

Słowa kluczowe: WWA, biodegradacja, osad denny, testy toksyczności

Monika ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ*, Maria ŁEBKOWSKA*,
Radosław KALINOWSKI*

BIODEGRADACJA WWA W OSADACH DENNYCH – OCENA EKOTOKSYKOLOGICZNA PROCESU

Celem pracy była ocena ekotoksykologiczna procesu biodegradacji wybranych WWA w warunkach tlenowych, w sztucznym osadzie dennym. W badaniach zastosowano naftalen, antracen, fenantren i piren. Biodegradację prowadzono w okresie 28 dni a jej wydajność oceniono na podstawie pomiarów zużycia tlenu i oznaczeń chromatograficznych zawartości związków w wodzie nadosadowej i w osadzie. Kontrola toksykologiczna procesu obejmowała frakcję wodną (testy enzymatyczne: Fluotox z *Daphnia magna* i Lumistox z *Vibrio fischeri* oraz genotoksyczności SOS-Chromotest z mutantami *Escherichia coli*) i osadową (test przeżywalności z *Daphnia magna* i wzrostowy z *Lemna minor*). Analizy chromatograficzne wykazały zróżnicowany efekt biodegradacji badanych związków w osadach dennych, w zależności od rodzaju WWA. Analizy toksykologiczne potwierdziły korelację pomiędzy spadkiem stężenia a szkodliwością wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i produktów pośrednich ich rozkładu w warunkach testu. Nie zaobserwowano wpływu genotoksycznego metabolitów biodegradacji.

1. WPROWADZENIE

Szlaki przemian złożonych związków organicznych mogą prowadzić do wytworzenia metabolitów trudnych do chemicznej identyfikacji. Wykazano, że w procesach degradacji substancji organicznych powstające produkty rozpadu mogą być znacznie bardziej toksyczne oraz trudniej biodegradowalne niż substancje macierzyste [15]. Do tego typu substancji należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA). Wiele opublikowanych danych dotyczy beztlenowej lub tlenowej biodegradacji WWA przez pojedyncze szczepy bakterii [17,32,35] lub grzybów [29,34]. W środowisku naturalnym zachodzą znacznie bardziej skomplikowane przemiany a w degradacji tych substancji może brać udział kilkunastu różnych gatunków mikroorganizmów, także na drodze kometabolizmu.

* Politechnika Warszawska, Zakład Biologii

Yu i wsp. [37] wykazali, że konsorcjum bakterii z rodzajów *Rhodococcus*, *Acinetobacter* oraz *Pseudomonas* może wykorzystywać WWA jako jedyne źródła węgla i energii. Luan i wsp. [12] zidentyfikowali siedem różnych metabolitów fenantrenu: dihydrodiol fenantrenu, dwie postacie dihydroksyfenantrenu, trihydroksyfenantren i monohydroksyfenantren, ester metylowy oraz kwas ftalowy. W przypadku pirenu wykryto cztery różne produkty rozpadu należące do dihydrodioli i laktanów a także dihydroksypiren i monohydroksyfenantren. Także glony mają zdolność do metabolizmu WWA. Fenantren jest biodegradowany przez zielenice do czterech różnych monohydroksyfenantrenów i dwu dihydroksyfenantrenów, zaś piren i fluorantren do trzech różnych pochodnych hydroksylowych. Chan i wsp. [3] potwierdzili zdolność zielenic do degradacji mieszaniny WWA zawierającej fluorantren, piren i fenantren. Efektywność usuwania związków przy początkowej gęstości zaszczepienia glonów wynoszącej $1 \cdot 10^7$ komórek/ml wynosiła odpowiednio 100%, 100% i 96%. Mechanizm degradacji obejmował adsorbencję związków na ścianach żywych i martwych komórek *Selenastrum capricornutum* a następnie absorbcję i degradację jedynie wewnątrz żywych organizmów. Efektywność zielenic z gatunków *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus*, *Scenedesmus quadricauda*, oraz *Selenastrum capricornutum* w usuwaniu zarówno pojedynczych WWA jak i ich mieszanin została potwierdzona przez Lei i wsp. [10], którzy wykazali zdolność tych glonów do degradacji fluorantrenu i pirenu w stężeniach 1 mg/l. Shafiee i wsp. [30] stwierdzili, że w optymalnych warunkach do rozwoju wyizolowanej z gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi mieszaniny bakterii (temp 30°C i pH=7) w przeciągu 10 dni procesu degradacji nastąpił całkowity rozkład fenantrenu. Antracen, piren, fluoren i fluorantren ulegały przemianom odpowiednio w 80%, 60%, 30% i 20% przy początkowym stężeniu związków wynoszącym 100 mg/l. Zaobserwowano także, iż mieszaniny związków często ulegają biodegradacji wydajniej niż pojedyncze substancje. Stałe biodegradacji wyznaczone dla 9 różnych WWA przez Knightes'a i Peters'a [8] były wyższe w przypadku mieszanin binarnych i wieloskładnikowych aniżeli wynikałoby to z predykcji z modeli dla pojedynczych związków za wyjątkiem naftalenu. Badania Shafiee i wsp. potwierdziły, że w obecności mieszaniny 4 WWA degradacja fluorantrenu wzrastała z 20% do 44% [30].

Badania nad przemianami WWA w środowisku osadów dennych dotyczyły głównie fotooksydacji, utleniania chemicznego, bioakumulacji i adsorpcji oraz biodegradacji. Yuan i wsp. [38] określili wpływ na biochemiczny rozkład fenantrenu – pH, temperatury, obecności różnych WWA i innych źródeł węgla, azotu, siarczków i fosforanów. Autorzy twierdzili, że fenantren ulegał efektywniejszej biodegradacji w wodzie, aniżeli w osadach dennych a rozkład związku zachodził wolniej wraz ze wzrostem stężenia od 5 do 100 mg/kg. Optymalne warunki procesu ustalono na 30°C i pH=7.0. Obecność fenantrenu przyspieszała rozkład antracenu, fluoranu i pirenu. Przeciwnie do wyników badań Yuana i wsp. uzyskali Xia i wsp. [36], którzy zaobserwowali, że rozkład WWA w osadach przebiega wydajniej aniżeli w fazie

wodnej. Autorzy przeprowadzili eksperymenty nad biodegradacją WWA w zależności od zawartości osadów dennych w zakresie od 0,4 do 10 g/dm³. Wydajność rozkładu WWA w osadach zwiększała się wraz ze spadkiem ich zawartości, ponieważ zawartość mikroorganizmów w osadach była wyższa aniżeli we frakcji wodnej, sorpcja WWA umożliwiała bezpośredni kontakt międzyfazowy powierzchnia komórki – WWA.

Bioaugmentację jako znany proces w bioremediacji gruntu wykorzystano w badaniach biodegradacji WWA zachodzącej w osadach dennych [1]. W osadach zawierających około 100 mg/kg WWA rozkład tych związków przebiegał intensywniej przy doszczepieniu aktywną mikroflorą, a test Microtox wykazywał detoksyfikację środowiska zasiedlonego mikroorganizmami. Autorzy wykazali, że tlenowy rozkład WWA stymulowany inokulacją osadów drobnoustrojami zaadaptowanymi do biodegradacji tych związków może być z powodzeniem stosowany do oczyszczania osadów metodą ex-situ.

Czynnikami istotnie wpływającymi na biodegradację WWA są także warunki tlenowe/beztlenowe. Johnson i Ghosh [7] przebadali rozkład 15 WWA w osadach dennych w warunkach beztlenowych. Stwierdzono 79% degradację acenaftenu i najniższą 8% – indeno(1,2,3)pirenu. Dodatek siarczanu jako akceptora elektronów niekiedy zwiększał rozkład WWA, natomiast przy dodatku azotanu nie stwierdzono tego zjawiska. Lei i wsp [11] zajmowali się biodegradacją WWA w warunkach tlenowych oraz w warunkach redukcji siarczanów i azotanów w osadach dennych. Zanik tlenu i silne zakwaszenie środowiska (wywołane utlenieniem siarczków do H₂SO₄) ograniczyły rozkład WWA, natomiast w warunkach tlenowych uzyskano stopniową degradację 2-, 3-, 4- i 5- pierścieniowych WWA. Wzbogacenie podłoża związkami mineralnymi azotu i fosforu, kosubstratami lub surfaktantem Triton X-100 nie zwiększyło poziomu degradacji WWA, podobnie jak warunki denitryfikacji. Przegląd danych piśmiennictwa wykazał, że niewiele jest informacji odnośnie badań ekotoksykologicznych w procesach biodegradacji WWA zachodzących w osadach dennych. Ze względu na fakt zróżnicowania składu chemicznego osadów naturalnych rzeczywistą szkodliwość WWA i ich metabolitów można ocenić przy zastosowaniu sztucznych osadów dennych.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Celem pracy była ocena ekotoksykologiczna 28 dniowego procesu biodegradacji wybranych WWA w warunkach tlenowych. Zakres pracy obejmował analizy kontrolne wody nadosadowej i osadu w tym: pomiar zużycia tlenu i zawartości WWA, testy ekotoksyczności, badania liczebności bakterii i grzybów oraz badania wybranych wskaźników chemicznych.

3. METODYKA

3.1. BADANIE ZWIĄZKI

Do badań użyto wybrane wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne – naftalen ($C_{10}H_8$), fenantren ($C_{14}H_{10}$), antracen ($C_{14}H_{10}$) i piren ($C_{16}H_{10}$), o czystości >95% pochodzących z firmy Merck. Roztwory podstawowe związków przygotowano w acetonie o 99,9% czystości (POCH).

W badaniach zastosowano standardowy sztuczny osad denny o składzie piasek – 80g, kaolin – 20g, α -celuloza – 5g, $CaCO_3$ – 0,1g.

3.2. STANOWISKA BADAWCZE

Do naczyń testowych o pojemności 1000 cm³ z czujnikami do pomiaru spadku ciśnienia – typu Sensomat-Scientific firmy WTW wprowadzono 70 cm³ standardowego osadu dennego nasaczonego do uzyskania WHC (ang. water holding capacity) zanieczyszczonego WWA w stężeniu 100 mg/kg sm oraz 280 cm³ wody uzdatnionej po biofiltrze. Kontrolę stanowiła próbka bez dodatku WWA. Badania prowadzono przez 28 dni w warunkach tlenowych, bez dostępu światła przy niewielkim mieszaniu cieczy nadosadowej w temperaturze 20°C. Eksperyment prowadzono zgodnie z metodyką podaną w rozporządzeniu Ministra Zdrowia w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych [5]. Pomiar zużycia tlenu przeprowadzono w systemie ciągłym w aparacie Sensomat-Scientific.

3.3. OZNACZENIA EKOTOSYKOLOGICZNE

We frakcji wodnej wykonywano testy enzymatyczne Fluotox z *Daphnia magna* [14] i Lumistox z *Vibrio fischeri* [13] oraz test genotoksyczności SOS-Chromotest z *Escherichia coli* [31]. Do oceny ekotoksyczności w osadach dennych zastosowano test przeżywalności z *Daphnia magna* [2] i test wzrostowy z *Lemna minor* według metodyki własnej, opartej na zaleceniach EPA do oceny toksyczności substancji w roztworach wodnych [18] oraz metodyce testowej opracowanej przez Lazorchak i wsp. [9]. W metodyce zwiększono ilość pożywki wprowadzanej do naczyń testowych i zmniejszono ilość użytego osadu w celu zachowania stosunku objętości wody do osadu 4:1. Wydłużono czas trwania testu z 96 h do 7 dni.

3.4. OZNACZENIA MIKROBIOLOGICZNE

Analizy mikrobiologiczne frakcji wodnej i osadowej obejmowały oznaczenia ogólnej liczby bakterii metodą płytkową Kocha na podłożu agarowym MPA metodą

posiewu głębinowego. Ogólną liczbę grzybów oznaczono na podłożu Sabourauda metodą posiewu powierzchniowego [6]. Wyniki podano w JTK/cm³.

3.5. OZNACZENIA CHEMICZNE

We frakcji wodnej dokonywano pomiary odczynu (pH) metodą elektrometryczną przy użyciu pehametru z elektrodą wskaźnikową typ pH/CONDUCTIVITY METER, CPC-501, chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT_{Cr}) [24], ogólnego węgla organicznego (OWO) wykonano metodą spektrofotometryczną w aparacie TOC5000 [33] zawartości: azotu amonowego [23], azotu azotynowego [21], azotu azotanowego [22], rozpuszczalnych ortofosforanów [20], chlorków wg Mohra [28]. We frakcji osadowej oznaczono odczyn pH (H₂O i KCl) [26], zawartość węgla organicznego metodą Turina [27], suchej masy oraz strat po prażeniu [16].

3.6. OZNACZENIA ZAWARTOŚCI WWA W WODZIE

Pobrane próbki wody przygotowywano do analizy zgodnie z PN-EN ISO 17993:2003 [25]. Oznaczenia zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodzie wykonywane były metodą chromatografii gazowej na aparacie Hewletta Packarda 5890A przy zastosowaniu kolumny SPB-1 (Supelco, 60 m x 0,32 mm x 1 µm).

3.7. OZNACZENIA ZAWARTOŚCI WWA W OSADZIE DENNYM

Pobrane próbki osadu przygotowywano do analizy zgodnie z metodyką opracowaną na potrzeby niniejszych badań [4,19,39]. Pobrane do szklanej butelki próbki osadu 20 g suszono dodając bezwodnego siarczanu sodu. Następnie dodawano 25 cm³ cykloheksanu i wytrząsano przez 2 h. Ekstrakt cykloheksanowy oddzielano od osadu odwirowując go przez 10 minut przy 2000 obr/min. i suszono 30 minut bezwodnym siarczanem sodu. W przypadku uzyskania emulsji, odwirowywano ją przez 10 minut przy 3000 obrotów/min. Próbki zatężano w łaźni wodnej w temperaturze 30°C pod zmniejszonym ciśnieniem 200 hPa, uzyskując próbkę o objętości 2 cm³. Do zatężonego ekstraktu dodawano 250 µm³ N,N-dimetyloformamidu i homogenizowano z 500 µm³ dichlorometanu. Próbkę odparowywano w strumieniu azotu do 0,5 cm³, a następnie przenoszono na uprzednio przygotowaną kolumnę zawierającą żel krzemionkowy. Naczynie po ekstrakcie przepłukiwano 0,5 cm³ cykloheksanu i wlewano tą objętość na kolumnę z żelem. WWA eluowano dodając 3 cm³ mieszaniny dichlorometan-cykloheksan. Następnie próbkę zatężano ponownie do objętości 1 cm³. Warunki rozdziału analogiczne jak w przypadku oznaczania zawartości WWA w wodzie.

4. WYNIKI BADAŃ

Procesy zużycia tlenu w środowisku osadu dennego wykazały zróżnicowania w zależności od zastosowanego WWA. Największy poziom respiracji po 28 dniach uzyskano w obecności antracenu (około 280–300 mg O₂/kg sm), w porównaniu z próbka kontrolną (około 100 mg O₂/kg sm). Efektywność zużycia tlenu przy dodatku fenantrenu i naftalenu była zbliżona wynosząc około 200 mg O₂/kg sm, a najniższa – w obecności pirenu – około 150 mg O₂/kg sm. Związek ten wobec kontroli hamował respirację do 14 dnia badań.

Analizy chromatograficzne zawartości WWA w osadzie podczas 28 dniowej biodegradacji wykazały, że antraceni uległ rozkładowi w 92% a fenantren w 83%. Naftalen wykryto w początkowym stężeniu 52,5 mg/kg sm., a więc w znacznie niższym niżeli innych WWA i już po 14 dniach nie stwierdzono jego obecności w osadzie i w wodzie nadosadowej. Piren uległ biodegradacji zaledwie w 28% (tab. 1).

Tab. 1. Stężenia WWA w osadzie w procesie 28 dniowej biodegradacji osadowej

Związek	Stężenie początkowe [μg/kg sm]	Badanie po czasie [d] [μg/kg sm]		
		0	14	28
Antraceni	100000	168000	52000	14000
Fenantren	100000	156000	30000	28000
Naftalen	100000	52510	<2,5	<2,5
Piren	100000	104000	101000	75000
Kontrola	0,0	0,0	0,0	0,0

We frakcji wodnej zawartość antracenu i fenantrenu była zbliżona w okresie eksperymentu wynosząc odpowiednio 4–6 mg/dm³ i 2–6mg/dm³; stężenie pirenu było w zakresie wartości śladowych.

Badania chemiczne wody nadosadowej w obecności WWA wykazały, że dodatek tych związków w acetonie wpłynął na znaczny wzrost ChZT i OWO (TOC) w porównaniu z próbka kontrolną. W czasie procesu biodegradacji nie zaobserwowano wyraźnych różnic w wartościach tych wskaźników; stwierdzono natomiast obniżenie w czasie stężenia azotu azotanowego i wzrost stężenia fosforanów we wszystkich próbkach z WWA i w kontrolnej. W osadach, w okresie 28 dni nie zachodziły wyraźne zmiany w wartościach oznaczanych wskaźników; pewne tendencje wzrostowe zaobserwowano w przypadku suchej masy i strat po prażeniu w obecności antracenu i naftalenu.

Liczebność bakterii i grzybów we frakcji wodnej ulegała fluktuacjom w czasie eksperymentu, ale na ogół była wyższa o rząd wielkości w próbkach z WWA aniżeli w próbce kontrolnej. Biodegradacja badanych związków wpłynęła na wzrost

liczebności bakterii w pierwszym tygodniu trwania doświadczeń, jak również grzybów do 14 dnia, szczególnie w próbkach z antracenenem, fenantrenem i naftalenem. W próbce kontrolnej obserwowano w czasie obniżenie liczebności mikroorganizmów. W osadach dennych rozwinęły się licznie grzyby, choć ich zawartość była niższa aniżeli bakterii. Analizując liczebność bakterii w osadach należy stwierdzić jej wzrosty w 21–28 dniu w próbkach z antracenenem i fenantrenem, a tendencję spadkową w próbce z pirenem i kontrolnej.

Badania ekotoksyczności wody nadosadowej w teście Fluotox z *Daphnia magna* wykazały, że w czasie „zero” największą szkodliwością charakteryzował się naftalen i fenantren a w mniejszym stopniu antracenen. Wraz z czasem biodegradacji toksyczność zmniejszała się z wyjątkiem próbek z fenantrenem. W tym czasie śmiertelność *Daphnia magna* w osadach po 48 h osiągnęła 100% w obecności fenantrenu i pirenu; najmniejszą szkodliwość stwierdzono w próbkach z naftalenem. Produkty metabolizmu WWA stymulowały bioluminescencję *Vibrio fischeri*. Nie stwierdzono genotoksyczności tych produktów w teście SOS-Chromotest. W początkowym okresie powstające produkty pośrednie powodowały stymulację przyrostu powierzchni listków u *Lemna minor*. W 21 dniu badań w przypadku naftalenu, antracenu i fenantrenu zaobserwowano znaczną inhibicję wzrostu, sięgającą blisko 60%.

5. WNIOSKI

1. Naftalen – aren o dwóch skondensowanych pierścieniach aromatycznych ulega biodegradacji znikając w środowisku osadowo-wodnym już po 7 dniach; powstające produkty pośrednie biodegradacji w niewielkim stopniu oddziałują szkodliwie na skorupiaki *Daphnia magna*.
2. Antracenen i fenantren – areny trójpierścieniowe są rozkładane przez mikroorganizmy w okresie 28 dni odpowiednio w 92% i 83%. Przypuszczać należy, że w czasie biodegradacji powstają toksyczne metabolity szkodliwe dla skorupiaków *Daphnia magna*. Zarówno we frakcji wodnej jak i osadowej; dotyczy to głównie fenantrenu w osadach. Wzrost liczebności mikroorganizmów w końcowym etapie badań sugeruje dalszy rozkład tych związków.
3. Piren – aren czteropierścieniowy ulega biodegradacji w 28% pozostając związany we frakcji osadowej, o czym świadczy niewielka toksyczność związku w wodzie nadosadowej i 100% śmiertelność skorupiaków we frakcji osadowej.
4. Nie wykazano genotoksyczności badanych związków i metabolitów ich rozkładu w teście SOS-Chromotest. W procesie biodegradacji wyżej wymienionych WWA zaobserwowano stymulację bioluminescencji bakterii *Vibrio fischeri*.
5. Nie stwierdzono istotnych zmian w składzie chemicznym wody i osadów dennych podczas biodegradacji badanych związków, z wyjątkiem wpływu użytego rozpuszczalnika organicznego – acetonu na wzrost ChZT i OWO.

LITERATURA

- [1] Abbondanzi F., ruzi L., Campisi T., Frezzati A., Guerra R., Iacondini A. 2006. *Biotreatability of polycyclic aromatic hydrocarbons in brackish sediments: Preliminary studies of an integrated monitoring*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57(4): 214-221.
- [2] ASTM E 1706, 2005. *Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*.
- [3] Chan S.M.N. Luan T., Wong M.H., Tam N.F.Y. 2006. *Removal and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7): 1772–1779.
- [4] Dutkiewicz T. 1998. *WWA w środowisku przyrodniczym*. Instytut Kształtowania Środowiska; Warszawa.
- [5] Dz. U. z 2003 r. Nr 232, poz. 2342 i 2343. *Załącznik do rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 28 lipca 2003 r. w sprawie metod przeprowadzania badań właściwości fizykochemicznych, toksyczności i ekotoksyczności substancji i preparatów chemicznych*.
- [6] Grabińska-Loniewska A. 1999. *Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- [7] Johnson K., Ghosh, S. 1998. *Feasibility of anaerobic biodegradation of PAHs in dredged river sediments*. *Water Science and Technology*, 38(7): 41-48.
- [8] Knightes C.D., Peters C.A. 2006. *Multisubstrate Biodegradation Kinetics for Binary and Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(7): 1746–1756.
- [9] Lazorchak, J. M., Suszcynskymeister E. M., Smith M. E. 2000. *A Sediment Toxicity Method Using Lemna Minor, Duckweed*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Nashville, TN, November 12-16.
- [10] Lei A.P., Hu Z.L., Wong Y.S, Tam N.F.Y. 2007. *Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species*, *Bioresource Technology*, 98(2): 273-280.
- [11] Lei L.; Khodadoust A.P.; Suidan M.T.; Tabak H.H. 2005. *Biodegradation of sediment-bound PAHs in field-contaminated sediment*. *Water Research*, 39(2-3): 349-361.
- [12] Luan T.G., Yu K.S.H., AN Y., Zhou H.W., AN C.Y., Tam N.F.Y. 2006. *Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments*. *Chemosphere* 65: 2289–2296.
- [13] *LUMIStox – Bedienungsanleitung Manual*. 1994. Dr Lange.
- [14] Łebkowska M, Załęska-Radziwiłł M., Słomczyńska B. 2004. *Toksykologia środowiska – ćwiczenia laboratoryjne*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- [15] Mahro B. 2000. *Bioavailability of contaminants*. *Bio/Technology* 11b: 61–88.
- [16] Myślińska E. 2001. *Laboratoryjne badania gruntów*. Wyd.3, PWN, Warszawa.
- [17] Ohnuma T., Suto K., Inoue C. 2007. *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacteria isolated from light oil polluted soils*. *AIP Conference Proceedings*, 898: 235-238.
- [18] OPPTS 850.4400. 1996. *Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Tiers I and II*
- [19] Ostrander G.C. 2005. *Determining aromatic hydrocarbons and chlorinated hydrocarbons in sediments and tissues using accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry*. *Techniques in Aquatic Toxicology*, CRC Press Book.
- [20] PN-C-04537-02:1973. *Woda i ścieki. Badania zawartości związków fosforu. Oznaczanie rozpuszczalnych ortofosforanów. Metoda kolorymetryczna przy użyciu molibdenianu amonowego i chlorku cynawego jako czynnika redukującego*.

- [21] PN-C-04576-06:1973. *Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu azotynowego metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i 1-naftyloaminą.*
- [22] PN-C-04576-08:1973. *Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu azotanowego. Metoda kolorymetryczna z kwasem fenolodwusulfonowym.*
- [23] PN-C-04576-4:1994. *Woda i ścieki. Badania zawartości związków azotu. Oznaczanie azotu amonowego w wodzie metodą bezpośredniej nessleryzacji.*
- [24] PN-C-04578-03:1974. *Woda i ścieki. Badania zapotrzebowania tlenu i zawartości węgla organicznego. Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) metodą dwuchromianową.*
- [25] PN-EN ISO 17993:2003. *Jakość wody. Oznaczanie 15 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w wodzie metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną po ekstrakcji ciecz-ciecz z modyfikacją dotyczącą ekstrahenta.*
- [26] PN-ISO 10390:1997. *Jakość gleby – Oznaczanie pH.*
- [27] PN-ISO 14235:2003. *Jakość gleby. Oznaczanie zawartości węgla organicznego przez utlenianie dwuchromianem(VI) w środowisku kwasu siarkowego(VI).*
- [28] PN-ISO 9297:1994. *Jakość wody. Oznaczanie chlorków. Metoda miareczkowania azotanem srebra w obecności chromianu jako wskaźnika (Metoda Mohra).*
- [29] Potin O., Rafin C., Etienne V. 2004. *Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil.* International Biodeterioration and Biodegradation. 54(1): 45-52.
- [30] Shafiee P., Shojasadati S.A., Charkhabi A.H. 2006. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by aerobic mixed bacterial culture isolated from hydrocarbon polluted soils.* Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 25(3): 73-78.
- [31] *SOS-Chromotest kit Instructions For Use.* 2005. Version 6,1, EPBI.
- [32] Stringfellow W.T., Aitken M.D. 1995. *Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads.* Applied and Environmental Microbiology, 61(1): 357-362.
- [33] *TOC Instruction Manual. Total Organic Carbon Analyzer Model TOC 5000.* Shimadzu Corporation. Environmental Analyzers Plant, Analytical Instruments Division.
- [34] Valentín L., Lu-Chau T.A., López C., Feijoo G., Ortira M.T., Lema J.M. 2007. *Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus Bjerkandera sp. BOS55.* Process Biochemistry 42(4): 641-648.
- [35] Van Herwijnen R., Van De Sande B.F., Van Der Wielen F.W.M., Springael, D., Govers H.A.J., Parsons J.R. 2003. *Influence of phenanthrene and fluoranthene on the degradation of fluorene and glucose by Sphingomonas sp. strain LB126 in chemostat cultures.* FEMS Microbiology Ecology, 46(1): 105-111.
- [36] Xia X.H.; Yu H.; Yang Z.F.; Huang G.H. 2006. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the natural waters of the Yellow River: Effects of high sediment content on biodegradation.* Chemosphere 65(3): 457-466.
- [37] Yu S.H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y. 2005. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a consortium enriched from mangrove sediments.* Environ. Int. 31: 149–154.
- [38] Yuan S.Y.; Chang J.S.; Yen J.H.; Chang B.V. 2001. *Biodegradation of phenanthrene in river sediment.* Chemosphere, 43(3): 273-278.
- [39] Zakrzewska E., Janosz-Rajczyk M. 2001. *Zmiany zawartości WWA w osadach ściekowych kondycjonowanych termicznie i modyfikowanych NSPC w procesie fermentacji metanowej.* Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka. 249-255.

PAH'S BIODEGRADATION IN SEDIMENT – ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF BY-PRODUCTS

The aim of the study was to evaluate ecotoxicity of PAH's biodegradation process in aerobic conditions in artificial sediment. Naphthalene, phenantrene, anthracene and pyrene were used as a model compounds. Biodegradation test was carried out for 28 days and its efficiency was assessed by sediment respiration and GC analyses of overlaying water and sediment samples. Ecotoxicological control included water fraction (enzymatic tests: Fluotox with *Daphnia magna* and Lumistox with *Vibrio fischeri* and genotoxicity SOS-Chromotest with *Escherichia coli*) and solid fraction (survival of *Daphnia magna* and growth inhibition of *Lemna minor*). GC analysis showed different biodegradation effect depending on PAH compound. Toxicological studies confirmed correlation between the decrease of parent compounds concentrations and biological effects of PAHs and their by-products in sediments. No genotoxic effects were observed during this study.