

Biologická degradácia polycyklických aromatických uhľovodíkov v pôde znečistenej uhoľným dechtom

Daniel Kupka¹, Peter Sekula², Ondrej Tischler² a Jaroslav Briančin¹

Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contaminated with coal tar

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of serious contaminants of air, water soil and sediments. Persistence and accumulation of PAHs in the environment is due to their hydrophobicity and hence low solubility and bioavailability to microbial action. This work presents an evidence of biodegradation of PAHs in a soil sample taken from a coal gasification plant contaminated with coal tar. The degradation of the contaminant by indigenous microorganisms was studied under aerobic conditions at 15 °C in a laboratory glass column. The oxidation kinetic of organic carbon was monitored by measuring the oxygen consumption rate and the carbon dioxide production rate. The biodegradation rates observed were in the range of 0.2 to 7 mg C kg⁻¹ h⁻¹. Approximately 14 000 mg kg⁻¹ of the total organic carbon was completely mineralized to CO₂ during 6 months. The sum of 16 EPA PAHs decreased from the initial concentration of 21 331 mg kg⁻¹ to the value of 2 774 mg kg⁻¹ after 6 months of biodegradation. The thermogravimetric analysis revealed a 34 % weight decrease of organic mater content during the 6-month degradation period.

Key words: Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH, coal tar, bio-degradation, gas analysis, respiration, thermogravimetry.

Úvod do problematiky

Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU) patria v súčasnej dobe k najsledovanejším skupinám rizikových látok v životnom prostredí. PAU sú väčšinou vysoko toxické, mutagénne a karcinogénne látky. Polyaromatické uhľovodíky obsahujú vo svojej molekule dva a viac kondenzovaných benzénových (aromatických) kruhov usporiadaných lineárne, zalomene, alebo vo forme zhlukov. Vzhľadom na svoju lipoфильnú povahu sa dobre vstrebávajú gastrointestinálnym traktom cicavcov. Sú pomerne rýchlo distribuované do viacerých orgánov a tkanív s tendenciou akumulácie v tukových tkanivách (Samanta a kol., 2002).

Hlavnými prírodnými zdrojmi PAU je uhlie a ropa. Niektoré PAU sa používajú v chemickom priemysle na syntézu pesticídov, detergentov, farbív a konzervačných látok a do životného prostredia sa dostávajú pri výrobe a distribúcii týchto produktov. Z ďalších antropogénnych emisných zdrojov najväčšou mierou prispievajú k znečisteniu prostredia polyaromatickými uhľovodíkmi tepelné elektrárne, dopravné prostriedky, spaľovne odpadu, pyrolyzne procesy, ako pyrolyza pneumatík, výroba koksu, splyňovanie uhlia, výroba dreveného uhlia a procesy, pri ktorých dochádza k nedokonalému spaľovaniu organických látok. Následne sa tieto látky dostávajú z atmosféry do pôdy, kde sa kumulujú, o čom svedčí výrazný nárast koncentrácie PAU v pôdach, vodách a sedimentoch v industrializovaných oblastiach za posledných 100-150 rokov (Jones a kol., 1989). Mestské oblasti predstavujú lokality s najvyššími obsahmi PAU v pôde v dôsledku koncentrácie ich hlavných producentov – priemyslu, teplární, a automobilovej dopravy. Obsahy PAU v znečistených pôdach sú v literárnych zdrojoch udávané v desiatkach až stovkách mg na kilogram sušiny. Limitné hodnoty prípustného znečistenia PAU sú všeobecne nízke, rádovo v rozsahu 0,05- 1,0 mg kg⁻¹ (Zákon č. 223/2001 Z.z. a vyhláška 283/2001 Z.z.).

PAU sú silne hydrofóbne zlúčeniny a ich perzistencia v životnom prostredí je zapríčinená najmä nízkou rozpustnosťou vo vode a tendenciou adsorbovať sa na pôdny matrix. Z toho vyplýva aj ich odolnosť voči mikrobiologickému rozkladu. Odolnosť sa zvyšuje s rastúcou molekulovou hmotnosťou (Cerniglia, 1992). PAU podliehajú oxidácii v prítomnosti ozónu a UV žiarenia a biologickej oxidácii mikroorganizmami. Metabolické dráhy mikrobiálnej oxidácie PAU obsahujúcich dva a tri aromatické kruhy (naftalén, fenantrén, anthracén a fluorantén) sú dostatočne podrobne preštudované. Je známa ich enzymatická a genetická regulácia (Juhász a Naidu, 2000). Sľubné výsledky boli dosiahnuté aj v oblasti mikrobiálnej degradácie ťažších refraktornejších PAU s vyššou molekulovou hmotnosťou, obsahujúcich 4 a viac kondenzovaných benzénových kruhov (Kastner a kol., 1994; Grifoll a kol., 1995; Juhász a Naidu, 2000; Van Hamme a kol., 2003). Iniciačným krokom transformácie PAU pri prokaryotických organizmoch (baktérie) je vnesenie dvoch atómov kyslíka z molekuly O₂ na dva atómy uhlíka benzénového kruhu účinkom dioxygenázového

¹ MVDr., Daniel Kupka PhD., Ing. Jaroslav Briančin, Ústav geotechniky Slovenskej akadémie vied, Watsonova 45, 043 53 Košice, dankup@saske.sk

² Ing. Peter Sekula, Ing. Ondrej Tischler, Environcenrtrum spol. s r.o. Rastislavova 58, 040 01 Košice (Recenzovaná a revidovaná verzia dodaná 15. 12. 2006)

enzymatického systému. To má za následok vytvorenie *cis*-dihydrodiolu, ktorý účinkom dehydrogenázy transformuje na dihydroxylovaný medziprodukt katechol (Cerniglia, 1984; Atlas, 1981; Gibson a Suramanian, 1984). Rozštiepením aromatického kruhu dochádza k tvorbe organických kyselín a ich následnej spotrebe mikrobiálnym metabolizmom na syntézu bunčných komponentov a na získanie energie, pričom dochádza k uvoľňovaniu CO₂ a vody (Wilson a Jones, 1993). Viacero štúdií ukázalo, že PAU môžu byť mineralizované na neškodné konečné produkty CO₂ a vodu.

V tejto práci sú prezentované výsledky laboratórneho testu degradácie PAU v reálnej vzorke zeminy autochtónnou bakteriálnou mikroflórou v aerobných podmienkach. Biologický spôsob sanácie tohto typu znečistenia by mohol predstavovať z hľadiska ekologického i ekonomického vhodnú alternatívu voči technológiám využívajúcim fyzikálno-chemické spôsoby dekontaminácie dechtového znečistenia.

Materiál a metódy

Príprava vzorky

Pre laboratórne testy bola odobratá vzorka zeminy znečistená polyaromatickými uhl'ovodíkmi. Zdrojom znečistenia bol uhoľný decht vznikajúci ako vedľajší produkt pri splyňovaní uhlia. Reziduálne znečistenie polyaromatickými uhl'ovodíkmi pochádzajúce ešte z obdobia výroby svietiplynu vo vtedajšej plynárni pretrváva na danej lokalite dodnes. Keďže sa jedná o starú ekologickú záťaž, bol predpoklad prítomnosti adaptovanej autochtónej mikroflóry schopnej degradovať PAU.

Zemina bola sitovaná pod 4 mm. Po následnej homogenizácii bola časť vzorky odobratá na stanovenie vlhkosti, špecifickej hmotnosti, na chemickú, mikrobiologickú analýzu a na testy toxicity. Na sledovanie biodegradácie organického uhlíka boli vzorky zeminy umiestnené v dvojplášťových sklenených kolónach s pracovným objemom 1 dm³. Hmotnosť zeminy v kolóne v prepočte na sušinu bola približne 1000 g. Zemina v kolónach bola aerovaná prúdom atmosférického vzduchu s rýchlosťou prietoku 200 ml min⁻¹. Konštantná rýchlosť prietoku vzduchu bola regulovaná pomocou mass-flow controllera (Cole Parmer USA). Biodegradácia prebiehala pri konštantnej teplote 15°C udržiavanej pomocou chladiaceho termostatu.

Chemická analýza, mikrobiologický rozbor

Na identifikáciu 16 polyaromatických uhl'ovodíkov bola použitá plynová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektroskopiou GC/MS podľa metódy US EPA 8100. Analýza bola vykonaná na plynovom chromatografe SHIMADZU QP 5050A s hmotnostným detektorom (Ekolab, Werferova 1, Košice).

Orientačný mikrobiologický rozbor vzorky bol urobený z výluhu po 15 min. pretrepávaní 10 g vzorky v 100 ml sterilného fyziologického roztoku. Výluh bol nariadený desiatkovým sériovým riedením a z každého riedenia bolo 0,1 ml vzorky naočkovaných na povrch platní so živným agarom č. 2 (Imuna Šarišské Michaľany). Misky boli kultivované pri teplote 30°C. Rast kolónii pozorovaný až do riedenia 10⁻⁹.

Respirometrické merania

Rýchlosť biologickej oxidácie organického uhlíka vo vzorkách bola monitorovaná on-line na základe porovnávaní parametrov vstupného a výstupného vzduchu (Obr. 1). Koncentrácia CO₂ bola meraná pomocou IČ analyzátora (Edinburgh Sensors, UK), koncentrácia O₂ pomocou paramagnetického analyzátora (Sable Systems, USA).

Termogravimetrická analýza

Termogravimetrická analýza TGA a diferenciálna termická analýza DTA bola meraná na prístroji Derivatograph C (MOM Budapešť, HU) pri teplotnom režime 5 °C min⁻¹. Záznam bol vyhodnotený pomocou programu WinDer C Ver. 6.0.

Výsledky a diskusia

Vzorka vykazovala vysoký stupeň znečistenia PAU už na základe senzorickeho vyšetrenia. Chemické rozbor vzorky dokázali prítomnosť vysokých koncentrácií polycyklických aromatických uhl'ovodíkov, dusíkatých a sírych derivátov PAU a ďalších látok, ako napr. nitrofenolov, vyšších alkoholov a ketónov. Zdrojom znečistenia je uhoľný decht, ktorý vznikal ako vedľajší produkt pyrolýzy čierneho uhlia pri výrobe svietiplynu. Vysoké koncentrácie 16 PAU vybraných US EPA a stanovených metódou US EPA 8100 dokumentuje tabuľka č. 1.

Senzorické zhodnotenie vzorky poukazuje na masívne znečistenie spojené s únikom prchavých zložiek do ovzdušia. Tieto plynné zložky boli zachytené sorpciou na aktívne uhlie a silikagél a následne analyzované (údaje nie sú v tejto práci prezentované).

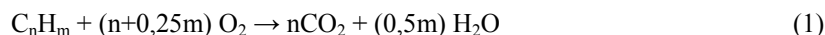
Tab. 1. Koncentrácia 16 vybraných PAU (EPA) vo vstupnej vzorke.
Tab. 1. Concentration of 16 selected PAHs (US EPA) in the sample.

ukazovateľ	mg.kg ⁻¹
acenaftén	289,72
acenaftylén	120,58
antracén	2519,20
benzo(b)fluorantén	1834,29
benzo(b,h,i)perylén	650,93
benzo(k)fluorantén	1254,78
benzo(a)antracén	1492,30
benzo(a)pyrén	1338,69
chryzén	1175,85
dibenzo(a,h)antracén	334,15
fluorén	1474,71
fluorantén	2376,20
fenantrén	1996,52
indeno(1,2,3-c,d)pyrén	1219,74
naftalén	3,60
pyrén	3249,82
SUMA PAU	21331,06

Degradácia organického uhlíka vo vzorkách zemín

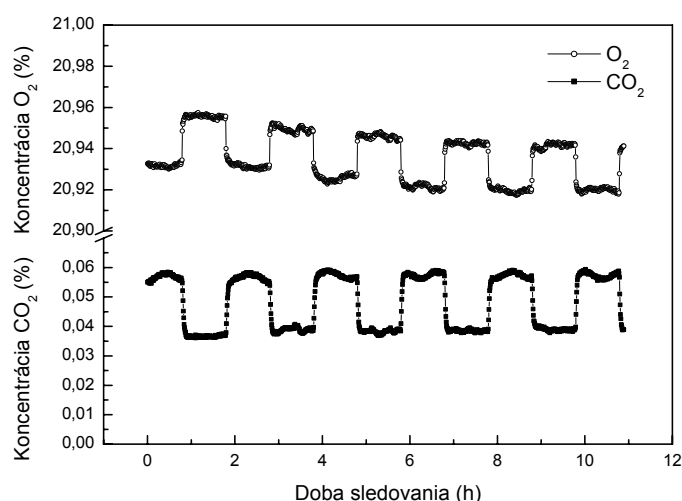
Mikrobiologický rozbor vzorky ukázal vysoké počty kultivovateľných mikroorganizmov. Počet kolónie tvoriacich zárodkov KTZ bol rádovo až 10^9 g⁻¹. Bola pozorovaná značná tvarová variabilita kolónii vyrastených aj pri vysokých riedeniach, čo poukazuje na pestrú diverzitu autochtónnych mikroorganizmov prítomných v pôvodnej vzorke. Jednotlivé izoláty sú uchovávané na identifikáciu a ďalšie štúdium v zbierke mikroorganizmov Ústavu Geotechniky SAV v Košiciach.

Kompletnú oxidáciu uhľovodíkov vrátane PAU až na oxid uhličitý a vodu možno zapísať všeobecnou stechiometrickou rovnicou



Molárny a hmotnostný pomer CO₂ a O₂ vo vzťahu k pôvodnej látke pre niektoré typy uhľovodíkov je uvedený v práci Kupka a kol. v tomto čísle.

Pomocou analýzy plynov je možné zmerať pokles koncentrácie kyslíka a produkciu oxidu uhličitého v súlade s rovnicou 1. Biologická oxidácia organického uhlíka, vrátane PAU vo vzorkách, bola monitorovaná on-line analýzou vstupného a výstupného vzduchu. Produkcia oxidu uhličitého, ako konečného produktu kompletnej mineralizácie organického uhlíka spojená so spotrebou kyslíka je dôkazom toho, že dochádza k oxidácii a k rozkladu organických látok (obr. 1).



Obr. 1. Záznam koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého. Periodická kontrola kvality vzduchu na vstupe a na výstupe z kolóny v priebehu degradácie PAU. Molárny pomer CO₂/O₂ má hodnotu 0,83.

Fig. 1. A record of concentrations of oxygen and carbon dioxide. A periodic analysis of the inlet and outlet gas quality in the course of PAH degradation. Molar CO₂/O₂ ratio equals 0.83.

Rýchlosť spotreby O_2 je vypočítaná pomocou vzťahu 2

$$-r_{O_2} = \frac{1}{M_{Soil}} (\Phi_{gas,in} [O_2]_{gas,in} - \Phi_{gas,out} [O_2]_{gas,out}) \quad (2)$$

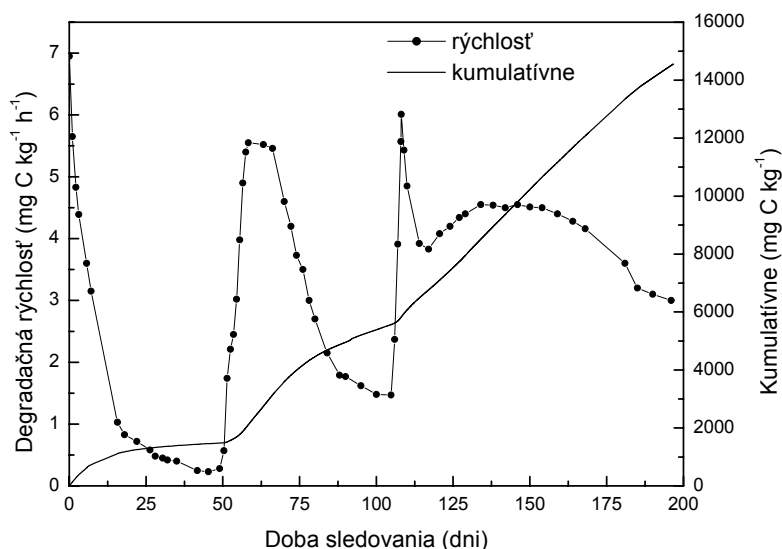
a analogicky rýchlosť produkcie CO_2 zo vzťahu 3

$$r_{CO_2} = \frac{1}{M_{Soil}} (\Phi_{gas,out} [CO_2]_{gas,out} - \Phi_{gas,in} [CO_2]_{gas,in}) \quad (3)$$

Následne je možné vypočítať kumulatívne množstvo odbúraného organického uhlíka z rýchlosti produkcie CO_2 za ľubovoľný časový interval.

$$C_X(t) = C_X(0) - \sum_{t_i=0}^{t_{i+1}=t} \frac{r_{CO_2}(t_i) + r_{CO_2}(t_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i) \quad (4)$$

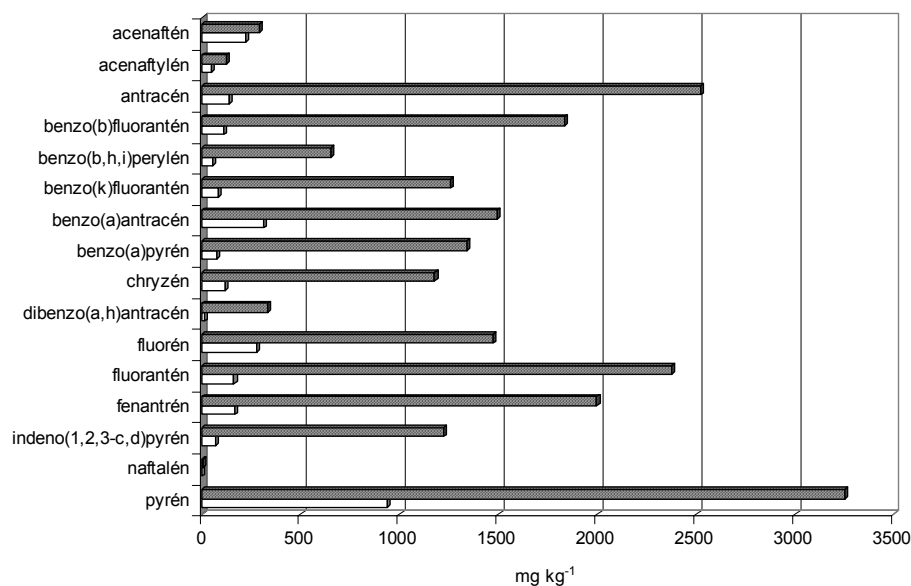
Respiračné rýchlosti sú indikátorom kinetiky degradácie organických látok v sledovanej vzorke. Na obrázku 2 sú zobrazené rýchlosti produkcie CO_2 a celkové množstvo odbúraného organického uhlíka vo forme CO_2 . Rýchlosť degradácie sa v priebehu kratších časových intervalov (napr. v priebehu jedného dňa) javila relatívne konštantná. Pri dlhodobom monitorovaní mali priemerné denné rýchlosti degradácie klesajúcu tendenciu. Aj napriek konštantným podmienkam experimentu degradačná rýchlosť poklesla v priebehu prvých 50 dní z hodnoty $7 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ na hodnotu $0,2 \text{ mg C kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Pokles rýchlosti degradácie môže byť napr. v dôsledku postupného znižovania vlhkosti, selektívneho odbúrania ľahšie rozložiteľných látok, úbytku nutričov, akumulácie toxických medziproduktov a ďalších faktorov. Po revitalizácii procesu zvýšením vlhkosti možno pozorovať prudkú akceleráciu degradačných rýchlostí a následný opätovný pokles. V priebehu troch takýchto cyklov, počas 6 mesiacov biologickej degradácie pri teplote 15°C bolo celkovo odbúraných približne $14\,000 \text{ mg}$ organického uhlíka v 1 kg suchej hmotnosti vzorky (obr. 2, vedľajšia os y).



Obr. 2. Priemerné denné rýchlosti degradácie organického uhlíka a kumulatívne odbúrané množstvo organického uhlíka vypočítané z produkcie CO_2 pri teplote 15°C .

Fig. 2. Average daily organic-carbon-degradation rates and the cumulative amount of degraded organic carbon calculated from the production of CO_2 at the temperature of 15°C .

Chemický rozbor vzorky pôdy po 6 mesiacoch biologickej degradácie ukázal výrazný pokles koncentrácie všetkých 16 sledovaných polyaromatických uhľovodíkov. Porovnanie koncentrácie PAU vo vstupnej vzorke s hodnotami po 6 mesiacoch biodegradácie je na obrázku 3. Celková suma PAU sa znížila z pôvodnej hodnoty $21\,331 \text{ mg kg}^{-1}$ (Tab. 1) na hodnotu $2\,774 \text{ mg kg}^{-1}$, čo predstavuje 13 % pôvodnej koncentrácie.

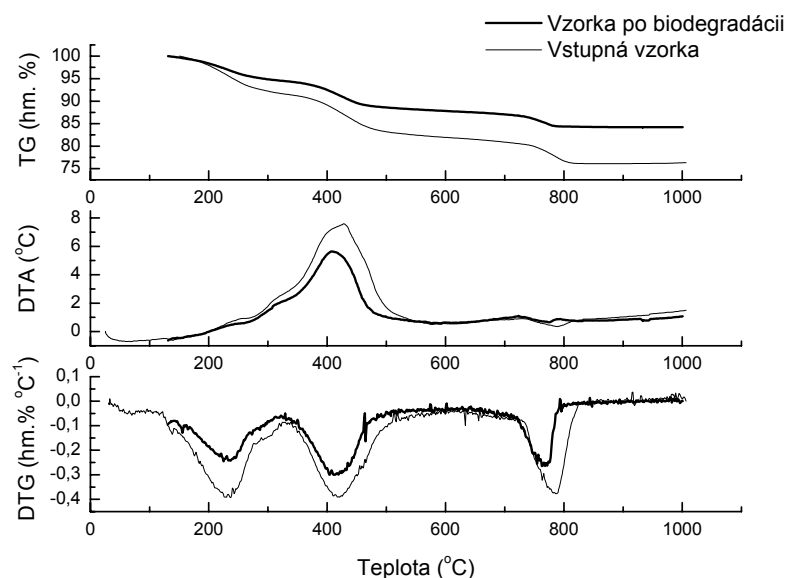


Obr. 3. Koncentrácia 16 polyaromatických uhľovodíkov vo vstupnej vzorke (šrafované) a po 6 mesiacoch biodegradácie (prázdne stĺpce).

Fig. 3. Concentration of 16 selected PAHs (US EPA) in the sample before (dashed columns) and after the 6-month biodegradation period (blank columns).

Termogravimetrická analýza TGA a diferenciálna termická analýza DTA vzoriek

Termogravimetrická analýza vzoriek (Obr. 4) indikuje tri významné termické efekty spojené s úbytkom hmotnosti vzorky (záznam TG). Všetky tri termické efekty sú výraznejšie v prípade vstupnej vzorky v porovnaní so vzorkou po šiestich mesiacoch biodegradácie. Prvý pík na zázname DTG so začiatkom termického efektu pri teplote 120 °C a s maximom pri 238 °C zodpovedá evaporácii prchavých zložiek, tepelnej deštrukcii karboxylových zlúčenín a fenolyckých skupín.



Obr. 4. Termická analýza vstupnej vzorky (tenká krivka) a vzorky po biodegradácii (hrubá krivka).

Fig. 4. Thermal analysis of „as received“ sample (thin line) and the sample after the 6-month biodegradation period (bold line).

Druhý termický efekt so začiatkom pri 335 °C a s maximom pri 420 °C je spojený s oxidáciou organického uhlíka na CO₂ a vodu (horenie), čomu zodpovedá aj výrazný exotermický prejav na zázname DTA. V teplotnom intervale tohto termického efektu sa nachádzajú body varu väčšiny PAU. Tretí termický

efekt s maximom pri 770-780 °C pravdepodobne zodpovedá deštrukcii anorganických zložiek vzorky. Zaujímavé však je, že aj pri tejto vysokej teplote je hmotnostný úbytok vzorky po biodegradácii o 34 % nižší v porovnaní so vstupnou vzorkou, podobne ako v prípade prvých dvoch termických efektov.

Analýza plyných produktov v priebehu termického rozkladu vzoriek umožnila detailnejší rozbor týchto efektov. K pozorovanej tvorbe plyných produktov s obsahom uhlíka dochádza len v teplotnom intervale od cca 100 °C do 720 °C. Teda s úbytkom organickej hmoty súvisia len prvé dva termické efekty. Tretí termický efekt na obrázku 4 nezodpovedá organickému uhlíku. Podľa predbežných výsledkov termickej analýzy obsah organickej hmoty vo vstupnej vzorke bol približne 24 %, čo svedčí o silnom znečistení. Vo vzorke po 6 mesačnej biodegradácii sa koncentrácia organickej hmoty znížila približne o 34 %.

Záver

Pre ochranu zdravia človeka je potrebné minimalizovať obsah škodlivín v životnom prostredí. Polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU) patria v súčasnej dobe k najsledovanejším skupinám rizikových látok. Vďaka rýchlemu rozvoju chromatografických a detekčných metód možno tieto organické zlúčeniny v prostredí spoľahlivo identifikovať a kvantifikovať v rôznych maticiach. (Dercová, 2005).

Prezentovaná práca podáva dôkaz na biodegradáciu PAU v pôde. Na rozklade aromatických uhľovodíkov včítane vysokomolekulových PAU (benzo[a]pyren) sa podieľali autochtónne mikroorganizmy prítomné vo vzorke znečistenej pôdy. Keďže sa jedná o starú záťaž, dlhodobá expozícia a selekčný tlak vysokých koncentrácií kontaminanta indukovali formovanie adaptovanej autochtónnej mikroflóry. Početná biodiverzita mikroorganizmov vzhľadom na morfológickú rozdielnosť kolónií vykultivovaných z predmetnej vzorky zeminy je priaznivým zistením vzhľadom na možnosť aplikácie biologických postupov v procese sanácie. Tento fakt podporuje aj značná respiračná aktivita samotnej vzorky, aj napriek vysokým koncentráciám PAU. Sledovaná vzorka vykazovala pomerne vysoké rýchlosti degradácie organického uhlíka namerané v laboratórnych podmienkach pri teplote 15 °C. Táto teplota je blízka teplotným klimatickým pomerom v priebehu roka s výnimkou zimných mesiacov v prístupných zónach. Pre priebeh degradácie boli zabezpečené vhodné aeróbne podmienky, dostatočná vlhkosť prostredia a prítomnosť nutričov. Pri rýchlosti cca 5 mg C kg⁻¹ h⁻¹ (cca 120 mg C kg⁻¹ deň⁻¹) je možné vysloviť orientačnú prognózu ohľadne doby potrebnej na sanáciu v závislosti na koncentrácii kontaminantu v prostredí.

Biologická degradácia ako sanačná metóda je vzhľadom na vyššie uvedené skutočnosti aplikovateľná aj na znečistenia PAU. Sľubné výsledky boli dosiahnuté v prípade degradácie nízkomolekulových, ako aj refraktornejších PAU s vyššou molekulovou hmotnosťou. Je potrebné konštatovať, že pri sanácii zložiek životného prostredia znečistených uhoľným dechtom neboli biologické postupy doposiaľ v praxi veľmi často aplikované. Biologický spôsob rozkladu PAU by mal predstavovať vhodnú alternatívu technológiám využívajúcim fyzikálne postupy (termický rozklad PAU) a chemické postupy (aplikácia surfaktantov a oxidačných činidiel KMnO₄, H₂O₂, O₃, fentonovú reakciu a ďalšie) z hľadiska ekologického i ekonomického. Úspešnosť aplikácie mikroorganizmov pri sanácii prostredia znečisteného PAU vyžaduje komplexné vedomosti o priebehu mikrobiálnej degradácie. Reziiduálne znečistenie polyaromatickými uhľovodíkmi (Σ PAU 2 774 mg kg⁻¹) stanovené po 6 mesiacoch intenzívnej biodegradácie v laboratórnych podmienkach je stále vysoké vzhľadom na prípustné limitné hodnoty pre jednotlivé PAU v pôdach s hraničnou hodnotou sumárnej koncentrácie PAU pre kategóriu A (1 mg kg⁻¹), B (20 mg kg⁻¹), C (200 mg kg⁻¹).

PodĎakovanie. Práca bola realizovaná s finančnou podporou zo Štátneho programu High Tech a nové technológie pre oblasť získavania a spracovania nerudných surovín. Reg. č. 676/2004-500-120.

Literatúra - References

- Atlas, R.M.: Microbial degradation of petroleum hydrocarbons; an environmental perspective. *Microbiological Reviews* 45, 180-209, 1981.
- Cerniglia, C. E.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-368, 1992.
- Cerniglia, C. E.: Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology* 30, 31-71, 1984.
- Dercová, K., Sejáková, Z.: Rizikové látky v pôde. Časť 2. Polyaromatické uhľovodíky (PAH). *Odpady roč. 5. č. 12, 12-18, 2005.*
- Gibson, D. T. (Ed.), Microbial Degradation of Organic Compounds. Marcel Dekker, New York, pp. 181-252.

- Gibson, D. T., Subramanian, V.: Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. 1984, In: Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V., Chapman, P. J., 1995. Actions of a versatile Fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3711-3723, 2005.
- Jones, K. C., Stratford, J. A., Waterhouse, K. S., Furlong, E. T., Giger, W., Hites, R. A., Schaner, C., Jobstson, A. E., 1989. Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environmental Science and Technology* 23, 95-101.
- Juhasz, A. L., Naidu, R.: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 57-88, 2000.
- Kastner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B.: Enumeration and characterisation of the soil micro-ora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralise polycyclic aromatic hydro-carbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology* 41, 267-273, 1994.
- Samanta, S. K., Sing, O. V. Jain, R. K.: Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and biodegradation. *Trends in Biotechnology*, Vol. 20, No. 6, 243-248 2002.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. Ward, O. P.: Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 4, 503-549, 2003.
- Wagrowski, D. M., Hites, R. A.: Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation. *Environ. Sci. Technol.* 31:279-282. 1997.
- Wilson, S. C. Jones, K. C.: Bioremediation of soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution* 88, pp. 229-249, 1993.