

ZMIANY W ZAWARTOŚCI BIOMASY ŻYWYCH MIKROORGANIZMÓW W GLEBACH ZANIECZYSZCZONYCH WĘGLOWODORAMI MONOAROMATYCZNYMI

Małgorzata Hawrot-Paw, Andrzej Nowak, Justyna Łyczakowska

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska,
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Gleba jest tym elementem środowiska przyrodniczego, w którym gromadzi się większość trudno rozkładalnych, hydrofobowych zanieczyszczeń, do jakich należą również węglowodory aromatyczne. Benzen, toluen i ksylen (BTX) uznawane są za najgroźniejsze skażenia ze względu na ich wysoką toksyczność [BI-GERT, FUCHS 1995]. Istnieje szereg metod, które umożliwiają pomiar biologicznej aktywności gleb zanieczyszczonych – poza oceną aktywności enzymów istotne są również oznaczenia ilości biomasy żywych mikroorganizmów [DILLY, MUNCH 1998]. Badania biologicznych parametrów mogą dostarczyć informacji nie tylko na temat obecności mikroorganizmów, ale również intensywności i rodzaju oraz czasu oddziaływania zanieczyszczeń [VAN BEELEN, DOELMAN 1997]. Omawiany w literaturze wpływ skażenia gleb produktami ropopochodnymi na mikroflorę nie jest jednoznaczny. Obserwować można zarówno brak reakcji ze strony mikroorganizmów [GÓRSKA 1986], stymulację [ZABŁOCKA-GODLEWSKA, BUCZKOWSKA-WESOŁOWSKA 1998; HAWROT, NOWAK 2004a], jak i zmniejszenie liczebności i aktywności mikroflory glebowej [ULFIG i in. 1998; MEGHARAJ i in. 2000].

Celem niniejszej pracy było przebadanie w warunkach laboratoryjnych wpływu wybranych węglowodorów aromatycznych na biomasę drobnoustrojów w dwóch, różnych typach gleb, z uwzględnieniem wielkości dawki użytego węglowodoru i czasu inkubacji.

Materiał i metody

W doświadczeniu wykorzystano glebę piaszczystą (piasek gliniasty lekki pylasty) oraz glebę gliniastą (glinę lekką pylastą), które poza składem granulometrycznym, oznaczonym metodą Cassegranda´a w modyfikacji Prószyńskiego, różniły się także zawartością materii organicznej. Zawartość węgla ogólnego, oznaczona metodą Tiurina, wynosiła 10 i 19 g·kg⁻¹ odpowiednio dla gleby piaszczystej i gleby gliniastej.

Badane gleby podsuszono, przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm i podzielono na 300 g próbki. Każdą z nich skażono wybranym węglowodorem z grupy BTEX: benzenem, toluenem, etylenem, ksylenem w dawce 100, 1000, 10 000 mg·kg⁻¹ s.m. gleby. Próbę kontrolną stanowiła gleba bez dodatku węglowodoru. Gleby doprowadzono do 50% maksymalnej pojemności wodnej (utrzymywano taką wilgotność przez cały czas trwania doświadczenia), umieszczono w polietylenowych workach i inkubowano w temperaturze pokojowej. Pierwsze analizy przeprowadzono w dniu skażenia gleb węglowodorami, a następnie odpowiednio w 7, 14, 28, 56, 112 dniu inkubacji (terminy pomiarowe od 1 do 6).

Oznaczenie zawartości biomasy przeprowadzono przy zastosowaniu fizjologicznej metody opracowanej przez ANDERSONA i DOMSCHA [1978]. Próbki glebowe o masie 10 g rozcierano z 0,3 g glukozy dodawanej jako mieszanina z talkiem (1 : 5), co pozwalało na jej równomierne rozprowadzenie. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach. Uzyskane wartości przedstawiono w mg węgla zawartego w biomacie żywych drobnoustrojów w przeliczeniu na 100 g s.m. gleby.

Wyniki poddano analizie statystycznej stosując analizę wariancji.

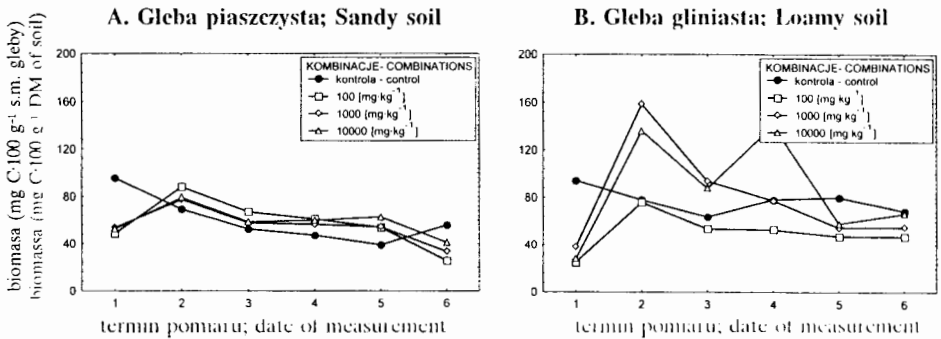
Wyniki

Ilość biomasy w glebie piaszczystej na początku doświadczenia wynosiła 95 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby, a następnie stopniowo malała do wartości 55 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby w szóstym terminie pomiaru. W przypadku gleby gliniastej ilość biomasy zmieniała się w zakresie od 94 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby do 68 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby na koniec okresu inkubacji.

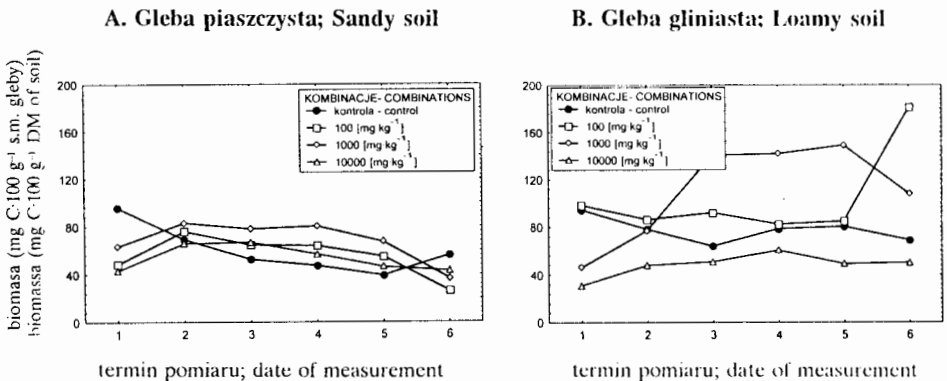
Wprowadzenie węglowodorów aromatycznych do gleby piaszczystej powodowało na ogół, niezależnie od dawki skażenia, obniżenie zawartości biomasy żywych mikroorganizmów. W przypadku benzenu wartość ta, w porównaniu z kontrolą, była niższa średnio o 44 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby (rys. 1A), dla toluenu maksymalnie o 53 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby (rys. 2A), 55 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby przy etylobenzenu (rys. 3A) i średnio 45 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby dla ksyleny (rys. 4A), przy czym dla benzenu i toluenu inhibicja ta była stosunkowo krótkotrwała. W glebie z benzenem wartości niższe od kontrolnych odnotowano ponownie dopiero po 112 dniach doświadczenia. Podobną reakcję odnotowano w obiektach skażonych toluenem. Wpływ etylobenzenu i ksyleny nie był tak jednoznaczny. Początkowo odnotowano zmniejszenie ilości biomasy mikroorganizmów, jednak w trakcie okresu inkubacji, bez względu na wielkość skażenia, zawartość biomasy była niższa lub wyższa niż w glebie kontrolnej. W obiektach z etylobenzenu i ksylenem, analogicznie jak przy pozostałych węglowodorach, po 112 dniach inkubacji, niezależnie od dawki, obserwowano zmniejszenie ilości biomasy poniżej wartości kontrolnych.

Wprowadzenie badanych węglowodorów do gleby gliniastej powodowało w większości obiektów zmniejszenie ilości biomasy w stosunku do obiektu nieskażonego, podobnie jak w glebie piaszczystej. W przypadku benzenu w pierwszym terminie pomiaru przy zastosowaniu najniższej dawki skażenia oznaczono zaledwie 25 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby (rys. 1B) i inhibicja ta utrzymywała się przez cały czas trwania doświadczenia (wartości były niższe o 3–73% od kontroli). Dla toluenu, w dniu wprowadzenia węglowodoru do gleby, jedynie najniższa dawka nie wywołała spadku zawartości biomasy. W przypadku stężenia 10 000 mg·kg⁻¹ inhi-

bicja utrzymywała się przez cały okres inkubacji (rys. 2B), a obserwowane wartości były niższe w stosunku do obiektu nieskażonego w zakresie 21–67%. Podobną sytuację dla najwyższej dawki skażenia obserwowano również w glebie z etylobenzenem (rys. 3B), przy czym oznaczone ilości biomasy przyjmowały wartości niższe o 16–53% w porównaniu z kontrolą. Najbardziej dynamicznie zmiany zaobserwowano po wprowadzeniu do gleby ksyleny. W pierwszym terminie analizy obserwowano zmniejszenie zawartości biomasy żywych mikroorganizmów we wszystkich badanych obiektach, a następnie wzrost aż do 194 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby i 172 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby, odpowiednio dla gleby z węglowodorem w dawce 1000 mg·kg⁻¹ i 10 000 mg·kg⁻¹. Od trzeciego terminu pomiaru (14 dzień inkubacji) w obu tych obiektach obserwowano równie gwałtowne zmniejszenie ilości biomasy żywych mikroorganizmów – 77 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby dla dawki 1000 mg·kg⁻¹ i 66 mg C·100 g⁻¹ s.m. gleby dla dawki najwyższej na koniec okresu inkubacji (rys. 4B).



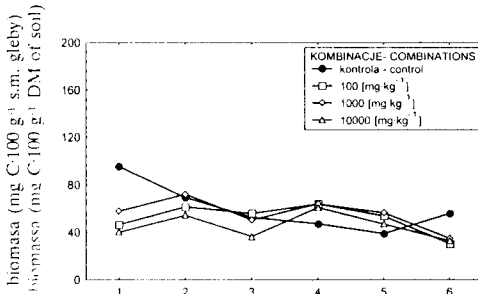
Rys. 1. Wpływ benzenu na zawartość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie
Fig. 1. Influence of benzene on the content of viable microorganism biomass in soil



Rys. 2. Wpływ toluenu na zawartość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie
Fig. 2. Influence of toluene on the content of viable microorganism biomass in soil

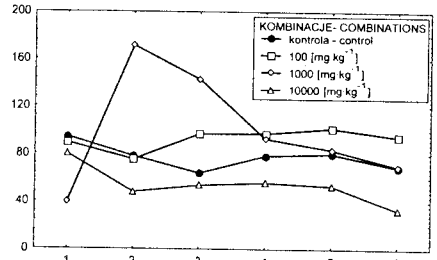
Analiza statystyczna wykazała, że zastosowana dawka węglowodorów oraz czas inkubacji miały wysoce istotny wpływ na ilość biomasy żywych mikroorganizmów, zarówno w glebie piaszczystej, jak i w glebie gliniastej (tab. 1).

A. Gleba piaszczysta; Sandy soil



termin pomiaru; date of measurement

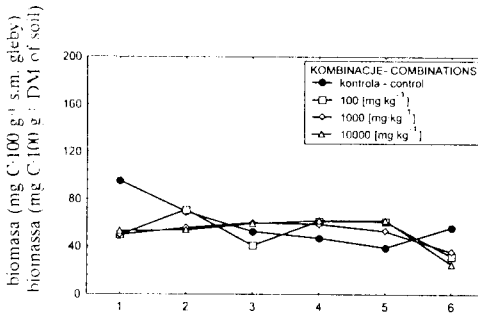
B. Gleba gliniasta; Loamy soil



termin pomiaru; date of measurement

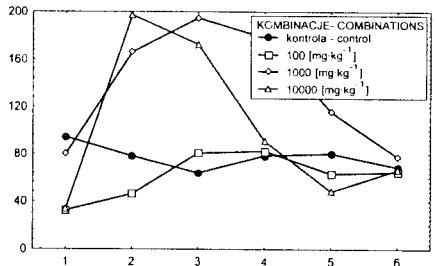
Rys. 3. Wpływ etylbenzenu na zawartość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie
 Fig. 3. Influence of ethylbenzene on the content of viable microorganism biomass in soil

A. Gleba piaszczysta; Sandy soil



termin pomiaru; date of measurement

B. Gleba gliniasta; Loamy soil



termin pomiaru; date of measurement

Rys. 4. Wpływ ksylenu na zawartość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie
 Fig. 4. Influence of xylene on the content of viable microorganism biomass in soil

Dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że węglowodory aromatyczne wprowadzone do gleby wywarły istotny wpływ na ilość biomasy żywych mikroorganizmów. W zależności od rodzaju węglowodoru, jego dawki oraz czasu oddziaływania, wpływ ten miał różny charakter (zarówno stymulacji, jak i inhibicji), a obserwowane zmiany często utrzymywały się przez cały okres inkubacji.

Według NOWAKA [1986] pojawienie się substancji toksycznych w glebie powoduje obniżenie maksymalnego poziomu biomasy, który obserwuje się w warunkach najkorzystniejszych. Potwierdzają to przeprowadzone badania. Węglowodory monoaromatyczne w dniu wprowadzenia do gleby piaszczystej, niezależnie od dawki, spowodowały zmniejszenie ilości biomasy żywych mikroorganizmów średnio o 50%. Podobną sytuację, z wyjątkiem toluenu, obserwowano w glebie gliniastej. Negatywny wpływ węglowodorów aromatycznych na mikroorganizmy

w początkowym okresie doświadczenia obserwowali również ULFIG i in. [1997]. Zbliżone wyniki uzyskali także HAWROT i NOWAK [2004b], którzy badali wpływ oleju napędowego na ilość biomasy żywych mikroorganizmów i stwierdzili jego negatywny wpływ na mikroorganizmy i zmniejszenie ilości biomasy średnio o 55%.

KUCHARSKI i JASTRZĘBSKA [2001a] badający aktywność enzymatyczną gleby, która podobnie jak biomasa jest wskaźnikiem aktywności biologicznej gleby, stwierdzili, że po wprowadzeniu oleju napędowego aktywność mikroorganizmów maleje wraz ze wzrostem dawki. W prezentowanej pracy nie stwierdzono takiej zależności, jednakże w dniu skażenia gleby piaszczystej na ogół najsilniej redukowały ilość biomasy węglowodory właśnie w najwyższej dawce $10\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby (z wyjątkiem benzenu). W glebie gliniastej po wprowadzeniu toluenu i ctylobenzenu inhibicja utrzymywała się przez cały okres doświadczenia.

Pozostałe węglowodory (benzen i ksylen) wprowadzone do gleby w dawce $10\ 000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby spowodowały wzrost ilości biomasy, co według danych literaturowych [MALISZEWSKA-KORDYBACH 1999; KUCHARSKI, JASTRZĘBSKA 2001b] może być związane z adaptacją mikroorganizmów do skażenia, jak również dopływem łatwo dostępnego źródła węgla i energii. Jak podaje PIĘKARSKA i in. [2000] po zanieczyszczeniu gruntu węglowodorami ilość biomasy może wzrosnąć 1000-krotnie.

Według SIMSA i OVERCASHA [1983] oraz MALISZEWSKIEJ-KORDYBACH [1992] obecność substancji organicznej w glebie, może wpływać na sorpcję węglowodórów aromatycznych zmniejszając ich biodostępność. W takiej sytuacji wpływ na mikroflorę powinien być ograniczony, tymczasem w przeprowadzonych badaniach w glebie gliniastej, w obecności większości badanych węglowodorów, obserwowano wyraźny wzrost aktywności biologicznej.

Wnioski

1. Wpływ węglowodorów aromatycznych na ilość biomasy żywych mikroorganizmów był zróżnicowany w zależności od rodzaju użytego węglowodoru i wielkości zastosowanej dawki oraz zmieniał się wraz z upływem czasu.
2. Nie stwierdzono zależności pomiędzy wzrostem dawki skażenia gleby a reakcją ze strony mikroflory – przy tej samej wartości skażenia dla różnych węglowodorów obserwowano bowiem zarówno stymulację, jak i inhibicję aktywności mikroorganizmów.
3. Węglowodory jednopierścieniowe z grupy BTEX tuż po wprowadzeniu do gleby, w większości przypadków, powodowały zmniejszenie ilości biomasy (średnio o 50%).
4. Istotny wpływ na ilość biomasy miał rodzaj użytych w doświadczeniu gleb. W glebie gliniastej obserwowano większą ilość biomasy żywych mikroorganizmów, w porównaniu z glebą piaszczystą – maksymalne wartości, w zależności od węglowodoru, były wyższe średnio o 125% niż w kontroli.
5. Na ogół największe średnie wartości biomasy, niezależnie od węglowodoru, obserwowano w glebie gliniastej w dawce $1000\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby.

Literatura

- ANDERSON J.P.E., DOMSCH K.H. 1978. *A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils*. Soil. Biol. Biochem. 10: 215–221.
- BIEGERT T., FUCHS G. 1995. *Anaerobic oxidation of toluene (analogues) to benzoate (analogues) by whole cells and by cell extracts of a denitrifying Thauera sp.* Arch. Microbiol. 163: 407–417.
- DILLY O., MUNCH J.C. 1998. *Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils*. Biol. Fertil. Soils 27: 374–379.
- GÓRSKA B. 1986. *Wpływ węglowodorów aromatycznych na mikroorganizmy glebowe*. Acta. Biol. Sil. 3(20): 139–153.
- HAWROT M., NOWAK A. 2004a. *Biodegradacja oleju napędowego w glebie prowadzona metodą ex situ oraz wpływ skażenia na liczebność i aktywność mikroflory glebowej*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 501: 151–157.
- HAWROT M., NOWAK A. 2004b. *Ocena wpływu dawki skażenia olejem napędowym i stosowanych zabiegów bioremediacyjnych na ilość biomasy żywych organizmów w glebie*. Folia Univ. Agric. Stetin. 234(93): 123–130.
- KUCHARSKI J., JASTRZĘBSKA E. 2001a. *Aktywność enzymatyczna gleby zanieczyszczonej olejem napędowym*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 476: 181–187.
- KUCHARSKI J., JASTRZĘBSKA E. 2001b. *Reakcja drobnoustrojów na zanieczyszczenie gleby benzyną ołowiową*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 476: 189–195.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH B. 1992. *Wpływ nawożenia organicznego na trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach*. Arch. Ochr. Środ. 2: 153–162.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH B. 1999. *Podstawy rekultywacji gleb zawierających trwałe zanieczyszczenia organiczne*. VI Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Biotechnologia środowiskowa”, 23–24 IX, Wrocław: 231–235.
- MEGHARAJ M., SINGLETON I., MCCLURE N.C., NAIDU R. 2000. *Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38: 439–445.
- NOWAK A. 1986. *Pomiary oddychania w ocenie wpływu czynników środowiskowych na mikroflorę glebową*. Post. Mikrobiol. XXV (3/4): 273–281.
- PIEKARSKA K., KOŁWZAN B., TRACZEWSKA T. 2000. *Zastosowanie metod biologicznych do prognozowania biodegradacji substancji ropopochodnych w gruntach*. Zesz. Nauk. Pol. Śl. 45: 89–99.
- SIMS R.C., OVERCASH M.R. 1983. *Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil – plant systems*. Residue. Rev. 88: 1–68.
- ULFIG K., PŁAZA G., TIEN A., MAŃKO T., WORSZTYNOWICZ A. 1997. *Zmiany liczebności i aktywności drobnoustrojów w procesie oczyszczania gleby z substancji ropopochodnych. Doświadczenia kolumnowe*. Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Biotechnologia Środowiska”, 10–12 XII, Ustroń Jaszowice: 17–25.
- ULFIG K., PŁAZA G., ŁUKASIK K., KRAJEWSKA J., HAŃKO T., WYPYCH J., DRZEWIECKA B., WORSZTYNOWICZ A. 1998. *Wybrane grzyby strzępkowe jako wskaźnik toksyczności odcieków i postępów bioremediacji*. Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Bioremediacja gruntów”, 08–11 XII, Wisła Bukowa: 47–53.

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.

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”, 08–11 XII, Wisła Bukowa: 59–73.

Słowa kluczowe: biomasa, mikroorganizmy, gleba, węglowodory aromatyczne

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań, w których oceniano wpływ wybranych węglowodorów aromatycznych na biomasę żywych drobnoustrojów w dwóch, różnych typach gleb, z uwzględnieniem wielkości dawki użytego węglowodoru i czasu inkubacji.

W doświadczeniu wykorzystano dwie gleby (piasek gliniasty lekki pylasty oraz glinę lekką pylastą). Próby glebowe o masie 300 g mieszano z wybranym węglowodorem: benzenem, toluenem, etylenem lub ksylenem w dawce 100, 1000, 10 000 mg·kg⁻¹ s.m. gleby. Próbę kontrolną stanowiła gleba bez dodatku węglowodoru. Gleby doprowadzono do 50% maksymalnej pojemności wodnej i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 112 dni. Oznaczenie biomasy przeprowadzono metodą SIR (ang. substrate induced respiration). Uzyskane wartości przedstawiono w mg CO₂ zawartego w biomacie żywych drobnoustrojów w przeliczeniu na 100 g s.m. gleby.

Na podstawie badań stwierdzono, że wprowadzone do gleby węglowodory aromatyczne wpływały na ilość biomasy żywych mikroorganizmów. W zależności od rodzaju węglowodoru, jego dawki oraz czasu oddziaływania, wpływ ten miał różny charakter (zarówno stymulacji, jak i inhibicji), a obserwowane zmiany często utrzymywały się przez cały okres inkubacji. Węglowodory monoaromatyczne w dniu wprowadzenia do gleby piaszczystej, niezależnie od dawki, powodowały zmniejszenie ilości biomasy żywych mikroorganizmów średnio o 50%. Podobną sytuację obserwowano w glebie gliniastej. W glebie piaszczystej w dniu skażenia na ogół najsilniej redukowały biomasę węglowodory w dawce 10000 mg·kg⁻¹ s.m. gleby (z wyjątkiem benzenu). W glebie gliniastej po wprowadzeniu toluenu i etylobenzenu inhibicja utrzymywała się przez cały okres doświadczenia, natomiast benzen i ksylen w tym stężeniu powodowały gwałtowny wzrost ilości biomasy.

CHANGES IN THE CONTENT OF LIVING MICROORGANISM BIOMASS IN SOILS POLLUTED WITH MONOAROMATIC HYDROCARBONS

Małgorzata Hawrot-Paw, Andrzej Nowak, Justyna Lyczakowska
Department of Microbiology and Environmental Biotechnology,
Agricultural University, Szczecin

Key words: biomass, microorganisms, soil, aromatic hydrocarbons

Summary

The paper presents study results upon the evaluation of influence of selected aromatic hydrocarbons on living microorganism biomass in two different soil types including the dose of hydrocarbon used and incubation time.

Two soil types (light dusty loamy sand and light dusty loam) were used in the experiments. Soil samples (300 g each) were mixed with selected hydrocarbon: benzene, toluene, ethylbenzene or xylene at the rates of 100, 1000, 10 000 mg·kg⁻¹ soil DM. The control was the soil with no hydrocarbon addition. Soils were adjusted to 50% of MPW and incubated at ambient temperature for 112 days. The biomass determination was performed by the means of SIR method (*substrate induced respiration*). The achieved results were expressed in mg of CO₂ contained in biomass of living microorganisms recalculated onto 100 g of soil DM.

The studies revealed that aromatic hydrocarbons introduced into the soil affected the number of living organism biomass. Depending on the hydrocarbon used, its dose and interaction time, the influence was of various character (both stimulation and incubation), and the observed changes often lasted for the whole incubation period. Monoaromatic hydrocarbons on the day of introduction into the sandy soil, regardless the rate, caused the decrease of living organism biomass by 50%, on the average. Similar situation was observed in loamy soil. On the day of sandy soil pollution, in general, hydrocarbons at 10 000 mg·kg⁻¹ soil DM rate strongest reduced the biomass (except from benzene). In loamy soil, the inhibition maintained for the whole experiment after the introduction of toluene and ethylobenzene; benzene and xylene caused a sudden increase of biomass amount at the same concentration.

Dr Małgorzata **Hawrot-Paw**
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska
Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17
71-434 SZCZECIN
e-mail: mhawrot@agro.ar.szczecin.pl