ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 2000
Seria: INŻYNIERIA ŚRODOWISKA z. 45 Nr kol. 1487

Sylwia FIJAŁKOWSKA[1], Hans-Peter SCHMAUDER[2], Jerzy DŁUGOŃSKI[1]

[1] Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Łódzki
90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16
[2] Forschungszentrum fur Medizintechnik und Biotechnologie e.V.,
Granienweg 7,D-99947 Bad Langensalza, Germany

USUWANIE METALI CIĘŻKICH Z GLEBY ZANIECZYSZCZONEJ ODPADAMI POPRODUKCYJNYMI POCHODZĄCYMI Z HUT PRZY ZASTOSOWANIU MIKROORGANIZMÓW I ROŚLIN

Streszczenie. W prezentowanej pracy podjęto próbę bioremediacji gleby przy wykorzystaniu gatunków roślin potencjalnie zdolnych do akumulacji metali ciężkich oraz czterech wybranych szczepów bakterii, uprzednio wyizolowanych ze środowisk zanieczyszczonych związkami metali ciężkich, opornych na wysokie stężenia cynku i ołowiu. Wykazano, iż największy ubytek metali ciężkich ma miejsce w glebie, na której uprawiano żyto z dodatkiem uprzednio wyodrębnionych szczepów bakterii. Stwierdzono również, iż dodanie na początku eksperymentu testowanych szczepów bakterii miało korzystny wpływ na rozwój mikroflory glebowej oraz stymulowało akumulację metali ciężkich przez rośliny.

MICROBIAL AND PLANT ACTION ON HEAVY METALS REMOVAL FROM SOIL CONTAMINATED BY POST FLOTATION TAILINGS FROM METAL WORKS

Summary. In presented work the combined plants and bacterial bioremediation was applied. Four bacterial strains with known resistance to high concentrations of zinc and lead and four species of plants had been planted together in soil contaminated by heavy metals. The most significant heavy metals uptake after four months of experiment was observed in soil, where Secale cereale was grown together with bacterial strains. It was found, that applying selected bacterial strains inoculation at the start of the experiment had positive effect on microflora development and heavy metals accumulation by plants.

WPROWADZENIE

Zanieczyszczenie gleby odpadami przemysłowymi stanowi istotny problem ekologiczny naszego wieku. Szczególnie uciążliwe dla środowiska naturalnego są odpady poprodukcyjne pochodzące z hut, zawierające metale ciężkie, zwłaszcza cynk, ołów czy kadm, w ilościach

przekraczających dopuszczalne normy. Składowanie odpadów hutniczych przez wiele lat wokół zakładów przemysłowych przyczyniło się do znacznego zagrożenia dla ludności.

Metale ciężkie oddziałują szkodliwie nie tylko na organizmy żywe, lecz również hamują aktywność drobnoustrojów biorących udział w rozkładzie ksenobiotyków organicznych, co ma znaczący wpływ na przebieg procesów bioremediacji [3].

Często stosowanymi, aczkolwiek kosztownymi sposobami oczyszczania skażonych gleb są metody fizykochemiczne. Alternatywą są metody biotechnologiczne, w tym również techniki z wykorzystaniem roślin lub drobnoustrojów.

Metody bioremediacji gleby oparte na użyciu aktywnych szczepów bakteryjnych lub grzybowych przeprowadzających mineralizację ksenobiotycznych substancji organicznych, a także zdolnych do usuwania metali ciężkich z gleby, są obecnie coraz częściej stosowane [5,7].

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia literaturowe dotyczące stosowania równolegle dwóch technik bioremediacji, polegającej na zastosowaniu bakterii oraz roślin w celu usunięcia metali ciężkich ze skażonych gleb [1].

W pracy podjęto próbę zastosowania łączonej techniki bioremediacji przy zastosowaniu roślin wyższych oraz wybranych szczepów bakterii opornych na wysokie stężenia cynku i ołowiu.

MATERIAŁY I METODY

Na terenie Huty Metali Nieżelaznych „Szopienice" w Katowicach wydzielono poletko doświadczalne, które obsiano 4 gatunkami roślin. Jednocześnie wprowadzano do gleby 4 szczepy bakteryjne o znanej oporności na metale ciężkie. Próbki do badań pobrano w pierwszym dniu doświadczeń oraz po 4 miesiącach inkubacji w warunkach naturalnych. Wysiano rośliny w następujących układach:

1) słonecznik (*Helianthus annus*) bez dodatku wybranych szczepów bakterii
2) słonecznik (*Helianthus annus*) z dodatkiem wybranych szczepów bakterii
3) łubin (*Lupinus luteus*) bez dodatku wybranych szczepów bakterii
4) łubin (*Lupinus luteus*) z dodatkiem wybranych szczepów bakterii
5) żyto (*Secale cereale*) bez dodatku wybranych szczepów bakterii
6) żyto (*Secale cereale*) z dodatkiem wybranych szczepów bakterii
7) kukurydza (*Zea mays*) bez dodatku wybranych szczepów bakterii
8) kukurydza (*Zea mays*) z dodatkiem wybranych szczepów bakterii

Ponadto jako układy odniesienia zastosowano:

9) poletko, na którym nie wysiano roślin ani testowanych szczepów bakterii.
10) poletko, na którym nie wysiano roślin, lecz dodano testowane szczepy bakterii.

Podstawowe właściwości fizykochemiczne, gleby na której przeprowadzono eksperymenty: pH(H_2O)=7,4; C całkowity – 8700 mg C/kg; azot całkowity – 1237 mg N/kg; fosfor całkowity - 327 mg P/kg; pojemność kompleksu sorpcyjnego – 82%.

Stosowane szczepy bakteryjne

W doświadczeniu zastosowano cztery szczepy bakteryjne o znanej oporności na stężenie jonów cynku i ołowiu: *Rhodococcus equi* IM 6KB3, *Rhodococcus equi* IM 62F5 oraz szczep IM 6116 i szczep IM 6120. Wymienione szczepy bakteryjne wyodrębniono uprzednio z gleb zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi oraz metalami ciężkimi.

Oznaczanie zawartości metali ciężkich w glebie i roślinach

Próby gleby do oznaczeń pobrano przed wysianiem roślin i zaszczepieniem wybranymi drobnoustrojami oraz po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym.

Pobrane próby mineralizowano w mieszaninie stężonych kwasów: 15,5 M HNO_3 i 10,5 M $HClO_4$ (1 : 4) (POCH Gliwice), w piecyku do mineralizacji MEDITHERM, przez 1 h w temperaturze 100°C, a następnie przez 23 h w temperaturze 140°C. Całkowitą zawartość metali ciężkich w badanych próbach gleby oznaczano przy zastosowaniu Absorpcyjnej Spektroskopii Atomowej na aparacie Spektra 300 (Varian). Wyniki podano w mg metalu / g suchej masy gleby.

Rośliny pobrano po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym i mineralizowano oraz oznaczano zawartość metali ciężkich analogicznie jak próby gleby. Wyniki podano w mg metalu / g suchej masy roślin.

Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów w glebie

Oznaczano ogólną liczbę drobnoustrojów w 1 g gleby metodą płytkową. W tym celu zastosowano podłoża:

1) uniwersalne o składzie (l^{-1}): 15 g bulion wzbogacony; 1,3 g ekstrakt drożdżowy; 5 g glukoza; 2 g żelatyna, agar (2%),
2) ZT o składzie (l^{-1}): 500 ml brzeczka (12° Blg), 4 g ekstrakt drożdżowy, 4 g glukoza, 2,5 g/l agar.

Podłoża sterylizowano w 117°C w ciągu 30 min.

Próbki gleb ekstrahowano przez 30 minut w soli fizjologicznej. Ekstrakt wysiewano z odpowiednich rozcieńczeń na podłoża ZT i uniwersalne. Wyrosłe kolonie liczono po 72-godzinnej inkubacji w temperaturze 30°C.

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza mikrobiologiczna gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi

W czasie trwania eksperymentu oznaczano ogólną liczbę drobnoustrojów w 1 gramie gleby. Stwierdzono, iż w pierwszym dniu doświadczenia 1 x 10^4 bakterii, 1,1 x 10^4 grzybów strzępkowych wyrosło na podłożu uniwersalnym (średnie z trzech powtórzeń). Na podłożu ZT wyliczono 1,7 x 10^4 grzybów strzępkowych (średnie z trzech powtórzeń). Nie wykazano obecności promieniowców.

Po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym ponownie oznaczono ilość drobnoustrojów w 1 g gleby. Wyniki zamieszczono w tabelach nr 1 i 2.

Tabela 1

Liczba drobnoustrojów* oznaczona na podłożu uniwersalnym w 1 g gleby po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym

Rośliny	Gleba zaszczepiona wybranymi szczepami bakterii			Gleba bez dodatku wybranych szczepów bakterii		
	Bakterie	Grzyby strzępkowe	Promieniowce	Bakterie	Grzyby strzępkowe	Promieniowce
Słonecznik	$8,77x10^5$	$1,2x10^5$	$5x10^5$	$3,7x10^5$	$3,1x10^4$	$2x10^5$
Łubin	$1,75x10^6$	$1x10^4$	$1x10^5$	$4x10^6$	$1x10^5$	$3x10^5$
Żyto	$4,6x10^5$	$1,65x10^5$	$2,5x10^5$	$1,76x10^6$	$9,5x10^4$	$1,2x10^5$
Kukurydza	$3,3x10^6$	$5,25x10^4$	$5,36x10^5$	$5,57x10^6$	$3,15x10^5$	$1,5x10^5$
Kontrola	$1,56x10^6$	$1,5x10^5$	$3,75x10^4$	$3,1x10^6$	$5x10^3$	$2,65x10^4$

Kontrola - gleba pochodząca z miejsc nie obsianych roślinami
*Średnie z dwóch powtórzeń

Tabela 2

Liczba drobnoustrojów* oznaczona na podłożu ZT w 1 g gleby po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym

Rośliny	Gleba zaszczepiona wybranymi szczepami bakterii			Gleba bez dodatku wybranych szczepów bakterii		
	Bakterie	Grzyby strzępkowe	Promieniowce	Bakterie	Grzyby strzępkowe	Promieniowce
Słonecznik	$1x10^4$	$5x10^4$	0	$4,25x10^4$	$1x10^4$	0
Łubin	$8,75x10^4$	$1x10^3$	0	$2,18x10^5$	$1x10^5$	$1x10^4$
Żyto	$7x10^4$	$5x10^4$	$6x10^3$	$4x10^4$	$1,35x10^5$	0
Kukurydza	$8x10^4$	$8,4x10^4$	0	$2,86x10^5$	$6,5x10^4$	$1,4x10^5$
Kontrola	$1,2x10^5$	$1,5x10^4$	0	$7x10^4$	$1x10^4$	0

Kontrola - gleba pochodząca z miejsc nie obsianych roślinami
*Średnie z dwóch powtórzeń

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono znaczny przyrost ogólnej liczby drobnoustrojów w glebie pobranej z miejsc wzrostu kukurydzy, aczkolwiek nie stwierdzono znaczącej statystycznie różnicy w stosunku do liczby drobnoustrojów występujących w glebie, do której uprzednio wprowadzono testowane szczepy bakteryjne.

Po 4 miesiącach doświadczenia liczba bakterii w próbach gleby pobranych z miejsca wzrostu kukurydzy zaszczepionych dodatkowo wybranymi szczepami bakterii wynosiła 3,3 x 10^6, natomiast w próbie kontrolnej 1,56 x 10^6. W próbach gleby pochodzących z miejsc wzrostu kukurydzy bez dodatku wybranych szczepów bakteryjnych liczba bakterii wynosiła 5,57 x 10^6, natomiast w kontroli 3,1 x 10^6.

Podobne wyniki otrzymano analizując liczbę grzybów strzępkowych na podłożu ZT, w próbach gleby pochodzących z miejsc uprawy kukurydzy. W próbie gleby pobranej z miejsca

wzrostu kukurydzy z wybranymi szczepami bakteryjnymi stwierdzono 8,4 x 10^4 grzybów strzępkowych, natomiast w próbie kontrolnej 1,5 x 10^4 (tabela nr 2).

We wszystkich próbach gleby w pierwszym dniu eksperymentu nie zaobserwowano obecności promieniowców, natomiast po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym liczba promieniowców w próbach gleby pochodzących z miejsc wzrostu kukurydzy z wybranymi szczepami bakterii była największa i wynosiła 5,36 x 10^6.

Otrzymane wyniki wskazują, że chociaż nie nastąpił znaczący przyrost liczby bakterii, szczególnie w miejscach wzrostu roślin z testowanymi szczepami bakterii, zmienił się skład jakościowy mikroflory gleby i zaobserwowano obecność promieniowców.

Oznaczanie zawartości metali ciężkich w glebie

Analiza prób pobranych w pierwszym dniu doświadczenia wykazała wysokie zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi. W 1 g suchej masy gleby stwierdzono: Pb–8 mg/g suchej masy gleby, Zn - 18 mg/g suchej masy gleby, Mn - 3 mg/g suchej masy gleby, Cd - 0,4 mg/g suchej masy gleby, Cu - 0,45 mg/g suchej masy gleby, Ni - 0,7 mg/g suchej masy gleby [6].

Uzyskane wyniki wskazywały na znaczne przekroczenie dopuszczalnych w Polsce norm, które dla gleby ciężkiej w odniesieniu do 1 g gleby wynoszą: 0,1 mg Pb, 0,3 mg Zn oraz 0,003 mg Cd.

Po 4-miesięcznym okresie wegetacyjnym zawartość metali ciężkich uległa zmianie. Otrzymane wyniki zamieszczono w tabeli nr 3.

Tabela 3

Zawartość metali ciężkich w glebie po 4 miesiącach wegetacji roślin.
Wyniki wyrażono w mg metalu / g suchej masy gleby

Badany układ	Zawartość metali w mg/g suchej masy gleby					
	Zn	Pb	Mn	Cd	Cu	Ni
Słonecznik + bakterie	15,1	5,5	1,7	0,3	0,3	0,4
Słonecznik	14,1	4,8	0,7	0,2	0,2	0,4
Kukurydza + bakterie	17,7	3,5*	1,1	0,2	0,2	0,4
Kukurydza	16,6	3,8*	2,8	0,3	0,3	0,7
Żyto + bakterie	7,9*	2,0*	3,5	0,2	0,2	0,7
Żyto	15,2	6,6	1,4	0,3	0,3	0,8
Łubin + bakterie	18,0	6,9	1,3	0,3	0,3	0,8
Łubin	15,4	6,2	1,8	0,4	0,4	0,6
Kontrola (obiekt nr 9)	18,0	7,8	2,5	0,4	0,45	0,5

W tabeli podano średnie liczone z trzech pomiarów.
* Różnice istotne statystycznie obliczane testem NIR w stosunku do kontroli (wartości *p* w tekście)

Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono w próbach gleby pobranych z miejsc wzrostu słonecznika oraz żyta spadek ilości cynku w stosunku do stanu wyjściowego oraz w stosunku do kontroli (układ bez testowanych roślin i bakterii).

Zaobserwowano, iż w przypadku prób gleby pochodzących z uprawy żyta, dodatkowo zaszczepionych wybranymi szczepami bakterii, ilość Zn spadła o 56% w stosunku do poletka kontrolnego, na którym nie uprawiano roślin ($p<0,002$). Nie było natomiast statystycznie istotnych różnic między zawartością Zn w próbce kontrolnej i w próbce pobranej z miejsca uprawy żyta bez bakterii.

Jednocześnie przeprowadzona analiza zawartości cynku w roślinach wykazała, iż ilość cynku w życie rosnącym na glebie bez dodatku wybranych szczepów wynosiła 8,43 mg cynku / g suchej masy roślin, natomiast ilość cynku w życie uprawianym na glebie z dodatkiem wybranych mikroorganizmów wynosiła 14,28 mg cynku/g suchej masy roślin.

Otrzymane wyniki są zbieżne z uzyskanymi przez de Souza [2], który stwierdził, że dodanie do gleby drobnoustrojów charakterystycznych dla ryzosfery *Brassica juncea* spowodowało pięciokrotnie większą akumulację selenu w strefie korzeniowej, w stosunku do roślin uprawianych bez dodatku mikroorganizmów.

Analizy ilościowe ołowiu w badanych próbach wykazały spadek zawartości ołowiu w glebie pobranej z miejsca wzrostu słonecznika, kukurydzy i żyta. Największy ubytek ilości ołowiu wynoszący 75% zaobserwowano w próbach gleby pobranych z miejsc wzrostu żyta ($p=10^{-6}$) zaszczepionych wybranymi szczepami bakterii, natomiast w próbach gleby pobranych z miejsca, gdzie żyto uprawiano bez dodatku bakterii, nie zaobserwowano statystycznie znamiennego spadku zawartości metalu. Jednocześnie przeprowadzona analiza zawartości ołowiu w roślinach wykazała, iż ilość ołowiu zakumulowanego w życie hodowanym na glebie bez dodatku wybranych szczepów wynosiła 6,245 mg ołowiu/g suchej masy roślin, natomiast ilość ołowiu w życie hodowanym na glebie z dodatkiem wybranych mikroorganizmów wynosiła 10,73 mg ołowiu/g suchej masy roślin.

Obecność bakterii w ryzosferze roślin może wpływać znacząco na zdolności do pobierania z gleby metali ciężkich i ich akumulacji w roślinach [1,4]. Drobnoustroje są zdolne do przeprowadzania nieprzyswajalnych form metali w formy przyswajalne, a tym samym wpływają na biodostępność metali dla roślin.

Interesujące wyniki uzyskano z prób gleby pochodzących z miejsc wzrostu kukurydzy. Nie zaobserwowano znaczącej różnicy między ubytkiem ołowiu w próbach pobranych z miejsc, w których wprowadzano dodatkowo bakterie ($p< 0,00001$) i z miejsc, w których nie dodano bakterii ($p<0,00006$), aczkolwiek ubytek Pb w glebie w obu przypadkach był znaczący statystycznie. Wykonana analiza zawartości ołowiu w kukurydzy potwierdziła, iż dodatek do gleby wybranych szczepów bakteryjnych w tym przypadku nie wpłynął w istotny sposób na zdolność do akumulacji metali ciężkich przez kukurydzę, gdyż ilość ołowiu w kukurydzy hodowanej na glebie bez dodatku wybranych szczepów bakterii wynosiła 1,96 mg ołowiu/g suchej masy roślin, natomiast w kukurydzy hodowanej na glebie z dodatkiem wybranych szczepów bakterii wynosiła 2,18 mg ołowiu / g suchej masy roślin.

Opisany we wcześniejszych pracach [1,4,5] pozytywny wpływ drobnoustrojów na zdolności roślin do akumulacji metali ciężkich dzięki obniżaniu toksyczności metali i przeprowadzaniu nieprzyswajalnych form w formy przyswajalne stwierdzono w niniejszej pracy. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, iż największy ubytek metali ciężkich w glebie zachodził w przypadku uprawy żyta, przy czym zanotowano, iż ubytek metali ciężkich w glebie, na której rosło żyto z w obecności testowanych szczepów bakterii, był większy w stosunku do ubytku ilości metali zawartych w glebie bez użytych szczepów bakterii. Jednocześnie analizy ilości metali ciężkich w roślinach potwierdziły, iż w życie rosnącym na glebie inokulowanej dodatkowo testowanymi szczepami bakterii akumulacja była bardziej wydajna.

WNIOSKI KOŃCOWE

Otrzymane wyniki wykazały, iż bioremediacja przy zastosowaniu wybranych szczepów bakteryjnych oraz gatunków roślin dała pozytywne wyniki. Analiza zawartości metali ciężkich w roślinach potwierdziła, iż wybrane gatunki roślin są zdolne do akumulacji metali ciężkich z testowanej gleby zawierającej odpady hutnicze.

LITERATURA

1. Burd G., Dixon D., Glick B.: *Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants.* Can. J. Microbiol., 46, 237-45, 2000.
2. de Souza M.P., Chu D., Zhao M., Zayed A.M., Ruzin S.E., Schichness D., Terry N.: *Rhizosphere bacteria enhance selenium accumulation and volatilization by Indian mustard.* Plant Physiol., 119, 565-574, 1999.
3. Fijałkowska S., Lisowska K., Długoński J.: *Bacterial elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals.* J. Basc Microbiol, 38, 361-369, 1998.
4. Gadd G.M., White C.: *Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology?* Bioremediation, 11, 353-359, 1993.
5. Meagher R.: *Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants.* Curr. Opin. Plant Biol, 3, 153-162, 2000.
6. Pikulski S., Wnuk Z.: *Prawo ochrony środowiska.* Agencja Wydawniczo-Reklamowa „Atrium T.T." 375-377.
7. Schmauder H.P., Gunther K., Schlosser D., Ludwig M., Zeth R.: *Application of microbiological methods for waste compound degradation in soil and water.* Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 95/4a, 1877-1880, 1994.

Abstract

Environmental contamination by heavy metals has been very important ecological and economical problem in the last few years. In Poland there are about 70 million tons of post flotation tailings containing non-ferrous metals, such as lead, zinc, copper and cadmium. Microbial bioremediation of heavy metals polluted soils, seems to be very useful, because of its simplicity and effectiveness.

The heavy metals polluted soil in Non-ferrous Metal Works in Katowice on Silesia region was planted with : *Zea mays, Secale cereale, Lupinus luteus* and *Helianthus annus* and four bacterial strains with known resistance to high level contents of zinc and lead compounds: *Rhodococcus equi* IM 6KB3 , *Rhodococcus equi* IM 62F5, strain IM 6116 and strain IM 6120. The plants were also planted without the bacterial strains as a control.

The most significant heavy metals uptake after four months of experiment was observed in samples, where *Secale cereale* was grown together with bacterial strains. It was found, that applying selected bacterial strains inoculation at the start of the experiment had a positive effect on microflora growth and heavy metals accumulation by plants.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach programu Unii Europejskiej INTERCOPERNICUS. Temat grantu: „Biodegradation of Toxic Organic Compounds in Waste Water and Accumulation of Heavy Metals", PL964126, contract IC15 CT 96-0716.

Składamy podziękowania Hucie Metali Nieżelaznych „Szopienice" w Katowicach za udostępnienie poletka doświadczalnego.

Recenzent: Prof. dr hab. Stanisław Kalembasa