

Małgorzata HAWROT-PAW, Małgorzata RYŁÓW

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ GLEBY ZANIECZYSZCZONEJ ANTRACENEM

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOIL CONTAMINATED WITH ANTHRACENE

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Juliusza Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, e-mail: Malgorzata.Hawrot-Paw@zut.edu.pl

Abstract. Paper presents study results upon evaluating the influence of anthracene on the numbers of the three main taxonomic groups of soil microflora. Variable factors in the experiment was a dose of hydrocarbon, temperature and incubation time. It was found that the largest group of microorganisms in the studied soil were bacteria, actinomycetes was considerably less and fungi. Microorganisms showed different sensitivity to the presence of anthracene, which depended on the dose, and the impact this has changed with time. On the basis of average values for the whole period of incubation was found that a significant effect on the number of bacteria was dose $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, for actinomyces, 100 and $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and for fungi $10\,000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Higher temperatures caused a rise in the number of bacteria and the limited development of the actinomycetes and fungi.

Słowa kluczowe: antracen, biologiczna aktywność, gleba, mikroorganizmy.

Key words: anthracene, biological activity, microorganisms, soil.

WSTĘP

Węglowodory ropopochodne należą do jednej z bardziej toksycznych grup ksenobiotyków obecnych w środowisku glebowym. Szczególnie niebezpieczne są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne ze względu na ich toksyczne, kancerogenne właściwości (Prince i Sambasivam 1993, Perera 1997). Mogą one pochodzić zarówno ze źródeł naturalnych, jak i antropogennych, czyli m.in. procesów przemysłowych. Węglowodory aromatyczne na ogół hamują wzrost mikroorganizmów, przy czym toksyczność tych substancji rośnie wraz ze zwiększaniem się ich masy cząsteczkowej (Neryng 1976). Istotną jest również konfiguracja benzenowych pierścieni, obecność i pozycja ich podstawników (Šepič i in. 1997). Badanie respiracji gleby, oznaczanie zawartości biomasy żywych organizmów, aktywności enzymatycznej czy też liczebności mikroorganizmów może dostarczyć informacji na temat intensywności, rodzaju oraz czasu oddziaływania zanieczyszczeń na biologiczną aktywność gleby (van Beelen i Doelman 1997, Brohon i in. 2001, Schloter i in. 2003, Eibes i in. 2006).

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu antracenu na liczebność wybranych mikroorganizmów glebowych. W badaniach zastosowano różne dawki węglowodoru i zmienne warunki temperatury.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w glebie piaszczystej (piasek gliniasty lekki pylasty). Materiał pobrano z głębokości 0–15 cm poziomu próchniczego. Glebę doprowadzono do 50% MPW (wilgotność tę utrzymywano przez cały okres doświadczenia) i pozostawiono na 7 dni w celu przywrócenia aktywności biologicznej. Materiał podzielono na trzy części, które skażono antracenenem w dawce 100, 1000 i 10 000 mg · kg⁻¹ s.m. gleby. Obiekt kontrolny stanowiła próba bez dodatku węglowodoru. Następnie glebę podzielono na trzy próby o wadze 300 g, które umieszczono w polietylenowych pojemnikach i inkubowano w zmiennych warunkach temperatury, odpowiednio w 5, 20 i 35°C.

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych przez cztery miesiące. Analizy wykonywano w dniu skażenia gleby węglowodorem, a następnie po 7, 14, 28, 56 oraz 112 dniach inkubacji. Analizy obejmowały określenie liczebności bakterii na podłożu agarowym z ekstraktem glebowym wg Bunta i Roviry (1955), grzybów na podłożu Martina (1950) i promieniowców na podłożu wg Cyganowa i Zukova (1964). Liczebność drobnoustrojów oznaczono, stosując płytkową metodę Kocha. Hodowle inkubowano w temperaturze pokojowej przez 7 dni. Wyniki przeliczono na 1 g s.m. gleby. Wszystkie oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

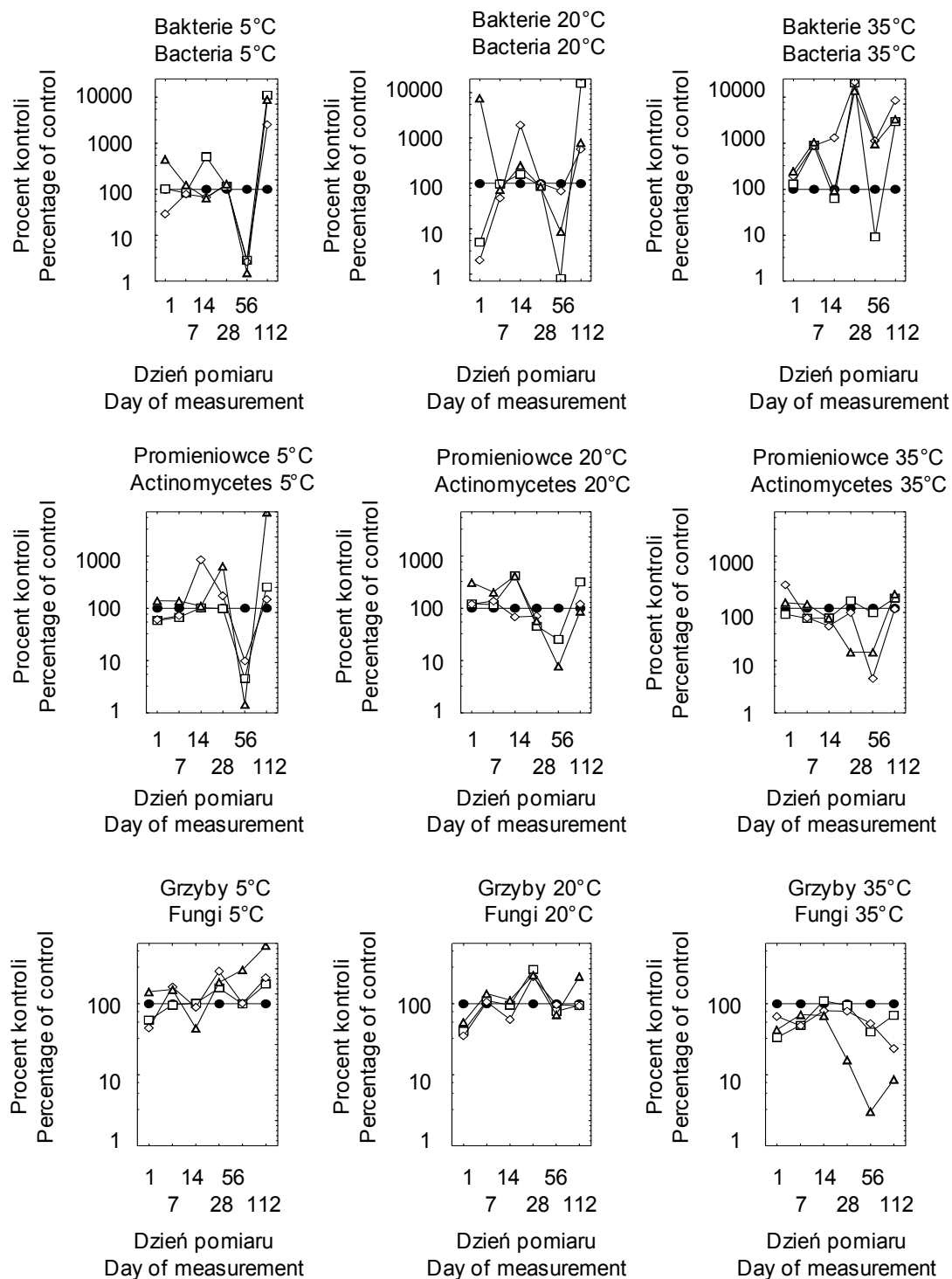
Wyniki badań poddano analizie statystycznej, stosując wieloczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya (poziom istotności $\alpha = 0,05$). Czynnikiem w analizie była dawka antracenu, temperatura oraz czas inkubacji.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że wpływ antracenu na ogólną liczebność bakterii, promieniowców i grzybów był zróżnicowany w zależności od jego dawki oraz warunków temperatury i zmieniał się wraz z upływem czasu (rys. 1).

Liczebność komórek bakterii w badanej glebie ulegała znacznym wahaniom podczas inkubacji. Zmiany te miały charakter zarówno stymulacji, jak i inhibicji rozwoju drobnoustrojów. Istotny wzrost liczebności powyżej wartości kontrolnych odnotowano przede wszystkim w temperaturze 35°C, jednak tylko dla dawki 1000 i 10 000 mg · kg⁻¹ s.m. gleby stymulujący wpływ antracenu utrzymywał się przez cały okres inkubacji.

Największe zmiany w liczebności promieniowców, niezależnie od temperatury, obserwowano między 7. i 56. dniem doświadczenia, zwłaszcza w odniesieniu do najwyższego stężenia skażenia. Zdecydowanie niekorzystny wpływ na wzrost tych mikroorganizmów miała dawka 1000 mg · kg⁻¹ s.m. gleby i temperatura 35°C. W tych warunkach, już między 7. a 56. dniem eksperymentu, liczebność promieniowców mieściła się w zakresie $3,03 \cdot 10^5$ – $3,83 \cdot 10^6$ jtk w 1 g s.m. gleby. W stosunku do próby kontrolnej redukcja liczebności osiągnęła więc poziom 1–95%.

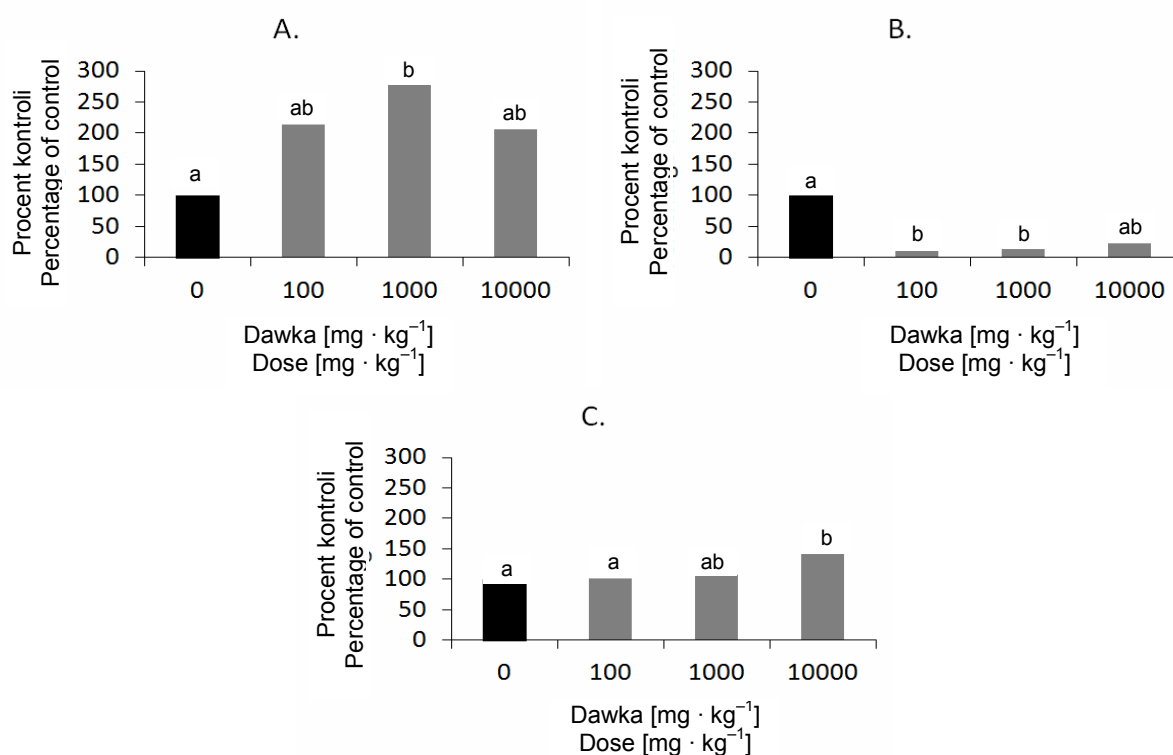


Rys. 1. Wpływ antracenu na liczebność bakterii, promieniowców i grzybów w zmiennych warunkach temperatury (—●— K, —□— $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, —◇— $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, —Δ— $10000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Fig. 1. Influence of anthracene on the number of bacteria, actinomycetes and fungi in the changing conditions of temperature (—●— K, —□— $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, —◇— $1.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, —Δ— $10.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Liczebność grzybów zmieniała się zależnie od warunków inkubacji. W niższych temperaturach liczba ich komórek ulegała na przemian zwiększeniu lub redukcji, przy czym w 20°C nie zaobserwowano istotnego związku pomiędzy wielkością zmian a zastosowaną dawką węglowodoru. Wyraźnie negatywną reakcję grzybów na obecność antracenu odnotowano w temperaturze 35°C, zwłaszcza przy jego najwyższej dawce (10 000 mg · kg⁻¹ s.m. gleby). Na ogół inhibicja zaobserwowana w dniu skażenia gleby węglowodorem utrzymywała się do końca doświadczenia. Zdecydowanie najbardziej niekorzystnie w tych warunkach oddziaływała najwyższa dawka antracenu.

Biorąc pod uwagę średnie wartości z całego okresu ekspozycji stwierdzono, że istotny wpływ na liczebność bakterii miała dawka 1000 mg · kg⁻¹, dla promieniowców 100 i 1000 mg · kg⁻¹, a dla grzybów 10 000 mg · kg⁻¹ (rys. 2).



Rys. 2. Średnia liczebność bakterii (A), promieniowców (B) i grzybów (C) w glebie skażonej antracenenem (wartości średnie dla wszystkich temperatur, oznaczone różnymi literami, różnią się statystycznie istotnie)

Fig. 2. The average number of bacteria (A), actinomycetes (B) and fungi (C) in soil contaminated with anthracene (mean values for all temperatures indicated by different letters differ statistically significantly)

DYSKUSJA

Wprowadzenie do gleby ksenobiotyków wywiera zróżnicowany wpływ na równowagę biologiczną gleby, a więc także na skład jakościowo-ilościowy drobnoustrojów. Ich oddziaływanie zależy od rodzaju polutanta, jego stężenia oraz warunków fizykochemicznych występujących w tym środowisku (Alexander 1975, Maliszewska-Kordybach 1986). Istotny wpływ czasu inkubacji oraz dawki skażenia węglowodorami aromatycznymi na aktywność mikroorganizmów glebowych potwierdzają badania Maliszewskiej-Kordybach i Smreczak (2003).

Dla bakterii obecność węglowodorów ropopochodnych może być czynnikiem stymulującym ich rozwój i aktywność (Michalcewicz 1995, Nowak i Hawrot 1999, Nowak i in. 2008). W badaniach własnych wprowadzenie antracenu do gleby spowodowało wahania liczebności tych mikroorganizmów niemal we wszystkich próbach, jednakże ich skala była różna w zależności od dawki, warunków temperatury, jak i czasu inkubacji. Stymulację wzrostu obserwowano przede wszystkim w temperaturze 35°C. Znaczny wzrost ogólnej liczby bakterii pod wpływem węglowodorów aromatycznych obserwowały także Maliszewska-Kordybach i Smreczak (2003).

Liczebność promieniowców zależała od dawki węglowodoru – największe zmiany w porównaniu z obiektem kontrolnym obserwowano w temperaturze 5°C. Wzrost liczebności promieniowców w obecności węglowodorów (antracenu, naftalenu i pirenu) zaobserwowały Zabłocka-Godlewska i Buczkowska-Wesołowska (1998). Badały one w warunkach skażenia wpływ wapnowania, nawożenia mineralnego i bioaugmentacji na aktywność biologiczną gleby. Autorki te stwierdziły początkową redukcję liczby komórek promieniowców, po czym wzrost ich liczby pod koniec doświadczenia, który utrzymywał się na poziomie ~ 60% w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Inne wyniki otrzymała Michalcewicz (1995), która po dodaniu do gleby oleju napędowego obserwowała redukcję liczebności promieniowców w zakresie 20–60% w porównaniu z glebą kontrolną, jak również stwierdziła, iż efekt ten związany był z wielkością zastosowanej dawki oleju napędowego. Inhibicję liczebności promieniowców pod wpływem substancji ropopochodnych potwierdzają również Zabłocka-Godlewska i Mrozowska (1997). Być może spadek liczebności promieniowców związany był ze wzrostem liczby bakterii, a więc organizmów konkurencyjnych.

W obecności antracenu liczebność grzybów rosła lub zmniejszała się, natomiast zdecydowanie niekorzystny wpływ obserwowano, niezależnie od dawki węglowodoru, w najwyższej badanej temperaturze inkubacji. W swoich badaniach Borowiec i in. (1982) stwierdził, że substancje ropopochodne, w tym olej napędowy zarówno w dawce 1, jak i 2 ml · 50 g⁻¹ gleby, hamował rozwój grzybów w porównaniu z glebą kontrolną. Zabłocka-Godlewska i Mrozowska (1997) badały wpływ oleju lekkiego i ciężkiego na aktywność biologiczną gleby. Obserwowały one na początku doświadczenia wzrost liczebności grzybów (do 14 dni), po czym jej redukcję. Wyjątek stanowiły próby z olejem lekkim zastosowanym w stężeniu 25%, gdzie stwierdzono spadek liczby komórek grzybów od początku doświadczenia. Negatywny wpływ substancji ropopochodnych potwierdzają też badania prowadzone przez Wyszowską i Kucharskiego (2001). Okresowy wzrost grzybów w niższych temperaturach, obserwowany w niniejszej pracy, może oznaczać możliwość wykorzystywania antracenu jako źródła węgla, co według Zabłockiej-Godlewskiej i Mrozowskiej (1997) mogło maskować toksyczny efekt wywołany jego obecnością w glebie.

WNIOSKI

Liczebność bakterii ulegała wahaniom w zależności od warunków inkubacji oraz dawki antracenu. Stymulujący wpływ obserwowano przede wszystkim w temperaturze 35°C w odniesieniu do dawki 1000 i 10 000 mg · kg⁻¹ s.m. gleby.

Antracenen stymulował lub redukował liczebność promieniowców. Zdecydowanie niekorzystne oddziaływanie, głównie pod wpływem stężenia 10 000 mg · kg⁻¹ s.m. gleby, odnotowano w temperaturze 35°C.

Istotny wpływ koncentracji antracenu w glebie na liczbę komórek grzybów obserwowano przede wszystkim w temperaturze 35°C. Odnotowana inhibicja, zwłaszcza w obecności najwyższej dawki węglowodoru, utrzymywała się przez cały okres inkubacji.

PIŚMIENNICTWO

- Alexander M.** 1975. Ekologia mikroorganizmów. PWN, Warszawa.
- Borowiec S., Dzieńka S., Boligłowa E.** 1982. Wpływ skażenia gleby produktami ropy naftowej na mikroflorę glebową Cz. I. Mikroorganizmy glebowe w sąsiedztwie magazynów paliw. Zesz. Nauk. AR Szczecin 94, 33–44.
- Brohon B., Delolme C. and Gourdon R.** 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biol. Biochem.* 33, 883–891.
- Bunt S., Rovira A.D.** 1955. Microbiological studies of some subantarctic soil. *J. Soil Sci.* 6 (1), 119–128.
- Cyganow W.A., Zukov R.A.** 1964. Morfologobiochemiciskije osobienosti novovoviale actionomicita. *Mikrobiologija* 33 (5), 863–869.
- Eibes G., Cajthaml T., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M.** 2006. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64, 408–414.
- Maliszewska-Kordybach B.** 1986. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w środowisku przyrodniczym. *Wiad. Ecol.* 32, 47–66.
- Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B.** 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ. Int.* 28, 719–728.
- Martin J.P.** 1950. Use of acid rose bengale and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 6, 215–233.
- Michalcewicz W.** 1995. Wpływ oleju napędowego do silników Diesla na liczebność bakterii, grzybów, promieniowców oraz biomasę mikroorganizmów glebowych. *Roczn. PZH XLVI*, 1, 91–97.
- Neryg A.** 1976. Metabolizowanie węglowodorów przez drobnoustroje. *Postępy Mikrobiol.* XV (1), 57–69.
- Nowak A., Hawrot M.** 1999. Izolacja bakterii zdolnych do biodegradacji substancji ropopochodnych ze środowiska naturalnego oraz metodyka oceny ich aktywności. I Krajowy Kongres Biotechnologii „Biotechnologia Środowiskowa”, Wrocław 23–24 wrzesień 1999. Wydaw. Politech. Śl., Gliwice, 237–242.
- Nowak A., Nowak J., Hawrot-Paw M., Telesiński A., Błaszak M., Kłódka D., Przybulewska K., Smolik B., Szymczak J.** 2008. Biodegradation of diesel fuel in soils modified with compost or bentonite and with optimized strains of bacteria. Part II. Changes in microorganisms counts and activity. *Ecol. Chem. Eng.* 15 (7), 607–622.

- Perera F.P.** 1997. Environment and cancer: who are susceptible? *Sci.* 278, 1068–1073.
- Prince M., Sambasivam Y.** 1993. Bioremediation of petroleum wastes from the refining of lubricant oils. *Environ. Progress* 12 (1), 5–11.
- Schlöter M., Dilly O., Munch J.C.** 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* 98, 255–262.
- Šepič E., Bricelj M., Leskovšek H.** 1997. Biodegradation studies of polyaromatic hydrocarbons in aqueous media. *J. Appl. Microbiol.* 83, 561–568.
- van Beelen P.V., Doelman P.** 1997. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34, 455–499.
- Wyszkowska J., Kucharski J.** 2001. Correlation between number of microbes and degree of soil contamination by petrol. *Pol. J. Environ. Stud.* 10 (3), 175–181.
- Zabłocka-Godlewska E., Buczkowska-Wesołowska K.** 1998. Ocena wpływu wybranych WWA oraz modyfikacji układu na zmiany jakościowo-ilościowe głównych mikroorganizmów w glebie piaszczysto-bielicowej. *Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Bioremediacja gruntów”, Wisła Bukowa 8–11 grudnia 1998.* Wydaw. Politech. Śl., Gliwice, 59–73.
- Zabłocka-Godlewska E., Mrozowska J.** 1997. Wpływ WWA na aktywność mikrobiologiczną gleby w zmodyfikowanych układach modelowych. *Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Biotechnologia środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 10–12 grudnia 1997.* Wydaw. Politech. Śl., Gliwice, 61–72.

