznych fungicydów (N-dichlorofluorometylotio-N',N'-dimetylo-N-fenylosulfoamid) w różnych naturalnych próbkach wody (woda morska, rzeczna i z jeziora) oraz w wodzie destylowanej. Próbkę zostały pobrane z górnych warstw poszczególnych akwenów do ciemnych szklanych butelek i przechowywane w temperaturze 4°C. Wszystkie próbki wody były poddane analizie bez wcześniejszego przygotowania, tzn. filtracji, sterylizacji czy też etapu zakwaszania. Próbkę zostały wystawione na bezpośrednie działanie promieniowania słonecznego, którego intensywność była mierzona 3 razy w ciągu dnia. Oprócz tego prowadzono również ekspozycje w laboratorium, gdzie napromieniowanie prowadzono przy użyciu lampy ksenonowej i szklanych filtrów ograniczających promieniowanie do długości fali 290 nm. Z przeprowadzonego doświadczenia wynika, że szybkość procesu degradacji dichlofluanidu jest wolniejsza w wodach naturalnych niż w wodzie destylowanej i możliwe jest przedstawienie poniższego szeregu dla szybkości tego procesu w różnych typach wód: woda z jeziora < woda rzeczna < woda morska < woda destylowana. Taki układ pokazuje silną zależność stopnia fotodegradacji od obecności i stężenia rozpuszczonej materii organicznej w poszczególnych mediach. Wraz ze wzrostem stężenia ogólnego węgla organicznego - OWO (ang. *total organic carbon - TOC*) w wodach naturalnych szybkość przemian fotochemicznych maleje. Mikroorganizmy i cząstki zawiesiny obecne w wodzie są przyczyną rozpraszania światła i stanowią pewną barierę w jego przenikaniu w głębsze warstwy wody. Fotoliza próbek eksponowanych w laboratorium przebiegała szybciej niż tych wystawionych na bezpośrednie działanie słońca. Wynika to z faktu, iż intensywność promieniowania słonecznego zmieniała się w zależności od pory dnia i warunków atmosferycznych, podczas gdy w laboratorium intensywność promieniowania była stała podczas całego doświadczenia. Niemniej jednak, we wszystkich przypadkach stwierdzono obecność nowych związków – możliwych produktów fotodegradacji, z których cztery zidentyfikowano jako: anilinę, DMSA, dichlorofluorometan i n-dichlorofluorometylotioanilinę [33]. Przebieg przemian fotochemicznych dichlofluanidu w roztworach wodnych przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Przebieg procesu fotodegradacji dichlorofluanidu w roztworach wodnych [33].

Fotodegradacja związków organicznych w glebie.

Stężenie substancji szkodliwych w wodach lub powietrzu zmniejsza się stosunkowo szybko w wyniku mieszania i rozcieńczania, natomiast w glebie wiele organicznych zanieczyszczeń ulega gromadzeniu. Niejonowe i niepolarne organiczne substancje szkodliwe są zazwyczaj adsorbowane przez substancje humusowe. Substancje te akumulują się w warstwie powierzchniowej gleby, ponieważ większość materii organicznej znajduje się na jej powierzchni. Związek organiczny może ulec procesowi fotolizy wówczas, kiedy jest zaadsorbowany na koloidach glebowych i znajduje się w powierzchniowej warstwie gleby wystawionej na działanie promieniowania słonecznego [10]. A zatem przemiany fotochemiczne w glebie ograniczone są tylko i wyłącznie do jej powierzchni, i sięgają w głąb maksymalnie do 1 mm [18]. Procesy rozkładu niebiologicznego, czyli fotodegradacja, występują jednocześnie z reakcjami katalizowanymi mikrobiologicznie, dlatego doniesienia dotyczące fotochemicznych przemian w glebie są bardzo ubogie.

Dostępne są również informacje na temat badań degradacji kwasów fenoksyoctowych (mekoprop i dichlorprop) w próbkach gleby o różnej wilgotności i składzie materii organicznej. Z przeprowadzonych badań wynika, iż szybkość zaniku dichloropropu (DCPP) i mekopropu (MCP) jest zależna od wilgotności gleby, tzn. dużo wolniejsza dla gleb suchych. Rozpad fotochemiczny MCP zachodzi dużo szybciej niż DCPP, powodem tego może być różna zdolność adsorpcji tych związków w glebie [34].

4. BIODEGRADACJA

Biologiczny rozkład trwałych organicznych zanieczyszczeń przez mikroorganizmy jest jednym z najważniejszych i najefektywniejszych sposobów usuwania tych związków z środowiska. Biodegradacja związków organicznych jest przeważnie procesem wieloetapowym, zachodzącym z udziałem kilku mikroorganizmów, które często wykazują działanie synergiczne. Zakres i szybkość przemian biodegradacyjnych uwarunkowane są szeregiem czynników takich, jak: skład i aktywność flory bakteryjnej, właściwości i „wiek” zanieczyszczenia, obecność innych związków, temperatura, odczyn pH, dostęp tlenu, zawartość składników odżywczych oraz właściwości fizykochemiczne medium, w jakim zachodzi proces [35, 36].

Mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową, w porównaniu z innymi organizmami, zdolnością adaptacji do nowych warunków środowiska, zdolnością traktowania związków nie będących produktami ich własnych przemian metabolicznych jako substratów energetycznych i budulcowych. Mikroorganizmy można podzielić na autotroficzne, czyli takie, które pozyskują niezbędny im węgiel z dwutlenku węgla oraz na organizmy heterotroficzne, czerpiące węgiel z rozkładu materii organicznej i antropogenicznych substancji organicznych.

Jedna cząsteczka enzymu może katalizować rozkład milionów cząstek organicznych w przeciągu jednej minuty [37]. Reakcje zachodzące z udziałem mikroorganizmów są w dużym stopniu podobne do tych zachodzących w organizmach wyższych. A zatem, związki aromatyczne ulegają epoksydacji i hydroksylacji, alifatyczne utlenianiu do kwasów i degradacji w procesie β -oksydacji, pochodne nitrowe są metabolizowane za pomocą nitroreduktaz. Mikroorganizmy mogą również prowadzić przemiany, których organizmy wyższe nie potrafią np.: rozkład pierścienia aromatycznego czy reakcje dehalogenacji.

Generalnie, środowisko cechuje stosunkowo duża różnorodność mikroorganizmów, przy czym większe zróżnicowanie mikroorganizmów obserwuje się w zespołach związanych z osadami niż w ujmowanych wodach podziemnych pochodzących z utworów o dużej średnicy porów i zasiedlonych przez wolno żyjące mikroorganizmy. Natomiast w osadach występują mikroorganizmy osiadłe, trwale związane i zasiedlające pory o małej średnicy.

Charakterystycznymi typami morfologicznymi są gram-ujemne pałeczki. Są wśród nich tlenowce między innymi z rodzaju *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, względnie beztlenowy gatunek *Aerobacter aerogenes* oraz beztlenowe gatunki z rodzaju *Desulfovibrio*. Wśród gram-dodatnich bakterii znajdziemy typowe dla tego środowiska rodzaj *Arthrobacter*, a także rodzaje przetrwalnikujące : tlenowy *Bacillus* i beztlenowy – *Clostridium*.

Bioremediacja

Skutecznym i ekonomicznym procesem oczyszczania zarówno wody, jak i gleby z zanieczyszczeń organicznych przy użyciu mikroorganizmów oraz w obecności grzybów wspomagających ten proces jest bioremediacja. Najczęściej usuwanymi związkami organicznymi są produkty ropopochodne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i związki chlorowcopochodne.

Właściwa bioremediacja zachodzi wtedy, gdy zanieczyszczenia są przekształcane w bezpieczne, naturalne substancje, co obniża koszty i eliminuje obowiązki związane z unieszkodliwieniem zanieczyszczonego gruntu na składowisku. Proces bioremediacji może zachodzić zarówno w środowisku wilgotnym, jak i suchym. Podstawowe etapy procesu oczyszczania, to:

- wprowadzenie systemu napowietrzania lub odpowiedników tlenu,
- wprowadzenie odżywki i szczepu bakterii,
- kontrola temperatury oraz wilgotności.

Unikalne w tym systemie jest to, że zanieczyszczona gleba może znajdować się w środowisku, gdzie nie ma warunków do przeprowadzania prac ziemnych lub ich wykonanie jest nieekonomiczne (np. w przypadku dróg lub budynków). Ogromną zaletą procesu jest fakt, iż eliminuje się koszty związane z unieszkodliwieniem zanieczyszczeń. Ponadto w wielu okolicznościach bioremediacja może być jedyną, najbardziej ekonomiczną dostępną technologią.

Oprócz bioremediacji (wykorzystanie naturalnej mikroflory glebowej) znane jest zjawisko bioaugmentacji, polegające na wprowadzeniu do gleb wyselekcjonowanych

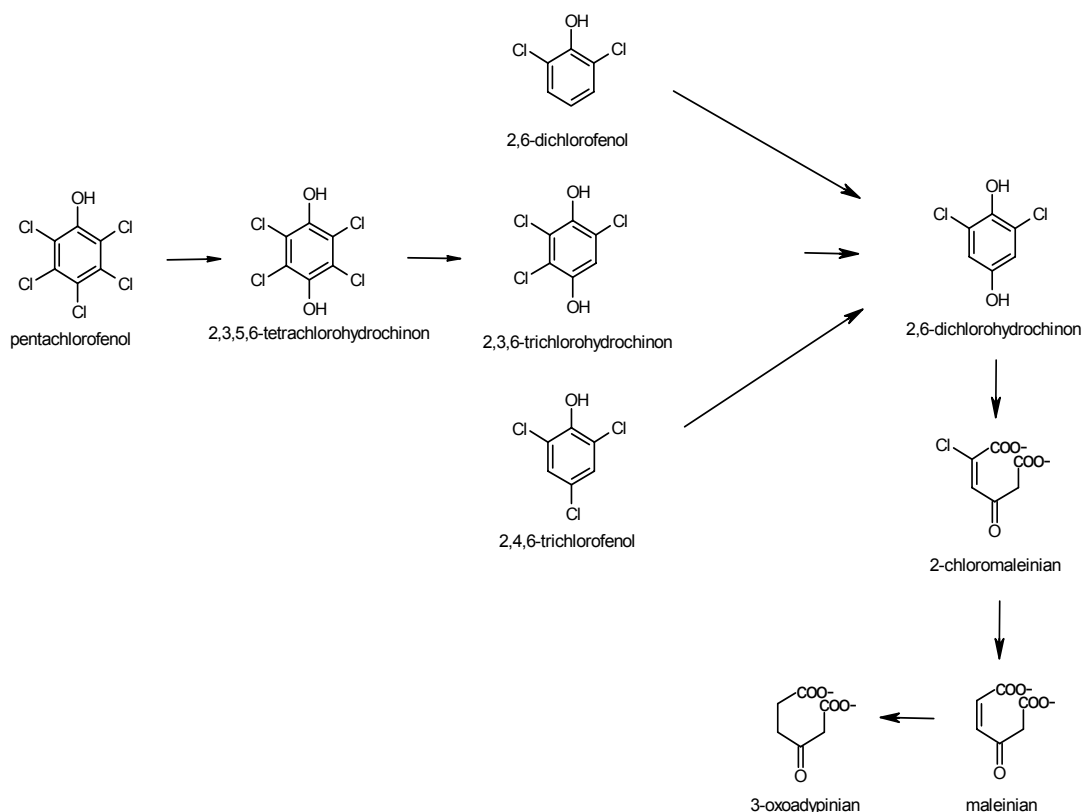
mikroorganizmów zdolnych do rozkładu wybranych zanieczyszczeń [27, 28]. W ostatnich latach stwierdzono, że istotną rolę w procesach bioremediacji może również odgrywać uprawa roślin; jest to tzw. fitoremediacja. Zasadniczym ograniczeniem fitoremediacji mogą być warunki środowiskowe, a przede wszystkim zbyt wysoka - nie tolerowana przez rośliny - zawartość zanieczyszczeń w glebie. Niestety, brak jest prawie całkowicie informacji dotyczących fitotoksycznego oddziaływania na rośliny związków z grupy WWA obecnych w glebach.

Procesy biologicznego oczyszczania są bezpiecznym i naturalnym sposobem utylizacji zanieczyszczonych gleb czy wody, gdyż bakterie - raz zaaplikowane - likwidują skażenie gruntu i wód w każdym klimacie, w różnych warunkach pogodowych i w zróżnicowanych formacjach geologicznych, a ich wielką zaletą jest znikome zapotrzebowanie na tlen i pożywki.

Chociaż z definicji proces bioremediacji całkowicie przetwarza zanieczyszczenia w bezpieczne dla środowiska i naturalne związki, jednakże z uwagi na niejednorodną naturę gleby, różnorodność szczepów bakteryjnych i przemian chemicznych mogących mieć miejsce, podczas remediacji tworzy się wiele różnorodnych pośrednich produktów [38-41].

Podczas mikrobiologicznego rozkładu pentachlorofenolu (PCP), powstaje ponad 30 produktów, z których niektóre charakteryzują się większą toksycznością niż produkt macierzysty. Badano proces przemiany PCP w glebie w obecności bakterii *Bacillus megaterium* z dodanym uprzednio, często stosowanym szczepem grzybów *Phanerochaete chrysosporium*. Po 6 tygodniowej inkubacji w temperaturze 25 °C stężenie PCP zmalało z 250 mg kg⁻¹ do 2 mg kg⁻¹, nie zauważono jednak, aby dodatek szczepu *P. chrysosporium* przyspieszał proces remediacji. Zarówno w próbce gleby skażonej PCP i próbce skażonej PCP z dodatkiem szczepu *P. chrysosporium* obserwowano rozkład pentachlorofenolu. Podczas przemian PCP w glebie powstało kilka toksycznych produktów między innymi: 3,4,5-trichlorofenol i 2,3,4,5-tetrachlorofenol, które niewątpliwie uległyby rozkładowi, gdyby prowadzono dłużej proces inkubacji [38].

W innym ośrodku naukowym zajmowano się degradacją pentachlorofenolu przy użyciu komórek bakteryjnych z rodziny *Flavobacterium*. Przeprowadzone doświadczenie pokazało, że zgodnie z reakcją kinetyki I-rzędu, część bakterii umiera w czasie okresu adaptacyjnego, zaś reszta jest w stanie rosnąć i degradować PCP. Schemat degradacji pentachlorofenolu pod wpływem *Flavobacterium* przedstawiono na rysunku 5. Zaobserwowano również, iż poziom zawartości PCP wpływa na okres adaptacyjny mikroorganizmów, który jest dłuższy w przypadku wyższego stężenia PCP [39].



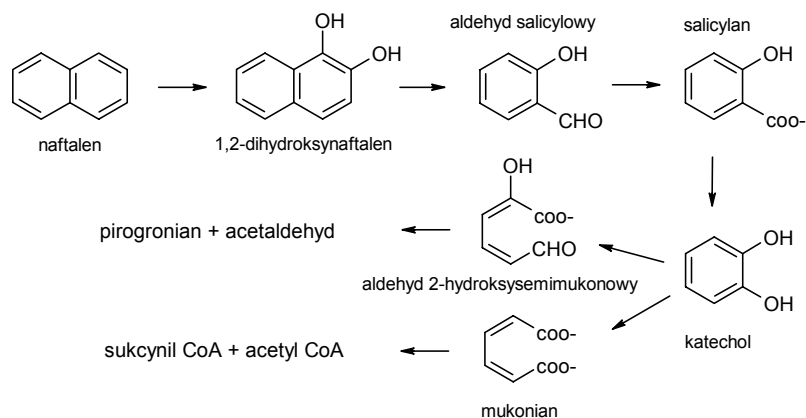
Rys. 7. Droga biodegradacji PCP z udziałem *Flavobacterium* [42].

Biodegradacja związków organicznych w glebie i osadach dennych.

Gleba stanowi mieszaninę składników organicznych, mineralnych, gazowych i ciekłych, zamieszkiwanych przez liczne mikroorganizmy. Materia organiczna gleby to resztki rozkładających się roślin i substancje humusowe. Składnikami mineralnymi gleby są cząstki wietrzejących skał, ropy, uwodnione tlenki Al. Związki organiczne są rozkładane przez mikroorganizmy żyjące w glebie, ale szybkość tego procesu zależy od właściwości substancji organicznej, genotypu mikroorganizmów, pH i właściwości odżywczych gleby oraz jej właściwości adsorpcyjnych. Mikrobiologiczny rozkład substancji jest wywoływany przez enzymy i zazwyczaj następuje po początkowym okresie utajenia, gdy mikroorganizmy adaptują się do nowego podłoża. W wielu przypadkach reakcje zachodzące w glebie są podobne do tych, które zachodzą w osadach, aczkolwiek zazwyczaj jedynie powierzchniowa warstwa osadu zawiera tlen. Przeważająca część osadu stanowi środowisko beztlenowe [10].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne przedostają się do środowiska w wyniku wysokotemperaturowego spalania substancji organicznych. Może to być proces zarówno naturalny (samoczynny zapłon biomasy, działalność wulkaniczna), jak i antropogenny np. spalanie węgla, paliw płynnych w silnikach samochodowych, ropy naftowej [43]. Zdolność mikroorganizmów do degradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zależy od ilości pierścieni aromatycznych w związku. Mikroorganizmy mogą degradować, a przy tym wykorzystywać jako własne źródło węgla związki z dwoma do czterech pierścieni benzenowych. Większa ilość (5-6) pierścieni w związku powoduje, iż jest on bardziej odporny na atak mikrobiologiczny [44, 45]. W literaturze opisano badania nad degradacją wybranych związków z grupy WWA przy udziale kilku szczepów bakterii tlenowych. Proces prowadzono dla 5 związków z grupy WWA poddawanych degradacji razem i osobno. Fenantren,

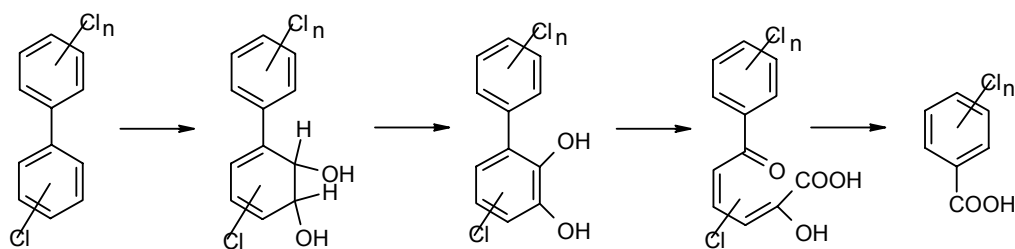
acenaften i piren uległy całkowitej degradacji w ciągu 28 h, 10 dni i 12 dni, podczas gdy zawartość antracenu i fluorenu praktycznie nie ulegała zmianie. Po zmieszaniu wszystkich związków zaobserwowano spadek szybkości biodegradacji fenantrenu, acenaftenu i pirenu, a wzrost szybkości tego procesu dla antracenu i fluorenu. To dowodzi, iż związki o mniejszej masie cząsteczkowej ulegają degradacji znacznie szybciej w porównaniu do związków o dużej masie cząsteczkowej [46]. Ten sam zespół naukowców zajmował się problemem biodegradacji fenantrenu w osadach rzecznych. Wyniki pokazują, że szybkość biodegradacji fenantrenu zmieniała się wraz ze zmianą wartości pH i temperatury (optimum wyznaczono dla 30°C i pH=7,0). Dodatek takich substancji, jak siarczany czy fosforany, nie wpłynął na szybkość przemian degradacyjnych [47]. Z doniesień naukowych wynika, iż proces biologicznego oczyszczania gleb celem usunięcia związków z grupy WWA o niskiej masie cząsteczkowej (naftalen, fenantren, piren) jest bardzo efektywny i skuteczny, gdyż zostało wyizolowanych i poznanych wiele mikroorganizmów, które są w stanie wykorzystywać tego rodzaju związki jako własne źródło węgla i energii (Rys. 6) [44, 45, 48-50].



Rys. 8. Przebieg procesu degradacji naftalenu w warunkach tlenowych przez bakterie z grupy *Pseudomonas* [42].

Podjęto próbę zbadania procesu biodegradacji benzo(a)pirenu, dibenzo(a,h)antracenu i koronenu, związków o wysokiej masie cząsteczkowej, wykorzystując w tym celu jeden ze szczepów *Burkholderia cepacia* (VUN 10,001). Użyty szczep VUN 10,001 zapewniał degradację związków z grupy WWA o pięciu i siedmiu pierścieniach aromatycznych, ale znacznie wolniej w porównaniu z pirenem. Widoczny ubytek (20-22%) benzo(a)pirenu i dibenz(a,h)antracenu był zauważalny dopiero po 63 dniach inkubacji. W przypadku koronenu, po 63 dniach stężenie spadło o 75% [48].

Biodegradacja polichlorowanych bifenyli (PCB) zachodzi wieloetapowo z udziałem bakterii tlenowych jak i beztlenowych. Bakterie beztlenowe (anaerobowe) są zdolne do rozkładu związków zawierających kilka atomów chloru, natomiast bakterie tlenowe (aerobowe) degradują tylko te związki, które zawierają jeden lub dwa atomy chloru. Pierwszy etap to degradacja związków polichlorowanych, gdzie bakterie nie wykorzystują PCB jako źródła węgla, lecz jako akceptor elektronów. Powstające di- i monochlorowane pochodne ulegają dalszemu rozkładowi poprzez rozerwanie pierścienia aromatycznego w obecności bakterii tlenowych. Dalsze przemiany prowadzą do uzyskania nieorganicznego chloru, ditlenku węgla i wody [11].



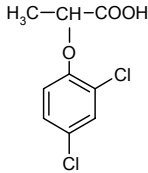
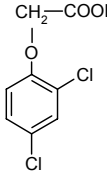
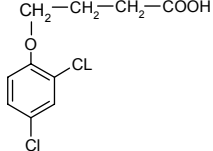
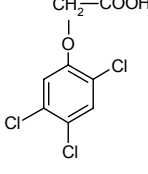
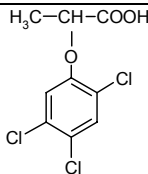
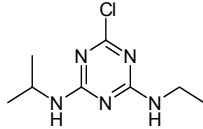
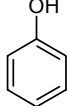
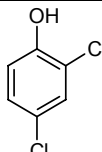
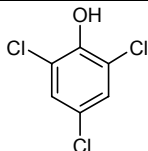
Rys. 9. Przebieg procesu mikrobiologicznej degradacji związków z grupy PCB [11].

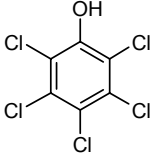
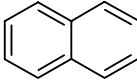
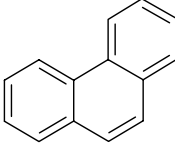
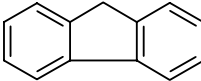
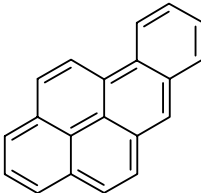
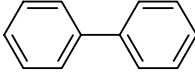
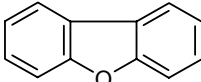
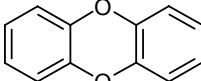
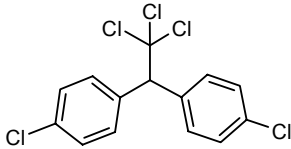
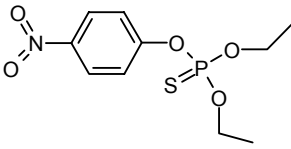
Biodegradacja związków organicznych w wodach gruntowych i powierzchniowych.

Kwasy fenoksyoctowe znalazły szerokie zastosowanie w rolnictwie do zwalczania chwastów. Związki te odznaczają się selektywnością, gdyż wrażliwe na ich działanie są rośliny szerokolistne, natomiast odporne są rośliny uprawne (zboża). Herbicydy przedostają się do wód wraz ze spływami obszarowymi z pól uprawnych. Prowadzono badania nad szybkością degradacji trzech herbicydów z grupy pochodnych fenoksyoctowych, tj. MCPA, dichloropropu i mekopropu obecnych w wodach gruntowych, w warunkach tlenowych i beztlenowych. Doświadczenia prowadzone były przy użyciu techniki ISM (*ang. in situ microcosms*) [51, 52], a oznaczeń końcowych dokonano z wykorzystaniem techniki HPLC. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzono, że podczas tlenowej biodegradacji wszystkie herbicydy uległy całkowitemu rozkładowi. W trakcie 100-200 dni prowadzenia eksperymentu nie zaobserwowano żadnych zmian w składzie wybranych kwasów fenoksyoctowych w warunkach beztlenowych [53].

Degradacja wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie poruszana była również w innych pracach. Badano rozkład mikrobiologiczny wybranych związków z grupy WWA w próbkach wód pobranych z pięciu studni głębinowych. Związki występujące na poziomie stężeń rzędu 25-150 $\mu\text{g/l}$ uległy niemalże całkowitej degradacji w przeciągu trzech dni. Szybkość zaniku poszczególnych związków z grupy WWA można było uszeregować w następujący sposób: acenaftylen > acenaften > 2-metylnaftalen > 2-metyloinden > 3-metyloinden > inden [54]. W przypadku biodegradacji fluorenu z wykorzystaniem różnych szczepów z rodziny *Cunniganella* rozkładowi uległo około 96% związku. Jako główne produkty degradacji zidentyfikowano 9-fluorenol i 9-fluorenon. Możliwe drogi degradacji mikrobiologicznej fluorenu przedstawiono na rysunku 10.

Tabela 1. Produkty biodegradacji wybranych trwałych organicznych zanieczyszczeń środowiska.

Związek wyjściowy	Struktura związku	Możliwe produkty degradacji
Dichlorprop kwas 2-(2,4-dichlorofenoksy)propionowy 2,4-DP		2,4-dichlorofenol 3,5-dichlorokatechol maleinian 3-oxoadypinian
2,4-D kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy		2,4-dichlorofenol 3,5-dichlorokatechol 2-chloromaleinian 3-oxoadypinian
2,4-DB kwas 4-(2,4-dichlorofenoksy)butyrowy		2,4-dichlorofenol 3,5-dichlorokatechol maleinian 3-oxoadypinian
2,4,5-T kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy		2,4,5-trichlorofenol 2,5-dichlorohydrochinon 5-chloro-1,2,4-trihydroksybenzen 1,2,4-benzenotriol maleinian 3-oxoadypinian
Fenoprop kwas 2-(2,4,5-trichlorofenoksy)propionowy		2,4,5-trichlorofenol 2,5-dichlorohydrochinon 5-chloro-1,2,4-trihydroksybenzen 1,2,4-benzenotriol maleinian 3-oxoadypinian
Atrazyna		hydroksyatrizona kwas cyjanurowy biuret (karbamylomocznik) mocznik
Fenol		benzochinon katechol kwas szczawiowy
2,4-Dichlorofenol		dichlorokatechol
2,4,6-Trichlorofenol		dichlorofenol dichlorokatechol

PCP pentachlorofenol		tetrachlorofenol trichlorofenol dichlorofenol
Naftalen		1,2-dihydroksynaftalen aldehyd salicylowy salicylan katechol
Fenantren		2,4-hydroksyfenantren 1,2-dihydroksynaftalen o-ftalan
Fluoren		3,4-dihydroksyfluoren 1-indanon 3,4-dihydrokumaryna salicylan
Benzo(a)piren		benzo(e)piren
Bifenyl		2,3-dihydroksybiphenyl kwas benzoesowy
Dibenzofuran		2,2',3-trihydroksybiphenyl salicylan
Dibenzo- <i>p</i> -dioksyna		katechol 2-hydroksymukonian
DDT 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorofenylo)-etan		DDE 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorofenylo)-etylen DDD 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorofenylo)-etan DDMU 1-chloro-2,2-bis(4-chlorofenylo)-etylen DDMS 1-chloro-2,2-bis(4-chlorofenylo)-etan DDM bis(4-chlorofenylo)-metan DBP 4,4'-dichlorobenzofenon
Paration		<i>p</i> -nitrofenol kwas dietylofosforowy

5. DEGRADACJA ZWIĄZKÓW W CZASIE PRZYGOTOWYWANIA PRÓBEK DO ANALIZY.

Wszelkie procesy degradacji są niezwykle istotne z punktu widzenia stanu czystości poszczególnych elementów środowiska i prowadzone są intensywne badania w wielu ośrodkach naukowych nad wpływem różnych czynników poprawiających ich efektywność. Na wykorzystaniu odpowiednich procesów degradacji oparta jest większość technologii remediacyjnych.

Te same procesy zachodzące na znacznie mniejszą skalę w próbkach środowiskowych (na etapie ich pobierania, wstępnej obróbki i przechowywania) są natomiast zdecydowanie niekorzystne, ponieważ mogą w istotny sposób wpływać na poziomy stężenie analitów, czyli ogólnie mówiąc, na stabilność składu próbek analitycznych. Efektem końcowym może być dezinformacja w miejsce tak pożądaných informacji analitycznych o obecności i poziomie zawartości określonych analitów w badanym elemencie środowiska. Konieczna jest więc dokładna znajomość przemian, jakim podlegają poszczególne anality obecne w próbce, tak aby można było podjąć odpowiednie przeciwdziałanie, żeby pobrana próbka spełniała wymóg reprezentatywności w stosunku do badanego obiektu aż do momentu analizy. Bardzo często zdarzają się w laboratoriach analitycznych takie sytuacje, że ze względu na ograniczenia czasowe bądź też aparaturowe, pobrane próbki muszą być przechowywane przez określony okres czasu przed wykonaniem analizy. Z tego też powodu pierwszorzędowego znaczenia nabierają informacje dotyczące maksymalnego okresu czasu, przez jaki próbki mogą być przechowywane bez znaczących zmian składu. W przeciwnym wypadku w wyniku przeprowadzenia analizy próbki zamiast informacji o poziomie stężeń analitów uzyskane zastaną informacje o stężeniach całkowicie innych składników, których nie było w próbce w momencie jej pobierania. Ze względu na fakt, iż w laboratorium pod wpływem temperatury i światła procesy degradacji zachodzą często znacznie szybciej niż w środowisku, na proces degradacji należy zwrócić szczególną uwagę.

Niekorzystne zjawiska w składzie próbki, można zminimalizować poprzez dobranie odpowiedniej metody jej konserwacji. Jednak nawet po utrwaleniu próbki i przechowywaniu jej w odpowiednich warunkach nie ma pewności, że próbka nie będzie podlegała zmianom. Niemożliwe jest bowiem zapewnienie stabilności wszystkich składników równocześnie [56-62].

6. TECHNIKI OZNACZEŃ I IDENTYFIKACJI SUBSTRATÓW I PRODUKTÓW PROCESÓW DEGRADACJI.

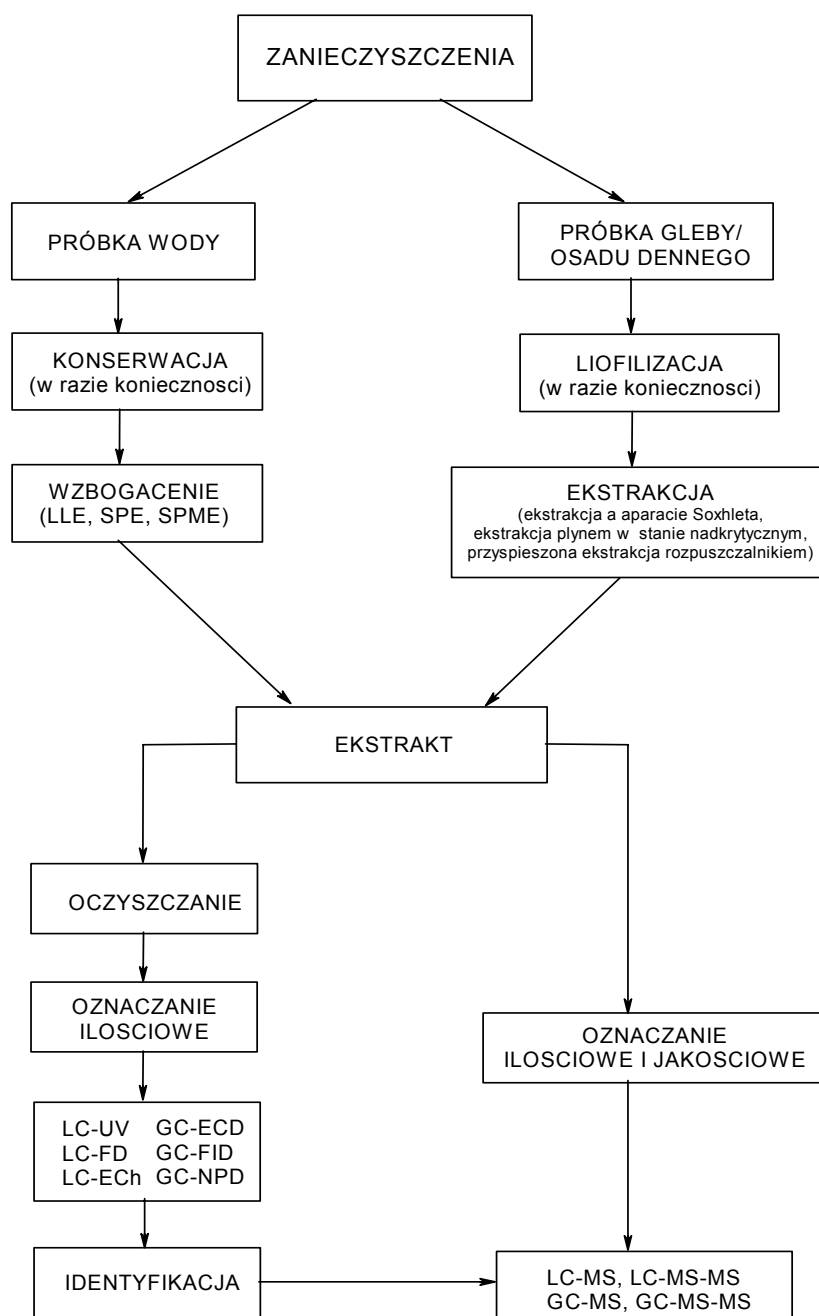
Techniki chromatograficzne, głównie GC i HPLC są najczęściej wykorzystywanymi technikami służącymi do identyfikacji i oznaczania trwałych organicznych zanieczyszczeń [48, 45, 46]. Niestety, brak detektorów charakteryzujących się wysoką selektywnością uniemożliwia identyfikację powstających produktów degradacji, co nie oznacza, że niemożliwe jest ich oznaczenie. Bezpośrednie sprzężenie technik GC i LC ze spektrometrem mas stało się skutecznym narzędziem do identyfikacji tych związków [65-71].

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrem mas (GC-MS) jest powszechnie stosowaną techniką do identyfikacji produktów degradacji związków z grupy WWA [40, 72].

Dostępne są dane literaturowe nt. oznaczeń zawartości kwasów fenoksyoctowych i ich metabolitów w wodzie i glebie przy użyciu techniki LC-MS. Wysoka

selektywność i czułość oraz brak etapu derywatywacji pozwala na bezpośrednie dozowanie próbek wody bez uprzedniego przygotowania. Takie postępowanie wstępne i krótki czas analizy dowodzi, iż technika LC-MS jest szybką i wiarygodną techniką oznaczania tego rodzaju zanieczyszczeń [67, 73-77].

W wielu laboratoriach trwają intensywne prace nad opracowaniem nowych procedur analitycznych, które będą mogły być wykryte na etapie oznaczania i identyfikacji analitów z grupy trwałych zanieczyszczeń środowiska oraz produktów ich przemian [78].



Rys. 11. Porównanie znanych procedur analitycznych opartych na wykorzystaniu technik LC(GC)-MS do oznaczania trwałych zanieczyszczeń środowiska i ich produktów przemian w różnych próbkach środowiskowych.

W tabeli 2 zestawiono informacje o opracowanych metodykach analitycznych, które można wykorzystać na etapie oznaczania i identyfikacji analitów z grupy POP oraz produktów ich przemian w środowisku.

Tabela 2. Metodyki oznaczania analitów z grupy POP i produktów ich przemian w próbkach środowiskowych.

Technika oznaczeń końcowych i identyfikacji	Anality	Rodzaj próbki	Technika izolacji i/ lub wzbogacania	Odnosińnik literaturowy
HPLC-UV/DAD	KWASY FENOKSYOCTOWE mecoprop; MCPA; 2,4-D; 2,4,5-T	woda powierzchniowa i gruntowa	SPE	[63, 64, 78]
	PESTYCYDY atrazyna, symazyna, carbendazim, Irgarol	woda, gleby	ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika, SPE	[66, 73, 79]
	WWA piren, fluoren, antracen	woda, gleby, osady denne	ekstrakcja w aparacie Soxhleta, SPE ekstrakcja ciecz-ciecz	[49, 80-82]
	CHLOROFENOLE pentachlorofenol	gleba	ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika	[83]
HPLC-FL	WWA antracen, fenantren, fluoren, piren	woda, gleby	SPE ekstrakcja ciecz-ciecz	[81, 84-86]
HPLC-MS	KWASY FENOKSYOCTOWE MCPA; 2,4-D; chloroacetanilid	woda, gleby woda powierzchniowa	SPE	[67, 74, 77, 87]
	PESTYCYDY amidofurfuron, bentazon, propikonazol atrazyna, symazyna, propazyna, anachlor diuron	woda powierzchniowa i gruntowa	SPE	[67, 70, 75, 79, 88, 89, 90]
	CHLOROFENOLE 4-chlorofenol, 2,4-dichlorofenol 2,4,6-trichlorofenol, pentachlorofenol	gleba	ekstrakcja w aparacie Soxhleta MAE	[91]
GC-MS	WWA antracen, fenantren, naftalen, piren, fluoranten	osady denne woda smoła węglowa	ekstrakcja ciecz-ciecz SPE	[40, 44, 72, 92, 93]

	DIOKSYNY PCDD, PCDF	woda osad denny	ekstrakcja ciecz-ciecz	[4, 94, 95]
	PCB 4,4' -Dichlorobiphenyl, 3,3',4,4' – Tetrachlorobiphenyl 2,2',4,4',5,5'- Hexachlorobiphenyl	gleba	ekstrakcja ciecz-ciecz	[96, 97]
	CHLOROFENOLE pentachlorofenol 4-chlorofenol	woda	SPE	[98] [99]
Elektrochromatografia micelarna - MEKC	PESTYCYDY atrazyna, symazyna, propazyna	woda	SPE	[100, 101]
Metoda ELISA	PESTYCYDY triazyny alachlor, atrazyna, symazyna metolachlor, bromacyl chloroacetanilid	deszcz woda powierzchniowa i gruntowa	ekstrakcja ciecz-ciecz SPE	[102-106]
	WWA Benzo(a)piren	krew	izolacja DNA	[107, 108]

SPE – ekstrakcja do fazy stałej

MAE - ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym

LITERATURA

- [1.] Kot-Wasik A., Namieśnik J., *Chem. Inż. Ekol.* **8**, 867 (2001)
- [2.] Walton B.T., Anderson T.A., *Chemosphere*, **17**, 1501 (1988)
- [3.] Pehkonen S.O., Zhang Q., *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **32**, 17 (2002)
- [4.] MeeKyung K., O'Keefe P.W., *Chemosphere*, **41**, 793 (2000)
- [5.] Maneli E., Samara C.: *Trends Anal. Chem.*, **18**, 6 (1999)
- [6.] Kot-Wasik A., Morawska M., Namieśnik J., *Chem. Inż. Ekol.*, **8**, 179 (2001)
- [7.] Jeannot R., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **57**, 231 (1994)
- [8.] Coats J.R., *Chemtech*, 25 (1993)
- [9.] Pimentel G.C., Coonrod J.A., *Chemia dziś i jutro*, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1993.
- [10.] Alloway B.J., Ayres D.C., *Chemiczne podstawy zanieczyszczeń środowiska*, PWN, Warszawa 1999.
- [11.] Müller R., Lingens F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **25**, 79 (1986)
- [12.] Choudhry G.G., Webster G.R.B., *Toxicol. Environ. Chem.*, **14**, 43 (1987)
- [13.] Larson R.A., Berenbaum M.R., *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 354 (1988)
- [14.] Mill T. M., *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 31 (1989)
- [15.] Rocha F., Walker A., *Weed Research*, **35**, 179 (1995)
- [16.] Klöpffer W., *Sci.Total Environ.*, **123/124**, 145 (1992)
- [17.] Zepp R. G., Schlotzhauer P.F., *Environ. Sci. Technol.* **17**, 462 (1983)

- [18.] Sinkkonen S., Paasivirta J., *Chemosphere*, **40**, 943 (2000)
- [19.] Chunde W., Xinhui L., Dongbin W., Jinchu F., Liansheng W., *Wat. Res.*, **35**, 3927 (2001)
- [20.] Naffrechoux E., Chanoux S., Petrier C., Suptil J., *Ultrason. Sonochem.*, **7**, 255 (2000)
- [21.] Jongki H., Do-Gyun K., Chaejoon Ch., Seung-Yong J., Mi-Ran Y., Kang-Jin K., Tae-Kwan K., Yoon-Chang: *Anal. Sci.*, **16**, 621 (2000)
- [22.] Klán P., Holoubek I., *Chemosphere*, **46**, 1201 (2002)
- [23.] Dubowski Y., Hoffmann M.R., *Geophys. Res. Lett.*, **27**, 3321 (2000)
- [24.] Meekyung K., O'keefe P. W., *Chemosphere*, **41**, 793, (2000)
- [25.] Friesen K.J., Foga M.M., Loewen M.D., *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 2504, (1996)
- [26.] Kochany J., Maguire R.J., *Sci. Tot. Environ.*, **144**, 17 (1994)
- [27.] Zepp R.G., Schlotzthauer F., *Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water in: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*, Ann Arbor Science Publishers Inc. 1979, 144
- [28.] Lehto K. M., Vuorimaa E., Lemmetyinen H., *J. Photochem. Photobiol. A*, **136**, 53 (2000)
- [29.] Bertilsson S., Widenfalk A., *Hydrobiologia*, **469**, 23 (2002)
- [30.] Moeini-Nombel L., Matsuzawa S., *J. Photochem. Photobiol. A*, **119**, 15 (1998)
- [31.] Biziuk M., *Pestycydy występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*, WNT, Warszawa 2001.
- [32.] Różański L., *Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku*, PWRiL, Warszawa 1992.
- [33.] Sakkas V. A., Konstantinou I. K., Albanis T. A., *J. Chromatogr A*, **930**, 135 (2001)
- [34.] Romero E., Dios G., Mingorance M. D., Matallo M. B., Peña A., Sánchez-Rasero F., *Chemosphere*, **37**, 577 (1998)
- [35.] Prince R.C., Drake E.N., *Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil*, in: *Bioremediation of Contaminated Soils*, Agronomy Monograph vol. 37, 677, S. Segoe Rd., Madison, WI 53711, USA 1999, 89.
- [36.] Gotvajn A. Ž., Zagorc-Končan J., *Wat. Sci. Tech.*, **39**, 375 (1999)
- [37.] Stryer L., *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
- [38.] McGrath R., Singleton I., *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1311 (2000)
- [39.] Gonzalez J. F., Wei-Shou H., *Environ. Technol.*, **16**, 287 (1995)
- [40.] Šepič E., Leskovšek H., *Analyst*, **124**, 1765 (1999)
- [41.] Weeb M. W., Ewbank G., Perkins J., McCarthy A., *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 1903 (2001)
- [42.] Ellis L.B.M., Hershberger C.D., Bryan E.M., Wackett L.P., *Nucleic Acids Res.*, **29**, 340 (2001)
- [43.] Maliszewska – Kordybach B.: Trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie, Rozprawa habilitacyjna, Instytut uprawy nawożenia i gleboznawstwa, Puławy 1993.
- [44.] Bumpus J. A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 154 (1989)
- [45.] Heitkamp M. A., Cerniglia C. E., *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1968 (1989)
- [46.] Yuan S.Y., Wei S. H., Chang B.V., *Chemosphere*, **41**, 1463 (2000)
- [47.] Yuan S.Y., Chang J.S., Yen J.H., Chang B.V., *Chemosphere*, **43**, 273 (2001)
- [48.] Juhasz A. L., Britz M. L., Stanley G. A., *Wat. Sci. Tech.*, **36**, 45 (1997)
- [49.] Ravelet C., Grosset C., Montuelle B., Benoit-Guyod J. L., Alary J., *Chemosphere*, **44**, 1541 (2001)
- [50.] Hwang S., Cutright T.J., *Chemosphere*, **47**, 891 (2002)
- [51.] Nielsen P.H., Bjerg P.L., Smith P., Christensen T. H., *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 31 (1996)
- [52.] Papiernik S., *Pest Manag. Sci.* **57**, 325 (2001)
- [53.] Harrison I., Leader R. U., Higgo J. W., Williams G. M., *Chemosphere*, **36**, 1211 (1998)
- [54.] Ogawa I., Junk G. A., Svec H. J., *Talanta*, **28**, 725 (1981)
- [55.] Monna L, Omori T, Kodama T., *Appl Environ. Microbiol.*, **59**, 285 (1993)
- [56.] Sabik H., Jeannot R., *J. Chromatogr. A*, **73**, 879 (2000)
- [57.] Capel P.D., *Chemosphere*, **30**, 1097 (1995)
- [58.] Namieśnik J., Jamrógiewicz Z., Pilarczyk M., Torres L. *Chem Inż. Ekol.* **4**(S1), (1997)
- [59.] Benoliel M.J., *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **57**, 197 (1994)

- [60.] Nikolaou A.D., Golfinopoulos K., Kostopoulou M.N., Lekkas T.D., *Chemosphere*, **41**, 1149 (2000)
- [61.] Fadini P. S., Jardim W. F., *Analyst*, **125**, 549 (2000)
- [62.] Śliwka-Kaszyńska M., Kot-Wasik A., Namieśnik J., *Crit. Rev. Environ. Sci Technol.*, **33**, 31 (2003)
- [63.] Hamann R., Meier M., Kettrup A., *Anal. Chem.*, **334**, 231 (1989)
- [64.] Cserhádi T., Forgács E., *J. Chromatogr. B*, **717**, 157 (1998)
- [65.] Gonzalez J. F., Wei-Shou H., *Environ. Technol.*, **16**, 287 (1995)
- [66.] Hogendoorn E., Zoonen P., *J. Chromatogr. A*, **892**, 435 (2000)
- [67.] Ferrer I., Thurman E.M., Barcelo D., *Anal. Chem.*, **69**, 4547 (1997)
- [68.] Molina C., Grasso P., Benfenati E., Barceló D., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **65**, 69 (1996)
- [69.] Oturan M.A., Aaron J.J., Oturan N., Pinson J., *Pestic. Sci.*, **55**, 558, (1999)
- [70.] Vialaton D., Pilichowski J.F., Baglio D., Paya-Perez A., Larsen B., Richard C., *J. Agric Food Chem.*, **49**, 5377 (2001)
- [71.] Creaser C., Santos L.F., Lamarca D.G., New A., Wolff J.C., *Anal. Chim. Acta*, **454**, 137 (2002)
- [72.] Zink G., Lorber E., *Chemosphere*, **31**, 4077 (1995)
- [73.] Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo E., Herrero-Hernandez E., Sanchez-San Roman F.J., *J. Chromatogr. A*, **950**, 157 (2002)
- [74.] Pozo O., Pitarch E., Sancho J. V., Hernández F., *J. Chromatogr. A*, **923**, 75 (2001)
- [75.] Dijkman E., Mooibroek D., Hoogerbrugge R., Hogendoorn E., Sancho J.V., Pozo O., Hernández F., *J. Chromatogr. A*, **926**, 113 (2001)
- [76.] Deml R., Dettner K., *Chemosphere*, **45**, 783 (2001)
- [77.] Lagana A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A., *Anal. Chim. Acta*, **462**, 187 (2002)
- [78.] Juhler R.K., Sorensen S.R., Larsen L., *Wat. Res.*, **35**, 1371 (2001)
- [79.] Boudina A., Emmelin C., Baaliouamer A., Grenier-Loustalot M.F., Chovelon J.M., *Chemosphere* **50**, 649 (2003)
- [80.] Casellas M., Grifoll M., Bayona J.M., Solanas A.M., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 819 (1997)
- [81.] Garon D., Krivobok S., Seigle-Murandi F., *Chemosphere* **40**, 91 (2000)
- [82.] Papadoyannis I.N., Zatou A., Samanidou V.F., *J. Liquid Chromatogr & Related Technol.*, **25**, 2653 (2002)
- [83.] Fukushima M., Tatsumi K., *Anal. Sci.*, **17**, 821 (2001)
- [84.] Taylor E., Cook B.B., Tarr M.A., *Ultrason. Sonochem.*, **6**, 175 (1999)
- [85.] Sheedy B.R., Mattson V.R., Cox J.S., Kosian P.A., Phipps G.L., Ankley G.T., *Chemosphere*, **36**, 3061 (1998)
- [86.] Chang B.V., Shiung L.C., Yuan S.Y., *Chemosphere*, **48**, 717 (2002)
- [87.] Kalkhoff S.J., Kolpin D.W., Thurman E.M., Ferrer I., Barcelo D., *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1738 (1998)
- [88.] Hernandez F., Sancho J.V., Pozo O., Lara A., Pitrach E., *J Chromatogr. A*, **939**, 1 (2001)
- [89.] Yokley R.A., Mayer L.C., Huang S.B., Vargo J.D., *Anal. Chem.*, **74**, 3754 (2002)
- [90.] Field J.A., Reed R.L., Sawyer T.E., Martinez M., *J. Agr. Food Chem.*, **45**, 3897 (1997)
- [91.] Alonso M.C., Puig D., Silgoner I., Grasserbauer M., Barcelo D., *J. Chromatogr. A*, **823**, 231 (1998)
- [92.] Cajthaml T., Möder M., Kačer P., Šašek V., Popp P., *J. Chromatogr. A*, **974**, 213 (2002)
- [93.] Annweiler E., Michaelis W., Meckenstock R. U., *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 852 (2002)
- [94.] Bunge M., Ballerstedt H., Lechner U., *Chemosphere*, **43**, 675 (2001)
- [95.] Hong H.B., Chang Y.S., Choi S.D., Park Y.H., *Wat. Res.*, **34**, 2404 (2000)
- [96.] Dietrich D., Hickey W. J., Lamar R., *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3904 (1995)
- [97.] Lores M., Llompарт M., Gonzales-Garcia R., Gonzales-Barreiro R., Cela R., *Chemosphere*, **47**, 607 (2002)

-
- [98.] Dai M., Rogers J. B., Warner J. R., Copley S. D., *J. Bacteriol.*, **185**, 302 (2003)
- [99.] Hong J., Kim D.G., Deo J.J., Lee Ch., Chung Ch., Kim K.W., *Anal. Chem.*, **19**, 537 (2003)
- [100.] Turiel E., Fernandez P., Perez-Conde C., Camara C., *J. Chromatogr. A*, **872**, 299 (2000)
- [101.] Loos R., Niessner R., *J. Chromatogr. A*, **835**, 217 (1999)
- [102.] Aga D.S., Thurman E.M., *Anal. Chem.*, **65**, 2894 (1993)
- [103.] Aga D.S. Thurman E.M., Pomes M.L., *Anal. Chem.*, **66**, 1495 (1994)
- [104.] Li Q.X., Hwang E.C., Guo F., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **66**, 653 (2001)
- [105.] Wilson R., Mathers D.T., Mabury S. A., Jorgensen G.M., *J. Chem. Edu.*, **77**, 1619 (2000)
- [106.] Pomes M.L., Thurman E.M., Aga D.S., Goolsby D.A., *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 163 (1998)
- [107.] Schooten F.J. Leeuwen F.E., Hillebrand M.J.X., Rijke M.E., Hart A.A.M., Veen H.G., Oosterink S., Kriek E., *Journal of the National Cancer Institute*, **82**, 11 (1990)
- [108.] Sherson D., Sabro P., Sigsgaard T., Johansen F., Autrup H., *British Journal of Industrial Medicine*, **47**, 448 (1990)