

Warunki biodegradacji WWA w środowisku wodnym

*Maria Włodarczyk-Makuła, Monika Wierzbicka**

Wprowadzenie

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) należą do grupy toksycznych zanieczyszczeń organicznych. Obecność tych związków w wodach powierzchniowych i podziemnych została wielokrotnie potwierdzona i znalazła odzwierciedlenie w przepisach prawnych. W dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady na liście środowiskowych norm jakości wód powierzchniowych, spośród WWA, wymienia się osiem węglowodorów (antracen, fluoranten, naftalen, benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perylene, indeno(123cd)piren). Sześć z nich (z pominięciem naftalenu i fluorantenu) uznano za najbardziej niebezpieczne [4, 5, 6]. Do oceny stanu wód podziemnych wymienia się sumę WWA (bez wyszczególnienia jakie związki należy analizować). Dla tła hydrogeochemicznego stężenia WWA podaje się zakresie od 1 do 100 ng/l. Dla poszczególnych klas jakości wód podziemnych: kolejno od I do IV, graniczne stężenia WWA określono na poziomie 100, 200, 300, 500 ng/l. Oznacza to, że gdy stężenie przekracza 500ng/l wody zaliczane są do V klasy czystości [7]. Głównym źródłem skażeń środowiska

wodnego mikrozanieczyszczeniami są ścieki bytowe i przemysłowe, opady atmosferyczne zawierające pyłowe zanieczyszczenia powietrza, spływy powierzchniowe z terenów zanieczyszczonych produktami ścierania asfaltów i opon pojazdów mechanicznych [10].

Badania toksykologiczne wykazały, że część związków z grupy WWA ma działanie kancerogenne, mutagenne lub teratogenne, co sprawia, że problem obecności i trwałości tych związków w środowisku jest poważny. Ponadto takie właściwości posiadają nie tylko związki podstawowe, lecz również produkty pośrednie ich przemian, jakie zachodzą w zmieniających się warunkach środowiska. Pomimo tego, że WWA należą do grupy trwałych zanieczyszczeń, to jednak ulegają ciągłym powolnym przemianom fizyczno-chemicznym i biologicznym. Spośród tych przemian główne znaczenie w usuwaniu ze środowiska wodnego i glebowego odgrywa biodegradacja. W artykule przedstawiono literaturowe rozpoznanie możliwości biodegradacji WWA w środowisku wodnym z uwzględnieniem szlaków przemian metabolicznych wybranych związków [12, 23].

Biodegradacja związków organicznych

Biologiczny rozkład związków organicznych przebiega z udziałem mikroorganizmów w procesach metabolizmu, który obejmuje procesy, w których substraty stanowią źródło węgla (katabolizm) oraz służą do syntezy komórek (anabolizm). Pod wpływem enzymów wytwarzanych przez komórki zachodzą biotransformacje na zewnątrz oraz wewnątrz komórek. Wśród enzymów należy wymienić oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy i ligazy. Większość związków organicznych (cukry, tłuszcze, białka) stosunkowo łatwo ulegają przemianom enzymatycznym. Inne natomiast, aby mogły stanowić źródło węgla i energii, muszą ulec hydrolizie i dopiero produkty zhydrolizowane mogą być przyswajane przez mikroorganizmy i wykorzystywane w procesach katabolicznych. W komórkach proste związki organiczne są włączane w szlaki metaboliczne i zachodzą wieloetapowe przemiany prowadzące do powstawania energii i nowych komórek. Całkowita mineralizacja związków organicznych prowadzi do powstawania ditlenku węgla i wody. Biologiczny rozkład substancji

organicznych może zachodzić zarówno w warunkach tlenowych i beztlenowych z udziałem bezwzględnych tlenowców, bezwzględnych beztlenowców oraz bakterii fakultatywnych i mikroaerofilnych [13, 14, 16, 22].

W literaturze jest wiele prac opisujących możliwości degradacji zanieczyszczeń organicznych z wykorzystaniem drobnoustrojów izolowanych ze środowiska, przez czyste kultury jak i mieszane populacje mikroorganizmów. Główną rolę w mineralizacji związków organicznych w środowisku odgrywają organizmy chemoorganotroficzne, dla których źródłem węgla i energii są właśnie związki organiczne oraz fotoorganotroficzne, dla których związki organiczne wykorzystywane są jako materiał budulcowy. Wśród tych organizmów wymienia się: archeobakterie, prokarioty (bakterie), eukarioty takie jak grzyby, glony, drożdże i pierwotniaki. W niektórych przypadkach konieczne jest współdziałanie większej liczby szczepów lub/i kultur mieszanych. Mikroorganizmy autochtoniczne zwykle nie wykazują bezpośrednio zdolności do rozkładu zanieczyszczeń organicznych trudno rozkładalnych, dlatego często niezbędna jest



adaptacja drobnoustrojów polegająca na wykształceniu zdolności do produkcji odpowiednich enzymów lub indukowanie zmian genetycznych prowadzących do możliwości wytwarzania takich enzymów [14, 16, 22].

Biodegradacja WWA

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wykazują dużą odporność na biodegradację, co wynika z ich właściwości hydrofobowych oraz zdolności do sorbowania na cząstkach stałych. Odporność na biodegradację rośnie proporcjonalnie do wartości współczynnika podziału oktanol/woda i wzrostu masy molowej, a odwrotnie proporcjonalnie do rozpuszczalności w wodzie. Lipofilność i oporność na degradację WWA rośnie także wraz ze wzrostem liczby pierścieni aromatycznych. Obecność związków organicznych w środowisku, takich jak detergenty zwiększa rozpuszczalność w wodzie, co wpływa na zwiększoną dostępność WWA dla mikroorganizmów. Z drugiej strony substancje te mogą hamować metabolizm bakteryjny na skutek uszkodzenia błon komórkowych, jak również powodować powstawanie bardziej toksycznych intermediatów, co ma niekorzystny wpływ na rozkład WWA [15, 17].

W przypadku WWA proces biodegradacji jest wieloetapowy i może przebiegać na drodze przemian metabolicznych lub kometabolicznych. Rozkład mogą prowadzić czyste szczepy jak i populacje mieszane, dla których po-

średnie produkty stanowią substraty dla innych. Rozkład węglowodórów w obecności łatwo rozkładalnego substratu jest możliwy z uwagi na stymulujący wpływ tego substratu na rozwój drobnoustrojów mających zdolność metabolizowania WWA [15]. Asymilacja WWA przez drobnoustroje może przebiegać w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Proces bez dostępu tlenu przebiega wolniej, a szybkość rozkładu zanieczyszczeń w tych warunkach może być nawet 100-krotnie mniejsza [17]. W warunkach anoksydacyjnych efektywność procesu biodegradacji zależy od możliwości wykorzystania innych akceptorów elektronów, jednak największy zysk energetyczny drobnoustroje uzyskują, gdy akceptorem jest tlen. Szlaki i strategia biochemicznej transformacji WWA zależą od charakteru chemicznego danego związku, dostępności akceptora elektronów oraz od rodzaju mikroflory i jej zdolności enzymatycznych do rozkładu konkretnego substratu a także od warunków środowiska (np. pH, temperatura, obecność innych związków). Dane literaturowe wskazują, że mikroorganizmy mogą wykorzystywać węglowodory z dwoma do czterech pierścieni aromatycznych jako główne źródło węgla. Natomiast te węglowodory, które zbudowane są z większej liczby pierścieni w cząsteczce są bardziej odporne na rozkład biologiczny. Warunki anoksydacyjne i silne zakwaszenie podłoża znacznie ograniczają rozpad WWA, natomiast w obecności tlenu

można uzyskać stopniową degradację WWA zbudowanych z większej liczby pierścieni [1, 14].

WWA mogą także ulegać biodegradacji na szlaku przemian kometabolicznych, kiedy węglowodory stanowią dodatkowe źródło węgla dla mikroorganizmów. Przykładem tego procesu jest biodegradacja benzo(a)pirenu przeprowadzana przez szczepy *Bacillus megaterium*. Bakterie te mają zdolność akumulacji tego związku w cytoplazmie w formie połączeń z lipidami. Jednak aby degradacja benzo(a)pirenu mogła zachodzić, wymagana jest w podłożu obecność kosubstratu, którym może być fenantren. Inne badania wskazują że fenantren oraz takie węglowodory jak fluoroanten, mogą stanowić jedyne źródło węgla i energii tylko dla wybranych szczepów bakterii. Związki te mogą być rozkładane kometabolicznie razem z WWA o mniejszej liczbie pierścieni, przy czym koutlenienie WWA o mniejszej cząsteczce, np. fluorenu i fenantrenu zachodzi łatwiej niż węglowodórów cięższych, np. benzo(a)antracenu czy pirenu. O ile w literaturze można znaleźć informacje dotyczące szlaków biodegradacji pojedynczych węglowodórów w roztworach modelowych, to niewiele wiadomo o szlakach biodegradacji mieszanin węglowodórów poliaromatycznych. Niekiedy po dodaniu do mieszaniny WWA dodatkowego związku z tej grupy obserwuje się zahamowanie biodegradacji. Zjawisko to określane jest w literaturze jako antagonizm substratowy.

Ogromną rolę w degradacji WWA z udziałem drobnoustrojów odgrywa współdziałanie mikroorganizmów, które uzupełniają się metabolicznie. Wówczas wprowadzenie do mieszaniny hodowlanej dodatkowego szczepu może zminimalizować lub usunąć efekt obserwowanej wcześniej inhibicji [15].

Mikroorganizmy zdolne do rozkładu WWA

Jak już pisano, mikroorganizmy zwykle nie są zdolne do bezpośredniego rozkładu takich ksenobiotyków jak WWA. Dlatego zwykle konieczna jest adaptacja mikroflory do biodegradacji węglowodórów obecnych w danym środowisku. Aby nastąpiło wykształcenie zdolności do produkcji odpowiednich enzymów mikroorganizmy potrzebują pewnego czasu, który zależy od rodzaju organizmów oraz od właściwości węglowodoru. Wiele bakterii oraz grzybów posiada zdolność do rozkładu WWA, jednak żaden pojedynczy gatunek nie wykazuje zdolności do wytwarzania takich enzymów, z udziałem których możliwa byłaby degradacja wszystkich zanieczyszczeń z tej grupy. Biodegradacja WWA jest więc procesem wieloetapowym, zachodzącym z udziałem wielu mikroorganizmów, które często wykazują działanie synergistyczne względem siebie. Mineralizacja WWA może być prowadzona przez czyste szczepy bakterii, mieszane populacje, grzyby, promieniowce, cyjanobakterie i glony. Największą zdolnością do biotransformacji WWA odznaczają się bakterie. Spośród bakterii

główną rolę w utlenianiu węglowodorów aromatycznych wykazują bakterie gramujemne, np. szczepy *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium* [14, 15, 21]. W tab.1 przedstawiono szczepy bakterii zdolne do rozkładu WWA w warunkach tlenowych [1].

Węglowodory od naftalenu do benzo(a)pirenu (w kolejności zgodnej z tabelą) mogą być również degradowane z udziałem drożdży takich jak *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* (antracen). Wśród grzybów wykazujących zdolność do przemian WWA wymienia się takie grzyby jak *Cunninghamella elegant*, *Rhizoctonia solani*, *Trametes versicolor*, *Chrysosporium lignorum*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium tordum*, *Sclerotium rolfsii* [10, 16]. Mieszane kultury grzybów mogą powodować degradację takich węglowo-

dorów jak benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, chryzen, benzo(ghi)perylen, dibenzo(ghi)peryleni Indeno(123,c d)piren [1]. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie naukowców enzymami pozyskiwanymi z grzybów białej zgnilizny drewna (white-rot fungi) do rozkładu WWA. Wykazano bowiem, że enzymy takie jak peroksydaza ligninowa, Mn-zależna peroksydaza i lakkaza wytwarzane przez *Nematoloma frowardii* biorą udział w utlenianiu związków monoaromatycznych jak i poliaromatycznych takich jak antracen, fenantren fluoranten [8]. Do glonów posiadających zdolność do metabolizmu pojedynczych jak i mieszanin WWA należą *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda* [1]. Przykładowo fenantren ulega

rozpadowi z udziałem zieleńców do czterech odmiennych monohydroksyfenantrenów i dwóch dihydroksyfenantrenów, natomiast piren i fluoranten do trzech różnych pochodnych hydroksylowych [1, 2, 11, 23, 24].

Szlaki biodegradacji WWA

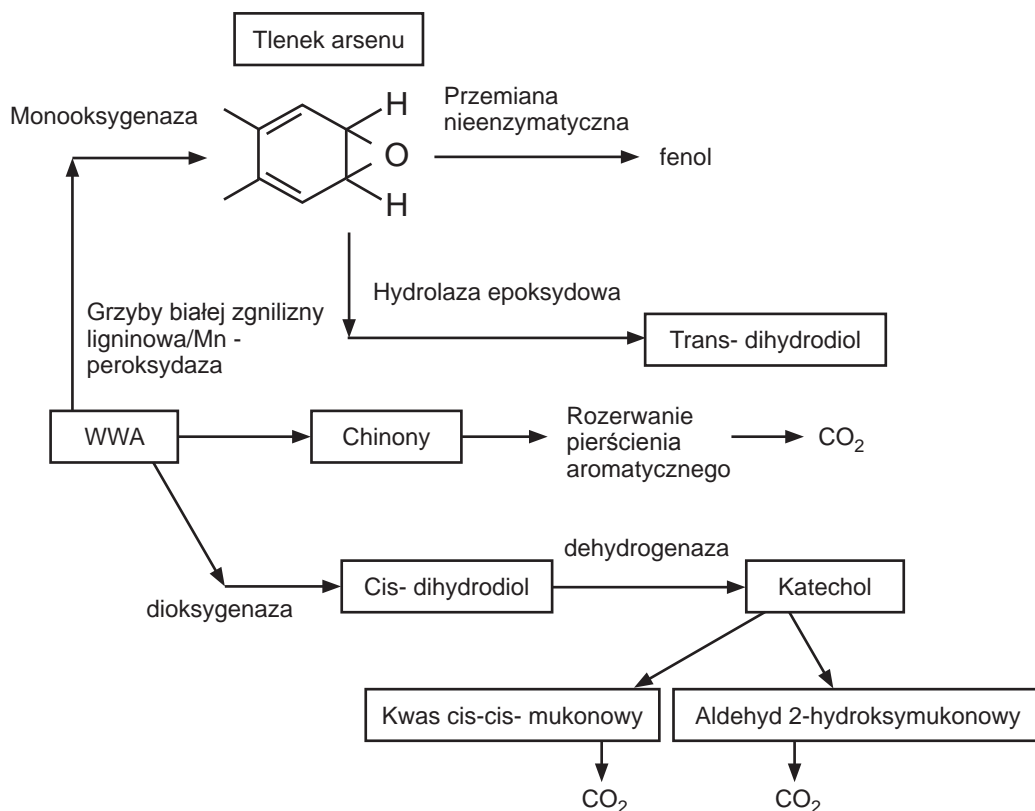
W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod genomiki i proteomiki, nastąpił dalszy postęp w poznawaniu mechanizmów mikrobiologicznych, prowadzących do biodegradacji zanieczyszczeń. Chociaż proces mineralizacji uważa się za zakończony, gdy substancja organiczna ulegnie biotransformacji do prostych związków takich jak CO₂, H₂O. Dotyczy to jednak związków organicznych łatwo rozkładalnych. Natomiast w przypadku związków złożonych, trudno

rozkładalnych w warunkach naturalnych często powstają jednocześnie różne produkty pośrednie rozkładu. Mogą one wykazywać silniejsze właściwości toksyczne i być trudniej biodegradowalne niż substancje wyjściowe. Zwykle organizmy priokariotyczne utleniają WWA z udziałem dioksygenaz, włączając dwa atomy tlenu do substratu, co prowadzi do powstania *cis*-hydrodioli, które są następnie przekształcone do związków dihydroksylowych. Rozkład WWA przez grzyby z wykorzystaniem monooksygenaz przebiega w odmienny sposób, a mianowicie po włączeniu do ksenobiotyku jednego atomu tlenu tworzą się tlenki arenów, które dalej są hydroksylowane do *trans*-dihydrodioli i fenoli. Po hydroksylacji pierwszego pierścienia benzoowego następuje jego

Tabela 1. Bakterie zdolne do tlenowego rozkładu WWA [1]

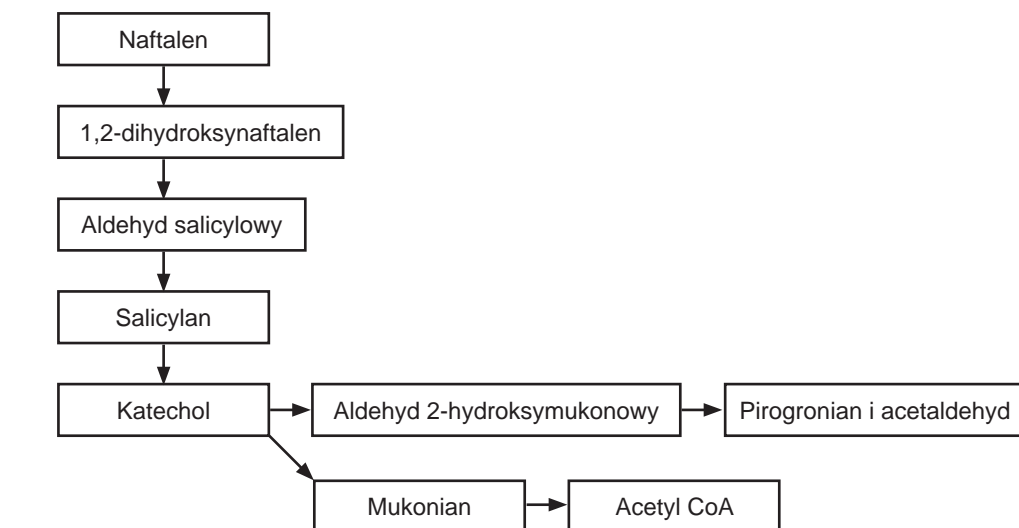
WWA	Bakterie zdolne do biodegradacji WWA
Naftalen	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Staphylococcus utriculans</i>
Acenaftylen	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
Acenaften	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Beijerinckia sp.</i>
Fluoren	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Brevibacterium sp.</i> , <i>Mycobacterium Pseudomonas sp.</i> , <i>Staphylococcus auriculans</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>
Antracen	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>
Fenantren	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Aeromonas sp.</i> , <i>Agmenellum quadruplicatum</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Arthrobacter polychromogenes</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Streptomyces flavovirens</i>
Fluoranten	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Benzo(a) antracen	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
Benzo(b)fluoranten benzo(k)fluoranten	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Piren	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>
Chryzen	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>
Benzo(a)piren	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Alcaligenes denitryficans</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Sphingomonas yanoikuyae</i>
Benzo(ghi)perylen Dibenzo(ghi)perylen Indeno(123,c d)piren	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>

rozszczerzenie i przekształcenie do kwasu pirogronowego i dwutlenku węgla, po czym w podobny sposób rozpada się kolejny pierścień [24]. Przykładowo produktami biodegradacji naftalenu są 1,2-dihydroksynaftalen, aldehyd salicylowy, salicylan i katechol. W procesie degradacji mikrobiologicznej fenantrenu powstają 2,4-hydroksyfenantren, 1,2-dihydroksynaftalen i ftalany, natomiast podczas przemian fluorenu zidentyfikowano 3,4-dihydroksyfluoren, n,3,4-dihydroksykumarynę, 1-indanon i salicylan [15, 20, 21, 24]. Na rys. 1-3 przedstawiono schematycznie przebieg biodegradacji WWA oraz odpowiednio naftalenu oraz pirenu [9].



Rys. 1. Uproszczony szlak degradacji WWA w przemianach kometabolicznych [9]

W przypadku pochodnych WWA w pierwszej kolejności degradowany jest podstawnik a dopiero potem zachodzi rozszczepienie pierścienia aromatycznego. Prosty podstawnik alkilowy powoduje, że związek łatwiej ulega rozkładowi. Pierwsza faza przemian enzymatycznych pochodnych WWA prowadzi do powstania pochodnych chlorokatechiny, które są dalej degradowane w drugiej fazie rozkładu. W fazie I związki policykliczne są aktywowane przez dioksygenazę w warunkach tlenowych. Powstałe pochodne cis-hydrodiolowe są przekształcane z udziałem dehydrogenaz do pochodnych 1,2-difenolowych, które są substratem w kolejnej reakcji enzymatycznego rozszczepienia, prowadzącej do rozerwania pierścienia benzenowego. Rozkład pochod-



Rys. 2. Przebieg procesu biodegradacji naftalenu w warunkach tlenowych z udziałem bakterii z grupy Pseudomonas [9]

nych katechiny zachodzi pod wpływem szeregu enzymów w sekwencyjnych reakcjach biochemicznych, prowadzących do utworzenia intermediatów włączanych do cyklu Krebsa, glukoneogenezy czy β-oksydacji [15, 21].

Wnioski

Na podstawie przeglądu literatury dotyczącej możliwości i warunków biodegradacji WWA można sformułować następujące wnioski:

1. Biodegradacja WWA jest procesem kilkuetapowym

i może przebiegać z udziałem różnorodnej populacji mikroorganizmów: bakterii, grzybów, drożdży, glonów.

2. Efektywność procesu biodegradacji zależy od rodzaju węglowodoru i jego właściwości, warunków środowiska

oraz obecności i zdolności mikroorganizmów do wytwarzania odpowiednich enzymów.

3. Węglowodory o mniejszej masie cząsteczkowej ulegają degradacji znacznie szybciej niż związki o dużej masie cząsteczkowej.

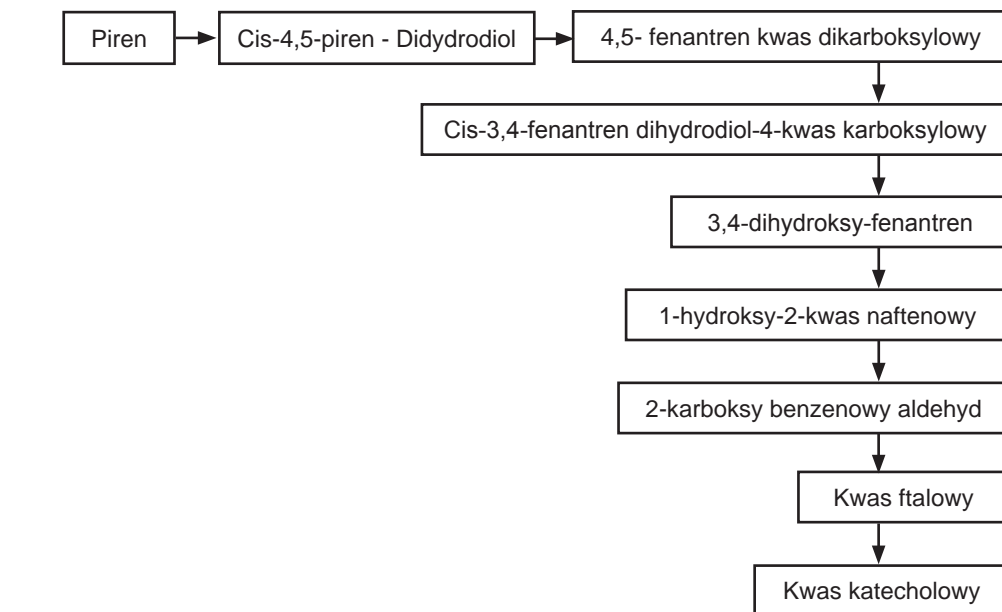
4. Przemiany biologiczne WWA odbywają się zarówno w warunkach tlenowych jak i bez-tlenowych, jednak szybkość biodegradacji w warunkach anaerobowych jest mniejsza.

5. W procesach rozkładu WWA powstające produkty rozpadu mogą być znacznie bardziej toksyczne oraz trudniej biodegradowalne niż substancje wyjściowe.

Pracę wykonano w ramach BS-MN-402-302/12

Literatura

[1] Agteeren M.H., Keuning S., Janssen D.B., Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds, Kluwer Academic Publishers, 1998
 [2] Biłozor S., Nawrocki J., Stabilność biologiczna wody do picia, PZITS, Poznań 2004
 [3] Cebula J., Górka P., Barbusiński K., Wybrane zagadnienia ochrony środowiska, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2003
 [4] Dz. Urz. UE Nr 348/2008
 [5] Dz. U. Nr 257 poz. 1545, 2011
 [6] Dz. U. Nr 258, 1550, 2011
 [7] Dz. U. Nr 143, 896, 2008
 [8] Gullotto A., Branciamore S., Duchi I., Cano M.F., Randazzo D., Tilli S., Giardina S., Sanna G., Scozzafava A., Briganti F., Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono- and



Rys. 3. Przebieg procesu biodegradacji pirenu [9]

poly-aromatic hydrocarbons, Bioresource Technology, 99, 2008, 8353-8359
 [9] Haritash A.K., Kaushik C.P., Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, Journal of Hazardous Materials 169, 2009, 1-15
 [10] Hryniewicz Z., Zanieczyszczenia uciążliwe w środowisku wodnym, Woda-ścieki-odpady w środowisku II, Wydawnictwo Politechniki Zielonogórskiej, Materiały konferencyjne, Zielona Góra 1997
 [11] Janosz-Rajczyk M., Zakrzewska E., Włodarczyk-Makuła M., Tokarz I., Zmiany zawartości WWA w osadach ściekowych podczas fermentacji metanowej z dodatkiem niejonowej substancji powierzchniowo czynnej, Inżynieria i Ochrona Środowiska, tom 3, nr 1-2, Częstochowa 2000
 [12] Jędraczek A., Mąkowski M., Oczyszczanie ścieków – nowe trendy, Woda-ścieki-odpady w środowisku II, Uniwersytet Zielonogórski Wyd.

MAXIM, Zielona Góra 2002
 [13] Klimiuk E., Łebkowska, Biotechnologia w ochronie środowiska, PWN, Warszawa 2004
 [14] Kołwzan B., Adamik W., Grabas K., Pawełczyk A., Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005
 [15] Kwapisz E., Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodórów ropy naftowej, Biotechnologia 2 (73), Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2006
 [16] Miksch K., Zastosowanie biotechnologii w oczyszczaniu wody, ścieków, gruntów i gazów oraz utylizacji odpadów, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008
 [17] Włodarczyk-Makuła M., Ilościowe zmiany WWA w osadach i cieczach nadosadowych podczas fermentacji prowadzonej w warunkach denitryfikacji, Inżynieria i Ochrona Środowiska, tom 13, nr 4, Częstochowa 2010
 [18] Włodarczyk-Makuła M., Wiśniowska E., Janosz-Rajczyk M., Przemiany biotyczne

i abiotyczne WWA w osadach podczas fermentacji, Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2002
 [19] www.bip.minrol.gov.pl
 [20] www.chem.pg.gda.pl/Katedry/Leki_Biochemia/.../mboswyk2.pp
 [21] http://fundacja.ogr.ar.krakow.pl/pdf/Koloczek%20Kaszycy%20str%2028-40.pdf
 [22] www.nettax.pl/serwis/imgpub/du/2003/232/2343/zal80.pdf
 [23] http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_książka_polska/Rozdzialy/rozdzial_033.pdf
 [24] www.pzits.not.pl/doc/ksiazki/Ekotok_2008/Zaleska-Radziwill465-474.pdf
 * Maria Włodarczyk-Makuła, Monika Wierzbicka; Katedra Chemii, Technologii Wody i Ścieków, Wydział Inżynierii Środowiska i Biotechnologii, Politechnika Częstochowska, mwm@is.pcz.czyst.pl