

Wojciech Kępka, Jacek Antonkiewicz, Agnieszka Baran

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

WYKORZYSTANIE BATERII BIOTESTÓW W OCENIE TOKSYCZNOŚCI GLEBY ZANIECZYSZCZONEJ BENZYNĄ PO PRZEPROWADZENIU REMEDIACJI

Streszczenie

Pochodne ropy naftowej stanowią grupę zanieczyszczeń organicznych najliczniej występujących w środowisku glebowym. Są to przede wszystkim węglowodory o różnej budowie chemicznej i zróżnicowanych parametrach fizycznych. Produkty naftowe stanowią więc rosnący problem ekologiczny ze względu na możliwość modyfikacji naturalnej aktywności biologicznej oraz właściwości chemicznych i fizycznych zanieczyszczonych gleb. Dzięki szybkiemu rozwojowi technik oczyszczania wód i gruntów udaje się ograniczyć ich toksyczność w środowisku. Najczęściej wykorzystywane technologie oparte są na metodach biologicznych.

Określenie zanieczyszczeni próbek środowiskowych może przebiegać na drodze analizy laboratoryjnej, jednak nie dostarcza ona pełnych informacji na temat bezpośredniej toksyczności na organizmy żywe. Znajac wymagania życiowe organizmów, można potraktować je jako biowskaźniki, przy czym ich autekologia, rozwój osobniczy i dynamika populacji muszą być dobrze poznane.

Słowa kluczowe: biotesty, bioremediacji, zanieczyszczenia środowiska, dżdżownice

Wstęp

Dynamicznie postępująca industrializacja oraz intensywny rozwój światowej gospodarki sprawiają, że człowiek coraz bardziej przyczynia się do niekorzystnych zmian w środowisku, często nieodwracalnych. Skutkiem nieracjonalnego korzystania ze środowiska jest przedostawanie się rosnącej ilości zanieczyszczeń do wszystkich jego elementów. Postęp gospodarczy i rozwój technologiczny powodują wzrost zużycia produktów przemysłu petrochemicznego. Spedycja, magazynowanie, dystrybucja i użytkowanie stanowią jedną z najczęstszych przyczyn przedostawania się paliw do środowiska przyrodniczego [Klimiuk i Łebkowska 2003]. Stąd związki ropopochodne łatwo mogą przedostawać się do wód i gruntów wpływając toksycznie nie tylko na florę i produkcję roślinną, ale również na zdrowie zwierząt i ludzi. W skład ropy naftowej i jej pochodnych wchodzi głównie węglowodory alifatyczne i aromatyczne. Benzyna jako jedna z pochodnych w składnie zawiera przede wszystkim węglowodory alifatyczne o liczbie atomowej od 5 do 12 oraz niewielką ilość węglodorów nienasyconych i aromatycznych [Surygała 2000].

Ze względu na zagrożenie ekologiczne konieczne jest przeprowadzenie działań prowadzących do oczyszczenia terenów zanieczyszczonych. Alternatywą dla często bardzo inwazyjnych metod fizycznych i chemicznych oczyszczania gruntów jest stosowanie mikroorganizmów. W procesie biologicznego oczyszczania gruntów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi mikroorganizmy wykorzystują węglowodory w charakterze źródła węgla i energii [Kołwzan 2008]. Istnieje wiele grup mikroorganizmów glebowych – głównie bakterii i grzybów, które są zdolne do przekształcania węglowodorów w nietoksyczne związki, lub całkowicie je mineralizują do substancji prostych takich jak dwutlenek węgla i woda [Szlaski i Wojewódka 2003]. Bioremediacja koncentruje się na zwiększeniu wydajności istniejących lecz powolnych procesów samooczyszczania zachodzącego w gruncie. Zwiększenie liczebności wyspecjalizowanych mikroorganizmów w gruncie można osiągnąć w procesach biostymulacji i bioaugmentacji. Biostymulacja to wzbogacenie gleby w biogeny i regulacja parametrów chemiczo-fizycznych. Natomiast bioaugmentacja polega na wprowadzeniu specjalnie wyselekcjonowanych mikroorganizmów zdolnych do degradacji zanieczyszczeń [Kołwzan 2008]. Wykorzystuje się tę zdolność w redukcji toksyczności zanieczyszczeń między innymi ropopochodnych. Zastosowanie bioaugmentacji w procesie eliminacji zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi staje się jak najbardziej uzasadnione z kilku powodów. Przede wszystkim są to metody wykorzystujące naturalną biologiczną aktywność mikroorganizmów, a końcowe produkty wszystkich zachodzących przemian stanowią związki nietoksyczne dla środowiska. Ponadto bioaugmentacja nie wymaga aplikacji do środowiska przyrodniczego dodatkowych związków chemicznych, mogących wchodzić w interakcje czy akumulujących się w glebie.

Wyniki analizy próbek środowiskowych pozwalają określić stan badanego materiału, jednak nie pozwalają one na poznanie wszystkich występujących w środowisku zanieczyszczeń, często działających synergistycznie [Jasiewicz i in. 2010]. Dlatego istnieje konieczność rozwoju badań w zakresie nauk o środowisku, opierających się zarówno na analizie chemicznej jak i monitoringu biologicznego. Uzupełnieniem analityki chemicznej mogą stanowić żywe organizmy testowe i ich reakcja na zanieczyszczenie. Ważne jest, żeby grupa organizmów testowych zbudowana była z przedstawicieli wszystkich poziomów łańcucha troficznego, zarówno producentów, konsumentów jak i reducentów.

Celem badań było ocena toksyczności gleby zanieczyszczonej benzyną po przeprowadzeniu procesu bioremediacji przy użyciu baterii biotestów.

Materiał i metody badań

Proces oczyszczania gleby zanieczyszczonej benzyną prowadzono w warunkach laboratoryjnych na czterech obiektach w trzech równoległych powtórzeniach. Podłoże glebowe zwilżono wodą destylowaną do 60% maksymalnej pojemności wodnej i zanieczyszczono benzyną w ilości 1% wag. Degradację zanieczyszczenia wspomagano przez bioaugmentację drożdżami z gatunku *Yarrowia lipolytica* zastosowanych w ilości 1, 2 i 3% wag. (tab. 1). Tak przygotowane obiekty inkubowano przez 15 i 30 dni w temperaturze pokojowej utrzymując stały poziom wilgotności.

Tabela 3. Schemat zastosowanych dawek paliwa i drożdży w poszczególnych obiektach

Numer obiektu	Skład obiektu
1	Gleba + Paliwo (1%)
2	Gleba + Paliwo (1%) + Drożdże (1 %)
3	Gleba + Paliwo (1%) + Drożdże (2 %)
4	Gleba + Paliwo (1%) + Drożdże (3 %)

Toksyczność próbek glebowych badano przy wykorzystaniu 4 biotestów: Phytotoxkit, Ostracodtoxkit, Microtox oraz biotestu z wykorzystaniem dżdżownic *Eisenia fetida*. W pracy zostaną omówione wyniki z biotestu na dżdżownicach. Biotest z wykorzystaniem dżdżownic *Eisenia fetida* do oznaczania toksyczności ostrej, oparty jest na obserwacji przyrostu biomasy i śmiertelności dżdżownic. Badania prowadzono zgodnie z normą PN-ISO 11268-1:1997. Metoda ta wykorzystuje pobieranie związków przez skórę i przewód pokarmowy zwierząt. Śmiertelność i inhibicję przyrostu masy określono po 7 i 14 dniach od umieszczenia dorosłych osobników z dobrze wykształconym siodełkiem w podłożu hodowlanym zawierającym jednakową ilość benzyny i różne zawartości drożdży *Yarrowia lipolytica*. Wartość współczynnika śmiertelności po 7 i 14 dniach wyznaczono na podstawie zależności:

$$M_{7(14)} = \frac{L - L_{7(14)}}{L} \cdot 100[\%]$$

gdzie:

$M_{7(14)}$ – współczynnik śmiertelności po 7 lub 14 dniach [%],

L – liczba żywych dżdżownic w próbce kontrolnej gleby,

$L_{7(14)}$ – liczba żywych dżdżownic w glebie zanieczyszczonej po 7 lub 14 dniach.

Test oceny oddziaływania substancji toksycznych na śmiertelność organizmów przeprowadzono w polietylenowych pojemnikach, wypełnionych 1000 g badanego podłoża hodowlanego. Każda próba składała się z 10 dorosłych dżdżownic z gatunku *Eisenia fetida* z prawidłowo wykształconym siodełkiem. Próbę kontrolną stanowiła gleba zanieczyszczona benzyną bez dodatku drożdży. Wilgotność prób utrzymywano w przedziale 40-60% całkowitej pojemności wodnej. Podczas trwania testu dżdżownice dokarmiano przefermentowanym i rozdrobnionym obornikiem.

Wyniki badań

Wyniki zmian zootoksyczności gleby zanieczyszczonej benzyną poddanej remediacji poprzez bioaugmentację w czasie 7, 14 i 21 dni na dżdżownice z gatunku *Eisenia fetida* przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Śmiertelność dżdżownic w zależności od czasu inkubacji gleby

Obiekty	Współczynnik śmiertelności po 7 dniach inkubacji	SD(7)	Współczynnik śmiertelności po 14 dniach inkubacji	SD(14)	Współczynnik śmiertelności po 21 dniach inkubacji	SD(21)
G+P	100	0	57	1,04	30	5,63
G+P+D1%	100	0	40	1,86	33	1,46
G+P+D2%	100	0	17	3,96	10	4,38
G+P+D3%	100	0	23	1,04	30	2,70

Po pierwszych 7 dniach we wszystkich obiektach badawczych odnotowano 100% śmiertelność dżdżownic. W celu oceny, czy czas wpłynie na zmniejszenie śmiertelności dżdżownic, w obiektach badawczych kolejny raz umieszczono po 10 dorosłych osobników. Obserwacje i analiza liczebności populacji organizmów testowych po 14 dniach bioremediacji, dowiodła, że warunki bytowe dżdżownic *Eisenia fetida* nadal były niesprzyjające rozwojowi. Test toksyczności ostrej wykazał w obiektach badawczych 1 - 4 śmiertelność na poziomie odpowiednio: 57, 40, 17, 23%. Natomiast po upływie 21 dni remediacji odnotowano znaczne zmniejszenie się śmiertelności dżdżownic i w kolejnych obiektach wynosiła ona odpowiednio: 30, 33, 10, 30%.

Podsumowanie

Substancje ropopochodne są szczególnie niebezpieczne dla organizmów bezkręgowych, gdyż przez bezpośredni kontakt wnikają do ich jam i przewodów. Węglowodory wchodzące w skład związków naftowych odkładają się w tkance tłuszczowej, skąd przenikają do krwi gdzie wytrącają się w postaci kropli, uszkadzając narządy [Schaefer 2001]. Zastosowanie dżdżownic do oceny ekotoksyczności charakteryzuje się wieloma zaletami. Jest to konsekwencją roli, jaką pełnią te bezkręgowce w środowisku glebowym [Traczewska 2011].

W pracy przedstawiono niekorzystny wpływ benzyny na dżdżownice z gatunku *Eisenia fetida*. Toksyczne właściwości węglowodorów związane są z ich zdolnością do tworzenia wiązań z niepolarnymi składnikami błon biologicznych, co może przyczyniać się do ich dezintegracji. Zanieczyszczenia znajdujące się w obiektach badawczych mogły na różny sposób wpływać na organizmy testowe. Mogły przez tworzenie powłoki oblepiającej dżdżownicę uniemożliwiać im oddychanie, w wyniku czego zwierzęta te dusiły się. Prawdopodobne jest również to, że bezpośredni kontakt dżdżownic z niektórymi zanieczyszczeniami miał wpływ na dużą toksyczność [Małachowska i in. 2012].

Proces bioremediacji przyczynił się do znacznego ograniczenia toksyczności prób glebowych, test z wykorzystaniem dżdżownic *Eisenia fetida* były czułym wskaźnikiem tych zmian. Tak, więc istnieje duża szansa i możliwość wprowadzenia biotestów opartych na reakcji dżdżownic w ocenie efektywności bioremediacji.

Pismiennictwo

1. Jasiewicz Cz., Niemiec M., Baran A., 2010: Ochrona środowiska. Przewodnik do ćwiczeń. Wyd. Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.
2. Klimiuk E., Łebkowska M., 2003: Mikrobiologiczne oczyszczanie gruntów z produktów naftowych. Biotechnologia w ochronie środowiska. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa: 199-226.
3. Kołwzan B., 2008: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. Ochrona Środowiska, 30: 3-14.
4. Małachowska-Jutcz A., Janosz W., Rudek J., 2012: Toksyczność gleby zanieczyszczonej olejem silnikowym poddanej samooczyszczaniu oraz fitoremediacji. Ochrona Środowiska, 34: 15-20.
5. PN-ISO 11268-1:1997
6. Robak M., Boruszkowski T., Drożdż W., Lazar Z., Baranowska M., Prządło D., Steininger M., 2011: Zastosowanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem krezotowym. Ochrona Środowiska, 33: 27-33.
7. Schaefer M., 2001: Earthworms in crude oil contaminated soils: Toxicity tests and effects on crude oil degradation. Soil, Sediment and Water, 8: 35-37.
8. Surygała J., 2000: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej: 57-64.
9. Szlaski A., Wojewódka D., 2003: Bioremediacja gruntów z produktów ropopochodnych. Instalator: 52-53.
10. Traczewska T. M., 2001: Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej: 88-91.