



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Zmiany w składzie bakteryjnych kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebie

Author: Agnieszka Mrozik

Citation style: Mrozik Agnieszka. (2009). Zmiany w składzie bakteryjnych kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebie. Katowice : Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego.



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Agnieszka Mrozik

A scanning electron micrograph (SEM) showing numerous rod-shaped bacteria in soil. The bacteria are stained pink and are distributed across a dark, textured background that represents soil particles. Some bacteria are in pairs, while others are single. The image is used as a background for the book cover.

Zmiany w składzie
bakteryjnych kwasów tłuszczowych
w czasie rozkładu fenolu w glebie



Wydawnictwo
Uniwersytetu Śląskiego
Katowice 2009

**Zmiany w składzie
bakteryjnych kwasów tłuszczowych
w czasie rozkładu fenolu w glebie**

PRACE
NAUKOWE



UNIWERSYTETU
ŚLĄSKIEGO
W KATOWICACH

NR 2689

Agnieszka Mroziak

**Zmiany w składzie
bakteryjnych kwasów tłuszczowych
w czasie rozkładu fenolu w glebie**



Redaktor serii: Biologia
Iwona Szarejko

Recenzenci
Wiesław Barabasz, Jerzy Długoński

Na okładce: Bakterie w obrazie skaningowego mikroskopu elektronowego (fot. Jagna Karcz)

Spis treści

Wykaz skrótów	7
1. Wstęp	9
1.1. Ogólna charakterystyka fenolu	9
1.2. Toksyczność fenolu	9
1.3. Rozkład fenolu przez bakterie w warunkach tlenowych	10
1.4. Bakteryjne kwasy tłuszczowe.	12
1.5. Kwasy tłuszczowe jako biomarkery	14
1.6. Wpływ związków aromatycznych na błony bakteryjne	15
1.7. Mechanizmy regulacji płynności błony bakterii w obecności związków aromatycznych	16
1.8. Rozkład związków aromatycznych w glebie	17
1.9. Bioaugmentacja a rozkład związków aromatycznych w glebie	19
1.10. FAMES w badaniach środowiskowych	21
2. Cel pracy	23
3. Materiały i metody.	24
3.1. Szczepy bakteryjne	24
3.2. Gleby	24
3.3. Wprowadzanie bakterii do gleb	25
3.4. Metody analityczne	25
3.4.1. Ekstrakcja i oznaczanie fenolu	25
3.4.2. Oznaczanie zawartości materii organicznej, węgla organicznego, wilgotności, frakcji kwasów próchnicowych i pH	25
3.5. Analizy mikrobiologiczne.	25
3.5.1. Oznaczanie liczebności bakterii	25
3.5.2. Izolacja i identyfikacja kwasów tłuszczowych z komórek bakterii oraz z gleby	28
3.6. Analiza statystyczna	28
4. Wyniki badań	29
4.1. Wprowadzenie bakterii do gleb sterylnych	29
4.1.1. Rozkład fenolu w glebach przez szczep <i>Pseudomonas vesicularis</i>	29
4.1.2. Przeżywalność szczepu <i>Pseudomonas vesicularis</i> po wprowadzeniu do gleb	29
4.1.3. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzonym szczepem <i>Pseudomonas vesicularis</i>	31
4.1.4. Analiza kwasów tłuszczowych szczepu <i>Pseudomonas vesicularis</i> w czasie rozkładu fenolu w glebach	33
4.1.5. Rozkład fenolu w glebach przez szczep <i>Pseudomonas</i> sp. JS150	40
4.1.6. Przeżywalność szczepu <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 po wprowadzeniu do gleb	44
4.1.7. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzonym szczepem <i>Pseudomonas</i> sp. JS150	44

4.1.8.	Analiza kwasów tłuszczowych szczepu <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 w czasie rozkładu fenolu w glebach	44
4.1.9.	Rozkład fenolu w glebach przez mieszaninę szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150	54
4.1.10.	Przeżywalność szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150 po wprowadzeniu do gleb	54
4.1.11.	Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzoną mieszaniną szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150	54
4.1.12.	Analiza kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebach przez mieszaninę szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150	59
4.2.	Wprowadzenie bakterii do gleb niesterylnych.	66
4.2.1.	Rozkład fenolu w glebach poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów <i>Pseudomonas vesicularis</i> i <i>Pseudomonas</i> sp. JS150	66
4.2.2.	Wpływ fenolu na przeżywalność mikroorganizmów w glebach poddanych bioaugmentacji	66
4.2.3.	Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach poddanych bioaugmentacji	69
4.2.4.	Analiza kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebach poddanych bioaugmentacji	69
5.	Dyskusja	79
5.1.	Degradacja fenolu przez bakterie w badanych glebach	79
5.2.	Bioaugmentacja jako metoda wspomagająca rozkład fenolu w glebie	83
5.3.	Wykorzystanie analizy FAMES do monitorowania tempa rozkładu fenolu w glebie	87
6.	Ogólne wnioski	94
	Literatura	95
	Summary	105
	Zusammenfassung	106

Wykaz skrótów

BRANCFAs	— rozgałęzione kwasy tłuszczowe
CFAs	— cyklopropanowe kwasy tłuszczowe
DGGE	— elektroforeza żelowa w gradiencie temperatury
DPG	— difosfatydyloglicerol
FAMEs	— metylowe estry kwasów tłuszczowych
FAs	— kwasy tłuszczowe
Ful	— kwasy fulwowe
GC	— chromatografia gazowa
GMMs	— mikroorganizmy zmodyfikowane genetycznie
HGT	— horyzontalny transfer genów
Hum	— kwasy huminowe
HYFAs	— hydroksylowe kwasy tłuszczowe
Hym	— kwasy hymatomelanowe
j.t.k.	— jednostki tworzące kolonie
LD50	— dawka związku, pod wpływem której ginie 50% populacji bakterii
LH-PCR	— zróżnicowanej długości fragmenty PCR
LPS	— lipopolisacharyd
MIDI-FAME	— metoda do identyfikacji bakterii, opracowana przez firmę MIDI, Inc., USA
MUFAs	— jednonienasycone kwasy tłuszczowe
P	— współczynnik podziału w układzie oktanol—woda
PCB	— polichlorowane bifenyle
PCR	— łańcuchowa reakcja polimerazy
PE	— fosfatydyloetanolamina
PHA	— kwasy polihydroksyalkanowe
PHB	— kwas polihydroksymasłowy
PG	— fosfatydyloglicerol
PLFAs	— fosfolipidowe kwasy tłuszczowe
PUFAs	— wielonienasycone kwasy tłuszczowe
SLB/ENAP	— ang. <i>signature lipid biomarkers/environmental nucleic acid probes</i>
s.m.	— sucha masa
STRAFAs	— nasycone, prostołańcuchowe kwasy tłuszczowe
Tn	— transpozon
T-RFLP	— polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych
TNT	— trinitrotoluen
WWA	— wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

1. Wstęp

1.1. Ogólna charakterystyka fenolu

Fenol (hydroksybenzen, nr CAS 108-95-2) pod względem budowy chemicznej jest najprostszym przedstawicielem jednopierścieniowych węglodorów aromatycznych. Ma grupę hydroksylową –OH, połączoną z węglem pierścienia aromatycznego o hybrydyzacji sp^2 . W stanie czystym występuje pod postacią ciała stałego, krystalicznego, jest bezbarwny. Po utlenieniu przyjmuje natomiast zabarwienie różowe lub brunatne. Charakteryzuje się ostrym, słodkawym zapachem, dobrą rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych (alkoholu etylowym, eterze etylowym, chloroformie, benzynie) oraz — w podwyższonej temperaturze — w wodzie. Jest słabym kwasem, a jego postać jonowa łatwo ulega reakcjom elektrofilowej substytucji i oksydacji (POŚNIAK, 1999; JAKUBOWSKI, 2003). Wybrane właściwości fizykochemiczne fenolu przedstawia tabela 1.

Tabela 1
Właściwości fizykochemiczne fenolu (POŚNIAK, 1999;
JAKUBOWSKI, 2003)

Fenol	Właściwości
Wzór sumaryczny	C_6H_5OH
Masa molowa, $g\ mol^{-1}$	94,11
Temperatura topnienia, $^{\circ}C$	40,90
Temperatura wrzenia, $^{\circ}C$	181,75
Rozpuszczalność w wodzie, $g\ l^{-1}$ w $25^{\circ}C$	87
Gęstość w $20^{\circ}C$, $g\ cm^{-3}$	1,07
Prężność par w $20^{\circ}C$, mmHg	0,357
Temperatura zapłonu, $^{\circ}C$	75
Kwasowość, pK_a	9,55

Fenol i jego pochodne są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Naturalnie powstają podczas biodegradacji polimerów zawierających pierścienie

aromatyczne, jak ligniny i taniny. Wchodzą w skład wydzielin korzeniowych roślin (kwas 4-hydroksybenzoesowy, ferulowy, *p*-kumarowy, cynamonowy, syrynginowy i wanilinowy), są też składnikami barwników kwiatów i owoców (SPARLING i in., 1981). Głównym jednak ich źródłem jest przemysł i działalność rolnicza (WISE, KUSKE, 2000). Związki fenolowe (fenol i krezole) powstają podczas koksowania węgla kamiennego i są głównymi składnikami uzyskiwanej w tym procesie smoły pogazowej. Uwalniane są także ze ściekami przemysłowymi, między innymi z koksowni, zakładów przemysłu chemicznego, petrochemicznego, farmaceutycznego, papierniczego i tekstylnego (SWOBODA-COLBERG, 1995; WHITELEY, BAILEY, 2000; ARUTCHELVAN i in., 2003).

Związki fenolowe od lat znajdowały zastosowanie zarówno w celach leczniczych, jak też jako przyprawy, używki, garbniki, trucizny w trakcie polowań i środki halucynogenne. Obecnie produkuje się je na skalę przemysłową i używa jako dodatków do rozpuszczalników organicznych, substancji antyseptycznych, leków (salicylanów), detergentów, farb i lakierów, materiałów przeciwkorozyjnych, żywic syntetycznych (bakelitu), środków wybuchowych (kwasu pikrynowego), biocydów, materiałów fotograficznych oraz tuszu (NEMEROW, 1978; BUDA-VARI, 1996).

1.2. Toksyczność fenolu

Fenol należy do silnych trucizn. Działa porażająco na układ nerwowy i krążeniowy. Uszkadza drogi oddechowe, powoduje denaturację białek oraz nekrozę i łuszczenie skóry. Może wywoływać: methemoglobinemię (sinicę), zakwaszenie ustroju

(kwasicę), uszkodzenie nerek (mocznicę) i wątroby (żółtaczkę) (Hazardous Substances Data Bank, 1997; California Environmental Protection Agency, 2003; JAKUBOWSKI, 2003).

Według wykazu substancji niebezpiecznych Centralnego Instytutu Ochrony Pracy w Polsce oraz drugiego wykazu Komisji Europejskiej (Dyrektywa o substancjach toksycznych), fenol jest substancją toksyczną oraz żrącą, ale nie jest sklasyfikowany jako mutageny i rakotwórczy dla ludzi. Dopuszczalne (alarmowe) stężenia fenolu w powietrzu są nieustalone, natomiast określone są dla klas wód powierzchniowych (np. w przypadku I klasy czystości wód indeks fenolowy wynosi 0,001 mg l⁻¹ przy pH 6,5—8,5, a dla klasy V — 0,05 mg l⁻¹ przy pH < 5,5 lub > 9,0) oraz dla oczyszczonych ścieków przemysłowych ze wszystkich sektorów (indeks fenolowy wynosi 0,1 mg l⁻¹) (Dz.U. 2004, nr 168, poz. 1763). Dopuszczalne stężenie fenolu w glebie wynosi 100 mg kg⁻¹ s.m. gleby i dotyczy terenów uprzemysłowionych, użytków kopalnych oraz terenów komunikacyjnych (Dz.U. 2002, nr 165, poz. 1359).

Powszechnie używanym wskaźnikiem toksyczności związków chemicznych jest wartość LD₅₀, określająca dawkę związku, przy którym ginie 50% badanej populacji. Stopień toksyczności związku koresponduje z jego logP, gdzie P oznacza współczynnik podziału danego związku w układzie oktanol—woda. Spośród związków aromatycznych najbardziej toksyczne są te, których logP mieści się w przedziale 1—5, natomiast te, których logP jest < 1 lub > 5, są mniej toksyczne (HEIPIEPER i in., 1994; SIKKEMA i in., 1995). Wartość logP dla fenolu wynosi 1,45, a LD₅₀ na przykład dla bakterii

Pseudomonas putida — 7,94 mM, z kolei dla *E. coli* > 10,64 mM. Hydrofobowość i toksyczność fenolu w porównaniu z innymi związkami organicznymi ilustruje tabela 2.

1.3. Rozkład fenolu przez bakterie w warunkach tlenowych

Z powodu zagrażających środowisku właściwości związków fenolowych zachodzi konieczność ich detoksykacji. Jednym ze skutecznych sposobów eliminacji tych związków jest ich całkowity rozkład przez mikroorganizmy do CO₂ i H₂O lub do produktów mniej toksycznych bądź całkowicie nietoksycznych. Mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową, w porównaniu z innymi organizmami, zdolnością adaptacji do nowych warunków środowiska i wykorzystania związków niebędących produktami ich własnych przemian metabolicznych jako substratów energetycznych i budulcowych (CHANG i in., 1997; KANALY, HARAYAMA, 2000; KIM i in., 2002; GOSWAMI i in., 2005; KHLEIFAT, 2006; PŁAZA i in., 2007).

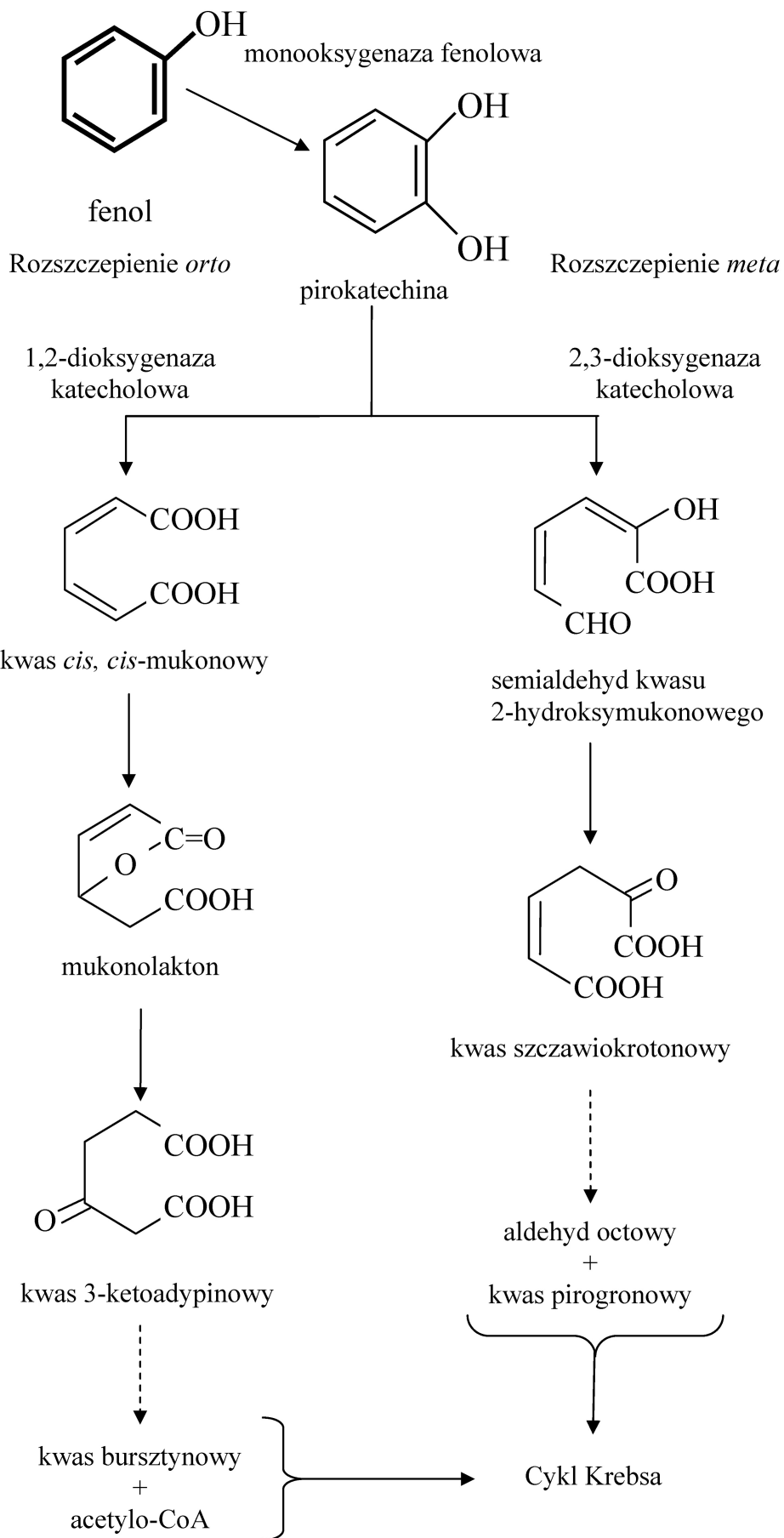
Spośród węglowodorów jednopierścieniowych fenol jest jednym z bardziej podatnych na rozkład przez bakterie. Wynika to z jego prostej budowy (jeden pierścień aromatyczny i jeden podstawnik hydroksylowy) oraz ze stosunkowo dobrej rozpuszczalności w wodzie (tabela 1). Do znanych i opisanych w literaturze szczepów bakterii wykorzystujących go jako źródło węgla i energii należą: *Pseudomonas* sp. CF600, *Pseudomonas stutzeri*

Tabela 2

Hydrofobowość i toksyczność wybranych grup związków organicznych (HEIPIEPER i in., 1994)

Grupa związków	Przykład związku	logP	LD ₅₀ (mM)*
Alkohole krótkołańcuchowe	metanol	-0,76	501,1
	etanol	-0,28	223,9
Słabe kwasy	kwas octowy	-0,23	60,0
	kwas masłowy	0,81	—
Alkohole aromatyczne	fenol	1,45	7,94
	4-chlorofenol	2,40	1,29
	2,4-dichlorofenol	3,21	0,144
	2,4,5-trichlorofenol	4,10	0,016
	pentachlorofenol	5,04	0,0067
Rozpuszczalniki aromatyczne	benzen	2,13	17,38
	toluen	2,48	3,58
	styren	3,00	3,15
	tetralina	3,86	0,75
Alkany	heksadekan	8,80	> 1 100

* Wartość LD₅₀ ustalona dla bakterii *Pseudomonas putida*.



Rys. 1. Szlaki *orto* i *meta* degradacji struktury aromatycznej fenolu przez bakterie (DAGLEY, 1971; HAIGLER i in., 1992; SMITH, 1994)

SPC2, *Pseudomonas* sp. JS150, *Comamonas testosteroni* P15, *Ralstonia taiwanensis* TJ86, *Rhodococcus* sp. DK17, *Rhodococcus erythropolis* M1, *Ewingella americana*, *Serratia plymuthica* GC i *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 (HAIGLER i in., 1992; POWLOWSKI, SHINGLER, 1994; AHAMAD, KUNHI, 1996; YAP i in., 1999; KIM i in., 2002; CHEN i in., 2004; GOSWAMI i in., 2005; KHLEIFAT, 2006; PRADHAN, INGLE, 2007; WEI i in., 2008). Rozkład fenolu przez bakterie w warunkach tlenowych obejmuje dwa kluczowe etapy. W pierwszym następuje wbudowanie grupy hydroksylowej do pierścienia aromatycznego przez hydroksylazę fenolową, enzym należący do monooksygenaz z grupy hydroksylaz. Wbudowuje ona jeden z atomów tlenu cząsteczkowego do pierścienia, a drugi ulega redukcji do wody. W wyniku tej reakcji fenol przekształca się w pirokatechinę. W drugim etapie pierścień aromatyczny pirokatechiny zostaje rozszczepiony między dwoma grupami hydroksylowymi (rozszczerzenie *orto* lub intradiolowe) lub między hydroksylovanym a sąsiadującym z nim niehydroksylovanym atomem węgla (rozszczerzenie *meta* lub ekstradiolowe). Rozszczepienie *orto* katalizuje 1,2-dioxygenaza katecholowa (EC 1.13.11.1). Prowadzi ono do utworzenia kwasu *cis*, *cis*-mukonowego, przekształcanego przez metabolity pośrednie do acetylo-CoA i kwasu bursztynowego, włączanych do cyklu Krebsa. Rozszczepienie *meta* zachodzi pod wpływem 2,3-dioxygenazy katecholowej (EC 1.13.11.2) i prowadzi do utworzenia semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Jest on dalej przekształcany do aldehydu octowego i kwasu pirogronowego, również włączanych do cyklu Krebsa (DAGLEY, 1971; HAIGLER i in., 1992; POWLOWSKI, SHINGLER, 1994; SMITH, 1994; WATANABE, 2002). Szlak *orto* i *meta* rozkładu fenolu przez bakterie ilustruje rys. 1.

Informacja genetyczna o syntezie enzymów katalizujących rozkład pierścienia aromatycznego może być zawarta w chromosomie bakteryjnym lub w plazmidach degradacyjnych. Powszechnie uważa się, że szlak *orto* kodowany jest chromosomalnie, a szlak *meta* — plazmidowo (VAN DER MEER i in., 1992). Chromosomalnie kodowaną drogę *orto* rozkładu fenolu stwierdzono na przykład u szczepów *Pseudomonas stutzeri* SPC2 i *Serratia plymuthica* GC (AHAMAD, KUNHI, 1996; PRADHAN, INGLE, 2007), plazmidowo zależną *meta* — u szczepu *Ewingella americana* i *Pseudomonas* sp. CF600 (POWLOWSKI, SHINGLER, 1994; KHLEIFAT, 2006), równoczesną indukcję enzymów obu tych szlaków u *Pseudomonas* sp. JS150 (HAIGLER i in., 1992), a chromosomalnie kodowaną drogę *meta* — u *Pseudomonas putida* BH i *Pseudomonas picketti* PKO1 (KUKOR, OLSEN, 1991; NISHIHARA i in., 1994).

1.4. Bakteryjne kwasy tłuszczowe

Głównym miejscem oddziaływania fenolu i innych związków aromatycznych na komórki bakterii jest błona cytoplazmatyczna. W wyniku kontaktu tych związków z błoną zmienia się jej struktura, głównie skład fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs), oraz jej właściwości (KEWELOH i in., 1991).

Kwasy tłuszczowe (FAs, ang. *fatty acids*) u bakterii występują głównie w błonach komórkowych jako składniki acylowe fosfolipidów, glikolipidów i glikofosfolipidów. Rzadko są spotykane w komórce w postaci wolnej. Jedynie 5—10% kwasów tłuszczowych jest niezwiązanych z błonami i w postaci lipidów obojętnych (hopanoidów i karotenoidów) pełnią w cytozolu funkcję zapasową (MORDARSKA, 1984; HUIJBREGTS i in., 2000).

Skład kwasów tłuszczowych u bakterii jest bardziej zróżnicowany niż u roślin i zwierząt. Za najbardziej charakterystyczne uważa się nasycone, prostolaniczne kwasy tłuszczowe (STRAFAs, ang. *straight chain fatty acids*) o długości łańcucha acylowego 14—20 atomów węgla. Najpowszechniej występują wśród nich *n*-heksadekanian (kwas palmitynowy) i *n*-oktadekanian (kwas stearynowy) (FINEAN, MITCHELL, 1981; RUSSELL, FUKUNAGA, 1990; RUSSELL, 1995). U niektórych bakterii z rodzaju *Rhizobium* i *Mesorhizobium* spotyka się również nietypowe kwasy o dłuższych łańcuchach acylowych, głównie w lipidzie A lipopolisacharydu (LPS), zawierające 27—28 atomów węgla (CHOMA, 1999; GRONOW, BRADE, 2001; KOMANIECKA, CHOMA, 2001).

Oprócz kwasów nasyconych bakterie syntetyzują kwasy jednonienasycone (MUFAs, ang. *monounsaturated fatty acids*) z wiązaniem podwójnym, najczęściej między C9 i C10, oraz wielonienasycone (PUFAs, ang. *polyunsaturated fatty acids*). Nienasycone kwasy tłuszczowe mogą zawierać maksymalnie do 6 wiązań podwójnych, jednak takie wielonienasycone kwasy występują u bakterii rzadko i spotyka się je jedynie u morskich psychrofilii i cyjanobakterii (FINEAN, MITCHELL, 1981; RUSSELL, FUKUNAGA, 1990; NICHOLS i in., 1993; HAMAMOTO i in., 1994). Wiązania podwójne w kwasach nienasyconych nie mają charakteru wiązań sprzężonych, oddzielone są od siebie grupą metylenową $-CH_2-$. W odróżnieniu od pojedynczych są sztywne, co uniemożliwia rotację wokół ich osi. Najczęściej występują w konfiguracji *cis*, powodującej wygięcie łańcucha acylowego o kąt 30° . Kwasy nienasycone w konfiguracji *trans* mają natomiast bardziej rozciągniętą strukturę, co czyni je przestrzennie podobnymi do kwasów nasyconych. W związku z tym

konfiguracja *trans*, w odróżnieniu od *cis*, zapewnia bardziej uporządkowany układ fosfolipidów w błonie (DIEFENBACH i in., 1992; HEIPIEPER i in., 1994). Reakcję izomeryzacji *cis*-nienasyconych kwasów tłuszczowych do postaci *trans* katalizuje monomeryczny, perioplazmatyczny enzym *cis-trans* izomeraza (Cti) o masie molekularnej 70–80 kDa, z kowalencyjnie związanym hemem (HOLTWICK i in., 1999; PEDROTTA, WITHOLT, 1999; BERNAL i in., 2007). Porównanie sekwencji aminokwasowych izomeraż izolowanych z *Pseudomonas putida* P8, *Pseudomonas putida* KT 2440, *Pseudomonas putida* DOT-T1E i *Pseudomonas oleovorans* wykazało wysoką ich homologię, wynoszącą 95% (RAMOS i in., 2002). Z badań HEIPIEPERA i in. (1992) wynika, że reakcja izomeryzacji *cis/trans* zachodzi wyłącznie wtedy, gdy zahamowaniu w komórce ulega biosynteza kwasów tłuszczowych. Ilość *trans*-nienasyconych kwasów tłuszczowych u bakterii zależy przede wszystkim od fazy wzrostu, składu podłoża oraz czynników środowiskowych (KEWELOH, HEIPIEPER, 1996). Liczne pomiary temperatury przejścia (T_m) z fazy żelowej błony do ciekłokrystalicznej wykazały, że zastąpienie konfiguracji *cis* konfiguracją *trans* w fosfatydyloetanolinie powoduje jej wzrost o 18–31°C, w zależności od struktury łańcucha acylowego w cząsteczce lipidu. Skutkiem tego jest znaczące zmniejszenie płynności błony (CRONAN, GELMANN, 1975).

Kolejną ważną grupą u bakterii są kwasy rozgałęzione (BRANCFAs, ang. *branched fatty acids*), które mogą mieć postać *iso* lub *anteiso*. W izomerach *iso* grupa metylowa $-CH_3$ podstawiona jest przy węglu C2 od końca metylowego (ω) łańcucha acylowego, a w postaci *anteiso* — przy węglu C3. Niektóre bakterie, na przykład *Rhodococcus opacus* i *Streptomyces* sp., zawierają kwasy tłuszczowe, w których grupa $-CH_3$ podstawiona jest przy C10, a u wielu gatunków z rodzaju *Bacillus* spotyka się także kwasy dimetylowane z grupą $-CH_3$ przy C2 i C4 od końca karboksylowego kwasu (MORGAN, WINSTANLEY, 1997; TSITKO i in., 1999, CARBALLEIRA i in., 2001). Kwasy rozgałęzione występują w znacznych ilościach u bakterii Gram-dodatnich. U przedstawicieli rodzajów *Bacillus*, *Micrococcus* i *Staphylococcus*, wspólnie z prostołańcuchowymi (do 10%), mogą stanowić nawet 50–60% ogólnej zawartości kwasów. Z kolei u bakterii Gram-ujemnych kwasy rozgałęzione nie występują lub jest ich znacznie mniej, natomiast zawierają większe ilości kwasów nasyconych, jednonienasyconych i cyklopropanowych (DENICH i in., 2003). Substratami do syntezy kwasów rozgałęzionych mogą być α -keto-kwasy (pochodne waliny, leucyny i izoleucyny) lub egzogenne, krótkołańcuchowe kwasy karboksylowe

(izomasłowy, izowalerianowy i 2-metylomasłowy). Zarówno kwasy o izomerii *iso*, jak i kwasy o izomerii *anteiso* powstają *de novo* i pozycja rozgałęzienia nie może być modyfikowana postsyntezytycznie (KANEDA, 1991). Ich obecność zwiększa płynność błony i sprawia, że nie przyjmuje ona struktury krystalicznej (RUSSELL, FUKUNAGA, 1990).

Spośród bakteryjnych kwasów tłuszczowych najbardziej złożoną budową odznaczają się kwasy cyklopropanowe (CFAs, ang. *cyclopropyl fatty acids*). Pierwszym odkrytym kwasem o budowie cyklicznej był *cis*-11,12-metylene-oktadekenian, 19-węglowy analog kwasu *cis*-wakcenowego, będącego głównym fosfolipidowym kwasem nienasyconym u *Lactobacillus arabinosus* (HOFMANN, LUCAS, 1950). Zdolność do syntezy kwasów cyklopropanowych mają zarówno bakterie Gram-ujemne (*Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas* i *Serratia*), jak i Gram-dodatnie (*Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*). Nie stwierdzono natomiast ich obecności w błonach bakterii z rodzajów: *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Rhodobacter* i *Leptospira* (GROGAN, CRONAN, 1997). Kwasy z pierścieniem cyklopropanowym powstają w błonie cytoplazmatycznej na skutek modyfikacji jednonienasyconych łańcuchów acylowych fosfolipidów. Reakcję tę przeprowadza syntaza cyklopropanowa, która włącza do podwójnego wiązania w konfiguracji *cis* grupę $-CH_2$, pochodzącą z *S*-adenozynometioniny. Enzym wiąże się odwracalnie z dwuwarstwą lipidową i odnajduje łańcuchy acylowe o właściwej geometrii, będące substratem reakcji. Kwasy o budowie cyklicznej powstają najczęściej w późnej fazie logarytmicznego wzrostu lub w fazie stacjonarnej (WANG, CRONAN, 1994). Ich biologiczna rola nie jest wyjaśniona. Uważa się, że pierścień cyklopropanowy zabezpiecza wiązanie podwójne przed utlenieniem, dzięki czemu stabilizuje lipidy. Tworzenie CFAs zapewnia także większą oporność patogennych szczepów *E. coli* na zmiany pH, a w strukturze kwasów mykoloowych prawdopodobnie odpowiada za patogenność wielu szczepów *Mycobacterium* (GROGAN, CRONAN, 1997; CHANG, CRONAN, 1999; CRONAN, 2002).

Inną grupę kwasów tłuszczowych u bakterii stanowią hydroksykwasy (HYFAs, ang. *hydroxy fatty acids*), szeroko rozpowszechnione u pałeczek Gram-ujemnych i promieniowców. U bakterii Gram-ujemnych występują w lipidzie A lipolisacharydów, w tłuszczach związanych z ornityną oraz w postaci polimeru kwasu polihydroksymasłowego (PHB) (MORDARSKA, 1984; DAS i in., 1994; DARVEAU, 1998). Kwasy hydroksylowe mogą przyjmować postać α lub β . W postaci α grupa $-OH$ jest podstawiona przy węglu pierwszym od karboksylo-

wego końca kwasu, a w postaci β — przy węglu drugim. U bakterii α -hydroksykwasu pojawiają się rzadko i ich występowanie ogranicza się do kilku ich rodzajów, z kolei β -hydroksykwasu są powszechne zarówno u bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Dodatkowe grupy hydroksylowe w łańcuchu węglowodorowym nadają kwasom tłuszczowym specyficzne właściwości, przede wszystkim wyższą lepkość i reaktywność w porównaniu z kwasami nierozgałęzionymi. Zdolność do syntezy mono-, di- i trihydroksykwasów z prekursorów w postaci nienasyconych kwasów tłuszczowych z wiązaniem podwójnym przy węglu C9 w konfiguracji *cis* ma na przykład nowo opisany szczep *Pseudomonas aeruginosa* PR3 (BAE i in., 2007).

Kwasy tłuszczowe wbudowane w fosfolipidy mają istotne znaczenie dla struktury i funkcji błony. Utrzymują jej integralną strukturę, wpływają na przepuszczalność, a także zwiększają wydajność sekrecji niektórych białek enzymatycznych, na przykład pullanazy (CRONAN, GELMANN, 1975; DE KRUIJFF, 1997; DENICH i in., 2003). Właściwości błony zależą od stosunku kwasów prostolańcuchowych do rozgałęzionych oraz nienasyconych do cyklopropanowych. Wzrost zawartości kwasów nienasyconych zwiększa płynność błony i nasila procesy dyfuzyjne, z kolei wzrost udziału kwasów rozgałęzionych i cyklopropanowych usztywnia strukturę błony i obniża jej przepuszczalność.

Kwasy tłuszczowe należą do jednych z najbardziej dynamicznych składników komórek bakteryjnych. Często podlegają wymianie i modyfikacjom w lipidach pod wpływem wielu czynników, w tym toksycznych związków aromatycznych. Dzięki tej zdolności bakterie mogą się łatwo przystosowywać do kolejnych faz wzrostu i adaptować do zmieniających warunków środowiskowych (ŠAJBIDOR, 1997).

1.5. Kwasy tłuszczowe jako biomarkery

Wiele gatunków bakterii lub fizjologicznie zbliżonych grup mikroorganizmów może być wykrywanych w środowisku na podstawie charakterystycznych wyłącznie dla nich fosfolipidowych kwasów tłuszczowych. Ich ilościowa i jakościowa charakterystyka pozwala także ocenić żywą biomasę mikroorganizmów oraz stan fizjologiczny komórek (WHITE, RINGELBERG, 1997; KOZDRÓJ, VAN ELSAS, 2001).

Na podstawie analizy kwasów tłuszczowych ekstrahowanych z osadów dennych wyróżniono następujące grupy mikroorganizmów: mikroeuکاریota (wielonienasycone kwasy tłuszczowe), tlenowe pro-

kariota (jednonienasycone kwasy tłuszczowe), bakterie Gram-dodatnie i niektóre beztlenowe (nasycone i rozgałęzione kwasy tłuszczowe o długości łańcucha acylowego od C14 do C16), bakterie redukujące siarczany i pozostałe beztlenowe (nasycone i rozgałęzione kwasy tłuszczowe o długości łańcucha acylowego od C16 do C19) (MORGAN, WINSTANLEY, 1997). Rozgałęzione kwasy tłuszczowe wskazują na obecność bakterii beztlenowych i redukujących siarczany z rodzaju *Desulfovibrio*. Kwas 16:0 10Me uważany jest za markerowy dla rodzaju *Desulfobacter*, ponieważ nie występuje u innych bakterii redukujących siarczany. Rozgałęzione kwasy o izomerii *iso* i *anteiso* są charakterystyczne dla bakterii Gram-dodatnich i dla rodzajów *Cytophaga* oraz *Flavobacterium*, a kwasy cyklopropanowe — dla bakterii Gram-ujemnych i wielu anaerobowych Gram-dodatnich (HAACK i in., 1994). Gram-ujemne bakterie mają też unikatowe kwasy hydroksylowe w lipidowej części LPS, w błonie zewnętrznej. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe są powszechne, lecz niespecyficzne dla beztlenowych bakterii Gram-ujemnych. Kwasy wielonienasycone występują głównie u cyjanobakterii. Dla promieniowców charakterystyczne są kwasy z grupą $-\text{CH}_3$ przy C10 (ZELLES, 1999 a). Wysoka zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z wielonienasyconymi wskazuje na dominację bakterii w środowisku. Z kolei różnice w udziale kwasów rozgałęzionych do jednonienasyconych mogą być wykorzystane do określenia proporcji bakterii Gram-dodatnich do Gram-ujemnych w wodach morskich (MORGAN, WINSTANLEY, 1997). Wyróżniono także kilka kwasów wskazujących na obecność w glebie grzybów. Należą do nich długołańcuchowe kwasy nasycone (24:0—26:0), nienasycony kwas 18:2 ω 6,9 (stosowany do obliczania biomasy grzybów) oraz 16:1 ω 5 (typowy dla grzybów mikoryzowych) (WELLS i in., 1996; FROSTEGÅRD, BÅÅTH, 1996; KELLY i in., 1999 b). Markerowe kwasy tłuszczowe wybranych gatunków, rodzajów i grup mikrobiologicznych ilustruje tabela 3.

Analiza ogólnej zawartości PLFAs może służyć także do oznaczenia biomasy drobnoustrojów w próbach środowiskowych (FROSTEGÅRD, BÅÅTH, 1996). Fosfolipidy występują jedynie w nienaruszonych błonach, a więc w żywych komórkach. W krótkim czasie po śmierci komórki endogenne fosfolipazy hydrolizują fosfolipidy, uwalniając polarną grupę fosforanową. Powstające diglicerydy mają identyczny skład kwasów tłuszczowych z oryginalnymi fosfolipidami. Dzięki temu fosfolipidowe kwasy tłuszczowe mogą być użyte do oznaczenia ogólnej żywej biomasy (WHITE, RINGELBERG, 1997). WILKE i in. (2004) wykorzystali PLFAs do oceny

Markerowe kwasy tłuszczowe wybranych gatunków, rodzajów i grup mikrobiologicznych

Gatunek, rodzaj, grupa mikrobiologiczna	Markerowe kwasy tłuszczowe	Literatura
<i>Desulfovibrio</i>	15:1 $\omega 7c$ iso, 17:1 $\omega 7c$ iso, 19:1 $\omega 7c$ iso	EDLUND i in. (1985)
<i>Desulfobacter</i>	16:0 10Me, 18:0 cy ($\omega 7,8$)	DOWLING i in. (1986)
<i>Arthrobacter</i>	15:0 anteiso, 17:0 (wysoka zawartość)	HAACK i in. (1994)
<i>Pseudomonas</i>	16:0 i 16:1 $\omega 7c$ (równoważna zawartość) 18:1 $\omega 7c/\omega 9t/\omega 12t$	HAACK i in. (1994)
<i>Bacteroides</i>	kwasy tłuszczowe z parzystą liczbą C	OLSSON, PERSSON (1999)
<i>Thiobacillus</i>	17:1 $\omega 5$ iso, 18:1 $\omega 6$ 10Me, 18:1 $\omega 6$ 11Me	KERGER i in. (1986)
<i>Vibrio cholerae</i>	19:1 11Me, 18: 2 $\omega 6,9$	GUCKERT i in. (1986)
Metanotrofy	16:1 $\omega 8c$, 16:1 $\omega 5c$	NICHOLS i in. (1987)
Bakterie Gram-ujemne	hydroksykwasy (np. 16:1 3OH, 18:1 3OH), kwasy nienasycone (np. 16:1 $\omega 5c$, 16:1 $\omega 7c$, 18:1 $\omega 7c$), kwasy cyklopropanowe (17:0 cy, 19:0 cy)	CAVIGELLI i in. (1995), ZELLES (1999a)
Bakterie Gram-dodatnie	kwasy tłuszczowe iso i anteiso (np. 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso, 17:0 anteiso)	PENNANEN i in. (1998) ZELLES (1999 a, b)
<i>Cytophaga-Flavobacterium</i>	16:1 $\omega 5c$	FROSTEGÅRD i in. (1993 a), KELLY i in. (1999 a)
<i>Actinomycetales</i>	kwasy tłuszczowe z grupą 10Me (np. 16:0 10Me, 17:0 10Me, 18:0 10Me)	FROSTEGÅRD i in. (1993 a), KELLY i in. (1999 a)
Grzyby	16:1 $\omega 5c$, 18:1 $\omega 9c$, 18:2 $\omega 6,9c$, 18:3 $\omega 6$, 20:4, 21:0, 23:0, 25:0	OLSSON (1997), FROSTEGÅRD i in. (1993 b, 1996), LINDAHL i in. (1997) ZELLES (1999 b)

biomasy mikroorganizmów w glebie pochodzącej z terenów leżących w pobliżu zakładu produkującego materiały wybuchowe i skażonej 2,4,6-trinitrotoluenem (TNT). W glebie zanieczyszczonej tym związkim stężenie PLFAs wynosiło 46,6 nmoli g⁻¹ gleby, natomiast w glebie nieskażonej było dwukrotnie wyższe (111,5 nmoli g⁻¹ gleby), co świadczyło o toksycznym działaniu TNT na komórki bakterii.

Profil PLFAs może służyć także do oceny stanu fizjologicznego komórek, zmieniającego się pod wpływem różnych czynników, takich jak: temperatura, ciśnienie, pH, dostępność tlenu, wody i składników odżywczych oraz obecność związków toksycznych. Zależy on także od wieku kultury i aktywności enzymatycznej mikroorganizmów (ŠAJBIDOR, 1997; WHITE, RINGELBERG, 1997; RAMOS i in., 2001). W warunkach ograniczonego dostępu substancji pokarmowych bakterie syntetyzują kwasy poly- β -hydroksyalkanowe (PHA), nie rosną i nie rozmnażają się. Dostarczenie niezbędnych do wzrostu składników powoduje rozkład PHA i tworzenie PLFAs. Głodzenie, susza i długotrwała ekspozycja na czynniki indukujące przejście bakterii do stacjonarnej fazy wzrostu prowadzi do przekształcenia nienasyconych kwasów tłuszczowych 16:1 $\omega 7c$ i 18:1 $\omega 7c$ w odpowiadające im kwasy cyklopropanowe 17:0 cy i 19:0 cy (GUCKERT i in., 1986; KIEFT i in., 1994). Stosunek kwasów nienasyconych

do cyklopropanowych zależy od mikroorganizmu i środowiska, które ten zasiedla, ale zwykle przyjmuje on wartość 0,05 w fazie logarytmicznego wzrostu i 2,5 lub wyższą w fazie stacjonarnej. LOFFAGEN i in. (2007) wykazali, że brak składników odżywczych prowadził w komórkach szczepu *Pseudomonas putida* P8 do wzrostu wartości stosunku kwasów cyklopropanowych do *cis*-nienasyconych (*cyklo/cis*) z 0,1 do 1,55. Z kolei w środowiskach zanieczyszczonych związkami organicznymi (alkoholami, fenolami i krótkołańcuchowymi kwasami karboksylowymi) u bakterii dochodzi do wzrostu zawartości *trans*-nienasyconych kwasów tłuszczowych w porównaniu z postacią *cis* (HEIPIEPER i in., 1995). Wzrost wartości stosunku kwasów tłuszczowych o konfiguracji *trans/cis* powyżej 0,1 świadczy również o starzeniu się komórek bakteryjnych. Natomiast jego wartość 0,05 lub niższa wskazuje na ich dobrą kondycję i brak wpływu stresowych czynników środowiskowych.

1.6. Wpływ związków aromatycznych na błony bakteryjne

Związki o strukturze aromatycznej wykazują duże powinowactwo do błony komórkowej bakterii,

wnikają do jej lipofilowego obszaru i ograniczają oddziaływanie między łańcuchami acylowymi fosfolipidowych kwasów tłuszczowych. Rezultatem tego jest zaburzenie jej integralnej struktury, wzrost przepuszczalności i płynności. Powoduje to zmianę potencjału błonowego, usuwanie lipidów i białek z błony oraz wypływ jonów i substancji drobnocząsteczkowych z komórki. Prowadzi to do zahamowania oddychania i wzrostu bakterii, a nawet do lizy komórek (HEIPIEPER i in., 1994; SIKKEMA i in., 1994, 1995; ČERTIK i in., 2003; DERCOVÁ i in., 2004).

Toksyczność poszczególnych związków aromatycznych zależy od ich chemicznej struktury, stopnia hydrofobowości, aktualnego stężenia w błonie, lokalizacji w dwuwarstwie lipidowej i oddziaływań ze składnikami błony (SIKKEMA i in., 1994). Związki amfipatyczne wnikają i rozpuszczają się w błonie dość łatwo, ze względu na duże podobieństwo do fosfolipidów błonowych. Związki aromatyczne z podstawnikami hydrofilowymi, szczególnie fenole, łatwo rozpuszczają się w warstwie lipidowej błony i wskutek tego są bardziej toksyczne w porównaniu z innymi związkami organicznymi. W zależności od miejsca lokalizacji związków aromatycznych zmieniają się właściwości błony. Związki lipofilowe wchodzi w interakcje z hydrofobowymi łańcuchami acylowymi, co wyraźnie zmienia powierzchnię błony (CORNELL, SEPAROVIC, 1983). Wykazano, że zjawisko to wywołują przede wszystkim związki, których logP wynosi 2–5 (benzen, toluen, *o*-ksylen, naftalen i bifenylo). Z badań prowadzonych z użyciem liposomów znakowanych fluorescencyjnie β -chlorkiem rodaminy oktadekanylu wynika, że zwiększenie powierzchni błony jest spowodowane oddziaływaniem tych związków wyłącznie z łańcuchami acylowymi lipidów zewnętrznej strony dwuwarstwy lipidowej w taki sposób, że jedna cząsteczka związku przypada na dwie cząsteczki fosfolipidów (HEIPIEPER i in., 1994). Związki hydrofilowe powodują z kolei hydratację grup polarnych (ROTTENBERG, 1992). Takie związki, jak: tetralina, bifenylo i antracen, wnikają pomiędzy łańcuchy acylowe fosfolipidów, powodując „pęcznienie błony” i wzrost jej płynności (SIKKEMA i in., 1994). Dla porównania, alkanany hydrofobowe (np. heksadekan, logP = 8,8) nie uszkadzają błony, ponieważ oddziałują z łańcuchami kwasów tłuszczowych zarówno wewnętrznej, jak i zewnętrznej dwuwarstwy lipidowej. Rezultatem takiego oddziaływania jest większe uporządkowanie lipidów, mniejsza przepuszczalność i płynność, ale zwiększenie się grubości błony (MCINTOSH i in., 1980).

1.7. Mechanizmy regulacji płynności błony bakterii w obecności związków aromatycznych

Bakterie w środowisku są narażone na działanie różnorodnych czynników, takich jak zmiany temperatury, dostępność składników odżywczych i wody oraz na obecność związków aromatycznych. W odpowiedzi na fizykochemiczny stres uruchamiają one kompleksowe mechanizmy regulacyjne, dzięki którym łatwo przystosowują się do zmieniających się warunków środowiskowych (SIKKEMA i in., 1994, 1995; WEBER, DE BONT, 1996; IVANOVA i in., 1999; BENEY, GERVAIS, 2001; RAMOS i in., 1997, 2001; SAKAMOTO, MURATA, 2002; CHICHIB i in., 2005; UNELL i in., 2007).

Jednym z podstawowych mechanizmów adaptacji bakterii do obecności związków o strukturze aromatycznej są zmiany składu fosfolipidowych kwasów tłuszczowych dotyczące stopnia ich nasycenia, długości łańcuchów acylowych, postsyntezytycznych ich modyfikacji oraz stosunku ilości lipidów do białek błonowych. Wzrost stopnia nasycenia lipidów błonowych w wyniku syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych (16:0 i 18:0) u szczepu *E. coli* K-12 w obecności subletalnych stężeń fenolu, 4-chlorofenolu i *p*-krezolu wykazali HEIPIEPER i in. (1991). DIEFENBACH i in. (1992) u szczepu *Pseudomonas putida* P8 obserwowali korelację pomiędzy wzrostem stopnia nasycenia lipidów błony a tolerancją komórek na wysokie stężenie 4-chlorofenolu (250 mg l⁻¹), a KIM i in. (2001) u *Ralstonia eutropha* H850, hodowanego z dodatkiem bifenylo w dawce 0,1%. Wyniki te wskazują, że synteza *de novo* kwasów tłuszczowych jest odpowiedzią komórek bakterii na błonowo-aktywne związki aromatyczne. Zachodzi ona jednak wyłącznie w komórkach rosnących, natomiast stężenia letalne hamują jej przebieg. Uważa się, że większość nowo zsyntetyzowanych kwasów służy do naprawy uszkodzonej przez te związki błony (LOFFHAGEN i in., 1995; HÄRTIG i in., 2005).

Innym mechanizmem regulacji płynności błony jest reakcja izomeryzacji *cis*-nienasyconych kwasów tłuszczowych do postaci *trans*. Zachodzi ona wtedy, gdy ustaje biosynteza kwasów tłuszczowych, a więc w komórkach nierosnących. Reakcję taką przeprowadzały na przykład bakterie *Pseudomonas putida* P8 w obecności fenolu, *Pseudomonas putida* NCTC 10936 w obecności 4-chlorofenolu i *Pseudomonas putida* S12 w obecności fenolu, *p*-krezolu i toluenu (DIEFENBACH i in., 1992; DIEFENBACH, KEWELOH, 1994; HEIPIEPER, DE BONT, 1994; HEIPIEPER i in., 1995; LOFFHAGEN i in., 2001). Nie jest to jednak reakcja zachodząca u wszystkich bakterii. Nie obserwowano jej w obecności związków o strukturze aro-

matycznej u szczepów *Rhodococcus* sp. 33 i *Shewanella putrefaciens* ACAM 342 (NICHOLS i in., 1994; GUTIÉRREZ i in., 1999).

Ekspozycja bakterii na działanie toksycznych związków aromatycznych prowadzi też do syntezy rozgałęzionych, nasyconych kwasów tłuszczowych o izomerii *iso* i *anteiso*. TSITKO i in. (1999) stwierdzili 5—10-krotny wzrost udziału tych kwasów u szczepu *Rhodococcus opacus*, hodowanego z dodatkiem benzenu, fenolu, 4-chlorofenolu, chlorobenzenu i toluenu. Podobnie wysoką zawartością procentową kwasów o izomerii *iso* i *anteiso* charakteryzowały się szczepy *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas putida* w czasie degradacji naftalenu oraz *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 w temperaturze 5°C w obecności fenolu, 4-nitrofenolu i 4-chlorofenolu (MROZIK i in., 2005; UNELL i in., 2007).

Kolejnym, znanym mechanizmem postsyntetycznych modyfikacji lipidów błonowych jest tworzenie kwasów z pierścieniem cyklopropanowym. Obserwowany w profilu kwasów tłuszczowych znaczny wzrost udziału tych kwasów, izolowanych z komórek *Ralstonia eutropha*, hodowanych w podłożu z dodatkiem bifenyłu oraz z *Pseudomonas stutzeri* i *Pseudomonas vesicularis*, rozkładających pirokatechinę i fenol, może świadczyć o istotnej roli wymienionych kwasów w regulacji płynności błony komórkowej tych bakterii (KIM i in., 2001; MROZIK i in., 2004).

Na fizykochemiczne właściwości błony ma także wpływ skład hydrofilowych „głów” fosfolipidów. WEBER i in. (1994) wykazali, że u *Pseudomonas putida* S12 w obecności toluenu dochodziło do zmniejszenia udziału fosfatydyloetanolaminy (PE) w błonie. PE jest fosfolipidem o stosunkowo małej powierzchni „głowy” w porównaniu z fosfatydyloglicerolem (PG) i difosfatydyloglicerolem (DPG). Spadek udziału PE, a wzrost PG i DPG powodowały zwiększenie średniej fosfolipidowej powierzchni „głowy”, prawdopodobnie w celu wyrównania większej objętości łańcuchów acylowych, wywołanej akumulacją toluenu w błonie. Wbudowanie PG i DPG do błony prowadzi do jej usztywnienia i zmniejszenia stopnia nieuporządkowania lipidów, wywołanego obecnością cząsteczek toluenu między łańcuchami acylowymi w sąsiedztwie występujących grup polarnych. Zmiany składu „głów” polarnych fosfolipidów są mniej powszechnymi modyfikacjami błony niż zmiany w składzie kwasów tłuszczowych, ale z powodu innej lokalizacji ładunków w obszarach polarnych mogą istotnie wpływać na interakcje lipidy—białka błonowe (ROSAS, 1980; SUWALSKY i in., 1990).

Akumulacja związków aromatycznych w dwuwarstwie lipidowej może indukować syntezę do-

datkowych białek błonowych. Zjawisko to obserwowali KEWELOH i in. (1990) u szczepu *E. coli* K-12 hodowanego na podłożu z dodatkiem fenolu w stężeniu 0,5 g l⁻¹. W wyniku rozdziału elektroforetycznego zidentyfikowali pojedyncze białko błonowe o masie molekularnej 45 kDa, którego ilość była znacznie wyższa w porównaniu z komórkami hodowanymi bez dodatku tego związku. Można sądzić, że wzrost zawartości specyficznego białka lub kilku białek zwiększa upakowanie łańcuchów acylowych w fosfolipidach. Stanowi to ochronę komórki przed utratą jonów i ważnych metabolitów.

1.8. Rozkład związków aromatycznych w glebie

Rosnące zapotrzebowanie na produkty przemysłu petrochemicznego oraz wynikająca z tego konieczność ich magazynowania i dystrybucji stwarzają poważne zagrożenie dla środowiska glebowego. Produkty ropopochodne i inne substancje o strukturze aromatycznej rozpraszają się w glebie w postaci substancji pływających na jej powierzchni, rozpuszczonych w wodzie, zanieczyszczeń zaadsorbowanych na cząstkach gleby oraz gazów. Ich obecność w glebie wpływa w istotny sposób na jej fizyczne, chemiczne i biologiczne właściwości. Powodują one przede wszystkim zmiany w ilości i składzie chemicznych substancji organicznych w glebie, obniżenie jej pojemności wodnej i utrudnienie wymiany gazowej, zaburzają stosunek zawartości węgla organicznego do azotu i fosforu oraz wpływają na właściwości koloidów glebowych, w tym wymianę jonową i pH (FINE i in., 1997; INDERJIT, MALLIK, 1997). Toksyczne węglowodory aromatyczne znajduje się we wszystkich warstwach gleby. Ich stężenie w glebach leśnych waha się od 5 µg kg⁻¹ do 100 µg kg⁻¹ gleby. Substancje aromatyczne dostają się w głąb gleby wraz z liśćmi oraz igłami, na których są adsorbowane. W glebach rolniczych ich stężenie wynosi od 10 µg kg⁻¹ do 100 µg kg⁻¹ gleby. Wysokie stężenie występuje w glebach rejonów przemysłowych, w których może wynosić do 3000 µg kg⁻¹ gleby (MENZIE i in., 1992). Wartość ta niejednokrotnie jest przekroczona, na przykład na terenach rafinerii, w miejscach niekontrolowanego wycieku substancji ropopochodnych oraz przetadunku paliw.

Rozkład fenolu i innych związków aromatycznych przez wyselekcjonowane szczepy bakterii, przeprowadzany w podłożach płynnych w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych nie w pełni wyjaśnia, jak proces ten zachodzi w warunkach natu-

ralnych w środowisku przyrodniczym. Dlatego też konieczne wydaje się prowadzenie badań nad ich rozkładem, z uwzględnieniem czynników środowiskowych, wpływających na wydajność procesu ich biodegradacji.

Rozkład związków aromatycznych w glebie jest procesem złożonym. Zależy nie tylko od składu zespołów mikroorganizmów glebowych, lecz także od warunków środowiskowych. ROMANTSCHUK i in. (2000) wyróżnili pięć podstawowych czynników decydujących o rozkładzie substancji organicznych w glebie. Należą do nich: temperatura, dostęp tlenu atmosferycznego, stężenie substancji odżywczych i kosubstratów, biodostępność związku i potencjał degradacyjny zasiedlających ją mikroorganizmów. Do czynników wpływających na przemiany tych zanieczyszczeń w glebie należą również: pH, zawartość wody, struktura i typ gleby oraz wcześniejsza ekspozycja mikroorganizmów na ich obecność. Nie bez znaczenia jest także budowa chemiczna i właściwości substancji stanowiącej skażenie (toksyczność, biodegradowalność i stężenie). Z czynników biotycznych niezwykle ważna jest bioróżnorodność mikroorganizmów zaangażowanych w procesy degradacyjne, interakcje między nimi, stabilność i aktywność enzymatyczna mikroorganizmów, ich biomasa i zdolność do chemotaksji (VOGEL, 1996).

Gleba odznacza się heterogenicznością przestrzenną i od stopnia jej agregacji zależy nie tylko aktywność mikroorganizmów, lecz także biodostępność związków aromatycznych. Dzięki tej właściwości w tej samej glebie powstają zróżnicowane siedliska mikroorganizmów o odmiennej zawartości składników odżywczych i wody (RANJARD, RICHAUME, 2001; BRONICK, LAL, 2005). Związki aromatyczne im są bardziej rozpuszczalne w roztworze glebowym i mniej hydrofobowe, tym łatwiej podlegają degradacji mikrobiologicznej.

Rozkład fenolu w glebie, w przeciwieństwie do innych związków jednopierścieniowych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), nie jest przedmiotem intensywnych badań. Niewiele prac dotyczy biotycznych i abiotycznych czynników wpływających na jego rozkład. Może to wynikać z faktu, że związki o charakterze fenoli są głównymi składnikami jąder jednostek mikrokonstrukcyjnych substancji humusowych i z tego względu trudno jest śledzić ich losy w środowisku glebowym. Ponadto są wysoce reaktywne w stosunku do kompleksów organiczno-mineralnych gleby i szybko parują z roztworu glebowego (GALLET, KELLER, 1999).

Rozkład fenolu w glebie pochodzącej z plantacji trzciny cukrowej na Tajwanie przez szczep *Ralstonia taiwanensis* TJ86 badali CHEN i in. (2004). Wy-

kazali, że w glebie sterylnej, o pH 7,3, wilgotności 8,9% i zawartości materii organicznej 4,8%, całkowity rozkład tego związku w stężeniu 500 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.m. gleby zachodził w ciągu 9 dni, natomiast dawka 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ s.m. gleby rozkładana była w tym czasie w 40%. Dla porównania, w glebie niesterylnej i bez inokulowanych bakterii fenol w niższej dawce w tym czasie ulegał mineralizacji w 30%, a w wyższym stężeniu nie był w niej degradowany. Z kolei SHIBATA i in. (2006) wykazali, że rozkład fenolu w stężeniu 30 mg kg^{-1} gleby w siedmiu różnych glebach pochodzących z plantacji ryżu w Japonii zależał od ogólnej zawartości węgla organicznego oraz dostępności tlenu. W warunkach tlenowych czas rozkładu połowy wprowadzonej dawki fenolu wynosił od 1,7 dnia do 6,9 dnia, a w warunkach beztlenowych było to od 24 dni do 260 dni. Badania nad biodegradacją i adsorpcją fenolu w glebie prowadzili także BAKER i MAYFIELD (1980) oraz SCOTT i in. (1982, 1983).

Przeważająca większość zanieczyszczeń o charakterze aromatycznym wiąże się odwracalnie lub nieodwracalnie z frakcjami humusowymi. Największe powinowactwo wykazują one do frakcji humin, mniejsze do kwasów huminowych, a najmniejsze do kwasów fulwowych. SONG (2003) dowiódł, że 33,4% wprowadzonego do gleby toluenu wiązało się z humusem, z tego 27,9% z frakcją humin, 3% z frakcją kwasów huminowych i najmniej — 2,5% z kwasami fulwowymi. Podobne wyniki otrzymał on dla *o*-ksylenu. Bardziej hydrofobowy naftalen, wprowadzony do gleby piaszczystej o niewielkiej zawartości materii organicznej, w największym stopniu wiązał się z huminami (59%), w mniejszym z kwasami fulwowymi (28,2%), a w najmniejszym z kwasami huminowymi (12,8%) (KOHL, RICE, 1998). Z badań XINGA i in. (1997, 2001) wynika, że na właściwości sorpcyjne gleby mają wpływ jej rodzaj, wiek i sposób transformacji. Rozkład związków aromatycznych zachodzi lepiej w glebach o większej zawartości materii organicznej. LALLAI i MURA (2004) wykazali, że w glebie zawierającej 0,04% materii organicznej nie zachodziła biodegradacja pentachlorofenolu, natomiast w glebie o zawartości 7—8% rozkład był całkowity. DAVIS i MADSEN (1996) porównywali tempo rozkładu toluenu w czterech rodzajach gleb: piaszczystej, piaszczysto-ilastej, gliniastej pochodzącej ze środowiska zanieczyszczonego związkami aromatycznymi oraz gliniastej, wolnej od zanieczyszczeń. Najszybciej rozkład tego związku zachodził w glebie piaszczysto-ilastej o zawartości materii organicznej 4%. Czas rozkładu połowy wprowadzonej dawki toluenu 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ gleby wynosił 57 godz., z kolei w glebie piaszczystej o zawartości materii organicznej 0,8% było to 165 godz.

Ważnym czynnikiem ograniczającym tempo biodegradacji związków aromatycznych jest zawartość wody w glebie. Zbyt niski poziom wilgoci ogranicza wzrost i przeżywalność bakterii, a nadmiar wody prowadzi do powstania warunków beztlenowych. Wpływ zawartości wody na rozkład toluenu w glebie badali DAVIS i MADSEN (1996). Niezależnie od dawki dodanego toluenu najszybciej jego rozkład przebiegał w glebie o 100% zawartości wody, wolniej przy wilgotności 14%, a proces ten nie zachodził, gdy zawartość wody wynosiła 2%. Wpływ różnej wilgotności gleby (od 20% do 70%) na wzrost, przeżywalność i rozkład naftalenu w glebie przez szczepy *Pseudomonas putida* G7 i *Pseudomonas putida* BS3701 badali także FILONOV i in. (1999).

Biodegradacja związków aromatycznych w glebach zachodzi szybciej, gdy występują w niej łatwo przyswajalne związki pokarmowe. Substancje organiczne stanowią nie tylko źródło węgla i energii, lecz także innych makroskładników pokarmowych, głównie fosforu, azotu i siarki. W wydajnej biodegradacji ważny jest stosunek ilości węgla do azotu i fosforu występujących w glebie. Według LIEBEGA i CUTRIGHTA (1999) powinien on wynosić 100:10:1, a zdaniem DAVISA i MADSENA (1996) — 100:9:2. Zarówno zbyt duża, jak i zbyt mała zawartość substancji organicznej wpływa hamująco na proces biodegradacji (HALUŠKA i in., 1995). Z badań CHAÎNEAU i in. (2003) wynika, że użycie mineralnych nawozów azotowych i uzyskanie stosunku C/N/P 100:10:1 w glebie znacznie zwiększyło stopień eliminacji z niej związków ropopochodnych. W glebie wzbogaconej w związki azotu 70—81% zanieczyszczeń uległo degradacji, gdy tymczasem w wyniku naturalnej atenuacji jedynie 56%. Podobny ubytek ropopochodnych skażeń obserwowali MARGESIN i SHINNER (2001) po użyczeniu gleby alpejskiej.

Ważnymi czynnikami w rozkładzie związków aromatycznych są także temperatura, pH i stężenie dostępnego tlenu; minimalna ilość powietrza wypełniającego przestrzeń w glebie powinna wynosić około 10%, optymalne pH 6—8, a temperatura 20—30°C (LEAHY, COLWELL, 1990; BOOPATHY, 2000). Niższa temperatura w naszej szerokości geograficznej przez większą część roku znacznie ogranicza efektywną biodegradację, ponieważ wpływa na właściwości węglowodorów (lepkość i rozpuszczalność w wodzie) oraz obniża aktywność degradacyjną mikroorganizmów (ERIKSSON i in., 2001).

Rozkład związków aromatycznych zależy także od wcześniejszej ekspozycji mikroorganizmów na działanie tych związków. Wykazano, że w glebach narażonych na ciągłe zanieczyszczenie węglowodorami aromatycznymi biodegradacja tych skażeń za-

chodziła szybciej niż w miejscach, które nie były uprzednio poddane ich wpływowi (DAVIS, MADSEN, 1996). Wynika to z adaptacji bakterii do toksycznych związków aromatycznych i zwiększenia ich udziału w zespołach mikroorganizmów zasiedlających skażone środowisko.

Niektóre substancje aromatyczne są szybciej rozkładane w glebie w obecności innych związków. Efekt ten, zwany kometabolizmem, polega na tym, że jeden ze związków wykorzystywany jest w procesie redukcji innego. W wyniku kometabolizmu następuje na przykład rozkład w glebie polichlorowanych bifenyli (PCB) przez szczepy *Ralstonia eutropha* i *Rhodococcus* sp. Kosubstratami, aktywnymi w komórkach tych bakterii gen *bhp* odpowiedzialny za degradację PCB, są dodatkowo wprowadzane do gleby monoterpeny i kwas salicylowy (LEUPROMCHAI i in., 2002).

Mikrobiologiczny rozkład trwałych i toksycznych związków o strukturze aromatycznej jest jednym z najefektywniejszych sposobów usuwania ich ze środowiska glebowego. Czynniki środowiskowe oraz bioróżnorodność populacji zasiedlających glebę utrudniają jednak śledzenie w niej losów i przemian tych związków oraz uniemożliwiają dokładne poznanie mechanizmów regulujących aktywność degradacyjną mikroorganizmów. Konieczne wydaje się więc poszukiwanie metod służących monitorowaniu stopnia eliminacji tych związków z gleby oraz zmian w składzie zespołów mikroorganizmów w warunkach stresu wywołanego obecnością substancji toksycznych.

1.9. Bioaugmentacja a rozkład związków aromatycznych w glebie

Zastosowanie do usuwania ze środowiska produktów ropopochodnych, jedno- i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz związków chlorowcopochodnych konwencjonalnych metod fizykochemicznych, takich jak: adsorpcja, ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi, utlenienie, odparowanie czy rozpuszczenie, nie zawsze jest skuteczne i nie prowadzi do całkowitej ich eliminacji (LOH, WANG, 1998). Z wielu badań wynika, że obiecującą technologią prowadzącą do ich detoksykacji jest bioremediacja (ROMANTSCHUK, 2000; CHAÎNEAU i in., 2003; FISCHER i in., 2006; PRPICH i in., 2006). Polega ona na zastosowaniu mikroorganizmów lub wytwarzanych przez nie enzymów w procesie oczyszczania środowiska z zanieczyszczeń nie tylko przemysłowych, lecz także komunalnych. Bioremediację można podzielić na

dwie kategorie: *in situ* i *ex situ*. W bioremediacji *in situ* usuwanie zanieczyszczeń odbywa się w miejscu ich występowania, a w *ex situ* zachodzi w innym, specjalnie wyznaczonym do tego celu miejscu (BOOPATHY, 2000).

Bioaugmentacja jest jedną z technik bioremediacji, zarówno *in situ*, jak i *ex situ*, polegającą na wprowadzaniu do gleby wyselekcjonowanych mikroorganizmów zdolnych do rozkładu wybranych zanieczyszczeń (IWAMOTO, NASU, 2001; WATANABE, 2001; EL FANTROUSSI, AGATHOS, 2005). Idealne mikroorganizmy użyte w tym celu powinny się charakteryzować: szerokim zakresem aktywności degradacyjnej, odpowiednią szybkością działania, niezbyt długim czasem życia, mobilnością (zdolnością penetracji w głąb systemu), zdolnością do adhezji (z wyjątkiem punktu iniekcji w celu uniknięcia zatykania porów w glebie), elastycznością (odporne na fluktuacje pH, siły jonowej, stężenia jonów metali ciężkich) oraz niewielkim kosztem ich uzyskania (VOGEL, 1996). Pozyskiwanie takich szczepów obejmuje selekcję mikroorganizmów glebowych, izolację, otrzymanie czystych kultur oraz testowanie ich pod względem przydatności w biodegradacji konkretnego zanieczyszczenia.

Można wymienić kilka sposobów wprowadzania egzogenego szczepu lub konsorcjów bakterii do gleby. Po dokonaniu selekcji i ich namnożeniu bakterie można wprowadzać do miejsca, z którego naturalnie pochodziły, lub do miejsc, w których związek stanowiący skażenie ma podobne właściwości chemiczne do tego, jaki zanieczyszczał pierwotne źródło ich pochodzenia. Po raz pierwszy bioaugmentację zakończoną sukcesem przeprowadzono w Japonii w 2000 roku, z użyciem degradującego związku aromatyczne szczepu *Ralstonia eutropha* KT-2, w celu usunięcia z gleby trichloroetyleny (NAKAMURA i in., 2000). Reintrodukcja szczepów *Gordona* sp. BP9 i *Mycobacterium* sp. VF1 do gleb skażonych benzo[a]pirenem i szczepu *Pseudomonas fluorescens* NS1 do miejsc zanieczyszczonych ropą naftową także w znacznym stopniu przyspieszyła rozkład tych związków (KANALY, HARAYAMA, 2000; BARATHI, VASUDEVAN, 2003). Porównanie szybkości rozkładu oleju napędowego w glebie na drodze naturalnej atenuacji, biostymulacji i bioaugmentacji, z zastosowaniem 6-składnikowej mieszaniny bakterii z rodzajów *Bacillus*, *Acinetobacter* i *Pseudomonas*, wykazało, że wzbogacenie rodzimej mikroflory w nowe gatunki bakterii przynosi lepsze efekty niż inne metody bioremediacji (BENTO i in., 2005). Nie wszystkie mikroorganizmy wyselekcjonowane laboratoryjnie o określonym potencjale degradacyjnym nadają się jednak do bioaugmentacji. Jest to spowodowane słabą ich przeżywalnością, niską zdolnością do

konkurowania z autochtonicznymi mikroorganizmami lub zanikiem aktywności enzymatycznej po wprowadzeniu do gleby. W jaki sposób i jakimi metodami powinno się badać przydatność różnych bakterii do bioaugmentacji, na przykładzie szczepów *Pseudomonas mendocina* i *Pseudomonas fluorescens* wprowadzonych do gleb skażonych fenolem i związkami ropopochodnymi, prezentują HEINARU i in. (2005). Podkreślili oni także, że ważne jest, aby takie mikroorganizmy były bezpieczne dla człowieka, nie produkowały toksycznych metabolitów i nie oddziaływały antagonistycznie z naturalną mikroflorą gleby.

Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie w bioaugmentacji mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (GMMs, ang. *genetically modified microorganisms*) (SAYLER, RIPP, 2000; ROMANTSCHUK i in., 2000; TOP i in., 2002; EL FANTROUSSI, AGATHOS, 2005). Tak skonstruowane laboratoryjnie mikroorganizmy po wprowadzeniu do gleby mogą być dawcami plazmidów degradacyjnych czy transpozonów dla potencjalnych biorców spośród mikroflory autochtonicznej. Ponieważ plazmidy są łatwo przenoszone, możliwe jest szybkie rozprzestrzenianie się zdolności degradacyjnych wśród mikroorganizmów na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT, ang. *horizontal gene transfer*) (TOP, SPRINGAEL, 2003). Na przykład plazmid RP4:Tn4371 szczepu *Enterobacter agglomerans* DK3, odpowiadający za rozkład bifenylu, do którego został wbudowany transpozon Tn4371, z dużą częstotliwością przekazywany był do różnych gatunków rodzimych bakterii glebowych (DE RORE i in., 1994). Transfer i ekspresję plazmidu RP4:TOL, kodującego enzymy szlaków rozkładu benzenu, toluenu i ksylenu z *Escherichia coli* C600 do gatunków *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* i *Bradyrhizobium elkanii*, obserwowali HOLLOWELL i in. (1999). Z kolei NEWBY i in. (2000) wykazali możliwość przenoszenia plazmidu pJP4, odpowiadającego za rozkład kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego z *E. coli* do bakterii glebowych, głównie z rodzaju *Pseudomonas* i *Burkholderia*. Przeżywalność uzyskanych transkonjugantów zależy od wielu czynników: rodzaju gleby, zawartości materii organicznej, konkurencji, obecności roślin, stężenia substancji zanieczyszczających oraz metali ciężkich (RAMOS-GONZALES i in., 1991; HILL, TOP, 1998; TOP i in., 2002). GMMs mogą wykazywać szeroką specyficzność substratową i mieć wysoki potencjał kataboliczny, ale zwykle giną szybko lub ich przeżywalność w skażonych środowiskach nie jest zadowalająca.

Badania nad bioaugmentacją dowiodły, że mikroorganizmy zmodyfikowane genetycznie mogą odnosić sukces w warunkach selekcyjnej presji spe-

cyficzego substratu. Nie są natomiast przydatne w środowisku zawierającym wiele substratów i różnorodnych mikroorganizmów bez specyficznej presji selekcyjnej. Zastosowanie GMMs do bioaugmentacji bez fizycznych ograniczeń i związane z nim względy biologicznego bezpieczeństwa budzą wiele wątpliwości. Ze względu na ograniczoną konkurencyjność wprowadzanie organizmów skonstruowanych w laboratorium metodami inżynierii genetycznej do otwartych systemów nie jest powszechnie akceptowane. Mikroorganizmy naturalnie występujące w środowisku mają potencjał do tworzenia nowych szlaków metabolicznych i są bardziej konkurencyjne, ponieważ przeszły selekcję naturalną (VAN DER MEER i in., 1992).

1.10. FAMES w badaniach środowiskowych

Procedura izolacji i identyfikacji komórkowych kwasów tłuszczowych (FAMES) została opracowana przez firmę MIDI Inc. (Newark, DE, USA) jako metoda służąca do oceny przynależności gatunkowej bakterii. Opiera się ona na założeniu, że skład komórkowych kwasów tłuszczowych, uwarunkowany genetycznie, jest charakterystyczną cechą każdego gatunku. Wiedząc jednak, że różne czynniki środowiskowe modyfikują profil kwasów tłuszczowych bakterii, możliwe jest także zastosowanie tej metody do analizy kwasów tłuszczowych, ekstrahowanych bezpośrednio z próbek gleby i wody. Wykorzystanie MIDI-FAME do identyfikacji bakterii wymaga ścisłego przestrzegania warunków hodowli (skład podłoża, temperatura, czas inkubacji) oraz stosowania odczynników chemicznych o wysokim stopniu czystości. Obecnie dzięki tej metodzie można identyfikować ponad 1500 gatunków bakterii. BRIM i in. (1999) użyli metody MIDI-FAME do identyfikacji dominujących szczepów, izolowanych z gleb zanieczyszczonych jonami cynku. Wykazali, że wśród metaloopornych szczepów najczęściej, bo 18 z 23, reprezentowało rodzaj *Arthrobacter*. TIGHE i in. (2000) użyli tej metody do ustalenia zależności filogenetycznych między ponad 600 szczepami należącymi do rodzajów: *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* i *Sinorhizobium*.

Analiza kwasów tłuszczowych izolowanych bezpośrednio z gleby umożliwia określenie podobieństw i różnic w zespołach mikroorganizmów. THOMPSON i in. (1995) na podstawie różnej zawartości FAMES izolowanych z dwóch identycznych, ale odseparowanych zespołów mikroorganizmów, do których wprowadzali genetycznie zmodyfikowa-

ny szczep *Pseudomonas fluorescens* lub szczep dziki, wykazali, że większy wpływ na ich skład wywierał szczep dziki. W innych badaniach CAVIGELLI i in. (1995) stwierdzili różnice między profilami FAMES ekstrahowanych bezpośrednio z gleby a wyizolowanych z niej mikroorganizmów, hodowanych laboratoryjnie na podłożach stałych. IBEKWE i KENNEDY (1999) na podstawie analizy FAMES ekstrahowanych z dwóch różnych gleb, na których uprawiano pszenicę, jęczmień i groch, wykazali zróżnicowany udział bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych w strefie ryzosferowej i pozaryzosferowej. Na podstawie obecności i wysokiej zawartości kwasów 15:0, 15:0 *iso*, 17:0 i 17:0 *anteiso* zaobserwowali, że w badanej glebie udział bakterii Gram-dodatnich był podobny zarówno w ryzosferze, jak i w glebie pozakorzeniowej. Gleby różniły się udziałem bakterii Gram-ujemnych, które wyodrębnili na podstawie charakterystycznych kwasów 10:0 3OH, 12:0 3OH i 17:0 *cy*. Więcej ich zasiedlało glebę przykorzeniową, a mniej — pozakorzeniową.

Użycie MIDI-FAME w badaniach środowiskowych umożliwia ponadto ocenę wpływu wielu czynników abiotycznych (temperatury, pH, związków toksycznych) na skład i bioróżnorodność zespołów mikroorganizmów. Wyraźną zależność między zmniejszającą się zawartością *cis*-nienasyconych kwasów tłuszczowych (16:1 $\omega 7c$ i 18:1 $\omega 7c$) a wzrostem temperatury w glebie z 4°C do 25°C oraz z 5°C do 30°C obserwowali PETERSEN i KLUG (1994), a także PETERSEN i BÄÄTH (2003). HEIPIEPER i in. (1996) wykazali, że u szczepu *Pseudomonas putida* S12 w niskim pH wzrastał stosunek *trans/cis* nienasyconych kwasów tłuszczowych z 0,1 do 0,4. CHAO i HSU (2004) użyli metody FAME do oceny wpływu toluenu na skład mikroorganizmów glebowych. Dowiedli, że przed wprowadzeniem toluenu do gleby dominowały w niej bakterie Gram-dodatnie, głównie z rodzajów *Bacillus* i *Ceulomonas*, a po skażeniu gleby tym związkiem dominującymi stały się bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Alcaligenes*, znane ze zdolności do rozkładu wielu różnych związków aromatycznych. KOZDRÓJ (2000) wykorzystał metodę MIDI-FAME do oceny składu zespołów mikroorganizmów hałdy popiołowej oraz żużlowej, metalurgicznej i nieżelazowej. W materiale z hałdy popiołowej wykazał obecność bakterii z grupy *Cytophaga-Flavobacterium*, charakterystycznej dla środowisk ubogich i silnie zdegradowanych, dla których markerowym kwasem tłuszczowym jest 16:1 $\omega 5c$. Hałdę nieżelazową z kolei cechował duży udział kwasu 18:2 $\omega 6,9$ świadczący o dominacji grzybów. W innych badaniach BUNDY i in. (2004) porównywali wpływ lekkiego oleju parafinowego

i ciężkiego oleju napędowego na populację mikroorganizmów w glebie. Po 2 miesiącach w glebie skażonej olejem parafinowym dominującymi kwasami były 15:0 i 17:1 ω 8, a w glebie zawierającej olej napędowy — 18:2 ω 6,9. Wyniki te potwierdzają fakt, że charakter zanieczyszczeń ma istotny wpływ na skład populacji mikroorganizmów glebowych.

Z wielu prac wynika, że analiza MIDI-FAME jest przydatną metodą w badaniach środowiskowych, chociaż występują w niej pewne ograniczenia. Stosując tę metodę, oprócz kwasów tłuszczowych pochodzących z mikroorganizmów, izoluje się z gleby kwasy związane z frakcjami próchnicowymi i korzeniami roślin (SCHUTTER, DICK, 2000). Porównanie metody MIDI-FAME z PLFA przez DRENOVSKY'EGO i in. (2004) wskazuje, że dzięki metodzie MIDI-FAME możliwe było izolowanie kwasów prostolącuchowych o długości łańcucha

do C14, natomiast wśród PLFAs kwasy te nie były identyfikowane. Ponadto w profilu kwasów tłuszczowych uzyskanym metodą MIDI-FAME stwierdzono wysoką zawartość kwasu markerowego dla grzybów, tzn. 18:2 ω 6,9, a mniejszym udziałem odznaczały się kwasy wskazujące na obecność promieniowców. Mimo wskazanych ograniczeń w stosowaniu tej metody, jest ona powszechnie używana w badaniach mikrobiologii środowiskowej i coraz częściej łączy się ją z metodami genetycznymi, na przykład SLB/ENAP, LH-PCR, PCR-DGGE i T-RFLP, stanowiącymi wspólnie bardziej zintegrowane narzędzie w określaniu zmian w składzie zespołów mikroorganizmów różnych środowisk, zarówno skażonych, jak i nieskażonych (VAN ELSAS i in., 1998; WHITE i in., 1998; MACNAUGHTON i in., 1999; RITCHIE i in., 2000; KOZDRÓJ, VAN ELSAS, 2001; TURPEINEN i in., 2004).

2. Cel pracy

Rozkład fenolu w warunkach laboratoryjnych przez wyselekcjonowane z różnych środowisk bakterie z rodzaju *Pseudomonas* jest procesem dobrze poznanym zarówno pod względem biochemicznym, jak i genetycznym. Znana jest budowa i mechanizm działania dioksygenaz katecholowych, intermedyaty szlaków metabolicznych *orto* i *meta* oraz lokalizacja i organizacja genów kodujących enzymy przemian katabolicznych tego związku. O wyborze szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 do planowanych badań zdecydowała zdolność rozkładu przez nie wysokich stężeń fenolu w podłożach płynnych (około 750 mg l^{-1}), wysoka aktywność właściwa dioksygenaz katecholowych ($1,60\text{--}1,85 \text{ }\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka) oraz brak informacji o możliwości wykorzystania tych bakterii w procesie bioremediacji gleb zanieczyszczonych związkami fenolowymi.

Głównym celem pracy było zbadanie, czy i jakie zmiany zachodzą w składzie komórkowych kwasów tłuszczowych szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w czasie rozkładu fenolu w glebie. Aby dokonać takiej analizy, konieczne było wykonanie badań polegających na ocenie przeżywalności tych szczepów i sprawdzeniu, czy są zdolne do rozkładu fenolu po wprowadzeniu do gleb. Ocenę przeżywalności i rozkład zastosowanych stężeń substratu fenolowego prowadzono

w czterech układach doświadczalnych. Pierwszy stanowiły gleby sterylne, do których introdukowano szczep *Pseudomonas vesicularis*, drugi — gleby sterylne z *Pseudomonas* sp. JS150, trzeci — gleby sterylne z wprowadzoną mieszaniną tych szczepów, a czwarty — gleby niesterylne poddane bioaugmentacji z użyciem obu tych szczepów. Z uwagi na to, że fenol wpływa na skład i modyfikacje kwasów tłuszczowych tych bakterii w podłożach płynnych, podjęto próbę zbadania, dzięki jakim znanym mechanizmom adaptacyjnym przystosowują się one do obecności tego związku w glebie. Zastosowanie takich układów doświadczalnych umożliwiło porównanie zmian w profilach kwasów tłuszczowych, wywołanych obecnością fenolu w pojedynczych szczepach, z uzyskanymi z ich mieszaniny oraz z profilami kwasów pochodzących z gleb z mikroflorą autochtoniczną i wprowadzonymi szczepami *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150.

Istotne było także zbadanie, czy analiza metylo-nych estrów kwasów tłuszczowych (FAMES) może być przydatna do oceny stopnia usuwania fenolu z gleby.

Zamierzeniem było również wyróżnienie markerowych kwasów tłuszczowych, które mogłyby służyć do monitorowania procesu eliminacji tego związku ze środowiska glebowego.

3. Materiały i metody

3.1. Szczepy bakteryjne

W badaniach użyto dwóch szczepów bakteryjnych: *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, znanych ze zdolności do rozkładu fenolu w podłożach płynnych w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych (HAIGLER i in., 1992; MROZIK i in., 2002). Szczep *Pseudomonas vesicularis* wyizolowano z mieszanej populacji mikroorganizmów osadu czynnego, pochodzącego z miejskiej oczyszczalni ścieków w Częstochowie, z kolei szczep *Pseudomonas* sp. JS150 otrzymano dzięki uprzejmości dr. J.C. Spaina z Air Force Civil Engineering Suport Agency, Tyndall Air Force Base na Florydzie w USA. Szczep *Pseudomonas vesicularis* jest szczepem dzikim, a *Pseudomonas* sp. JS150 — szczepem zmienionym genetycznie. Wyjściowy do otrzymania szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 był *Pseudomonas* sp. JS1, rozkładający *p*-dichlorobenzen i poddany mutagenzie z użyciem metanosulfonianu etylu.




3.2. Gleby

W badaniach korzystano z trzech rodzajów gleb. Próbkę pobierano z trzech stanowisk, z głębokości 0—20 cm, w październiku, w latach 2005—2007. Były to: gleba lasu mieszanego w Sosnowcu, gleba lasu sosnowego w Bukowni oraz gleba podmokłej łąki w Sosnowcu. Gleby oznaczono umownie: L1, L2 i G. Charakterystykę gleb przedstawia tabela 4.

Pobrane próbki gleb suszono w temperaturze pokojowej przez 48 godz., przesiewano przez sito o średnicy oczek 2 mm, porcjowano po 150 g do szklanych naczyń o objętości 180 ml i czterokrotnie sterylizowano w odstępach 24-godzinnych w autoklawie, w temperaturze 121°C, przy ciśnieniu 1,2 atmosfery, przez 40 min. Wilgotność gleby doprowadzano do 50% jej maksymalnej pojemności wodnej. Wszystkie gleby skażano trzema stężeniami fenolu (Sigma-Aldrich, Niemcy): 1,7 mg g⁻¹ s.m., 3,3 mg g⁻¹ s.m. oraz 5,0 mg g⁻¹ s.m. gleby, i prein-

Tabela 4

Charakterystyka gleb

Właściwości	L1	L2	G
Morfologia gleb			
Materia organiczna, %	15,00	2,10	21,00
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,63	0,45	2,84
Kwasy huminowe, mg g ⁻¹	0,17	0,08	0,19
Kwasy fulwowe, mg g ⁻¹	2,90	1,39	3,81
Kwasy hymatomelanowe, mg g ⁻¹	0,06	0,04	0,09
Wilgotność, %	12,00	3,00	24,00
pH	8,10	7,10	6,95

Objaśnienia: L1 — gleba lasu sosnowego, L2 — gleba lasu mieszanego, G — gleba podmokłej łąki.

kubowano przez 3 dni. Do bioaugmentacji użyto gleb, których nie poddano procesowi sterylizacji.

3.3. Wprowadzanie bakterii do gleb

Przed wprowadzeniem pojedynczych szczepów bakterii do sterylnych gleb namnażano je w bulionie odżywczym (Becton Dickinson, USA) przez 6–8 godz., z wytrząsaniem (125 rpm), w temperaturze 28°C, uzyskując $1,5 \cdot 10^9$ komórek w 1 ml hodowli. Następnie zawiesinę bakterii odwirowywano ($8000 \cdot g$) w 4°C przez 15 min i przemywano trzykrotnie 0,85% roztworem NaCl. Otrzymany osad zawieszano w 13 ml 0,85% roztworu NaCl i wprowadzano do gleb ($2,5 \cdot 10^9$ komórek na 1 g s.m. gleby) skażonych różnymi stężeniami fenolu. Aby ocenić wpływ fenolu na przeżywalność bakterii, szczepy wprowadzano także do gleb nieskażonych fenolem. Natomiast dwuskładnikową mieszaninę szczepów do inokulacji sporządzano, łącząc po określonym czasie hodowli (6–8 godz.) identyczne objętości zawiesiny komórek obu szczepów, po czym odwirowywano je i zawieszano w 13 ml 0,85% roztworu NaCl, tak aby liczba komórek w 1 g s.m. gleby wynosiła $2,5 \cdot 10^9$. W podobny sposób przygotowywano inokulat bakterii do bioaugmentacji. Wszystkie gleby przechowywano w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła. Schemat prowadzenia badań biodegradacyjnych w glebach ilustruje rys. 2.

3.4. Metody analityczne

3.4.1. Ekstrakcja i oznaczanie fenolu

W celu oznaczenia stężenia fenolu pobierano w 1., 4. i 8. dniu, a dalej co 16 dni, 5 g gleby i umieszczano w kolbach Erlenmayera o objętości 100 ml. Następnie wprowadzano 45 ml metanolu, wytrząsano przez 30 min i sączono przez sączek bibułowy Whatman nr 4. W przesączu oznaczano stężenie fenolu kolorymetryczną metodą z *p*-nitroaniliną (ŁURIE, RYBNIKOVA, 1968). Do 1 ml przesączu wprowadzano 1 ml zdwuazowanej *p*-nitroaniliny z użyciem 2% Na_2NO_2 , 0,5 ml 10% Na_2CO_3 , 1 ml 10% NaOH i uzupełniano wodą destylowaną do 10 ml. Po 10 min od momentu zmieszania reagentów mierzono absorbancję roztworu przy długości fali $\lambda = 550$ nm. Stężenie fenolu odczytywano z krzywej wzorcowej o równaniu $y = 0,0096x$.

3.4.2. Oznaczanie zawartości materii organicznej, węgla organicznego, wilgotności, frakcji kwasów próchnicowych i pH

Zawartość procentową materii organicznej w glebie oznaczano przez spalanie w piecu muflowym, w temperaturze 600°C, przez 8 godz., wysuszonych do stałej masy 5 g gleby (LITYŃSKI i in., 1972). Zawartość węgla organicznego oznaczano spektrofotometrycznie z użyciem mieszaniny 0,067 M dichromianu potasu w kwasie siarkowym (1:1) (KANDELER, 1995). Zawartość wody oznaczano metodą wagową, polegającą na wysuszeniu próbek gleby do stałej masy w 105°C (LITYŃSKI i in., 1972). Ekstrakcję kwasów huminowych (Hum), fulwowych (Ful) i hymatomelanowych (Hym) z gleby prowadzono metodą opisaną przez SZCZEPANIEC-CIECIAK i KOŚCIELNIAK (1999). Etapy ekstrakcji kwasów humusowych z gleby ilustruje rys. 3.

Zawartość poszczególnych frakcji kwasów humusowych oznaczano spektrofotometrycznie, korzystając z wzorów:

$$\text{Hum} = \frac{0,5 \cdot 1,724 (S_2 - S_1)}{8,8 \cdot A_2 + 0,25 \cdot A_3 + 0,5 \cdot A_4},$$

$$\text{Ful} = \frac{8,8 \cdot 1,724 (S_2 - S_1)}{8,8 \cdot A_2 + 0,25 \cdot A_3 + 0,5 \cdot A_4},$$

$$\text{Hym} = \frac{0,25 \cdot 1,724 (S_2 - S_1)}{8,8 \cdot A_2 + 0,25 \cdot A_3 + 0,5 \cdot A_4},$$

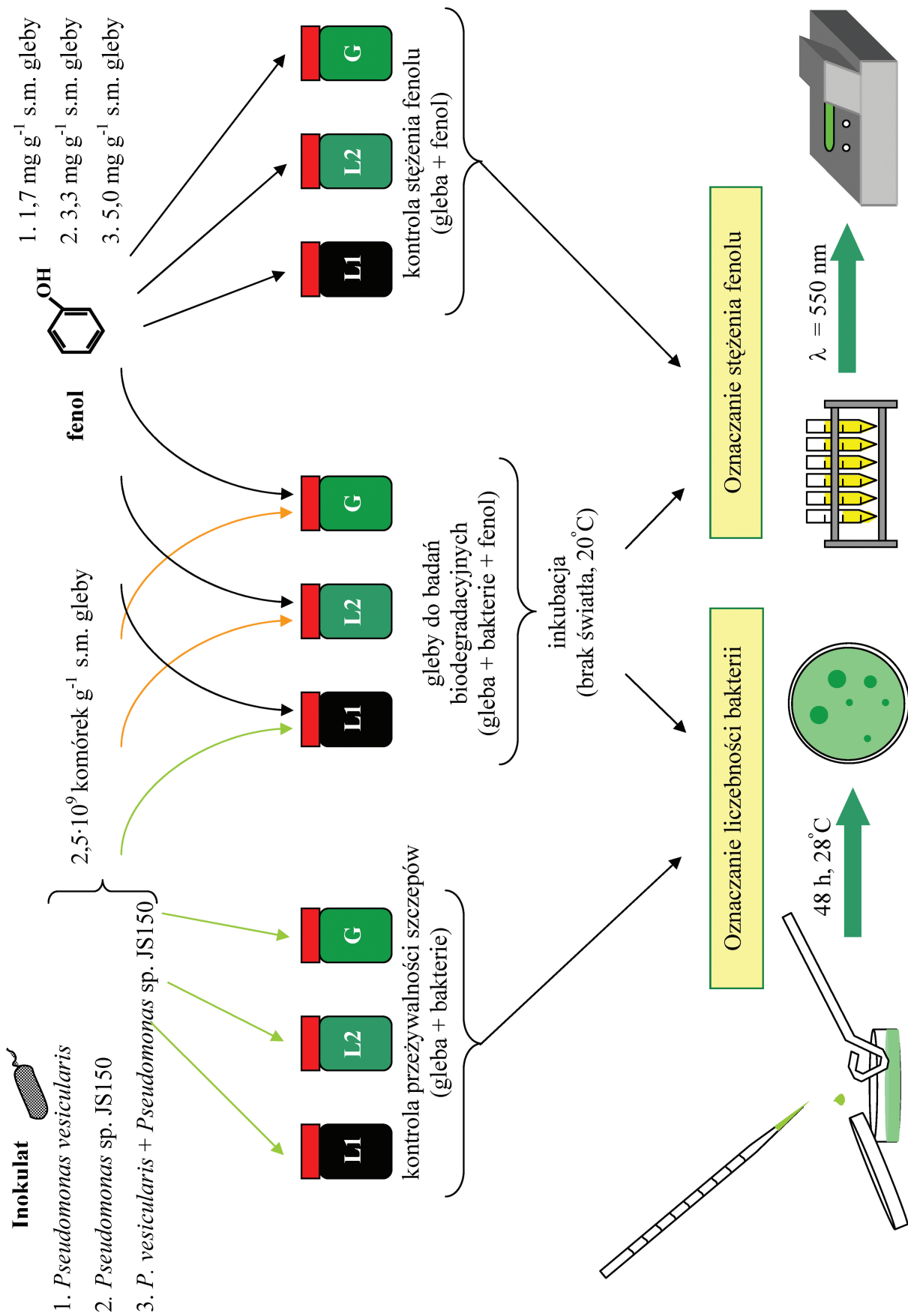
gdzie: S_1 — zawartość węgla organicznego w próbie wyekstrahowanej ługiem [mg], S_2 — zawartość węgla organicznego w próbie podstawowej [mg], A_2 , A_3 i A_4 — absorbancje kolejnych roztworów.

Odczyn pH gleby oznaczano potencjometrycznie w wodnym roztworze gleby w stosunku 1:2 po 2 godz. wytrząsania, z użyciem pehametru Elmetron CX-731.

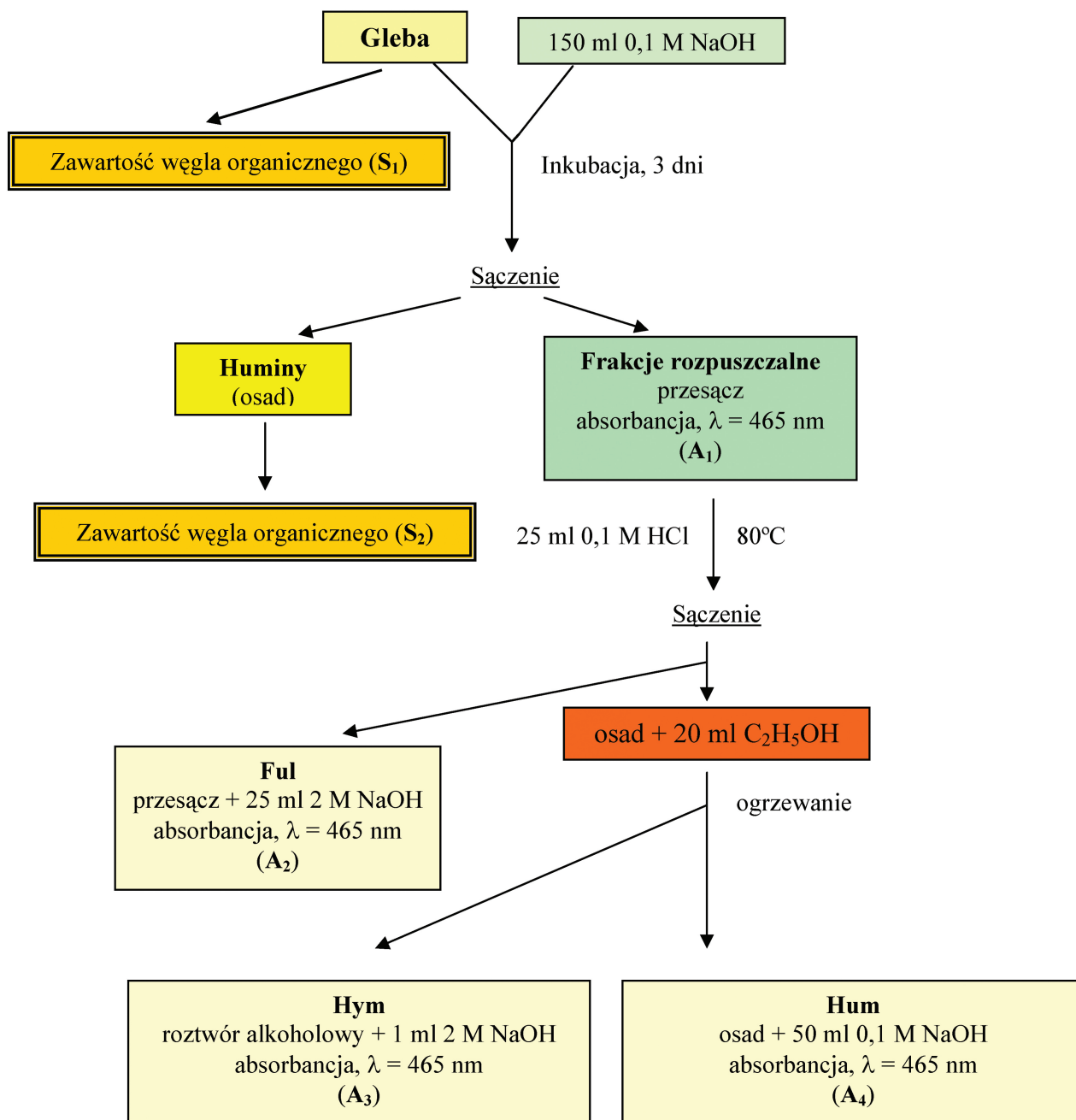
3.5. Analizy mikrobiologiczne

3.5.1. Oznaczanie liczebności bakterii

Oznaczenia liczby bakterii w glebach skażonych fenolem oraz w glebach kontrolnych przeprowadzano metodą płytek tartych (LORCH i in., 1995) w 1., 4. i 8. dniu, a następnie co 16 dni od wprowadze-



Rys. 2. Schemat prowadzenia badań biodegradacyjnych w glebach



Rys. 3. Schemat ekstrakcji kwasów huminowych, fulwowych i hymatomelanowych z gleby

nia ich do gleby. W tym celu po 5 g gleby umieszczano w kolbach Erlenmayera zawierających 45 ml 0,85% roztworu NaCl i wytrząsano w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po dokonaniu tych czynności sporządzano szereg 10-krotnych rozcieńczeń zawiesiny glebowej w 0,85% roztworze NaCl i wysiewano po 100 μ l z rozcieńczeń 10^{-4} – 10^{-8} na płytki Petriego z agarem odżywcym (BTL, Łódź) w trzech powtórzeniach. Płytki inkubowano w 28°C przez 48 godz., a następnie liczono wyrosłe kolonie, przyjmując, że jedna kolonia odpowiada jednej komórce bakteryjnej. Liczbę bakterii *Pseudomonas* sp. JS150 wprowadzonych do gleb sterylnych w postaci 2-składnikowej mieszaniny z *Pseudomonas vesicularis* oznaczano na płytkach

z agarem odżywcym z dodatkiem ryfampicyny (Pharmaceutical Works Polfa, Trachomin), na którą szczep ten był odporny, w stężeniu 100 μ g g^{-1} . Ponieważ *Pseudomonas vesicularis* nie był odporny na ryfampicynę i inne antybiotyki, liczebność komórek tego szczepu w mieszaninie oznaczano, odejmując od ogólnej liczby bakterii wyrosłych na płytkach z agarem odżywcym liczbę bakterii *Pseudomonas* sp. JS150 opornych na ryfampicynę. Dodatkowo podczas liczenia bakterii zwracano uwagę na morfologię wyrosłych kolonii. Szczep *Pseudomonas vesicularis* tworzył drobne, lśniące kolonie o zabarwieniu beżowym, z kolei *Pseudomonas* sp. JS150 rósł w postaci większych, matowych kolonii o białym kolorze. Liczebność bakterii

Pseudomonas sp. JS150 w glebach poddanych bioaugmentacji oceniano, korzystając z jego oporności na ryfampicynę, natomiast liczby bakterii *Pseudomonas vesicularis* nie oznaczano z powodu braku cechy wyróżniającej go wśród mikroflory autochtonicznej. Liczbę komórek w 1 g s.m. gleby podawano w skali logarytmicznej (log j.t.k.).

3.5.2. Izolacja i identyfikacja kwasów tłuszczowych z komórek bakterii oraz z gleby

Izolacje kwasów tłuszczowych z komórek bakterii prowadzono zgodnie z procedurą opracowaną przez SASSERA (1990), a z gleby — według KOZDRÓJA (2000). W celu wyznaczenia profilu kwasów tłuszczowych użytych w badaniach bakterii hodowano je w 100 ml bulionu odżywczego. Po 6—8 godz. inkubacji hodowle wirowano ($8000 \cdot g$) w $4^{\circ}C$ przez 15 min. Z otrzymanego osadu pobierano sterylną eżą 40 mg bakterii i umieszczano w probówkach Pyrex o objętości 13 ml. W celu izolacji kwasów tłuszczowych z gleby odważano 5 g i umieszczano w probówkach Pyrex o objętości 30 ml. Do prób zawierających bakterie dodawano 1 ml, a do prób zawierających glebę — 5 ml odczynnika R1 (150 g NaOH w 50% metanolu), powodującego saponifikację. Wszystkie próbki worteksowano przez 10—20 s, a następnie inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze $100^{\circ}C$ przez 30 min. Po tym czasie zawartość próbek ochładzano i do próbek zawierających bakterie dodawano 2 ml, a do zawierających glebę — 10 ml odczynnika R2 (325 ml 6 M HCl i 275 ml metanolu) w celu przekształcenia nielotnych soli sodowych kwasów tłuszczowych w ich lotne pochodne — estry metylowe (FAMES). Próby worteksowano 10—20 s i umieszczano ponownie w łaźni wodnej o temperaturze $80^{\circ}C$ na 10 min. Po tym czasie próbki ochładzano i dodawano odczynnika R3 (heksan/eter metylowy tert-butylu, 1:1): do próbek zawierających bakterie — 1,25 ml, a do próbek z glebą — 2 ml. Zawartość wszystkich próbek delikatnie mieszano na mieszadle rotacyjnym przez 10 min. Etap ten miał na celu ekstrakcję metylowych estrów kwasów tłuszczowych z fazy wodnej do fazy organicznej. Po rozdzieleniu się faz oddzie-

lano fazę wodną od organicznej. Z próbek zawierających bakterie usuwano dolną fazę wodną za pomocą pipety pasterowskiej. Z kolei z próbek zawierających glebę pipetą pasterowską zbierano górną fazę organiczną i przenoszono do próbek o pojemności 13 ml firmy Pyrex. Do fazy organicznej obu typów próbek dodawano 3 ml odczynnika R4 (1,2% NaOH w H_2O), który powodował usunięcie wolnych, niezmetylowanych kwasów tłuszczowych, zanieczyszczających próbę. Zawartość wszystkich próbek delikatnie mieszano przez 5 min. Gdy pojawiała się emulsja, do prób dodawano kilka kropli odczynnika R5 (nasycony roztwór NaCl) i ponownie delikatnie mieszano. Po rozwarstwieniu się faz ekstrakt kwasów tłuszczowych przenoszono do naczynek chromatograficznych firmy Hawlett—Packard. Rozdział FAMES prowadzono za pomocą chromatografu gazowego Hawlett—Packard 6890, wyposażonego w kapilarną kolumnę HP Ultra 2 (fenylo-metylo-krzemionkową o średnicy 0,2 mm, długości 25 m i grubości 0,33 μm) z wodorem jako gazem nośnym i detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID. Rozdzielone FAMES identyfikowano z wykorzystaniem oprogramowania Sherlock, w wersji 3,90, firmy MIDI (Microbial ID Inc., Newark, DE, USA). Do kalibracji stosowano standardową mieszaninę kwasów tłuszczowych (MIDI System Calibration Standard) firmy Hawlett—Packard.

3.6. Analiza statystyczna

Przedstawione wyniki są średnimi z trzech powtórzeń. Wszystkie obliczenia (stężenie fenolu, liczebność bakterii, wartości średnie i odchylenia standardowe) oraz wykresy wykonano z zastosowaniem arkuszy kalkulacyjnych Microsoft® Excel w wersji 9.0.

Do oceny wpływu fenolu na zmiany procentowego udziału poszczególnych grup kwasów tłuszczowych w profilu FAMES w czasie wykorzystano analizę wariancji z powtórzeniami ANOVA. Istotnie statystycznie różnice ($p < 0,05$) między średnimi oceniano, dokonując obliczeń wartości najmniejszych istotnych różnic (NIR), z zastosowaniem programu STATISTICA® w wersji 6.0 PL.

4. Wyniki badań

4.1. Wprowadzenie bakterii do gleb sterylnych

4.1.1. Rozkład fenolu w glebach przez szczep *Pseudomonas vesicularis*

Badania biodegradacyjne przeprowadzono w trzech rodzajach sterylnych gleb skażonych fenolem w stężeniach $1,7 \text{ mg g}^{-1}$, $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ i $5,0 \text{ mg g}^{-1}$, do których wprowadzono szczep *Pseudomonas vesicularis*. Jako kontrole w badaniach tych służyły gleby sterylne skażone takimi samymi stężeniami fenolu. Gleby z introdukowanym szczepem i skażone fenolem oznaczono $L1_{F+B1}$, $L2_{F+B1}$ i G_{F+B1} , a gleby kontrolne — $L1_F$, $L2_F$ i G_F (gdzie B1 w indeksie dolnym to *Pseudomonas vesicularis*, a F — fenol).

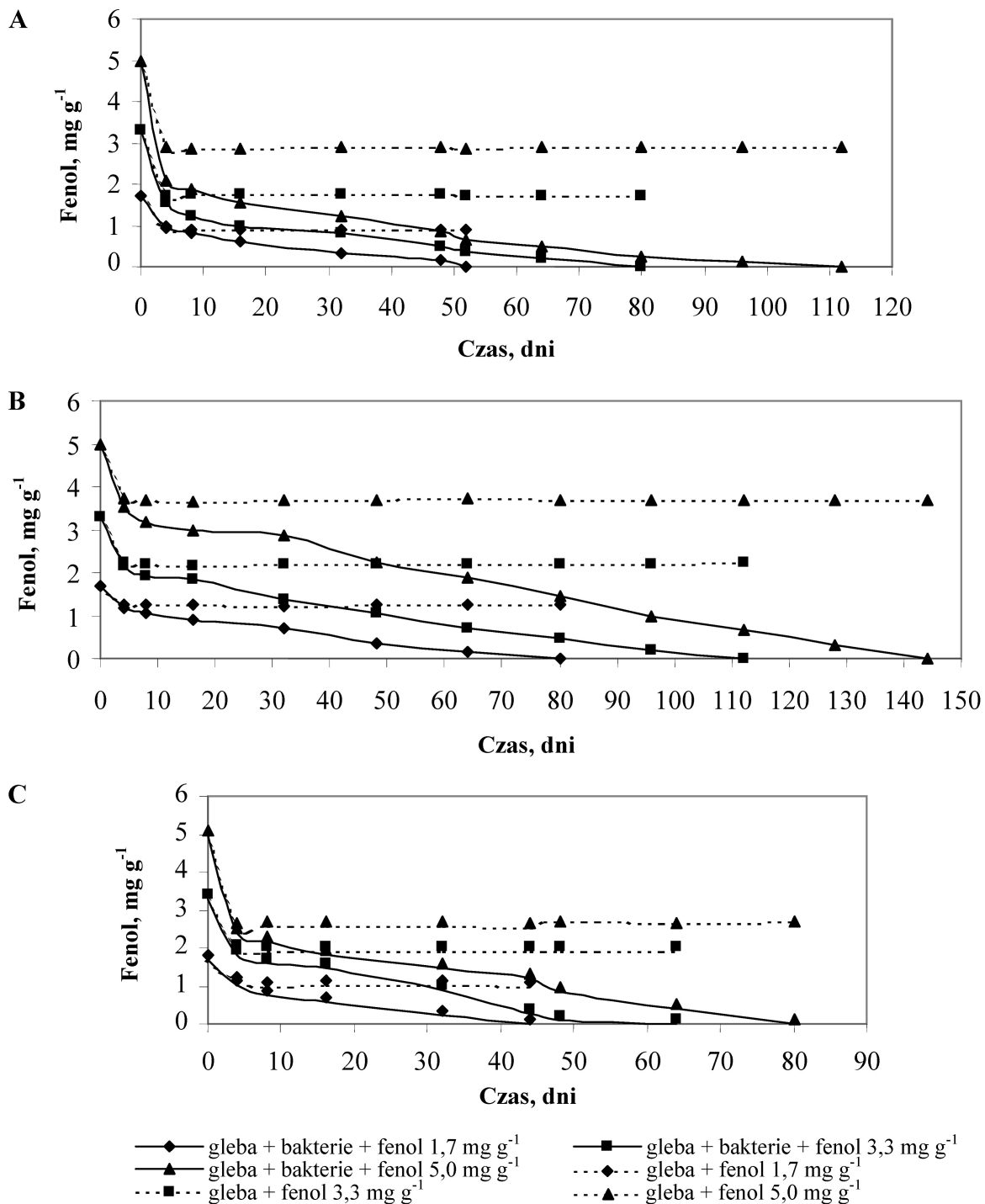
Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że szczep *Pseudomonas vesicularis* był zdolny do rozkładu zastosowanych stężeń fenolu we wszystkich glebach. Dawkę $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ degradował w glebie $L1_{F+B1}$ w ciągu 52 dni, w glebie $L2_{F+B1}$ w ciągu 80 dni, a w glebie G_{F+B1} w ciągu 44 dni. Rozkład fenolu w stężeniu $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ trwał w glebie $L1_{F+B1}$ 80 dni, w glebie $L2_{F+B1}$ — 112 dni, a w glebie G_{F+B1} — 64 dni. Czas degradacji najwyższej dawki fenolu $5,0 \text{ mg g}^{-1}$ przez ten szczep wynosił w glebach: $L1_{F+B1}$ — 112 dni, w $L2_{F+B1}$ — 144 dni, a w G_{F+B1} — 80 dni. Największy ubytek wprowadzonego do gleb fenolu następował w ciągu pierwszych 4 dni inkubacji, zarówno w glebach z wprowadzonym szczepem, jak i w glebach kontrolnych. W glebie $L1_{F+B1}$ skażonej użytymi dawkami fenolu zawierał się w przedziale 43,53—58,00%, w glebie $L2_{F+B1}$ — w przedziale 29,40—34,76%, a w glebie G_{F+B1} — w zakresie 38,82—51,80%. W glebach kontrolnych był mniejszy i kształtował się nastę-

pująco: 43,88—48,18% w $L1_F$, 25,29—32,24% w $L2_F$ i 34,12—49,40% w G_F . W kolejnych dniach stężenie fenolu nie zmieniało się w glebach kontrolnych, w glebach $L1_{F+B1}$, $L2_{F+B1}$ i G_{F+B1} obserwowano natomiast stopniowy rozkład wprowadzonego fenolu. Dynamikę rozkładu fenolu w stężeniach $1,7 \text{ mg g}^{-1}$, $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ i $5,0 \text{ mg g}^{-1}$ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebach L1, L2 i G oraz zmiany stężenia fenolu w glebach kontrolnych ilustruje rys. 4.

4.1.2. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas vesicularis* po wprowadzeniu do gleb

Przeżywalność bakterii *Pseudomonas vesicularis* badano w glebach L1, L2 i G skażonych fenolem w stężeniach $1,7 \text{ mg g}^{-1}$, $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ i $5,0 \text{ mg g}^{-1}$ oraz w nieskażonych glebach kontrolnych, zawierających bakterie. Gleby z wprowadzonym szczepem i skażone fenolem oznaczono: $L1_{F+B1}$, $L2_{F+B1}$ i G_{F+B1} , a gleby kontrolne: $L1_{B1}$, $L2_{B1}$ i G_{B1} (gdzie B1 w indeksie dolnym odpowiada bakteriom *Pseudomonas vesicularis*, F zaś oznacza fenol).

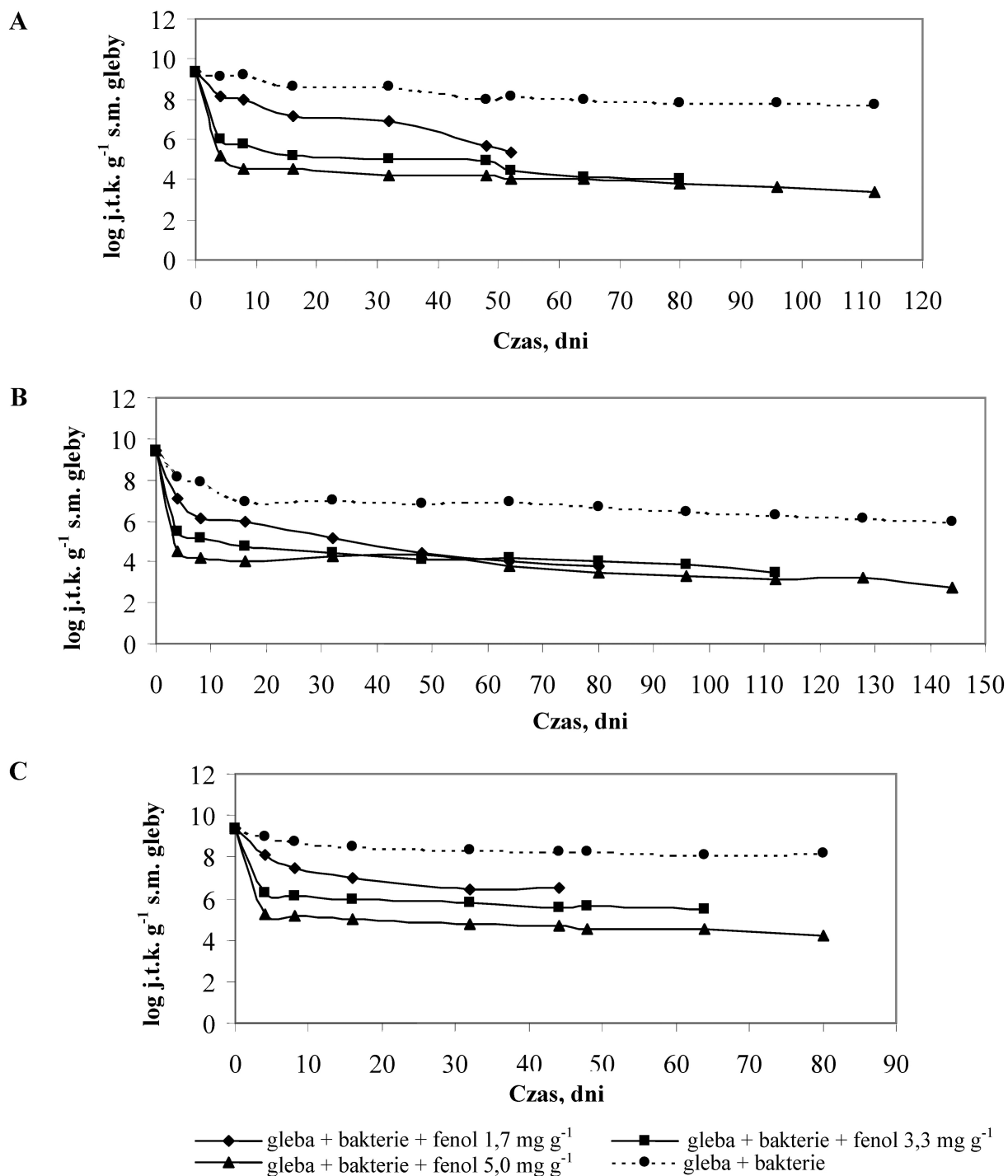
Największy spadek liczebności komórek obserwowano w glebach: $L1_{F+B1}$, $L2_{F+B1}$ i G_{F+B1} , skażonych zastosowanymi dawkami fenolu w ciągu pierwszych 4 dni inkubacji. W glebach $L1_{F+B1}$, $L2_{F+B1}$ i G_{F+B1} zanieczyszczonych najniższą dawką tego związku był on najmniejszy i stanowił odpowiednio: 13,30%, 25,00% i 13,51% wprowadzonej liczby bakterii. W glebach skażonych fenolem w stężeniu $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ gleby spadek liczby bakterii był większy i wynosił: w glebie $L1_{F+B1}$ 36,17%, w glebie $L2_{F+B1}$ 42,02%, a w glebie G_{F+B1} 32,98%



Rys. 4. Dynamika rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach L1 (A), L2 (B) i G (C) przez szczep *Pseudomonas vesicularis* oraz zmiany stężenia fenolu w glebach kontrolnych

wyjściowej liczby komórek. W glebach skażonych najwyższą dawką fenolu równą 5,0 mg g⁻¹ był on największy i wynosił: w glebie L1_{F+B1} 45,21%, w glebie L2_{F+B1} 52,13%, a w glebie G_{F+B1} 43,83%. W kolejnych dniach we wszystkich glebach skażonych fenolem liczebność bakterii malała i w dniu, w którym stwierdzano całkowity rozkład tego związku, kształtowała się w zależności od stopnia skażenia gleb w przedziale: 35,64—57,23% w glebie L1_{F+B1}, 23,94—40,64% w glebie L2_{F+B1} i 44,47—69,04% w glebie G_{F+B1}. Dla porównania,

w glebach kontrolnych liczba bakterii w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń była podobna: w glebie L1_{B1} zawierała się w przedziale 82,98—86,17%, w glebie L2_{B1} przedział ten wynosił 63,83—71,28%, a w glebie G_{B1} — 86,60—87,98%. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas vesicularis* w glebach L1, L2 i G skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz glebach kontrolnych, niezawierających fenolu, przedstawia rys. 5.



Rys. 5. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas vesicularis* w glebach L1 (A), L2 (B) i G (C) skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz w glebach kontrolnych (nieskażonych)

4.1.3. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas vesicularis*

W glebach L1_{F+B1}, L2_{F+B1} i G_{F+B1} przed rozpoczęciem i po zakończeniu badań biodegradacyjnych oznaczano zawartość materii organicznej, węgla or-

ganicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz mierzone pH. Identycznych pomiarów dokonywano w glebach kontrolnych L1_{B1}, L2_{B1} i G_{B1} oraz L1_F, L2_F i G_F. Po zakończeniu inkubacji we wszystkich układach doświadczalnych stwierdzono niewielkie zmiany pH gleby, nieprzekraczające 1 jednostki w skali pH. Największy ubytek materii organicznej i węgla organicznego oznaczano w glebach L1_{B1}, L2_{B1} i G_{B1} oraz w glebie G_{F+B1} z dodatkiem wszystkich zastosowanych stężeń fenolu. Z analizy frakcji kwasów próchnicowych wy-

Tabela 5
Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach L1, L2 i G przed i po degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) przez *Pseudomonas vesicularis* oraz w glebach kontrolnych (D)

Właściwości	Gleba													
	L1 _F		L1 _{F+BI}		L2 _F		L2 _{F+BI}		G _F		G _{F+BI}			
	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 44.	dzień 1.	dzień 44.		
Materia organiczna, %	15,30 ± 0,11	15,34 ± 0,15	15,60 ± 0,88	15,27 ± 0,05	2,12 ± 0,05	2,11 ± 0,06	2,13 ± 0,06	2,04 ± 0,06	21,16 ± 0,11	21,14 ± 0,08	21,99 ± 0,13	19,85 ± 0,47		
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,61 ± 0,07	1,62 ± 0,06	1,68 ± 0,04	1,38 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,47 ± 0,04	0,48 ± 0,02	0,32 ± 0,06	2,89 ± 0,08	2,90 ± 0,15	2,95 ± 0,09	2,51 ± 0,08		
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,09	2,90 ± 0,09	2,90 ± 0,09	2,72 ± 0,09	1,40 ± 0,04	1,42 ± 0,06	1,40 ± 0,06	1,20 ± 0,06	3,80 ± 0,11	3,86 ± 0,08	3,80 ± 0,05	3,67 ± 0,06		
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01		
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01		
pH	7,56 ± 0,06	7,47 ± 0,03	7,56 ± 0,04	6,88 ± 0,04	6,82 ± 0,08	6,74 ± 0,02	6,82 ± 0,09	6,27 ± 0,01	6,70 ± 0,06	6,65 ± 0,06	6,72 ± 0,06	6,38 ± 0,03		

Właściwości	Gleba													
	L1 _F		L1 _{F+BI}		L2 _F		L2 _{F+BI}		G _F		G _{F+BI}			
	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 64.	dzień 1.	dzień 64.		
Materia organiczna, %	15,37 ± 0,11	15,40 ± 0,18	15,74 ± 0,18	15,40 ± 0,25	2,17 ± 0,04	2,13 ± 0,07	2,18 ± 0,05	1,74 ± 0,05	21,20 ± 0,17	21,10 ± 0,10	22,04 ± 0,19	19,42 ± 0,42		
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,65 ± 0,09	1,69 ± 0,05	1,73 ± 0,10	1,24 ± 0,02	0,48 ± 0,04	0,49 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,44 ± 0,03	2,99 ± 0,09	3,00 ± 0,12	2,99 ± 0,06	2,45 ± 0,10		
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,06	2,89 ± 0,06	2,90 ± 0,08	2,65 ± 0,15	1,41 ± 0,13	1,42 ± 0,06	1,40 ± 0,08	1,00 ± 0,08	3,80 ± 0,10	3,81 ± 0,11	3,80 ± 0,15	3,50 ± 0,11		
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,01		
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01		
pH	7,45 ± 0,03	7,37 ± 0,04	7,47 ± 0,04	6,70 ± 0,05	6,60 ± 0,12	6,61 ± 0,08	6,69 ± 0,04	6,40 ± 0,05	6,61 ± 0,06	6,55 ± 0,05	6,64 ± 0,05	6,38 ± 0,04		

Właściwości	Gleba													
	L1 _F		L1 _{F+BI}		L2 _F		L2 _{F+BI}		G _F		G _{F+BI}			
	dzień 1.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 144.	dzień 1.	dzień 144.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 80.		
Materia organiczna, %	15,40 ± 0,16	15,42 ± 0,16	15,80 ± 0,11	15,20 ± 0,11	2,19 ± 0,08	2,19 ± 0,04	2,17 ± 0,10	1,91 ± 0,05	21,30 ± 0,11	21,25 ± 0,08	22,69 ± 0,11	19,30 ± 0,17		
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,79 ± 0,06	1,80 ± 0,06	1,80 ± 0,08	1,60 ± 0,09	0,48 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,51 ± 0,06	0,35 ± 0,03	3,04 ± 0,06	3,07 ± 0,08	3,0 ± 0,066	2,40 ± 0,12		
Ful, mg g ⁻¹	2,91 ± 0,08	2,90 ± 0,02	3,01 ± 0,07	2,91 ± 0,09	1,41 ± 0,05	1,41 ± 0,05	1,40 ± 0,07	1,37 ± 0,04	3,80 ± 0,08	3,80 ± 0,11	3,80 ± 0,13	3,40 ± 0,11		
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,00		
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00		
pH	7,15 ± 0,04	7,10 ± 0,04	7,12 ± 0,04	6,52 ± 0,06	6,40 ± 0,05	6,31 ± 0,06	6,45 ± 0,04	6,12 ± 0,05	6,40 ± 0,07	6,31 ± 0,03	6,50 ± 0,05	6,19 ± 0,06		

Właściwości	Gleba													
	L1 _{BI}		L2 _{BI}		G _{BI}									
	dzień 1.	dzień 52.	dzień 80.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 44.	dzień 1.	dzień 64.	dzień 80.					
Materia organiczna, %	15,70 ± 0,16	15,12 ± 0,13	14,92 ± 0,13	14,67 ± 0,21	2,67 ± 0,07	2,27 ± 0,05	2,14 ± 0,10	2,01 ± 0,13	21,94 ± 0,46	18,94 ± 0,36	18,35 ± 0,58	18,01 ± 0,61		
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,67 ± 0,06	1,27 ± 0,04	1,19 ± 0,05	1,02 ± 0,06	0,47 ± 0,06	0,29 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,07	2,95 ± 0,18	2,55 ± 0,28	2,47 ± 0,25	2,30 ± 0,21		
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,08	2,53 ± 0,08	2,41 ± 0,09	2,37 ± 0,06	1,41 ± 0,06	1,15 ± 0,04	1,10 ± 0,06	1,05 ± 0,08	3,80 ± 0,14	3,62 ± 0,20	3,45 ± 0,30	3,31 ± 0,24		
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,03		
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02		
pH	8,05 ± 0,04	7,75 ± 0,05	7,62 ± 0,04	7,50 ± 0,04	7,12 ± 0,07	6,72 ± 0,06	6,50 ± 0,03	6,45 ± 0,07	7,00 ± 0,08	6,68 ± 0,06	6,49 ± 0,08	6,35 ± 0,10		

Objęcia: L1_F, L2_F, G_F — gleby nieskażone z wprowadzonymi bakteriami; L1_{F+BI}, L2_{F+BI}, G_{F+BI} — gleby skażone z wprowadzonymi bakteriami (BI — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol, średnia ±SD).

nika, że największym spadkiem zawartości kwasów fulwowych odznaczały się gleby kontrolne L1_{B1}, L2_{B1} i G_{B1}. Mniejszą ich zawartość oznaczano także w glebach L1_{F+B1}, L2_{F+B1} i G_{F+B1} skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ gleby. Z kolei zawartość kwasów huminowych i hymatomelanowych we wszystkich glebach była podobna przed i po zakończeniu badań. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH przed i po degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebach L1, L2 i G oraz w glebach kontrolnych przedstawiono w tabeli 5.

4.1.4. Analiza kwasów tłuszczowych szczepu *Pseudomonas vesicularis* w czasie rozkładu fenolu w glebach

Chcąc ocenić, jak zmienia się skład komórkowych kwasów tłuszczowych szczepu *Pseudomonas vesicularis* w czasie degradacji fenolu w glebach L1, L2 i G, izolowano z nich bezpośrednio w kolejnych dniach inkubacji metylowe estry kwasów tłuszczowych (FAMES). Profil kwasów tłuszczowych izolowanych z komórek szczepu *Pseudomonas vesicularis* hodowanego w bulionie odżywczym przed introdukcją do gleb przedstawiono w tabeli 6. Wpływ wzrastających stężeń fenolu 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ gleby na profil kwasów tłuszczowych *Pseudomonas vesicularis* określano, porównując skład kwasów izolowanych z gleb L1, L2 i G skażonych zastosowanymi dawkami fenolu oraz nieskażonych gleb kontrolnych zawierających bakterie. Na potrzeby analizy uzyskanych profili FAMES wyekstrahowane z gleb kwasy tłuszczowe podzielono na dwie grupy. Pierwszą stanowiły kwasy nasycone, a drugą — nienasycone. Ze względu na dużą różnorodność kwasów nasyconych dokonano ich dodatkowego podziału na: prostotańcuchowe, rozgałęzione, hydroksylowe oraz cyklopropanowe.

W pierwszej serii ekstrahowano kwasy tłuszczowe z gleb L1_{F+B1}, L2_{F+B1} i G_{F+B1} skażonych fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ oraz gleb kontrolnych L1_{B1}, L2_{B1} i G_{B1}. Wyniki analiz chromatograficznych wykazały, że zawartość kwasów prostotańcuchowych ekstrahowanych z gleby L1_{F+B1} w kolejnych dniach inkubacji była podobna do ich zawartości w glebie L1_{B1} i zawierała się w przedziale 42,84—49,51% wszystkich wyizolowanych kwasów. Zwiększał się natomiast znacznie udział kwa-

Tabela 6
Profil kwasów tłuszczowych izolowanych z komórek *Pseudomonas vesicularis*, hodowanych w bulionie odżywczym, przed wprowadzeniem do gleb

Kwasy tłuszczowe	Zawartość procentowa
Nasycone	
10:0	1,20
10:0 3OH	2,97
11:0	1,10
11:0 <i>iso</i>	0,79
12:0	6,17
12:0 2OH	1,52
12:0 3OH	4,04
14:0	4,57
15:0	0,87
15:0 <i>iso</i>	3,68
15:0 <i>anteiso</i>	2,74
16:0	28,65
16:0 <i>iso</i>	0,88
17:0	1,25
17:0 <i>cy</i>	5,20
18:0	2,88
Nienasycone	
16:1 ω7c	10,24
18:1 ω7c	11,24
18:1 ω8c	6,12
18:1 ω9c	2,39
18:1 ω7c/ω19t/ω12t	1,30
Nasycone/nienasycone	2,18

sów rozgałęzionych — z 7,64% w 1. dniu do 18,05% w 32. dniu. W dniach 48. i 52. obserwowano spadek udziału tej grupy kwasów odpowiednio do 8,61% i 7,61%, gdy tymczasem w glebie L1_{B1} ich zawartość od dnia 1. do 52. była podobna i wynosiła 42,45—46,42% wszystkich wyizolowanych FAMES. Od 4. dnia w glebie L1_{F+B1} nie wykrywano kwasów hydroksylowych. Na uwagę zasługuje grupa kwasów cyklopropanowych reprezentowana przez dwa kwasy 17:0 *cy* i 19:0 *cy* ω10c. Pierwszy z nich oznaczano wyłącznie w glebie L1_{B1}, z kolei drugi izolowano z gleby L1_{F+B1} od 16. dnia. Zawartość kwasu 19:0 *cy* ω10c zwiększała się z 5,20% w 16. dniu do 8,56% w 32. dniu, a następnie malała i w ostatnim 20. dniu inkubacji wynosiła 2,11% ogólnej zawartości kwasów. Zmiany zawartości procentowej wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych wpłynęły w glebie L1_{F+B1} na wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń. Stosunek ten wzrastał od dnia 4. do 32. z 1,49 do 2,84, a następnie malał i w dniu 52. był podobny do wartości stosunku tych kwasów w glebie L1_{B1}. Zmiany w udziale procentowym wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez *Pseudomonas vesicularis* w glebie L1_{F+B1} oraz w glebie kontrolnej L1_{B1} prezentuje tabela 7.

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcu- chowce	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropano- we	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _{B1}	48,88 ^a	6,22 ^a	6,12 ^{a,d,e}	4,58 ^a	4,58 ^a	0,00 ^a	34,88 ^a	1,89
	L1 _{F+B1}	47,21 ^{a,f,h}	7,64 ^b	5,62 ^a	3,70 ^b	3,70 ^b	0,00 ^a	35,83 ^a	1,79
Dzień 4.	L1 _{B1}	42,45 ^b	7,13 ^{a,d}	4,64 ^b	3,12 ^c	3,12 ^c	0,00 ^a	42,66 ^{b,h}	1,34
	L1 _{F+B1}	48,25 ^a	11,35 ^c	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^a	40,04 ^c	1,49
Dzień 8.	L1 _{B1}	43,88 ^{b,e}	7,22 ^d	5,21 ^{b,e}	3,24 ^c	3,24 ^c	0,00 ^a	40,45 ^d	1,47
	L1 _{F+B1}	49,51 ^c	14,04 ^e	0,00 ^c	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^a	36,75 ^a	1,72
Dzień 16.	L1 _{B1}	45,62 ^d	7,25 ^d	6,01 ^{a,d}	1,66 ^e	1,66 ^e	0,00 ^a	39,46 ^d	1,53
	L1 _{F+B1}	48,23 ^a	17,29 ^f	0,00 ^c	5,20 ^f	0,00 ^d	5,20 ^b	29,28 ^e	2,42
Dzień 32.	L1 _{B1}	44,53 ^e	6,47 ^a	6,86 ^d	1,41 ^e	1,41 ^e	0,00 ^a	40,73 ^{b,d}	1,46
	L1 _{F+B1}	47,37 ^f	18,05 ^g	0,00 ^c	8,56 ^g	0,00 ^d	8,56 ^c	26,02 ^f	2,84
Dzień 48.	L1 _{B1}	44,75 ^e	7,28 ^d	5,37 ^e	1,47 ^e	1,47 ^e	0,00 ^a	41,13 ^b	1,43
	L1 _{F+B1}	42,84 ^g	8,61 ^h	0,00 ^c	4,42 ^h	0,00 ^d	4,42 ^d	44,13 ^g	1,27
Dzień 52.	L1 _{B1}	43,16 ^b	6,94 ^d	6,01 ^f	1,62 ^e	1,62 ^e	0,00 ^a	42,27 ^h	1,37
	L1 _{F+B1}	45,57 ^h	7,61 ⁱ	0,00 ^c	2,11 ⁱ	0,00 ^d	2,11 ^e	44,71 ^g	1,33

O b j a ś n i e n i a: L1_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L1_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₁ — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

W glebie L2_{F+B1} skażonej fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ od dnia 1. do 32. zwiększał się zarówno udział kwasów prostołańcuchowych, jak i rozgałęzionych, odpowiednio z 48,48% do 53,84% i z 6,95% do 15,97%. Dla porównania w glebie L2_B zawartość tych kwasów w tym czasie zawierała się w przedziale 45,42—49,54% i 8,00—10,94%. Kwasów hydroksylowych z gleby L2_{F+B1} nie izolowano od dnia 4., a w glebie L2_{B1} występowały we wszystkich dniach prowadzenia oznaczeń. Ich zawartość w glebie L2_{B1}, poza 1. dniem (4,11%), utrzymywała się na podobnym poziomie i wynosiła 2,06—2,65% wszystkich wyizolowanych FAMES. Kwas cyklopropanowy 17:0 cy był obecny w profilu FAMES, ekstrahowanych zarówno z gleby L2_{B1}, jak i z gleby L2_{F+B1}. Jego udział w glebie L2_{B1} od dnia 4. do 80. był znacznie mniejszy niż w 1. dniu (4,50%) i zawierał się w przedziale 1,01—1,86%, natomiast w glebie L2_{F+B1} wynosił w tym czasie 0,30—5,16%. Od dnia 32. w glebie L2_{F+B1} pojawiał się drugi z kwasów cyklopropanowych — 19:0 cy ω10c. Był to nowy rodzaj kwasu, występujący wyłącznie w glebie L2_{F+B1}. Jego udział w 32. dniu wynosił 5,99% i zwiększył się do 64. dnia do 14,27%. W glebie L2_{F+B1} w czasie degradacji fenolu przez *Pseudomonas vesicularis* obserwowano wzrost wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych z 1,76 w 1. dniu do 3,28 w 48. dniu. Dla porównania w glebie L2_{B1} stosunek ten w kolejnych dniach izolacji kwasów był niższy i zawierał się w przedziale

1,52—1,78. Zmiany w udziale procentowym wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w glebach L2_{F+B1} i L2_{B1} oraz wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych przedstawia tabela 8.

W glebie G_{F+B1} pod wpływem fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ największe zmiany w porównaniu z glebą G_{B1} obserwowano w udziale procentowym kwasów rozgałęzionych. Ich zawartość zwiększała się z 9,21% w 1. dniu do 22,47% w 16. dniu, a w kolejnych dniach systematycznie się zmniejszała i w 44. dniu była podobna do ich zawartości w glebie G_{B1}. Kwasy hydroksylowe w glebie G_{F+B1} oznaczano do 8. dnia, a w następnych dniach pomiarów nie stwierdzano już ich obecności wśród izolowanych FAMES. Kwas cyklopropanowy 17:0 cy ekstrahowano zarówno z gleby G_{B1}, jak i z gleby G_{F+B1} we wszystkich dniach prowadzenia oznaczeń. Drugi z kwasów cyklopropanowych — 19:0 cy ω10c, pojawiał się w profilu FAMES w 8. dniu z udziałem 7,54%. Do 16. dnia jego udział zwiększał się do 10,28%, a następnie malał i w 44. dniu wynosił 3,20%. Udział kwasów prostołańcuchowych w czasie degradacji fenolu w glebie G_{F+B1} zmieniał się nieznacznie w porównaniu z kontrolą i zawierał się w przedziale 49,16—54,10%. Stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych w glebie G_{F+B1} był najwyższy w 16. dniu (7,22), a najniższy w 44. dniu (1,97). W glebie G_{B1} w kolejnych dniach oznaczeń mieścił się w zakresie 1,95—2,26. Prezentowane wyniki ilustruje tabela 9.

Tabela 8

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	L2 _{B1}	46,42 ^{a,b,e}	8,00 ^a	4,11 ^a	4,50 ^a	4,50 ^a	0,00 ^a	36,29 ^a	1,74
	L2 _{F+B1}	48,48 ^a	6,95 ^b	4,15 ^a	4,16 ^a	4,16 ^a	0,00 ^a	36,26 ^a	1,76
Dzień 4.	L2 _{B1}	49,54 ^b	10,94 ^c	2,11 ^b	1,41 ^b	1,41 ^b	0,00 ^a	36,00 ^a	1,78
	L2 _{F+B1}	50,61 ^{c,g}	13,51 ^d	0,00 ^c	5,16 ^c	5,16 ^c	0,00 ^a	30,72 ^b	2,26
Dzień 8.	L2 _{B1}	47,88 ^a	10,50 ^{c,h}	2,06 ^b	1,01 ^b	1,01 ^b	0,00 ^a	38,56 ^c	1,59
	L2 _{F+B1}	51,56 ^{c,d}	13,79 ^{d,e}	0,00 ^c	4,14 ^a	4,14 ^a	0,00 ^a	30,51 ^b	2,28
Dzień 16.	L2 _{B1}	47,42 ^a	10,28 ^{c,h}	2,58 ^d	1,74 ^{d,i}	1,74 ^{d,i}	0,00 ^a	37,98 ^c	1,63
	L2 _{F+B1}	52,72 ^{d,f}	14,38 ^e	0,00 ^c	2,98 ^e	2,98 ^e	0,00 ^a	29,92 ^b	2,34
Dzień 32.	L2 _{B1}	45,42 ^e	10,94 ^{c,h}	2,47 ^d	1,51 ^d	1,51 ^d	0,00 ^a	39,66 ^d	1,52
	L2 _{F+B1}	53,84 ^f	15,97 ^f	0,00 ^c	6,79 ^f	0,80 ^f	5,99 ^b	23,40 ^e	3,27
Dzień 48.	L2 _{B1}	47,26 ^a	9,17 ^g	2,16 ^b	1,72 ^{d,i}	1,72 ^{d,i}	0,00 ^a	39,69 ^d	1,52
	L2 _{F+B1}	52,92 ^{d,f}	14,16 ^d	0,00 ^c	9,56 ^g	0,34 ^f	9,22 ^c	23,36 ^e	3,28
Dzień 64.	L2 _{B1}	46,04 ^e	10,21 ^h	2,65 ^d	1,47 ^d	1,47 ^d	0,00 ^a	39,63 ^d	1,52
	L2 _{F+B1}	50,18 ^g	8,62 ⁱ	0,00 ^c	14,57 ^h	0,30 ^f	14,27 ^d	26,63 ^f	2,76
Dzień 80.	L2 _{B1}	47,40 ^a	10,60 ^{c,h}	2,38 ^{b,d}	1,86 ⁱ	1,86 ⁱ	0,00 ^a	37,76 ^c	1,65
	L2 _{F+B1}	47,90 ^a	7,82 ^j	0,00 ^c	7,13 ^f	0,66 ^f	6,47 ^e	37,15 ^c	1,69

Objaśnienia: L2_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L2_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B1 — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

Tabela 9

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	G _{B1}	49,18 ^a	7,13 ^a	7,16 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	0,00 ^a	33,41 ^a	1,99
	G _{F+B1}	49,93 ^{a,e}	9,21 ^b	5,13 ^b	2,94 ^a	2,94 ^a	0,00 ^a	32,79 ^a	2,05
Dzień 4.	G _{B1}	47,19 ^b	12,81 ^c	6,24 ^c	3,06 ^a	3,06 ^{a,c}	0,00 ^a	30,70 ^b	2,26
	G _{F+B1}	50,22 ^a	15,63 ^d	3,66 ^d	2,01 ^b	2,01 ^b	0,00 ^a	28,48 ^c	2,51
Dzień 8.	G _{B1}	49,15 ^a	12,97 ^c	4,16 ^e	2,66 ^c	2,66 ^c	0,00 ^a	31,06 ^b	2,22
	G _{F+B1}	54,10 ^c	19,05 ^e	1,00 ^f	8,71 ^d	1,17 ^d	7,54 ^b	17,14 ^d	4,83
Dzień 16.	G _{B1}	50,57 ^{a,d}	12,12 ^{c,h}	2,07 ^g	1,94 ^e	1,94 ^e	0,00 ^a	33,30 ^a	2,00
	G _{F+B1}	53,98 ^c	22,47 ^f	0,00 ^h	11,38 ^f	1,10 ^d	10,28 ^c	12,17 ^e	7,22
Dzień 32.	G _{B1}	49,79 ^{a,d}	12,99 ^c	2,54 ^{g,i}	1,51 ^g	1,51 ^f	0,00 ^a	33,17 ^a	2,01
	G _{F+B1}	53,04 ^c	18,29 ^g	0,00 ^h	6,19 ^h	0,90 ^g	5,29 ^d	22,48 ^f	3,45
Dzień 44.	G _{B1}	50,24 ^d	11,86 ^h	2,61 ⁱ	1,39 ^g	1,39 ^f	0,00 ^a	33,90 ^a	1,95
	G _{F+B1}	49,16 ^e	12,51 ⁱ	0,00 ^h	4,66 ⁱ	1,46 ^f	3,20 ^e	33,67 ^a	1,97

Objaśnienia: G_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; G_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B1 — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

W drugiej serii badań analizowano wpływ fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ gleby na profil kwasów tłuszczowych szczepu *Pseudomonas vesicularis* introdukowanego do sterylnych gleb L1, L2 i G. Skażenie gleby L1_{F+B1} tą dawką fenolu wywołało w komórkach bakterii wzrost zawartości procento-

wej kwasów prostoańcuchowych w dniach od 1. do 16. z 47,56% do 58,75%. Do 48. dnia zwiększał się także udział kwasów rozgałęzionych z 8,86% w 1. dniu do 22,97% w 48. dniu. W kolejnych dniach zawartość tych kwasów systematycznie malała. W glebie L1_{F+B1} od dnia 4. do 80. nie

oznaczano kwasów hydroksylowych, gdy tymczasem w glebie L1_{B1} były one obecne i charakteryzowały się udziałem procentowym wynoszącym 4,64—7,06%. Kwas cyklopropanowy 17:0 cy występował wśród izolowanych FAMES zarówno z gleby L1_{F+B1}, jak i z gleby L1_{B1} do dnia 8., natomiast w kolejnych dniach wykrywano go jedynie w glebie L1_{B1}. Kwas 19:0 cy ω10c był obecny w profilu kwasów tłuszczowych izolowanych wyłącznie z gleby L1_{F+B1} od dnia 32. do 80. Jego udział był najwyższy w dniu 48. (9,87%), a najniższy w dniu 80. (2,77%). Podobnie najwyższy był w 48. dniu stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych (6,13), a najniższy w 80. dniu (1,80). W glebie L1_{B1} stosunek ten w czasie prowadzenia eksperymentu zawierał się w przedziale 1,34—1,89. Zmiany w udziale procentowym wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez *Pseudomonas vesicularis* w glebie L1_{F+B1} oraz w glebie kontrolnej L1_{B1} przedstawia tabela 10.

sów z tych grup zwiększała się od dnia 1. do 32., odpowiednio z 49,37% do 56,59% i z 8,59% do 21,84%. W glebie kontrolnej L2_{B1} w tym czasie wynosiła 45,42—49,54% i 8,00—10,94%, odpowiednio w przypadku kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych. Od dnia 48. do 112. udział kwasów prostołańcuchowych w glebie L2_{F+B1} systematycznie malał, kwasów rozgałęzionych utrzymywał się na podobnym poziomie do dnia 80., a w kolejnych dniach zmniejszał się i w 112. dniu wynosił 11,22% ogólnej zawartości wyizolowanych FAMES. Od dnia 16. z gleby L2_{F+B1} nie izolowano hydroksykwasów. Zawartość kwasu 17:0 cy w tej glebie zmniejszała się z 4,10% w 1. dniu do 0,26% w 48. dniu, w którym izolowano z niej po raz pierwszy kwas o budowie cyklicznej 19:0 cy ω10c (10,33%). Najwyższym udziałem odznaczał się on w dniu 80. (17,98%), co wpłynęło na wzrost wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych (6,94). Zmiany w udziale procentowym wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w glebie

Tabela 10

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _{B1}	48,88 ^a	6,22 ^a	6,12 ^a	4,58 ^a	4,58 ^a	0,00 ^a	34,88 ^a	1,89
	L1 _{F+B1}	47,56 ^b	8,86 ^b	4,16 ^b	4,41 ^a	4,41 ^a	0,00 ^a	35,01 ^a	1,86
Dzień 4.	L1 _{B1}	42,45 ^c	7,13 ^c	4,64 ^c	3,12 ^b	3,12 ^b	0,00 ^a	42,66 ^b	1,34
	L1 _{F+B1}	54,76 ^d	12,06 ^d	0,00 ^d	1,94 ^c	1,94 ^c	0,00 ^a	31,24 ^c	2,20
Dzień 8.	L1 _{B1}	43,88 ^e	7,22 ^c	5,21 ^c	3,24 ^b	3,24 ^b	0,00 ^a	40,45 ^d	1,47
	L1 _{F+B1}	57,08 ^f	14,21 ^e	0,00 ^d	0,84 ^d	0,84 ^d	0,00 ^a	27,87 ^e	2,47
Dzień 16.	L1 _{B1}	43,88 ^{e,i}	7,22 ^c	5,21 ^a	3,24 ^c	3,24 ^e	0,00 ^a	40,45 ^f	1,47
	L1 _{F+B1}	58,75 ^g	19,00 ^f	0,00 ^d	0,00 ^f	0,00 ^f	0,00 ^a	22,25 ^g	3,49
Dzień 32.	L1 _{B1}	44,53 ^e	6,47 ^a	6,86 ^e	1,41 ^g	1,41 ^g	0,00 ^a	40,73 ^d	1,46
	L1 _{F+B1}	54,72 ^d	20,03 ^g	0,00 ^d	7,21 ^h	0,00 ^f	7,21 ^b	18,04 ^h	4,54
Dzień 48.	L1 _{B1}	44,75 ^e	7,28 ^c	5,37 ^c	1,47 ^g	1,47 ^g	0,00 ^a	41,13 ^d	1,43
	L1 _{F+B1}	53,06 ^h	22,97 ^h	0,00 ^d	9,87 ⁱ	0,00 ^f	9,87 ^c	14,01 ⁱ	6,13
Dzień 64.	L1 _{B1}	45,66 ⁱ	7,41 ^c	6,86 ^e	1,57 ^g	1,57 ^g	0,00 ^a	38,50 ^j	1,60
	L1 _{F+B1}	51,65 ^j	18,24 ⁱ	0,00 ^d	5,01 ^j	0,00 ^f	5,01 ^d	25,01 ^k	2,99
Dzień 80.	L1 _{B1}	43,15 ^c	7,28 ^c	7,06 ^e	1,94 ^k	1,94 ^h	0,00 ^a	40,57 ^{b,d}	1,46
	L1 _{F+B1}	48,85 ^b	12,71 ^j	0,00 ^d	2,77 ^l	0,00 ^f	2,77 ^e	35,67 ^l	1,80

Objaśnienia: L1_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L1_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B1 — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

Fenol w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ gleby powodował też istotne zmiany w składzie komórkowych kwasów tłuszczowych u szczepu *Pseudomonas vesicularis* w glebie L2_{F+B1}. Polegały one, podobnie jak w glebie L1_{F+B1}, na wzroście udziału procentowego kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych w początkowych dniach inkubacji. Zawartość kwa-

L2_{F+B1} i w glebie L2_{B1} oraz wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w tych glebach przedstawia tabela 11.

Z analiz chromatograficznych wynika, że fenol w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ gleby wpływał także na udział wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w komórkach *Pseudomonas vesicularis* w glebie

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L2 _{B1}	46,42 ^{a,c}	8,00 ^a	4,11 ^a	4,50 ^a	4,50 ^a	0,00 ^a	36,29 ^a	1,74
	L2 _{F+B1}	49,37 ^a	8,59 ^b	3,84 ^b	4,10 ^b	4,10 ^b	0,00 ^a	34,10 ^b	1,92
Dzień 4.	L2 _{B1}	49,54 ^a	10,94 ^c	2,11 ^c	1,41 ^c	1,41 ^c	0,00 ^a	36,00 ^a	1,78
	L2 _{F+B1}	51,57 ^b	15,94 ^d	2,45 ^d	3,68 ^d	3,68 ^d	0,00 ^a	26,36 ^c	2,78
Dzień 8.	L2 _{B1}	47,88 ^{a,c}	10,50 ^e	2,06 ^c	1,01 ^e	1,01 ^e	0,00 ^a	38,56 ^d	1,59
	L2 _{F+B1}	52,83 ^b	17,60 ^f	1,62 ^e	2,07 ^f	2,07 ^f	0,00 ^a	25,88 ^c	2,86
Dzień 16.	L2 _{B1}	47,42 ^{a,c}	10,28 ^e	2,58 ^f	1,74 ^g	1,74 ^g	0,00 ^a	37,98 ^d	1,63
	L2 _{F+B1}	56,55 ^d	19,45 ^g	0,00 ^g	0,88 ^h	0,88 ^h	0,00 ^a	23,12 ^e	3,33
Dzień 32.	L2 _{B1}	45,42 ^e	10,94 ^e	2,47 ^f	1,51 ^g	1,51 ^g	0,00 ^a	39,66 ^f	1,52
	L2 _{F+B1}	56,59 ^d	21,84 ^h	0,00 ^g	0,40 ⁱ	0,40 ⁱ	0,00 ^a	21,17 ^g	3,72
Dzień 48.	L2 _{B1}	47,26 ^c	9,17 ⁱ	2,16 ^c	1,72 ^g	1,72 ^g	0,00 ^a	39,69 ^f	1,52
	L2 _{F+B1}	56,01 ^d	15,19 ^j	0,00 ^g	10,59 ^j	0,26 ⁱ	10,33 ^b	18,21 ^h	4,49
Dzień 64.	L2 _{B1}	46,04 ^f	10,21 ^e	2,65 ^f	1,47 ^g	1,47 ^g	0,00 ^a	39,63 ^f	1,52
	L2 _{F+B1}	55,57 ^{d,g}	15,36 ^{d,j}	0,00 ^g	15,47 ^k	0,20 ⁱ	15,27 ^c	13,60 ⁱ	6,35
Dzień 80.	L2 _{B1}	47,40 ^c	10,60 ^e	2,38 ^f	1,86 ^g	1,86 ^g	0,00 ^a	37,76 ^d	1,65
	L2 _{F+B1}	53,61 ^g	15,58 ^{d,j}	0,00 ^g	18,22 ^l	0,24 ⁱ	17,98 ^d	12,59 ^j	6,94
Dzień 96.	L2 _{B1}	47,76 ^c	10,94 ^e	2,30 ^f	1,91 ^g	1,91 ^g	0,00 ^a	37,09 ^d	1,70
	L2 _{F+B1}	50,11 ^{b,i}	13,06 ^k	0,00 ^g	12,79 ^m	0,28 ⁱ	12,51 ^e	24,04 ^k	3,16
Dzień 112.	L2 _{B1}	46,96 ^h	10,78 ^e	2,04 ^c	1,86 ^g	1,86 ^g	0,00 ^a	38,36 ^l	1,61
	L2 _{F+B1}	49,46 ⁱ	11,22 ^e	0,00 ^g	8,70 ⁿ	0,26 ⁱ	8,44 ^f	30,59 ^m	2,27

Objaśnienia: L2_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L2_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₁ — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

G_{F+B1}. Zawartość w komórkach bakterii kwasów prostołańcuchowych wzrosła o 5% od dnia 1. do 8., a od dnia 1. do 32. o 16,70% wzrosła w nich zawartość kwasów rozgałęzionych. W obecności fenolu bakterie nie syntetyzowały hydroksykwasów od dnia 16., w którym wśród izolowanych FAMES pojawił się kwas 19:0 cy ω10c (11,33%). Jego zawartość w kolejnych dniach malała i w 64. dniu wynosiła 2,77%. Drugi z kwasów cyklopropanowych 17:0 cy występował u bakterii zarówno w glebie G_{B1}, jak i G_{F+B1} przez cały czas trwania eksperymentu. W glebie G_{B1} jego udział kształtował się w przedziale 1,42—3,12%, a w glebie G_{F+B1} — w przedziale 1,00—3,33%. Zmiany w udziale procentowym wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w glebach G_{F+B1} i G_{B1} przedstawia tabela 12.

W trzeciej serii izolowano kwasy tłuszczowe z gleb L1, L2 i G skażonych najwyższym stężeniem fenolu 5,0 mg g⁻¹ i zawierających szczep *Pseudomonas vesicularis* oraz z gleb kontrolnych. W glebie L1_{F+B1} najwyższą zawartość kwasów prostołańcuchowych — 59,42%, i rozgałęzionych — 21,16%, oznaczano w 32. dniu inkubacji. W kolejnych dniach ich udział systematycznie się zmniejszał

i w ostatnim 112. dniu wynosił odpowiednio 54,13% i 14,20%. Od dnia 4. z gleby tej nie izolowano hydroksykwasów, a od dnia 16. do 112. — kwasu z pierścieniem cyklopropanowym 17:0 cy. Drugi z kwasów o budowie cyklicznej — 19:0 cy ω10c, pojawiał się wśród izolowanych z gleby L1_{F+B1} FAMES w dniu 48. z udziałem 9,26%. Do dnia 80. jego zawartość zwiększała się do 17,47%, a w kolejnych malała i w ostatnim dniu inkubacji wynosiła 6,33%. W glebie L1_{B1} zmiany udziału poszczególnych grup kwasów były niewielkie. Zawartość procentowa kwasów prostołańcuchowych w ciągu 112 dni kształtowała się w zakresie 40,89—48,88%, kwasów rozgałęzionych w zakresie 6,22—8,03%, a hydroksylowych — w granicach 4,64—7,06%. Z kolei udział kwasu 17:0 cy w profilu FAMES w dniach od 1. do 16. wynosił 3,12—4,58%, a w kolejnych malał i zawierał się w przedziale 1,41—1,94%. Wyniki tych obserwacji zawiera tabela 13.

W glebie L2_{F+B1} najwyższą zawartość kwasów prostołańcuchowych, wynoszącą 56,76%, oznaczano w dniu 48., a kwasów rozgałęzionych — 24,89% — w dniu 32. Od dnia 48. nie ekstrahowa-

Tabela 12

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostotańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	G _{B1}	49,18 ^a	7,13 ^a	7,16 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	0,00 ^a	33,41 ^a	1,99
	G _{F+B1}	47,98 ^a	9,12 ^b	5,07 ^b	3,33 ^a	3,33 ^a	0,00 ^a	34,50 ^b	1,90
Dzień 4.	G _{B1}	47,19 ^b	12,81 ^c	6,24 ^c	3,06 ^a	3,06 ^a	0,00 ^a	30,70 ^c	2,26
	G _{F+B1}	49,95 ^a	16,52 ^d	2,30 ^d	2,05 ^b	2,05 ^b	0,00 ^a	29,18 ^d	2,43
Dzień 8.	G _{B1}	49,15 ^a	12,97 ^c	4,16 ^e	2,66 ^c	2,66 ^c	0,00 ^a	31,06 ^c	2,22
	G _{F+B1}	52,95 ^c	22,46 ^e	1,77 ^f	1,44 ^d	1,44 ^d	0,00 ^a	21,38 ^e	3,68
Dzień 16.	G _{B1}	50,57 ^d	12,12 ^f	2,07 ^g	1,94 ^e	1,94 ^e	0,00 ^a	33,30 ^a	2,00
	G _{F+B1}	52,05 ^c	25,38 ^g	0,00 ^h	12,45 ^f	1,12 ^f	11,33 ^b	10,12 ^f	8,88
Dzień 32.	G _{B1}	49,79 ^a	12,99 ^c	2,54 ⁱ	1,51 ^g	1,51 ^g	0,00 ^a	33,17 ^a	2,01
	G _{F+B1}	49,50 ^a	25,83 ^h	0,00 ^h	8,92 ^h	1,00 ^f	7,92 ^c	15,75 ^g	5,35
Dzień 48.	G _{B1}	50,16 ^{a,d}	12,07 ^f	2,58 ⁱ	1,42 ^{d,g}	1,42 ^g	0,00 ^a	33,77 ^a	1,96
	G _{F+B1}	49,17 ^a	20,47 ⁱ	0,00 ^h	6,93 ⁱ	1,16 ^f	5,77 ^d	23,43 ^h	3,27
Dzień 64.	G _{B1}	51,97 ^{a,c,d}	10,91 ^j	2,40 ⁱ	1,47 ^g	1,47 ^g	0,00 ^a	33,25 ^a	2,01
	G _{F+B1}	49,20 ^{a,d}	17,26 ^k	0,00 ^h	4,03 ^j	1,26 ^f	2,77 ^e	29,51 ^d	2,39

Objaśnienia: G_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; G_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₁ — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

Tabela 13

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie L1

Gleba L1		Grupa kwasów tłuszczowych						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostotańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _{B1}	48,88 ^a	6,22 ^a	6,12 ^a	4,58 ^a	4,58 ^a	0,00 ^a	34,88 ^a	1,89
	L1 _{F+B1}	48,15 ^a	10,80 ^b	3,97 ^b	4,47 ^a	4,47 ^a	0,00 ^a	32,61 ^b	2,07
Dzień 4.	L1 _{B1}	42,45 ^b	7,13 ^c	4,64 ^c	3,12 ^b	3,12 ^b	0,00 ^a	42,66 ^c	1,34
	L1 _{F+B1}	52,95 ^c	12,93 ^d	0,00 ^d	2,98 ^b	2,98 ^b	0,00 ^a	31,14 ^d	2,21
Dzień 8.	L1 _{B1}	43,88 ^d	7,22 ^c	5,21 ^e	3,24 ^b	3,24 ^b	0,00 ^a	40,45 ^e	1,47
	L1 _{F+B1}	57,50 ^{e,g}	16,85 ^e	0,00 ^d	1,72 ^c	1,72 ^c	0,00 ^a	23,93 ^f	3,18
Dzień 16.	L1 _{B1}	43,88 ^f	7,22 ^c	5,21 ^a	3,24 ^d	3,24 ^d	0,00 ^a	40,45 ^g	1,47
	L1 _{F+B1}	58,40 ^{e,g}	19,97 ^f	0,00 ^d	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^a	21,63 ^h	3,62
Dzień 32.	L1 _{B1}	44,53 ^d	6,47 ^a	6,86 ^f	1,41 ^f	1,41 ^f	0,00 ^a	40,73 ^e	1,46
	L1 _{F+B1}	59,42 ^e	21,16 ^g	0,00 ^d	0,00 ^e	0,00 ^e	0,00 ^a	19,42 ⁱ	4,15
Dzień 48.	L1 _{B1}	44,75 ^d	7,28 ^c	5,37 ^e	1,47 ^f	1,47 ^f	0,00 ^a	41,13 ^e	1,43
	L1 _{F+B1}	57,19 ^g	20,86 ^g	0,00 ^d	9,26 ^g	0,00 ^e	9,26 ^b	12,69 ^j	6,88
Dzień 64.	L1 _{B1}	45,66 ^f	7,41 ^c	6,86 ^f	1,57 ^d	1,57 ^d	0,00 ^a	38,50 ^g	1,60
	L1 _{F+B1}	55,14 ^h	19,27 ^h	0,00 ^d	15,62 ^h	0,00 ^e	15,62 ^c	9,97 ^k	9,03
Dzień 80.	L1 _{B1}	43,15 ⁱ	7,28 ^c	7,06 ^f	1,94 ^d	1,94 ^d	0,00 ^a	40,57 ^e	1,46
	L1 _{F+B1}	55,27 ^h	19,01 ⁱ	0,00 ^d	17,47 ⁱ	0,00 ^e	17,47 ^d	8,25 ^l	11,12
Dzień 96.	L1 _{B1}	41,16 ^b	8,03 ^c	6,43 ^g	1,51 ^f	1,51 ^f	0,00 ^a	42,87 ^c	1,33
	L1 _{F+B1}	57,65 ^g	18,59 ⁱ	0,00 ^d	10,77 ^j	0,00 ^e	10,77 ^e	12,99 ^j	6,70
Dzień 112.	L1 _{B1}	40,89 ^b	7,53 ^c	6,12 ^a	1,74 ^d	1,74 ^d	0,00 ^a	43,72 ^c	1,29
	L1 _{F+B1}	54,13 ^j	14,27 ^j	0,00 ^d	6,33 ^k	0,00 ^e	6,33 ^f	25,27 ^m	2,96

Objaśnienia: L1_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L1_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₁ — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

no z niej kwasów hydroksylowych. Znacznemu spadkowi udziału kwasów rozgałęzionych w dniu 48. towarzyszyło pojawienie się wśród izolowanych FAMES kwasu 19:0 cy ω10c o zawartości 14,28%. Najwyższym udziałem charakteryzował się on w 64. dniu (21,06%), co znalazło odzwierciedlenie w najwyższej w tym dniu wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych (9,36). W następnych dniach jego udział systematycznie malał i w 144. dniu wynosił 5,12% ogólnej zawartości wszystkich kwasów. Kwas cyklopropanowy 17:0 cy najwyższym udziałem, wynoszącym 4,22%, charakteryzował się w glebie L1_{F+B1} w 1. dniu. Do 8. dnia jego zawartość malała (1,24%), a w dniach od 16. do 144. nie przekraczała 1%. Dla porównania w glebie L2_{B1} udział tego kwasu też był najwyższy w 1. dniu (4,50%), a od następnego dnia pomiarów zmniejszał się i do dnia 144. zawierał się w przedziale 1,01—1,91%. Zmiany w udziale procentowym wyróżnionych grup kwa-

sów tłuszczowych w glebach L2_{F+B1} i L2_{B1} oraz wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych przedstawia tabela 14.

W glebie G_{F+B1} skażonej fenolem w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ do dnia 16. zwiększał się zarówno udział kwasów prostołańcuchowych, jak i rozgałęzionych, odpowiednio o 4,30% i 14,60%. W kolejnych dniach oznaczeń, podobnie jak w glebach L1_{F+B1} i L2_{F+B1}, ich udział się zmniejszał. W dniu 16. z gleby G_{F+B1} ekstrahowano także kwas 19:0 cy ω10c o wysokim udziale procentowym, wynoszącym 12,28%. W tym dniu najwyższy był też stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych (10,20). Do dnia 32. zawartość kwasu 19:0 cy ω10c zwiększała się do 17,16%, w kolejnych dniach malała i w ostatnim 80. dniu wynosiła 7,06%. Wysokiej zawartości kwasu 19:0 cy ω10c towarzyszył niewielki udział kwasu 17:0 cy, wynoszący 0,37—0,74%. Dla porównania zawartość kwasu 17:0 cy w glebie G_{B1} była znacznie wyższa i mie-

Tabela 14

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L2 _{B1}	46,42 ^a	8,00 ^a	4,11 ^a	4,50 ^a	4,50 ^a	0,00 ^a	36,29 ^a	1,74
	L2 _{F+B1}	48,39 ^a	8,84 ^b	3,91 ^a	4,22 ^a	4,22 ^a	0,00 ^a	34,64 ^b	1,89
Dzień 4.	L2 _{B1}	49,54 ^b	10,94 ^c	2,11 ^b	1,41 ^b	1,41 ^b	0,00 ^a	36,00 ^a	1,78
	L2 _{F+B1}	52,37 ^c	15,10 ^d	1,16 ^c	3,50 ^c	3,50 ^c	0,00 ^a	27,87 ^c	2,59
Dzień 8.	L2 _{B1}	47,88 ^a	10,50 ^c	2,06 ^b	1,01 ^d	1,01 ^d	0,00 ^a	38,56 ^d	1,59
	L2 _{F+B1}	53,91 ^d	21,39 ^e	0,78 ^d	1,24 ^d	1,24 ^d	0,00 ^a	22,68 ^e	3,41
Dzień 16.	L2 _{B1}	47,42 ^a	10,28 ^c	2,58 ^e	1,74 ^e	1,74 ^e	0,00 ^a	37,98 ^d	1,63
	L2 _{F+B1}	55,68 ^e	3,20 ^f	0,49 ^f	0,63 ^f	0,63 ^f	0,00 ^a	20,00 ^f	4,00
Dzień 32.	L2 _{B1}	45,42 ^f	10,94 ^c	2,47 ^e	1,51 ^g	1,51 ^g	0,00 ^a	39,66 ^g	1,52
	L2 _{F+B1}	56,74 ^e	24,89 ^g	0,16 ^g	0,70 ^f	0,70 ^f	0,00 ^a	17,51 ^h	4,71
Dzień 48.	L2 _{B1}	47,26 ^a	9,17 ^h	2,16 ^b	1,72 ^e	1,72 ^e	0,00 ^a	39,69 ^g	1,52
	L2 _{F+B1}	56,76 ^e	14,14 ⁱ	0,00 ^h	14,93 ^h	0,65 ^f	14,28 ^b	14,17 ⁱ	6,06
Dzień 64.	L2 _{B1}	46,04 ^a	10,21 ^c	2,65 ^e	1,47 ^g	1,47 ^g	0,00 ^a	39,63 ^g	1,52
	L2 _{F+B1}	55,83 ^e	12,72 ^j	0,00 ^h	21,80 ⁱ	0,74 ^f	21,06 ^c	9,65 ^j	9,36
Dzień 80.	L2 _{B1}	47,40 ^a	10,60 ^c	2,38 ^e	1,86 ^e	1,86 ^e	0,00 ^a	37,76 ^d	1,65
	L2 _{F+B1}	53,33 ^d	12,68 ^j	0,00 ^h	18,77 ^j	0,63 ^f	18,14 ^d	15,22 ^k	5,57
Dzień 96.	L2 _{B1}	47,76 ^a	10,94 ^c	2,30 ^e	1,91 ^e	1,91 ^e	0,00 ^a	37,09 ^d	1,70
	L2 _{F+B1}	51,54 ^c	9,08 ^k	0,00 ^h	13,90 ^k	0,69 ^f	13,21 ^e	25,48 ^l	2,92
Dzień 112.	L2 _{B1}	46,96 ^a	10,78 ^c	2,04 ^b	1,86 ^e	1,86 ^e	0,00 ^a	38,36 ^d	1,61
	L2 _{F+B1}	50,58 ^g	9,22 ^k	0,00 ^h	9,86 ^l	0,72 ^f	9,14 ^f	30,34 ^m	2,30
Dzień 128.	L2 _{B1}	45,50 ^f	10,99 ^c	2,27 ^e	1,77 ^e	1,77 ^e	0,00 ^a	39,47 ^g	1,53
	L2 _{F+B1}	51,16 ^g	7,65 ^l	0,00 ^h	7,85 ^m	0,79 ^f	7,06 ^g	33,34 ^b	2,00
Dzień 144.	L2 _{B1}	44,90 ^f	11,12 ^c	2,35 ^e	1,50 ^g	1,50 ^g	0,00 ^a	40,13 ^g	1,49
	L2 _{F+B1}	51,20 ^g	7,47 ^l	0,00 ^h	5,96 ⁿ	0,84 ^f	5,12 ^h	35,37 ⁿ	1,83

Objaśnienia: L2_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L2_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B1 — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas vesicularis* w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostotańcu- chowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropa- nowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	G _{B1}	49,18 ^a	7,13 ^a	7,16 ^a	3,12 ^a	3,12 ^a	0,00 ^a	33,41 ^a	1,99
	G _{F+B1}	49,58 ^a	9,40 ^b	5,12 ^b	3,10 ^a	3,10 ^a	0,00 ^a	32,80 ^a	2,05
Dzień 4.	G _{B1}	47,19 ^b	12,81 ^c	6,24 ^c	3,06 ^a	3,06 ^a	0,00 ^a	30,70 ^b	2,26
	G _{F+B1}	53,74 ^c	20,41 ^d	2,01 ^d	1,63 ^b	1,63 ^b	0,00 ^a	22,21 ^c	3,50
Dzień 8.	G _{B1}	49,15 ^a	12,97 ^c	4,16 ^e	2,66 ^a	2,66 ^a	0,00 ^a	31,06 ^b	2,22
	G _{F+B1}	55,36 ^d	26,76 ^e	1,70 ^f	0,66 ^c	0,66 ^c	0,00 ^a	15,52 ^d	5,44
Dzień 16.	G _{B1}	50,57 ^e	12,12 ^c	2,07 ^g	1,94 ^d	1,94 ^d	0,00 ^a	33,30 ^a	2,00
	G _{F+B1}	53,89 ^c	24,00 ^f	0,53 ^h	12,65 ^e	0,37 ^e	12,28 ^b	8,93 ^e	10,20
Dzień 32.	G _{B1}	49,79 ^f	12,99 ^c	2,54 ⁱ	1,51 ^f	1,51 ^f	0,00 ^a	33,17 ^a	2,01
	G _{F+B1}	51,46 ^c	20,58 ^d	0,00 ^j	17,57 ^g	0,41 ^e	17,16 ^c	10,39 ^e	8,62
Dzień 48.	G _{B1}	50,16 ^{e,f}	12,07 ^c	2,58 ⁱ	1,42 ^f	1,42 ^f	0,00 ^a	33,77 ^a	1,96
	G _{F+B1}	50,54 ^c	17,62 ^g	0,00 ^j	16,00 ^h	0,48 ^e	15,52 ^d	15,84 ^d	5,31
Dzień 64.	G _{B1}	51,97 ^g	10,91 ^h	2,40 ⁱ	1,47 ^f	1,47 ^f	0,00 ^a	33,25 ^a	2,01
	G _{F+B1}	48,99 ^{c,h}	15,42 ⁱ	0,00 ^j	10,62 ⁱ	0,50 ^e	10,12 ^e	24,97 ^f	3,00
Dzień 80.	G _{B1}	50,88 ^e	9,12 ^j	2,57 ⁱ	1,91 ^d	1,91 ^d	0,00 ^a	35,61 ^g	1,81
	G _{F+B1}	48,04 ^h	11,82 ^k	0,00 ^j	7,80 ⁱ	0,74 ^g	7,06 ^f	32,34 ^a	2,09

Objaśnienia: G_{B1} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; G_{F+B1} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₁ — szczep *Pseudomonas vesicularis*, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

ściła się w przedziale 1,42—3,12%. Od dnia 32. nie izolowano z gleby G_{F+B1} kwasów hydroksylowych. Prezentowane wyniki zawiera tabela 15.

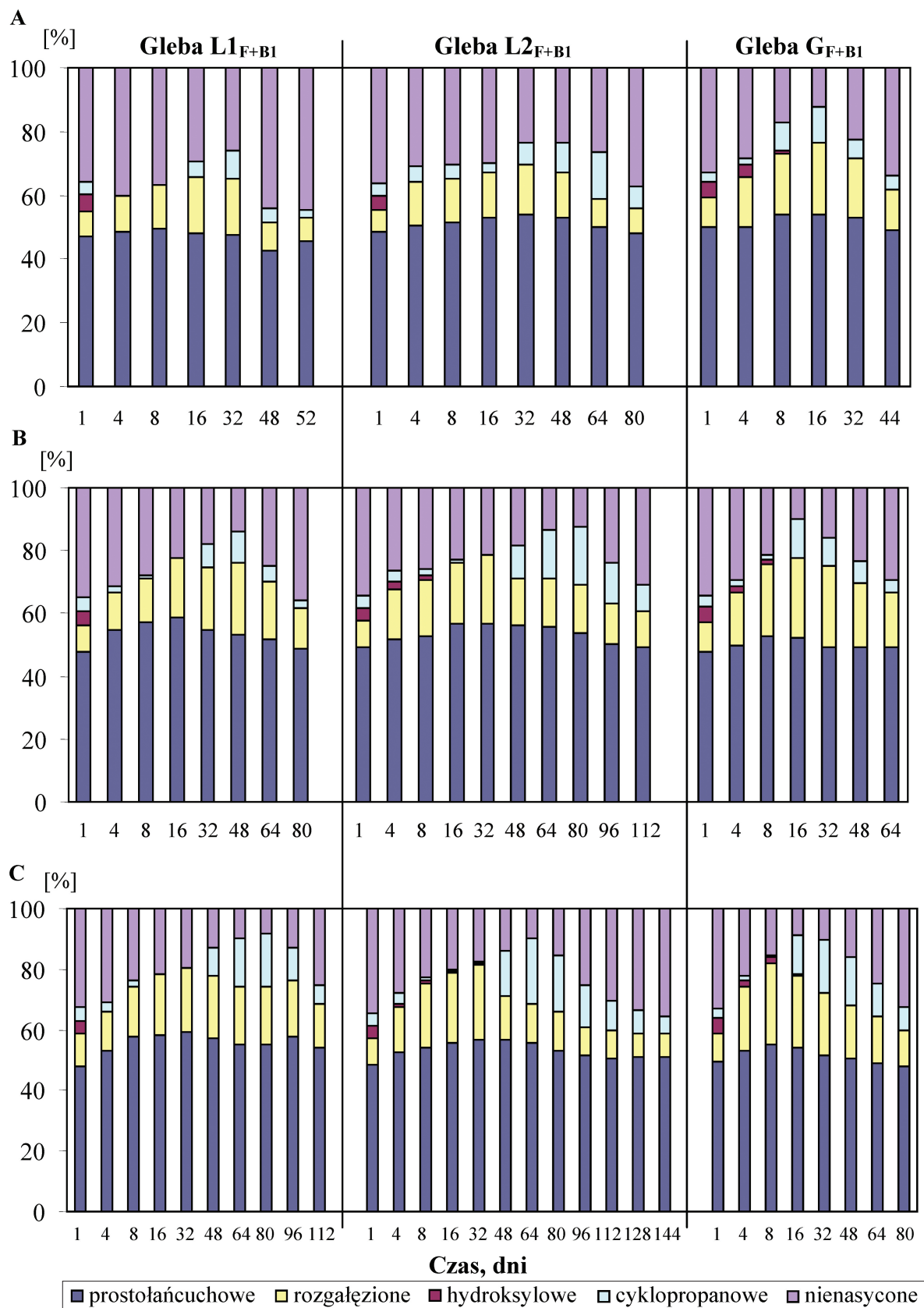
Porównanie zmian zachodzących w obecności różnych stężeń fenolu w składzie komórkowych kwasów tłuszczowych u szczepu *Pseudomonas vesicularis*, wprowadzonego do sterylnych gleb L1, L2 i G, prezentuje rys. 6.

4.1.5. Rozkład fenolu w glebach przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150

Gleby skażone fenolem z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas* sp. JS150 oznaczono L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2}, a gleby kontrolne — jako L1_F, L2_F i G_F (gdzie B2 w indeksie dolnym odpowiada bakteriom *Pseudomonas* sp. JS150, a F oznacza fenol).

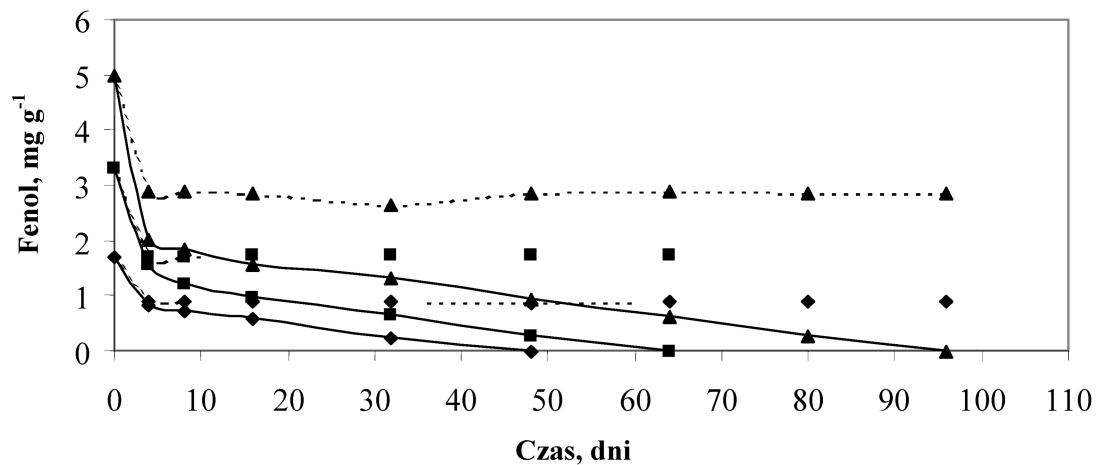
Szczep *Pseudomonas* sp. JS150, podobnie jak *Pseudomonas vesicularis*, rozkładał fenol w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2}. Największy ubytek wprowadzonych dawek fenolu obserwowano we wszystkich glebach w ciągu pierwszych 4 dni inkubacji. W tym czasie w glebie L1_{F+B2} ubyło 51,76—59,60% wprowadzonego fenolu, w glebie

L2_{F+B2} ubytek ten wynosił 35,20—51,52%, a w glebie G_{F+B2} — 38,24—53,20%. W glebach kontrolnych ubytek fenolu był mniejszy i wynosił: w glebie L1_F 42,20—48,18%, w glebie L2_F 25,29—32,12%, a w glebie G_F — 41,18—49,40%. Szczep *Pseudomonas* sp. JS150 rozkładał wszystkie stężenia fenolu w krótszym czasie niż *Pseudomonas vesicularis*, a najszybciej rozkład tego związku przeprowadzał w glebie G_{F+B2}. Dawkę 1,7 mg g⁻¹ degradował w tej glebie w ciągu 28 dni, dawkę 3,3 mg g⁻¹ w czasie 48 dni, a dawkę 5,0 mg g⁻¹ w ciągu 64 dni. W glebie L1_{F+B2} rozkład fenolu odbywał się wolniej niż w glebie G_{F+B2} i trwał 48 dni, gdy skażono ją dawką 1,7 mg g⁻¹; rozkład fenolu liczył 64 dni, gdy do gleby tej wprowadzono 3,3 mg g⁻¹ fenolu i 96 dni, gdy zastosowano dawkę 5,0 mg g⁻¹ tego związku. Najwolniej degradacja użytych stężeń substratu fenolowego przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 odbywała się w glebie L2_{F+B2} i trwała odpowiednio 64, 96 i 124 dni. Dynamikę rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach L1, L2 i G oraz zmiany stężenia fenolu w glebach kontrolnych ilustruje rys. 7.

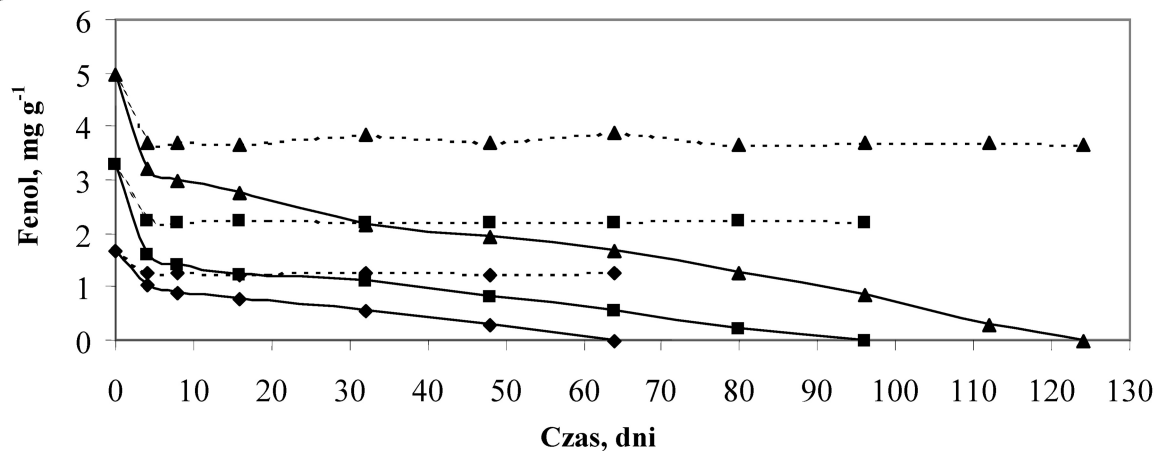


Rys. 6. Zawartość procentowa wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych u szczepu *Pseudomonas vesicularis* w czasie degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) w glebach L1_{F+B1}, L2_{F+B1} i G_{F+B1}

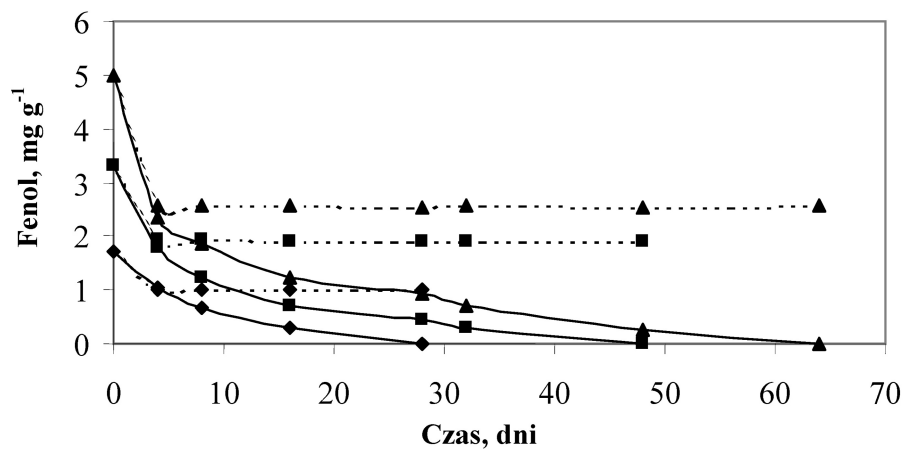
A



B



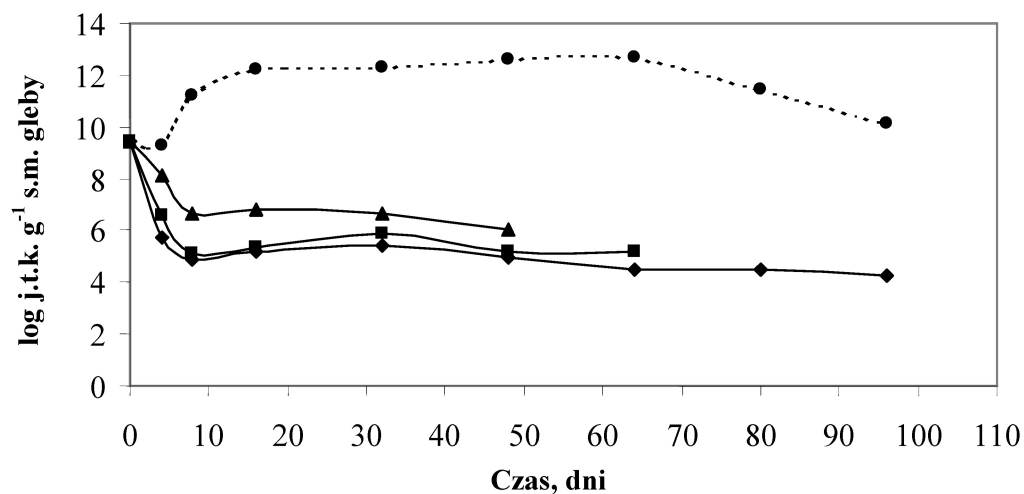
C



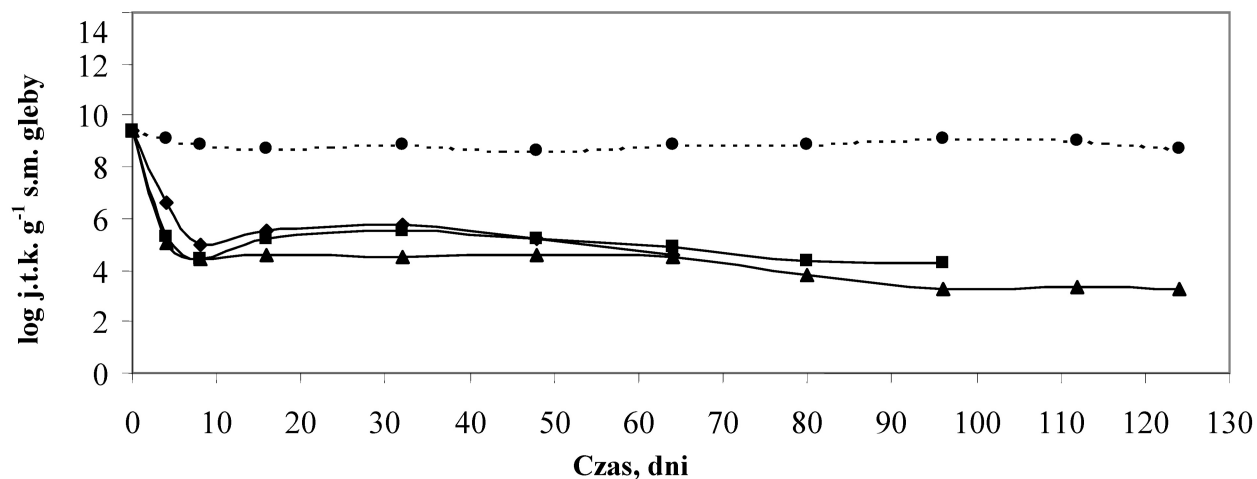
—◆— gleba + bakterie + fenol 1,7 mg g⁻¹ —■— gleba + bakterie + fenol 3,3 mg g⁻¹
 —▲— gleba + bakterie + fenol 5,0 mg g⁻¹ - - -◆- - - gleba + fenol 1,7 mg g⁻¹
 - - -■- - - gleba + fenol 3,3 mg g⁻¹ - - -▲- - - gleba + fenol 5,0 mg g⁻¹

Rys. 7. Dynamika rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach L1 (A), L2 (B) i G (C) przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 oraz zmiany stężenia fenolu w glebach kontrolnych

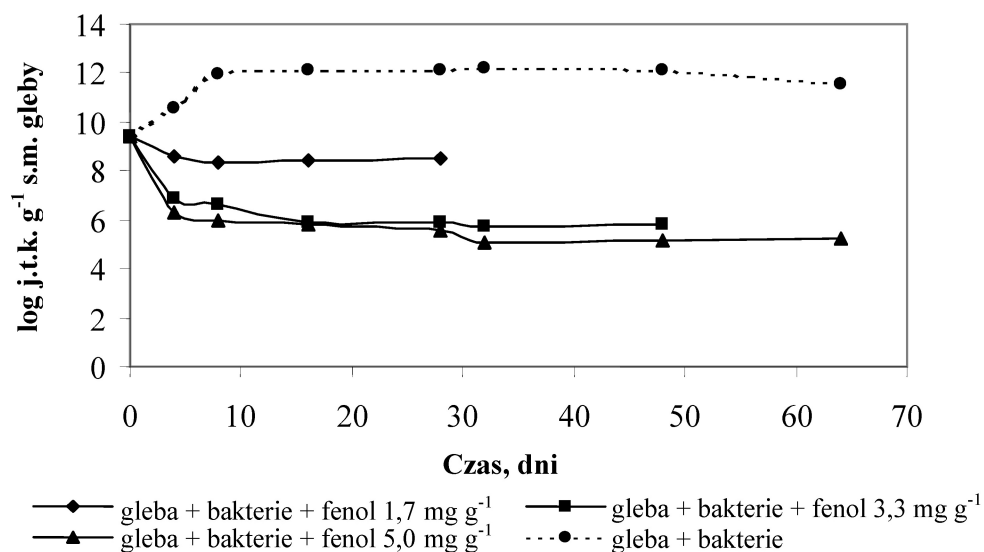
A



B



C



Rys. 8. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1 (A), L2 (B) i G (C) skażonych fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz w glebach kontrolnych (nieskażonych)

4.1.6. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 po wprowadzeniu do gleb

Przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 zarówno w glebach skażonych fenolem, jak i w glebach kontrolnych różniła się od przeżywalności w nich bakterii *Pseudomonas vesicularis*. W 4. dniu inkubacji w glebach L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2} skażonych wszystkimi dawkami fenolu obserwowano mniejszy spadek wprowadzonej liczby bakterii *Pseudomonas* sp. JS150 niż w glebach z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas vesicularis*. Najmniejszy był on w glebie G_{F+B2} i dla stężeń 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ wynosił odpowiednio: 8,4%, 27,23% i 32,87% wyjściowej liczby komórek. Spadek liczby wprowadzonych bakterii w glebie L1_{F+B2} skażonej wzrastającymi stężeniami fenolu był większy niż w glebie G_{F+B2} i wynosił odpowiednio: 13,62%, 29,68% i 38,94%, z kolei największy był w glebie L2_{F+B2}, w której stanowił 29,57%, 43,94% i 46,60% dodanej liczby komórek. Większą liczbę bakterii *Pseudomonas* sp. JS150 niż *Pseudomonas vesicularis* oznaczano także w glebach L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2} w dniu całkowitego rozkładu zastosowanych dawek fenolu. Szczep *Pseudomonas* sp. JS150 rósł również lepiej w glebach kontrolnych, niezawierających substratu fenolowego. Poza kontrolną glebę L2_{B2}, w kolejnych dniach inkubacji oznaczano w nich więcej bakterii niż do nich wprowadzono. W ostatnim dniu wykonywania oznaczeń liczebność bakterii w glebie L1_{B2} była o 8% większa od wyjściowej liczby komórek, a w glebie G_{B2} — o 22,55%. W kontrolnej glebie L2_{B2} w kolejnych dniach inkubacji liczba bakterii była podobna i wynosiła 95% wprowadzonych do niej bakterii. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz w glebach kontrolnych przedstawia rys. 8.

4.1.7. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas* sp. JS150

W glebach L1, L2 i G z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas* sp. JS150 i skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz glebach kontrolnych przed i po zakończeniu obserwacji biodegradacyjnych oznaczano zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji

kwasów próchnicowych i mierzono pH. Największe zmiany w zawartości materii organicznej i węgla organicznego obserwowano w nieskażonych glebach kontrolnych zawierających bakterie. W glebie L1_{B2} w dniach od 1. do 96. ubytek materii organicznej wynosił 1,1%, a węgla organicznego — 27,54%. W glebie L2_{B2} w dniach od 1. do 124. ubyło 0,52% materii organicznej i 51% węgla organicznego, a w G_{B2} w dniach od 1. do 64. odpowiednio — 0,82% i 27,80%. W glebach kontrolnych odnotowano największy spadek zawartości kwasów fulwowych, wynoszący: w L1_{B2} — 24,85%, w L2_{B2} — 29,08%, a w G_{B2} — 9,21%. Dla porównania w glebie L1_{F+B2} skażonej zastosowanymi stężeniami fenolu w ostatnim dniu badań biodegradacyjnych ubyło 0,22—0,45% materii organicznej i 8,93—10,29% węgla organicznego, w glebie L2_{F+B2} odpowiednio 0,17—0,44% i 20,83—27,45%, a w G_{F+B2} — 0,43—0,67% i 5,42—9,01%. Największym spadkiem zawartości kwasów fulwowych wyróżniały się wśród nich gleby L1_{F+B2} i G_{F+B2} skażone najwyższą dawką fenolu — 5,0 mg g⁻¹ gleby. Zawartość kwasów huminowych i hymatomelanowych we wszystkich glebach skażonych fenolem i zawierających wprowadzone bakterie była podobna. Odczyn pH gleb zmniejszał się w czasie inkubacji, nie przekraczając 1 jednostki w skali pH. Wyniki tych obserwacji zawiera tabela 16.

4.1.8. Analiza kwasów tłuszczowych szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 w czasie rozkładu fenolu w glebach

Przed wprowadzeniem komórek bakterii *Pseudomonas* sp. JS150 do sterylnych gleb L1, L2 i G wyznaczono profil ich kwasów tłuszczowych, który prezentuje tabela 17. Wpływ różnych dawek fenolu na skład komórkowych kwasów tłuszczowych bakterii *Pseudomonas* sp. JS150 po introdukcji do sterylnych gleb oceniano, porównując go z profilem kwasów uzyskanych z gleb kontrolnych. Analizie poddano, podobnie jak u szczepu *Pseudomonas vesicularis*, kwasy nasycone (prostotańcuchowe, rozgałęzione, hydroksylowe i cyklopropanowe) oraz nienasycone. Obliczono także stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych w kolejnych dniach prowadzenia analiz.

W pierwszej serii izolowano kwasy tłuszczowe z gleb: L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2} skażonych najniższą dawką fenolu wynoszącą 1,7 mg g⁻¹ gleby, oraz z gleb kontrolnych L1_{B2}, L2_{B2} i G_{B2}. Od dnia 1. do 8. w komórkach bakterii w glebie L1_{F+B2} następo-

Tabela 17
Profil kwasów tłuszczowych izolowanych z komórek *Pseudomonas* sp. JS150, hodowanych w bulionie odżywczym, przed wprowadzeniem do gleb

Kwasy tłuszczowe	Zawartość procentowa
Nasycone	
10:0	2,09
11:0 <i>iso</i>	3,74
12:0 3OH	2,05
13:0 <i>iso</i>	0,54
14:0	2,37
14:0 <i>iso</i>	4,55
15:0	1,24
15:0 <i>iso</i>	31,65
15:0 <i>anteiso</i>	11,75
16:0	11,71
16:0 <i>iso</i>	1,22
17:0 <i>iso</i>	3,69
17:0 <i>cy</i>	3,06
18:0	1,37
19:0 <i>iso</i>	0,75
Nienasycone	
16:1 ω 7c	10,61
17:1 ω 9c	3,72
18:1 ω 9c	2,67
18:1 ω 7c ω 19t/ ω 12t	1,42
Nasycone/nienasycone	4,43

wał wzrost udziału procentowego kwasów prostołańcuchowych z 29,53% do 40,34%, kwasów hydroksylowych z 2,43% do 2,91% oraz spadek kwasów rozgałęzionych z 52,64% do 43,36%. Od 16. dnia zawartość kwasów prostołańcuchowych i hydroksylowych zmniejszała się, a zawartość

kwasów rozgałęzionych wzrastała i w ostatnim dniu inkubacji wynosiła odpowiednio: 25,67%, 2,16% i 49,96% wszystkich izolowanych FAMES. W 16. dniu z gleby tej po raz pierwszy izolowano kwas cyklopropanowy 19:0 *cy* ω 10c z udziałem 7,94%. W 32. dniu oznaczano go 13,27%, a w ostatnim, 48. dniu — 6,25%. Drugiego z kwasów cyklopropanowych 17:0 *cy* nie ekstrahowano z tej gleby. Do 16. dnia zwiększał się stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych z 5,49 w 1. dniu do najwyższej wartości 6,79 w 16. dniu. W kolejnych dniach malał i w 48. dniu wynosił 5,27. Dla porównania w glebie L1_{B2} zawartość procentowa kwasów prostołańcuchowych w czasie trwania eksperymentu zawierała się w przedziale 27,07—34,91%, kwasów rozgałęzionych w granicach 40,28—47,24%, hydroksylowych w zakresie 1,99—3,04%, kwasu cyklopropanowego 17:0 *cy* w przedziale 2,35—3,11%, kwasów nienasyconych w granicach 18,29—20,98%, a stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych wynosił 3,77—4,47. Procentową zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1 przedstawia tabela 18.

W komórkach *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L2_{F+B2} skażonej fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ zawartość kwasów prostołańcuchowych zwiększała się od dnia 1. do 16. z 31,31% do 45,75%, w kolejnych malała i w 76. dniu była bliska tej, jaką oznaczono po 24-godzinnej ekspozycji bakterii na fenol. Kwasów rozgałęzionych izolowano z tej gleby prawie dwukrotnie mniej do dnia 64. (26,90%)

Tabela 18
Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 <i>cy</i>	19:0 <i>cy</i> ω 10c		
Dzień 1.	L1 _{B2}	27,07 ^a	47,24 ^a	2,36 ^a	2,35 ^a	2,35 ^a	0,00 ^a	20,98 ^a	3,77
	L1 _{F+B2}	29,53 ^b	52,64 ^b	2,43 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	15,40 ^{b,h}	5,49
Dzień 4.	L1 _{B2}	30,68 ^c	45,29 ^c	3,04 ^b	2,71 ^c	2,71 ^c	0,00 ^a	18,29 ^c	4,47
	L1 _{F+B2}	34,64 ^d	48,30 ^d	2,60 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	14,46 ^b	5,92
Dzień 8.	L1 _{B2}	33,38 ^e	41,86 ^e	2,51 ^a	3,11 ^d	3,11 ^d	0,00 ^a	19,14 ^d	4,22
	L1 _{F+B2}	40,34 ^f	43,36 ^f	2,91 ^d	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	13,39 ^e	6,47
Dzień 16.	L1 _{B2}	34,91 ^g	40,28 ^g	2,47 ^d	2,74 ^c	2,74 ^c	0,00 ^a	19,60 ^f	4,10
	L1 _{F+B2}	36,47 ^h	39,89 ^g	2,87 ^{c,d}	7,94 ^e	0,00 ^b	7,94 ^b	12,83 ^g	6,79
Dzień 32.	L1 _{B2}	34,43 ^g	41,09 ^g	1,99 ^e	2,48 ^a	2,48 ^a	0,00 ^a	20,01 ^{d,f}	4,00
	L1 _{F+B2}	28,68 ⁱ	40,04 ^g	2,21 ^f	13,27 ^f	0,00 ^b	13,27 ^c	15,80 ^h	5,33
Dzień 48.	L1 _{B2}	32,53 ^j	43,45 ^h	2,24 ^g	3,07 ^d	3,07 ^d	0,00 ^a	18,71 ^{c,d}	4,34
	L1 _{F+B2}	25,67 ^k	49,96 ⁱ	2,16 ^f	6,25 ^g	0,00 ^b	6,25 ^d	15,96 ^h	5,27

Objaśnienia: L1_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L1_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₂ — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcu- chowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropano- we	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L2 _{B2}	27,54 ^a	46,06 ^a	2,51 ^a	2,64 ^a	2,64 ^a	0,00 ^a	21,25 ^a	3,71
	L2 _{F+B2}	31,31 ^b	48,49 ^b	0,00 ^b	2,31 ^b	2,31 ^b	0,00 ^a	17,89 ^b	4,59
Dzień 4.	L2 _{B2}	31,77 ^c	46,62 ^a	1,36 ^c	2,35 ^c	2,35 ^c	0,00 ^a	17,90 ^c	4,57
	L2 _{F+B2}	37,98 ^d	43,45 ^c	0,00 ^b	1,92 ^d	1,92 ^d	0,00 ^a	16,65 ^d	5,01
Dzień 8.	L2 _{B2}	32,01 ^c	46,17 ^a	1,39 ^c	2,42 ^c	2,42 ^c	0,00 ^a	18,01 ^c	4,55
	L2 _{F+B2}	43,35 ^e	39,35 ^d	0,00 ^b	1,16 ^e	1,16 ^e	0,00 ^a	16,14 ^{d,e}	5,20
Dzień 16.	L2 _{B2}	31,48 ^c	46,69 ^a	1,64 ^d	2,44 ^c	2,44 ^c	0,00 ^a	17,75 ^c	4,63
	L2 _{F+B2}	45,75 ^f	37,64 ^e	0,00 ^b	0,81 ^f	0,81 ^f	0,00 ^a	15,80 ^{d,e}	5,33
Dzień 32.	L2 _{B2}	31,84 ^c	47,54 ^f	1,29 ^e	2,16 ^g	2,16 ^g	0,00 ^a	17,17 ^c	4,82
	L2 _{F+B2}	37,14 ^g	34,18 ^g	0,00 ^b	13,04 ^h	0,00 ^h	13,04 ^b	15,64 ^e	5,39
Dzień 48.	L2 _{B2}	31,98 ^c	46,94 ^a	1,53 ^f	2,51 ^a	2,51 ⁱ	0,00 ^a	17,04 ^c	4,87
	L2 _{F+B2}	33,93 ^h	26,85 ^h	0,00 ^b	23,44 ⁱ	0,00 ^h	23,44 ^c	15,78 ^e	5,34
Dzień 64.	L2 _{B2}	30,71 ⁱ	47,59 ^f	1,47 ^g	2,39 ^c	2,39 ^c	0,00 ^a	17,84 ^c	4,61
	L2 _{F+B2}	32,94 ^j	26,90 ^h	0,00 ^b	18,98 ⁱ	0,00 ^h	18,98 ^d	21,18 ^f	3,72
Dzień 76.	L2 _{B2}	31,46 ^c	46,74 ^a	1,75 ^h	3,12 ^k	3,12 ^j	0,00 ^a	16,93 ^c	4,91
	L2 _{F+B2}	29,21 ^k	40,04 ^d	0,00 ^b	9,34 ^l	0,00 ^h	9,34 ^e	21,41 ^f	3,67

Objaśnienia: L2_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L2_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₂ — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

w porównaniu z 1. dniem (48,49%), a hydroksylowe nie pojawiały się wśród uzyskanych FAMES w żadnym dniu prowadzenia ekstrakcji. Od dnia 32. do 76. oznaczano w tej glebie kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω10c, z największym udziałem 23,44% w 48. dniu. Kwas 17:0 cy charakteryzował się znacznie mniejszą zawartością procentową 0,81—2,31% i występował w profilu jedynie do 16. dnia. Stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych najwyższe wartości w tej glebie, wynoszące 5,34 i 5,39, przyjmował w dniach 32. i 48. W glebie kontrolnej L2_{B2}, poza hydroksykwasami, których oznaczano od dnia 4. prawie dwukrotnie mniej niż w 1. dniu, nie obserwowano większych różnic w zawartości pozostałych grup kwasów tłuszczowych. Podobnie od dnia 4. do 76. wartość stosunku kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych była podobna i zawierała się w przedziale 4,55—4,91. Prezentowane wyniki ilustruje tabela 19.

Z analiz chromatograficznych wynika, że fenol w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ powodował też istotne zmiany w komórkach *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G_{F+B2}. Od dnia 1. do 8. zwiększała się w nich zawartość kwasów prostołańcuchowych z 31,24% do 43,45%. W kolejnych dniach udział kwasów z tej grupy malał i w 28. dniu, w którym nie oznaczano fenolu w tej glebie, wynosił 34,14% ogólnej zawartości kwasów. Jednocześnie między dniem 1. a 16.

obserwowano stopniowy spadek zawartości kwasów rozgałęzionych o 20,79%, a hydroksylowych o 1,71%. Od 8. dnia z gleby tej izolowano kwas z pierścieniem cyklopropanowym 19:0 cy ω10c, który najwyższym udziałem (16,79%) odznaczał się w dniu 16. Tak wysoki jego udział wpłynął na wartość stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych, która wzrosła w tym dniu do 9,13. Drugiego z kwasów o budowie cyklicznej 17:0 cy bakterie nie syntetyzowały w obecności wprowadzonego fenolu. W glebie kontrolnej G_{B2} też obserwowano zmiany w zawartości wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych, ale nie tak znaczące, jak w obecności fenolu. W porównaniu z dniem 1., w dniu 28. nastąpił wzrost udziału kwasów prostołańcuchowych o 5,68%, cyklopropanowego 17:0 cy o 0,24%, spadek zawartości kwasów rozgałęzionych o 6,09% i hydroksylowych o 0,16%. Zmiany te nie miały jednak wpływu na wartość stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych, który w 1. dniu wynosił 4,15, a w dniu 28. — 4,06. Procentowy udział wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu przez *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G_{F+B2} oraz glebie kontrolnej G_{B2} przedstawia tabela 20.

W kolejnej serii analizowano zmiany w składzie komórkowych kwasów tłuszczowych szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1, L2 i G w obecności fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ oraz

Tabela 20

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	G _{B2}	24,69 ^a	51,80 ^a	2,16 ^a	1,92 ^a	1,92 ^a	0,00 ^a	19,43 ^a	4,15
	G _{F+B2}	31,24 ^b	49,67 ^b	2,98 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	16,11 ^b	5,21
Dzień 4.	G _{B2}	26,56 ^c	49,93 ^c	1,08 ^c	2,20 ^c	2,20 ^c	0,00 ^a	20,23 ^c	3,94
	G _{F+B2}	33,93 ^d	48,76 ^d	2,43 ^d	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	14,88 ^d	5,72
Dzień 8.	G _{B2}	28,45 ^e	47,96 ^e	1,47 ^e	2,14 ^c	2,14 ^c	0,00 ^a	19,98 ^c	4,01
	G _{F+B2}	43,45 ^f	37,98 ^f	1,88 ^f	6,48 ^d	0,00 ^b	6,48 ^b	10,21 ^e	8,79
Dzień 16.	G _{B2}	28,66 ^e	46,15 ^g	1,77 ^g	2,49 ^e	2,49 ^d	0,00 ^a	20,93 ^c	3,78
	G _{F+B2}	43,19 ^f	28,88 ^h	1,27 ^h	16,79 ^f	0,00 ^b	16,79 ^c	9,87 ^f	9,13
Dzień 28.	G _{B2}	30,37 ^g	45,71 ^g	2,00 ⁱ	2,16 ^c	2,16 ^c	0,00 ^a	19,76 ^c	4,06
	G _{F+B2}	34,14 ^d	40,70 ⁱ	2,05 ^j	10,24 ^g	0,00 ^b	10,24 ^d	12,87 ^g	6,77

Objaśnienia: G_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; G_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₂ — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

w glebach kontrolnych. W glebie L1_{F+B2} stwierdzono wzrost zawartości procentowej kwasów prostołańcuchowych od dnia 1. do 16. o 21,13% oraz spadek udziału kwasów rozgałęzionych do dnia 48. o 32,86%. Dla porównania w glebie L1_{B2} udział kwasów prostołańcuchowych w tym czasie zwiększył się o 7,84%, a rozgałęzionych zmalał o 3,79%. Zawartość kwasów hydroksylowych w glebie L1_{F+B2} w czasie rozkładu fenolu przez bakterie oraz w glebie L1_{B2} była podobna i zawierała się

w przedziale 1,95—3,04% wszystkich wyizolowanych FAMES. Obecności kwasu cyklopropanowego 17:0 cy nie wykrywano wśród izolowanych z gleby L2_{F+B2} kwasów, natomiast kwas 19:0 cy ω10c występował w niej od dnia 8. do 64. Najwyższą zawartością, wynoszącą 31,13%, kwas ten charakteryzował się w dniu 48., a najniższą, wynoszącą 8,79%, w dniu 16., w którym po raz pierwszy ekstrahowano go z tej gleby. Z gleby kontrolnej L1_{B2} izolowano wyłącznie kwas 17:0 cy,

Tabela 21

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _{B2}	27,07 ^a	47,24 ^a	2,36 ^{a,f}	2,35 ^a	2,35 ^a	0,00 ^a	20,98 ^a	3,77
	L1 _{F+B2}	28,36 ^b	54,42 ^b	2,15 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	15,07 ^b	5,64
Dzień 4.	L1 _{B2}	30,68 ^c	45,29 ^c	3,04 ^b	2,71 ^c	2,71 ^c	0,00 ^a	18,29 ^c	4,47
	L1 _{F+B2}	36,82 ^d	48,36 ^d	2,61 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	12,21 ^d	7,19
Dzień 8.	L1 _{B2}	33,38 ^e	41,86 ^e	2,51 ^a	3,11 ^d	3,11 ^d	0,00 ^a	19,14 ^e	4,22
	L1 _{F+B2}	46,68 ^f	31,63 ^f	2,47 ^a	8,94 ^e	0,00 ^b	8,94 ^b	10,28 ^f	8,73
Dzień 16.	L1 _{B2}	34,91 ^g	40,28 ^e	2,47 ^a	2,74 ^c	2,74 ^c	0,00 ^a	19,60 ^g	4,10
	L1 _{F+B2}	49,49 ^h	30,74 ^f	1,99 ^c	8,79 ^e	0,00 ^b	8,79 ^b	8,99 ^h	10,12
Dzień 32.	L1 _{B2}	34,43 ^g	41,09 ^e	1,99 ^d	2,48 ^a	2,48 ^e	0,00 ^a	20,01 ^{e,g}	4,00
	L1 _{F+B2}	43,93 ⁱ	25,71 ^g	2,16 ^e	21,37 ^f	0,00 ^b	21,37 ^c	6,83 ⁱ	13,64
Dzień 48.	L1 _{B2}	32,53 ^e	43,45 ^h	2,24 ^f	3,07 ^d	3,07 ^d	0,00 ^a	18,71 ^e	4,34
	L1 _{F+B2}	35,27 ^j	21,56 ⁱ	2,67 ^a	31,13 ^g	0,00 ^b	31,13 ^d	9,37 ^h	9,67
Dzień 64.	L1 _{B2}	32,80 ^e	45,95 ^c	1,95 ^d	1,79 ^h	1,79 ^e	0,00 ^a	17,51 ^c	4,71
	L1 _{F+B2}	27,48 ^h	30,83 ^f	2,94 ^g	26,94 ⁱ	0,00 ^b	26,94 ^e	11,81 ^d	7,47

Objaśnienia: L1_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L1_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₂ — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

z udziałem 1,79—3,11%. Zawartość kwasów nienasyconych u bakterii w glebie L1_{F+B2} malała do dnia 32., z 15,07% w dniu 1. do 6,83% w dniu 32., a następnie stopniowo zwiększała się i w ostatnim dniu wynosiła 11,81%. W glebie L1_{B2} udział kwasów nienasyconych był podobny w kolejnych dniach analiz chromatograficznych i wynosił 17,51—20,98%. Najwyższą wartość (13,64) stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych izolowanych z gleby L1_{F+B2} przyjmował w dniu 32., a najniższą (5,64) po 24-godzinnej ekspozycji bakterii na fenol. W 64. dniu, tj. w dniu, w którym stwierdzono całkowity rozkład fenolu przez wprowadzone do tej gleby bakterie, stosunek ten wynosił 7,47. Dla porównania w glebie kontrolnej L1_{B2} stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych był podobny w dniach od 4. do 64. i mieścił się w przedziale 4,00—4,71. Otrzymane wyniki ilustruje tabela 21.

W glebie L2_{F+B2} reakcją bakterii na fenol w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ w początkowych dniach inkubacji był wzrost udziału kwasów prostołańcuchowych z 30,01% w dniu 1. do 51,32% w dniu 32. Wzrostowi zawartości tych kwasów towarzyszył spadek udziału kwasów rozgałęzionych. Hydroksykwasów nie identyfikowano wśród uzyskanych z tej gleby

FAMEs, a kwas cyklopropanowy 17:0 cy oznaczał jedynie do dnia 32. Jego udział był niewielki i wynosił 1,63—2,57% ogólnej zawartości kwasów. Znacznie wyższą zawartością charakteryzował się natomiast kwas 19:0 cy ω10c, izolowany z gleby L2_{F+B2} od 48. dnia do 96. dnia. Jego udział w tym czasie mieścił się w przedziale 15,15—26,70%. Obserwowanym zmianom w zawartości kwasów nasyconych towarzyszyły niewielkie różnice w udziale kwasów nienasyconych. W dniach od 1. do 64. udział tych kwasów był podobny i mieścił się w zakresie 13,26—14,92%, natomiast w dniu 80. i 96. był nieznacznie wyższy i wynosił odpowiednio 16,64% i 17,58%. Stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń zwiększał się i najwyższe wartości (6,54 i 6,50) osiągał w dniach 48. i 64. Dla porównania w glebie kontrolnej L2_{B2} udział kwasów prostołańcuchowych w czasie trwania eksperymentu kształtował się w przedziale 27,54—32,01%, kwasów rozgałęzionych w zakresie 46,06—47,59%, hydroksylowych — 1,29—2,51%, cyklopropanowego 17:0 cy — 2,16—3,06%, a nienasyconych — 17,04—21,25%. Niewiele zmieniały się także wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych, ekstrakto-

Tabela 22

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L2 _{B2}	27,54 ^a	46,06 ^a	2,51 ^a	2,64 ^a	2,64 ^a	0,00 ^a	21,25 ^a	3,71
	L2 _{F+B2}	30,01 ^b	52,50 ^b	0,00 ^b	2,57 ^a	2,57 ^a	0,00 ^a	14,92 ^b	5,70
Dzień 4.	L2 _{B2}	31,77 ^c	46,62 ^a	1,36 ^c	2,35 ^b	2,35 ^b	0,00 ^a	17,90 ^c	4,57
	L2 _{F+B2}	38,31 ^d	45,18 ^a	0,00 ^b	2,04 ^c	2,04 ^c	0,00 ^a	14,47 ^b	5,91
Dzień 8.	L2 _{B2}	32,01 ^c	46,17 ^a	1,39 ^c	2,42 ^b	2,42 ^b	0,00 ^a	18,01 ^c	4,55
	L2 _{F+B2}	45,56 ^e	38,25 ^c	0,00 ^b	2,16 ^c	2,16 ^d	0,00 ^a	14,03 ^{b,f}	6,13
Dzień 16.	L2 _{B2}	31,48 ^c	46,69 ^a	1,64 ^d	2,44 ^b	2,44 ^b	0,00 ^a	17,75 ^c	4,63
	L2 _{F+B2}	48,78 ^f	35,02 ^d	0,00 ^b	1,92 ^d	1,92 ^e	0,00 ^a	14,26 ^b	6,01
Dzień 32.	L2 _{B2}	31,84 ^c	47,54 ^a	1,29 ^e	2,16 ^e	2,16 ^f	0,00 ^a	17,17 ^d	4,82
	L2 _{F+B2}	51,32 ^g	33,35 ^e	0,00 ^b	1,63 ^f	1,63 ^g	0,00 ^a	13,70 ^{b,f}	6,30
Dzień 48.	L2 _{B2}	31,98 ^c	46,94 ^a	1,53 ^c	2,51 ^b	2,51 ^b	0,00 ^a	17,04 ^d	4,87
	L2 _{F+B2}	42,75 ^h	25,29 ^f	0,00 ^b	18,70 ^g	0,00 ^h	18,70 ^b	13,26 ^f	6,54
Dzień 64.	L2 _{B2}	30,71 ⁱ	47,59 ^a	1,47 ^c	2,39 ^b	2,39 ^b	0,00 ^a	17,84 ^c	4,61
	L2 _{F+B2}	38,05 ^d	21,31 ^g	0,00 ^b	26,70 ^h	0,00 ^h	26,70 ^c	13,34 ^f	6,50
Dzień 80.	L2 _{B2}	29,74 ⁱ	46,56 ^a	1,87 ^f	3,06 ⁱ	3,06 ⁱ	0,00 ^a	18,77 ^g	4,33
	L2 _{F+B2}	36,14 ^j	28,13 ^h	0,00 ^b	19,09 ^g	0,00 ^h	19,09 ^b	16,64 ^h	5,01
Dzień 96.	L2 _{B2}	29,74 ⁱ	46,56 ^a	1,87 ^f	3,06 ⁱ	3,06 ⁱ	0,00 ^a	18,77 ^g	4,33
	L2 _{F+B2}	28,96 ^{b,i}	38,31 ^c	0,00 ^b	15,15 ⁱ	0,00 ^h	15,15 ^d	17,58 ⁱ	4,69

Objaśnienia: L2_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L2_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B2 — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

wanych z tej gleby, które zawierały się w przedziale 3,71—4,87. Prezentowane wyniki zestawiono w tabeli 22.

Fenol w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ gleby w podobny sposób wpływał na skład komórkowych kwasów tłuszczowych szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 introdukowanego do gleby G, jak w pozostałych glebach. Największy wzrost o 15,52% zawartości kwasów prostołańcuchowych u bakterii wprowadzonych do gleby G_{F+B2} stwierdzono w 8. dniu pomiarów, podczas gdy w nieobecności fenolu ich udział w komórkach w glebie G_{B2} w czasie trwania eksperymentu wzrósł o 7,79%. Kolejna, ważna zmiana w glebie G_{F+B2} dotyczyła kwasów rozgałęzionych, których udział w dniach od 1. do 16. zmalał o 24,39%. Dla porównania w glebie kontrolnej G_{B2} zawartość kwasów z tej grupy zmniejszyła się w tym czasie o 13,44%. Z kolei zawartość hydroksykwasów w kolejnych dniach izolowania FAMES z gleb G_{F+B2} i G_{B2} była podobna i zawierała się w przedziale 1,08—2,64% wszystkich wyizolowanych FAMES. Kwasu cyklopropanowego 17:0 cy nie wykrywano w profilach kwasów uzyskanych z gleby G_{F+B2}, ale identyfikowano go w glebie kontrolnej G_{B2}, w której charakteryzował się udziałem 1,92—2,49%. Drugi z kwasów o budowie cyklicznej 19:0 cy ω10c izolowano wyłącznie z gleby skażonej fenolem od dnia 8. Jego zawartość procentowa była wysoka i mieściła się w dniach od 8. do 48. w zakresie 11,37—23,28% ogólnej zawartości otrzymanych z tej gleby FAMES. Udział kwasów nienasyconych w glebie G_{F+B2} zmniejszał się od dnia 1. do 16.

z 16,75% do 7,09%, a następnie zwiększał się i w 48. dniu wynosił 14,38%. W kontrolnej glebie G_{B2} zawartość kwasów nienasyconych nie zmieniała się istotnie. Najwyższą wartość (13,10) stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych, ekstrahowanych z gleby G_{F+B2}, osiągał w dniu 16., natomiast w tym dniu w komórkach bakterii wprowadzonych do gleby G_{F+B2} był ponad 3-krotnie niższy (3,78). Procentową zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie degradacji fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ gleby przez *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G_{F+B2} oraz w glebie kontrolnej G_{B2} przedstawia tabela 23.

W kolejnej serii badano, jak fenol w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ gleby wpływa na zawartość procentową wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych u szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1, L2 i G. Stwierdzono, że bez względu na rodzaj gleby, do której wprowadzono bakterie, od dnia 1. do 16. pod wpływem fenolu dochodziło w ich komórkach do wzrostu zawartości procentowej kwasów prostołańcuchowych. W tym czasie w bakteriach w glebie L1_{F+B2} udział tych kwasów wzrósł o 26,23%, w glebie L2_{F+B2} o 22,37%, a w glebie G_{F+B2} o 15,03%. W kolejnych dniach ich zawartość się zmniejszała i w ostatnim dniu, w którym stwierdzano całkowity rozkład przez bakterie wprowadzonego do gleby fenolu, wynosiła: w L1_{F+B2} — 28,56%, w L2_{F+B2} — 28,16%, a w G_{F+B2} — 36,37% ogólnej zawartości kwasów. W glebach kontrolnych ich udział w trakcie trwania badań także się zmieniał, ale obserwowane zmiany nie były tak duże, jak w glebach skażonych fenolem. Ich za-

Tabela 23

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	G _{B2}	24,69 ^a	51,80 ^a	2,16 ^a	1,92 ^a	1,92 ^a	0,00 ^a	19,43 ^a	4,15
	G _{F+B2}	29,66 ^b	51,53 ^a	2,06 ^a	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	16,75 ^b	4,97
Dzień 4.	G _{B2}	26,56 ^c	49,93 ^b	1,08 ^b	2,20 ^c	2,20 ^c	0,00 ^a	20,23 ^c	3,94
	G _{F+B2}	35,98 ^d	46,32 ^c	2,42 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	15,28 ^d	5,54
Dzień 8.	G _{B2}	28,45 ^e	47,96 ^d	1,47 ^d	2,14 ^c	2,14 ^c	0,00 ^a	19,98 ^c	4,01
	G _{F+B2}	45,18 ^f	31,16 ^e	2,16 ^a	11,37 ^d	0,00 ^b	11,37 ^b	10,13 ^e	8,87
Dzień 16.	G _{B2}	28,66 ^e	46,15 ^f	1,77 ^e	2,49 ^e	2,49 ^d	0,00 ^a	20,93 ^c	3,78
	G _{F+B2}	44,16 ^g	27,14 ^g	1,94 ^f	19,67 ^f	0,00 ^b	19,67 ^c	7,09 ^f	13,10
Dzień 32.	G _{B2}	31,71 ^h	43,24 ^h	1,97 ^g	2,19 ^c	2,19 ^c	0,00 ^a	20,89 ^c	3,79
	G _{F+B2}	34,71 ⁱ	32,64 ⁱ	1,66 ^h	23,28 ^g	0,00 ^b	23,28 ^d	7,71 ^g	11,97
Dzień 48.	G _{B2}	32,48 ^h	44,18 ^j	2,64 ⁱ	2,31 ^c	2,31 ^c	0,00 ^a	18,39 ^h	4,44
	G _{F+B2}	29,27 ^j	38,29 ^k	1,93 ^f	16,13 ^h	0,00 ^b	16,13 ^e	14,38 ⁱ	5,95

Objaśnienia: G_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; G_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₂ — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

wartość w glebie L1_{B2} mieściła się w przedziale 27,07—34,91%, w glebie L2_{B2} w przedziale 27,54—32,01%, a w glebie G_{B2} — w przedziale 24,69—32,48%. Przeciwnie do zawartości kwasów prostołańcuchowych kształtował się w glebach skażonych fenolem udział kwasów rozgałęzionych. Do dnia 16. ich zawartość się zmniejszyła: o 29,27% w glebie L1_{F+B2}, o 17,03% w glebie L2_{F+B2} i o 32,40% w glebie G_{F+B2}, a w kolejnych dniach się zwiększała i w ostatnim dniu prowadzenia oznaczeń wynosiła odpowiednio: 43,88%, 49,17% i 29,68%. W glebie L2_{F+B2} w obecności fenolu w bakteriach nie występowały hydroksykwasy, natomiast z gleb L1_{F+B2} i G_{F+B2} izolowano je w każdym dniu przeprowadzanych ekstrakcji. W glebie L1_{F+B2} ich zawartość mieściła się w przedziale 2,16—3,07%, a w glebie G_{F+B2} — w przedziale 1,49—2,20%. Z gleb L1_{F+B2} i G_{F+B2} nowy kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω10c izolowano od 8. dnia, a z gleby L2_{F+B2} od 32. dnia. Jego zawartość procentowa była wysoka i zawierała się w glebie L1_{F+B2} w przedziale 9,68—38,60%, w glebie L2_{F+B2} w zakresie 6,27—28,26%, a w glebie G_{F+B2}

w granicach 15,55—30,48% ogólnej zawartości wszystkich kwasów. Drugi z kwasów cyklopropanowych 17:0 cy występował w bakteriach w glebach kontrolnych oraz w glebie L2_{F+B2} do dnia, w którym ekstrahowano z niej po raz pierwszy kwas 19:0 cy ω10c. Wzrost wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych obserwowano w glebie L1_{F+B2} do dnia 48., w glebie L2_{F+B2} do 64. dnia, a w glebie G_{F+B2} do 32. dnia, w których osiągał najwyższe wartości, wynoszące odpowiednio: 14,08, 9,50 i 16,83. Dla porównania w bakteriach w glebach kontrolnych stosunek ten zawierał się w przedziale 3,71—4,87. Procentową zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie degradacji fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ gleby przez *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2} oraz w glebach kontrolnych przedstawiają tabele 24—26.

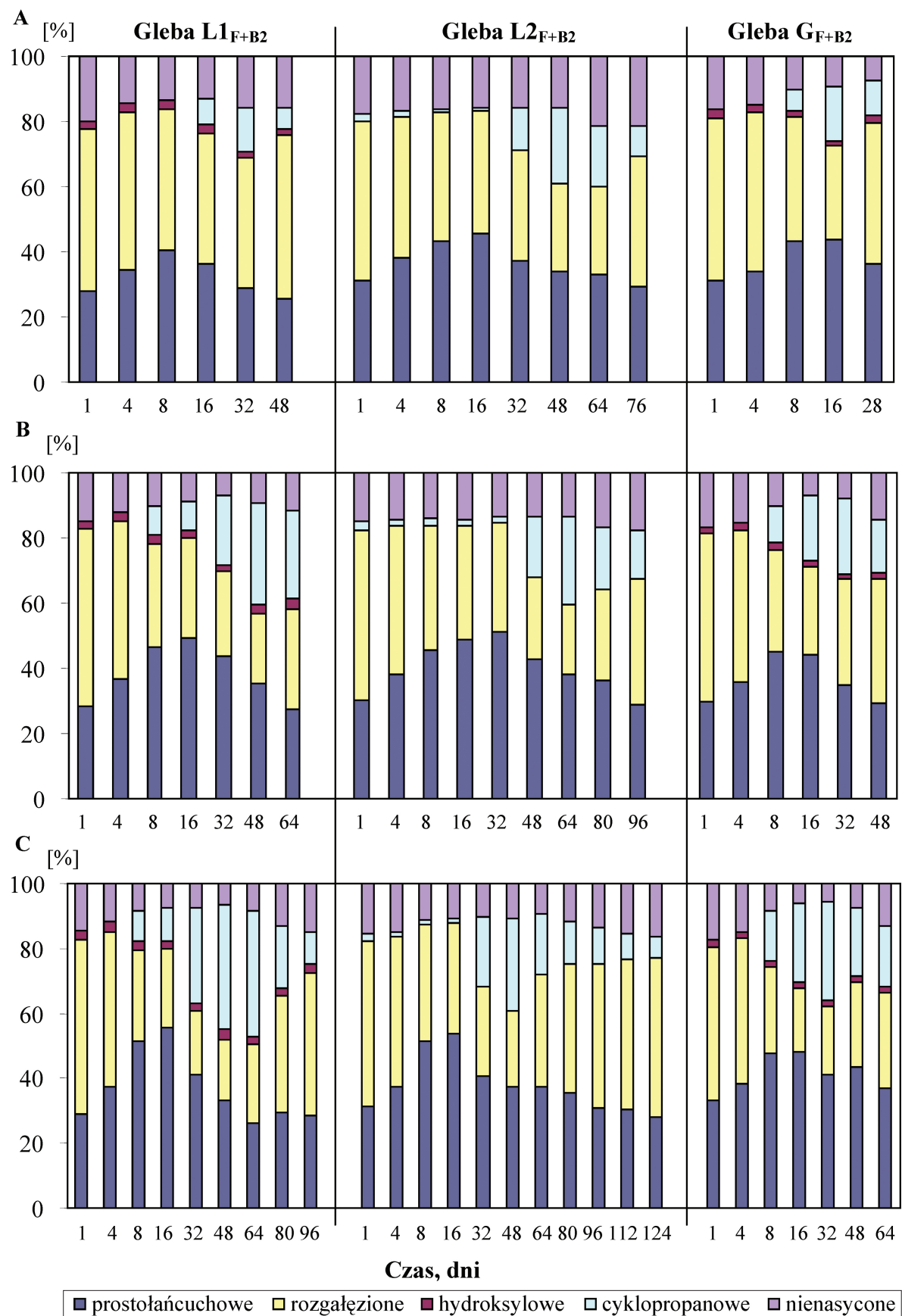
Porównanie zmian zachodzących w obecności różnych stężeń fenolu w składzie komórkowych kwasów tłuszczowych u szczepu *Pseudomonas* sp. JS150, wprowadzonego do sterylnych gleb L1, L2 i G, prezentuje rys. 9.

Tabela 24

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez szczep *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _{B2}	27,07 ^a	47,24 ^a	2,36 ^a	2,35 ^a	2,35 ^a	0,00 ^a	20,98 ^a	3,77
	L1 _{F+B2}	29,16 ^b	53,67 ^b	2,64 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	14,53 ^b	5,88
Dzień 4.	L1 _{B2}	30,68 ^c	45,29 ^c	3,04 ^c	2,71 ^c	2,71 ^c	0,00 ^a	18,29 ^c	4,47
	L1 _{F+B2}	37,44 ^d	47,76 ^d	3,07 ^c	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^a	11,73 ^d	7,53
Dzień 8.	L1 _{B2}	33,38 ^e	41,86 ^e	2,51 ^d	3,11 ^d	3,11 ^d	0,00 ^a	19,14 ^e	4,22
	L1 _{F+B2}	51,56 ^f	27,76 ^f	2,74 ^e	9,68 ^e	0,00 ^b	9,68 ^b	8,26 ^f	11,11
Dzień 16.	L1 _{B2}	34,91 ^g	40,28 ^g	2,47 ^d	2,74 ^c	2,74 ^c	0,00 ^a	19,60 ^g	4,10
	L1 _{F+B2}	55,39 ^h	24,40 ^h	2,54 ^b	10,11 ^e	0,00 ^b	10,11 ^b	7,56 ^h	12,23
Dzień 32.	L1 _{B2}	34,43 ^g	41,09 ⁱ	1,99 ^f	2,48 ^a	2,48 ^a	0,00 ^a	20,01 ^{e,g}	4,00
	L1 _{F+B2}	40,97 ⁱ	19,92 ⁱ	2,40 ^g	29,05 ^f	0,00 ^b	29,05 ^c	7,66 ⁱ	12,05
Dzień 48.	L1 _{B2}	32,53 ^e	43,45 ^k	2,24 ^a	3,07 ^d	3,07 ^d	0,00 ^a	18,71 ^c	4,34
	L1 _{F+B2}	33,19 ^e	18,79 ^l	2,98 ^c	38,41 ^g	0,00 ^b	38,41 ^d	6,63 ^j	14,08
Dzień 64.	L1 _{B2}	32,80 ^e	45,95 ^c	1,95 ^f	1,79 ^h	1,79 ^e	0,00 ^a	17,51 ^k	4,71
	L1 _{F+B2}	26,19 ^j	24,11 ^h	2,51 ^h	38,60 ^g	0,00 ^b	38,60 ^d	8,59 ^f	10,64
Dzień 80.	L1 _{B2}	34,79 ^g	43,20 ^{e,k}	2,17 ^a	2,16 ⁱ	2,16 ^f	0,00 ^a	17,68 ^k	4,66
	L1 _{F+B2}	29,56 ^k	36,03 ^m	2,16 ⁱ	19,24 ^j	0,00 ^b	19,24 ^e	13,01 ^l	6,69
Dzień 96.	L1 _{B2}	34,41 ^g	42,61 ^{e,k}	1,75 ^j	2,64 ^c	2,64 ^{a,c}	0,00 ^a	18,59 ^c	4,38
	L1 _{F+B2}	28,56 ^k	43,88 ⁿ	2,64 ^b	10,09 ^e	0,00 ^b	10,09 ^b	14,83 ^b	5,74

Objaśnienia: L1_{B2} — gleba z wprowadzonymi bakteriami nieskażona fenolem; L1_{F+B2} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi bakteriami (B₂ — szczep *Pseudomonas* sp. JS150, F — fenol). Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).



Rys. 9. Zawartość procentowa wyróżnionych grup kwasów u szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 w czasie degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) w glebach L1_{F+B2}, L2_{F+B2} i G_{F+B2}

4.1.9. Rozkład fenolu w glebach przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150

W tym etapie badań przeprowadzono obserwacje rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach L1, L2 i G, do których po wysterylizowaniu wprowadzono mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. Kontrolami w tych badaniach były gleby skażone fenolem, niezawierające bakterii. Pierwszy rodzaj gleb oznaczono jako L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M}, a drugi jako L1_F, L2_F i G_F (gdzie M w indeksie dolnym odpowiada mieszaninie szczepów, a F oznacza fenol).

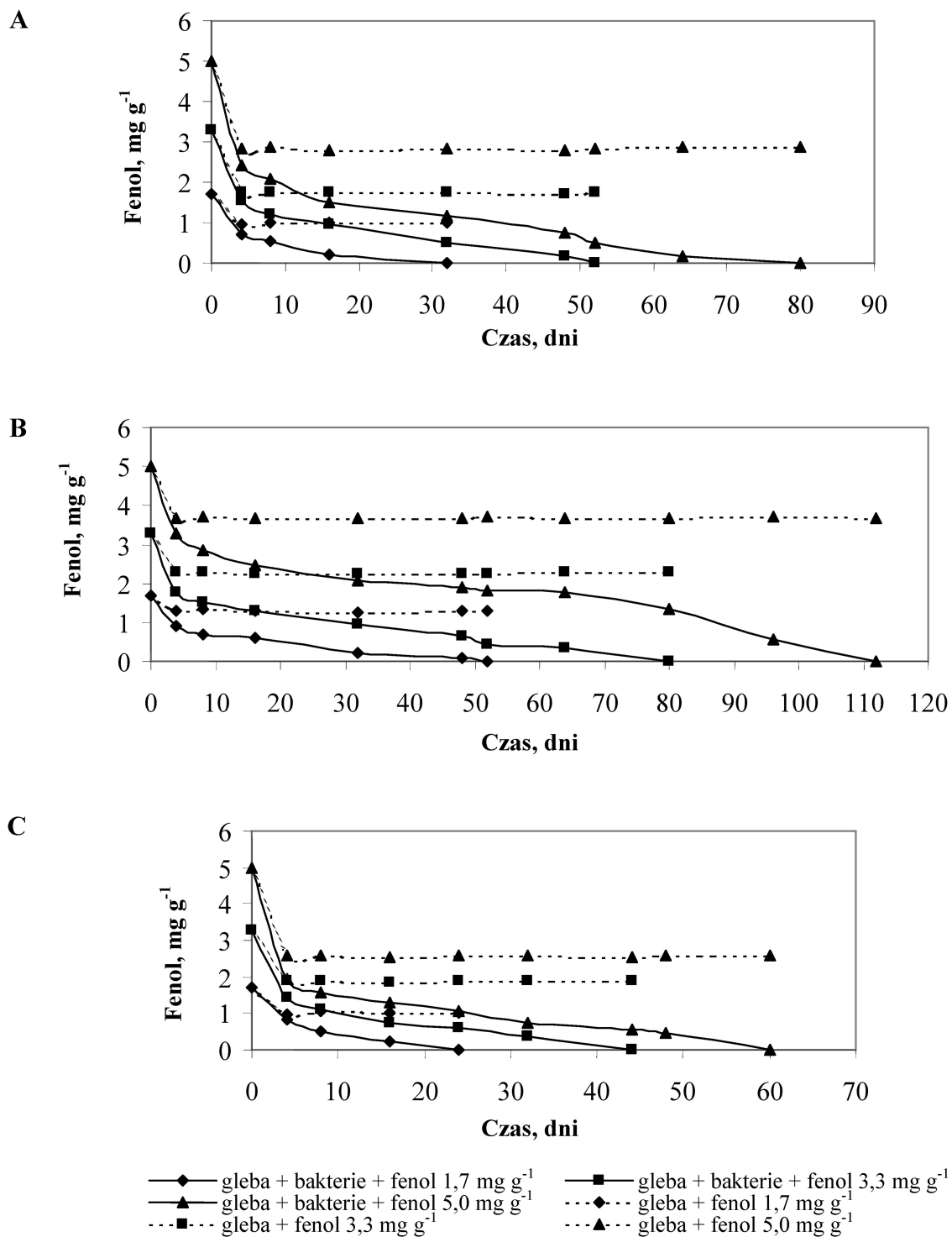
Rozkład fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} zachodził w krótszym czasie niż przez pojedynczo wprowadzone do nich szczepy. W glebie L1_{F+M} całkowitą degradację tego związku w dawce 1,7 mg g⁻¹ stwierdzono w 32. dniu, w glebie L2_{F+M} był to 52. dzień, a w glebie G_{F+M} — 24. dzień. Fenol w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ ulegał rozkładowi w tych glebach odpowiednio w ciągu 52, 80 i 44 dni, a w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ — w czasie 80, 112 i 60 dni. Podobnie do gleb z pojedynczo wprowadzonymi szczepami, największy ubytek wprowadzonych do nich stężeń fenolu następował w ciągu pierwszych 4 dni inkubacji. W glebie L1_{F+M} wynosił on 51,48—58,24%, w glebie L2_{F+M} — 34—47,06%, a w glebie G_{F+M} stanowił 52,35—61,20%. W glebach kontrolnych ubytek zastosowanych stężeń fenolu był mniejszy i kształtował się następująco: w przedziale 42,94—46,36% w glebie L1_F, w zakresie 23,53—30,30% w glebie L2_F i w granicach 41,76—48,20% w glebie G_F. W kolejnych dniach stężenie fenolu w glebach kontrolnych utrzymywało się na podobnym poziomie, a w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} zmniejszało się, co świadczyło o postępującym rozkładzie fenolu przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. Dynamikę rozkładu wzrastających stężeń fenolu przez te szczepy w glebach L1, L2 i G ilustruje rys. 10.

4.1.10. Przeżywalność szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 po wprowadzeniu do gleb

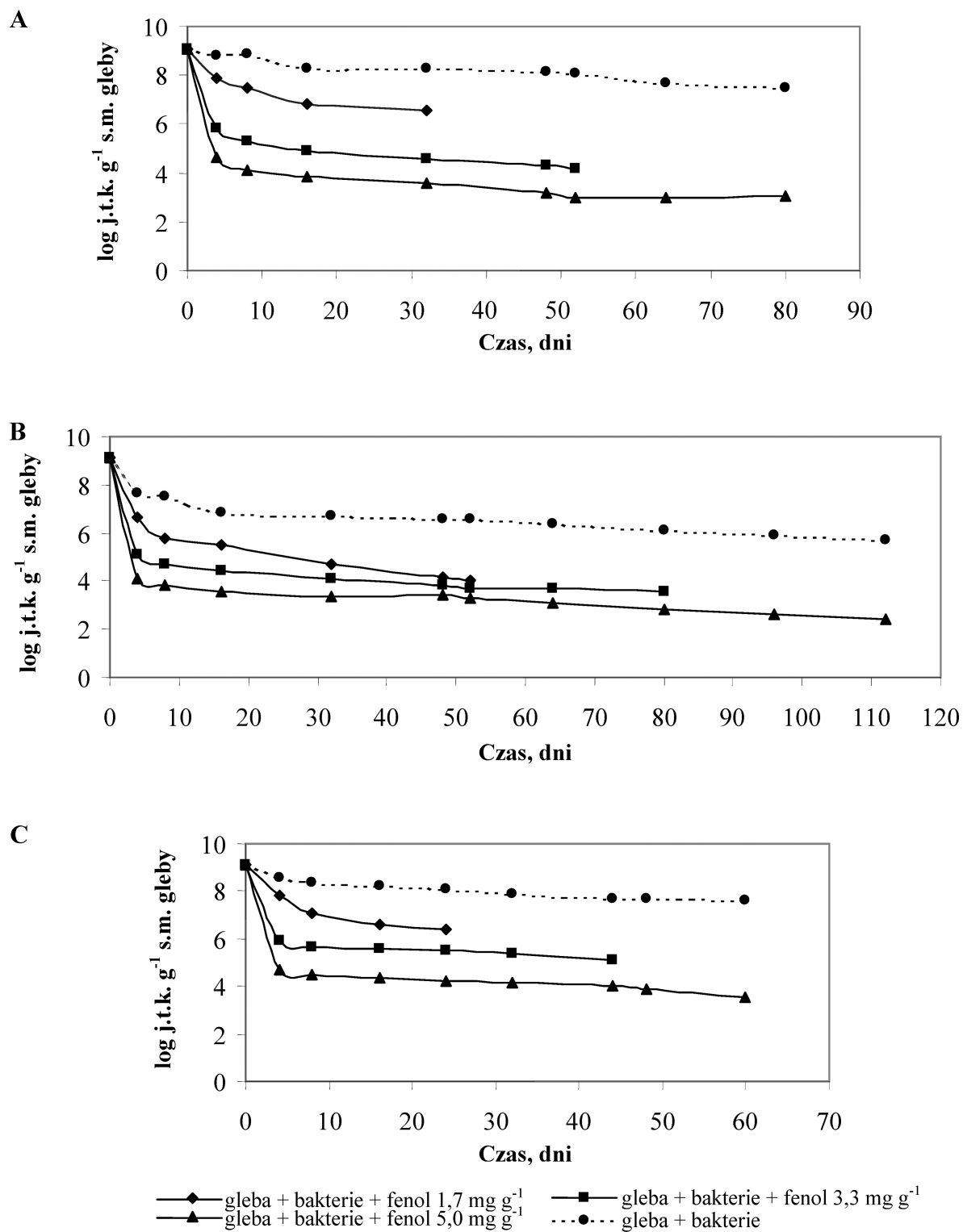
Przeżywalność szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 badano w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz w glebach kontrolnych L1_M, L2_M i G_M niezawierających fenolu. Stwierdzono, że przeżywalność każdego z nich w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} zanieczyszczonych fenolem w dawce 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ była podobna, a w obecności najwyższego stężenia tego związku, czyli 5,0 mg g⁻¹, lepiej rósł w nich szczep *Pseudomonas* sp. JS150. Największy spadek wprowadzonej liczby komórek obu szczepów w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} oznaczano w ciągu pierwszych 4 dni inkubacji. Im wyższą dawką fenolu skażano gleby, tym spadek liczby bakterii w tym czasie był większy. Na przykład w glebie L1_{F+M} z dodatkiem fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ ubyło 13,74% wyjściowej liczby komórek *Pseudomonas vesicularis* i 12,42% *Pseudomonas* sp. JS150, a w tej samej glebie z dodatkiem 5,0 mg g⁻¹ fenolu — odpowiednio 48,90% i 41,76%. Dla porównania: w glebie L1_M liczba komórek *Pseudomonas vesicularis* zmniejszyła się w tym czasie o 3,50%, a *Pseudomonas* sp. JS150 o 1,00%. W porównaniu z *Pseudomonas vesicularis* szczep *Pseudomonas* sp. JS150 charakteryzował się lepszym wzrostem w glebach kontrolnych L1_M i G_M. Liczba komórek tego szczepu była w nich wyższa od tej, jaką do nich wprowadzano. Przeżywalność obu szczepów w glebach L1, L2 i G zarówno w obecności, jak i nieobecności fenolu ilustrują rys. 11 i 12.

4.1.11. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach z wprowadzoną mieszaniną szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150

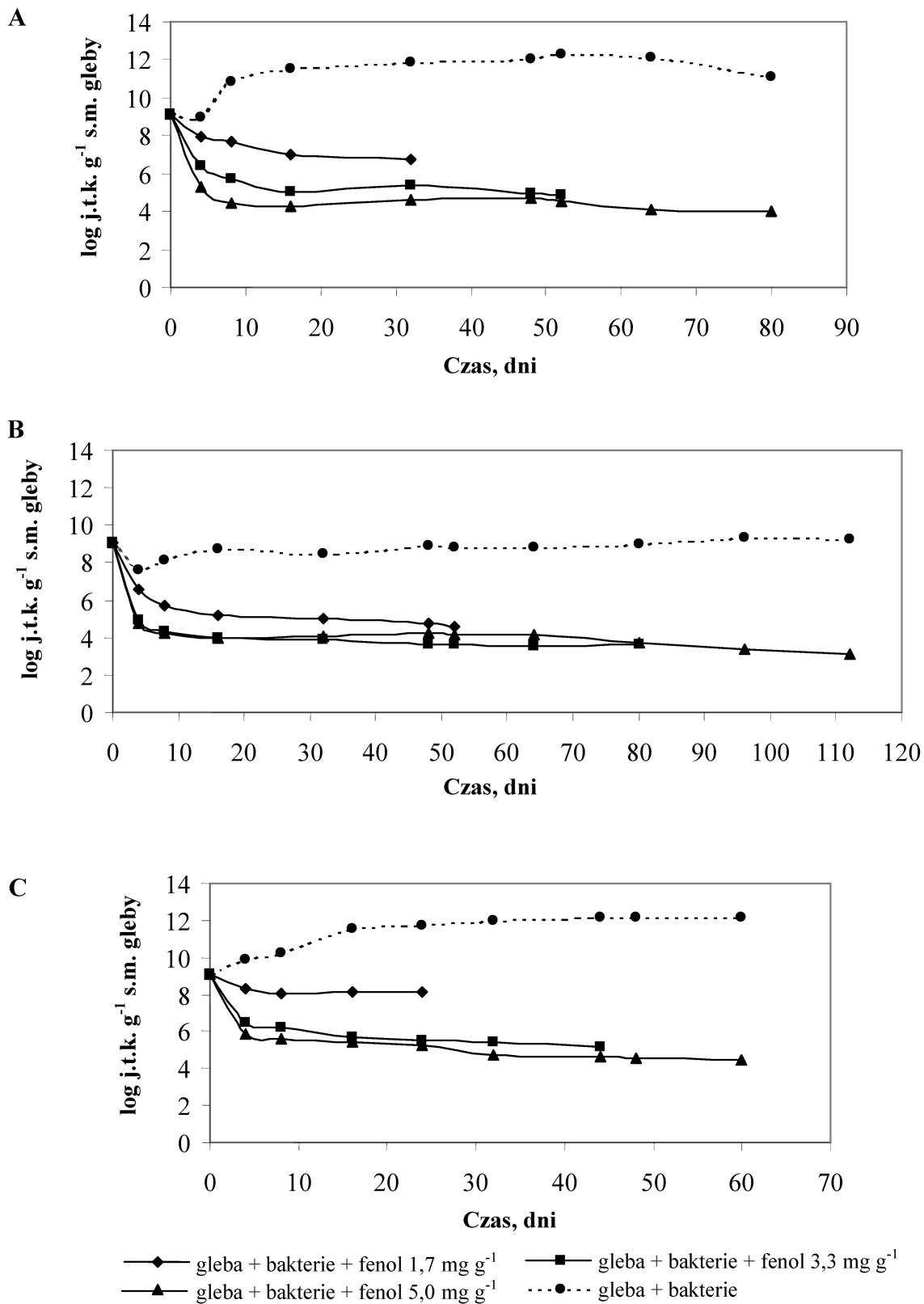
Na podstawie oznaczeń zawartości materii organicznej i węgla organicznego przed i po degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹



Rys. 10. Dynamika rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebie L1 (A), L2 (B) oraz G (C) przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 oraz zmiany stężenia fenolu w glebach sterylnych



Rys. 11. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas vesicularis* wprowadzonego w mieszaniu z *Pseudomonas* sp. JS150 do gleb L1 (A), L2 (B) i G (C) w czasie rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz w glebach kontrolnych (nieskażonych)



Rys. 12. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 wprowadzonego w mieszaninie z *Pseudomonas vesicularis* do gleb L1 (A), L2 (B) i G (C) w czasie rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ oraz w glebach kontrolnych (nieskażonych)

Tabela 27
Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH przed i po degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) w glebach L1, L2 i G przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas sp. JS150* oraz w glebach kontrolnych (D)

Właściwości	Gleba															
	L1 _F		L1 _{F+M}		L2 _F		L2 _{F+M}		G _F		G _{F+M}					
	dzień 1.	dzień 32.	dzień 1.	dzień 32.	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 24.	dzień 1.	dzień 24.				
Materia organiczna, %	15,30 ± 0,11	15,33 ± 0,25	15,62 ± 0,18	15,19 ± 0,10	2,12 ± 0,08	2,14 ± 0,09	2,17 ± 0,13	2,07 ± 0,70	21,16 ± 0,63	21,18 ± 0,36	21,99 ± 0,41	21,45 ± 0,52				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,61 ± 0,07	1,62 ± 0,13	1,69 ± 0,15	1,65 ± 0,11	0,47 ± 0,12	0,48 ± 0,06	0,52 ± 0,07	0,50 ± 0,18	2,89 ± 0,18	2,90 ± 0,18	2,95 ± 0,24	2,81 ± 0,34				
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,09	2,90 ± 0,20	2,90 ± 0,24	2,56 ± 0,18	1,40 ± 0,15	1,41 ± 0,16	1,40 ± 0,19	1,31 ± 0,23	3,80 ± 0,24	3,82 ± 0,12	3,80 ± 0,17	3,62 ± 0,25				
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,02				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01				
pH	7,56 ± 0,06	7,47 ± 0,18	7,55 ± 0,12	6,91 ± 0,13	6,82 ± 0,10	6,75 ± 0,11	6,82 ± 0,10	6,40 ± 0,14	6,70 ± 0,15	6,68 ± 0,13	6,70 ± 0,09	6,53 ± 0,14				

Właściwości	Gleba															
	L1 _F		L1 _{F+M}		L2 _F		L2 _{F+M}		G _F		G _{F+M}					
	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 44.	dzień 1.	dzień 44.				
Materia organiczna, %	15,37 ± 0,11	15,40 ± 0,30	15,74 ± 0,18	15,30 ± 0,33	2,17 ± 0,10	2,16 ± 0,13	2,21 ± 0,11	2,11 ± 0,13	21,20 ± 0,17	21,19 ± 0,47	22,07 ± 0,57	21,35 ± 0,35				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,65 ± 0,09	1,68 ± 0,14	1,74 ± 0,11	1,69 ± 0,08	0,48 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,57 ± 0,06	0,54 ± 0,06	2,99 ± 0,09	3,00 ± 0,21	3,00 ± 0,19	2,84 ± 0,19				
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,06	2,89 ± 0,16	2,91 ± 0,10	2,61 ± 0,21	1,41 ± 0,11	1,40 ± 0,13	1,40 ± 0,18	1,31 ± 0,20	3,80 ± 0,10	3,81 ± 0,13	3,80 ± 0,11	3,59 ± 0,20				
Hum, mg g ⁻¹	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,19 ± 0,02				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01				
pH	7,45 ± 0,03	7,45 ± 0,14	7,50 ± 0,04	7,10 ± 0,16	6,61 ± 0,15	6,51 ± 0,11	6,69 ± 0,06	6,40 ± 0,13	6,60 ± 0,06	6,44 ± 0,12	6,67 ± 0,14	6,30 ± 0,15				

Właściwości	Gleba															
	L1 _F		L1 _{F+M}		L2 _F		L2 _{F+M}		G _F		G _{F+M}					
	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 60.	dzień 1.	dzień 60.				
Materia organiczna, %	15,40 ± 0,16	15,42 ± 0,22	15,80 ± 0,11	15,35 ± 0,24	2,19 ± 0,13	2,20 ± 0,14	2,18 ± 0,11	2,08 ± 0,09	21,30 ± 0,38	21,28 ± 0,43	22,71 ± 0,37	21,96 ± 0,31				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,79 ± 0,06	1,80 ± 0,09	1,80 ± 0,08	1,75 ± 0,14	0,48 ± 0,06	0,49 ± 0,07	0,52 ± 0,06	0,49 ± 0,07	3,04 ± 0,11	3,01 ± 0,16	3,08 ± 0,13	2,91 ± 0,11				
Ful, mg g ⁻¹	2,91 ± 0,08	2,90 ± 0,11	3,01 ± 0,07	2,70 ± 0,17	1,41 ± 0,11	1,41 ± 0,12	1,40 ± 0,09	1,27 ± 0,06	3,80 ± 0,19	3,80 ± 0,14	3,80 ± 0,18	3,51 ± 0,14				
Hum, mg g ⁻¹	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01				
pH	7,15 ± 0,04	7,07 ± 0,08	7,12 ± 0,04	7,10 ± 0,09	6,40 ± 0,11	6,31 ± 0,09	6,50 ± 0,07	6,20 ± 0,10	6,40 ± 0,13	6,31 ± 0,09	6,50 ± 0,10	6,29 ± 0,08				

Właściwości	Gleba															
	L1 _M				L2 _M				G _M							
	dzień 1.	dzień 32.	dzień 52.	dzień 80.	dzień 1.	dzień 52.	dzień 80.	dzień 112.	dzień 1.	dzień 24.	dzień 44.	dzień 60.				
Materia organiczna, %	15,70 ± 0,12	15,10 ± 0,17	14,12 ± 0,21	12,41 ± 0,23	2,67 ± 0,12	2,27 ± 0,11	2,11 ± 0,12	2,00 ± 0,18	20,88 ± 0,63	20,88 ± 0,63	19,25 ± 0,56	18,84 ± 0,38				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,67 ± 0,11	1,57 ± 0,12	1,48 ± 0,14	1,30 ± 0,18	0,53 ± 0,06	0,48 ± 0,06	0,40 ± 0,05	0,37 ± 0,05	3,11 ± 0,16	2,91 ± 0,23	2,74 ± 0,18	2,45 ± 0,16				
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,11	2,83 ± 0,16	2,71 ± 0,09	2,56 ± 0,16	1,41 ± 0,13	1,30 ± 0,18	1,28 ± 0,09	1,28 ± 0,11	3,80 ± 0,26	3,62 ± 0,22	3,40 ± 0,21	3,20 ± 0,24				
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,00				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,01				
pH	7,99 ± 0,05	7,85 ± 0,06	7,62 ± 0,12	7,25 ± 0,07	7,16 ± 0,06	6,72 ± 0,10	6,50 ± 0,12	6,40 ± 0,10	6,88 ± 0,14	6,68 ± 0,09	6,49 ± 0,12	6,35 ± 0,08				

Objaśnienia: L1_F, L2_F, G_F — gleby sterylne skażone fenolem; L1_M, L2_M, G_M — gleby z wprowadzonymi szczepami nieskażone fenolem; L1_{F+M}, L2_{F+M}, G_{F+M} — gleby skażone fenolem z wprowadzonymi szczepami. Średnia ±SD.

i 5,0 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} stwierdzono, że ich ubytek był podobny niezależnie od wprowadzonej dawki tego związku. W glebie L1_{F+M} było średnio 0,45% materii organicznej i 2,70% węgla organicznego, w glebie L2_{F+M} odpowiednio 0,10% i 5,00%, a w G_{F+M} — 0,70% i 5,00%. W glebach tych następował także spadek zawartości kwasów fulwowych, w L1_{F+M} o około 0,30 mg g⁻¹, w L2_{F+M} o 0,10 mg g⁻¹, a w G_{F+M} o 0,22 mg g⁻¹ gleby. W glebach kontrolnych ubytek materii organicznej i węgla organicznego był większy i wynosił odpowiednio 3,29% i 22,16% w L1_M, 0,67% i 30,19% w L2_M oraz 4,10% i 21,22% w G_M. Kwasów fulwowych ubyło z nich 0,34 mg g⁻¹, 0,13 mg g⁻¹ i 0,20 mg g⁻¹ gleby. Jednocześnie stwierdzono, że zawartość kwasów huminowych i hymatomelanowych nie zmieniała się zarówno w skażonych fenolem glebach z introdukowaną mieszaniną szczepów, jak i w glebach kontrolnych. Zmiany odczynu pH były niewielkie i nie przekraczały 1 jednostki w skali pH. Przedstawione wyniki ilustruje tabela 27.

4.1.12. Analiza kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebach przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150

Wpływ różnych dawek fenolu na profil kwasów tłuszczowych izolowanych z gleb L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} po wprowadzeniu do nich mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 oceniano, porównując skład kwasów w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń oraz z profilami kwasów pochodzących z gleb kontrolnych L1_M, L2_M i G_M.

W glebach L1_{F+M} i G_{F+M}, w których rozkład fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 zachodził w krótszym czasie niż w L2_{F+M}, do dnia 8. obserwowano niewielki wzrost zawartości procentowej kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych. Wynosił on odpowiednio 4,78% i 3,28% kwasów prostołańcuchowych oraz 3,61% i 1,44% kwasów rozgałęzionych. W glebie L2_{F+M} wzrost udziału tych kwasów następował do dnia 16. i był większy niż w glebach L1_{F+M} i G_{F+M}, gdyż wynosił 9,94% kwasów prostołańcuchowych i 4,69% rozgałęzionych. Dla porównania w glebie kontrolnej L1_M zawartość kwasów prostołańcuchowych

w tym czasie się nie zmieniała, w G_M zmniejszyła się o 1,67%, a zawartość kwasów rozgałęzionych w obu glebach zmalała o około 2%. Z kolei w glebie L2_M udział kwasów prostołańcuchowych do dnia 16. zmalał o 2,33%, a rozgałęzionych wzrósł o 1,78%. Hydroksokwasów w glebie L1_{F+M} ubywało w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń z 4,27% w dniu 1. do 1,45% w dniu 32., z L2_{F+M} nie izolowano ich od dnia 8., a w glebie G_{F+M} w dniach od 1. do 24. ich zawartość zawierała się w przedziale 2,92—4,51%. W nieskażonych fenolem glebach L1_M i G_M zawartość kwasów hydroksylowych w czasie trwania eksperymentu systematycznie malała i w ostatnim dniu prowadzenia analiz zmniejszyła się o około 1,50%, natomiast w glebie L2_M po spadku ich udziału do dnia 8. z 4,22% do 3,11% obserwowano ponowny jego wzrost do około 4,00%. Nowy kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω10c izolowano z gleb L1_{F+M} i G_{F+M} od dnia 8., a z L2_{F+M} — od dnia 32. Najwyższym udziałem charakteryzował się on wśród FAMES uzyskanych z gleby L2_{F+M} (14,66—19,33%), niższym (9,18—17,78%) z G_{F+M}, a najniższym (7,21—15,44%) z L1_{F+M}. Od dnia, w którym pojawiał się on wśród izolowanych FAMES, zawartość drugiego kwasu o budowie cyklicznej 17:0 cy zmniejszała się i wynosiła około 1% lub nie występował on w uzyskanym profilu kwasów. W odróżnieniu od gleb skażonych fenolem, w glebach kontrolnych L1_M i G_M udział kwasu 17:0 cy zwiększał się lub, jak w glebie L2_M, pozostawał na podobnym poziomie. Obserwowanym w obecności fenolu zmianom w zawartości poszczególnych grup kwasów tłuszczowych w komórkach bakterii towarzyszył wzrost wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych do dnia, w którym udział kwasu z pierścieniem cyklopropanowym 19:0 cy ω10c był najwyższy. W 16. dniu w glebach L1_{F+M} i G_{F+M} wynosił odpowiednio 6,50 i 6,39, a w dniu 32. w L2_{F+M} — 4,82. W glebach kontrolnych L1_M, L2_M i G_M różnice w zawartości kwasów z poszczególnych grup nie miały znaczącego wpływu na wartość stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w kolejnych dniach prowadzenia analiz. Wartości tego stosunku kształtowały się w następujących przedziałach: 2,22—2,49 w L1_M, 2,01—2,61 w L2_M i 2,27—2,83 w G_M. Zmiany w udziale procentowym kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} oraz w glebach kontrolnych przedstawiają tabele 28—30.

W kolejnym etapie analizowano wpływ fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ na zawartość procentową wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych u szcze-

Tabela 28

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _M	35,74 ^a	27,62 ^a	4,24 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	28,64 ^a	2,49
	L1 _{F+M}	36,76 ^b	26,75 ^b	4,27 ^a	3,19 ^b	3,19 ^b	0,00 ^a	29,03 ^a	2,44
Dzień 4.	L1 _M	38,73 ^c	26,21 ^{c,e}	3,83 ^b	3,20 ^c	3,20 ^c	0,00 ^a	29,03 ^a	2,44
	L1 _{F+M}	40,44 ^d	27,06 ^{c,b}	3,16 ^c	5,60 ^d	5,60 ^d	0,00 ^a	23,74 ^b	3,21
Dzień 8.	L1 _M	36,02 ^a	25,51 ^c	2,98 ^d	5,16 ^e	5,16 ^e	0,00 ^a	30,33 ^c	2,30
	L1 _{F+M}	41,54 ^e	30,36 ^d	2,28 ^e	8,37 ^f	1,16 ^f	7,21 ^b	17,45 ^d	4,73
Dzień 16.	L1 _M	35,74 ^a	25,05 ^c	2,45 ^f	5,70 ^g	5,70 ^g	0,00 ^a	31,06 ^c	2,22
	L1 _{F+M}	38,94 ^f	29,34 ^d	1,94 ^g	16,41 ^h	0,97 ^h	15,44 ^c	13,37 ^e	6,50
Dzień 32.	L1 _M	35,16 ^a	26,76 ^{a,e}	2,77 ^d	5,91 ⁱ	5,91 ⁱ	0,00 ^a	29,40 ^a	2,40
	L1 _{F+M}	33,49 ^g	28,13 ^f	1,45 ^h	8,41 ^j	0,00 ⁱ	8,41 ^d	28,52 ^f	2,51

Objasnienia: L1_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; L1_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

Tabela 29

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	L2 _M	38,02 ^a	26,11 ^a	4,22 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	27,89 ^a	2,59
	L2 _{F+M}	36,38 ^b	26,81 ^a	4,01 ^b	3,19 ^b	3,19 ^b	0,00 ^a	29,61 ^b	2,38
Dzień 4.	L2 _M	34,06 ^c	27,99 ^b	3,26 ^c	3,92 ^c	3,92 ^c	0,00 ^a	30,77 ^c	2,25
	L2 _{F+M}	40,28 ^d	29,32 ^c	1,17 ^d	2,27 ^d	2,27 ^d	0,00 ^a	26,96 ^d	2,71
Dzień 8.	L2 _M	37,56 ^e	24,75 ^d	3,11 ^e	4,03 ^c	4,03 ^e	0,00 ^a	30,55 ^b	2,27
	L2 _{F+M}	44,32 ^f	29,94 ^e	0,00 ^f	2,06 ^d	2,06 ^f	0,00 ^a	23,68 ^e	3,22
Dzień 16.	L2 _M	35,69 ^g	27,89 ^b	4,02 ^g	3,79 ^{a,c}	3,79 ^{a,c,e}	0,00 ^a	28,61 ^a	2,50
	L2 _{F+M}	46,32 ^h	31,50 ^f	0,00 ^f	2,32 ^d	2,32 ^d	0,00 ^a	19,86 ^f	4,04
Dzień 32.	L2 _M	38,30 ⁱ	26,17 ^{a,i}	4,15 ^a	3,67 ^{a,c}	3,67 ^a	0,00 ^a	27,71 ^a	2,61
	L2 _{F+M}	39,32 ^j	27,50 ^g	0,00 ^f	16,00 ^e	0,00 ^g	16,00 ^b	17,18 ^g	4,82
Dzień 48.	L2 _M	35,16 ^k	28,05 ^b	3,61 ^h	3,90 ^{a,c}	3,90 ^{c,e}	0,00 ^a	29,28 ^h	2,42
	L2 _{F+M}	35,57 ^l	25,14 ^h	0,00 ^f	19,33 ^f	0,00 ^g	19,33 ^c	17,96 ⁱ	4,57
Dzień 52.	L2 _M	33,31 ^l	25,65 ⁱ	4,00 ^g	4,02 ^c	4,02 ^{c,e}	0,00 ^a	33,02 ^j	2,01
	L2 _{F+M}	36,94 ^b	24,18 ⁱ	0,00 ^f	14,66 ^g	0,00 ^g	14,66 ^d	24,22 ^e	3,13

Objasnienia: L2_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; L2_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

Tabela 30

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	G _M	36,73 ^a	29,00 ^a	4,66 ^a	3,52 ^a	3,52 ^a	0,00 ^a	26,09 ^a	2,83
	G _{F+M}	36,16 ^a	28,37 ^{a,c}	4,51 ^b	3,16 ^b	3,16 ^b	0,00 ^a	27,80 ^b	2,72
Dzień 4.	G _M	34,02 ^b	26,51 ^b	4,70 ^a	4,21 ^c	4,21 ^c	0,00 ^a	30,56 ^c	2,27
	G _{F+M}	39,40 ^c	27,46 ^{c,e}	3,05 ^c	2,01 ^d	2,01 ^d	0,00 ^a	24,48 ^d	3,08
Dzień 8.	G _M	35,06 ^d	27,23 ^b	3,76 ^d	4,65 ^e	4,65 ^e	0,00 ^a	29,30 ^e	2,41
	G _{F+M}	39,44 ^c	29,81 ^d	2,92 ^e	10,19 ^f	1,01 ^f	9,18 ^b	17,64 ^f	4,69
Dzień 16.	G _M	35,70 ^e	28,61 ^a	3,45 ^f	4,80 ^e	4,80 ^e	0,00 ^a	27,44 ^g	2,64
	G _{F+M}	38,69 ^c	26,85 ^{e,f}	3,14 ^g	17,78 ^g	0,00 ^g	17,78 ^c	13,54 ^h	6,39
Dzień 24.	G _M	34,12 ^{a,b,d,e}	29,01 ^a	2,95 ^h	4,16 ^c	4,16 ^c	0,00 ^a	29,76 ^e	2,36
	G _{F+M}	37,50 ^f	26,00 ^f	3,04 ^{c,e,h}	11,00 ^h	0,00 ^g	11,00 ^d	22,46 ⁱ	3,45

Objasnienia: G_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; G_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

pów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w czasie rozkładu tego związku w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M}. Podobnie jak w poprzedniej serii, u bakterii w glebach L1_{F+M} i G_{F+M} wzrost zawartości kwasów prostołańcuchowych obserwowano do dnia 8., a w L2_{F+B} do dnia 16. Wynosił on w tym czasie w glebie L1_{F+M} — 9,31%, w glebie L2_{F+B} — 8,12%, a w glebie G_{F+M} — 1,4%. Kwasów rozgałęzionych oznaczano w tych dniach w glebie L1_{F+M} o 10,56% więcej, w L2_{F+M} o 7,87% więcej niż po 24-godzinnej ekspozycji obu szczepów na fenol, a w glebie G_{F+M} o 1,15% więcej. Udział kwasów hydroksylowych w glebie L1_{F+M} w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń zawierał się w przedziale 2,02—3,15%, w glebie G_{F+M} — w zakresie 1,65—4,56%, a w glebie L2_{F+M} do dnia 8. — w granicach 2,15—3,83%. W następnych dniach nie wykrywano już ich wśród izolowanych z gleby L2_{F+M} FAMES. Kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω10c ekstrahowano z gleby L1_{F+M} od dnia 16. (9,99%), z gleby L2_{F+M} od dnia 32. (15,51%), a z gleby G_{F+M} od dnia 8. (12,45%). Jego najwyższy udział w tych glebach był podobny i mieścił się w zakresie 9,99—25,28%. Drugi z kwasów cyklopropanowych 17:0 cy występował u bakterii we wszystkich glebach skażonych fenolem z udziałem: 1,67—3,11% w L1_{F+M}, 3,28—4,23% w L2_{F+M} i 1,17—3,12% w G_{F+M} do dnia, w którym po raz pierwszy ekstrahowano z nich kwas 19:0 cy ω10c. W kolejnych dniach jego udział zmniejszał się i rzadko przekraczał 1%. Z kolei w glebach nieskażonych fenolem

jego zawartość zwiększała się z 3,76% w 1. dniu do 6,43% w 52. dniu w glebie L1_M, z 3,52% w 1. dniu do 4,90% w 44. dniu w glebie G_M, natomiast w L2_M stanowiła około 4,00% przez cały czas trwania eksperymentu. Najwyższą wartość (10,83) stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych osiągał u bakterii w glebie L1_{F+M} w dniu 32., 7,15 w glebie L2_{F+B} w dniu 48. i 6,92 w glebie G_{F+M} w dniu 16. Jednocześnie stwierdzono, że zmiany w zawartości wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych u obu szczepów w glebach kontrolnych nie miały większego wpływu na wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych. Stosunek ten w kolejnych dniach analiz zawierał się w przedziale: 2,19—2,49 w glebie L1_M, 2,25—2,86 w glebie L2_M i 2,14—2,83 w glebie G_M. Zmiany w udziale procentowym analizowanych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} oraz w glebach kontrolnych ilustrują tabele 31—33.

Z analiz chromatograficznych wynika, że fenol w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ też powodował istotne zmiany w składzie kwasów tłuszczowych szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, wprowadzonych w postaci mieszaniny do sterylnych gleb L1, L2 i G. Polegały one na wzroście udziału kwasów: prostołańcuchowych i rozgałęzionych o około 10% w glebie L1_{F+M} do dnia 8., prostołańcuchowych o 11,13% i rozgałęzionych o 5,14% w glebie L2_{F+M} do dnia 16. oraz pro-

Tabela 31

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostołańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _M	35,74 ^a	27,62 ^a	4,24 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	28,64 ^a	2,49
	L1 _{F+M}	36,67 ^b	28,39 ^b	3,15 ^b	3,11 ^b	3,11 ^b	0,00 ^a	28,68 ^a	2,49
Dzień 4.	L1 _M	38,73 ^c	26,21 ^c	3,83 ^c	3,20 ^c	3,20 ^c	0,00 ^a	29,03 ^a	2,44
	L1 _{F+M}	41,12 ^d	36,06 ^d	3,00 ^{b,j}	1,67 ^d	1,67 ^d	0,00 ^a	16,21 ^b	5,17
Dzień 8.	L1 _M	36,02 ^{a,g}	25,51 ^c	2,98 ^d	5,16 ^e	5,16 ^e	0,00 ^a	30,33 ^c	2,30
	L1 _{F+M}	45,98 ^e	38,95 ^e	2,28 ^e	1,70 ^d	1,70 ^d	0,00 ^a	11,09 ^d	8,02
Dzień 16.	L1 _M	35,74 ^{a,g}	25,05 ^e	2,45 ^f	5,70 ^f	5,70 ^f	0,00 ^a	31,06 ^c	2,22
	L1 _{F+M}	41,29 ^d	35,80 ^d	2,44 ^f	10,71 ^g	0,72 ^g	9,99 ^b	9,76 ^e	9,25
Dzień 32.	L1 _M	35,16 ^a	26,76 ^{c,g}	2,77 ^d	5,91 ^h	5,91 ^h	0,00 ^a	29,40 ^a	2,40
	L1 _{F+M}	38,88 ^f	24,84 ^f	2,02 ^g	25,81 ⁱ	0,53 ⁱ	25,28 ^c	8,45 ^f	10,83
Dzień 48.	L1 _M	36,26 ^g	26,27 ^g	2,22 ^h	5,96 ^h	5,96 ^h	0,00 ^a	29,29 ^a	2,41
	L1 _{F+M}	37,00 ^b	25,14 ^f	2,97 ^{b,j}	18,50 ^j	0,41 ^j	18,09 ^d	16,39 ^b	5,10
Dzień 52.	L1 _M	33,51 ^h	26,94 ^g	1,82 ⁱ	6,43 ^k	6,43 ^k	0,00 ^a	31,30 ^c	2,19
	L1 _{F+M}	31,15 ⁱ	27,29 ^h	3,04 ^j	13,99 ^l	0,92 ^l	13,07 ^e	24,53 ^g	3,08

O b j a ś n i e n i a: L1_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; L1_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05).

Tabela 32

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	L2 _M	38,02 ^a	26,11 ^a	4,22 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	27,89 ^a	2,59
	L2 _{F+M}	36,67 ^b	25,98 ^a	3,83 ^b	3,28 ^b	3,28 ^b	0,00 ^a	30,24	2,31
Dzień 4.	L2 _M	34,06 ^c	27,99 ^b	3,26 ^c	3,92 ^c	3,92 ^c	0,00 ^a	30,77	2,25
	L2 _{F+M}	39,15 ^d	28,97 ^c	3,71 ^b	4,11 ^d	4,11 ^d	0,00 ^a	24,06	3,16
Dzień 8.	L2 _M	37,56 ^a	24,75 ^d	3,11 ^d	4,03 ^c	4,03 ^e	0,00 ^a	30,55	2,27
	L2 _{F+M}	41,78 ^e	30,09 ^e	2,15 ^e	4,23 ^d	4,23 ^f	0,00 ^a	21,75	3,60
Dzień 16.	L2 _M	35,69 ^f	27,89 ^b	4,02 ^f	3,79 ^{a,c}	3,79 ^{a,c,e}	0,00 ^a	28,61	2,50
	L2 _{F+M}	44,79 ^g	33,85 ^f	0,00 ^g	3,57 ^e	3,57 ^f	0,00 ^a	17,79	4,62
Dzień 32.	L2 _M	38,30 ^h	26,17 ^a	4,15 ^a	3,67 ^{a,c}	3,67 ^a	0,00 ^a	27,71	2,61
	L2 _{F+M}	40,54 ⁱ	28,69 ^c	0,00 ^g	16,65 ^f	1,14 ^h	15,51 ^b	14,12	6,08
Dzień 48.	L2 _M	35,16 ^j	28,05 ^b	3,61 ^h	3,90 ^{a,c}	3,90 ^{a,c,e}	0,00 ^a	29,28	2,42
	L2 _{F+M}	37,75 ^k	27,16 ^g	0,00 ^g	22,82 ^g	0,53 ⁱ	22,29 ^c	12,27	7,15
Dzień 64.	L2 _M	37,85 ^h	28,61 ^b	3,77 ⁱ	3,86 ^{a,c}	3,86 ^{a,c}	0,00 ^a	25,91	2,86
	L2 _{F+M}	38,47 ^l	26,29 ^a	0,00 ^g	18,79 ^h	0,70 ^j	18,09 ^d	16,45	5,08
Dzień 80.	L2 _M	38,28 ^h	28,30 ^b	3,13 ^c	3,49 ⁱ	3,49 ^k	0,00 ^a	26,80	2,73
	L2 _{F+M}	35,50 ^l	25,99 ^a	0,00 ^g	15,12 ^j	1,62 ^l	13,50 ^e	23,39	3,28

Objaśnienia: L2_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; L2_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

Tabela 33

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostoańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	G _M	36,73 ^a	29,00 ^a	4,66 ^a	3,52 ^a	3,52 ^a	0,00 ^a	26,09 ^a	2,83
	G _{F+M}	38,62 ^{b,g}	28,53 ^a	4,51 ^a	3,12 ^b	3,12 ^b	0,00 ^a	25,22	2,97
Dzień 4.	G _M	34,02 ^c	26,51 ^b	4,70 ^a	4,21 ^c	4,21 ^c	0,00 ^a	30,56 ^b	2,27
	G _{F+M}	39,50 ^{b,e}	29,51 ^a	4,56 ^a	2,60 ^d	2,60 ^d	0,00 ^a	23,83 ^c	3,20
Dzień 8.	G _M	35,06 ^d	27,23 ^b	3,76 ^b	4,65 ^e	4,65 ^e	0,00 ^a	29,30 ^d	2,41
	G _{F+M}	40,02 ^e	29,68 ^a	3,00 ^c	15,62 ^f	1,17 ^f	12,45 ^b	13,68 ^e	6,31
Dzień 16.	G _M	35,70 ^f	28,61 ^a	3,45 ^d	4,80 ^g	4,80 ^{e,h}	0,00 ^a	27,44 ^f	2,64
	G _{F+M}	38,83 ^g	22,46 ^c	2,73 ^e	23,36 ^h	0,56 ^g	22,80 ^c	12,62 ^g	6,92
Dzień 32.	G _M	34,84 ^{e,d}	25,50 ^d	2,92 ^f	4,93 ^g	4,93 ^h	0,00 ^a	31,81 ^h	2,14
	G _{F+M}	36,44 ^h	20,94 ^e	1,65 ^g	24,79 ⁱ	0,70 ⁱ	24,09 ^d	16,18 ⁱ	5,18
Dzień 44.	G _M	33,80 ^c	26,92 ^b	3,04 ^f	4,90 ^g	4,90 ^{e,h}	0,00 ^a	31,34 ^h	2,19
	G _{F+M}	35,89 ^h	20,60 ^e	1,69 ^g	19,93 ^j	0,84 ^j	19,09 ^e	21,89 ^j	3,57

Objaśnienia: G_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; G_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

stołańcuchowych o 8,88% i rozgałęzionych o 0,95% w G_{F+M} do dnia 4. Dla porównania w tym czasie zawartość kwasów prostoańcuchowych w glebie L1_M zwiększyła się o 0,28%, a kwasów rozgałęzionych — zmniejszyła się o 2,11%, w glebie L2_M zmniejszyła się o 2,33% zawartość kwasów prostoańcuchowych i zwiększyła się o 1,78%

zawartość kwasów rozgałęzionych, a w glebie G_M zmniejszyła się o 2,71% zawartość kwasów prostoańcuchowych i o 2,49% rozgałęzionych. W kolejnych dniach w glebach skażonych fenolem zawartość kwasów z tych grup malała i w ostatnim dniu prowadzenia analiz była podobna do oznaczanej w dniu 1., a w glebach nieskażonych utrzymy-

wała się na podobnym poziomie. Udział hydroksykwasów w czasie trwania eksperymentu w glebie L1_{F+M} kształtował się w przedziale 1,09—4,16%, w glebie G_{F+M} — w granicach 3,19—4,81%, a w glebie L2_{F+M} do dnia 32. był to przedział 4,15—4,22%. W kolejnych dniach pomiarów w glebie L2_{F+M} nie wykrywano ich obecności wśród otrzymanych FAMES. W nieskażonych glebach kontrolnych zawartość kwasów hydroksylowych była nieznacznie wyższa i zawierała się w przedziale 2,06—4,24% w glebie L1_M, w zakresie 3,11—4,22% w glebie L2_M i w granicach 2,92—4,70% w glebie G_M. Stwierdzono, że im wyższym stężeniem fenolu skażano glebę, tym więcej izolowano z nich kwasu cyklopropanowego 19:0 cy ω10c. Jego udział w glebie L1_{F+M} od dnia 16. do dnia 80. zawierał się w przedziale 9,41—29,29%, w glebie L2_{F+M} od dnia 32. do dnia 112. mieścił się w granicach 13,50—27,21%, a w glebie G_{F+M} od dnia 8. do 60. — w zakresie 14,05—27,82%. Towarzyszył mu w tych dniach w glebach L2_{F+M} i G_{F+M} kwas 17:0 cy, z udziałem około 1%, a w glebie L1_{F+M} od dnia 32. nie oznaczano go wśród uzyskanych FAMES. Dla porówna-

nia w kontrolnej glebie L1_M zawartość kwasu z pierścieniem cyklopropanowym 17:0 cy od dnia 8. (5,16%) zwiększała się i w dniu 80. wynosiła 6,30%, w glebie L2_M utrzymywała się w podobnym zakresie 3,44—4,03%, a w glebie G_M wzrosła z 3,52% w dniu 1. do 4,81% w dniu 60. Stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych zwiększał się w glebie L1_{F+M} do dnia 32., w którym osiągał najwyższą wartość 15,47, w glebie L2_{F+M} był to dzień 64. (8,94), a w glebie G_{F+M} — dzień 16. (12,42). Dla porównania, w glebach kontrolnych L1_M, L2_M i G_M zawierał się w przedziale 1,94—2,97. Procentową zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M} oraz w glebach kontrolnych zawierają tabele 34—36.

Porównanie zmian zachodzących w obecności różnych stężeń fenolu w składzie komórkowych kwasów tłuszczowych szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, wprowadzonych w postaci mieszaniny do sterylnych gleb L1, L2 i G, prezentuje rys. 13.

Tabela 34

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L1

Gleba L1		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostotańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω10c		
Dzień 1.	L1 _M	35,74 ^a	27,62 ^a	4,24 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	28,64 ^a	2,49
	L1 _{F+M}	37,16 ^b	28,11 ^a	4,16 ^a	3,66 ^a	3,66 ^a	0,00 ^a	26,91 ^b	2,72
Dzień 4.	L1 _M	38,73 ^c	26,21 ^{b,f}	3,83 ^b	3,20 ^b	3,20 ^b	0,00 ^a	29,03 ^a	2,44
	L1 _{F+M}	41,67 ^d	31,97 ^c	1,82 ^c	1,57 ^c	1,57 ^c	0,00 ^a	22,97 ^c	3,35
Dzień 8.	L1 _M	36,02 ^{a,h}	25,51 ^b	2,98 ^d	5,16 ^d	5,16 ^d	0,00 ^a	30,33 ^d	2,30
	L1 _{F+M}	47,41 ^f	37,77 ^d	1,74 ^e	1,47 ^c	1,47 ^c	0,00 ^a	11,61 ^e	7,61
Dzień 16.	L1 _M	35,74 ^{a,h}	25,05 ^b	2,45 ^e	5,70 ^e	5,70 ^e	0,00 ^a	31,06 ^{d,i}	2,22
	L1 _{F+M}	40,77 ^g	33,97 ^e	1,44 ^f	15,58 ^f	1,29 ^f	14,29 ^b	8,23 ^f	11,14
Dzień 32.	L1 _M	35,16 ^a	26,76 ^f	2,77 ^d	5,91 ^e	5,91 ^g	0,00 ^a	29,40 ^a	2,40
	L1 _{F+M}	35,34 ^a	28,21 ^a	1,09 ^g	29,29 ^g	0,00 ^h	29,29 ^c	6,07 ^g	15,47
Dzień 48.	L1 _M	36,26 ^h	26,27 ^f	2,22 ^h	5,96 ^e	5,96 ^{g,j}	0,00 ^a	29,29 ^{a,d}	2,41
	L1 _{F+M}	35,61 ^a	29,16 ^g	1,99 ^h	25,22 ^h	0,00 ^h	25,22 ^d	8,02 ^f	11,47
Dzień 64.	L1 _M	32,70 ⁱ	27,16 ^f	2,06 ⁱ	6,68 ⁱ	6,68 ⁱ	0,00 ^a	31,40 ⁱ	2,19
	L1 _{F+M}	38,24 ^j	31,50 ^h	2,53 ^j	15,26 ^j	0,00 ^h	15,26 ^e	12,47 ^j	7,02
Dzień 80.	L1 _M	30,66 ^k	26,54 ^f	2,44 ^e	6,30 ⁱ	6,30 ^{i,j}	0,00 ^a	34,06 ^k	1,94
	L1 _{F+M}	36,27 ^l	30,54 ⁱ	2,68 ^j	9,41 ^k	0,00 ^h	9,41 ^f	21,10 ^l	3,74

O b j a ś n i e n i a : L1_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; L1_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

Tabela 35

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie L2

Gleba L2		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostotańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	L2 _M	38,02 ^{a,h}	26,11 ^a	4,22 ^a	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	27,89 ^a	2,59
	L2 _{F+M}	36,50 ^b	24,97 ^b	4,16 ^a	3,48 ^b	3,48 ^b	0,00 ^a	30,89 ^b	2,24
Dzień 4.	L2 _M	34,06 ^c	27,99 ^{c,h}	3,26 ^b	3,92 ^c	3,92 ^c	0,00 ^a	30,77 ^c	2,25
	L2 _{F+M}	39,89 ^d	27,21 ^d	4,04 ^c	3,18 ^d	3,18 ^d	0,00 ^a	25,68 ^d	2,89
Dzień 8.	L2 _M	37,56 ^a	24,75 ^e	3,11 ^d	4,03 ^a	4,03 ^e	0,00 ^a	30,55 ^c	2,27
	L2 _{F+M}	43,72 ^e	29,07 ^f	2,51 ^e	2,61 ^e	2,61 ^f	0,00 ^a	22,09 ^e	3,53
Dzień 16.	L2 _M	35,69 ^f	27,89 ^{c,h}	4,02 ^f	3,79 ^a	3,79 ^{a,c,e}	0,00 ^a	28,61 ^a	2,50
	L2 _{F+M}	47,63 ^g	30,11 ^f	2,17 ^g	2,24 ^f	2,24 ^g	0,00 ^a	17,85 ^f	4,60
Dzień 32.	L2 _M	38,30 ^h	26,17 ^a	4,15 ^a	3,67 ^a	3,67 ^a	0,00 ^a	27,71 ^a	2,61
	L2 _{F+M}	43,48 ^e	26,50 ^a	0,00 ^h	18,42 ^g	0,92 ^h	17,50 ^b	11,60 ^g	7,62
Dzień 48.	L2 _M	35,16 ^f	28,05 ^{c,h}	3,61 ⁱ	3,90 ^{a,c}	3,90 ^{a,c,e}	0,00 ^a	29,28 ^h	2,42
	L2 _{F+M}	39,81 ^{d,i}	25,01 ^{a,b}	0,00 ^h	25,08 ^h	0,58 ⁱ	24,50 ^c	10,10 ⁱ	8,90
Dzień 64.	L2 _M	37,85 ^{h,j}	28,61 ^c	3,77 ^j	3,86 ^a	3,86 ^{a,c}	0,00 ^a	25,91 ^{j,l}	2,86
	L2 _{F+M}	39,18 ^{d,i}	23,07 ^{g,h}	0,00 ^h	27,69 ⁱ	0,48 ^j	27,21 ^d	10,06 ⁱ	8,94
Dzień 80.	L2 _M	38,28 ^h	28,30 ^c	3,13 ^{b,d}	3,49 ^j	3,49 ^k	0,00 ^a	26,80 ^j	2,73
	L2 _{F+M}	39,94 ^{d,i}	24,44 ^b	0,00 ^h	23,23 ^k	0,71 ^l	22,52 ^e	12,39 ^k	7,07
Dzień 96.	L2 _M	38,70 ^h	29,16 ^c	3,17 ^{b,d}	3,76 ^a	3,76 ^a	0,00 ^a	25,21 ^l	2,97
	L2 _{F+M}	39,07 ^{h,i}	24,50 ^b	1,91 ^k	20,06 ^l	1,52 ^l	18,54 ^f	14,46 ^l	5,91
Dzień 112.	L2 _M	38,02 ^j	27,61 ^h	3,74 ^{i,j}	3,44 ^j	3,44 ^m	0,00 ^a	27,19 ^j	2,68
	L2 _{F+M}	37,16 ^k	23,94 ^b	0,00 ^h	15,44 ^l	1,94 ⁿ	13,50 ^f	23,46 ^m	3,26

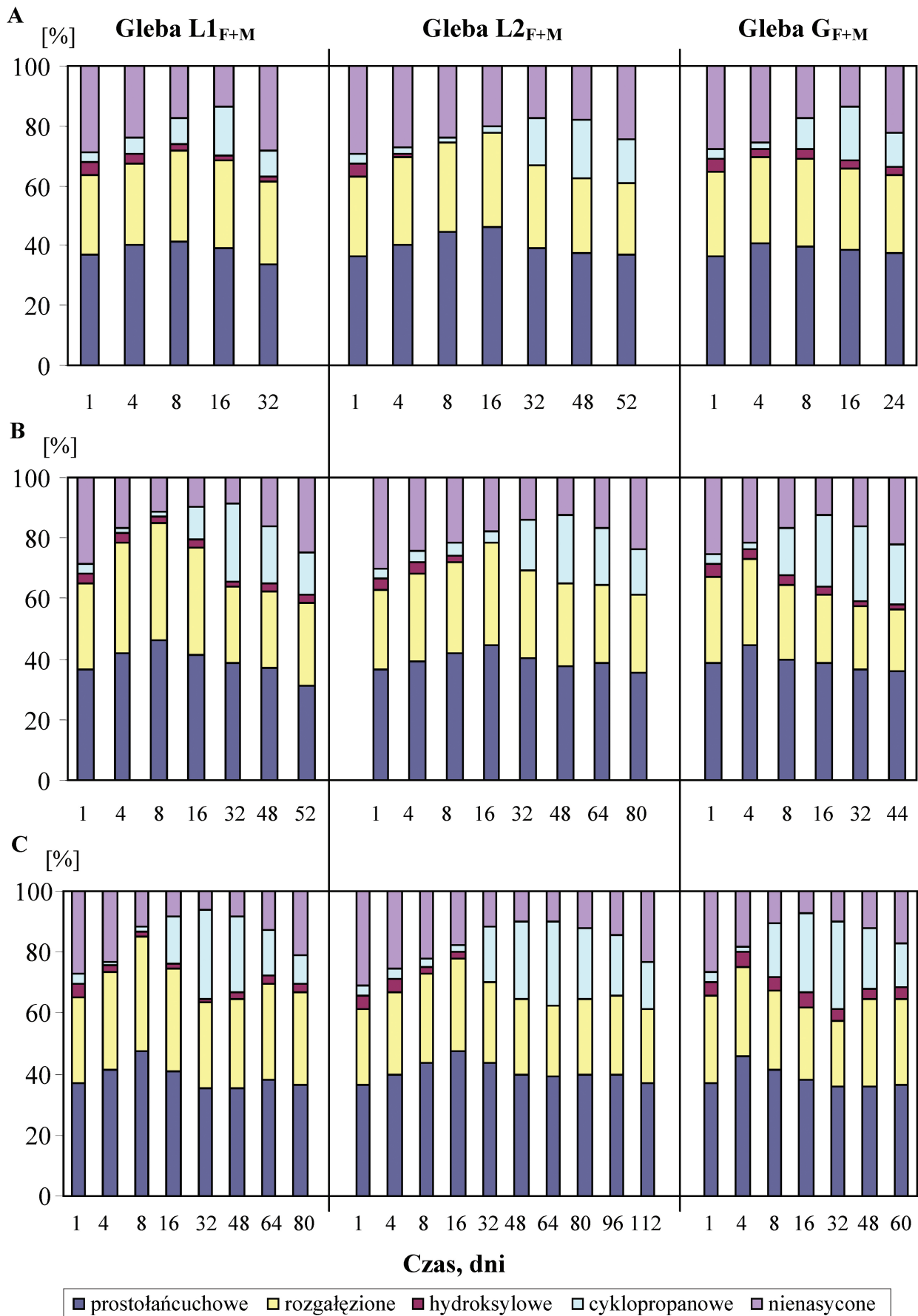
O b j a ś n i e n i a: L2_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; L2_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).

Tabela 36

Procentowa zawartość wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebie G

Gleba G		Nasycone						Nienasycone	Nasycone/ nienasycone
		prostotańcuchowe	rozgałęzione	hydroksylowe	cyklopropanowe	cyklopropanowe			
						17:0 cy	19:0 cy ω8c		
Dzień 1.	G _M	36,73 ^a	29,00 ^{a,c}	4,66 ^a	3,52 ^a	3,52 ^a	0,00 ^a	26,09 ^a	2,83
	G _{F+M}	37,12 ^a	28,37 ^a	4,73 ^a	3,44 ^a	3,44 ^a	0,00 ^a	26,34 ^a	2,80
Dzień 4.	G _M	34,02 ^b	26,51 ^b	4,70 ^a	4,21 ^b	4,21 ^b	0,00 ^a	30,56 ^b	2,27
	G _{F+M}	46,00 ^c	29,32 ^c	4,81 ^a	1,42 ^c	1,42 ^c	0,00 ^a	18,45 ^c	4,42
Dzień 8.	G _M	35,06 ^d	27,23 ^b	3,76 ^b	4,65 ^d	4,65 ^d	0,00 ^a	29,30 ^d	2,41
	G _{F+M}	41,57 ^e	25,99 ^d	4,26 ^c	17,93 ^e	0,77 ^e	17,16 ^b	10,25 ^e	8,76
Dzień 16.	G _M	35,70 ^f	28,61 ^a	3,45 ^d	4,80 ^f	4,80 ^d	0,00 ^a	27,44 ^f	2,64
	G _{F+M}	38,34 ^g	23,68 ^e	4,64 ^a	25,89 ^g	0,96 ^f	24,93 ^c	7,45 ^g	12,42
Dzień 32.	G _M	34,84 ^d	25,50 ^f	2,92 ^e	4,93 ^f	4,93 ^d	0,00 ^a	31,81 ^h	2,14
	G _{F+M}	36,03 ^h	21,44 ^g	4,07 ^c	28,72 ^h	0,90 ^f	27,82 ^d	9,74 ^e	9,27
Dzień 48.	G _M	34,01 ^{b,d}	27,18 ^b	3,04 ^e	4,90 ^f	4,90 ^d	0,00 ^a	30,87 ⁱ	2,24
	G _{F+M}	35,94 ^h	28,63 ^c	3,19 ^f	20,35 ⁱ	0,84 ^f	19,51 ^e	11,89 ^j	7,41
Dzień 60.	G _M	32,87 ⁱ	26,49 ^b	3,16 ^e	4,81 ^f	4,81 ^d	0,00 ^a	32,67 ^h	2,06
	G _{F+M}	36,64 ^h	28,17 ^c	3,57 ^g	14,59 ^j	0,54 ^g	14,05 ^f	17,03 ^k	4,87

O b j a ś n i e n i a: G_M — gleba z wprowadzonymi szczepami nieskażona fenolem; G_{F+M} — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami. Istotne różnice względem kontroli w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$).



Rys. 13. Zawartość procentowa wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w czasie degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach L1_{F+M}, L2_{F+M} i G_{F+M}

4.2. Wprowadzenie bakterii do gleb niesterylnych

4.2.1. Rozkład fenolu

w glebach poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150

Aby zbadać, czy wzbogacenie mikroflory autochtonicznej gleb L1, L2 i G o nowe szczepy bakterii, zdolne do rozkładu fenolu, może wpływać na tempo eliminacji z nich tego związku, przeprowadzono dwie serie badań biodegradacyjnych. W pierwszej mierzono ubytek wprowadzonego fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w glebach poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, które oznaczono jako L1_{F+BM}, L2_{F+BM} i G_{F+BM}, a w drugiej ubytek fenolu w tych samych stężeniach w glebach niebioaugmentowanych L1_{NF}, L2_{NF} i G_{NF} (gdzie F w indeksie dolnym oznacza fenol, N — gleby niesterylne, a BM odpowiada glebom poddanym bioaugmentacji z wykorzystaniem mieszaniny tych szczepów).

Rozkład fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ w glebach poddanych bioaugmentacji najszybciej zachodził w glebie G_{F+BM}, bo w ciągu 8 dni. W glebie L1_{F+BM} całkowitą degradację tego związku stwierdzano w dniu 16., a w glebie L2_{F+BM} — w dniu 32. W glebach niebioaugmentowanych też obserwowano rozkład wprowadzonego do nich fenolu, ale w dłuższym czasie niż w glebach wzbogaconych o szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. W glebach G_{NF}, L1_{NF} i L2_{NF} czas potrzebny do pełnej degradacji tego związku przez mikroflorę rodzimą wynosił odpowiednio: 16, 24 i 60 dni. Wyższe dawki fenolu (3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹) również w krótszym czasie ulegały eliminacji z gleby G_{F+BM} niż z gleb L1_{F+BM} i L2_{F+BM}. Całkowity rozkład tego związku w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ stwierdzano w glebie G_{F+BM} w dniu 12., a w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ — w dniu 20. Dla porównania w glebie G_{NF} skażonej tymi dawkami fenolu nie oznaczano jego obecności odpowiednio w dniu 20. i 32. Wolniej usuwanie przez mikroorganizmy wyższych dawek fenolu zachodziło w glebie L1_{F+BM}, a najwolniej w L2_{F+BM}. Czas potrzebny do pełnej degradacji wprowadzonego do gleby L1_{F+BM} fenolu w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ wynosił 24 dni, a dawki 5,0 mg g⁻¹ — 52 dni. W glebie L1_{NF} całkowity rozkład tych dawek fenolu stwierdzano

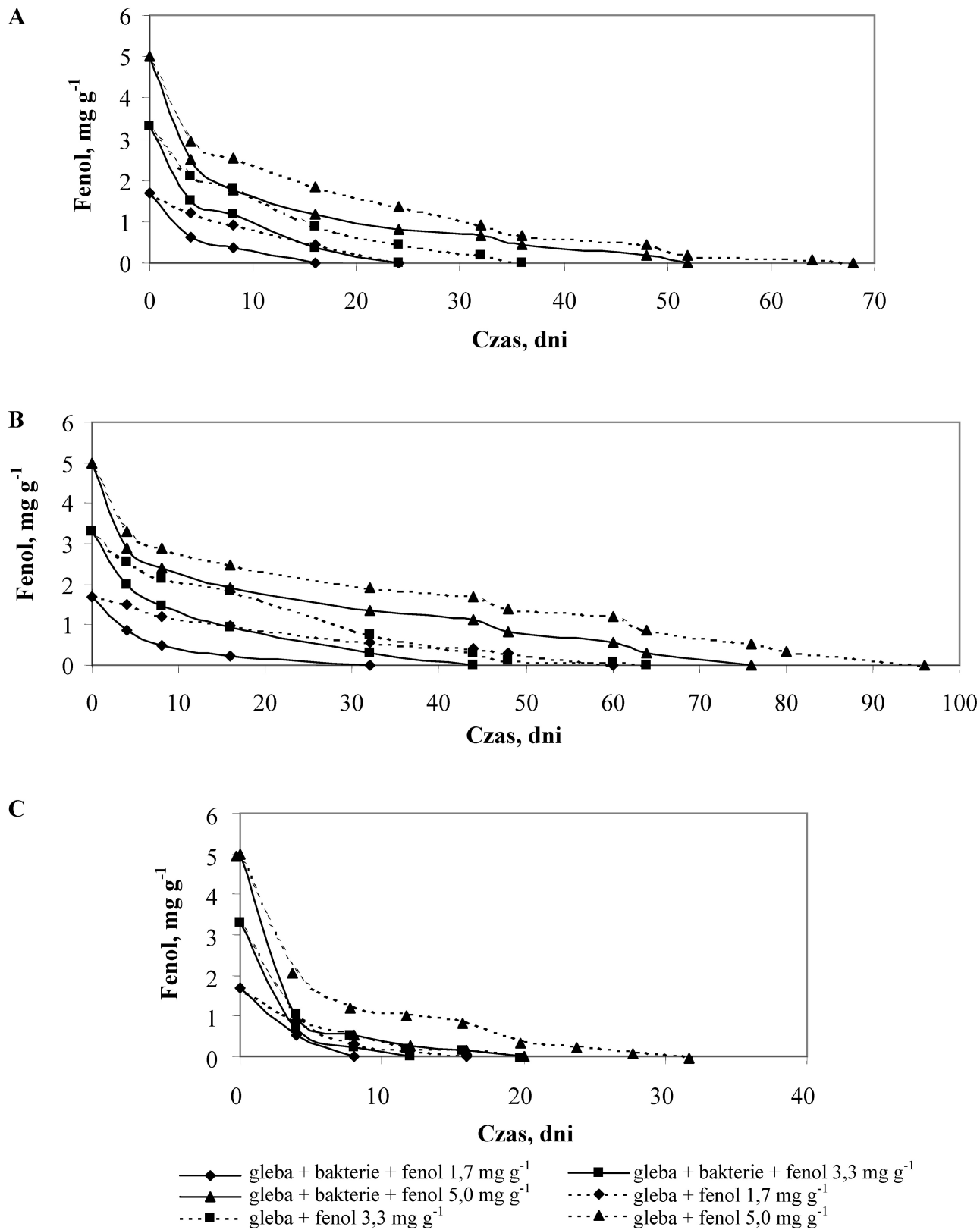
odpowiednio w dniu 36. i 68. Różnica w czasie eliminacji substratu fenolowego w stężeniu 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ była największa między glebami L2_{F+BM} oraz L2_{NF} i wynosiła 20 dni. Wyniki tych obserwacji ilustruje rys. 14.

4.2.2. Wpływ fenolu na przeżywalność mikroorganizmów w glebach poddanych bioaugmentacji

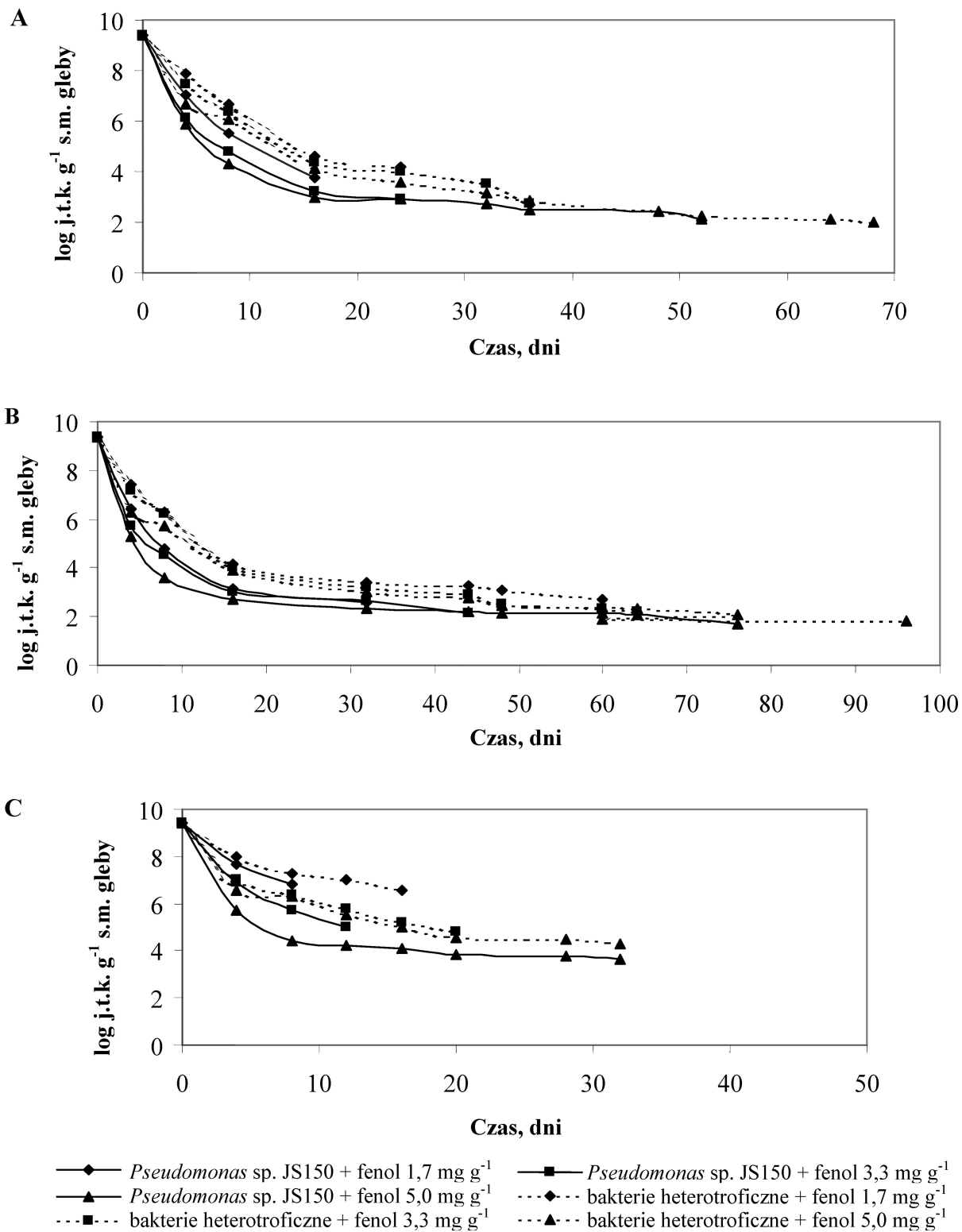
Równocześnie z badaniami biodegradacyjnymi oznaczano przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 oraz frakcji hodowlanej mikroorganizmów autochtonicznych w glebach L1_{F+BM}, L2_{F+BM} i G_{F+BM} skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ gleby. Nie udało się ocenić w nich przeżywalności drugiego z wprowadzonych szczepów *Pseudomonas vesicularis* z powodu braku cechy selekcyjnej, pozwalającej na wyróżnienie go spośród mikroflory rodzimej.

Stwierdzono, że im wyższym stężeniem fenolu skażano gleby L1_{F+BM}, L2_{F+BM} i G_{F+BM}, tym mniejszą liczbę komórek *Pseudomonas* sp. JS150 oznaczano w kolejnych dniach analiz. Największy spadek liczby bakterii obserwowano w ciągu pierwszych 4 dni od wprowadzenia ich do gleby. Wynosił on w glebach L1_{F+BM}, L2_{F+BM} i G_{F+BM} skażonych dawką fenolu 1,7 mg g⁻¹ odpowiednio: 25,11%, 31,81% i 18,62% wyjściowej liczby komórek. Dla porównania, w tych glebach z dodatkiem 5,0 mg g⁻¹ fenolu ubywało w tym czasie odpowiednio: 37,23%, 43,94% i 39,15% wprowadzonej liczby bakterii. Spadek ogólnej liczebności bakterii heterotroficznych w glebach bioaugmentowanych w ciągu pierwszych 4 dni inkubacji był mniejszy i wynosił w L1_{F+BM} — 16,49%, w L2_{F+BM} — 21,28% i w G_{F+BM} — 15% komórek, a w glebach z dodatkiem 5,0 mg g⁻¹ fenolu odpowiednio: 29,26%, 32,98% i 30,32%. W kolejnych dniach zarówno liczebność bakterii *Pseudomonas* sp. JS150, jak i bakterii heterotroficznych we wszystkich glebach się zmniejszała. Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że szczep *Pseudomonas* sp. JS150 i bakterie autochtoniczne najlepiej przeżywały w obecności zastosowanych dawek fenolu w glebie G_{F+BM}, a słabym wzrostem charakteryzowały się w glebie L2_{F+BM}. Wpływ fenolu na przeżywalność bakterii w glebach L1, L2 i G poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 przedstawia rys. 15.

W glebach kontrolnych bez dodatku fenolu, do których wprowadzono mieszaninę szczepów, w ko-



Rys. 14. Dynamika rozkładu fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w niesterylnych glebach L1 (A), L2 (B) i G (C) poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 oraz w glebach niebioaugmentowanych



Rys. 15. Przeżywalność szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 oraz bakterii heterotroficznych w glebach L1 (A), L2 (B) i G (C) skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ gleby

lejnych dniach prowadzenia oznaczeń liczebność komórek *Pseudomonas* sp. JS150 w $L1_{BM}$ i G_{BM} zawierała się w przedziale 75—85% wyjściowej liczby bakterii, natomiast w $L2_{BM}$ była niższa i wynosiła 55—65%. Zastosowane stężenia fenolu miały także wpływ na liczebność bakterii heterotroficznych w glebach $L1_{NF}$, $L2_{NF}$ i G_{NF} , niezawierających mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. Po skażeniu ich tym związkiem ginęło 20—25% populacji tych bakterii w glebie $L1_{NF}$, 15—19% w G_{NF} i 45—54% w $L2_{NF}$ (wyniki nieilustrowane).

4.2.3. Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz pH w glebach poddanych bioaugmentacji

W niesterylnych glebach $L1_{NF}$, $L2_{NF}$ i G_{NF} skażonych fenolem oraz w glebach poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, z dodatkiem ($L1_{F+BM}$, $L2_{F+BM}$ i G_{F+BM}) i bez dodatku tego związku ($L1_{BM}$, $L2_{BM}$ i G_{BM}), przed i po zakończeniu badań biodegradacyjnych oznaczano zawartość materii organicznej, węgla organicznego, kwasów próchnicowych oraz mierzono pH. Stwierdzono, że w glebach $L1_{NF}$, $L2_{NF}$ i G_{NF} wzrost stężenia wprowadzonego fenolu skorelowany był z niewielkim ubytkiem w nich materii organicznej, wynoszącym 0,12—0,42%. Spośród gleb poddanych bioaugmentacji i skażonych zastosowanymi dawkami fenolu największy spadek zawartości procentowej materii organicznej, wynoszący 0,75—0,85%, obserwowano w glebie $L1_{F+BM}$, natomiast w glebach $L2_{F+BM}$ i G_{F+BM} był on mniejszy i zawierał się w przedziale 0,16—0,34%. Dla porównania, w glebach z wprowadzoną mieszaniną szczepów i nieskażonych fenolem spadek ten był większy i mieścił się w zakresie 0,96—1,82%. Węgiel organiczny najwięcej ubywało z gleb $L1_{BM}$, $L2_{BM}$ i G_{BM} , a najmniej z gleby G_{F+BM} skażonej zastosowanymi stężeniami fenolu. We wszystkich glebach stwierdzono spadek zawartości kwasów fulwowych, natomiast zawartość kwasów huminowych i hymatomelanowych się nie zmieniała. Odczyn pH wszystkich gleb zmniejszał się, nie przekraczając 1 jednostki w skali pH. Prezentowane wyniki zawiera tabela 37.

4.2.4. Analiza kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebach poddanych bioaugmentacji

Przed przystąpieniem do bioaugmentacji wyizolowano i zidentyfikowano kwasy tłuszczowe ze świeżych gleb L1, L2 i G. Największą różnorodnością kwasów charakteryzowała się gleba L1 (24 kwasy), a najmniejszą — gleba L2 (14 kwasów). Zawartość kwasów prostołańcuchowych, rozgałęzionych, hydroksylowych i cyklopropanowych wynosiła w glebie L1 odpowiednio: 34,56%, 3,46%, 2,22% i 12,41%, w glebie L2 — 40,78%, 6,44%, 0% i 11,14%, a w glebie G — 31,61%, 7,98%, 3,56% i 13,30%. Kwasów nienasyconych oznaczono w glebie L1 47,35%, w glebie L2 — 41,64%, a w glebie G — 43,55%. Na podkreślenie zasługuje wysoki udział w tych glebach kwasu cyklopropanowego 17:0 cy. Profile kwasów tłuszczowych tych gleb zawiera tabela 38.

W pierwszej serii analizowano zmiany w zawartości procentowej wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych w glebie L1 poddanej bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, z dodatkiem i bez dodatku fenolu, oraz w glebie skażonej tym związkiem i niebioaugmentowanej. Stwierdzono, że po dodaniu do gleby $L1_{F+BM}$ fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ zawartość procentowa kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych w kolejnych dniach prowadzenia izolacji, niezależnie od użytej dawki tego związku, była podobna. Odpowiednio do wzrastających stężeń fenolu wynosiła w tej glebie: 36,62—39,23%, 36,50—39,94% i 38,76—41,19% kwasów prostołańcuchowych oraz 23,53—28,53%, 24,11—30,27% i 22,96—29,94% kwasów rozgałęzionych. Kwasów hydroksylowych najmniej oznaczano w niej po wprowadzeniu najwyższej dawki fenolu wynoszącej 5,0 mg g⁻¹ gleby. Największy wpływ zastosowane stężenia substratu fenolowego miały na udział kwasów cyklopropanowych 17:0 cy i 19:0 cy ω10c. Pierwszy z nich najwyższą zawartością charakteryzował się w dniu 1. (około 15,50% niezależnie od stężenia fenolu), a w kolejnych dniach inkubacji jego udział gwałtownie malał do około 1% lub nie pojawiał się on wśród izolowanych FAMES. Od dnia 4. z gleby $L1_{F+BM}$, skażonej wszystkimi stężeniami fenolu, izolowano drugi z kwasów cyklopropanowych 19:0 cy ω10c. Najwyższy jego udział, wynoszący 16,59%, stwierdzano w glebie $L1_{F+BM}$ w dniu 4., po wprowadzeniu fenolu w dawce 1,7 mg g⁻¹, natomiast po skażeniu jej 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ fenolu jego udział był najwyższy

Tabela 37
Zawartość materii organicznej, węgla organicznego, frakcji kwasów próchnicowych oraz zmiany pH przed i po degradacji fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) w glebach L1, L2 i G poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 oraz w glebach kontrolnych (D)

Właściwości	Gleba															
	L1 _{NF}			L1 _{F+BM}			L2 _{NF}			L2 _{F+BM}			G _{NF}		G _{F+BM}	
	dzień 1.	dzień 24.	dzień 1.	dzień 16.	dzień 1.	dzień 60.	dzień 1.	dzień 32.	dzień 1.	dzień 16.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 8.
Materia organiczna, %	15,30 ± 0,10	14,88 ± 0,14	15,68 ± 0,16	14,83 ± 0,21	2,14 ± 0,11	1,99 ± 0,16	2,16 ± 0,15	1,83 ± 0,12	20,91 ± 0,32	21,16 ± 0,45	21,99 ± 0,55	21,65 ± 0,70				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,61 ± 0,08	1,48 ± 0,10	1,71 ± 0,11	1,51 ± 0,07	0,49 ± 0,05	0,45 ± 0,06	0,52 ± 0,11	0,47 ± 0,06	2,95 ± 0,21	2,71 ± 0,20	3,16 ± 0,23	2,85 ± 0,30				
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,11	2,81 ± 0,09	3,00 ± 0,17	2,70 ± 0,21	1,40 ± 0,11	1,35 ± 0,16	1,38 ± 0,19	1,28 ± 0,20	3,86 ± 0,24	3,81 ± 0,19	3,77 ± 0,37	3,67 ± 0,28				
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,02				
pH	7,56 ± 0,04	7,37 ± 0,06	7,55 ± 0,09	7,30 ± 0,08	6,82 ± 0,03	6,62 ± 0,06	6,80 ± 0,03	6,53 ± 0,05	6,65 ± 0,11	6,55 ± 0,12	6,65 ± 0,11	6,44 ± 0,12				

Właściwości	Gleba															
	L1 _{NF}			L1 _{F+BM}			L2 _{NF}			L2 _{F+BM}			G _{NF}		G _{F+BM}	
	dzień 1.	dzień 36.	dzień 1.	dzień 24.	dzień 1.	dzień 64.	dzień 1.	dzień 44.	dzień 1.	dzień 20.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 1.	dzień 12.	
Materia organiczna, %	15,37 ± 0,18	15,07 ± 0,32	15,74 ± 0,25	14,94 ± 0,26	2,18 ± 0,11	2,10 ± 0,16	2,21 ± 0,17	2,05 ± 0,19	20,98 ± 0,32	21,20 ± 0,32	22,24 ± 0,33	21,92 ± 0,57				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,65 ± 0,12	1,53 ± 0,19	1,75 ± 0,21	1,56 ± 0,21	0,50 ± 0,12	0,46 ± 0,09	0,57 ± 0,09	0,52 ± 0,07	3,00 ± 0,21	2,84 ± 0,25	3,29 ± 0,26	3,08 ± 0,37				
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,11	2,88 ± 0,09	3,00 ± 0,16	2,81 ± 0,15	1,41 ± 0,16	1,35 ± 0,12	1,40 ± 0,16	1,38 ± 0,16	3,80 ± 0,23	3,74 ± 0,21	3,89 ± 0,16	3,75 ± 0,26				
Hum, mg g ⁻¹	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01				
pH	7,45 ± 0,07	7,30 ± 0,11	7,50 ± 0,13	7,22 ± 0,11	6,57 ± 0,04	6,64 ± 0,09	6,69 ± 0,04	6,56 ± 0,04	6,60 ± 0,12	6,54 ± 0,11	6,67 ± 0,09	6,51 ± 0,13				

Właściwości	Gleba															
	L1 _{NF}			L1 _{F+BM}			L2 _{NF}			L2 _{F+BM}			G _{NF}		G _{F+BM}	
	dzień 1.	dzień 68.	dzień 1.	dzień 52.	dzień 1.	dzień 96.	dzień 1.	dzień 76.	dzień 1.	dzień 32.	dzień 1.	dzień 20.				
Materia organiczna, %	15,40 ± 0,34	15,15 ± 0,41	15,85 ± 0,34	15,10 ± 0,39	2,19 ± 0,17	2,07 ± 0,12	2,28 ± 0,21	1,96 ± 0,19	21,30 ± 0,49	21,12 ± 0,54	22,96 ± 0,48	22,68 ± 0,51				
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,79 ± 0,12	1,61 ± 0,18	1,80 ± 0,15	1,58 ± 0,10	0,48 ± 0,09	0,44 ± 0,06	0,51 ± 0,07	0,48 ± 0,05	3,01 ± 0,27	2,89 ± 0,23	3,33 ± 0,22	3,06 ± 0,27				
Ful, mg g ⁻¹	2,91 ± 0,19	2,75 ± 0,20	3,01 ± 0,13	2,84 ± 0,21	1,41 ± 0,14	1,32 ± 0,15	1,40 ± 0,16	1,34 ± 0,15	3,80 ± 0,26	3,68 ± 0,19	3,57 ± 0,14	3,48 ± 0,21				
Hum, mg g ⁻¹	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,02				
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01				
pH	7,15 ± 0,09	7,00 ± 0,15	7,12 ± 0,11	6,93 ± 0,15	6,40 ± 0,09	6,40 ± 0,13	6,50 ± 0,15	6,36 ± 0,10	6,40 ± 0,13	6,44 ± 0,08	6,55 ± 0,07	6,40 ± 0,14				

Właściwości	Gleba					
	L1 _{BM}		L2 _{BM}		G _{BM}	
	dzień 1.	dzień 68.	dzień 1.	dzień 96.	dzień 1.	dzień 32.
Materia organiczna, %	15,70 ± 0,21	14,51 ± 0,26	2,67 ± 0,19	2,98 ± 0,21	21,98 ± 0,61	20,16 ± 0,59
Węgiel organiczny, mg g ⁻¹	1,67 ± 0,09	1,27 ± 0,07	0,47 ± 0,05	0,39 ± 0,07	3,04 ± 0,18	2,50 ± 0,27
Ful, mg g ⁻¹	2,90 ± 0,11	2,83 ± 0,12	1,40 ± 0,11	1,35 ± 0,06	3,80 ± 0,26	3,64 ± 0,20
Hum, mg g ⁻¹	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,02
Hym, mg g ⁻¹	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01
pH	7,55 ± 0,08	7,25 ± 0,06	7,12 ± 0,11	6,72 ± 0,06	6,40 ± 0,09	6,15 ± 0,11

Objaśnienia: L1_{NF}, L2_{NF}, G_{NF} — gleby niesterylne skażone fenolem; L1_{BM}, L2_{BM}, G_{BM} — gleby niesterylne poddane bioaugmentacji, nieskażone fenolem; L1_{F+BM}, L2_{F+BM}, G_{F+BM} — gleby niesterylne skażone fenolem, poddane bioaugmentacji. Średnia ±SD.

Tabela 38

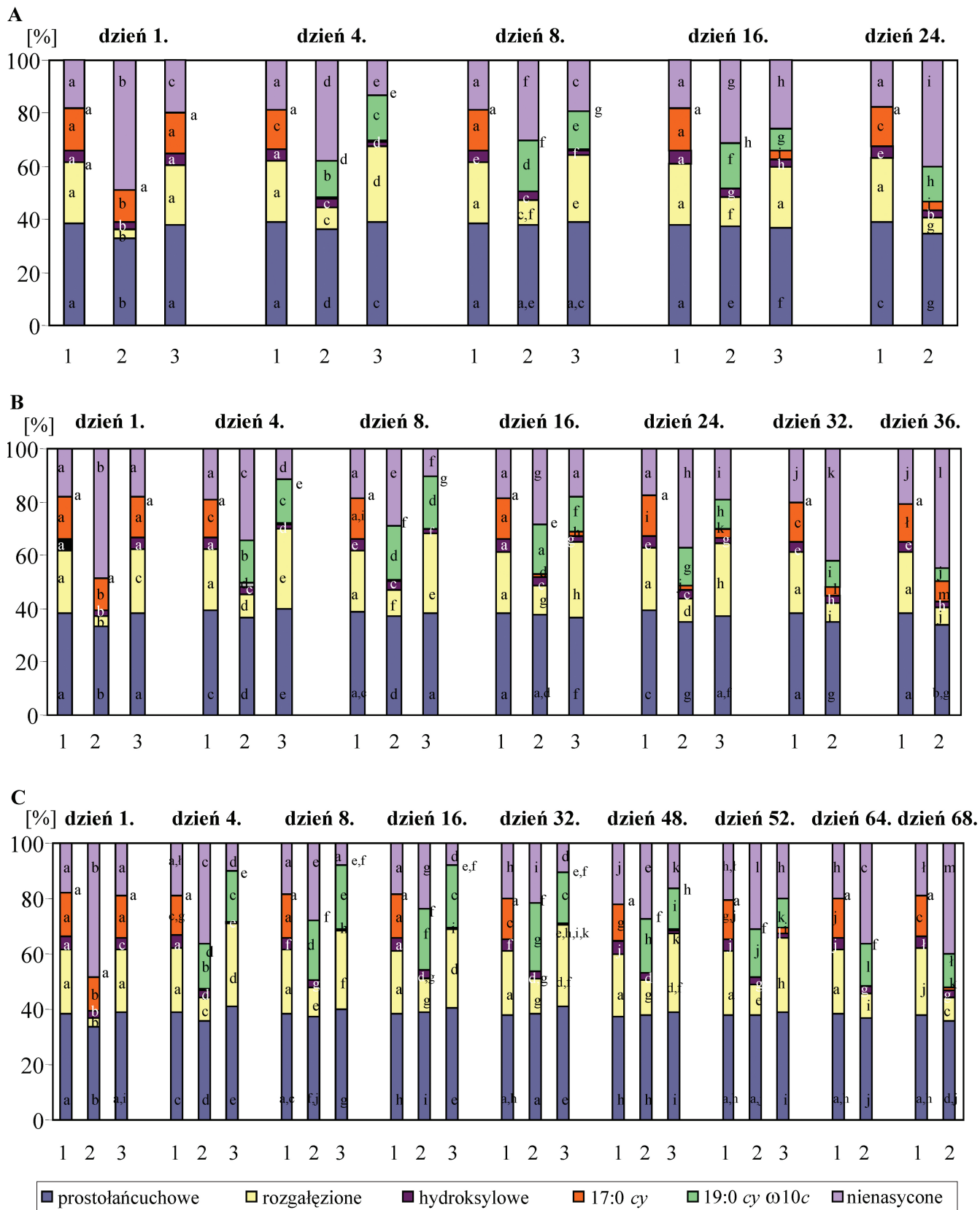
Profile kwasów izolowanych z gleb L1, L2 i G

Rodzaje kwasów tłuszczowych	Zawartość procentowa		
	gleba L1	gleba L2	gleba G
Nasycone			
9:0	0,61	0,00	0,00
10:0	0,48	0,00	1,87
10:0 3OH	0,77	0,00	1,99
12:0	5,50	7,88	4,54
12:0 2OH	0,39	0,00	1,57
12:0 3OH	1,06	0,00	0,00
14:0	3,84	7,12	6,93
15:0 <i>iso</i>	1,16	3,28	2,57
15:0 <i>anteiso</i>	0,93	3,16	3,54
16:0	18,86	22,72	14,12
16:0 N alkohol	1,37	0,00	1,87
17:0 <i>cy</i>	12,41	11,14	13,30
18:0	4,11	1,80	3,34
20:0	1,16	1,26	0,81
Nienasycone			
15:1 ω 5c	1,58	8,41	2,14
15:1 ω 8c	12,79	0,92	2,99
16:1 ω 5c	6,31	12,81	12,93
16:1 ω 7c	5,99	7,94	6,83
17:1 ω 10c	0,78	0,00	5,96
18:1 ω 9c	15,27	7,02	5,80
18:1 ω 7c/ ω 9t/12t	1,36	0,00	4,12
18:2 ω 6,9c	2,09	4,54	2,78
18:3 ω 6,9,12c	1,18	0,00	0,00
Nasycone/nienasycone	1,11	1,40	1,30

w dniu 8., odpowiednio wynosił 20,06% i 23,44%. W kolejnych dniach inkubacji zawartość kwasu 19:0 *cy* ω 10c zmniejszała się, a zwiększała się zawartość kwasu 17:0 *cy*. Jednocześnie stwierdzono, że do dnia, w którym udział kwasu 19:0 *cy* ω 10c był najwyższy, wzrastał stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych. W glebie L1_{F+BM} skażonej dawką fenolu 1,7 mg g⁻¹ najwyższą wartość (6,43) osiągał w dniu 4., a po wprowadzeniu 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ tego związku — w dniu 8., odpowiednio 8,75 i 11,74. W glebie L1_{NF}, skażonej wszystkimi stężeniami fenolu i niezawierającej mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, największe zmiany obserwowano w udziale procentowym kwasów rozgałęzionych, cyklopropanowych i nienasyconych. W kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń ich zawartość, niezależnie od użytych dawek fenolu, wzrastała i zawierała się w przedziale 3,39—12,66%. Kwas cyklopropanowy 19:0 *cy* ω 10c izolowano z niej od dnia 4. Jego udział był największy w dniu 8. w glebie skażonej fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ (odpowiednio 19,04% i 20,05%), z kolei w glebie z dawką 5,0 mg g⁻¹ — w dniu 32. (24,71%). Jednocześnie stwierdzono, że w czasie rozkładu fenolu w glebie L1_{NF} zmniejszał się udział kwasów nienasyconych. Obserwowane zmiany w zawartości poszczególnych grup kwasów

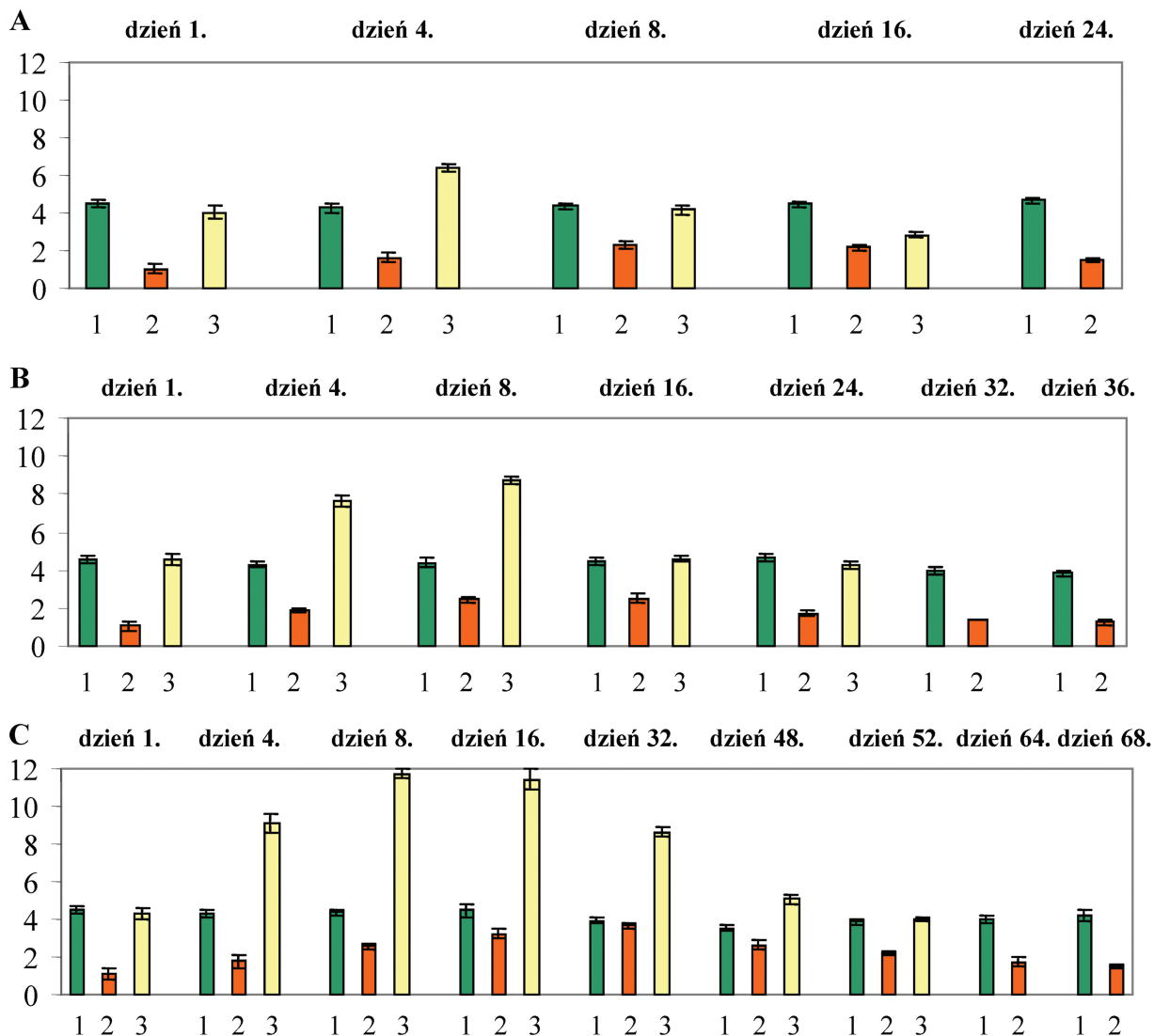
znalazły odzwierciedlenie w wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych. W glebie L1_{NF} skażonej dawką fenolu wynoszącą 1,7 mg g⁻¹ zwiększał się do dnia 8. (2,28), dawką 3,3 mg g⁻¹ — do dnia 16. (2,51), a dawką 5,0 mg g⁻¹ — do dnia 32. (3,68) i nie osiągał w niej tak wysokich wartości, jak w glebie L1_{F+BM}. Z kolei w glebie L1_{BM}, poddanej bioaugmentacji i nieskażonej fenolem różnice w zawartości analizowanych grup kwasów tłuszczowych były niewielkie i nie miały większego wpływu na wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w kolejnych dniach pomiarów (3,83—4,66). Zawartość procentową wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z gleby L1, skażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹, poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz z gleby niebioaugmentowanej przedstawia rys. 16, a wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych pokazuje rys. 17.

W drugiej serii badano wpływ zastosowanych stężeń fenolu na zawartość kwasów tłuszczowych w glebie L2 poddanej bioaugmentacji z wykorzystaniem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. Analizowano także skład kwasów w glebie bioaugmentowanej i nieskażonej fenolem oraz w zanieczyszczonej tym związkiem i niepoddanej bioaugmentacji. W glebie L2_{F+BM} z dodatkiem fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ stwierdzono wzrost zawartości kwasów prostolańcuchowych do dnia 16., a z dodatkiem 5,0 mg g⁻¹ do dnia 32. o około 8,50%. Udział kwasów rozgałęzionych w tym czasie pozostawał zbliżony i zawierał się, odpowiednio do zastosowanych dawek fenolu, w przedziałach: 26,72—28,13%, 28,01—31,01% i 27,64—31,24%. Nie zmieniała się także istotnie w tej glebie pod wpływem fenolu zawartość kwasów hydroksylowych. Najważniejsze różnice spośród analizowanych grup dotyczyły kwasów cyklopropanowych. Kwas 17:0 *cy* największym udziałem, niezależnie od użytej dawki fenolu, charakteryzował się w dniach od 1. do 4. (około 12,00%). W kolejnych dniach jego zawartość gwałtownie malała w glebie L2_{F+BM} skażonej dawkami fenolu 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ i do czasu izolowania z niej kwasu 19:0 *cy* ω 10c nie przekraczała 5,00%. W glebie L2_{F+BM} zanieczyszczonej najwyższą dawką substratu fenolowego 5,0 mg g⁻¹ obecności kwasu 19:0 *cy* ω 10c nie towarzyszył kwas 17:0 *cy*. Jednocześnie stwierdzono, że im wyższym stężeniem fenolu skażano glebę L2_{F+BM}, tym więcej ekstrahowano z niej kwasu 19:0 *cy* ω 10c. W glebie skażonej dawką 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ najczęściej oznaczano go w dniu 16., odpowiednio 10,59% i 11,57%, a z dodatkiem feno-



Rys. 16. Zawartość procentowa wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z gleby L1, skażonej i nieskażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) i poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz z gleby niebioaugmentowanej

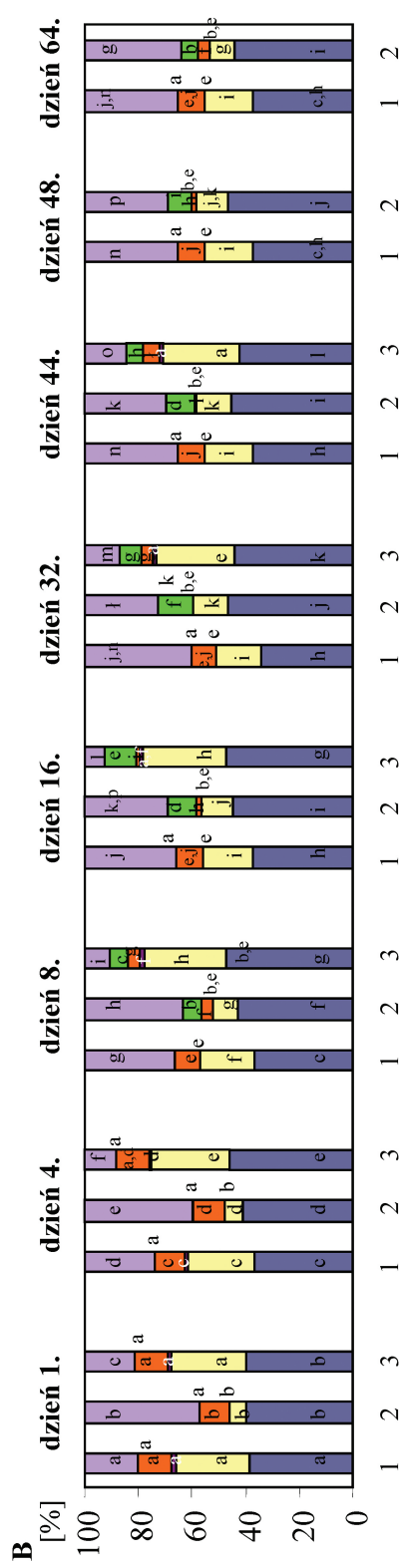
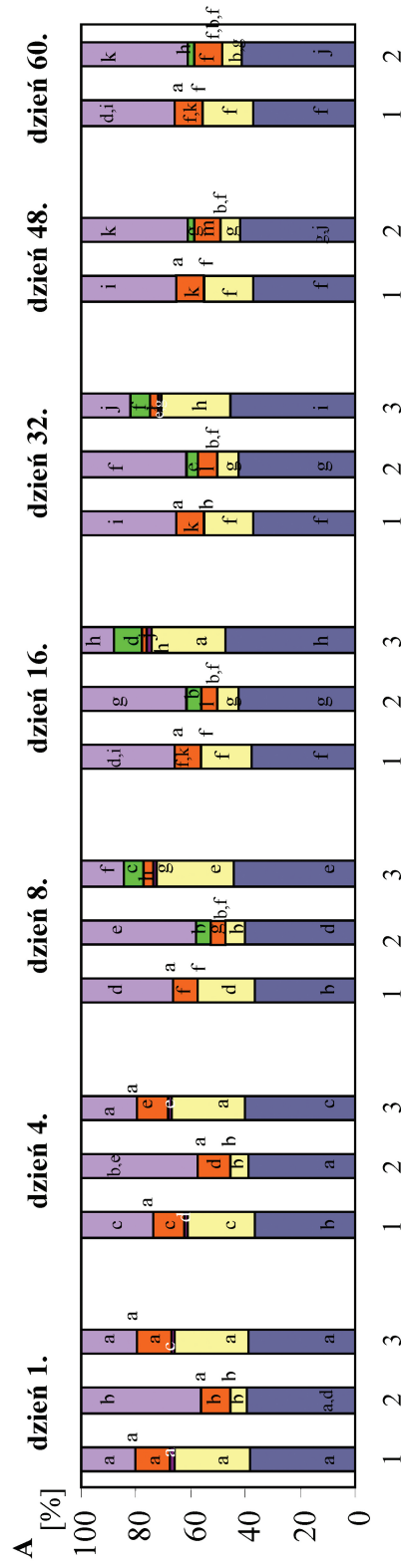
1 — gleba nieskażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (L1_{BM}), 2 — gleba skażona fenolem bez wprowadzonych szczepów (L1_{NF}), 3 — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (L1_{F+BM}). Istotne różnice w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie między glebami 1, 2 i 3 oznaczono różnymi literami (ANOVA, n = 3, p < 0,05). Litery poza kolumnami dotyczą grupy kwasów tłuszczowych o zawartości 0%



Rys. 17. Wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w glebie L1, skażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) i poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz w glebie nieskażonej i niebioaugmentowanej
 1 — gleba nieskażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (L1_{BM}), 2 — gleba skażona fenolem bez wprowadzonych szczepów (L1_{NF}), 3 — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (L1_{F+BM}). Średnia ±SD

lu w stężeniu 5,0 mg g⁻¹ — w dniu 48. (15,44%). W dniu 16. w glebie L2_{F+BM} zanieczyszczonej fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ najwyższą wartość osiągał także stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych, wynoszącą odpowiednio 7,53 i 11,89, a w glebie z dodatkiem 5,0 mg g⁻¹ tego związku — w dniu 32. (14,27). Z kolei na podstawie profili FAMES uzyskanych z gleby L2_{NF} skażonej wszystkimi stężeniami fenolu i niezawierającej szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 stwierdzono, że główne różnice w porównaniu z profilami kwasów ekstrahowanych z gleby L2_{F+BM} dotyczyły kwasów hydroksylowych i cyklopropanowych. Hydroksykwasów nie izolowano z tej gleby, zawartość kwasu 19:0 cy ω10c była niższa niż w L2_{F+BM}, a 17:0 cy w dniach, w których występował wśród izolowanych FAMES — wyższa. Wartość stosunku

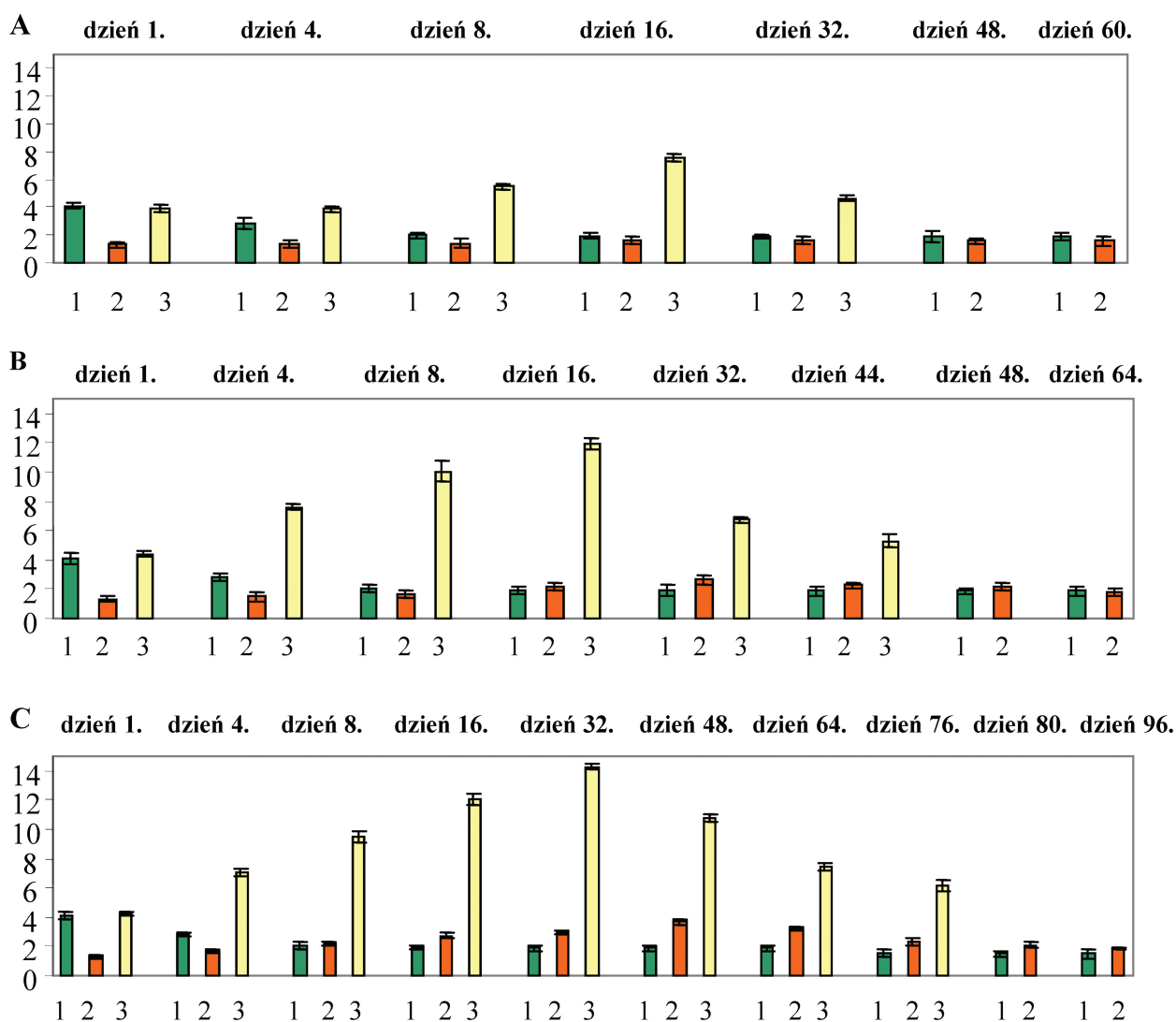
kwasów nasyconych do nienasyconych w glebie L2_{NF} z dodatkiem fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ zwiększała się do dnia 32., w którym wynosiła odpowiednio 1,63 i 2,63, a z dodatkiem 5,0 mg g⁻¹ — do dnia 48. (3,66). W żadnym dniu prowadzenia oznaczeń nie osiągała tak wysokich wartości, jak w glebie L2_{F+BM}. Dla porównania, w glebie L2_{BM} poddanej bioaugmentacji i nieskażonej fenolem stwierdzono w kolejnych dniach prowadzenia analiz: podobny udział kwasów prostofałnicuchowych i cyklopropanowego 17:0 cy, spadek zawartości kwasów rozgałęzionych, brak hydroksykwasów od dnia 8. i ponad 2-krotnie niższy stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych w porównaniu z dniem 1. Zawartość procentową wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z gleby L2, skażonej i nieskażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹



i poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz z gleby niebioaugmentowanej przedstawia rys. 18, a wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych pokazuje rys. 19.

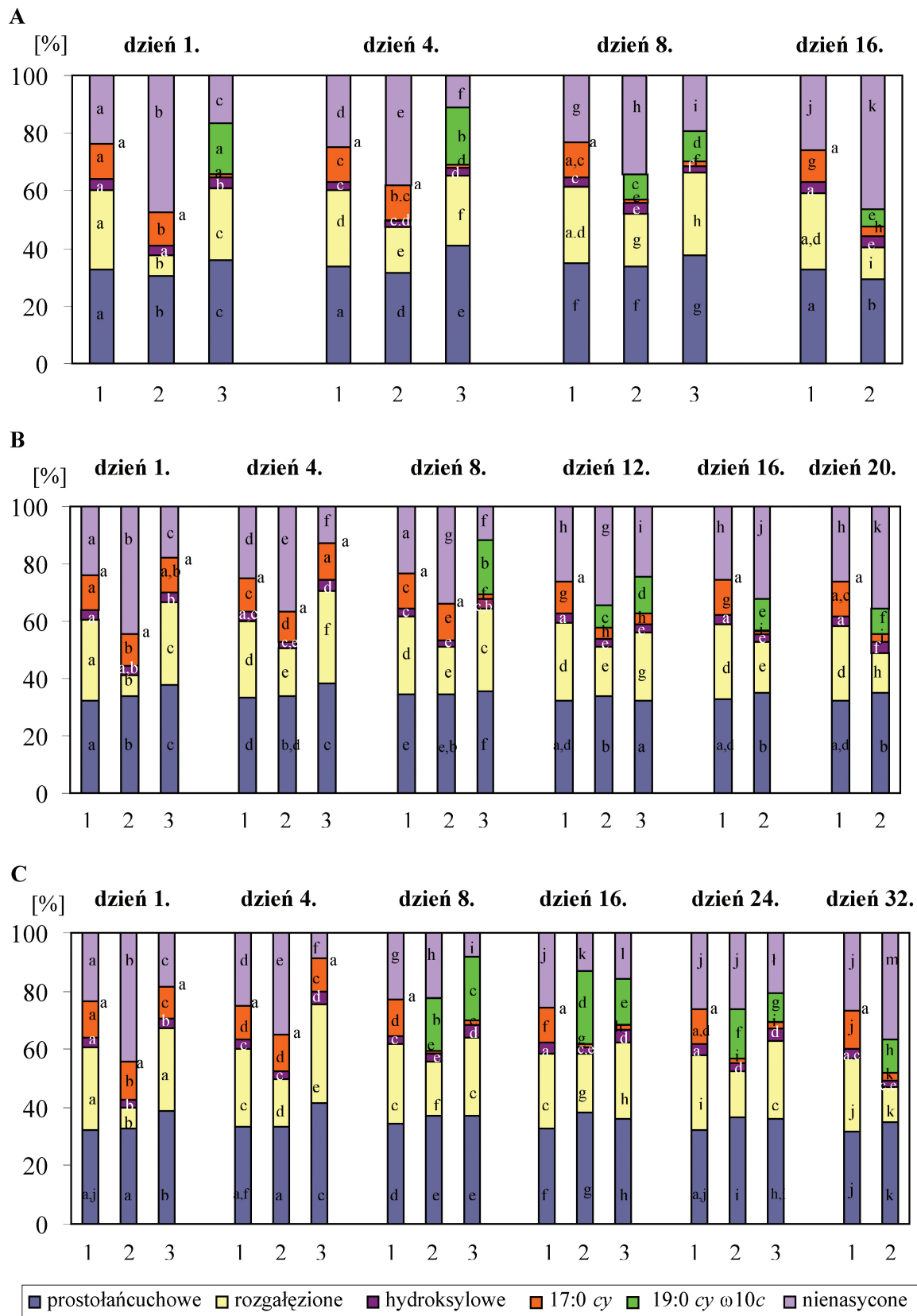
Z analiz chromatograficznych wynikają także różnice wywołane wzrastającymi stężeniami fenolu, w składzie kwasów tłuszczowych izolowanych z gleby G, do której wprowadzono mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. Fenol w stężeniu $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ powodował u mikroorganizmów w tej glebie niewielkie zmiany w zawartości kwasów prostołańcuchowych, rozgałęzionych i hydroksylowych. W dniach od 1. do 8. ich zawartość mieściła się odpowiednio w następujących przedziałach: 35,67—40,61%, 24,81—28,86% i 2,49—3,83%. Istotną zmianą wśród izolowanych z tej gleby FAMES było pojawienie się w 4. dniu kwasu 19:0 cy ω 10c z udziałem 19,80%.

W tym dniu najwyższy był też stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych, wynoszący 8,09. W glebie G_{F+BM} skażonej fenolem w stężeniu $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ zawartość kwasów prostołańcuchowych w dniach od 1. do 16. zawierała się w przedziale 32,19—38,35%, kwasów rozgałęzionych 24,16—29,05%, a hydroksylowych — 2,64—4,11%. W 8. dniu po raz pierwszy ekstrahowano z niej kwas 19:0 cy ω 10c z udziałem 19,45%. Do tego dnia zwiększał się także stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych z 4,69 do 7,40. Dawka fenolu $5,0 \text{ mg g}^{-1}$ również nie powodowała w glebie G_{F+BM} większych różnic w zawartości kwasów prostołańcuchowych, rozgałęzionych i hydroksykwasów od dnia 1. do 20. Ich udział wynosił w tym czasie odpowiednio: 36,16—41,71%, 26,12—33,93% i 3,19—4,45%. Od 8. dnia w profilu FAMES pojawiał się kwas 19:0 cy ω 10c. Jego udział w tym dniu był najwyższy (21,72%),

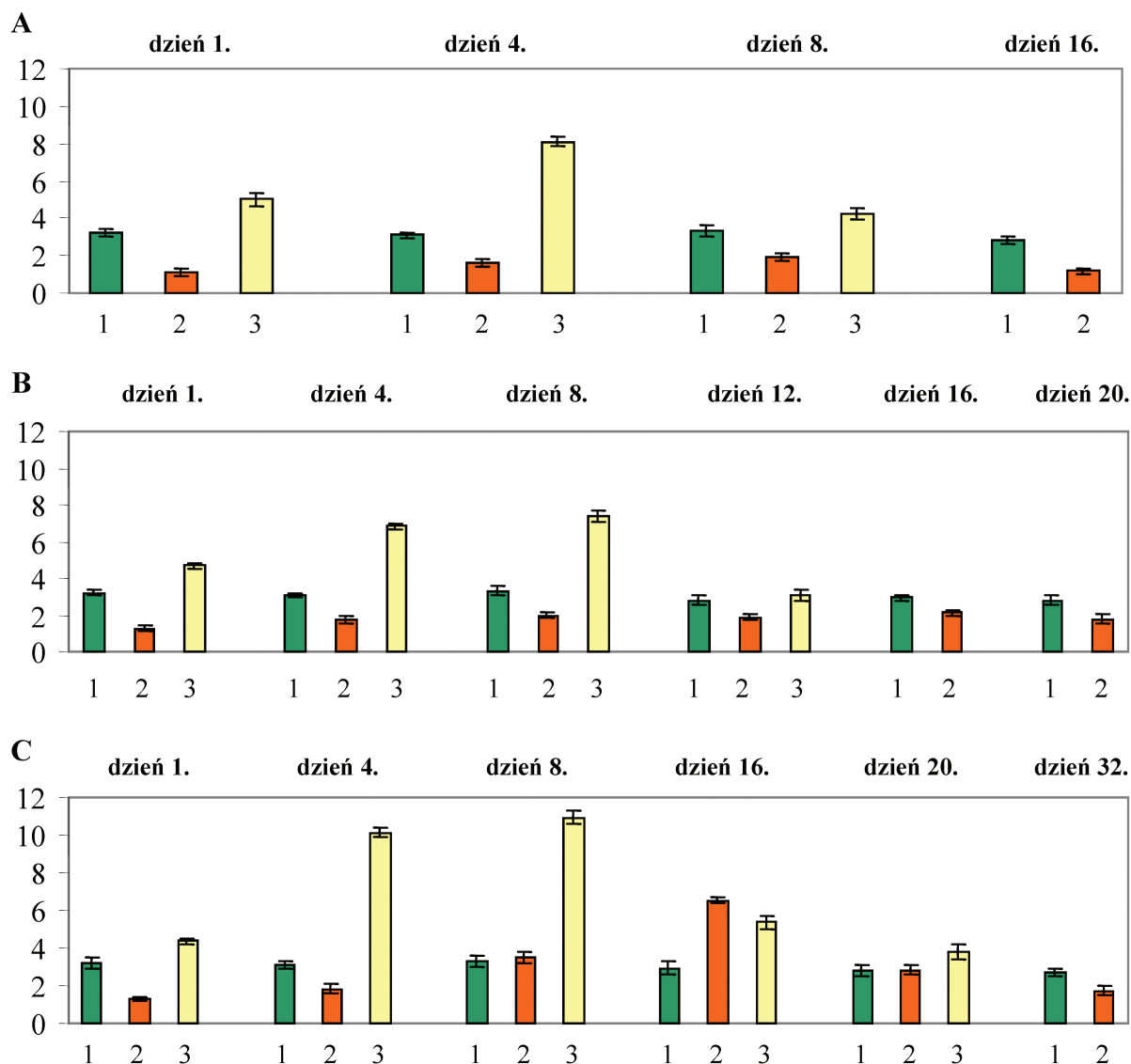


Rys. 19. Wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w glebie L2, skażonej fenolem w stężeniach $1,7 \text{ mg g}^{-1}$ (A), $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ (B) i $5,0 \text{ mg g}^{-1}$ (C) i poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz w glebie nieskażonej i niebioaugmentowanej

1 — gleba nieskażona fenolem z wprowadzonymi szczepami ($L2_{BM}$), 2 — gleba skażona fenolem bez wprowadzonych szczepów ($L2_{NF}$), 3 — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami ($L2_{F+BM}$). Średnia \pm SD



Rys. 20. Zawartość procentowa wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z gleby G, skażonej i nieskażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) i poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz z gleby niebioaugmentowanej 1 — gleba nieskażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (G_{BM}), 2 — gleba skażona fenolem bez wprowadzonych szczepów (G_{NF}), 3 — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (G_{F+BM}). Istotne różnice w procentowej zawartości wyróżnionej grupy kwasów tłuszczowych w czasie między glebami 1, 2 i 3 oznaczono różnymi literami (ANOVA, $n = 3$, $p < 0,05$). Litery obok kolumn dotyczą grupy kwasów tłuszczowych o zawartości 0%



Rys. 21. Wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w glebie G, skażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹ (A), 3,3 mg g⁻¹ (B) i 5,0 mg g⁻¹ (C) i poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz w glebie nieskażonej i niebioaugmentowanej
 1 — gleba nieskażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (G_{BM}), 2 — gleba skażona fenolem bez wprowadzonych szczepów (G_{NF}), 3 — gleba skażona fenolem z wprowadzonymi szczepami (G_{F+BM}). Średnia ±SD

a w kolejnych malał i w 20. dniu był 2-krotnie niższy. W 8. dniu najwyższą wartość osiągał także stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych (10,92). Dla porównania, w glebie G_{NF}, skażonej fenolem i niepoddanej bioaugmentacji, obserwowano znaczący wzrost udziału kwasów rozgałęzionych. W glebie G_{NF} po wprowadzeniu fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ ich zawartość zwiększyła się do 8. dnia o 10,44%, po dodaniu 3,3 mg g⁻¹ tego związku zwiększyła się do 16. dnia o 10,98%, a po skażeniu jej stężeniem 5,0 mg g⁻¹ do 16. dnia zwiększyła się o 13,16%. Nie obserwowano natomiast większego wpływu użytych stężeń substratu fenolowego na zawartość kwasów prostolącuchowych i hydroksylowych. Kwas z pierścieniem cyklopropanowym 19:0 cy ω10c największym udziałem (25,18%) odznaczał się w glebie G_{NF}

skażonej dawką 5,0 mg g⁻¹ w 16. dniu, w którym też najwyższy był stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych (6,55). Z kolei w glebie G_{BM}, poddanej bioaugmentacji i nieskażonej fenolem, profil kwasów tłuszczowych w kolejnych dniach prowadzenia oznaczeń był podobny, a stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych zawierał się w przedziale 2,71—3,31. Zawartość procentową wyróżnionych grup kwasów tłuszczowych izolowanych z gleby G, skażonej i nieskażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹, poddanej bioaugmentacji z użyciem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, oraz z gleby niebioaugmentowanej przedstawia rys. 20, a wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych pokazuje rys. 21.

5. Dyskusja

5.1. Degradacja fenolu przez bakterie w badanych glebach

Bakterie rozkładające fenol i jego pochodne są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Występują nie tylko w glebie, lecz także w wodzie i w osadach dennych. Przeważającą większość wśród uzyskanych z tych środowisk izolatów stanowią gatunki z rodzaju *Pseudomonas*, choć nie tylko one są zdolne do rozkładu fenolu. Do dobrze scharakteryzowanych pod względem biochemicznym i genetycznym należą takie szczepy, jak: *Ewingella americana*, *Ralstonia taiwanensis* TJ86 i *Serratia plymuthica* GC (CHEN i in., 2004; KHLEIFAT, 2006; PRADHAN, INGLE, 2007). Oddzielną grupę wśród bakterii degradujących związki fenolowe stanowią bakterie modyfikowane genetycznie (GMMs), na przykład: *Pseudomonas putida* F1-Te, *Pseudomonas putida* DOT-T1-Km, *Pseudomonas* sp. B13, *Pseudomonas* sp. CF600 (DmpR), *Comamonas testosteroni* rN7(R503) i *Comamonas testosteroni* E23, skonstruowane z użyciem metod inżynierii genetycznej na potrzeby bioremediacji *in situ* (SHINGLER i in., 1993; PAVEL, SHINGLER, 1994; HUERTAS i in., 1998; YAP i in., 1999; VAN DER MEER i in., 2001; WATANABE i in., 2002a).

Badania przeprowadzone nad rozkładem fenolu przez szczepy *Pseudomonas vesicularis* i/lub *Pseudomonas* sp. JS150 po ich wprowadzeniu do sterylnych gleb potwierdziły nieopisywaną dotąd w literaturze zdolność obu szczepów do rozkładu fenolu w tym środowisku. Stwierdzono, że tempo eliminacji z gleb tego związku zależało od ich właściwości fizykochemicznych, stopnia skażenia i od tego, czy dodano do nich pojedyncze szczepy, czy ich mieszaninę. Niezależnie od składu inokulum, najszybciej mikrobiologiczny rozkład fenolu zachodził w gliniastej, łąkowej glebie G o najwyż-

szej zawartości materii organicznej (21%), wolniej w leśnej glebie L1 o średniej zawartości materii organicznej (15%), a najwolniej w piaszczystej, leśnej glebie L2, ubogiej w materię organiczną (2,10%). Uzyskane wyniki wskazują także, że wraz ze wzrostem stężenia wprowadzanego do gleb fenolu wydłużał się czas jego całkowitej degradacji przez introdukowane szczepy. W najkrótszym czasie przeprowadzały one rozkład fenolu w dawce 1,7 mg g⁻¹ gleby, a wyższe jego stężenia metabolizowały wolniej. Największą różnicę w czasie rozkładu fenolu wprowadzonego do gleby w dawce 1,7 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹, wynoszącą 64 dni, stwierdzono dla gleby L2 z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas vesicularis*. Dla porównania, różnica ta dla gleby G zawierającej szczep *Pseudomonas vesicularis* wynosiła 36 dni, a dla gleby L1 — 60 dni. Szybciej rozkład fenolu we wszystkich glebach przeprowadzał szczep *Pseudomonas* sp. JS150. Dawkę 1,7 mg g⁻¹ rozkładał w glebach L1, L2 i G o 16 dni krócej niż *Pseudomonas vesicularis*, a dawkę 5,0 mg g⁻¹ rozkładał krócej o odpowiednio 16 i 20 dni. Różnica w czasie degradacji najniższego i najwyższego stężenia fenolu przez ten szczep była najmniejsza dla gleby G, dla której wynosiła 36 dni, w L2 była wyższa i wynosiła 48 dni, a największa była dla gleby L2 — 60 dni. Jednocześnie stwierdzono, że rozkład fenolu przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 zachodził we wszystkich glebach w krótszym czasie niż przez pojedynczo wprowadzone do nich szczepy. Fenol w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ był rozkładany przez nie w glebie G o 20 dni krócej niż przez *Pseudomonas vesicularis* i o 4 dni krócej niż przez *Pseudomonas* sp. JS150, w glebie L1 odpowiednio było to o 20 i 16 dni krócej, a w glebie L2 — o 28 i 16 dni krócej. Fenol w dawce 5,0 mg g⁻¹ ulegał z kolei eliminacji przez mieszaninę szczepów z gleby G w czasie

krótszym o 20 dni w porównaniu z *Pseudomonas vesicularis* i o 4 dni w porównaniu z *Pseudomonas* sp. JS150, z gleby L1 było to odpowiednio o 32 i 16 dni krócej, a z gleby L2 — o 32 i 12 dni krócej. Największą różnicę pomiędzy czasem rozkładu najniższego i najwyższego stężenia fenolu przez mieszaninę szczepów wykazano w przypadku gleby L2 (60 dni), mniejszą dla gleby L1 (48 dni), a najmniejszą — dla gleby G (36 dni). Podobne zależności między czasem rozkładu różnych stężeń fenolu a zawartością materii organicznej w glebie obserwowali CHEN i in. (2004). Stwierdzili, że dodany do sterylnej gleby, zawierającej 4,8% materii organicznej, szczep *Ralstonia taiwanensis* TJ86 rozkładał fenol w stężeniu $500 \mu\text{g g}^{-1}$ w ciągu 9 dni, a wyższą dawkę wynoszącą $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ fenolu metabolizował w tym czasie w 40%.

DAVIS i MADSEN (1996) wykazali, że w glebie piaszczystej o zawartości 0,8% materii organicznej 50% wprowadzonego toluenu w dawce $5 \mu\text{g g}^{-1}$ uległo rozkładowi w ciągu 165 godz., w glebie piaszczysto-gliniastej o zawartości materii organicznej 4,0% — w czasie 57 godz., a w glebie gliniastej o najwyższej zawartości materii organicznej 5,5% — w ciągu 48 godz. Zależność rozkładu PCB przez introdukowany do siedmiu różnych, sterylnych gleb szczep *Alcaligenes xylooxidans* od zawartości w nich materii organicznej badali także HALUŠKA i in. (1995). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, że najwięcej, bo 96,4%, wprowadzonego do nich PCB uległo rozkładowi w ciągu 60 dni w glebie o największej zawartości materii organicznej (2,6%). Z badań laboratoryjnych prowadzonych zarówno w podłożach płynnych, jak i w glebach wiadomo, że rozkład fenolu i innych związków aromatycznych przez pojedyncze szczepy zachodzi wolniej niż przez ich populacje mieszane. Wynika to z faktu, że pojedyncze szczepy mogą metabolizować ograniczoną liczbę związków, gdy tymczasem ich konsorcja mają bardziej różnorodny potencjał enzymatyczny i większe możliwości degradowania nie tylko pojedynczych substratów, lecz także złożonych ich mieszanin (GHAZALI i in., 2004). GOSWAMI i in. (2005) wykazali, że czyste kultury szczepów *Ralstonia erythropolis* M1 i *Pseudomonas fluorescens* P1 rozkładały fenol w stężeniu 100mg l^{-1} w czasie wynoszącym odpowiednio 26 i 30 godz., gdy tymczasem ich mieszanina dokonywała tego w ciągu 20 godz. Podobne wyniki otrzymali HAUGLAND i in. (1990) w badaniach nad rozkładem kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego i 2,4,5-trichlorofenoksyoctowego przez mieszaninę szczepów *Pseudomonas cepacia* AC1100 i *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Dowiedli, że degradacja tych związków zachodziła efektywniej przez mieszane populacje tych bakterii

niż przez indywidualne szczepy. W innych badaniach REARDON i in. (2002) obserwowali szybszy rozkład jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przez mieszaninę dwóch szczepów *Pseudomonas putida* F1 i *Burkholderia* (*Pseudomonas*) sp. JS150 w porównaniu z pojedynczymi szczepami. Z kolei YUAN i in. (2000) wykazali, że rozkład fenantrenu w stężeniu 5mg l^{-1} przez mieszaninę sześciu szczepów trwał 28 godz., podczas gdy każdy z nich degradował go w ciągu 6—8 godz. Aby zbadać, jak zachodzi rozkład związków aromatycznych przez mieszane populacje bakterii, konieczne jest dokładne sprecyzowanie ich roli w przypadku poszczególnych gatunków. HARDER i DIJKHUIZEN (1982) zaproponowali, aby związki odgrywające tę samą rolę dla bakterii nazwać homologicznymi, a odgrywające różną rolę — heterologicznymi.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że rozkład fenolu w glebach L1, L2 i G przez pojedynczo wprowadzone do nich szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 oraz przez ich mieszaninę trwał znacznie dłużej w porównaniu z jego rozkładem przez te szczepy oraz inne gatunki bakterii w podłożach płynnych o znanym składzie. Szczep *Pseudomonas vesicularis* w zmodyfikowanej pożywce Kojima rozkładał fenol w stężeniu 376mg l^{-1} w ciągu 15 godz. (MROZIK i in., 2007), a *Pseudomonas* sp. JS150 — w ciągu 10 godz. (dane niepublikowane). BAI i in. (2007) wykazali, że szczep *Alcaligenes faecalis*, hodowany w pożywce mineralnej (MSM), przeprowadzał rozkład fenolu w stężeniu 50mg l^{-1} w ciągu 99 godz., w stężeniu 100mg l^{-1} — w ciągu 57 godz., a 150mg l^{-1} — w czasie 27 godz. Degradacja wzrastających stężeń fenolu w coraz krótszym czasie mogła wynikać ze wzrostu aktywności enzymów uczestniczących w rozkładzie tego związku w komórkach bakterii. Przeciwny efekt wzrastających stężeń fenolu na czas jego rozkładu przez szczep *Pseudomonas putida* ATCC 49451 obserwowali WANG i LOH (2001). Wykazali, że szczep ten degradował dawkę 200mg l^{-1} w ciągu 14 godz., a dawkę 4-krotnie wyższą — w czasie 38 godz. Znacznie krócej w porównaniu z *Alcaligenes faecalis* fenol w dawce 50mg g^{-1} w zmodyfikowanej pożywce Huntera (MSB) rozkładał szczep *Pseudomonas putida* F1. Czas potrzebny do całkowitej degradacji tego stężenia fenolu wynosił 18 godz. (ABUHAMED i in., 2004). Inne, znane ze zdolności rozkładu wysokich stężeń fenolu, ale różniące się między sobą aktywnością degradacyjną, są szczepy *Pseudomonas putida* MTCC 1194 i *Serratia plymuthica* GC (KUMAR i in., 2005; PRADHAN, INGLE, 2007). Pierwszy z nich przeprowadzał pełny rozkład fenolu w dawce 1000mg l^{-1} w ciągu 162 godz., natomiast

drugi w czasie znacznie dłuższym, bo liczącym 11 dni. Do rozkładu fenolu zdolne są także bakterie z rodzaju *Ralstonia*. CHEN i in. (2004) wykazali, że zdolność taką miał szczep *Ralstonia taiwanensis*, który wymagał 18 godz. hodowli do pełnego rozkładu fenolu w stężeniu $500 \mu\text{g l}^{-1}$.

Spełnianie przez glebę takich podstawowych funkcji, jak: magazynowanie i dostarczanie składników pokarmowych, zatrzymywanie wody oraz unieszkodliwianie składników potencjalnie toksycznych, zależy od jej zdolności sorpcyjnych. Zjawisko adsorpcji związków organicznych w glebie zależy od zawartości w niej materii organicznej, rodzaju i ilości glin, pojemności wodnej, wymiany jonowej oraz aktywności degradacyjnej mikroorganizmów. Przeważająca większość zanieczyszczeń organicznych, dostających się do gleby, wiąże się odwracalnie lub nieodwracalnie z frakcjami kwasów próchnicowych, co ogranicza ich przemieszczanie się i rozkład lub zostaje uwiecznionych w mikroporach agregatów glebowych (STEINBERG i in., 1987; KOHL, RICE, 1998). Największe powinowactwo do kwasów fulwowych, humusowych i do humin wykazują związki niepolarne, hydrofobowe, o dużej masie molekularnej (np. PCB i WWA), a o wiele mniejsze — związki zawierające grupy polarne i o mniejszej masie cząsteczkowej (XING, 2001). Znaczenie ochronne substancji humusowych polega nie tylko na adsorbowaniu zanieczyszczeń organicznych, lecz także na przyspieszaniu ich rozkładu w wyniku dostarczania mikroorganizmom związków pokarmowych. Można sądzić, że związanie związków aromatycznych w mikroporach agregatów glebowych czyni je bardziej dostępnymi dla bakterii, które chętniej kolonizują mikropory niż makropory. Na taką lokalizację bakterii w glebie wskazują wyniki badań HATTORIEGO (1988) oraz RAJNARDA i in. (1997), którzy wykazali, że ponad 80% występujących w analizowanych glebach bakterii zasiedlało wewnątrz mikroporów glebowych. Środowisko to z powodu niewielkiej objętości, małych wahań wilgotności oraz funkcji ochronnej przed atakiem pierwotniaków wydaje się lepszym miejscem bytowania dla bakterii niż makropory (RAJNARD, RICHAUME, 2001). Obserwowany przez BELLINA i in. (1990) oraz ROBINSONA i in. (1990) efektywny rozkład zaadsorbowanego w glebie pentachlorofenolu i toluenu może potwierdzać związek między większą ich biodostępnością w postaci związanej dla bakterii a zdolnością zasiedlania przez nie określonych miejsc w glebie. Nie wszystkie jednak związki aromatyczne związane z substancjami próchnicowymi gleby podlegają rozkładowi mikrobiologicznemu. AL BASHIR i in. (1990) wykazali na przykład, że bardziej hydrofobowy naftalen nie jest biodegradowany do momen-

tu, aż nie ulegnie desorpcji z agregatów glebowych i nie przedostanie się do roztworu glebowego. Z kolei GUERIN i BOYD (1992) stwierdzili, że niektóre gatunki bakterii rozkładają wyłącznie naftalen w postaci zaadsorbowanej do agregatów glebowych, a dla innych jest on dostępny jedynie w postaci rozpuszczonej w roztworze glebowym.

Wyniki uzyskane z oznaczeń stężenia fenolu w sterylnych glebach L1, L2 i G, do których nie dodawano szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, jednoznacznie wskazują, że zjawisko adsorpcji fenolu w tych glebach zachodziło i zależało od zawartości w nich materii organicznej. Największy ubytek wprowadzonego do nich fenolu stwierdzono w ciągu pierwszych czterech dni od introdukcji do nich szczepów. Podobny był on w glebach L1 i G, a znacznie mniejszy w ubogiej w materię organiczną glebie L2. W porównaniu ze skażonymi glebami kontrolnymi w ciągu pierwszych czterech dni ubytek wszystkich stężeń fenolu był największy w glebach, do których wprowadzono mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. W glebach tych stężenie fenolu zmniejszyło się o około 12—17% w porównaniu z kontrolą, natomiast w glebach z pojedynczo wprowadzonymi szczepami — o około 2—11%. Wskazuje to na zainicjowany w tym czasie proces rozkładu fenolu we wszystkich układach doświadczalnych oraz potwierdza wyższą aktywność degradacyjną mieszaniny szczepów niż pojedynczych ich gatunków. W kolejnych dniach pomiarów stężenie fenolu w glebach kontrolnych utrzymywało się na podobnym poziomie, co może świadczyć o ustalonej równowadze między stężeniem fenolu związanego z fazą stałą gleby a jego stężeniem w roztworze glebowym. Aby to potwierdzić, konieczne są dodatkowe badania porównawcze w glebach sterylnych i niesterylnych, obejmujące wpływ preinkubacji, określenie czasu potrzebnego do osiągnięcia stanu równowagi i wpływ różnych stężeń fenolu na jego adsorpcję w glebie. Stosowne wydaje się również do tego celu opracowanie matematyczne z wykorzystaniem równania Freundlicha ($S = KC^N$, gdzie S oznacza ilość zaadsorbowanego związku na 1 g gleby ($\mu\text{g g}^{-1}$), C jest stężeniem w stanie równowagi ($\mu\text{g ml}^{-1}$), a K i N są stałymi) oraz wyznaczenie parametru E , pozwalającego na jednoznaczne odróżnienie fizycznej adsorpcji od mikrobiologicznej degradacji.

Z licznych prac wynika, że tempo eliminacji związków aromatycznych z gleby zależy od przeżywalności wprowadzonych do niej bakterii oraz ich aktywności degradacyjnej. Przeprowadzone oznaczenia liczby komórek *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w czasie degradacji fenolu w stężeniach $1,7 \text{ mg g}^{-1}$, $3,3 \text{ mg g}^{-1}$ i $5,0 \text{ mg g}^{-1}$

w glebach L1, L2 i G wykazały, że lepszą przeżywalnością odznaczał się w nich *Pseudomonas* sp. JS150. Spadek liczby komórek tego szczepu w ciągu pierwszych 4 dni od wprowadzenia ich do gleb L1 i G skażonych dawkami fenolu 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ był o około 10% mniejszy niż komórek *Pseudomonas vesicularis*, z kolei nie różnił się w glebie L2 z dodatkiem fenolu w stężeniu 1,7 mg g⁻¹. W glebie L2 skażonej wszystkimi stężeniami fenolu spadek liczby komórek obu szczepów w tym czasie był podobny. Szczep *Pseudomonas* sp. JS150 przeżywał także lepiej w glebach kontrolnych w porównaniu z *Pseudomonas vesicularis*. W ostatnim dniu prowadzenia pomiarów w glebie G liczebność komórek tego szczepu była większa o około 23% od liczby, jaką do niej wprowadzono, w glebie L1 o 8%, a w L2 spadła o 5% w porównaniu z wyjściową liczbą bakterii. Dla porównania, liczba bakterii *Pseudomonas vesicularis* w glebach kontrolnych L1 i G nie przekraczała 87% wyjściowej liczby komórek, a w glebie L2 — 72%. Szczep *Pseudomonas* sp. JS150 charakteryzował się także większą zdolnością do namnażania, szczególnie w obecności najwyższej dawki fenolu 5,0 mg g⁻¹, w glebach, do których wprowadzono go w postaci mieszaniny z *Pseudomonas vesicularis*. W glebach nieskażonych L1 i G, zawierających oba szczepy, także przeżywał lepiej niż *Pseudomonas vesicularis* i przez cały czas trwania eksperymentu stwierdzano w nich więcej komórek niż wprowadzono.

Spadek liczebności komórek trzech mutantów *Pseudomonas putida* EEZ15 (Ap^r, Km^r), *P. putida* F1 (Rif^r) i *P. putida* DOT-T1 (Rif^r, Cm^r) po dodaniu do gleby toluenu w stężeniu 1% obserwowali także HUERTAS i in. (1998). Spośród nich najbardziej wrażliwy na tę dawkę toluenu był *Pseudomonas putida* EEZ15, którego liczba komórek w ciągu kilku godzin drastycznie zmalała, a po 24 godz. nie izolowano go z tej gleby. Liczba komórek dwóch pozostałych szczepów także zmalała z 10⁶ do 10²—10⁴ w 1 g gleby, ale w następnych dniach systematycznie się zwiększała i w 30 dniu po dodaniu toluenu wynosiła 10⁵—10⁶ w 1 g gleby. Z kolei toluen w stężeniu 10% powodował natychmiastową śmierć wszystkich szczepów, o czym świadczył brak wzrostu komórek na selekcyjnych podłożach z dodatkiem odpowiednich antybiotyków. Autorzy ci nie stwierdzili natomiast wpływu heptanu (10%) i propylobenzenu (0,1—10%) na przeżywalność tych szczepów. Przeciwny efekt w przeżywalności komórek *Pseudomonas cepacia* AC1100 w glebie w obecności kwasu 2,4,5-trichlorofenoksyoctowego w stężeniu 1 μg g⁻¹ obserwowali CHATTERJEE i in. (1982). Po skażeniu gleby tym związkem nastąpił gwałtowny wzrost liczby komórek, która zmniej-

szyła się dopiero po 7 dniach, gdy wprowadzony kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy uległ rozkładowi w 95%. Wzrost liczebności mikroorganizmów po dodaniu wzrastających stężeń toluenu do różnych gleb obserwowali także DAVIS i MADSEN (1996). Największe różnice w liczebności bakterii degradujących ten związek stwierdzali między glebą piaszczystą a piaszczysto-gliniastą. W pierwszej z nich przed dodaniem toluenu oznaczyli jedynie 10 komórek w 1 g gleby, a w drugiej 6,01 · 10⁴. Po skażeniu tych gleb toluenem w stężeniu 5 μg g⁻¹ liczba bakterii degradujących toluen stopniowo się zwiększała i w ostatnim dniu eksperymentu wynosiła 2,81 · 10³ i 2,20 · 10⁶, odpowiednio w 1 g gleby piaszczystej i piaszczysto-gliniastej. Dla porównania, w glebie gliniastej skażonej tą dawką toluenu liczba bakterii zmniejszyła się z wyjściowej 2,53 · 10⁶ do 1,72 · 10⁵ w 1 g gleby.

Nie zawsze jednak zauważa się bezpośrednią zależność między przeżywalnością szczepów a ich aktywnością degradacyjną. Brak takiej korelacji stwierdzili HALUŚKA i in. (1999) w badaniach nad rozkładem PCB w różnych glebach przez *Alcaligenes xylosoxidans*. Wykazali oni, że wysokiej przeżywalności tego szczepu w różnych glebach nie zawsze towarzyszyła eliminacja z nich tych samych stężeń PCB. Wpływ gęstości zawiesiny bakterii na rozkład fenolu oraz udział poszczególnych szczepów w jego eliminacji badano także w podłożach płynnych. KHLEIFAT (2006) stwierdził, że w zależności od gęstości komórek *Ewingella americana* w zawieszynie (OD₆₀₀ = 0,2; 0,4 i 0,6) czas pełnej degradacji fenolu w stężeniu 300 ppm przez ten szczep był różny i wynosił odpowiednio 24 godz., 48 godz. i 72 godz. W innych badaniach GOSWAMI i in. (2005) dowiedli na podstawie oznaczeń liczby komórek szczepów *Rhodococcus erythropolis* M1 i *Pseudomonas fluorescens* P1, hodowanych w podłożu M3 z dodatkiem fenolu w stężeniu 100 mg l⁻¹, że do 8 godz. udział obu szczepów w rozkładzie tego związku był równorzędny, w kolejnych godzinach lepiej rósł i wyższą aktywność enzymatyczną wykazywał dominujący w tej mieszaninie *Rhodococcus erythropolis* M1.

Oznaczenia ogólnej zawartości materii organicznej, węgla organicznego i frakcji kwasów humusowych (fulwowych, huminowych i hymatomelanowych) wydawały się istotne, ponieważ bakterie mogą wykorzystywać je jako źródło węgla, azotu czy składników mineralnych. Ponadto wiedząc, że związki typu fenoli są głównymi składnikami budulcowymi jąder substancji humusowych, można było na podstawie ich zawartości stwierdzić potencjalne wykorzystanie wprowadzonego do gleby fenolu jako substratu do ich syntezy. Największy ubytek w zawartości procentowej materii organicz-

nej oraz węgla organicznego w kontrolnych glebach L1, L2 i G, zawierających pojedyncze szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 lub ich mieszaninę, wskazuje na to, że korzystały one z nich jako źródła węgla i energii. Mniejszy ubytek materii organicznej i węgla organicznego z gleb w czasie degradacji wszystkich stężeń fenolu przez badane szczepy może z kolei sugerować, że bakterie, mając do dyspozycji wprowadzony do gleb substrat fenolowy, preferencyjnie wykorzystywały go jako źródło węgla i energii, a w mniejszym stopniu korzystały z węgla zawartego w materii organicznej gleby. Obserwowany także w czasie rozkładu fenolu spadek zawartości kwasów fulwowych może świadczyć o ingerencji bakterii w ich strukturę, polegającej na odłączaniu od rozbudowanych jąder aromatycznych jednostek monomerycznych, które mogły dla nich stanowić źródło węgla i energii. Kwas fulwowy uważa się za „niedojrzałą” postać kwasów huminowych; w porównaniu z nimi składają się z prostszych związków o niższej masie cząsteczkowej. Są łatwo rozpuszczalne w wodzie i ruchliwe w glebie, co w porównaniu z kwasami huminowymi i huminami czyni je bardziej podatnymi na rozkład w określonych warunkach bioekologicznych (KOHL, RICE, 1998). Takie zjawisko zachodzi na przykład w glebach uprawnych, w których w wyniku zabiegów agrotechnicznych następują po sobie okresy szybkiego rozkładu związków próchnicznych oraz okresy akumulacji próchnicy w wyniku uprawy odpowiednich roślin. Niższą zawartość kwasów huminowych w glebie skażonej lekkim olejem napędowym w stężeniach 5%, 15% i 25% oraz ciężkim olejem Hipol w porównaniu z glebą kontrolną w 2. tygodniu eksperymentu stwierdzili MAŁACHOWSKA-JUTSZ i in. (1997). Po dodaniu do skażonej gleby CaCO_3 i wyizolowanego z terenu rafinerii szczepu *Pseudomonas* sp. nastąpił w niej w pierwszych 12 tygodniach znaczny wzrost zawartości kwasów huminowych. Sole wapnia, regulując pH, nadają tlenowy charakter procesom rozkładu substancji organicznej, przyspieszając w ten sposób jej mineralizację i gromadzenie humusu, natomiast rola bakterii mogłaby polegać na wbudowywaniu metabolitów pośrednich powstałych w czasie rozkładu oleju napędowego, w strukturę kwasów huminowych. Znaczenie substancji próchnicowych w mikrobiologicznym rozkładzie związków aromatycznych nie jest dokładnie wyjaśnione. SIVAGURUNATHAN i in. (2003) wykazali na przykład, że kwasy huminowe w odpowiednim stężeniu hamują rozkład toluenu przez szczep *Pseudomonas fluorescens*. Wprowadzenie ich do podłoża w stężeniu 0,02% nie miało wpływu na czas degradacji toluenu przez bakterie, a stężenie 0,04% znacznie

wydłużało czas jego całkowitego rozkładu. W obecności wyższych stężeń kwasów huminowych rozkład toluenu był całkowicie zahamowany. Z kolei ORTEGA-CALVO i SAIZ-JIMENEZ (1998) udowodnili, że dzięki kwasom huminowym w stężeniu $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ możliwy był rozkład fenantrenu w dawce $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ przez szczep *Pseudomonas fluorescens*. Dzięki jednoczesnej adsorpcji fenantrenu i bakterii przez kwasy huminowe dochodziło do bezpośredniego kontaktu ich komórek z ksenobiotykiem, co w znacznym stopniu przyspieszało ich rozkład.

5.2. Bioaugmentacja jako metoda wspomagająca rozkład fenolu w glebie

Bioaugmentacja jest jedną z obiecujących technik bioremediacji gleb, stosowaną w celu zwiększenia tempa usuwania z nich takich zanieczyszczeń, jak: węglowodory alifatyczne i aromatyczne, chlorowcopochodne, polichlorowane bifenyle, 2,4,6-trinitrololuen i pestycydy. Chociaż wprowadzanie do zanieczyszczonych środowisk wyselekcjonowanych mikroorganizmów nie jest koncepcją nową, opisano dotąd zaledwie kilka jej zastosowań w warunkach polowych. Większość badań prowadzi się nadal w warunkach laboratoryjnych, najczęściej w glebach sterylnych, które według EL FANTROUSSIEGO i AGATHOSA (2005) są chętniej kolonizowane przez obce szczepy niż gleby naturalne i łatwiej jest w nich kontrolować rozmieszczenie, przeżywalność oraz aktywność wprowadzonych szczepów. Pomija się jednak wtedy wpływ czynników biotycznych, takich jak: oddziaływanie z mikroflorą autochtoniczną (drapieżnictwo i współzawodnictwo o składniki pokarmowe czy akceptory elektronów), obecność korzeni uwalniających różne związki organiczne oraz wiele czynników abiotycznych (pH, dostępność wody, tlenu czy temperaturę) (VAN VEEN i in., 1997). Badania takie są ważne, ponieważ pozwalają poznać losy introdukowanych mikroorganizmów w glebie i ich znaczenie w usuwaniu zanieczyszczeń, jednakże nie odzwierciedlają w pełni wzajemnych relacji między obcymi i rodzimymi mikroorganizmami oraz skażeniami. Według ALEKSANDRA (1999), wydajność bioremediacji jest funkcją aktywności w naturalnym środowisku inokulowanych szczepów do rozkładu określonego typu zanieczyszczeń.

Dobór odpowiednich mikroorganizmów do bioaugmentacji nie jest zadaniem łatwym. Oprócz wysokiej skuteczności rozkładu określonych zanieczyszczeń, powinny mieć zdolność adaptacji i roz-

woju w nowym środowisku (VOGEL, 1996). Mikroorganizmy można wprowadzać do gleby w postaci: pojedynczych szczepów preadaptowanych do rozkładu danego związku, preadaptowanych mieszanych populacji, GMMs lub dodanie stosownych genów wbudowanych w wektory, które najczęściej w procesie koniugacji mogą być przenoszone do komórek bakterii naturalnie zasiedlających glebę (EL FANTROUSSI, AGATHOS, 2005). Ostatnio zwraca się także uwagę na korzyści wynikające z łączenia z sobą w inokulacie szczepów bakterii i grzybów mikroskopowych (JACQUES i in., 2008).

W przeprowadzonej bioaugmentacji gleb L1, L2 i G zastosowano opcję 1 i 2, tzn. wprowadzono do nich mieszaninę preadaptowanych do rozkładu fenolu w stężeniu 4 mM komórek dzikiego szczepu *Pseudomonas vesicularis* i zmienionego na drodze mutagenyzy *Pseudomonas* sp. JS150. Uzyskany efekt bioaugmentacji można uznać za pomyślny, ponieważ udało się zwiększyć wydajność eliminacji fenolu z gleb L1, L2 i G skażonych tym związkiem w porównaniu z glebami niebioaugmentowanymi. Najszybciej rozkład fenolu w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ zachodził w poddanej bioaugmentacji glebie G. Odpowiednio dla wzrastających dawek fenolu trwał w niej krócej o 8, 12 i 32 dni niż w glebie L1 i o 24, 32 i 56 dni krócej niż w glebie L2. Mogło to wynikać nie tylko z większej aktywności degradacyjnej, lecz także z lepszej niż w glebach L1 i L2 przeżywalności w obecności fenolu zarówno bakterii heterotroficznych, jak i szczepu *Pseudomonas* sp. JS150. Skuteczniejsza degradacja fenolu przez wzbogaconą rodzimą mikroflorę o szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w porównaniu ze skażonymi, ale niebioaugmentowanymi glebami kontrolnymi może wskazywać na zachodzące między nimi oddziaływania synergistyczne. Brak informacji o przeżywalności drugiego z wprowadzonych szczepów *Pseudomonas vesicularis* uniemożliwia jednak dokładne sprecyzowanie tych zależności. W glebach niebioaugmentowanych rozkład wszystkich stężeń fenolu przez naturalnie zasiedlające je mikroorganizmy także zachodził, co może świadczyć o ewentualnej wcześniejszej ekspozycji rodzimej mikroflory na fenol i obecności gatunków zawierających informację genetyczną o rozkładzie tego związku. Trwał on jednak dłużej niż w glebach zawierających mieszaninę szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150. W glebie G mikroorganizmy autochtoniczne degradowały fenol w dawkach 1,7 mg g⁻¹ i 3,3 mg g⁻¹ w czasie o 8 dni dłuższym niż w glebie poddanej bioaugmentacji, a w dawce 5,0 mg g⁻¹ fenolu — dłużej o 12 dni. W glebie L1 różnice w czasie

rozkładu wzrastających stężeń fenolu były większe i wynosiły odpowiednio: 8, 12 i 16 dni, a największe były w glebie L2, w której zawierały się w przedziale 20—28 dni. Z oznaczeń zawartości materii organicznej i węgla organicznego wynika, że zarówno w skażonych glebach poddanych, jak i niepoddanych bioaugmentacji mikroorganizmy korzystały nie tylko z fenolu jako źródła węgla i energii, lecz także z innych związków w nich występujących, choć preferencyjnie wykorzystywały fenol. Podobnie jak w dniu całkowitego rozkładu fenolu przez szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, dodane pojedynczo czy w postaci mieszaniny do gleb sterylnych, a także w glebach skażonych i nieskażonych oraz bioaugmentowanych i niebioaugmentowanych w ostatnim dniu prowadzenia oznaczeń stwierdzono nieznaczny spadek zawartości kwasów fulwowych, co potwierdza możliwość wykorzystania ich przez mikroorganizmy jako dodatkowego źródła węgla. Zdolność skutecznej degradacji fenolu w glebach bioaugmentowanych z zastosowaniem szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 może być wykorzystana na przykład do sporządzania konsorcjów mikroorganizmów w projektach rekultywacji gleb zanieczyszczonych związkami fenolowymi czy ropopochodnymi. Biopreparaty, będące mieszaninami mikroorganizmów o różnym składzie gatunkowym i proporcjach ilościowych, po wprowadzeniu do gleb znacznie wspomagają, a niekiedy wręcz warunkują procesy likwidacji skażeń. Możliwości praktycznego wykorzystania bioaugmentacji do eliminacji fenolu z gleb dotąd w literaturze nie opisano, co może wynikać z powszechnie przyjętego poglądu, że związek ten stosunkowo łatwo jest usuwany przez mikroorganizmy z tego środowiska i nie stwarza takiego zagrożenia dla ekosystemów, jak na przykład chlorowcopochodne, PCB czy WWA. Nie oznacza to jednak, że nie można posłużyć się tym zabiegiem do usuwania fenolu z gleby czy wód w miejscach nagłego skażenia wysokimi stężeniami tego związku, szczególnie gdy samooczyszczanie jest mało skuteczne lub nie zachodzi.

Więcej uwagi, w porównaniu ze związkami fenolowymi, poświęca się natomiast znaczeniu bioaugmentacji w rozkładzie mniej podatnych na atak mikrobiologiczny związków ksenobiotycznych. Zadowolający wynik bioaugmentacji w usuwaniu wybranych WWA z gleby otrzymali JACQUES i in. (2008). Zwiększenie wydajności rozkładu antracenu, fenantrenu i pirenu uzyskali dzięki wzbogaceniu gleby w 6-składnikową mieszaninę, w skład której wchodziło pięć szczepów bakterii: *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans* i szczep z rodzi-

ny *Microbacteriaceae*, oraz jeden gatunek grzyba *Fusarium oxysporum*. Mieszanina tych szczepów rozkładała w 99%, 99% i 96% odpowiednio: antracen, fenantren i piren w ciągu 70 dni, i w 78% wszystkie WWA w tym samym czasie. Każdy z tych szczepów był znacznie mniej efektywny w rozkładzie WWA w porównaniu z konsorcjum, co wskazuje na ich synergistyczne oddziaływania w mineralizacji WWA. Uzupełnienie mieszaniny szczepów bakteryjnych o gatunek grzyba *Fusarium oxysporum* miało znaczny wpływ na przebieg biodegradacji WWA. Według jednej z hipotez, ruch strzępek grzyba, do których wiążą się bakterie, umożliwia przemieszczanie się ich w kierunku zanieczyszczenia. Według BOONCHANA i in. (2000), grzyb inicjuje utlenienie WWA, uwalniając bardziej polarne metabolity, które z kolei przez bakterie są przekształcane do CO₂ i H₂O. Pozytywny wynik bioaugmentacji z wykorzystaniem autochtonicznych szczepów bakterii zdolnych do rozkładu WWA w glebie uzyskali także KANALY i HARAYAMA (2000). Po reintrodukcji dwóch izolatów, należących do rodzajów *Gordona* i *Mycobacterium*, tempo rozkładu pirenu w glebie zwiększyło się 6-krotnie w porównaniu z glebą bez inokulowanych bakterii. Podobnie BARATHI i VASUDEVAN (2003) obserwowali większą wydajność usuwania składników ropy naftowej z gleby w ciągu 30 dni po reintrodukcji do niej szczepu *Pseudomonas fluorescens* NS1. Zakończoną sukcesem bioaugmentację z zastosowaniem anaerobowych konsorcjów bakterii do rozkładu benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksyleny (BTEX) przeprowadzili także DA SILVA i ALVAREZ (2004).

Nie zawsze jednak użycie w bioaugmentacji wyspecjalizowanych w rozkładzie określonych zanieczyszczeń szczepów przynosi spodziewane rezultaty. WENDEROTH i in. (2003) wykazali, że rozkład chlorobenzenu w wodach podziemnych zależał od użytego do tego celu szczepu. Spośród kilku szczepów z rodzaju *Pseudomonas* o tych samych zdolnościach do rozkładu chloro- i dichlorobenzenu tylko niektóre zwiększały wydajność ich biodegradacji. Na przykład *Pseudomonas putida* GJ31 i *Pseudomonas putida* F1 przyspieszały rozkład, gdy tymczasem *Pseudomonas aeruginosa* RHO1 nie miał większego wpływu na wydajność procesu. Losy wprowadzonych szczepów *Pseudomonas mendocina* PC1, *Pseudomonas fluorescens* PC18, PC20 i PC24 do gleb skażonych fenolem i ropą naftową badali także HEINARU i in. (2005). Każdy z tych szczepów rozkładał inne związki aromatyczne i uruchamiał w ich obecności różne szlaki metaboliczne. Wszystkie szczepy rozkładały fenol i *p*-krezol, ale nie rozkładały *m*-toluenu, szczep PC20 wykazywał zdolność degradacji salicylanu

i naftalenu. Szczepy PC1 i PC18 rozkładały fenol szlakiem *meta*, szczep PC20 — *meta* i *orto*, a PC24 — *orto*. Rozkład *p*-krezolu szczepy PC1 i PC20 przeprowadzały drogą *meta*, a szczepy PC18 i PC24 — szlakiem *orto*. Wyniki uzyskane z analizy DGGE produktów reakcji PCR genów 16S rRNA i genu kodującego większą podjednostkę hydroksylazy fenolowej (LmPH) dowiodły, że dominującym szczepem w glebie skażonej ropą naftową był *Pseudomonas fluorescens* PC20, a w glebie zanieczyszczonej fenolem — *Pseudomonas mendocina* PC1. Poza tą różnicą, mieszanina introdukowanych bakterii wykazywała także zróżnicowane typy wzrostu w zależności od rodzaju zanieczyszczenia. W glebie skażonej ropą szczepy rosły w postaci rozgałęzionych agregatów, a w glebie skażonej fenolem wzrost ich był równomierny. Przewaga różnych szczepów w określonych glebach wskazuje, że rozkład znajdujących się w niej zanieczyszczeń przebiegał odmiennymi szlakami metabolicznymi, z kolei forma kolonizacji, szczególnie w glebie skażonej ropą naftową, mogła mieć znaczenie w wykorzystywaniu intermediatów rozkładu danego związku w jednym miejscu przez kilka szczepów równocześnie. W innych badaniach JERNBERG i JANSSON (2002) użyli szczepu *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L (z chromosomalnym genem *luc* kodującym lucyferazę) do usuwania 4-chlorofenolu z piaszczysto-gliniastej gleby uprawnej. Dokonując pomiarów aktywności lucyferazy, oznaczenia liczby bakterii metodą płytkową i analizy T-RFLP, możliwe było śledzenie przeżywalności inokulowanego szczepu w glebie i jego oddziaływań z mikroflorą autochtoniczną. Uzyskane z tych analiz wyniki pozwoliły stwierdzić, że *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L miał znaczącą przewagę w glebie zanieczyszczonej 4-chlorofenolem. Ponadto związek ten stymulował wzrost bakterii, które rozkładały go w stężeniu 180 µg g⁻¹ w ciągu 8 dni. Odpowiedni dobór szczepów do bioaugmentacji też jest niezwykle ważny, gdy zamierza się wykorzystać GMMs. NEWBY i in. (2000) wykazali, że transfer plazmidu pJP4 z naturalnego gospodarza *Ralstonia eutropha* JMP134 i zmodyfikowanego szczepu *E. coli* D11, zawierającego ten plazmid, do autochtonicznych biorców w glebie skażonej kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym odbywał się z różną częstotliwością. Analiza izolowanych z gleb transkoniugantów, będących głównie przedstawicielami bakterii z rodzajów *Burkholderia* i *Ralstonia*, wskazuje, że bardziej wydajny w transferze plazmidu pJP4 był szczep *E. coli* D11. Transkoniuganty z plazmidem pochodzącym z komórek *E. coli* D11 wykazywały także wyższą aktywność degradacji kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego. Związek ten w stę-

żeniu 500 µg g⁻¹ degradowały w ciągu 7 dni, podczas gdy transkoniuganty z plazmidem uzyskany z komórek *Ralstonia eutropha* JMP134 — w ciągu 28 dni. Badania te dowodzą, że bioaugmentacja z zastosowaniem bakterii niosących plazmidy może prowadzić do transferu genów do autochtonicznych biorców, oraz jak ważny jest dobór odpowiednich szczepów do inokulacji dla wyższej skuteczności usuwania zanieczyszczeń z gleby.

Zastosowanie w bioaugmentacji szczepów bakterii modyfikowanych genetycznie nie jest powszechnie akceptowane, jednak takie badania są konieczne, ponieważ wyjaśniają zjawisko horyzontalnego transferu genów i genetycznej adaptacji bakterii do ksenobiotyków. De LIPTHAY i in. (2001) wykazali możliwość horyzontalnego transferu genu *tfdA* niesionego przez plazmid pRO103 z komórek *E. coli* HB101 do degradujących fenol biorców *Ralstonia eutropha* AEO106 i gatunków autochtonicznych, co znacznie zwiększyło tempo rozkładu kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego zarówno w glebach sterylnych, jak i niesterylnych. Gen *tfdA* koduje dioksygenazę 2,4-dichlorofenoksy/2-okso-glutaranową, która przekształca kwas fenoksyoctowy do fenolu. Z przedstawionych badań wynika, że w efekcie HGT możliwe jest uzupełnianie szlaków metabolicznych o nowe geny, co rozszerza zakres degradowanych związków przez mikroorganizmy. Zjawisko to potwierdzają także rezultaty WATANABE i in. (2002 a, 2002 b), którzy wprowadzili do naturalnie występującego i dominującego w osadzie czynnym szczepu *Comamonas* sp. rN7 geny *phc*, kodujące podjednostki hydroksylazy fenolowej i jej regulatory transkrypcyjne, pochodzące z *Comamonas testosteroni* R5. W wyniku udanego transferu genów *phc* stwierdzili wysoką aktywność utleniania fenolu przez wprowadzonego do osadu czynnego transkoniuganta rN7(R503) w porównaniu z osadem zawierającym szczep *Comamonas* sp. rN7 i *Comamonas testosteroni* R5. Potwierdza to, że dominujące szczepy w populacjach mikroorganizmów zanieczyszczonych środowisk są dobrymi kandydatami na gospodarzy nowych genów katabolicznych, zwiększających ich potencjał degradacyjny. Większą wydajność rozkładu alkoholu benzyloвого (BA) w osadzie czynnym uzyskali także NANCHARAIAN i in. (2008) dzięki wzbogaceniu go o nowy szczep *Pseudomonas putida* KT2442, niosący plazmid TOL. Badanie ekspresji reporteroowego białka GFP (ang. *green fluorescent protein*), kodowanego w plazmidzie tego szczepu, z wykorzystaniem konfokalnego, laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM), pozwoliło *in situ* monitorować rozmieszczenie wprowadzonych komórek i transfer plazmidu do innych bakterii. Badania mikroskopowe wykazały, że szczep *Pseudomonas pu-*

tida KT2442 wiązał się z powierzchnią specjalnie przygotowanych kłaczków, tworząc granule (o średnich rozmiarach 1,8 mm × 0,86 mm), w ciągu kilku godzin penetrował ich wnętrze i w wyniku proliferacji tworzył wyraźne mikrokolonie, w których pojawiały się transkoniuganty. Rezultatem tego był rozkład BA w stężeniu 5 mM w ciągu 6 godz., podczas gdy osad niepoddany bioaugmentacji w zasadzie tego związku nie rozkładał. Dzięki informacji genetycznej nabytej w wyniku HGT bakterie mogą zasiedlać nowe nisze ekologiczne. Transfer ruchomych elementów genetycznych powoduje nagłe pojawienie się zdolności wykorzystywania wcześniej nieprzyswajalnych źródeł węgla. Wykazano, że niektóre szlaki metaboliczne mają strukturę mozaikową, co świadczy, że zostały złożone z pojedynczych genów lub grup genów, pochodzących od różnych bakterii, w trakcie wielu niezależnych procesów HGT (TOP i in., 2002; TOP, SPRINGAEL, 2003).

Praktyką w zwiększaniu tempa rozkładu wielu trwałych i niebezpiecznych zanieczyszczeń organicznych jest kombinacja bioaugmentacji z biostymulacją. Biostymulacja polega na wprowadzeniu do środowiska dodatkowych źródeł węgla lub akceptorów elektronów stymulujących wzrost mikroorganizmów. SILVA i in. (2004) połączyli bioaugmentację z biostymulacją w celu eliminacji z gleby atrazyny. Wprowadzonym do gleby szczepem był *Pseudomonas* sp. ADP, a dodatkowymi źródłami węgla i energii — cytrynian oraz bursztynian. W wyniku tego zabiegu przeżywalność inokulowanego szczepu w obecności atrazyny była lepsza i zwiększyło się tempo jej mineralizacji. Dzięki kombinacji tych dwóch metod możliwe było także usunięcie ropy naftowej z nadbrzeżnych skał po katastrofie tankowca Exxon Valdez w cieśninie Prince Williams w USA. W wyniku zastosowania preparatów biologicznych i nawozów, znanych pod handlową nazwą Inipol EAP22 i Customblen, po 10 dniach czarne powierzchnie skał stały się białe i wolne od zanieczyszczeń (ATLAS, 1995). Można przeprowadzać też bioaugmentację z jednoczesnym wprowadzaniem surfaktantów. Taka strategia jest skuteczna szczególnie w usuwaniu wysoce hydrofobowych WWA. GARON i in. (2004) wykazali, że w wyniku wprowadzenia do gleby szczepu *Absidia cylindrospora* i surfaktantu maltozylo-cyklodekstrinu zwiększyła się biodostępność fluorenu i tempo degradacji.

5.3. Wykorzystanie analizy FAMES do monitorowania tempa rozkładu fenolu w glebie

Chcąc dokładnie określić efekty mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń organicznych w glebie, konieczne są nie tylko pomiary ich aktualnego stężenia czy identyfikacja produktów pośrednich powstających w czasie ich utleniania, lecz także ważna jest biologiczna aktywność gleby. Można ją ocenić, stosując standardowe analizy mikrobiologiczne, polegające na oznaczeniu ogólnej liczebności bakterii heterotroficznych, aktywności enzymów (dehydrogenazy, fosfatazy, katalazy, lipazy i ureazy) czy tempa respiracji gleby. Oznaczenia liczebności bakterii heterotroficznych umożliwiają ocenę stopnia aklimatyzacji bakterii do panujących warunków w glebie, a pomiary aktywności enzymów i testy respirometryczne są dobrymi biomarkerami ich aktywności metabolicznej (TUNLID, WHITE, 1992; LANGBEHN, STEINHART, 1995; BALBA i in., 1998; MARGESIN i in., 2000). Alternatywną metodą, niezależną od technik hodowlanych, stosowaną do oznaczania żywej biomasy i statusu fizjologicznego bakterii jest analiza fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs) (KAUR i in., 2005). Fosfolipidy są dobrymi biomarkerami. Ponieważ występują w komórkach bakterii w stałej ilości w stosunku do ich biomasy, są szybko rozkładane po śmierci komórki, nie stanowią materiału zapasowego i nie są składnikami zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego (WHITE, RINGELBERG, 1997). Jakościowa i ilościowa analiza PLFAs znalazła także szerokie zastosowanie w ocenie składu i struktury zespołów mikroorganizmów w środowiskach skażonych różnymi związkami, na przykład trinitrotoluenem, trinitrobenzenem (FULLER, MANNING, 2004), WWA (RINGELBERG i in., 1997), substancjami ropopochodnymi (MACNAUGHTON i in., 1999) czy jonami metali ciężkich (PENANEN i in., 1998, 2001) oraz w czasie rozkładu zanieczyszczeń organicznych w procesie kompostowania (STEGER i in., 2003; BARJE i in., 2008). Inną metodą, opartą na izolacji komórkowych kwasów tłuszczowych i również często stosowaną w badaniach środowiskowych, jest analiza MIDI-FAME. Podobnie jak PLFA, stosuje się ją do oceny stanu fizjologicznego komórek oraz bioróżnorodności zespołów mikroorganizmów zarówno skażonych, jak i nieskażonych środowisk (IBEKWE, KENNEDY, 1999; KOZDRÓJ, 2000; CHAO, HSU, 2004). Wskaźnikami postępu bioremediacji gleb, szczególnie zanieczyszczonych ropą naftową, mogą być także obecne w niej w danym momencie określone węglowo-

dory. Z uwagi na to, że bakterie szybciej rozkładają alkanoy prostoańcuchowe, w mniejszym stopniu rozgałęzione (np. pristan, fitan czy hopan) oraz izoprenoidowe, wartość stosunku alkanoy prostoańcuchowych do rozgałęzionych może być wskaźnikiem stopnia ich eliminacji ze środowisk zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi (WANG i in., 1994).

W przeprowadzonych badaniach podjęto próbę zastosowania metody MIDI-FAME do monitorowania stopnia rozkładu fenolu przez szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 po wprowadzeniu do sterylnych gleb oraz w glebach poddanych bioaugmentacji. Dokonanie szczegółowych analiz kwasów tłuszczowych w czasie biodegradacji fenolu w glebach, w różnych układach doświadczalnych, pozwoliło zaobserwować podobieństwa i różnice w składzie i zawartości kwasów u pojedynczych szczepów, w ich mieszaninie oraz w obecności mikroflory autochtonicznej w zależności od rodzaju gleby i stężenia fenolu. Na podstawie analizy profili kwasów tłuszczowych możliwe było także stwierdzenie, dzięki jakim mechanizmom bakterie adaptują się do obecności fenolu w glebie.

Pierwszą reakcją bakterii *Pseudomonas vesicularis* po wprowadzeniu ich do sterylnych gleb skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ był wzrost w ich komórkach zawartości procentowej kwasów nasyconych, prostoańcuchowych (10:0, 14:0, 15:0, 16:0 i 18:0). Stwierdzono, że im wyższą dawką fenolu skażono gleby L1 i L2, tym wzrost procentowego udziału kwasów z tej grupy był większy, natomiast w glebie G niezależnie od stężenia fenolu był podobny. Z gleby L1 skażonej fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ izolowano do dnia 8. o 1,02% więcej kwasów prostoańcuchowych niż po 24-godzinnej ekspozycji bakterii na ten związek, z gleby z dodatkiem 3,3 mg g⁻¹ fenolu do dnia 16. o 11,19%, a z gleby skażonej 5,0 mg g⁻¹ fenolu do dnia 32. o 11,27%. Dla porównania, z gleby L2 skażonej wzrastającymi stężeniami fenolu ekstrahowano tych kwasów odpowiednio więcej o 5,36% do dnia 32., o 7,22% do dnia 32. i o 8,37% do dnia 48. W komórkach bakterii w glebie G wzrost zawartości kwasów nasyconych, prostoańcuchowych w mniejszym stopniu zależał od dawki fenolu i do dnia 8. w tej glebie skażonej wszystkimi stężeniami fenolu zawierał się w przedziale 4,17—4,97%. Z kolei u bakterii w nieskażonych glebach kontrolnych nie stwierdzono większych różnic w udziale kwasów prostoańcuchowych w kolejnych dniach oznaczeń. U szczepu *Pseudomonas* sp. JS150, dodanego do gleb L1, L2 i G, wzrost udziału kwasów nasyconych, prostoańcuchowych (10:0, 14:0, 15:0, 16:0

i 18:0) w porównaniu z *Pseudomonas vesicularis* był znacznie większy. Z gleby L1 zanieczyszczonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ w porównaniu z dniem 1. izolowano tych kwasów więcej odpowiednio o 10,81%, 21,13% i 26,23% do dnia 16., z gleby L2 o 14,44%, 21,31% i 22,37% do dnia 32., a z gleby G — o 12,21%, 15,52% i 15,03% do dnia 16. W komórkach bakterii w nieskażonych glebach kontrolnych także stwierdzono wzrost zawartości kwasów rozgałęzionych, ale w przedziale 5—8%. Tak znaczne różnice między *Pseudomonas vesicularis* a *Pseudomonas* sp. JS150 w udziale tych kwasów mogły wynikać z innej ich zawartości w wyjściowych profilach bakterii, hodowanych w bulionie odżywczym, przed introdukcją do gleb. W komórkach *Pseudomonas vesicularis* kwasy te stanowiły 46,69% ogólnej zawartości izolowanych FAMES, a u *Pseudomonas* sp. JS150 ich udział był prawie 3-krotnie mniejszy (18,78%). Zawartość kwasów nasyconych, prostołańcuchowych zwiększała się także u obu szczepów wprowadzonych w postaci mieszaniny do skażonych wszystkimi stężeniami fenolu gleb L1, L2 i G. Do dnia 8. z gleby L1 izolowano tych kwasów odpowiednio do zastosowanych stężeń fenolu więcej o 4,78%, 9,31% i 10,25%, z gleby L2 do dnia 16. o 9,94%, 8,12% i 11,13%, a z gleby G w dniach od 4. do 8. o 3,28%, 1,40% i 8,88% w porównaniu z ich udziałem w komórkach obu szczepów w dniu 1. Podobna zawartość kwasów nasyconych, prostołańcuchowych w komórkach *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w glebach kontrolnych lub nieznaczny ich spadek (2—5%) w porównaniu z glebami skażonymi może wskazywać na ważny udział kwasów z tej grupy w modyfikacji lipidów błonowych w obecności fenolu w celu zapewnienia zarówno właściwej płynności, przepuszczalności, jak i integralności błony. Wzrost stopnia nasycenia błony w wyniku syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych jest jednym z najpowszechniej występujących u bakterii mechanizmów adaptacji do toksycznych związków fenolowych. Taką zdolność bakterii do zmiany właściwości błony w obecności fenolu u szczepu *E. coli* K-12 i *Pseudomonas putida* P8, a w obecności 4-chlorofenolu w komórkach *Pseudomonas putida* NCTC 10936 obserwowali KEWELOH i in. (1991), HEIPIEPER i in. (1992) oraz LOFFHAGEN i in. (2001). Nowo zsyntetyzowane kwasy nasycone prawdopodobnie wbudowywane są do fosfolipidów błonowych w celu naprawy błony uszkodzonej przez te związki. Według PINKARTA i in. (1996), może na to wskazywać szybka wymiana kwasów nasyconych w PG i PE, obserwowana u *Pseudomonas putida* (szczepu Idaho) w warunkach ekspozycji na *o*-ksylen.

Podobny do obserwowanego pod wpływem związków fenolowych efekt wzrostu płynności i przepuszczalności błony komórkowej bakterii może wywoływać podwyższona temperatura oraz obecność w podłożu hodowlanym niektórych alkoholi czy krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych. INGRAM (1976) wykazał na przykład, że u *E. coli* K-12 CSH1 w obecności heksanolu i kwasu octowego wzrastała zawartość kwasów 12:0, 14:0 i 16:0, a LOFFHAGEN i in. (2001) stwierdzili wzrost udziału kwasu 16:0 i 18:0 w komórkach *Pseudomonas putida* NCTC 10936, hodowanych w temperaturze 40°C.

Wzrostowi zawartości kwasów nasyconych, prostołańcuchowych w komórkach bakterii *Pseudomonas vesicularis* w początkowych dniach prowadzenia eksperymentu towarzyszył wzrost udziału procentowego kwasów rozgałęzionych (11:0 *iso*, 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso* i 16:0 *iso*). W stosunku do ich zawartości w dniu 1. z gleb L1 i L2 skażonych fenolem w stężeniu 1,7 mg g⁻¹ izolowano ich w dniu 32. więcej odpowiednio o 10,41% i 9,02%, a z gleby G w dniu 16. o 13,26% więcej. Większy wzrost ich udziału obserwowano w glebach skażonych fenolem w dawce 3,3 mg g⁻¹. Z gleby L1 izolowano ich w dniu 48. o 14,11% więcej niż w dniu 1., z gleby L2 w dniu 32. o 13,25% więcej, a z gleby G w dniu 32. o 16,71% więcej. Z gleb L1 i L2 skażonych 5,0 mg g⁻¹ fenolu ekstrahowano ich natomiast w dniu 32. więcej odpowiednio o 10,36% i 16,05%, a z gleby G w dniu 16. o 14,60% więcej. W kolejnych dniach, w których stężenie wprowadzonego fenolu systematycznie się zmniejszało, obserwowano spadek udziału procentowego kwasów rozgałęzionych. W nieskażonych glebach kontrolnych z wprowadzonym szczepem *Pseudomonas vesicularis* udział kwasów rozgałęzionych przez cały czas trwania eksperymentu był podobny lub obserwowano nieznaczny wzrost ich zawartości, wynoszący 4—6%. Przeciwnie, w komórkach szczepu *Pseudomonas* sp. JS150 wzrostowi zawartości kwasów nasyconych towarzyszył znaczny spadek udziału kwasów rozgałęzionych, reprezentowanych przez: 11:0 *iso*, 13:0 *iso*, 14:0 *iso*, 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 16:0 *iso*, 17:0 *iso* i 19:0 *iso*. Różnica w zawartości tych kwasów między dniem 1. a dniem 16. w glebie L1 skażonej najniższym stężeniem fenolu wynosiła 12,75%, a między dniem 1. a 48. w glebie skażonej dawkami 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ wynosiła odpowiednio 13,24% i 34,88%. Ze skażonej gleby L2 także izolowano znacznie mniej kwasów rozgałęzionych. W dniu 48. ich zawartość w glebie L2 skażonej najniższym i najwyższym stężeniem fenolu była o 21,64% i 27,22% mniejsza niż w dniu 1., a w glebie skażonej dawką 3,3 mg g⁻¹ — o 27,21% mniejsza. Wśród FAMES uzyskanych z gleby G

skażonej wzrastającymi stężeniami fenolu udział kwasów rozgałęzionych w dniu 16. w porównaniu z dniem 1. był mniejszy odpowiednio o 20,79%, 24,39% i 27,87%. W następnych dniach, gdy stężenie wprowadzonego fenolu było coraz mniejsze, zawartość kwasów rozgałęzionych w komórkach *Pseudomonas* sp. JS150 zwiększała się, a gdy stwierdzono całkowity jego rozkład, była podobna do ich udziału w komórkach w nieskażonych glebach kontrolnych. Dla porównania, w komórkach tych bakterii w kontrolnych glebach L1 i G też następował spadek udziału kwasów rozgałęzionych, ale był on znacznie mniejszy niż w glebach skażonych i wynosił około 7—9%. Wyjątek stanowiła kontrolna gleba L2, w której zawartość kwasów rozgałęzionych w kolejnych dniach pomiarów była podobna. Otrzymane wyniki wskazują, że szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, dodane pojedynczo do zanieczyszczonych fenolem gleb, w odmienny sposób regulowały płynność i przepuszczalność błony z wykorzystaniem kwasów rozgałęzionych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że znacznie różniły się one między sobą zawartością tych kwasów w profilu wyjściowym FAMES, przed introdukcją do gleb. Szczep *Pseudomonas vesicularis* zawierał ich zaledwie 8,09%, a u *Pseudomonas* sp. JS150 były one dominujące w grupie kwasów nasyconych, wśród których stanowiły 57,85% wszystkich wyizolowanych kwasów. Z kolei zawartość kwasów rozgałęzionych, pochodzących z gleb, do których wprowadzono oba te szczepy, równocześnie zwiększała się w początkowych dniach prowadzenia oznaczeń. Nie był to jednak znaczny wzrost i w stosunku do ich zawartości w dniu 1. w skażonej glebie L1 zawierał się w przedziale 3,61—10,56% w ciągu pierwszych 8 lub 16 dni, w L2 mieścił się w przedziale 4,69—7,87% w ciągu 16 dni, a w glebie G — w przedziale 0,95—1,44% w ciągu 4 lub 8 dni. Jednocześnie stwierdzono, że zawartość kwasów rozgałęzionych u bakterii w glebach kontrolnych była podobna lub obserwowano nieznaczny jej spadek, który nie przekraczał 4%.

Zmiany w składzie i zawartości kwasów rozgałęzionych są znanym z literatury mechanizmem adaptacji bakterii do związków toksycznych, jednakże ich rola w budowie i funkcji błony komórkowej nie jest dokładnie wyjaśniona. Wzrost zawartości kwasu 18:0 10Me obserwowano na przykład GUTIÉRREZ i in. (1999) u szczepu *Rhodococcus* sp. 33 w obecności benzenu, a kwasów 15:0 *iso*, 15:0 *anteiso*, 18:0 10Me i 19:0 10Me RHEE i in. (1996) u szczepu *Pimelobacter* sp. KCTC 0074 BP w obecności pirydyny. TSITKO i in. (1999) u szczepu *Rhodococcus opacus*, hodowanego z dodatkiem benzenu, fenolu, 4-chlorofenolu, chlorobenzenu

i toluenu, także wykazali wzrost zawartości kwasów rozgałęzionych. Z kolei z badań UNELLA i in. (2007) wynika, że szczep *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 adaptuje się do zmiennej temperatury i obecności związków fenolowych dzięki zmianie proporcji w błonie ilości kwasów rozgałęzionych o izomerii *anteiso* do *iso*. Stwierdzili, że komórki rosnące w temperaturze 5°C zawierały dwukrotnie więcej kwasów o izomerii *anteiso* (stosunek *anteiso/iso*: 15,5) niż rosnące w temperaturze 28°C (stosunek *anteiso/iso*: 7,8). W wyższej temperaturze i w obecności fenolu, 4-chlorofenolu oraz 4-nitrofenolu stosunek zawartości kwasów o izomerii *anteiso/iso* zmniejszał się, co czyniło błonę bardziej sztywną i przeciwdziało wzrostowi jej płynności. Wpływ temperatury oraz zasolenia na zawartość kwasów rozgałęzionych o izomerii *iso* u szczepów *Aeromonas caviae* LMG 13455, *A. hydrophila* LMG 2844 i *A. sobria* LMG 3783 obserwowali także CHICHIB i in. (2005).

Szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 różniły się także między sobą rodzajami i zawartością procentową hydroksykwasów. W komórkach *Pseudomonas vesicularis* ich udział stanowił 8,53% wszystkich wyizolowanych kwasów i reprezentowane były przez trzy kwasy: 10:0 3OH, 12:0 2OH i 12:0 3OH, z kolei u *Pseudomonas* sp. JS150 występował tylko jeden hydroksykwas 12:0 3OH, którego udział w profilu FAMES wynosił 2,05%. Po wprowadzeniu bakterii do skażonych fenolem gleb L1, L2 i G zawartość kwasów hydroksylogowych systematycznie się zmniejszała lub nie były obecne wśród izolowanych FAMES, co wskazuje na brak ich udziału w mechanizmach adaptacji bakterii do obecności tego związku. Dla porównania, w komórkach obu szczepów w nieskażonych glebach kontrolnych w kolejnych dniach analiz chromatograficznych kwasy te identyfikowano z udziałem 2,04—7,16% u *Pseudomonas vesicularis*, z udziałem 0,96—3,04% u *Pseudomonas* sp. JS150 i 1,82—4,70%, gdy do gleb wprowadzono oba te szczepy równocześnie.

Na szczególną uwagę spośród kwasów nasyconych zasługują kwasy cyklopropanowe 17:0 *cy* i 19:0 *cy* ω10c. Pierwszy z nich identyfikowano u obu szczepów wprowadzonych do nieskażonych gleb kontrolnych, we wszystkich dniach prowadzenia oznaczeń, z kolei drugi był nowym rodzajem kwasu, syntetyzowanym przez bakterie wyłącznie w obecności fenolu. Kwas cyklopropanowy 17:0 *cy* izolowano również z gleb skażonych wszystkimi stężeniami fenolu, zarówno z pojedynczo, jak i wspólnie wprowadzonymi szczepami *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, ale wyłącznie w początkowych dniach eksperymentu. Kwas 19:0 *cy* ω10c izolowano natomiast z nich od

dnia, w którym stwierdzono ponad 50% ubytek wprowadzonego do nich substratu fenolowego, a więc nie było to wcześniej niż w 16. dniu w glebie L1, w 32. dniu w glebie L2 i w 8. dniu w glebie G. Do tego czasu zawartość kwasu 17:0 cy w komórkach obu szczepów we wszystkich glebach skażonych fenolem malała lub było go brak wśród wyizolowanych FAMES. Gdy pojawił się kwas 19:0 cy ω 10c, z reguły nie obserwowano obecności kwasu 17:0 cy w profilach FAMES, a gdy występował, wówczas jego udział był niewielki i nie przekraczał 1%. Zawartość procentowa kwasu 19:0 cy ω 10c była wysoka i u bakterii *Pseudomonas vesicularis* wprowadzonych do gleb L1, L2 i G skażonych wszystkimi stężeniami fenolu mieściła się w przedziale 2,11—21,06%. Dla porównania, jego udział zawierał się w zakresie 6,25—38,60%, gdy izolowano go ze skażonych wszystkimi stężeniami fenolu gleb L1, L2 i G z dodanym szczepem *Pseudomonas* sp. JS150, natomiast ze skażonych gleb zawierających oba szczepy, kwas 19:0 cy ω 10c stanowił 7,21—27,82% ogólnej zawartości wszystkich kwasów. Jednocześnie stwierdzono, że kwas 19:0 cy ω 10c występował u *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 do momentu, aż wprowadzony do gleb fenol nie uległ całkowitej biodegradacji, choć w tych dniach jego zawartość była znacznie niższa w porównaniu z dniem, w którym pojawił się po raz pierwszy. Zaobserwowano również, że pojawieniu się kwasu 19:0 cy ω 10c towarzyszył spadek zawartości kwasów nasyconych, prostołańcuchowych i rozgałęzionych u *Pseudomonas vesicularis*, spadek udziału kwasów prostołańcuchowych i wzrost rozgałęzionych u *Pseudomonas* sp. JS150, a gdy oba szczepy wprowadzono do skażonych fenolem gleb równocześnie, obserwowano spadek zawartości zarówno kwasów prostołańcuchowych, jak i rozgałęzionych. Uzyskane wyniki dowodzą, że kolejną reakcją bakterii *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w warunkach ekspozycji na fenol, po ustaleniu odpowiedniego składu i proporcji kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych w fosfolipidach błonowych, było tworzenie kwasu cyklopropanowego 19:0 cy ω 10c. Kwas ten mógł powstać z kwasu nienasyconego 18:1 ω 9c w wyniku cyklizacji podwójnego wiązania przez przyłączenie grupy $-\text{CH}_2$ pochodzącej z S-adenozynometioniny. Stwierdzony spadek zawartości tego kwasu w profilach FAMES, uzyskanych z gleb L1, L2 i G skażonych wszystkimi stężeniami fenolu i zawierających zarówno pojedynczo wprowadzone do nich szczepy, jak i ich mieszaninę, może wskazywać, że taka reakcja w ich komórkach prawdopodobnie zachodziła. Dzięki przeprowadzonym analizom losów kwasów

cyklopropanowych 17:0 cy i 19:0 cy ω 10c w komórkach *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 w obecności różnych stężeń fenolu wydaje się, że spośród nich kwas 19:0 cy ω 10c może być wygodnym biomarkerem w ocenie stopnia usuwania fenolu ze środowiska glebowego. W jakim celu bakterie syntetyzują kwasy cyklopropanowe i jaką odgrywają one rolę fizjologiczną, dotąd nie wyjaśniono. Prawdopodobnie kwasy z pierścieniem cyklopropanowym usztywniają błonę, redukują efekt wpływu temperatury na jej właściwości oraz ograniczają ruchy i oddziaływania między końcami łańcuchów acylowych sąsiadujących fosfolipidów (DUFOURE i in., 1984; GROGAN, CRONAN, 1997). Tworzenie kwasów z pierścieniem cyklopropanowym chroni komórki bakterii nie tylko przed toksycznym działaniem związków aromatycznych czy alkoholi alifatycznych, lecz także przed zmianami temperatury, ciśnienia i zasolenia (DENICH i in., 2003; KABELITZ i in., 2003; CHICHIB i in., 2005).

Poza kwasami prostołańcuchowymi, rozgałęzionymi i cyklopropanowymi, analizie poddano także kwasy nienasycone, reprezentowane u *Pseudomonas vesicularis* przez: 16:1 ω 7c, 17:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 8c, 18:1 ω 9c i 18:1 ω 7c/ ω 9t/ ω 12t, a u *Pseudomonas* sp. JS150 przez: 16:1 ω 7c, 17:1 ω 9c, 18:1 ω 9c i 18:1 ω 7c/ ω 9t/ ω 12t. Stwierdzono, że zawartość tych kwasów w komórkach obu szczepów wprowadzonych do skażonych wszystkimi stężeniami fenolu gleb L1, L2 i G zmniejszała się do dnia, w którym izolowano z nich po raz pierwszy kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω 10c lub do dnia, w którym jego zawartość procentowa była najwyższa, a w komórkach tych bakterii w nieskażonych glebach kontrolnych utrzymywała się na podobnym poziomie. Według KEWELOHA i HEIPIPERA (1996), obecność kwasów nienasyconych w konfiguracji *cis* w fosfolipidach błonowych czyni błonę mniej sztywną, bardziej nieuporządkowaną i płynną w porównaniu z kwasami nasyconymi i nienasyconymi w konfiguracji *trans*. Z powodu braku możliwości swobodnej rotacji między atomami węgla tworzącymi wiązanie podwójne w kwasach tłuszczowych w konfiguracji *cis* nie dochodzi do wytworzenia optymalnych oddziaływań hydrofobowych między łańcuchami acylowymi fosfolipidowych kwasów tłuszczowych, co zmniejsza stopień uporządkowania lipidów błony i nie chroni w dostatecznym stopniu komórki przed wpływem do jej wnętrza związków toksycznych. Aby temu zapobiec, niektóre gatunki bakterii przeprowadzają reakcję izomeryzacji nienasyconych kwasów tłuszczowych w konfiguracji *cis* do postaci *trans*. Taki mechanizm adaptacji do obecności związków fenolowych opisano na przykład u bakterii *Pseudo-*

monas putida P8 i *Pseudomonas putida* NCTC 10936 (HEIPIEPER i in., 1992; LOFFHAGEN i in., 2001), a nie występował on w szczepach *Lactobacillus plantarum* i *Ralstonia eutropha* H850 (ROZÈS, PERES, 1998; KIM i in., 2001). Reakcji takiej nie przeprowadzały także wykorzystane w badaniach szczepy *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150.

Dobrym wskaźnikiem stopnia rozkładu fenolu w glebach L1, L2 i G przez *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 była także wartość stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych. Stosunek ten najwyższe wartości przyjmował, gdy stężenie wprowadzonego do gleb fenolu zmniejszyło się o ponad 50% i gdy zawartość kwasu cyklopropanowego 19:0 cy ω10c u obu szczepów była najwyższa. W komórkach *Pseudomonas vesicularis*, wprowadzonych do gleby L1 skażonej fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹, wartość tego stosunku wzrosła odpowiednio z 1,79 w dniu 1. do 2,84 w dniu 32., z 1,86 do 6,13 w dniu 48. i z 2,07 do 9,03 w dniu 64., a w komórkach *Pseudomonas* sp. JS150 z 5,49 w dniu 1. do 6,79 w dniu 16., z 5,64 do 13,64 w dniu 32. i z 5,88 do 14,08 w dniu 48. Dla porównania, w komórkach *Pseudomonas vesicularis* w glebie G skażonej tymi dawkami fenolu najwyższa wartość stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych wynosiła odpowiednio: 7,22 w dniu 16., 8,88 w dniu 16. i 8,62 w dniu 32. i była 3—4-krotnie wyższa niż w dniu 1. Z kolei w komórkach *Pseudomonas* sp. JS150 wprowadzonych do skażonej fenolem gleby G stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych najwyższą wartość wynoszącą 9,13 przyjmował w dniu 16., gdy skażono ją dawką fenolu 1,7 mg g⁻¹, 13,10 w dniu 16., gdy wprowadzono do niej 3,3 mg g⁻¹ fenolu, i 16,83 w dniu 32., gdy skażono ją dawką 5,0 mg g⁻¹ tego związku i był 2—3-krotnie wyższy w porównaniu z jego wartością w 1. dniu. Podobną zależność między wartością stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych a stopniem rozkładu wprowadzonego fenolu obserwowano także w komórkach *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, dodanych równocześnie do gleb L1, L2 i G. Dla porównania, stosunek ten u bakterii *Pseudomonas vesicularis* w nieskażonych glebach kontrolnych zawierał się w przedziale 1,29—2,26, u *Pseudomonas* sp. JS150 — w granicach 3,71—4,91, a gdy oba te szczepy wprowadzono do nich w postaci mieszaniny, kształtował się w zakresie 1,94—2,97. Wzrost stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych w komórkach *Rhodococcus* sp. 33 w obecności benzenu oraz u *Ralstonia eutropha* H850 w obecności bifenyli stwierdzili również GUTIÉRREZ i in. (1999) oraz KIM i in. (2001).

Z przeprowadzonych analiz składu i zawartości kwasów tłuszczowych w komórkach badanych szczepów podczas rozkładu przez nie fenolu w glebach L1, L2 i G wynika, że w zależności od aktualnego stężenia tego związku w glebie uruchamiały one różne mechanizmy, pozwalające na utrzymanie właściwej płynności błony komórkowej i prawidłowe jej funkcjonowanie. Gdy stężenie fenolu było wysokie, główną reakcją obu szczepów stanowiła synteza *de novo* i zmiany w składzie kwasów nasyconych i rozgałęzionych, a gdy zmniejszyło się o ponad połowę, bakterie tworzyły kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω10c. Obserwowane zmiany w składzie kwasów tłuszczowych u obu szczepów w czasie degradacji fenolu znalazły odzwierciedlenie w wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych, który wspólnie z kwasem cyklopropanowym 19:0 cy ω10c można uznać za wskaźniki oceny stopnia eliminacji fenolu z gleby z udziałem tych bakterii.

Przed przystąpieniem do bioaugmentacji gleb L1, L2 i G, z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, dokonano porównania profili wyizolowanych z nich kwasów tłuszczowych, co uzupełniło charakterystykę gleb o informacje o możliwym składzie mikroflory autochtonicznej. Stwierdzono, że we wszystkich glebach występowały bakterie Gram-ujemne, ponieważ wśród wizolowanych z nich FAMES były obecne markerowe dla tej grupy mikrobiologicznej kwasy 16:1 ω5c, 16:1 ω7c i 17:0 cy, oraz bakterie Gram-dodatnie, wyróżniane na podstawie obecności kwasów rozgałęzionych 15:0 *iso* oraz 15:0 *anteiso* (CAVIGELLI i in., 1995; PENNANEN i in., 1998; ZELLES, 1999 a, 1999 b). O obecności bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebach L1 i G świadczył kwas 18:1 ω7c/ω9t/ω12t, a obecność grzybów we wszystkich glebach potwierdzały markerowe dla tej grupy mikroorganizmów kwasy 18:2 ω6,9c oraz 16:1 ω5c (HAACK i in., 1994; FROSTEGÅRD i in., 1996; OLSSON, 1999). Kwas 16:1 ω5c może także wskazywać na występowanie w glebach bakterii z rodzaju *Cytophaga* i *Flavobacterium* oraz grzybów mikoryzowych, a 15:0 *anteiso* na obecność bakterii z rodzaju *Arthrobacter* (FROSTEGÅRD i in., 1993 a; HAACK i in., 1994; KELLY i in., 1999 a; OLSSON, 1999). Nie zidentyfikowano natomiast w żadnej z gleb kwasów 16:0 10Me, 17:0 10Me i 18:0 10Me, typowych dla promieniowców (ZELLES, 1999 a). Chociaż profile kwasów mogą wskazywać na podobieństwo w składzie mikroorganizmów zasiedlających gleby L1, L2 i G, to różna zawartość procentowa poszczególnych kwasów markerowych może świadczyć, że dominującymi były w nich inne rodzaje czy grupy mikrobiologiczne.

Z analiz kwasów tłuszczowych, przeprowadzonych dla gleb L1, L2 i G poddanych bioaugmentacji z użyciem mieszaniny szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 i skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹, wynika, że największe zmiany wśród izolowanych z tych gleb FAMEs dotyczyły kwasów cyklopropanowych 17:0 cy i 19:0 cy ω10c. Pierwszy z nich najwyższą zawartością charakteryzował się z reguły w ciągu pierwszych 4 lub 8 dni od wprowadzenia obu szczepów do gleb, natomiast w kolejnych dniach jego udział gwałtownie malał. Tak nagły spadek jego zawartości skorelowany był z pojawieniem się nowego kwasu o budowie cyklicznej 19:0 ω10c. Obecność tego kwasu w profilach FAMEs zależała od aktualnego stężenia fenolu w glebie i niezależnie od dawki fenolu, jaką skażono gleby L1, L2 i G, izolowano go z nich wyłącznie wtedy, gdy ubytek wprowadzonego fenolu wynosił 50—60%. Ponieważ rozkład fenolu w glebach bioaugmentowanych zachodził szybciej niż przez wprowadzone do sterylnych gleb szczepy *Pseudomonas vesicularis* i/lub *Pseudomonas* sp. JS150, izolowano go z nich znacznie wcześniej, tzn. w 4. lub 8. dniu trwania eksperymentu. Z kolei w zależności od stężenia fenolu, jakim skażono gleby, oraz od rodzaju gleby kształtował się jego udział procentowy. Najwyższy był w glebie L1, skażonej najwyższym stężeniem fenolu 5,0 mg g⁻¹, i stanowił w 8. dniu 23,44% ogólnej zawartości wszystkich kwasów w próbie. Najniższy był natomiast w glebie L2 zanieczyszczonej fenolem w dawce 1,7 mg g⁻¹, w której wynosił w 16. dniu 10,59%. W kolejnych dniach wraz ze spadkiem stężenia wprowadzonego fenolu jego zawartość się zmniejszała. Zwiększał się natomiast udział kwasu 18:1 ω9c, co może wskazywać na istotną jego rolę w procesie postsyntetycznej modyfikacji do kwasu cyklopropanowego. Podobną zależność między zawartością kwasu 19:0 cy ω10c a aktualnym stężeniem i rodzajem gleby obserwowano w niebioaugmentowanych glebach skażonych fenolem, z kolei z gleb poddanych bioaugmentacji, a nieskażonych fenolem, poza kwasem 17:0 cy, nie izolowano innego kwasu cyklopropanowego. Wyniki te potwierdzają istotną rolę kwasu 19:0 cy ω10c w mechanizmach adaptacji do obecności fenolu nie tylko wyselekcjonowanych laboratoryjnie szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150, lecz także innych gatunków mikroorganizmów naturalnie zasiedlających glebę. Konieczne są jednak dalsze badania na poziomie fizjologicznym i genetycznym, wyjaśniające dokładny mechanizm tworzenia tego kwasu i jego regulację w zależności od stężenia fenolu.

W bioaugmentowanych i skażonych fenolem glebach L1, L2 i G zmieniał się także udział kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych, ale w znacznie mniejszym stopniu niż w glebach sterylnych, do których wprowadzono szczepy *Pseudomonas vesicularis* i/lub *Pseudomonas* sp. JS150. W poddanej bioaugmentacji glebie L1 skażonej wszystkimi stężeniami fenolu stwierdzono wzrost zawartości kwasów prostołańcuchowych w ciągu pierwszych 4 dni o około 2—3% i o 6—7% kwasów rozgałęzionych, w glebie G w tym czasie o odpowiednio 2—4% i 3—6%, a w glebie L2 w ciągu 32 dni o 8% i 1—4%. Dla porównania, w glebach niebioaugmentowanych i skażonych fenolem wzrost zawartości kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych w początkowych dniach był większy i wynosił około 4—5% i 7—9% w L1, 3—7,5% i 2—10,5% w L2 oraz 0,5—5,5% i 10—13% w glebie G. Z kolei udział kwasów hydroksylowych w glebach skażonych pozostawał na podobnym poziomie, zmniejszał się lub nie były one obecne wśród wyizolowanych FAMEs, co wskazuje na mniejszy ich udział w regulacji płynności błony u bakterii w obecności fenolu. Stwierdzono także, że wzrostowi zawartości procentowej kwasów prostołańcuchowych i rozgałęzionych u mikroorganizmów w glebach skażonych fenolem towarzyszył spadek udziału kwasów nienasyconych, zazwyczaj do dnia, w którym izolowano z nich po raz pierwszy kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω10c, lub do dnia, w którym jego udział był najwyższy. Spośród kwasów nienasyconych, izolowanych z bioaugmentowanych gleb L1, L2 i G skażonych wszystkimi stężeniami fenolu, na uwagę zasługuje kwas 18:1 ω7c/ω9t/ω12t, którego udział w kolejnych dniach oznaczeń zawierał się w przedziale 1,98—4,78%. Jego obecność może świadczyć o szybkiej aklimatyzacji wprowadzonych szczepów *Pseudomonas vesicularis* i *Pseudomonas* sp. JS150 do nowego dla nich środowiska życia. Ze skażonych fenolem gleb L1 i G z mikroflorą autochtoniczną kwas ten także izolowano z udziałem 0,69—1,19%, co może wskazywać na występowanie w nich bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, natomiast nie identyfikowano go wśród ekstrahowanych FAMEs z gleby L2. W glebie L2 spośród kwasów nienasyconych wysokim udziałem charakteryzowały się kwasy 15:1 ω5c i 18:2 ω6,9c, potwierdzające dominację w niej grzybów.

Podobnie jak podczas rozkładu fenolu przez szczepy *Pseudomonas vesicularis* i/lub *Pseudomonas* sp. JS150 dodane do gleb sterylnych, tak i w skażonych glebach poddanych i niepoddanych bioaugmentacji dobrym wskaźnikiem stopnia degradacji wprowadzonego do nich fenolu okazał się stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych.

Zaobserwowano, że gdy stężenie fenolu w glebach było dość wysokie, wartość tego stosunku w kolejnych dniach się zwiększała, a gdy stwierdzono ubytek ponad 50% wyjściowej jego dawki — systematycznie się zmniejszała. W skażonych fenolem glebach niebioaugmentowanych wartość stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych także wzrastała, ale nie przyjmowała tak wysokich wartości, jak w glebach poddanych bioaugmentacji, co mogło wynikać ze znacznie mniejszej liczebności obecnych w nich mikroorganizmów. W glebach L1 i G poddanych bioaugmentacji i skażonych fenolem w stężeniach 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ i 5,0 mg g⁻¹ wartość tego stosunku zawierała się odpowiednio w przedziałach — 2,85—11,74 i 3,08—10,92, a dla porównania, w glebach L1 i G bez wprowadzonych szczepów były to zakresy: 1,05—3,68 i 1,09—6,55.

Z przeprowadzonych badań wynika, że z metody MIDI-FAME można korzystać w monitorowaniu postępu eliminacji fenolu z gleby. Na podstawie analizy profili kwasów tłuszczowych oraz wartości stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych można ocenić, czy zachodzi mikrobiologiczny rozkład fenolu w glebie, a informacje o kwasie z pierścieniem cyklopropanowym 19:0 cy ω10c mogą wskazywać na stopień zaawansowania tego procesu. Ze względu na stwierdzoną przydatność zarówno stosunku kwasów nasyconych do nienasyconych, jak i kwasu 19:0 cy ω10c do oceny stopnia mikrobiologicznego rozkładu fenolu, można uznać je za dobre markery zanieczyszczenia środowiska tym związkami.

Dotychczas metodę MIDI-FAME stosowano przede wszystkim w badaniach bioróżnorodności mikroorganizmów różnych środowisk, zarówno wolnych od zanieczyszczeń, jak i skażonych różnymi związkami organicznymi. RITCHIE i in. (2000) użyli jej na przykład do charakterystyki zespołów mikroorganizmów w glebach porośniętych trawami, kostrzewą i rajgrasem, a IBEKWE i KENNEDY (1999) — do badania zróżnicowania mikroorganizmów w strefie korzeniowej i pozakorzeniowej w zależności od tego, czy uprawiano na nich zboża czy rośliny strączkowe. FRIES i in. (1997), stosując metodę MIDI-FAME, oceniali skład zespołów mikroorganizmów w środowisku wodnym w obecności toluenu i fenolu jako dodatkowych źródeł węgla w kometabolicznym rozkładzie trichloroetenu, a BANOWETZ i in. (2006) użyli jej do badania stabilności profili FAMES po zalaniu gleby wodą. Z kolei SHUTTER i DICK (2000) oraz DRENOWSKY i in. (2004) porównywali metody MIDI-FAME i PLFA pod względem poziomu detekcji poszczególnych kwasów tłuszczowych i precyzyjności ekstrakcji FAMES z próbek różnych gleb. Na podstawie uzyskanych wyników dokonali oceny składu zespołów mikroorganizmów w glebach, na których uprawiano zboża, warzywa, bawełnę, winogrona, w glebach pochodzących z plantacji drzew migdałowych, figowych i orzecha włoskiego, glebach leśnych, łąkowych z szafranami oraz ugorach. Wykorzystanie metody MIDI-FAME do monitorowania stopnia usuwania fenolu z gleby może być nowym jej zastosowaniem w badaniach środowiskowych.

6. Ogólne wnioski

1. Rozkład fenolu przez wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* zależał od rodzaju gleby, do której je wprowadzono, stopnia jej skażenia oraz składu inokulum.
2. Stwierdzono bezpośrednią zależność między tempem eliminacji fenolu z gleby a przeżywalnością wprowadzonych do niej szczepów.
3. Analiza profili kwasów tłuszczowych umożliwiła monitorowanie procesów degradacyjnych zachodzących z udziałem bakterii w glebie oraz ocenę stopnia zanieczyszczenia środowiska glebowego tym związkami.
4. Wykazano zróżnicowanie mechanizmów regulujących płynność i przepuszczalność bakteryjnej błony komórkowej w zależności od aktualnego stężenia fenolu w glebie.
5. Obserwowane zmiany w składzie kwasów tłuszczowych u wyselekcjonowanych laboratoryjnie szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* oraz u bakterii naturalnie zasiedlających glebę wskazują, że mechanizmy adaptacji do obecności fenolu były u nich podobne.
6. Uzyskane wyniki pokazują, że bioaugmentacja z wykorzystaniem badanych szczepów bakterii jest skuteczną metodą usuwania fenolu ze środowiska glebowego.
7. Za biomarkery stopnia zanieczyszczenia gleby fenolem uznano kwas cyklopropanowy 19:0 cy ω 10c oraz stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych.

Literatura

- ABUHAMED T., BAYRAKTAR E., MEHMETOĞLU T., MEHMETOĞLU Ü. 2004. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene, and phenol biodegradation. *Process Biochem.*, **39**: 983—988.
- AHAMAD P.Y.A., KUNHI A.A.M. 1996. Degradation of phenol through *ortho*-cleavage pathway by *Pseudomonas stutzeri* strain SPC2. *Lett. Appl. Microbiol.*, **22**: 26—29.
- AL BASHIR B.T., CSEH T., LEDUC R., SAMSON R. 1990. Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soils under denitrifying conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**: 414—419.
- ALEKSANDER M. 1999. Biodegradation and bioremediation. 2nd ed. New York: Academic Press.
- ARUTCHELVAN V., KANAKASABAI V., NAGARAJAN S., MURALIKRISHNAN V. 2003. Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *J. Hazard. Mater.*, **127**: 238—243.
- ATLAS R.M. 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.*, **31**: 178—182.
- BAE J.-H., KIM D.-S., SUH M.-J., OH S.-R., LEE I.-J., KANG S.-C., HOU C.T., KIM H.-R. 2007. Production and identification of a novel compound, 7,10-dihydroxy-8(*E*)hexadecenoic acid from palmitoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3. *Appl. Microbiol. Cell Physiol.*, **75**: 435—440.
- BAI J., WEN J.P., LI H.M., JIANG Y. 2007. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and *m*-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochem.*, **42**: 510—517.
- BAKER M.D., MAYFIELD C.I. 1980. Microbial and non-biological decomposition of chlorophenols and phenol in soil. *Water Air Soil Pollut.*, **13**: 411—424.
- BALBA M.T., AL-AWADHI N., AL-DAHER R. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Meth.*, **32**: 155—164.
- BARATHI S., VASUDEVAN N. 2003. Bioremediation of crude oil contaminated soil by bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* SN1. *J. Environ. Sci. Health A*, **38**: 1857—1866.
- BARJE F., AMIR S., WINTERTON P., PINELLI E., MERLINA G., CEGARRA J., REVEL J.C., HAFIDI M. 2008. Phospholipid fatty acid analysis to monitor the co-composting process of olive oil wastes and organic household refuse. *J. Hazard. Mater.*, **154**: 682—687.
- BELLIN C.A., O'CONNOR G.A., JIN Y. 1990. Sorption and degradation of pentachlorophenol in sludge amended soils. *J. Environ. Qual.*, **19**: 603—608.
- BENEY L., GERVAIS P. 2001. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**: 34—42.
- BENTO F.M., CAMARGO F.A.O., OKEKE B.C., FRANKENBERGER W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.*, **96**: 1049—1055.
- BERNAL B., SEGURA A., RAMOS J.L. 2007. Compensatory role of the *cis-trans*-isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Environ. Microbiol.*, **9**: 1658—1664.
- BOONCHAN S., BRITZ M.I., STANLEY G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1007—1019.
- BOOPATHY R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresour. Technol.*, **74**: 63—67.
- BRIM H., HEUER H., KRÖGERRECKLENFORT E., MERGEAY M., SMALLA K. 1990. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. *Can. J. Microbiol.*, **45**: 326—338.
- BRONICK C.J., LAL R. 2005. Soil structure and management: a review. *Geoderma*, **124**: 3—22.
- BUDAVARI S. 1996. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station. New York: Merck.

- BUNDY J.G., PATON G.I., CAMPBELL C.D. 2004. Combined microbial community level and single species biosensor responses to monitor recovery of oil polluted soil. *Soil Biol. Biochem.*, **36**: 1149—1159.
- California Environmental Protection Agency. Evidence on the developmental and reproductive toxicity of phenol. 2003.
- CARBALLEIRA N.M., CARLOS M., LOZANO C.M., NECHEV J.T., IVANOVA A., ILIEVA M., TZVETKOVA I., STEFANOV K. 2001. Characterization of a novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species. *J. Nat. Prod.*, **64**: 256—259.
- CAVIGELLI M.A., ROBERTSON G.P., KLUG M.J. 1995. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. In: The significance and regulation of soil biodiversity. Eds. COLLINS H.P., ROBERTSON G.P., KLUG M.J. Dordrecht: Kluwer Academic.
- ČERTIK M., DERCOVÁ K., SEJAKOVÁ Z., FIND'OVÁ M., JAKUBIK T. 2003. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) on the membrane lipids of bacterial cell. *Biológia*, **58**: 1115—1121.
- CHAÏNEAU C.H., YEPREMIAN C., IDALIE J.F., DUCREUX J., BALLERINI D. 2003. Biodegradation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollut.*, **144**: 419—440.
- CHANG B.V., WU W.B., YUAN S.Y. 1997. Biodegradation of benzene, toluene, and other aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. D8. *Chemosphere*, **35**: 2801—2815.
- CHANG Y.-Y., CRONAN J.E., Jr. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **33**: 249—259.
- CHAO W.L., HSU S.F. 2004. Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, **36**: 479—487.
- CHATTERJEE D.K., KILBANE J.J., CHAKRABARTHY A.M. 1982. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 514—516.
- CHEN W.-M., CHANG J.-S., WU C.-H., CHANG S.-C. 2004. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Res. Microbiol.*, **155**: 672—680.
- CHICHIB N.E., TIERNY Y., MARY P., HORNEZ J.P. 2005. Adaptational changes in cellular fatty acid branching and unsaturation of *Aeromonas* species as a response to growth temperature and salinity. *Int. J. Food Microbiol.*, **102**: 113—119.
- CHOMA A. 1999. Fatty acid composition of *Mesorhizobium huakuii* lipopolysaccharides. Identification of 27-oxooctamsonic acid. *FEMS Microbiol. Lett.*, **17**: 257—262.
- CORNELL B.A., SEPAROVIC F. 1983. Membrane thickness and acyl chain length. *Biochim. Biophys. Acta*, **733**: 189—193.
- CRONAN J.E., Jr., GELMANN E.P. 1975. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriol. Rev.*, **39**: 232—256.
- CRONAN J.E., Jr. 2002. Phospholipid modifications in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, **5**: 202—205.
- DAGLEY S. 1971. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.*, **6**: 1—8.
- DARVEAU R.P. 1998. A diversity and the innate host response to bacterial infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**: 36—42.
- DAS S., RAMM M., KOCHANOWSKI H., BASU S. 1994. Structural studies of the side chain of outer membrane lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* W-43. *J. Bacteriol.*, **176**: 6550—6557.
- DA SILVA M.L.B., ALVAREZ P.J.J. 2004. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 4720—4726.
- DAVIS J.W., MADSEN S. 1996. Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere*, **33**: 107—130.
- DE KRUIFF B. 1997. Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**: 564—569.
- DE LIPHTAY J.R., BARKAY T., SØRENSEN S.J. 2001. Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**: 75—84.
- DENICH T.J., BEAUDETTE L.A., LEE H., TREVORS J.T. 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Meth.*, **52**: 149—182.
- DERCOVÁ K., ČERTIK M., MAL'OVÁ A., SEJÁKOVÁ Z. 2004. Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **54**: 251—254.
- DE RORE H., DEMOLDER K., DE WILDE K., TOP E., HOUWEN F., VERSTRAETE W. 1994. Transfer of the catabolic plasmid RP4: Tn4371 to indigenous soil bacteria and its effect on respiration and biphenyl breakdown. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **15**: 71—81.
- DIEFENBACH R., HEIPIEPER H.J., KEWELOH H. 1992. The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**: 382—387.
- DIEFENBACH R., KEWELOH H. 1994. Synthesis of *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8 by direct isomerization of the double bond of lipids. *Arch. Microbiol.*, **162**: 120—125.
- DOWLING N.J.E., WIDDEL F., WHITE D.C. 1986. Phospholipid ester linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulfate reducers and other sulfide forming bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 1815—1825.
- DRENOVSKY R.E., ELLIOTT G.N., GRAHAM K.J., SCOW K.M. 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, **36**: 1793—1800.

- DUFOURE E.J., SMITH C.P., JARREL H.C. 1984. Role of cyclopropane fatty moieties in the lipid properties of biological membranes: a ^2H NMR structural and dynamical approach. *Biochemistry*, **23**: 2300—2309.
- „Dziennik Ustaw”, nr 165, poz. 1359: Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 roku w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi.
- „Dziennik Ustaw”, nr 168, poz. 1763: Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 8 lipca 2004 roku w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego.
- EDLUND A., NICHOLS P.D., ROFFEY R., WHITE D.C. 1985. Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxyl acid profiles from *Desulfovibrio* species. *J. Lipid Res.*, **26**: 982—988.
- EL FANTROUSSI S.E., AGATHOS S.N. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**: 268—275.
- ERIKSSON M., KA H., MOHN W. 2001. Effects of low temperature and freeze-thaw cycles on hydrocarbon biodegradation in Arctic tundra soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 5107—5112.
- FILONOV A.E., PUNTUS I.F., KARPOV A.V., GAIKAZOV R.R., KOSHELEVA I.A., BORONIN A.M. 1999. Growth and survival of *Pseudomonas putida* strains degrading naphthalene in soil model systems with different moisture levels. *Process Biochem.*, **34**: 303—308.
- FINE P., GRABER E.R., YARON B. 1997. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. *Soil Technol.*, **10**: 133—153.
- FINEAN J.B., MITCHELL R.H. 1981. Isolation, composition and general structure of membranes. In: *Membrane structure*. Eds. FINEAN J.B., MITCHELL R.H. New York: Elsevier, s. 19—25.
- FISCHER A., BAUER J., MECKENSTOCK R.U., STICHLER W., GRIEBLER C., MALOSZEWSKI P., KASTNER M., RICHNOW H.H. 2006. A multitracer test proving the reliability of Rayleigh equation-based approach for assessing biodegradation in a BTEX contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.*, **49**: 4245—4252.
- FRIES M.R., HOPKINS G.D., MCCARTY P.L., FORNEY L.J., TIEDJE J.M. 1997. Microbial succession during a field evaluation of phenol and toluene as the primary substrates for trichloroethene cometabolism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 1515—1522.
- FROSTEGÅRD A., BÅÅTH E., TUNLID A. 1993a. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analyses. *Soil Biol. Biochem.*, **25**: 723—730.
- FROSTEGÅRD A., TUNLID A., BÅÅTH E. 1993b. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3605—3617.
- FROSTEGÅRD A., BÅÅTH E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils*, **22**: 59—65.
- FROSTEGÅRD A., TUNLID A., BÅÅTH E. 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soil experimentally contaminated with metals. *Soil Biol. Biochem.*, **28**: 55—63.
- FULLER M.E., MANNING J.F., Jr. 2004. Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot bioslurry reactors. *Bioresour. Technol.*, **91**: 123—133.
- GALLET C., KELLER C. 1999. Phenolic composition of soil solutions: comparative study of lysimeter and centrifuge waters. *Soil Biol. Biochem.*, **31**: 1151—1160.
- GARON D., SAGE L., SEIGLE-MURANDI F. 2004. Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment of fluorine degradation in soil slurry. *Biodegradation*, **15**: 1—8.
- GHAZALI F.M., RAHMAN R.N.Z.A., SALLEH A.B., BASRI M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **54**: 61—67.
- GOSWAMI M., SHIVARAMAN N., SINGH R.P. 2005. Microbial metabolism of 2-chlorophenol, phenol and *p*-cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in coculture with *Pseudomonas fluorescens* P1. *Microbiol. Res.*, **160**: 101—109.
- GROGAN D.W., CRONAN J.E., Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 429—441.
- GRONOW S., BRADE H. 2001. Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive. *J. Endotoxin. Res.*, **7**: 3—23.
- GUCKERT B., HOOD M.A., WHITE D.C. 1986. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes in nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*. Increase in the *cis/trans* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 794—801.
- GUERIN W.F., BOYD S.A. 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1142—1152.
- GUTIÉRREZ J.A., NICHOLS P., COUPERWHITE I. 1999. Changes in whole cell-derived fatty acids induced by benzene and occurrence of the unusual 16:1 ω 6c in *Rhodococcus* sp. 33. *FEMS Microbiol. Lett.*, **176**: 213—218.
- HAACK S.K., GARCHOW H., ODELSON D.A., FORNEY L.J., KLUG M.J. 1994. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2483—2493.
- HAIGLER B.E., PETTIGREW C.H.A., SPAIN J.C. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2237—2244.
- HALUŠKA L., BARANČIKOVÁ G., BALÁŽ Š., DERCOVÁ K., VRANA B., PAZ-WEISSHAAR M., FURČIOVÁ E., BIELEK P. 1995. Degradation of PCB in different soils by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *Sci. Total Environ.*, **175**: 275—285.
- HAMAMOTO T., TAKATA N., KUDO T., HORIKOSHI K. 1994. Effect of temperature and growth phase on fatty acid

- composition of the psychrophilic *Vibrio* sp. strain 5710. FEMS Microbiol. Lett., **119**: 77—82.
- HARDER W., DIJKHUIZEN L. 1982. Strategies of mixed substrate utilization in microorganisms. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., **B297**: 459—480.
- HÄRTIG C., LOFFHAGEN N., HARMS H. 2005. Formation of *trans* fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. Appl. Environ. Microbiol., **71**: 1915—1922.
- HATTORI T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. Biol. Fertil. Soils, **6**: 189—203.
- HAUGLAND R.A., SCHLEMM D.J., LYONS R.P., SFERRA P.R., CHAKRABARTY A.M. 1990. Degradation of the chlorinated phenoxyacetate herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. Appl. Environ. Microbiol., **56**: 1357—1362.
- Hazardous Substances Data Bank (HSDB, 1997). Phenol.
- HEINARU E., MERIMAA M., VIGGOR S., LEHISTE M., LEITO I., TRUU J., HEINARU A. 2005. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. FEMS Microbiol. Ecol., **51**: 363—373.
- HEIPIEPER H.J., KEWELOH H., REHM H.J. 1991. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 1213—1217.
- HEIPIEPER H.J., DIEFENBACH R., KEWELOH H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. Appl. Environ. Microbiol., **58**: 1847—1852.
- HEIPIEPER H.J., DE BONT J.A.M. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. Appl. Environ. Microbiol., **60**: 4440—4444.
- HEIPIEPER H.J., WEBER F.J., SIKKEMA J., KEWELOH H., DE BONT J.A.M. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. Trends Biotechnol., **12**: 409—415.
- HEIPIEPER H.J., LOFFELD B., KEWELOH H., DE BONT J.A.M. 1995. The *cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: an indicator for environmental stress due to organic compounds. Chemosphere, **30**: 1041—1051.
- HEIPIEPER H.J., MEULENBELD G., VAN OIRSCHOT Q., DE BONT J.A.M. 1996. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. Appl. Environ. Microbiol., **62**: 2773—2777.
- HILL K.E., TOP E.M. 1998. Gene transfer in soil system using microcosms. FEMS Microbiol. Ecol., **25**: 319—329.
- HOFMANN K., LUCAS R.A. 1950. The chemical nature of a unique fatty acid. J. Am. Chem. Soc., **72**: 4328—4329.
- HOLLOWELL G.P., KUYKENDALL L.D., GILLETTE W.K., HASHEM F.M., HOU L.H., TATEM H.E., DUTTA S.K. 1999. Genetic transfer and expression of plasmid RP4: TOL in *Sinorhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. Soil Biol. Biochem., **31**: 1811—1819.
- HOLTWICK R., KEWELOH H., MEINHARDT F. 1999. *Cis/trans* isomerase of unsaturated fatty acids of *Pseudomonas putida* P8: evidence for a heme protein of the cytochrome c type. Appl. Environ. Microbiol., **65**: 2644—2649.
- HUERTAS M.J., DUQUE E., MARQUÉS S., RAMOS J.L. 1998. Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 38—42.
- HUIJBREGTS R.P.H., DE KROON A.I.P.M., DE KRUIFF B. 2000. Topology and transport of membrane lipids in bacteria. Biochim. Biophys. Acta, **1469**: 43—61.
- IBEKWE A.M., KENNEDY A.C. 1999. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as a tool to investigate community structure of two agricultural soils. Plant Soil, **206**: 151—161.
- INDERJIT S., MALLIK A.U. 1997. Effect of phenolic compounds on selected soil properties. For. Ecol. Manage., **92**: 11—18.
- INGRAM L.O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. J. Bacteriol., **125**: 670—678.
- IVAMOTO T., NASU M. 2001. Current bioremediation practice and perspective. J. Biosci. Bioeng., **92**: 1—8.
- IVANOVA I.T., BOYTCHIEVA S., MIHAILOVA G. 1999. Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and pre-incubation temperature. J. Therm. Biol., **24**: 217—227.
- JACQUES R.J.S., OKEKE B.C., BENTO F.M., TEIXEIRA A.S., PERALBA M.C.R., COMARGO F.A.O. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresour. Technol., **99**: 2637—2643.
- JAKUBOWSKI M. 2003. Fenol. Dokumentacja proponowanych wartości dopuszczalnych poziomów narażenia zawodowego. Podst. Met. Oceny Środ. Pr., **135**: 87—113.
- JERNBERG C., JANSSON J.K. 2002. Impact of 4-chlorophenol contamination and/or inoculation with the 4-chlorophenol-degrading strain, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L, on soil bacterial community structure. FEMS Microbiol. Ecol., **42**: 387—397.
- KABELITZ N., SANTOS P.M., HEIPIEPER H.J. 2003. Effect of aliphatic alcohols on growth and degree of saturation of membrane lipids in *Acinetobacter calcoaceticus*. FEMS Microbiol. Lett., **220**: 223—227.
- KANALY R.A., HARAYAMA S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. J. Bacteriol., **182**: 2059—2067.
- KANDELER E. 1995. Organic matter by wet combustion. In: Methods in soil biology. Eds. SHINER F., OEHLINGER R., KANDELER E., MARGESIN R. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, s. 397—398.
- KANEDA T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiol. Rev., **55**: 288—302.

- KAUR A., CHAUDHARY A., KOUR A., CHOUDHART R., KAUSHIK R. 2005. Phospholipid fatty acid — a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecology. *Curr. Sci.*, **89**: 1103—1112.
- KELLY J.J., HÄGGBLUM M.M., TATE R.L. 1999a. Effects of the land application of sewage sludge on soil heavy metal concentrations and soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.*, **31**: 1467—1470.
- KELLY J.J., HÄGGBLUM M.M., TATE R.L. 1999b. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.*, **31**: 1455—1465.
- KERGER B., NICHOLS P.D., ANTWRHTH C.P., SAND W., BOCK E., COKS J.C., LANGWORTHY T.A., WHITE D.C. 1986. Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacilli*: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **38**: 67—74.
- KEWELOH H., WEYRAUCH G., REHM H.J. 1990. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Biotechnol.*, **33**: 66—71.
- KEWELOH H., DIEFENBACH R., REHM H.J. 1991. Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. *Arch. Microbiol.*, **157**: 49—53.
- KEWELOH H., HEIPIEPER H.J. 1996. *Trans* unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids*, **2**: 129—137.
- KHLEIFAT K.M. 2006. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochem.*, **41**: 2010—2016.
- KIEFT T.L., RINGELBERG D.B., WHITE D.C. 1994. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 3292—3299.
- KIM D., KIM Y.S., KIM S.K., KIM S.W., ZYLSTRA G.J., KIM Y.M., KIM E. 2002. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3270—3278.
- KIM I.S., LEE H., TREVORS J.T. 2001. Effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl and biphenyl on cell membranes of *Ralstonia eutropha* H850. *FEMS Microbiol. Lett.*, **200**: 17—24.
- KOHL S.D., RICE J.A. 1998. The binding of contaminants to humin: a mass balance. *Chemosphere*, **36**: 251—261.
- KOMANIECKA I., CHOMA A. 2001. Składniki lipidowe *Rhizobiaceae*. *Post. Mikrobiol.*, **40**: 7—30.
- KOZDRÓJ J. 2000. Microflora of technogenous wastes characterized by fatty acid profiling. *Microbiol. Res.*, **155**: 149—156.
- KOZDRÓJ J., VAN ELSAS J.D. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Meth.*, **43**: 197—212.
- KUKOR J.J., OLSEN R.H. 1991. Genetic organization and regulation of a *meta* cleavage pathway for catechols produces from catabolism of toluene, benzene, phenol and cresols by *Pseudomonas picketti* PKO1. *J. Bacteriol.*, **173**: 4587—4594.
- KUMAR A., KUMAR S., KUMAR S. 2005. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.*, **22**: 151—159.
- LALLAI A., MURA G. 2004. Biodegradation of 2-chlorophenol in forest soil: effect of inoculation with aerobic sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.*, **23**: 325—330.
- LANGBEHN A., STEINHART H. 1995. Biodegradation studies of hydrocarbons in soils by analyzing metabolites formed. *Chemosphere*, **30**: 855—868.
- LEAHY J.G., COLWELL R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, **54**: 305—313.
- LEUPROMCHAI E., SINGER A.C., YANG C.H., CROWLEY D.E. 2002. Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **41**: 191—197.
- LIEBEG E.W., CUTRIGHT T.J. 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **44**: 55—64.
- LINDAHL V., FROSTEGÅRD A., BAKKEN L., BÅÅTH E. 1997. Phospholipid fatty acid composition of size fractionated indigenous soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.*, **29**: 1565—1569.
- LITYŃSKI T., JURKOWSKA H., GORLACH E. 1972. Analiza chemiczno-rolnicza. Warszawa: PWN.
- LOFFHAGEN N., HÄRTIG C., BABEL W. 1995. Fatty acid patterns of *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V indicate sensitivity against xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**: 526—531.
- LOFFHAGEN N., HÄRTIG C., BABEL W. 2001. Suitability of the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* NCTC 10936 as an indicator of the acute toxicity of chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **50**: 65—71.
- LOFFHAGEN N., HÄRTIG C., GEYER W., VOJEVODA M., HARMS H. 2007. Competition between *cis*, *trans* and cyclopropane fatty acid formation and its impact on membrane fluidity. *Eng. Life Sci.*, **7**: 67—74.
- LOH K.C., WANG S.J. 1998. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. *Biodegradation*, **8**: 329—338.
- LORCH H.J., BENCKIESER G., OTTOW J.C.G. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: *Methods in applied microbiology and biochemistry*. Eds. ALEF K., NANPIERI P. New York: Academic Press, s. 146—161.
- LURIE J., RYBNIKOVA I. 1968. Chemical analysis of industrial sewages. Moskwa: Gaschmizdat (in Russian).
- MACNAUGHTON S.J., STEPHEN J.R., VENOSA A.D., DAVIS G.A., CHANG Y.-J., WHITE D.C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3566—3574.
- MAŁACHOWSKA-JUTSZ A., MROZOWSKA J., KOZIŁSKA M., MIKSCH K. 1997. Aktywność enzymatyczna w glebie

- skażonej związkami ropopochodnymi w procesie ich detoksykacji. *Biotechnologia*, **1**: 79—91.
- MARGESIN R., ZIMMERBAUER A., SHINNER F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, **40**: 339—346.
- MARGESIN R., SHINNER F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 3127—3133.
- MCINTOSH T.J., SIMON S.A., MACDONALD R.C. 1980. The organization of *n*-alkanes in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **597**: 445—463.
- MENZIE C.A., POTOCHI B.B., SANDODONATO J. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, **26**: 1278—1284.
- MORDARSKA H. 1984. Lipidy bakteryjne. *Post. Hig. Med. Dośw.*, **38**: 709—731.
- MORGAN J.A.W., WINSTANLEY C. 1997. Microbial biomarkers. In: *Modern soil microbiology*. Eds. VAN ELSAS J.D., TREVORS J.T., WELLINGTON E.M.H. New York: Marcel Dekker Inc.
- MROZIK A., ŁABUŻEK S. 2002. A comparison of biodegradation of phenol and homologous compounds by *Pseudomonas vesicularis* and *Staphylococcus sciuri* strains. *Acta Microbiol. Polon.*, **51**: 367—378.
- MROZIK A., ŁABUŻEK S., PIOTROWSKA-SEGET Z. 2004. Changes in cellular fatty acid composition induced by phenol and catechol in *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas stutzeri*. *Biotechnologia*, **1**: 244—252.
- MROZIK A., ŁABUŻEK S., PIOTROWSKA-SEGET Z. 2005. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiol. Res.*, **160**: 149—157.
- MROZIK A., PIOTROWSKA-SEGET Z., ŁABUŻEK S. 2007. FAME profiles in *Pseudomonas vesicularis* during catechol and phenol degradation in the presence of glucose as an additional carbon source. *Pol. J. Microbiol.*, **56**: 157—164.
- NAKAMURA K., ISHIDA H., LIZUMI T., SHIBUYA K., OKAMURA K. 2000. Quantitative PCR-detection of a phenol-utilizing bacterium, *Ralstonia eutropha* KT-1, injected to a trichloroethylene-contaminated site. *Eng. Res.*, **37**: 267—278.
- NANCHARAIAN Y.V., JOSHI H.M., HAUSNER M., VENUGOPALAN V.P. 2008. Bioaugmentation of aerobic microbial granules with *Pseudomonas putida* carrying TOL plasmid. *Chemosphere*, **71**: 30—35.
- NEMEROW N.I. 1978. *Industrial water pollution — origin, characteristics and treatment*. London: Addison-Wesley.
- NEWBY D.T., GENTRY T.J., PEPPER I.L. 2000. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3399—3407.
- NICHOLS D.S., NICHOLS P.D., McMEEKIN T.A. 1993. Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria. *Antarct. Sci.*, **5**: 144—160.
- NICHOLS D.S., McMEEKIN T.A., NICHOLS P.D. 1994. Manipulation of polyunsaturated, branched-chain and *trans*-fatty acid production in *Shewanella putrefaciens* strain ACAM 342. *Microbiology*, **140**: 577—584.
- NICHOLS P.D., MANCUSO C.A., WHITE D.C. 1987. Measurement of metanotroph and methanogen signature phospholipid for use in assessment of biomass and community structure in model system. *Org. Geochem.*, **11**: 451—461.
- NISHIHARA T., YAMADA T., TAKANO K., OSADA S., NISHIKAWA J., IMAGAWA M. 1994. Characterization of *pheB* gene encoding catechol 2,3-dioxygenase. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**: 181—193.
- OLSSON P.A. 1997. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **29**: 303—310.
- OLSSON S., PERSSON P. 1999. The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots. *Appl. Soil Ecol.*, **12**: 205—215.
- ORTEGA-CALVO J.J., SAIZ-JIMENEZ C. 1998. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3123—3126.
- PAVEL H., SHINGLER V. 1994. An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.*, **176**: 7550—7557.
- PEDROTTA V., WITHOLT B. 1999. Isolation and characterization of the *cis-trans*-unsaturated fatty acid isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPO12. *J. Bacteriol.*, **181**: 3256—3261.
- PENNANEN T., PERKIÖMÄKI J., KIIKILÄ O., VANHALA P., NEUVONEN S., FRITZE H. 1998. Prolonged, stimulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **27**: 291—300.
- PENNANEN T. 2001. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH — a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog^R and H-timidine incorporation methods in field studies. *Geoderma*, **100**: 91—126.
- PETERSEN S.O., KLUG M.J. 1994. Effect of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2421—2430.
- PETERSEN S.O., BÄÄTH E. 2003. Temperature-dependent changes in the soil bacterial community in limed and unlimed soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **45**: 13—21.
- PINKART H.C., WOLFRAM J.W., ROGERS R., WHITE D.C. 1996. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to *o*-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1129—1132.
- PLAZA G.A., WYPYCH J., BERRY C., BRIGMON R.L. 2007. Utilization of monocyclic aromatic hydrocarbons individually and in mixture by bacteria isolated from petroleum-contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 533—542.

- POŚNIAK M. 1999. Fenol, *o*-, *m*- i *p*-krezol — metoda oznaczania. Podst. Met. Oceny Środ. Pr., **22**: 91—95.
- POWLOWSKI J., SHINGLER V. 1994. Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. Biodegradation, **5**: 219—236.
- PRADHAN N., INGLE A.O. 2007. Mineralization of phenol by *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. Int. Biodeterior. Biodegrad., **60**: 103—108.
- PRPICH G.P., ADAMS R.L., DAUGULIS A.J. 2006. Ex situ bioremediation of phenol contaminated soil using polymer beads. Biotechnol. Lett., **28**: 2027—2031.
- RAMOS J.L., DUQUE E., RODRIGUEZ-HERVA J.J., GODOY P., HAIDOUR A., REYES F., FERNANDEZ-BARRERO A. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. J. Biol. Chem., **272**: 3887—3890.
- RAMOS J.L., GALLEGOS M.-T., MARQUÉS S., RAMOS-GONZÁLEZ M.-I., ESPINOSA-ÚRGEL M., SEGURA A. 2001. Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. Curr. Opin. Microbiol., **4**: 166—171.
- RAMOS J.L., DOQUE E., GALLEGOS M.-T., GODOY P., RAMOS-GONZÁLEZ M.-I., SROJAS A., TERAN W., SEGURA A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. Annu. Rev. Microbiol., **56**: 743—768.
- RAMOS-GONZALES M.J., DUQUE E., RAMOS J.L. 1991. Conjugational transfer of recombinant DNA in cultures and in soils: host range of *Pseudomonas putida* TOL plasmids. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 3020—3027.
- RANJARD L., RICHAUME A., JOCTEUR MONROZIER L., NAZARET S. 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. FEMS Microbiol. Ecol., **24**: 321—331.
- RANJARD L., RICHAUME A. 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbiol., **152**: 707—716.
- REARDON K.F., MOSTELLER D.C., BULL ROGERS J., DUTEAU N.M., KIM K.H. 2002. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. Environ. Health Perspect., **110**: 1005—1011.
- RHEE S.K., LEE G.M., KIM Y.B., LEE S.T. 1996. Effect of pyridine on the fatty acid composition of *Pimelobacter* sp. FEMS Microbiol. Lett., **141**: 139—143.
- RINGELBERG D.B., SUTTON S., WHITE D.C. 1997. Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep surface analysis of ester-linked phospholipid fatty acids. FEMS Microbiol. Rev., **3**: 371—377.
- RITCHIE N.J., SCHUTTER M.E., DICK R.P., MYROLD D.D. 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. Appl. Environ. Microbiol., **66**: 1668—1675.
- ROBINSON K.G., FARMER W.S., NOVAK J.T. 1990. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation of acclimated bacteria. Water Res., **24**: 345—350.
- ROMANTSCHUK M., SARAND I., PETÄNEN T., PELTOLA R., JONSSON-VIHANNE M., KOIVULA T., YRJÄLÄ K., HAAHTELA K. 2000. Means to improve the effect of *in situ* bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. Environ. Pollut., **107**: 179—185.
- ROSAS S.B., DEL CARMEN SECCO M., GHITTONI N.E. 1980. Effects of pesticides on fatty acid and phospholipid composition of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **40**: 231—234.
- ROTTENBERG H. 1992. Probing the interactions of alcohols with biological membranes with the fluorescent probe Prodan. Biochemistry, **31**: 9473—9481.
- ROZÈS N., PERES C. 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **49**: 108—111.
- RUSSEL N.J., FUKUNAGA N. 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. FEMS Microbiol. Rev., **75**: 171—182.
- RUSSELL N.J. 1995. Psychrotrophy and adaptation to low temperatures: microbial membrane lipids. Proceedings of the 19th International congress on refrigeration. Workshop refrigeration and microbiology; health, food, drinks and flowers. Vol. 1, Haque, s. 359—365.
- SAKAMOTO T., MURATA N. 2002. Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. Curr. Opin. Microbiol., **5**: 208—218.
- SASSER M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI technical Note 101. Microbial ID, Inc., Newark, DE, USA.
- SAYLER G.S., RIPP S. 2000. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. Curr. Opin. Biotechnol., **11**: 286—289.
- SCHUTTER M.E., DICK R.P. 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. Soil Sci. Soc. Am. J., **64**: 1659—1668.
- SCOTT H.D., WOLF D.C., LAVY T.L. 1982. Apparent adsorption and microbial degradation of phenol by soil. J. Environ. Qual., **11**: 107—112.
- SCOTT H.D., WOLF D.C., LAVY T.L. 1983. Adsorption and degradation of phenol at low concentrations in soil. J. Environ. Qual., **12**: 91—95.
- SHIBATA A., INOUE Y., KATAYAMA A. 2006. Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils. Sci. Total Environ., **367**: 979—987.
- SHINGLER V., BARTILSON M., MOORE T. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVII150 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators. J. Bacteriol., **175**: 1596—1604.
- SIKKEMA J., WEBER F.J., HEIPIEPER H.J., DE BONT J.A.M. 1994. Cellular toxicity of lipophilic compounds: mechanisms, implications and adaptations. Biocatalysis, **10**: 113—122.
- SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B. 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol. Rev., **59**: 201—222.

- SILVA E., FIALHO A.M., SA-CORREIA I., BURNS R.G., SHAW L.J. 2004. Combined bioaugmentation and biostimulation to clean up soil contaminated with high concentration of atrazine. *Environ. Sci. Technol.*, **38**: 632—637.
- SIVAGURUNATHAN M., MARTIN A.M., HELLEUR R.J. 2003. Biological waste-treatment of humic acids on the degradation of toluene. *Appl. Energy*, **75**: 267—273.
- SMITH M.R. 1994. The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria. In: *Biochemistry of microbial degradation*. Eds. RATLEGE C. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- SONG H.G. 2003. Degradation of humus-bound metabolites generated from toluene and *o*-xylene in soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **51**: 129—132.
- SPARLING G.P., ORD B.G., VAUGHAN D. 1981. Changes in microbial biomass and activity in soils amended with phenolic acids. *Soil Biol. Biochem.*, **13**: 455—460.
- STEGER K., ASA J., SVEN S., INGVAR S. 2003. Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. *J. Microbiol. Meth.*, **55**: 371—382.
- STEINBERG S.M., PIGNATELLO J.J., SAWHNEY B.L. 1987. Persistence of 1,2-dibromoethane in soils: entrapment in intraparticle micropores. *Environ. Sci. Technol.*, **21**: 1201—1208.
- SUWALSKY M., ESPINOZA M.A., BAGNARA M., SOTOMAYOR C.P. 1990. X-ray and fluorescence studies on phospholipid bilayers: IX. Interactions with pentachlorophenol. *Z. Naturforsch., C* **45**: 265—272.
- SWOBODA-COLBERG N.G. 1995. Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of synthetic organic chemicals. In: *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Eds. YOUNG L.Y., CERNIGLIA C.E. Wiley-Liss, Inc., USA, s. 27—74.
- SZCZEPANIEC-CIĘCIAK K., KOŚCIELNIAK P. 1999. *Chemia środowiska. Ćwiczenia i seminaria*. Kraków: Wyd. Uniw. Jagiellońskiego.
- ŠAJBIDOR J. 1997. Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **17**: 87—103.
- THOMPSON I.P., ELLIS R.J., BAILEY M.J. 1995. Autecology of a genetically modified fluorescent pseudomonad on a sugar beet. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **17**: 1—13.
- TIGHE S.W., DE LAJUDIE P., DIPIETRO K., LINDSTRÖM K., NICK G., JARVIS D.W. 2000. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* i *Sinorhizobium* using the Sherlock Microbial Identification System. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 787—801.
- TOP E.M., SPRINGAEL D., BOON N. 2002. Catabolic mobile elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soil and waters. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **42**: 199—208.
- TOP E.M., SPRINGAEL D. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**: 262—269.
- TSITKO I.V., ZAITZEV G.M., LOBANOK A.G., SALKINOJA-SALONEN M.S. 1999. Effect of aromatic compounds on cellular fatty acid composition of *Rhodococcus opacus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 853—855.
- TUNLID A., WHITE D.C. 1992. Biochemical analysis of biomass, community structure, nutritional status, and metabolic activity of microbial communities in soil. In: *Soil biochemistry*. Vol. 7. Eds. STOTZKY G., BOLLAG J.M. New York: Marcel Dekker Inc.
- TURPEINEN R., KAIRESALO T., HÄGGBLUM M. 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium-, and copper-contaminated soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **47**: 39—50.
- UNELL M., KABELITZ N., JANSSON J.K., HEIPEPER H.J. 2007. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the *anteiso/iso* ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.*, **266**: 138—143.
- VAN DER MEER J.R., DE VOS W.M., HARAYAMA S., ZEHNDER A.J.B. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Res.*, **56**: 677—694.
- VAN DER MEER J.R., RAVATN R., SENTCHILLO V. 2001. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch. Microbiol.*, **175**: 79—85.
- VAN ELSAS J.D., DUARTE G.F., ROSADO A.S., SMALLA K. 1998. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. *J. Microbiol. Meth.*, **32**: 133—154.
- VAN VEEN J.A., VAN OVERBEEK L.S., VAN ELSAS J.D. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**: 121—135.
- VOGEL T.M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **7**: 311—316.
- WANG A.Y., CRONAN J.E., Jr. 1994. The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS (Kat F) — dependent promoter plus enzyme instability. *Mol. Microbiol.*, **11**: 1009—1117.
- WANG S.J., LOH K.C. 2001. Biotransformation kinetics of *Pseudomonas putida* for catabolism of phenol and 4-chlorophenol in the presence of sodium glutamate. *Biodegradation*, **12**: 189—199.
- WANG Z., FINGAS M., LI K. 1994. Fractionation of a light crude oil and identification and quantification of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS Part I. *J. Chromatogr. Sci.*, **32**: 361—366.
- WATANABE K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**: 237—241.
- WATANABE K., MIYASHITA M., HARAYAMA S. 2002 a. Stable augmentation of activated sludge with foreign catabolic genes harbored by an indigenous dominant bacterium. *Environ. Microbiol.*, **4**: 577—583.
- WATANABE K., TERAMOTO M., HARAYAMA S. 2002 b. Linking genetics, physiology and ecology: an inter-

- disciplinary approach for advancing bioremediation. *J. Biosci. Bioeng.*, **6**: 557—562.
- WEBER F.J., ISKEN S., DE BONT J.A.M. 1994. *Cis/trans* isomerisation of fatty acids as a defense mechanism of *Pseudomonas putida* strains to toxic concentrations of toluene. *Microbiology*, **140**: 2013—2017.
- WEBER F.J., DE BONT J.A.M. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1286**: 225—245.
- WEI G., YU J., ZHU Y., CHEN W., WANG L. 2008. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysoptera* in mining tailing region. *J. Hazard. Mater.*, **151**: 111—117.
- WELLS G.B., DICKSON R.C., LESTER R.L. 1996. Isolation and composition of inositolphorylceramide-type sphingolipids of hyphal forms of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, **178**: 6223—6226.
- WENDEROTH D.F., ROSENBROCK P., ABRAHAM W.R., PIEPER D.H., HOFLE M.G. 2003. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microbiol. Ecol.*, **46**: 161—176.
- WHITE D.C., RINGELBERG D.B. 1997. Utility of the signature lipid biomarker analysis in determining the *in situ* viable biomass, community structure, and nutritional/physiologic status of deep subsurface microbiota. In: *The microbiology of the terrestrial deep subsurface*. Eds. AMY P., HALDEMAN D.L. New York: CRC Press.
- WHITE D.C., FLEMMING C.A., LEUNG K.T., MACNAUGHTON S.J. 1998. *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J. Microbiol. Meth.*, **32**: 93—105.
- WHITELEY A.S., BAILEY M.J. 2000. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 2400—2407.
- WILKE B.M., GATTINGER A., FRÖHLICH E., ZELLES L., GONG P. 2004. Phospholipid fatty acid composition of a 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soil and uncontaminated soil as affected by a humification remediation process. *Soil Biol. Biochem.*, **36**: 725—729.
- WISE A.A., KUSKE C.R. 2000. Generation of novel bacterial regulatory proteins that detect priority pollutant phenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 163—169.
- XING B. 1997. The effect of the quality of soil organic matter on sorption of naphthalene. *Chemosphere*, **35**: 633—642.
- XING B. 2001. Sorption of naphthalene and phenanthrene by soil humic acids. *Environ. Pollut.*, **111**: 303—309.
- YAP L.F., LEE Y.K., POH C.L. 1999. Mechanism for phenol tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**: 833—840.
- YUAN S.Y., WEI S.H., CHANG B.V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere*, **41**: 1463—1468.
- ZELLES L. 1999 a. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils*, **29**: 111—129.
- ZELLES L. 1999 b. Identification of single cultured microorganisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere*, **39**: 665—682.

Changes in bacterial fatty acid composition during phenol degradation in soil

Summary

The aim of this study was to investigate the effects of phenol on fatty acid composition of *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas* sp. JS150 strains introduced into sterile L1, L2 and G soils and in *Pseudomonas*-inoculated non-sterile soils. Phenol was added to all soils at the concentration of 1.7 mg g⁻¹, 3.3 mg g⁻¹ and 5.0 mg g⁻¹. Simultaneously, the survival of both strains introduced into soils was estimated. The investigations were conducted in four separate experimental arrangements. The first comprised sterile soils with introduced *Pseudomonas vesicularis* strain, the second — sterile soils with *Pseudomonas* sp. JS150, the third-sterile soils containing the mixture of these strains and the fourth — *Pseudomonas*-inoculated non-sterile soils. FAMES extracted from these soils at the following sampling days were analysed by GC method and identified using software Sherlock, 3,90.

It was found that phenol degradation by *Pseudomonas vesicularis* or/and *Pseudomonas* sp. JS150 depended on type of soil, phenol contamination and inoculum composition. The highest phenol removal at each concentration in L1, L2 and G soils was observed when bacteria were used as a mixture, phenol was metabolized slower by *Pseudomonas* sp. JS150 and much slower by *Pseudomonas vesicularis*. It was also demonstrated that independently on inoculum composition phenol degradation rate varied depending on type of soil. In G soil with the highest amount of organic matter phenol degradation proceeded faster than in L1 soil with intermediate amount of organic matter and in L2 soil with the lowest amount of organic matter. Obtained results also indicated that increasing dose of phenol made its biodegradation much longer. On the basis of bacterial counts it was showed that *Pseudomonas* sp. JS150 strain better survived both in phenol-polluted and the unpolluted soils in comparison with *Pseudomonas vesicularis*. Bioaugmentation with *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas* sp. JS150 strain in all soils resulted in the increase of effectiveness of phenol removal as compared to control samples. It indicated that the interactions between autochthonous bacteria and strains introduced into soils were synergic.

The analyses of fatty acid percentages and composition in bacterial cells showed that they regulated of membrane fluidity and permeability in response to ac-

tual phenol concentration in soil. The first reaction of both strains in the presence of phenol added was *de novo* synthesis and changes in composition of saturated, straight-chain and branched fatty acids at the beginning days of experiment. While the phenol concentration decreased above 50% of dose used cyclopropane fatty acid 19:0 *cy* ω10c from these cells was isolated. In turn, the abundance of hydroxy fatty acids in that time decreased or they were not present in FAMES profiles. The ratio of saturated/unsaturated fatty acids appeared the useful marker for rate of phenol degradation by *Pseudomonas vesicularis* or/and *Pseudomonas* sp. JS150. At the first days of experiment when phenol concentration in soils was high saturated/unsaturated ratio increased. It highest value was calculated generally at day when the abundance of 19:0 *cy* ω10c fatty acid was the highest whereas at the following days simultaneously with phenol removal it decreased. The value of sat/unsat ratio varied in response to the type of soil, inoculum composition and dose of phenol added. The similar correlations between phenol concentration, the presence of 19:0 *cy* ω10c fatty acid and value of sat/unsat ratio were observed in phenol amended and *Pseudomonas*-inoculated soils and phenol amended but not-inoculated soils. The abundance of saturated, straight-chain and branched fatty acids changed also in these soils but the changes were significantly lower as compared to sterile soils with introduced of *Pseudomonas vesicularis* or/and *Pseudomonas* sp. JS150 strains. In turn, the amount of hydroxy fatty acids isolated from these soils remained at the similar level. It indicates that adaptive mechanisms to the presence of phenol were similar both in laboratory selective of *Pseudomonas vesicularis* and *Pseudomonas* sp. JS150 strains and in other species of bacteria naturally existing in soil.

It was confirmed that MIDI-FAME method could be used to monitor the progress of phenol elimination from soil. On the basis of fatty acid profiles and analysis of value of sat/unsat ratio it is possible to estimate if degradation of phenol by microorganisms in soil proceeds and the presence and abundance of 19:0 *cy* ω10c fatty acid indicate the progress of this process. For this reason, they may be good biomarkers of phenol contaminated environments.

Die Veränderungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Fettsäuren während des Phenolzerfalls im Boden

Zusammenfassung

Zum Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Einwirkung des Phenols auf die Zusammensetzung der Fettsäuren bei den Stämmen *Pseudomonas vesicularis* und *Pseudomonas* sp. JS150 in sterilen Boden L1, L2 und G, und in nicht sterilen, mit Hilfe der genannten Stämme bioaugmentierten Boden. Alle Boden wurden mit dem Phenol in der Konzentration von 1,7 mg g⁻¹, 3,3 mg g⁻¹ und 5,0 mg g⁻¹ verpestet. Gleichzeitig untersuchte man die Lebensfähigkeit der beiden Bakterienstämme nach deren Introdution in den Boden. Die Untersuchungen wurden in vier Versuchssystemen durchgeführt. Das erste System bildeten sterile Boden, zu denen der Stamm *Pseudomonas vesicularis* gegeben wurde, das zweite – sterile Boden mit *Pseudomonas* sp. JS150, das dritte – sterile Boden mit einer Mischung von den zwei genannten Stämmen, und das vierte System – nicht sterile, mittels der beiden Stämme bioaugmentierte Boden. Die aus den Boden in den einzelnen Versuchstagen gewonnenen FAMES wurden mittels der GC Methode getrennt und mittels der Sherlock-Software (Version 3,90) identifiziert.

Der durch die in sterile Boden L1, L2 und G eingeführten Bakterienstämme *Pseudomonas vesicularis* und/oder *Pseudomonas* sp. JS150 verursachte Phenolzerfall hing von der Bodenart, deren Verpestungsgrad und der Zusammensetzung des Inokulums ab. Am schnellsten wurden alle Phenolkonzentrationen in L1, L2 und G-Boden von dem Bakteriengemisch zerfallen. Der Stamm *Pseudomonas* sp. JS150 verursachte den langsameren und der Stamm *Pseudomonas vesicularis* den langsamsten Phenolzerfall. Außerdem stellte man Folgendes fest: unabhängig von der Inokulumzusammensetzung kam es zum schnellsten mikrobiologischen Phenolzerfall im G-Boden mit dem höchsten Gehalt der organischen Materie, zum langsameren Phenolzerfall im L1-Boden mit mittlerem Gehalt der organischen Materie und zum langsamsten Zerfall in dem an organischer Materie armen L2-Boden. Je höher die in die Boden eingeführte Phenolgabe war, desto länger dauerte es, bis die sich in den Boden befindenden Bakterienstämme zur völliger Degradation des Phenols geführt haben. Aufgrund der Bakterienzählung wurde festgestellt, dass eine bessere Lebensfähigkeit nicht nur in den mit Phenol verpesteten Boden, sondern auch in den Kontrollböden bei dem Stamm *Pseudomonas* sp. JS150 aufgewiesen

wurde. Der Bioaugmentationseffekt der Boden mit dem Gemisch von den beiden Bakterienstämmen konnte befriedigend beurteilt werden, denn die Effizienz des daraus eliminierten Phenols im Vergleich zu Kontrollböden wesentlich größer war. Die Ursache dafür kann synergistische Wechselwirkung zwischen den autochthonen Bakterien und den neu eingeführten Bakterienstämmen sein.

Aus den Analysen der Zusammensetzung und des Gehaltes von Fettsäuren in den Zellen der untersuchten Bakterienstämme während der Phenolzersetzung im Boden geht Folgendes hervor: je nach der aktuellen Phenolkonzentration im Boden werden von den Fettsäuren verschiedene Mechanismen in Gang gebracht, welche die Flüssigkeit und die Durchlässigkeit der Zellhaut zu regulieren haben. Die beiden Bakterienstämme reagierten auf den Phenol mit der *de novo* Synthese und der Veränderung in der Zusammensetzung von unverzweigten und verzweigten gesättigten Fettsäuren. Wenn sich die Konzentration des eingeführten Phenols um über eine Hälfte verringert hatte, wurde aus den Bakterienzellen die Zyklopropansäure 19:0 cy ω10c abgesondert. Der Gehalt von Hydroxylsäuren in den Zellen der beiden Bakterienstämme war während des Phenolzerfalls niedriger oder die Säure war in den FAMES Profilen gar nicht vorhanden. Als ein guter Indikator für den Grad des von *Pseudomonas vesicularis* und/oder *Pseudomonas* sp. JS150 in den Boden ablaufenden Phenolzerfalls zeigte sich das Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. In den ersten Tagen bei hoher Phenolkonzentration wurde dieses Verhältnis höher. Den höchsten Wert erreichte es meist an dem Tag, als der höchste Gehalt von der Säure 19:0 cy ω10c beobachtet wurde. In den nächsten Tagen mit niedrigeren Phenolkonzentrationen in den Boden wurde das Verhältnis immer niedriger. Das Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren hing von der Bodenart, der Zusammensetzung des Inokulums und der Gabe des zur Bodenverpestung verwendeten Phenols ab. Solche Wechselwirkungen zwischen der Phenolkonzentration, dem Vorkommen von der Säure 19:0 cy ω10c und dem Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren wurden auch sowohl in den bioaugmentierten, wie auch in den nicht augmentierten phenolverpesteten Boden festgestellt. In den Boden wurde der Anteil von

unverzweigten und verzweigten Fettsäuren weniger verändert als in sterilen Boden mit den Stämmen von *Pseudomonas vesicularis* und/oder *Pseudomonas* sp. JS150, der Anteil von Oxykarbonsäuren dagegen war in den beiden Boden ähnlich. Das kann auf ähnliche Mechanismen der Anpassung ans Phenolverhandensein nicht nur bei laborausgewählten Stämmen *Pseudomonas vesicularis* und *Pseudomonas* sp. JS150, sondern auch bei anderen, in den untersuchten Boden natürlicherweise angesiedelten Mikroorganismen hindeuten.

Es wurde festgestellt, dass man die MIDI-FAME-Methode zum Überwachen der Phenolausscheidungsprogression aus dem Boden anwenden kann. Die Analyse von den Fettsäureprofilen und von dem Verhältnis von den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren kann zur Bestätigung des Phenolverfalls im Boden verwendet werden; das Vorhandensein und der Prozentgehalt von der 19:0 ω 10c Säure kann auf den Entwicklungsgrad des Prozesses hindeuten. So können die Fettsäure als Biomarkers der Bodenverunreinigung mit Phenol betrachtet werden.

Redaktorzy Barbara Todos-Burny, Grażyna Wojdała

Projektant okładki Małgorzata Pleśniar

Redaktor techniczny Barbara Arenhövel

Korektor Lidia Szumigala

Copyright © 2009

by Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego

Wszelkie prawa zastrzeżone

ISSN 0208-6336

ISBN 978-83-226-1874-5

Wydawca

Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego

ul. Bankowa 12B, 40-007 Katowice

www.wydawnictwo.us.edu.pl

e-mail: wydawus@us.edu.pl

Wydanie I. Ark. druk. 13,5. Ark. wyd. 15,0.

Przekazano do łamania w kwietniu 2009 r.

Podpisano do druku w czerwcu 2009 r.

Papier offset. kl. III, 80 g

Cena 25 zł

Łamanie: Pracownia Składu Komputerowego

Wydawnictwa Uniwersytetu Śląskiego

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna

ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek



Cena 25 zł

ISSN 0208-6336
ISBN 978-83-226-1874-5