



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Manca FURLAN

**BIOREMEDIACIJA OKOLJA ONESNAŽENEGA S
POLICIKLIČNIMI AROMATSKIMI
OGLJIKOVODIKI IN TEŽKIMI KOVINAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Manca FURLAN

**BIOREMEDIACIJA OKOLJA ONESNAŽENEGA S
POLICIKLIČNIMI AROMATSKIMI OGLJIKOVODIKI IN TEŽKIMI
KOVINAMI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**BIOREMEDIATION OF COMBINED POLLUTION OF
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND HEAVY
METALS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Miha Humar.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Miha HUMAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 8. 7. 2019

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 606:504.5:661.715.7(043.2)
- KG bioremediacija, policiklični aromatski ogljikovodiki, težke kovine, mikroorganizmi
- AV FURLAN, Manca
- SA HUMAR, Miha (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2019
- IN BIOREMEDIACIJA OKOLJA ONESNAŽENEGA S POLICIKLIČNIMI AROMATSKIMI OGLJIKOVODIKI IN TEŽKIMI KOVINAMI
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VI, 19 str., 1 sl., 71 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Zadnje čase poteka vse več raziskav na področju bioremediacije okolja onesnaženega s policikličnimi aromatski ogljikovodiki (PAH) in težkimi kovinami. Postopke bioremediacije izvajamo z bakterijami in glivami. Pri razgradnji različnih vrst policikličnih aromatskih ogljikovodikov in težkih kovin lahko sodelujejo številne vrste mikroorganizmov bodisi z adsorpcijo, delno ali celovito razgradnjo onesnaževal. Bioremediacija je učinkovita, ekonomična in enostavna metoda čiščenja okolja, onesnaženega s PAH. Uspešnost bioremediacije zavisi od številnih dejavnikov, kot so zastopanost in količina onesnaževal ter interakcije med njimi, prilagojenost in raznolikost mikrobnih populacij ter okoljski dejavniki. Med slednjimi prevladuje vpliv pH, temperature, organskih kislin nizke molekularne mase in huminskih kislin. Obstajajo različni mehanizmi bioremediacije PAH in težkih kovin. Na mehanizme vplivajo interakcije med težkimi kovinami, PAH in njihovimi metaboliti. Bakterije in glive so razvile različne mehanizme odpornosti na težke kovine, ki so lahko za njih toksične in delujejo zaviralno na bioremediacijo. PAH in njihovi presnovki lahko spodbujajo ali inhibirajo aktivnost mikroorganizmov in tako vplivajo na njihovo sposobnost absorpcije in razgradnje. Prisotnost obeh vrst onesnaževal hkrati pa lahko deluje sinergistično ali antagonistično glede na toksičnost na mikroorganizme.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 606:504.5:661.715.7(043.2)
- CX bioremediation, polycyclic aromatic hydrocarbons, heavy metals, microorganisms
- AU FURLAN, Manca
- AA HUMAR, Miha (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
- PY 2019
- TI BIOREMEDIATION OF COMBINED POLLUTION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND HEAVY METALS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 19 p., 1 fig., 71 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Lately there has been more and more research in the field of bioremediation of environments contaminated with polycyclic aromatic carbons (PAHs) and heavy metals. Bioremediation is done with the help of bacteria and fungi. Various species of microorganisms can aid in degradation of PAHs and heavy metals, either by adsorption, partial or complete degradation of the pollutants. Biodegradation is an efficient, economic, and facile method for the treatment of polluted environment. It's success depends on many factors such as pH, temperature, low molecular weight organic acids and humic acids. There are numerous bioremediation mechanisms of PAH and heavy metals with bacteria and fungi, that are affected by interaction between both types of pollutants. Microorganisms have acquired different resistance mechanisms for coping with toxic effects of heavy metals, that can otherwise be detrimental to bioremediation. PAH and their metabolites can either promote or inhibit microorganism's activity and affect their ability of absorption and degradation of pollutants. The combined effects of PAHs and heavy metals on bacteria and fungi can be synergistic or antagonistic in regard to their toxicity.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	VI
1 UVOD	1
2 OPIS IZBRANIH VRST ONESNAŽEVAL	2
2.1 POLICIKLIČNI AROMATSKI OGLJIKOVODIKI.....	2
2.2 TEŽKE KOVINE	3
3 BIOREMEDIACIJA Z BAKTERIJAMI IN GLIVAMI.....	4
4 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA UČINKOVITOST BIOREMEDIACIJE	4
4.1 OKOLJSKI DEJAVNIKI.....	4
4.1.1 Vpliv pH	4
4.1.2 Vpliv temperature	5
4.1.3 Vpliv nizkomolekularnih organskih in huminskih kislin	5
4.1.4 Mikrobna aktivnost.....	6
4.1.5 Vpliv značaja onesnaževal	7
5 MEHANIZMI BIOREMEDIACIJE ONESNAŽENJA S PAH IN TEŽKIMI KOVINAMI.....	7
5.1 VPLIV TEŽKIH KOVIN NA BIOREMEDIACIJO.....	7
5.2 VPLIV PAH ALI NJIHOVIH PRESNOVKOV NA BIOREMEDIACIJO PAH.....	9
5.3 VPLIV INTERAKCIJ MED PAH IN TEŽKIMI KOVINAMI NA BIOREMEDIACIJO.....	10
5.3.1 Vpliv težkih kovin na bioremediacijo PAH	10
5.3.2 Vpliv PAH na bioremediacijo težkih kovin	12
6 ZAKLJUČEK	13
7 VIRI	14

KAZALO SLIK

Slika 1. Mehanizmi vpliva težkih kovin in PAH na mikroorganizme (Liu in sod., 2017; Gschmeissner, 2019)	13
---	----

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons - policiklični aromatski ogljikovodiki
MGP	Manufactured gas plant - mesta nekdanje proizvodnje plina iz premoga ali lesa
ATPaze	Adenozin trifosfataze
GSH	Reduciran glutation
GST	Glutation S-transferaza
GSSG	Oksidiran glutation
GR	Glutation reduktaza
ROS	Reactive oxygen species - reaktivne kisikove spojine

1 UVOD

PAH predstavljajo veliko skupino organskih spojin. So aromatski ogljikovodiki z dvema ali večimi benzenskimi obroči. Obstajajo številni naravni in antropogeni viri PAH. V okolju so močno razširjeni onesnaževalci s škodljivimi biološkimi učinki, pogosto so strupeni, mutageni in rakotvorni. Njihova razširjenost, rakotvornost in bioakumulacija predstavlja velik okoljski problem (Haritash in Kaushik, 2009). PAH zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti lahko zasledimo povsod v okolju: v zraku, prsti in vodi, kjer se nahajajo kot kompleksne mešanice več sto posameznih PAH obročev. Nastanejo pri skoraj vseh vrstah izgorevanj organskih materialov. Antropogeni viri PAH in njihovih derivatov so različni. Nastajajo pri nepopolnem izgorevanju fosilnih goriv, odpadkov ali drugih organskih snovi, na primer tobaka. PAH nastajajo tudi ob gozdnih požarih in vulkanskih izbruhih. V ozračju lahko prepotujejo dolge razdalje, preden se s pomočjo padavin odlagajo na tla, vegetacijo ali v vode. Z večanjem molekulske mase PAH se zvišuje tudi njihova rakotvornost, akutna toksičnost se zmanjšuje (Kim in sod., 2013).

PAH so podvrženi različnim tipom razgradnje, kot so adsorpcija, izhlapevanje, fotoliza in kemična razgradnja, glavni proces njihove degradacije je mikroba razgradnja. V primerjavi s fizikalno in kemijsko remediacijo je bioremediacija najbolj učinkovita in najcenejša, pri razgradnji PAH v okolje ne vnaša novih onesnaževal. Razgradnja policikličnih aromatskih vodikov je odvisna od njihove narave in kemijske strukture, okoljskih pogojev ter količine in vrste mikroorganizmov. Razgradijo se v manj kompleksne metabolite, preko mineralizacije nastanejo končni produkti kot so anorganski minerali, voda in ogljikov dioksid ob navzočnosti kisika in metan v anaerobnih razmerah. Stopnja biorazgradnje je odvisna od pH, temperature, kisika, mikrobnih populacij, stopnje prilagajanja mikroorganizmov, dostopnosti hranil, kemijske strukture spojine, lastnosti celičnega transporta in kemične sestave ravnega gojišča. Večina vrst bakterij, ki lahko razgrajujejo PAH, je bila izolirana iz onesnažene zemlje in sedimentov (Haritash in Kaushik, 2009; Liu in sod., 2017).

Poleg PAH velik okoljski problem predstavljajo tudi težke kovine. Vse težke kovine, tudi tiste, ki so za življenje organizmov nujno potrebne, so toksične, če so prisotne v visokih koncentracijah. Strupenost kovin v organizmu lahko opredelimo kot potencial ali sposobnost kovine, da ima škodljiv učinek na žive organizme in je odvisna od biodostopnosti kovin (Rasmussen in sod., 2000). Težke kovine lahko v kombinaciji z drugimi polutanti škodujejo tako zdravju ljudi kot okolju tudi pri nizkih koncentracijah zaradi postopne akumulacije. Običajno se sproščajo pri industrijskih procesih, kot je na primer galvanizacija, proizvodnja jekla in kemijska predelava. Veliko raziskav poteka na področju težkih kovin, kot so kadmij, krom, baker, svinec in cink, zaradi njihove razširjenosti v okolju in pomembne vloge pri rasti rastlin. V majhnih koncentracijah so namreč nujno potrebne za rast rastlin, vendar postanejo škodljive že pri rahlo višjih koncentracijah (Chaturvedi in sod. 2015; Liu in sod., 2017).

Nekateri neesencialni elementi kot so arzen (As), fluor (F), cezij (Cs), živo srebro (Hg) in svinec (Pb), so strupeni za organizme tudi pri zelo nizkih koncentracijah. Nevarnost težkih kovin za zdravje ljudi in živali predstavlja njihovo dolgotrajno kopičenje v okolju. Svinec je primer ene najbolj obstojnih kovin, saj se v zemlji lahko zadržuje 150 do 5000 let. Njegov povprečni biološki razpolovni čas je ocenjen na 18 let, znotraj človeškega telesa pa 10 let (Mani in Kumar, 2013).

Čprav biološka ali kemijska razgradnja težkih kovin ni možna, obstajajo metode za znižanje njihove toksičnosti za okolje, kot je kelacija s kelatorji pri kemijski ali fizikalni remediaciji ali sprememba oksidacijskih stanj z redoks reakcijami. Slednje je poglavitni mehanizem fitoremediacije in mikrobne remediacije (bioremediacije), ki postajata vse bolj okolju prijazni in stroškovno učinkoviti tehnologiji (Wu in sod., 2010).

V naravi je onesnaženje z enim samim kontaminantom zelo redko. Policiklični aromatski ogljikovodiki in težke kovine se pogosto nahajajo skupaj, kar predstavlja velik problem za okolje in zdravje človeka povsod po svetu. Antropogeni dejavniki, kot so energetska izraba fosilnih goriv, avtomobilske emisije in sežiganje odpadkov, so odgovorni za nastanek številnih onesnaženih mest s PAH in težkimi kovinami. Sočasno pojavljanje PAH in težkih kovin je pogosto na industrijskih mestih, kot so območja impregnacijskih postaj za les, proizvodnje plina iz premoga in lesa, rudarstva in metalurgije, ter tudi v naravi v sedimentih voda. Na urbanih območjih je potrebna sanacija številnih mest, da se prepreči širjenje kontaminantov in omogoči ponovni razvoj. Prisotnost obeh vrst onesnaževal na isti lokaciji predstavlja tehnični in ekonomski izziv za dekontaminacijo okolja. Veliko število raziskovalcev v svojih raziskavah poudarja koristi bioremediacije okolja onesnaženega s PAH in težkimi kovinami, ker je ta metoda ekonomična, okolju prijazna in z njo lahko hkrati odstranimo organska in anorganska onesnaževala (Lu in sod., 2014; Roy in sod.; 2005, Liu in sod.; 2017).

Cilj diplomske naloge je opisati obe vrsti onesnaževal, možnosti bioremediacije in vpliva različnih dejavnikov, ki vplivajo na učinkovitost bioremediacije ter opisati vpliv PAH in težkih kovin na mikroorganizme. Poleg tega je namen zaključnega dela pokazati vpliv težkih kovin in interakcij med njimi na bioremediacijo tako težkih kovin kot PAH ter vpliv PAH in njihovih metabolitov na bioremediacijo PAH in težkih kovin.

2 OPIS IZBRANIH VRST ONESNAŽEVAL

2.1 POLIČIKLIČNI AROMATSKI OGLJIKOVODIKI

Policiklični aromatski ogljikovodiki se v zemlji zadržujejo zaradi edinstvenih fizikalnih lastnosti, kot sta visoka hidrofobnost ter visoka odpornost na nukleofilni napad. Znano je, da se PAH v zemlji razgradijo na različne načine. Biološka razgradnja organskih snovi v zemlji običajno vključuje kompleksne skupnosti bakterij in gliv s številnimi metabolnimi potmi, vključenimi v razgradnjo. Na splošno velja, da se biološka razgradljivost PAH zmanjšuje skoraj logaritemsko s povečanjem molekulske mase. PAH z nižjo molekulsko maso so lažje biorazgradljivi, ker so preproste oblike organskih spojin bolj primerne kot vir energije. Kljub temu obstajajo različne vrste mikroorganizmov, ki so sposobne razgraditi PAH tako nizke kot visoke molekulske mase (Baltrons in sod., 2018; Zhang in sod., 2006).

Kupposamy in sod. (2016) so ugotovili, da so bakterije v zemlji uspele razgraditi PAH z nizko molekulsko maso (z dvema ali tremi benzenovimi obroči, kot je na primer fenantren) in PAH z visoko molekulsko maso (z več kot tremi benzenovimi obroči, kot je piren) do tako nizkih koncentracij, da jih v okolju ni bilo več mogoče zaznati (pod mejo detekcije). S tem so dokazali visoko učinkovitost bioremediacije, vendar je čas razgradnje pirena štirikrat daljši od časa, potrebnega za razgradnjo fenantrena.

Usoda PAH ni odvisna le od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti, ampak tudi od drugih prisotnih onesnaževal, kot so težke kovine. PAH, kot so naftalen, fenantren in piren so največkrat preučevani v prisotnosti kadmija in svineca, ki sta značilna predstavnika težkih kovin. Rezultati analize zemlje, pridobljene iz mest nekdanje proizvodnje plina iz premoga ali lesa oziroma ang. "manufactured gas plant" ali MGP v Sydneyju in Novem Južnem Walesu v Avstraliji, so pokazali prisotnost desetih vrst PAH (naftalen, acenaftilen, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, krizen, benzo(a)piren) in štirih vrst toksičnih težkih kovin, to so svinec (Pb), kadmij (Cd), krom (Cr) in cink (Zn). PAH nastajajo kot stranski produkt pri suhi destilaciji lesa. Koncentracije pirena s štirimi obroči so bile višje kot koncentracije naftalena z dvema obročema in fenantrena s tremi obroči (Thavamani in sod., 2011; Liu in sod., 2017).

2.2 TEŽKE KOVINE

Stopnjo onesnaženja okolja s težkimi kovinami je težko oceniti samo z merjenjem njihove koncentracije. Težke kovine imajo zelo raznolik vpliv na mikroorganizme ter okolje zaradi različne moči vezave potencialnih ligandov na kovinske ione ter različne mobilnosti kovin. Na porazdelitev težkih kovin v tleh vpliva več dejavnikov, kot so fizikalno-kemijske lastnosti zemlje in njen redoks potencial. Tako se številne raziskave osredotočajo na mobilnost in razpoložljivost težkih kovin (Chen in sod., 2015).

Kompleksi kovin in organskih snovi niso sposobni vezave na encime, zato so težke kovine običajno toksične le v ionski obliki. Kot take lahko zavirajo biorazgradnjo PAH z njihovo interakcijo s PAH-specifičnimi encimi oksigenazami, ki so neposredno vključeni v proces biorazgradnje ali pa delujejo posredno preko interakcij s presnovnimi encimi bakterij (Thavamani in sod., 2013).

Izsledki številnih raziskav nakazujejo, da imajo različne težke kovine zaviralni učinek na biorazgradnjo ob različnih koncentracijah. Za cink je bilo z raziskavami določenih pet različnih mejnih vrednosti koncentracij, ki zavirajo bioremediacijo. Nekateri rezultati raziskav so kazali na to, da težke kovine ne zavirajo biorazgradnje, na primer Delaune in sod. (1998) so ugotovili, da krom v koncentracijah 0-5000 µg/g sedimenta in svinec v koncentracijah 0-2500 µg/gram nista vplivala na bioremediacijo naftnih ogljikovodikov v glinenih sedimentih. Drugi raziskovalci so ugotovili nasprotno. Obstoj tako nasprotujočih si rezultatov, ki bodisi kažejo na različne stopnje ali načine inhibicije, lahko najverjetneje pojasnimo s pomanjkanjem standardiziranih metod za določanje toksičnosti težkih kovin. Najbolj pogosto so se raziskave nanašale na celokupno koncentracijo težkih kovin v testnem sistemu, kar pa ni najbolj zanesljivo merilo, saj so nekatere vrste težkih kovin bolj biodostopne kot druge. Trenutno veljajo prosti kovinski ioni, na primer Cd^{2+} , za najbolj biološko dostopne. Poleg koncentracije težkih kovin pa je pomembna še njihova kemijska oblika.

3 BIOREMEDIACIJA Z BAKTERIJAMI IN GLIVAMI

Številne vrste mikroorganizmov so sposobne bioremediacije okolja, onesnaženega s PAH in težkimi kovinami, vključno z bakterijami in glivami. Večino teh je bilo izoliranih iz onesnaženih sedimentov in zemlje. Dlje časa ko so mikroorganizmi izpostavljeni obema vstama onesnaževal, bolj postajajo učinkoviti pri bioremediaciji. *Bacillus*, *Escherichia* in *Mycobacterium* so vrste bakterij, ki jih pogosto zasledimo pri bioremediaciji PAH in težkih kovin. Poglavitni del bioremediacije PAH v zemlji naravno opravijo mikroorganizmi kot so *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* in druge skupine, kot so aktinomicete in glive bele trehnobe. Policiklične aromatske ogljikovodike, kot so antracen, naftalen, fenantren, pireni in benzo(a)piren lahko razgradijo v prisotnosti težkih kovin in omilijo njihov zaviralni značaj. Zaviralno na primer delujejo težke kovine kot so kadmij (Cd), baker (Cu), krom (Cr) in svinec (Pb), ko se nahajajo skupaj s PAH. Podobno se lahko s tovrstnimi onesnaževali spopadejo tudi določene vrste gliv, kot so *Acremonium*, *Pleurotus* in *Fusarium* (Liu in sod., 2017; Baltrons in sod., 2018). Li in sod. (2017) so ugotovili, da so tudi določene združbe mikroorganizmov, ki se nahajajo v rizosferi rastlin, učinkovite pri čiščenju PAH in težkih kovin. Znano je, da korenine rastlin izločajo snovi, kot so organski kislini anioni, sladkorji, vitamini, aminokisliline, anorganski ioni in nekateri encimi, ki imajo pomemben vpliv na razvoj mikrobnih populacij in na njihovo biološko dejavnost. Na ta način mikroorganizmi, korenine rastlin in interakcije med njimi izboljšajo biološko razpoložljivost kovin v rizosferi. Nekatere metode, kot je imobilizacija in kompostiranje lahko zaščitijo mikroorganizme pred težkimi kovinami in PAH ali povečajo mikrobno aktivnost in s tem izboljšajo bioremediacijo (Park in sod., 2011; Liu in sod., 2017).

4 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA UČINKOVITOST BIOREMEDIACIJE

4.1 OKOLJSKI DEJAVNIKI

Učinkovitost bioremediacije zavisi od številnih okoljskih dejavnikov. Glavni vpliv na razgradnjo PAH in težkih kovin predstavljajo pH, temperatura, nizkomolekularne organske in huminske kisline, ki spremenijo mobilnost in razpoložljivost težkih kovin ter biodostopnost PAH in težkih kovin (Liu in sod., 2017).

4.1.1 Vpliv pH

Vrednost pH je glavni dejavnik, ki vpliva na učinkovitost bioremediacije. Od njegove vrednosti zavisi encimska aktivnost mikroorganizmov. Večina heterotrofnih bakterij je najbolje prilagojenih na nevtralne vrednosti pH, vendar se optimalni pH razlikuje glede na vrsto mikroorganizmov. Redoks stanje in topnost težkih kovin sta prav tako odvisna od pH vrednosti. Na ta način se s pH spreminja tudi njihova toksičnost na mikroorganizme. Posledično lahko PAH in težke kovine s spreminjanjem pH in drugih okoljskih dejavnikov močno vplivajo na bioremediacijo (Liu in sod., 2017; Tang in Qi, 2005).

Vrednost pH številnih s PAH onesnaženih mest ni optimalna za bioremediacijo. Mesta opuščenih plinarn in plinohranov na primer vsebujejo velike količine betona in opek, ki ostanejo po rušenju. Izpiranje tovrstnega materiala povzroči zvišanje vrednosti pH v zemlji in s tem poslabša pogoje za mikrobni metabolizem (Bamforth in Singleton, 2005).

Thavamani in sod. (2011) so ugotovili, da se vrednost pH tal na mestih nekdanje proizvodnje plina (MGP) giblje med kislo in nevtralnno. Nizke vrednosti pH spremenijo biodostopnost težkih kovin s povečanjem njihove topnosti in tako vplivajo na mikrobo aktivnost. Raziskave so pokazale, da se z znižanjem pH za eno enoto, topnost Zn poveča za 100 %. Prilaganje pH na onesnaženih mestih bi tako lahko omogočilo uspešnejšo bioremediacijo okolja.

4.1.2 Vpliv temperature

Temperatura vpliva na hitrost biokemijskih reakcij in sicer se hitrost številnih reakcij podvoji, ko se temperatura dvigne za deset stopinj. Z višanjem temperature se zvišuje tudi aktivnost mikroorganizmov, nad določeno temperaturo pa mikrobn metabolizem ni več mogoč (Vidali, 2001).

Antizar-Ladislao in sod. (2007) so ugotovili, da pri kompostiranju visoke temperature zavirajo mikrobo raznolikost (temperaturo so dvigovali od optimalne 38°C do 70°C), s čimer lahko znižajo učinkovitost bioremediacije onesnažene zemlje. V prejšnjih raziskavah so raziskovali vpliv temperature na razgradnjo PAH in rezultati so pokazali, da je optimalna razgradnja PAH potekala pri 38°C. Prav tako so prišli do spoznanja, da temperatura močno vpliva na razmerje med glivnimi in bakterijskimi populacijami v kompostu (Antizar-Ladislao in sod., 2006).

Temperatura ima tako močan vpliv na možnost bioremediacije. Z višanjem temperature do določene mere se poveča topnost PAH in težkih kovin, vendar na onesnaženih mestih večino leta temperatura ni optimalna. Z višanjem temperature pa se znižuje topnost kisika, s tem pa tudi metabolna aktivnost mikroorganizmov (Bamforth in Singleton, 2005).

Rezultati raziskave vpliva temperature na adsorpcijo PAH nakazujejo, da se adsorpcija PAH z naraščanjem temperature zvišuje (Gupta H. in Gupta B., 2015). Adsorpcija aromatskih organskih snovi se lahko bistveno spremeni tudi s koncentracijo in značilnostmi soobstoječih težkih kovin in aromatskih organskih snovi. Povišana adsorpcija težkih kovin lahko prepreči adsorpcijo PAH in obratno, saj se obe vrsti onesnaževal vežeta na podobna adsorpcijska mesta na mikroorganizmih. Soobstoječi PAH lahko tudi izboljšajo adsorpcijo težkih kovin, saj se nekateri od polutantov vežejo močneje in nekateri šibkeje (Tao in sod., 2014; Zhang in sod., 2015).

4.1.3 Vpliv nizkomolekularnih organskih in huminskih kislin

Nizkomolekularne organske in huminske kisline so zelo pomemben dejavnik, ki vpliva na bioremediacijo PAH in težkih kovin. So naravno prisotne v tleh, predvsem v rizosferi, saj nastanejo kot koreninski izločki rastlin in so ostanek razgradnje lignina. Nizkomolekularne organske in huminske kisline povzročijo sproščanje vezanih ostankov PAH v zemlji in na ta način izboljšajo njihovo biodostopnost ter razgradljivost. Nastanek vezanih ostankov PAH je najbolj pogosta usoda PAH v zemlji. Nastanejo predvsem s porazdelitvijo PAH v organsko snov v zemlji s počasno difuzijo ali ujetjem v mikropore znotraj agregatov. Sproščanje vezanih ostankov PAH lahko pripišemo vplivom nizkomolekularnih organskih in huminskih kislin na mikrobne interakcije ter na kemijske reakcije. Razlike v sestavi, strukturi in stanju organskih snovi vplivajo na moč adsorpcije PAH. Kationi kovin v zemlji so sposobni tvoriti komplekse s

funkcionalnimi skupinami organskih molekul. Nizkomolekularne organske in huminske kisline lahko raztopijo kovinske katione in na ta način v rizosferi prekinajo vezi med organskimi snovmi, kot so PAH in trdno površino delcev zemlje, s čimer povzročijo sproščanje PAH. Z adsorpcijo PAH na huminske kisline in nizkomolekularne organske kisline se prav tako neposredno znižuje delež PAH vezanih na minerale zemlje. Adsorpcija lahko posredno povzroči sproščanje vezanih PAH z delcev zemlje, s čimer se poveča mobilnost in biodostopnost PAH, kar izboljša mikrobno razgradnjo (Gao in sod., 2015; Liu in sod., 2016).

Nizkomolekularne organske in huminske kisline lahko vplivajo na migracije, transformacije in biodostopnost težkih kovin z ionsko izmenjavo, površinsko adsorpcijo in tvorbo kompleksov (Liu in sod., 2016). Krishnamurti in sod. (1997) so proučevali kinetiko sproščanja kadmija v zemlji pod vplivom nizkomolekularnih organskih in huminskih kislin in ugotovili, da slednje tvorijo komplekse s kadmijem in na ta način povečajo njegovo topnost, mobilnost in biodostopnost.

4.1.4 Mikrobna aktivnost

Na uspešnost bioremediacije PAH in težkih kovin vpliva struktura mikrobne skupnosti in njihova aktivnost. Soobstoj obeh onesnaževal dolgoročno vodi v drugačno strukturo mikrobne skupnosti.

Z analizo DNK, izolirane iz zemlje nekdanjih MGP mest, so Thavamani in sod. (2012) potrdili prisotnost raznolikih mikrobnih skupnosti. Raznolikost je bila odvisna od koncentracije PAH in težkih kovin. Prisotnost težkih kovin v zemlji, onesnaženi s PAH, je dokazano predstavljala stresni dejavnik in je bila toksična za mikrobne populacije. Te so se bile zato prisiljene prilagoditi, kar je povzročilo nastanek novih mikrobnih skupnosti.

Primarni genetski mehanizem za prilagoditev mikroorganizmov je pomnoževanje genov, katerih produkti so vključeni v metabolizem kontaminantov, s selektivno obogatitvijo genov in prenosom genov. DNK sevov, ki so sposobni bioremediacije PAH in težkih kovin, običajno vsebuje gene za odpornost ali gene za razgradnjo, ki jih lahko detektiramo. Ugotavljanje adaptacije mikroorganizmov je bilo namreč omogočeno z razvojem specifičnih DNK sond, s katerimi lahko odkrijemo gene, vključene v katabolne poti ogljikovodikov (Haritash in Kaushik, 2009). Goyal in Zylstra (1996) sta tako uspela molekularno klonirati gene za razgradnjo fenantrena in naftalena iz treh sevov *Comamonas testosteroni* in tako lokalizirala gene, ki kodirajo prva dva encima katabolne poti ogljikovodikov, to sta fenantren deoksigenaza in cis-fenantren dihidrodiol dehidrogenaza. Z nadaljnjim razvojem tehnologije, ki nam omogoča ugotavljanje novih genov, odgovornih za katabolizem drugih vrst ogljikovodikov, izolacijo specifične RNK in rekombinantne DNK tehnologije, lahko razvijemo nove seve mikroorganizmov z izboljšanim metabolizmom za razgradnjo PAH (Haritash in Kaushik, 2009).

4.1.5 Vpliv značaja onesnaževal

Lastnosti kot so struktura, topnost, koncentracija in adsorpcija PAH in težkih kovin vplivajo na njihovo biodostopnost. Nizka topnost in visoka adsorptivnost PAH na zemljo sta poglavitna dejavnika, ki omejujeta njihovo dostopnost mikroorganizmom. Površinsko aktivne snovi oziroma surfaktanti se pogosto uporabljajo za čiščenje PAH in težkih kovin. Uporaba surfaktantov lahko poveča topnost drugače hidrofobnim policikličnim aromatskim ogljikovodikom. Surfaktant tvori micle okoli raztopljenih PAH, ko koncentracija preseže kritično micelarno koncentracijo (Harayama, 1997). Bioremediacijo PAH lahko surfaktanti izboljšajo tudi z razprševanjem in emulgiranjem komponent ogljikovodikov ter povečanjem njihove mobilnosti. Biosurfaktanti so surfaktanti, ki jih proizvajajo številni mikroorganizmi, njihova uporaba postaja vse bolj zanimiva tudi za bioremediacijo onesnažene zemlje. Učinkovitost tovrstne uporabe surfaktantov so raziskovali že številni raziskovalci (Cameotra in Bollag, 2003).

Herman in sod. (1997) so proučevali učinke biofiltrir iz ramnolipidnih biosurfaktantov na biorazgradnjo ogljikovodikov, ujetih v in situ porozni matrici. Ugotovili so, da koncentracije biosurfaktantov, ki so višje od kritične micelarne koncentracije, predvsem povečajo mobilnost heksadekana, ujetega v zemlji in tako omogočijo fizično odstranjevanje onesnaževal. Koncentracije biosurfaktantov, ki so nižje od kritične micelarne koncentracije, pa pospešijo in situ mineralizacijo ujetih ogljikovodikov. Odgovor mikroorganizmov na dodane biosurfaktante je bil odvisen tudi od izbire bakterijskega izolata. Na bioremediacijo lahko vplivajo tudi same interakcije med biosurfaktanti in mikroorganizmi. Surfaktanti so lahko toksični za mikroorganizme ali služijo kot alternativni vir ogljika zanje. Poleg tega lahko inhibirajo razgradnjo ogljikovodikov tudi z združevanjem celic, ki onemogoči fizični kontakt med mikroorganizmi in ogljikovodiki.

Biosurfaktante lahko uporabljamo tudi za bioremediacijo težkih kovin, saj z njimi tvorijo komplekse, s čimer zmanjšujejo adhezijo med težkimi kovinami in zemljo (Hu in sod, 2011). Luna in sod. (2016) so tako raziskovali vpliv biosurfaktantov na bioremediacijo težkih kovin in uspeli z biosurfaktanti, proizvedeni s kvasovkami *Candyda sphaerica*, odstraniti 95 % železa (Fe), 90 % cink (Zn) in 79 % svinca (Pb) v onesnaženi zemlji.

5 MEHANIZMI BIOREMEDIACIJE ONESNAŽENJA S PAH IN TEŽKIMI KOVINAMI

Uspeh bioremediacije PAH in težkih kovin je odvisen od prisotnosti različnih kontaminantov in od interakcij med njimi. Težke kovine in interakcije med njimi lahko vplivajo na bioremediacijo, PAH in njihovi presnovki lahko vplivajo na bioremediacijo drugih PAH, prav tako PAH vplivajo na bioremediacijo težkih kovin in obratno.

5.1 VPLIV TEŽKIH KOVIN NA BIOREMEDIACIJO

Organizmi so se razvijali ob navzočnosti težkih kovin v okolju in nekatere od njih izkoristili v številnih ključnih življenjskih procesih. Kljub temu nekatere težke kovine ne doprinašajo organizmom nobene biološke prednosti in so toksične, kot na primer kadmij in svinec. Zaradi

podobne kemijske in fizikalne strukture med težkimi kovinami, so se neesencialne težke kovine sposobne vezati na različne ligande, ki drugače vežejo esencialne kovine. Tako se lahko kadmij veže na tiolne skupine celičnih makromolekul in zamenja cink v encimih, katerih kofaktor je cink, kot so karboksipeptidaze in metalotioneini. Razlike v občutljivosti na visoke koncentracije težkih kovin se pojavljajo med različnimi vrstami mikroorganizmov, sevi iste vrste in celo med različnimi aktivnostmi mikroorganizmov iste vrste. Zaradi stresnih pogojev ob prisotnosti previsokih koncentracij težkih kovin je izkoristek mikrobnega substrata manjši. Mehanizmi odpornosti na težke kovine namreč zahtevajo dodatno porabo energije, kar vodi v zmanjšanje deleža substrata, namenjenega za rast mikroorganizmov (Giller in sod., 1998; Howlett and Avery, 1997; Gauthier in sod., 2014).

Težke kovine imajo raznolik vpliv na biološke funkcije v zemlji. Vplivajo na primer na velikost, aktivnost in raznovrstnost mikrobnih populacij ter na aktivnost encimov, vključenih v metabolizem ogljika, dušika, fosforja in žvepla. Encimske reakcije lahko inhibirajo na več načinov. Težke kovine lahko tvorijo komplekse s substratom, lahko se vežejo na aktivne domene encima ali reagirajo s kompleksom encim-substrat, vplivajo na izražanje genov, ki kodirajo encime ali povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin, kar vodi v oksidacijo encimov (Gao in sod., 2009, Dalle Donne in sod., 2003). Poleg inhibicije vitalnih encimskih funkcij lahko težke kovine delujejo kot redoks katalisti produkcije reaktivnih kisikovih spojin, porušijo ionsko ravnovesje z adhezijo na površino celic in vstopom preko difuzije, ionskih kanalčkov ali prenašalcev, ali pa direktno vplivajo na nastajanje DNK in proteinskih kompleksov (Gauthier in sod., 2014; Chen in sod., 2014).

Citotoksičnost reaktivnih kisikovih spojin, kot sta $O_2^{\bullet-}$ in $\cdot OH$, se odraža v peroksidaciji lipidov in oksidaciji encimov. Oksidirane membrane so manj fluidne in posledično manj permeabilne, kar vodi v prekinitev ionske homeostaze. Ob oksidaciji lipidnih membran nastajajo toksični nenasičeni aldehidi, ki lahko poškodujejo proteine in DNK. Celice se branijo pred oksidativnim stresom s pomočjo encimov, kot so katalaze ter superoksid dismutaze in s pomočjo glutationskega (GSH) sistema. Slednji sistem sestavljajo reduciran glutation (GSH), glutation S-transferaza (GST), oksidiran glutation (GSSG) in glutation reduktaza (GR) (Gauthier in sod., 2014).

Glavni mehanizem toksičnosti bakra in kadmija in nekaterih drugih prehodnih kovin je povzročanje neravnovesja v celičnih in organelnih membranah, kar vodi v okvare membranskih funkcij in izgubo učinkovitosti membran. Težke kovine, kot sta baker in nikelj, lahko katalizirajo Fentonovo ali Haber-Weissovo reakcijo in podobne kovinsko katalizirane redoks reakcije, pri čemer nastajajo reaktivne kisikove spojine (ROS). V teh reakcijah težke kovine delujejo kot topni prenašalci elektronov (donorji ali akceptorji), ROS pa povzročajo hude poškodbe citoplazemskih molekul, DNK, lipidov in drugih proteinov (Di Giulio in Meyer, 2008; Gadd, 1993).

Mehanizmi odpornosti na težke kovine bakterij in gliv so zelo različni in vključujejo vezavo težkih kovin na proteine, zunajcelične polimere ali na celično steno, porazdelitev težkih kovin znotraj celic, encimsko pretvorbo kovin (z oksidacijo, redukcijo, metilacijo ali demetilacijo) v manj toksične produkte, nastajanje netopnih kovinskih sulfidov, zmanjšan prevzem iz okolja ali povečan transport iz celice ali pretvorbo težkih kovin v plinasto stanje (problematiko so sistematično povzeli: Gadd in Griffiths, 1978; Gadd, 1990; Ross, 1993).

Za ohranitev homeostaze morajo mikroorganizmi nadzorovati znotrajcelično vsebnost ionov težkih kovin. P tipi adenozin trifosfataz oziroma krajše ATPaz so skupina proteinov, vpletenih v transport težkih kovin zunaj celične membrane. Tak transport prokariontom omogoča odpornost na težke kovine, kot so cink, kadmij, svinec, baker, srebro, arzen in antimon (Rensing in sod., 1999). Drugi pogost mehanizem odpornosti je bioakumulacija težkih kovin v celici s pomočjo proteinov, ki imajo sposobnost vezave težkih kovin, to so metalotioneini. Ti proteini so nizkomolekularni in vsebujejo cisteine, ki s svojimi tiolnimi skupinami tvorijo komplekse s težkimi kovinami kot so kadmij, svinec, cink in baker. Na ta način jih imobilizirajo, s čimer zaščitijo metabolne procese, katalizirane z encimi (Blindauer in sod., 2002). Mikroorganizmi se lahko zaščitijo pred toksičnimi učinki težkih kovin tudi s spremembo morfologije. Chakravarty in Banerjee (2008) sta opazila največje spremembe v velikosti bakterij *Acidiphilium symbioticum* H8, ko so bile izpostavljene bakru in kadmiju v koncentracijah pod inhibitorno vrednostjo. Bakterije z značilno obliko bacilov z ohlapnimi stiki so ob prisotnosti kadmija oblikovale verige in postale kokoidne ter lentikularne oblike, baker pa je povzročil njihovo preoblikovanje v okroglo obliko. Celice so se združevale v agregate ob navzočnosti niklja, ob cinku pa ni prišlo do vidne spremembe morfologije.

Pigmentirane bakterije prevladujejo v stresnih okoljih, kjer so na primer visoke koncentracije organskih onesnaževal, težkih kovin ali soli. Bakterijska sinteza sideroforov kot odgovor na stres zaradi kadmija, cinka in bakra, je odgovorna za zmanjševanje toksičnosti omenjenih težkih kovin. Siderofori tvorijo stabilne komplekse težkih kovin z ligandi in tako omejujejo njihovo mobilnost. To se je izkazalo za zelo pomembno strategijo izločanja toksičnih težkih kovin (Naik in Dubey, 2003). Dimpka in sod. (2008) so pokazali, da se je sinteza sideroforov ob dodatku kadmija povečala in posledično se je akumulacija kadmija v celicah znižala, saj so bakterije izločale težke kovine s pospeševanjem njihove difuzije skozi porine in njihovega transporta iz celice.

5.2 VPLIV PAH ALI NJIHOVIH PRESNOVKOV NA BIOREMEDIACIJO PAH

PAH in njihovi metaboliti lahko vplivajo na bioremediacijo PAH. Izoliranih je bilo zelo malo mikroorganizmov, ki lahko rastejo na čistih kulturah PAH z visoko molekulsko maso (z več kot petimi obroči aromatskimi obroči). Kljub temu je bilo dokazano, da lahko mikroorganizmi razgradijo visokomolekularne PAH preko kometabolizma. Kometabolizem je definiran kot nespecifična encimska reakcija s substratom, ki tekmuje s strukturno podobnim primarnim substratom za vezavo na aktivno mesto encima. Mikroorganizmom omogoča izrabo težje razgradljivih, manj dostopnih PAH v prisotnosti lažje dostopnih PAH, kot vir energije in ogljika (Zhang in sod., 2006). Lep primer je kometabolizem benzo(a)pirena z bakterijo, ki raste na pirenu, ki so ga proučevali Boonchan in sod. (2000). Bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,010 in mikrobni konzorcij VUN 10,009 so uspevali tudi na gojišču s pirenom kot edinim energijskim virom in virom ogljika. Benzo(a)pirena niso bili sposobni uporabiti kot edinega vira ogljika, vendar so v prisotnosti obeh PAH uspeli mineralizirati tudi navedeni visokomolekularni PAH. Do znatne razgradnje in mikrobne rasti na pirenu, krizenu, benz(a)antracenu, benzo(a)pirenu in dibenz(a,h)antracenu je prišlo, ko so v enem gojišču združili glive *Penicillium janthinellum* VUO 10,201 in bakterije *S.maltophilia* VUN 10,010 in bakterijski konzorcij VUN 10,009. V 49 dneh so mikroorganizmi mešane kulture mineralizirali 25 % benzo(a)pirena v CO₂, v 100 dneh je odstotek razgrajenega benzo(a)pirena narasel na 53

%. Mešana kultura mikroorganizmov je bistveno bolje razgradila tudi druge visokomolekularne PAH in zmanjšala mutageni potencial PAH v zemlji.

Tudi metaboliti PAH lahko vplivajo na bioremediacijo PAH. Wen in sod. (2011) so opazili, da imata ftalna in salicilna kislina, ki sta metabolna intermediata pirena zaviralni učinek na razgradnjo PAH z glivo bele trehnobe *Pseudotrametes gibbosa*. Ravno nasproten učinek so zasledili Gong in sod. (2011), kjer sta ftalna in salicilna kislina izboljšali rezultat bioremediacije z mikroorganizmi v zemlji. Neskladje rezultatov je lahko posledica neprimernosti intermediatov za rast mikroorganizmov ali pa uporabe previsokih koncentracij metabolitov PAH. Z uporabo primernih koncentracij metabolitov pa lahko povečamo učinkovitost bioremediacije PAH.

5.3 VPLIV INTERAKCIJ MED PAH IN TEŽKIMI KOVINAMI NA BIOREMEDIACIJO

PAH in težke kovine so onesnaževala toksične narave, ki se pojavljajo skupaj v številnih onesnaženih okoljih po svetu. Mešanice obeh polutantov lahko delujejo sinergistično ali antagonistično na toksičnost in/ali na encimsko aktivnost mikroorganizmov, glede na njihov značaj in koncentracijo (Moreau in sod., 1999).

Zaradi prisotnosti težkih kovin lahko mikrobne skupnosti spreminjajo svojo velikost, rast in aktivnost, lahko se zmanjša dostopnost substrata za celično dihanje ali pa so podvržene akutni toksičnosti kovin. Težke kovine kot so kadmij, baker in živo srebro, so toksične tako za bakterije kot glive v zemlji. Imajo negativen učinek na lignolitične encime gliv trehnob, kar zavira bioremediacijo. Kadmij na primer dokazano vpliva na mikrobne aktivnosti, saj povzroča spremembe encimskih funkcij (npr. dehidrogenaze), produkcije ATP, mineralizacije ogljika in spremembe bakterijske skupnosti. Znanstveniki se tako strinjajo, da imajo lahko težke kovine negativen učinek na biorazgradnjo organskih snovi, kot so PAH, zaradi inhibicije encimskih aktivnosti vpletenih v bioremediacijo (Baltrons in sod., 2018; Baldrian in sod., 1996; Vig in sod., 2003).

Tudi PAH vplivajo na bioremediacijo težkih kovin. PAH lahko povzročajo spremembe lipidnih membran, povečajo njihovo fluidnost in spreminjajo transmembranski potencial (Sikkema in sod., 1994). Membranski potencial je ključnega pomena za biodostopnost težkih kovin, zato spremembe v fluidnosti membran neposredno spremenijo obseg prevzema težkih kovin (Kinraide, 2006). Obstajajo tudi drugi načini delovanja PAH in njihovih intermediatov na bioremediacijo težkih kovin.

5.3.1 Vpliv težkih kovin na bioremediacijo PAH

Težke kovine lahko vplivajo na razgradnjo PAH s spreminjanjem površinskih lastnosti mikroorganizmov ali s spreminjanjem njihove encimske aktivnosti (Liu in sod., 2017).

Površina celice ima pomembno vlogo pri interakciji mikroorganizmov z okoljem. Vezava na površino celice je običajno prvi korak pri prevzemanju in akumulaciji težkih kovin v mikroorganizmih. Težke kovine lahko vplivajo na mikrobno adsorpcijo PAH s spreminjanjem elektrokinetičnih lastnosti celične površine, še posebej pri mikroorganizmih z veliko površino. Ob prisotnosti ionov težkih kovin, negativno nabiti mikroorganizmi privlačijo kovinske

katione. Elektrostatske privlačne sile med površino mikroorganizmov in težkimi kovinami so mnogo močnejše od Van der Waalsovih interakcij med površino in PAH. Ko se koncentracija kovinskih kationov na površini mikroorganizmov zvišuje, površina postaja vse bolj električno nevtralna in manj hidrofilna, kar poveča adsorpcijo PAH (Collins in Stotzky, 1991; Yan in Viraraghavan, 2003; Weissenfels in sod., 1992).

Obuekwe in Semple (2013) sta preučevala vpliv cinka, bakra, aluminija in železa na porazdelitev in biodostopnost fenantrena v zemlji. Prisotnost visokih koncentracij bakra in aluminija je vplivala na dostopnost, možnost ekstrakcije in obstojnost fenantrena. Pri najvišjih dodanih koncentracijah kovin je bilo pri vzorcu z visokimi koncentracijami aluminija in bakra v zemlji največ nerazgrajenega fenantrena v primerjavi z vzorci zemlje z drugimi kovinami. Baker in aluminij imata največjo jakost vezanja na organske in mineralne delce zemlje in se na njih močno adsorbirata, s čimer preprečita dostop fenantrena na adsorpcijska mesta mikroorganizmov.

Težke kovine in PAH lahko sodelujejo v nekovalentnih kationskih π interakcijah, saj simetrija aromatskih obročev omogoča, da se elektroni p-orbital vodikovih atomov porazdelijo med šest vodikovih atomov obroča. To omogoča drugače nepolarnim aromatskih obročem (kot so PAH) interakcije s kationi, kar poveča mikrobnno adsorpcijo PAH (Gauthier in sod., 2014).

Težke kovine so toksične za mikroorganizme tudi zaradi njihovega vpliva na encimsko aktivnost. Toksični kationi težkih kovin se lahko vežejo na encime in tako zasedejo mesta fiziološko pomembnim kationom (na primer kadmij zamenja cink), kar onesposobi encim. Podobno lahko kovinski oksoanioni, kot je arzenik, zamenjajo ključne oksoanione, kot je fosfat (Kachur in sod., 1998). Pogosto ioni težkih kovin, še posebej tisti z visokim atomskim številom, kot so živo srebro (Hg^{2+}), kadmij (Cd^{2+}) in srebro (Ag^+), delujejo toksično zaradi vezave na tiolne skupine encimov, ki sodelujejo v celičnem metabolizmu. Minimalna inhibitorna koncentracija teh kovinskih ionov je pri *Escherichia coli* neposredno povezana z disociacijsko konstanto ustreznih sulfidov (Nies, 1999). Ioni težkih kovin lahko zavirajo bioremediacijo PAH preko interakcije z encimi, ki so vpleteni v splošni metabolizem ali z encimi, ki sodelujejo pri metabolizmu PAH (Angle in Chaney 1989). Ker težke kovine lahko delujejo kot katalizatorji redoks reakcij v produkciji reaktivnih kisikovih spojin, lahko onesposobijo encime z oksidacijo, pri čemer nastajajo karbonilni adukti. Oksidacija povzročena z ROS lahko vodi v poškodbe membrane in sproži odgovor antioksidantnih encimskih sistemov (Dalle Donne in sod. 2003; Ke in sod., 2010).

Maslin in Maier (2000) sta s poskusi z izvornimi mikrobnimi skupnostmi iz puščavske zemlje raziskovala vpliv kadmija na bioremediacijo fenantrena tekom 9 dni. Rezultati so pokazali 5 dni zaostanka v razgradnji fenantrena zaradi podaljšanja lag faze pred mineralizacijo in slabšo biorazgradnjo v prisotnosti 8,9 in 18 μM raztopin kadmija in popolno inhibicijo pri 27 μM raztopini kadmija. Najnižja koncentracija biodostopnega kadmija, ki je povzročila popolno inhibicijo bioremediacije, 27 μM , ustreza 394 mg/kg dodanega kadmija. Omenjeni rezultati raziskave nakazujejo, da inhibicija bioremediacije PAH narašča z naraščanjem koncentracije prisotnih biodostopnih težkih kovin, vendar to ne drži vedno. V raziskavah je bilo opaženih več vzorcev vpliva. Majhne koncentracije težkih kovin lahko povečajo učinkovitost bioremediacije, višje koncentracije delujejo zaviralno ali pa imajo manjše koncentracije težkih kovin močnejši zaviralni učinek kot višje. Pri mnogih raziskavah so nižje koncentracije težkih

kovin izboljšale bioremediacijo, dokler ni bil dosežen maksimalni prag stimulacije, nato pa se je toksični vpliv težkih kovin povečeval z naraščanjem koncentracije. Večina tovrstnih raziskav je spremljala odziv mikrobnih skupnosti in ne samo enega izolata, zato je opazovan vzorec najverjetneje posledica različne toksičnosti težkih kovin za posamezne mikrobnе populacije. Ob določeni koncentraciji težkih kovin pride do inhibicije aktivnosti nekaterih bolj občutljivih mikrobnih populacij, kar zmanjša kompeticijo za hranila, ki jih potrebujejo za nas zanimivi odporni mikroorganizmi (Sandrin in Maier, 2003).

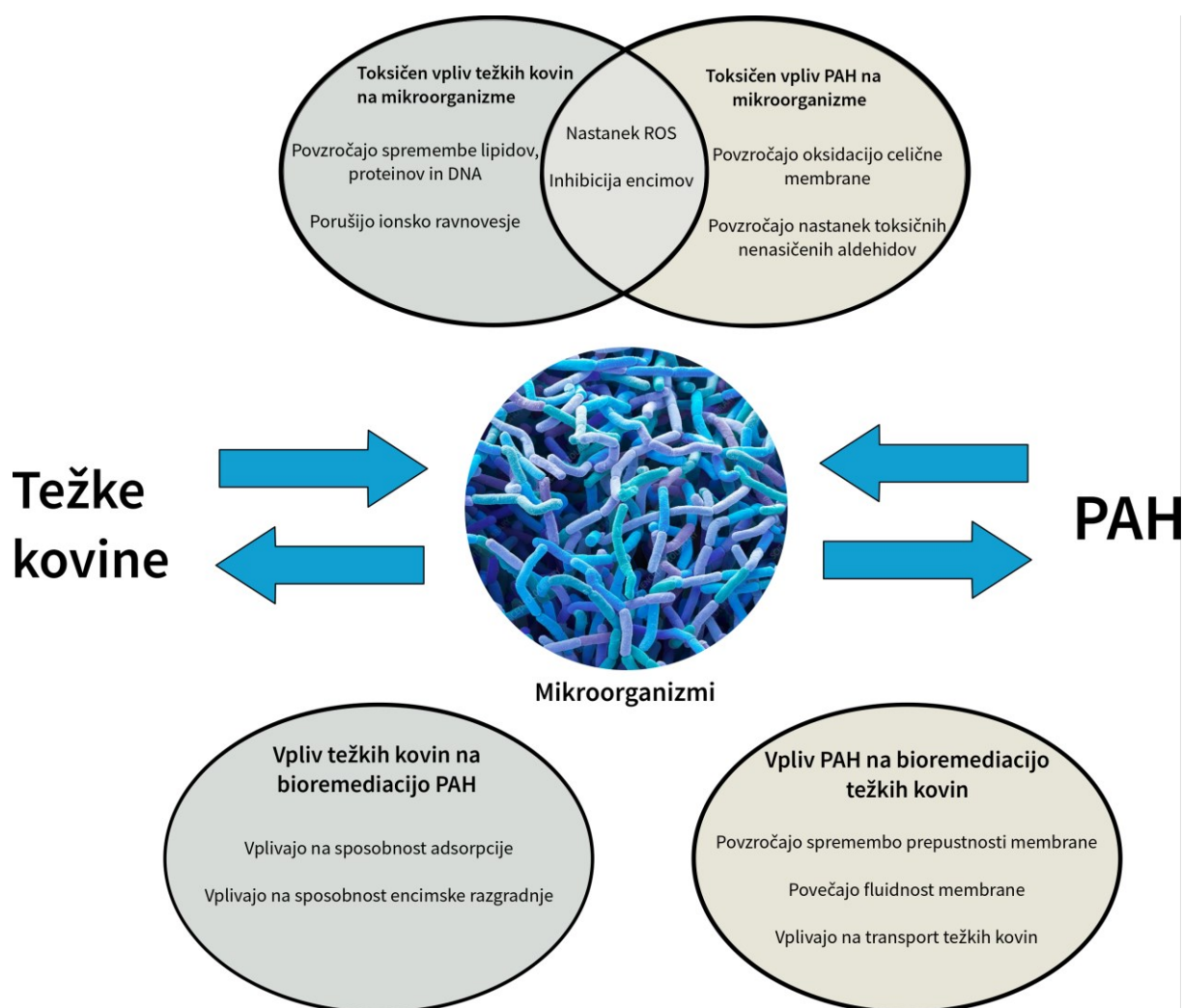
Druge raziskave so pokazale, da nizke koncentracije težkih kovin zavirajo mikrobnо aktivnost dokler ne dosežejo maksimalnega nivoja inhibicije, nato se njihova toksičnost z naraščanjem koncentracije zmanjšuje. Tak odziv na težke kovine lahko pojasnimo z dinamiko skupnosti mikroorganizmov, kjer visoke koncentracije težkih kovin vzpostavijo selekcijski pritisk, ki favorizira rast odpornih mikroorganizmov, ki lahko razgrajujejo PAH. Tovrstna selekcija lahko zmanjša kompeticijo občutljivih mikroorganizmov in izboljša bioremediacijo pri visokih koncentracijah težkih kovin (Sandrin in Maier, 2003). Enak vzorec odziva pa so zasledili Sandrin in sod. (2000) tudi pri raziskavi s čisto kulturo *Burkholderia sp.*, kjer je kadmij v naraščajočih koncentracijah 1-50 mg/l vse bolj inhibiral biorazgradnjo naftalena, pri najvišji uporabljeni koncentraciji 100 mg/l pa se je inhibicija zmanjšala. Razlog za tak učinek je lahko zmanjšan prevzem kadmija pri visokih koncentracijah. Prav tako je možno, da visoke koncentracije težkih kovin hitreje inducirajo mehanizme odpornosti, pomembne za zmanjševanje toksičnih učinkov kadmija, kot nizke koncentracije.

5.3.2 Vpliv PAH na bioremediacijo težkih kovin

Tudi PAH lahko vplivajo na bioremediacijo težkih kovin. Na prevzem težkih kovin močno vplivajo škodljivi učinki PAH na membrane. Transport težkih kovin preprečuje predvsem njihova nizka topnost v lipidih, ki sestavljajo celične membrane. Pretok kovin je reguliran s transmembranskim električnim potencialom, ki inhibira adsorpcijo kationov in omogoča delovanje številnih receptorjev kovinskih ionov ter proteinskih kanalčkov (Bhattacharya, 2005). Posledično imajo spremembe v strukturi membrane, ki jih povzročajo PAH, vpliv na biodostopnost težkih kovin. PAH povečajo fluidnost membrane in tako deregulirajo pretok vodikovih protonov čez membrano, kar povzroči spremembe v pH gradientu in transmembranskemu potencialu (Sikkema in sod., 1994).

PAH lahko vplivajo na delovanje encimov s povzročanjem akumulacije reaktivnih kisikovih spojin in tako zavirajo ionsko regulacijo. Izsledki mnogih raziskav nakazujejo, da PAH lahko povečajo ali zmanjšajo aktivnost ATPaz P-tipa in tako vplivajo na transport težkih kovin (Sikkema in sod., 1995; Gauthier in sod., 2014).

Poleg tega obstaja možnost, da interakcije med težkimi kovinami in fosfolipidi povzročajo nastanek kationskih π vezi med PAH in kovinami v bližini lipidnih membran. Izsledki raziskav Zhang in sod. (2010) so pokazali, da je dodatek manjših količin fenantrena rahlo zmanjšal adsorpcijo svinca (Pb²⁺), medtem ko so jo primerno višje količine fenantrena izboljšale. Poleg tega je dodajanje samega fenantrena povzročilo večje zaviranje adsorpcije svinca kot v primeru hkratnega dodajanja fenantrena in svinca. Ti rezultati nakazujejo na nastanek različnih kationskih π vezi glede na postopek dodajanja ter pri različnih količinah dodanega fenantrena.



Slika 1. Mehanizmi vpliva težkih kovin in PAH na mikroorganizme (Liu in sod., 2017; Gschmeissner, 2019)

6 ZAKLJUČEK

Na bioremediacijo okolja, onesnaženega s PAH in težkimi kovinami, lahko vplivajo številni raznoliki dejavniki. Uspešnost metode zavisi od zastopanosti in količine onesnaževal, prilagojenosti in raznolikosti prisotnih mikrobnih populacij, okoljskih dejavnikov, interakcij med onesnaževali ter drugih faktorjev. Glavne omejitve bioremediacije predstavljajo slaba biodostopnost onesnaževal, redki primerni mikroorganizmi, ki lahko učinkovito metabolizirajo polutante, slabi pogoji za rast le teh ter negativne interakcije med onesnaževali. Za izboljšanje učinkovitosti čiščenje okolja so potrebne nadaljnje raziskave z namenom boljšega razumevanja mehanizmov interakcij med PAH in težkimi kovinami, ki znatno vplivajo na njihovo toksičnost. Zaželjene so tudi raziskave, katerih namen je odkriti način za povečanje biodostopnosti onesnaževal ter razvoj in uporaba novih tehnologij za povečanje odpornosti in robustnosti mikroorganizmov sposobnih remediacije.

7 VIRI

- Angle J.S., Chaney R.L. 1989. Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2101-2104
- Antizar-Ladislao B., Lopez-Real J., Beck A.J. 2006. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aged coal-tar contaminated soil under in-vessel composting conditions. *Environmental Pollution*, 141: 459-468
- Antizar-Ladislao B., Beck A. J., Spanova K., Lopez-Real J., Russell N. J. 2007. The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *Journal of Hazardous Materials*, 144, 1-2: 340-347
- Baltrons O., López-Mesas M., Vilaseca M., Gutiérrez-Bouzán C., Le Derf F., Portet-Koltalo F., Palet C. 2018. Influence of a mixture of metals on PAHs biodegradation processes in soils. *Science of the Total Environment*, 628-629: 150-158
- Baldrian P., Gabriel J., Nerud F. 1996. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiologica*, 41: 363-367
- Bamforth S. M., Singleton I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80, 7: 723-736
- Bhattacharya P.K. 2005. Alkali and alkaline earth metals ions in biochemical systems. V: *Metal ions in biochemistry*. Harrow, Alpha Science International Ltd., UK: 66-85
- Blindauer C.A., Harrison M.D., Robinson A.K., Parkinson J.A., Bowness P.W., Sadler P.J., Robinson N.J. 2002. Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like fingers. *Molecular Microbiology*, 45: 1421-1432
- Boonchan S., Britz M. L. and Stanley G. A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3: 1007-1019
- Cameotra S. S., Bollag J.-M. 2003. Biosurfactant-Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 33, 2: 111-126
- Chaturvedi A.D., Pal D., Penta S., Kumar A. 2015. Ecotoxic heavy metals transformation by bacteria and fungi in aquatic ecosystem. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 1595-1603
- Chen S., Yin H., Ye J., Peng H., Liu Z., Dang Z., Chang J. 2014. Influence of coexisted benzo[a]pyrene and copper on the cellular characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* during biodegradation and transformation. *Bioresource Technology*, 158: 181-187

- Chen M., Xu P., Zeng G., Yang C., Huang D., Zhang J. 2015. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33, 6: 745-755
- Collins YE, Stotzky G. 1992. Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1592–1600
- Dalle Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329: 23-38
- Delaune R.D., Mulbah C., Devai I., Lindau C.W. 1998. Effect of chromium and lead on degradation of South Louisiana crude oil in sediment. *Journal of Environmental Science and Health, A*, 33: 527-546
- Di Giulio R.T., Hinton D.E. 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress, v The toxicology of fishes. Di Giulio R.T. (ur.). New York, CRC: 273-324
- Dimkpa C.O., Svatoš A., Dabrowska P., Schmidt A., Boland W., Kothe E. 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces spp.* *Chemosphere*, 74: 19-25
- Gadd G. M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist Trust*, 124: 25-60
- Gadd G. M., Griffiths A. J. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4: 303-317
- Gao Y., Yuan X., Lin X., Sun B., Zhao Z. 2015. Low-molecular-weight organic acids enhance the release of bound PAH residues in soils. *Soil and Tillage Research*, 145: 103-110
- Gao Y., Zhou P., Mao L., Zhi Y., Shi W. 2009. Assessment of effects of heavy metals combined pollution on soil enzyme activities and microbial community structure: modified ecological dose–response model and PCR-RAPD. *Environmental Earth Sciences*, 60, 3: 603-612
- Gauthier P. T., Norwood W. P., Prepas E. E., Pyle G. G. 2014. Metal–PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquatic Toxicology*, 154: 253-269
- Giller K. E., Witter E., Mcgrath S. P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10-11: 1389-1414
- Goyal A.K., Zylstra G.J. 1996. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ 39, *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 230-236

- Gupta H., Gupta B. 2015. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on banana peel activated carbon. *Desalination and Water Treatment*, 57, 20: 9498-9509
- Gschmeissner S. 2019. Soil bacteria, SEM. London, Science photo library.
<https://www.sciencephoto.com/media/903820/view/soil-bacteria-sem> (17. maj 2019)
- Harayama S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 3: 268-273
- Haritash A. K., Kaushik C. P. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1-3: 1-15
- Herman D.C., Zhang Y., Miller R.M. 1997. Rhamnolipid (biosurfactant) effects on cell aggregation and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3622-3627
- Hoffman D. R., Okon J. L., Sandrin T. R. 2005. Medium composition affects the degree and pattern of cadmium inhibition of naphthalene biodegradation. *Chemosphere*, 59, 7: 919-927
- Howlett N.G., Avery S.V. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid un-saturation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2971-2976
- Hu X.J., Wang J.S., Liu Y.G., Li X., Zeng G.M., Bao Z.L., Zeng X.X., Chen A.W. 2011. Adsorption of chromium (VI) by ethylenediamine-modified cross-linked magnetic chitosan resin: isotherms, kinetics and thermodynamics. *Journal of Hazardous Materials*, 185: 306-314
- Kachur A.V., Koch C.J., Biaglow J.E. 1998. Mechanism of coppercatalyzed oxidation of glutathione. *Free Radical Research*, 28: 259-269
- Ke L., Luo L., Wang P., Luan T., Tam N.F.-Y. 2010. Effects of metals on biosorption and biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by a freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*. *Bioresource Technology*, 101: 6950-6961
- Kim K.-H., Jahan S. A., Kabir E., Brown R. J. C. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60: 71-80
- Kinraide T.B. 2006. Plasma membrane surface potential (PM) as a determinant of ion bioavailability: a critical analysis of new and published toxicological studies and a simplified method for the computation of plant PM. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25: 3188-3198
- Krishnamurti G.S.R., Cieslinski G., Huang P.M., Van Rees K.C.J. 1997. Kinetics of cadmium release from soils as influenced by organic acids: implication in cadmium availability. *Journal of Environmental Quality*, 26-27: 1-7

- Naik M. M., Dubey S. K. 2013. Lead resistant bacteria: Lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 1-7
- Li H., Zhang X., Liu X., Hu X., Wang Q., Hou Y., Chen Xi., Chen Xu. 2016. Effect of rhizodeposition on alterations of soil structure and microbial community in pyrene-lead co-contaminated soils. *Environmental Earth Sciences*, 75, 2: 1-8
- Liu S.H., Zeng G.M., Niu Q.Y., Liu Y., Zhou L., Jiang L.H., Tan X.F., Xu P., Zhang C., Cheng M. 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresource Technology*, 224: 25-33
- Lu M., Zhang Z.-Z., Wang J.-X., Zhang M., Xu Y.X., Wu X.J. 2014. Interaction of Heavy Metals and Pyrene on Their Fates in Soil and Tall Fescue (*Festuca arundinacea*). *Environmental Science & Technology*, 48, 2: 1158-1165
- Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A. 2016. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Safety and Environment Protection*, 102: 558-566
- Mani D., Kumar C. 2013. Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11, 3: 843-872
- Maslin P., Maier R. M. 2000. Rhamnolipid-Enhanced Mineralization of Phenanthrene in Organic-Metal Co-Contaminated Soils. *Bioremediation Journal*, 4, 4: 295-308
- Moreau C.J., Klerks P.L., Haas C.N. 1999. Interaction between phenanthrene and zinc in their toxicity to the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 2: 251-257
- Nies D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 6: 730-750
- Obuekwe I. S., & Semple K. T. 2013. Impact of Zn, Cu, Al and Fe on the partitioning and bioaccessibility of 14C-phenanthrene in soil. *Environmental Pollution*, 180: 180-189
- Park J. H., Lamb D., Paneerselvam P., Choppala G., Bolan N., Chung J.W. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 2-3: 549-574
- Rasmussen L.D., Sorenson S.J., Turner R.R., Barkay T. 2000. Application of a merlux biosensor for estimating bioavailable mercury in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 5: 639-649
- Rensing C., Ghosh M., Rosen B.P. 1999. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *Journal of Bacteriology*, 181: 5891-5897

- Ross I. S. 1993. Membrane transport processes and response to heavy metals. V: Stress tolerance of fungi. Jennings D. H. (ur.). New York, Marcel Dekker: 97-125
- Roy S., Labelle S., Mehta P., Mihoc A., Fortin N., Masson C., Leblanc R., Châteauneuf G., Sura C., Gallipeau S., Olsen C., Delisle S., Labrecque M., Greer C. W. 2005. Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. *Plant and Soil*, 272, 1-2: 277-290
- Sandrin TR, Chech AM, Maier RM. 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during biodegradation of naphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4585-4588
- Sandrin T.R., Maier R.M. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 111: 1093-1101
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Biological Chemistry*, 269: 8022-8028
- Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59: 201-222
- Tang Y. J., Qi L., Krieger-Brockett B. 2005. Evaluating factors that influence microbial phenanthrene biodegradation rates by regression with categorical variables. *Chemosphere*, 59, 5: 729-741
- Tao Y., Xue B., Yang Z., Yao S., Li S. 2014. Effects of Heavy Metals on the Sorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Environmental Quality*, 43: 1953-1962
- Thavamani P., Megharaj M., Naidu R. 2011. Multivariate analysis of mixed contaminants (PAHs and heavy metals) at manufactured gas plant site soils. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184, 6: 3875-3885
- Thavamani P., Megharaj M., Naidu R. 2013. Metal-tolerant PAH-degrading bacteria: development of suitable test medium and effect of cadmium and its availability on PAH biodegradation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 12: 8957-8968
- Vidali M. 2001. Bioremediation - an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 7: 1163-1172
- Vig K., Megharaj M., Sethunathan N., Naidu R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: a review. *Advances in Environmental Research*, 8: 121-135
- Weissenfels W.D., Klewer H.J., Langhoff J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 689-696

- Wen J., Gao D., Zhang B., Liang H. 2011. Co-metabolic degradation of pyrene by indigenous white-rot fungus *Pseudotrametes gibbosa* from the northeast China. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 600-604
- Wu G., Kang H., Zhang X., Shao H., Chu L., Ruan C. 2010. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, 174: 1-3: 1-8
- Yan G., Viraraghavan T. 2003. Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*, 37, 18: 4486-4496
- Zhang W.H., Cao J., Huang H., Zhang R.D. 2010. Effect of coexisting lead and phenanthrene on their individual sorption on a clayish soil. *Soil and Sediment Contamination*, 19: 1-16
- Zhang W., Zheng J., Zheng P., Tsang D.C., Qiu R. 2015. The roles of humic substances in the interactions of phenanthrene and heavy metals on the bentonite surface. *Journal of Soils and Sediments*, 15: 1463-1472
- Zhang X. X., Cheng S.-P., Zhu C. J., Sun S. L. 2006. Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere*, 16: 555-556