

Jolanta TUREK-SZYTOW, Korneliusz MIKSCH, Katarzyna BARTOSIEWICZ

Politechnika Śląska
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
44-101 Gliwice, ul. Akademicka 2

TOKSYCZNOŚĆ I BIODEGRADACJA OLEJU ANTRACENOWEGO W GLEBIE

Streszczenie. Badano wpływ stężeń oleju antracenowego na aktywność dehydrogenaz w glebie uprawnej i leśnej. Wyznaczono charakterystyczne wielkości efektu toksycznego oleju antracenowego, tj. stężenia, które powodują 20%, 50% i 80% zahamowanie aktywności (EC_{20} , EC_{50} , EC_{80}). Następnie dla tak wyznaczonych stężeń prowadzono biodegradację analizując produkty rozkładu techniką analizy widm w podczerwieni (IR).

TOXICITY AND BIODEGRADATION OF ANTHRACENE OIL IN SOIL

Summary. The influence of anthracene oil on the dehydrogenase activity in the natural agricultural and forest soils was studied. Concentration of oil was determined as EC_{20} , EC_{50} , EC_{80} (EC- effect concentration), for which the detail analysis of infra-red spectrum were performed.

WSTĘP

Eliminacja węglowodorów z gruntów na drodze biologicznej jest możliwa w przypadku, gdy stężenie tych zanieczyszczeń nie przekracza 5-10%. Przy niższych stężeniach, tj. w zakresie 0,5%-1%, szybkość rozkładu nie zależy od stężenia węglowodorów [1]. Decydującym etapem przemian biochemicznych towarzyszących rozkładowi węglowodorów wchodzących w skład produktów ropopochodnych jest utlenianie (prostych bądź rozgałęzionych) alkanów oraz rozrywanie pierścieni aromatycznych [2,3]. Nierównomierne rozmieszczenie węglowodorów w gruncie, jak również zróżnicowany skład, a zatem i różne oddziaływanie na mikroflorę, utrudnia przebieg procesów rozkładu tych związków. Procesy fizyczne, takie jak parowanie czy sorpcja, wpływają także na ubytek wprowadzonego do gleby oleju. Na zewnętrznej powierzchni cząstek koloidalnych związków humusowych odbywa się sorpcja różnych substancji. Związki humusowe odznaczają się na ogół dużą zdolnością sorpcyjną, stąd ich zdolność do regulacji stężenia roztworów glebowych. Humus zwiększa też

zdolności buforowe gleb regulując odczyn. Jest to ważne dla rozwoju drobnoustrojów i procesów przez nie wywoływanych. Wiadomo, że na dynamikę rozkładu węglowodorów w glebie wpływają czynniki regulujące sorpcję. Gleba o dużej zawartości substancji organicznej wykazuje większą sorpcję związków niepolarnych. Wskaźnikiem pojemności sorpcyjnej w stosunku do kationów zasadowych jest suma zasad. Im wyższa kwasowość, tym mniejszy udział kationów zasadowych w kompleksie sorpcyjnym [4].

CEL I METODYKA BADAŃ

Celem przeprowadzonych badań było wyznaczenie stężeń toksycznych oleju antracenenowego, a następnie prześledzenie pierwszego etapu biodegradacji w celu określenia intensywności powstawania związków tlenowych techniką analizy widm w podczerwieni (IR).

Olej antracenenowy, powstający w wyniku destylacji węglowych smół surowych, jest mieszaniną węglowodorów aromatycznych, w tym WWA, parafinowych i naftalenowych. Analiza oleju antracenenowego metodą HPLC wykazała, że w 40% składa się on m.in. z następujących wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (tabela 1).

Tabela 1

Składniki oleju antracenenowego

Związek	Stężenie [mg/l]	%
Naftalen	0.089	4
Fenantren	0.240	10
Antracen	0.028	2
Fluoranten	0.246	11
Piren	0.317	14

Na naturalny proces rozkładu oleju antracenenowego wprowadzonego do gleby ma wpływ stężenie biogenów [5]. Jako modyfikację do gleby wprowadzono osad ściekowy. Dodatek osadu miał zapewnić dostępność mineralnych składników pokarmowych, takich jak azot, fosfor, siarka, wapń, potas, magnez. Badania toksyczności oleju antracenenowego prowadzono na dwóch rodzajach gleb uprawnej i leśnej (tabela 2). Wytypowane do badań gleby różniły się znacznie właściwościami fizykochemicznymi. Substancja organiczna, która jest podstawowym źródłem energii dla drobnoustrojów glebowych, jest dwukrotnie wyższa w glebie uprawnej.

W ocenie stanu środowiska glebowego i w praktyce ekologicznej ważna jest znajomość zawartości próchnicy. Próchnica zwiększa pojemność sorpcyjną (warunkuje od 30 -90% pojemności gleb mineralnych), wpływa na termikę (ciepło gleby), zwiększa pojemność wodną i buforowość gleby oraz działa stymulująco na wzrost roślin i mikroorganizmów [4]. W glebie leśnej poziom próchnicy jest o 20% wyższy niż w glebie uprawnej; podobny jest stosunek zawartości węgla w obu glebach.

Tabela 2

Analiza fizykochemiczna gleb

Lp.	Typ oznaczenia	Symbol	Rodzaj gleby		Jednostka
			leśna	uprawna	
1	Odczyn (w KCl)	pH	4,5	5	----
2	Substancja organiczna	Xs.org	2,5	4,9	%
3	Węgiel organiczny	Xc	1,93	1,59	%
4	Azot ogólny	Xn	0,17	0,13	%
5	Zawartość próchnicy	Xs,próch	3,33	2,72	%
6	Kwasy huminowe	Xh	0,014	0,095	%
7	Kwasowość hydrolytyczna	H	6,5	3,9	me/100 g gleby
8	Suma zasad	S	0,87	1,96	me/100 g gleby

W poziomie próchnicznym gleb uprawnych zawartość węgla jest przeważnie 10 razy większa od zawartości azotu (stosunek C:N=10). W glebach bardzo czynnych biologicznie (żyźnych) stosunek C:N wynosi około 8:1. W glebach mineralnych o małej aktywności biologicznej (suche gleby piaskowe, podmokłe gleby o różnej granulacji) stosunek C:N może osiągać 12:1. Obie wytypowane gleby należą do gleb o małej aktywności biologicznej, ponieważ stosunek C:N jest na poziomie 12:1

Badania prowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie wyznaczono stężenia oleju antracenowego, które powodują 20%, 50% i 80% zahamowanie aktywności dehydrogenaz w badanej glebie (EC₂₀, EC₅₀, EC₈₀). Stopień toksyczności ST poszczególnych stężeń oleju antracenowego wyznaczono według wzoru:

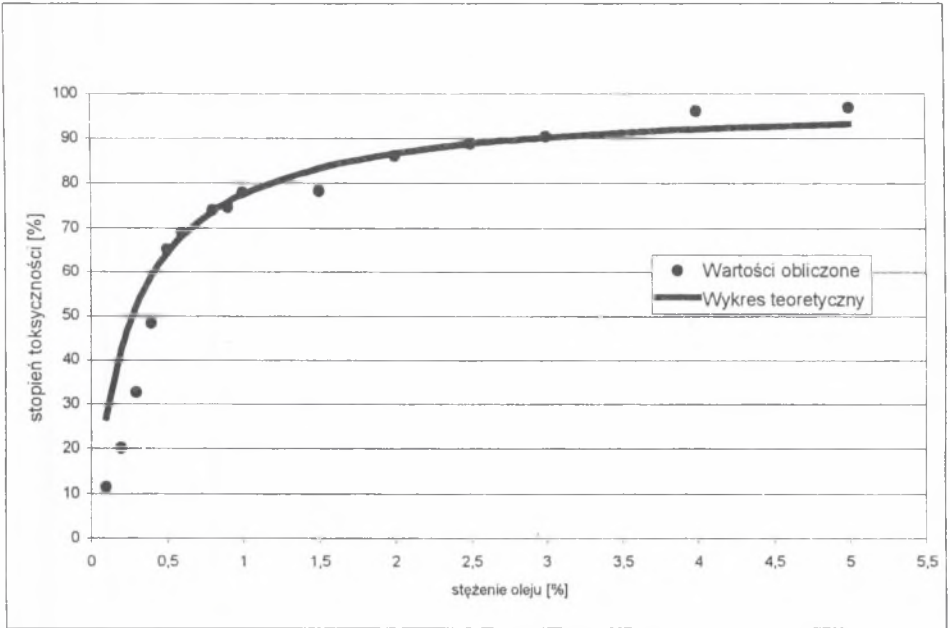
$$ST = \frac{AD_0 - AD_{c^r}}{AD_0} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie:

AD_0 - średnia aktywność dehydrogenaz próbek nie poddanych działaniu oleju antracenowego,

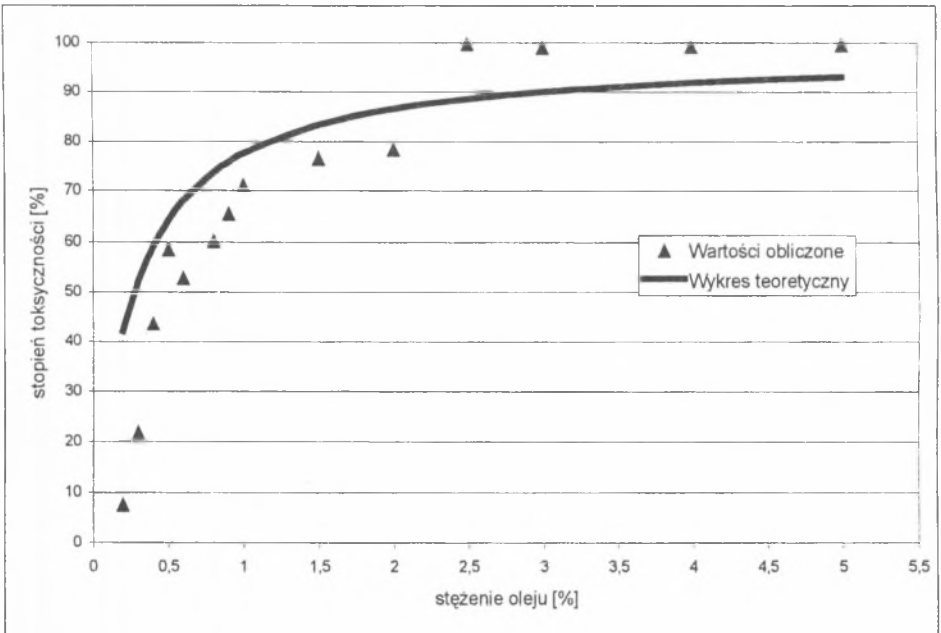
AD_{c^r} - średnia aktywność dehydrogenaz próbek w obecności oleju antracenowego.

Na tej podstawie sporządzono wykres zależności stopnia toksyczności w funkcji stężenia substancji toksycznej, jaką jest olej antracenowy $ST=f(C^T)$ (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Stopień toksyczności oleju antracenenowego w glebie uprawnej

Fig. 1. Degree of toxicity anthracene oil in agricultural soil



Rys. 2. Stopień toksyczności oleju antracenenowego w glebie leśnej

Fig. 2. Degree of toxicity anthracene oil in forest soil

Wyznaczono także matematyczne równanie przebiegu toksyczności badanego oleju. Uzyskano równanie o postaci:

$$ST = ST_{\max} \frac{C^T}{K + C^T} \quad (2)$$

gdzie:

ST - stopień toksyczności,

C^T - stężenie substancji toksycznej,

K - stężenie oleju antracenowego powodujące 50% zahamowanie aktywności (EC_{50}).

Wartości teoretyczne efektu toksycznego:

Dla gleby uprawnej

$ST_{\max} = 100\%$

$K = 0,6\%$ (5,4 mg oleju/g gleby)

Dla gleby leśnej

$ST_{\max} = 98\%$

$K = 0,3\%$ (2,6 mg oleju/g gleby)

W glebie leśnej efekt toksyczny wywołany jest przez stężenie oleju antracenowego o 50% niższe niż dla gleby uprawnej. Wartości teoretyczne stężeń powodujących 50% zahamowanie aktywności dehydrogenaz to 5,4 mg oleju/g gleby uprawnej i 2,6 mg oleju/g gleby leśnej.

Do badań nad biodegradacją przyjęto następujące stężenia oleju antracenowego:

Dla gleby uprawnej

$EC_{20} = 0,3\%$ (3 mg/g gleby)

$EC_{30} = 0,6\%$ (6 mg/g gleby)

$EC_{80} = 2,0\%$ (20 mg/g gleby)

Dla gleby leśnej

$EC_{20} = 0,2\%$ (2 mg/g gleby)

$EC_{30} = 0,4\%$ (4 mg/g gleby)

$EC_{80} = 1,5\%$ (15 mg/g gleby)

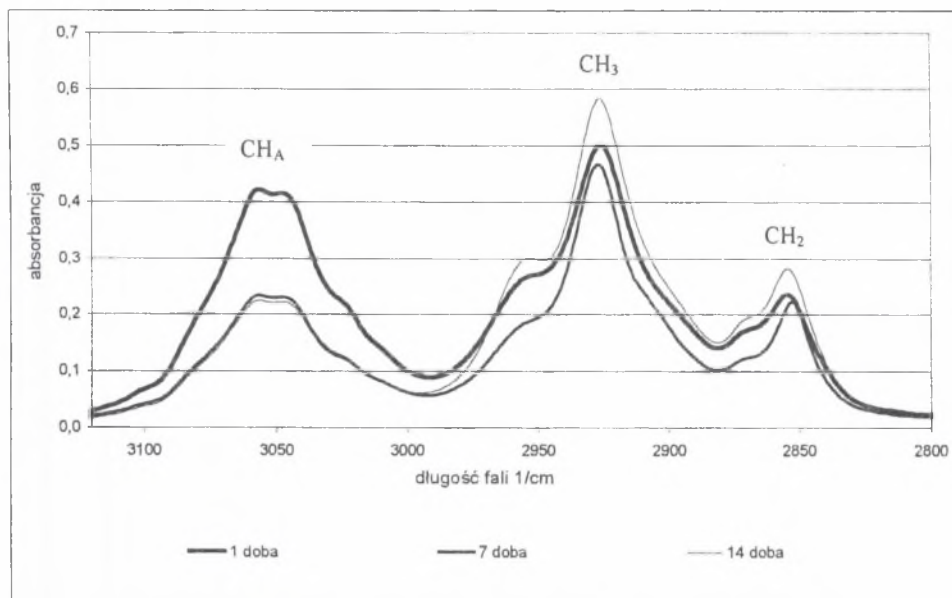
W etapie drugim, dla tak wyznaczonych stężeń, badano przez okres trzech tygodni proces biodegradacji oleju antracenowego kontrolując aktywność gleby i pobierając próbki do analizy chemicznej. W celu wzbogacenia gleby w związki biogenne (głównie azot i fosfor) przygotowano także próbki gleb modyfikowane osadem ściekowym (10 g osadu/100 g gleby).

Próbki powietrznie suchych gleb ekstrahowano w aparacie Soxhleta przez 4 godziny cykloheksanem. Ekstrakty oczyszczano na żelu krzemionkowym i odparowywano do stałej masy. Następnie suchą pozostałość rozpuszczano w czterochlorku węgla (CCl_4) i analizowano w zakresie podczerwieni $4000 \text{ cm}^{-1} - 900 \text{ cm}^{-1}$.

ANALIZA I Dyskusja Wyników

Znajomość szybkości degradacji związków, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, jest niezbędnym warunkiem oszacowania ich trwałości i toksyczności w środowisku glebowym. Kinetykę rozkładu ksenobiotyków w glebie określa się przeważnie na podstawie ich strat w glebie w funkcji czasu bez uwzględnienia mechanizmów tych strat.

Przykładową analizę gleby leśnej skażonej olejem antracenowym (stężenie oleju $2 \text{ mg/g}_{\text{gleby}}$) w zakresie podczerwieni w obszarze 3100 cm^{-1} do 2850 cm^{-1} przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Przykładowa analiza w podczerwieni oleju antracenowego podczas biodegradacji w glebie leśnej
 Fig. 3. Example of infra-red analysis of anthracene oil during biodegradation in forest soil

Na podstawie pomiarów absorbancji w zakresie grup CH_A (grupa CH w pierścieniu aromatycznym), CH_3 , CH_2 obserwowano zmiany zachodzące w glebach, do których wprowadzono olej antracenowy w odpowiednich stężeniach.

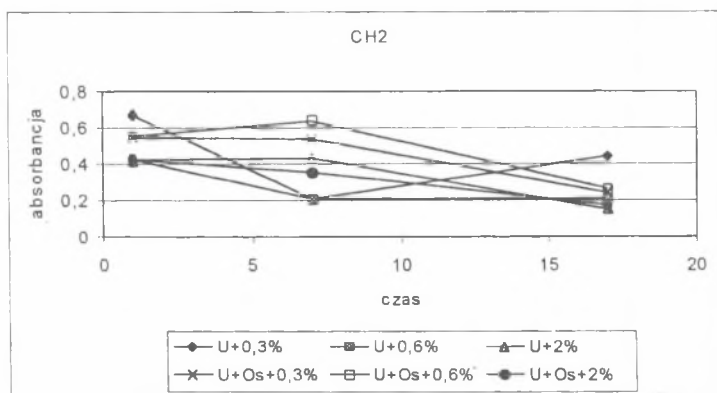
Biodegradacja oleju antracenowego w glebie uprawnej

W glebie uprawnej z dodatkiem oleju w ilości 3 mg/g i 6 mg oleju/g_{gleby} obserwujemy w pierwszym etapie spadek ilości grup CH_2 , a następnie wzrost po 14 d. Podobna tendencja występuje w przypadku grup CH_3 (rys. 4 i 5). Początkowy spadek jest wynikiem utleniania związków alifatycznych. W kolejnym etapie następuje rozrywanie pierścienia aromatycznego związków zawartych w oleju, co powoduje z kolei przyrost grup CH_2 i CH_3 . W glebie z dodatkiem oleju w ilości 6 mg/g i 20 mg/g obserwujemy stopniowy spadek ilości grup CH_2 i CH_3 . Jednoczesny wzrost ilości grupy CH_A (CH_A - grupy C-H w pierścieniu aromatycznym) w stosunku do grup CH_2 świadczy o wyczerpywaniu łatwo utleniających substratów w postaci związków alifatycznych (rys. 6). W przypadku gleby z dodatkiem oleju 20 mg/g nie zachodzi rozrywanie pierścienia aromatycznego, ponieważ ilość grup CH_A pozostaje na stałym poziomie. Dodatek osadu ściekowego powoduje wzrost stężenia ilości grup CH_2 i CH_3 , co świadczy o wprowadzeniu łatwo utleniającego substratu w postaci związków alifatycznych (rys. 4 i 5). Dodatek oleju wpływa jednak na ubytek grup CH_A , co świadczy o utlenianiu pierścienia aromatycznego do związków alifatycznych, jednocześnie obserwujemy ubytek grup CH_2 i CH_3 . Można przypuszczać, że zachodzi tu zjawisko „kometabolizmu”.

Biodegradacja oleju antracenenowego w glebie leśnej

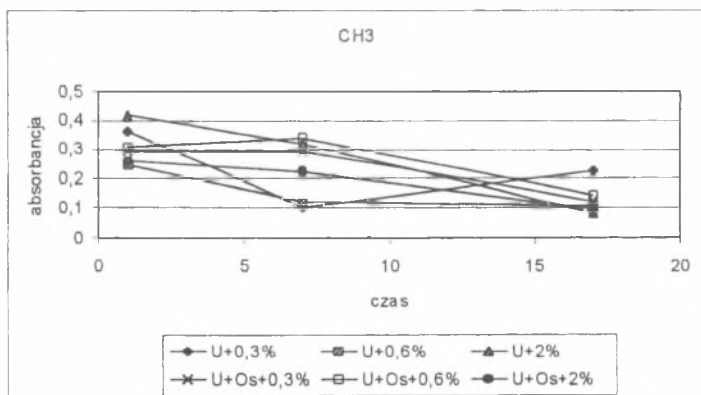
W glebie leśnej z dodatkiem oleju antracenenowego 2 mg/g i 4 mg/g wzrasta ilość grup CH_2 i CH_3 , jednocześnie następuje spadek w zakresie grup CH_A . Świadczy to o postępującym procesie tworzenia się związków alifatycznych. Dla pozostałych gleb wartości odpowiadające ilości grup CH_2 i CH_3 utrzymują się na stałym poziomie (rys. 7 i 8). Znaczący ubytek CH_A zauważalny jest jedynie w przypadku gleby z dodatkiem osadu i stężeniem oleju antracenenowego 15 mg/g.

W glebie leśnej i glebie modyfikowanej osadem, do których wprowadzono olej antracenenowy w ilości 2 mg/g, obserwuje się nieznaczny wzrost ilości grup CH_A po 7 dniach prowadzenia procesu, poczym nieznaczny ich ubytek (rys. 9). Podobny mechanizm obserwujemy w glebie z dodatkiem 15 mg oleju/g. Prawdopodobnie jest to wynikiem sorpcji wprowadzonego oleju antracenenowego w pierwszym etapie. Utrzymywanie wilgotności gleby na poziomie 25% powoduje prawdopodobnie uwalnianie zaadsorbowanego związku do roztworu glebowego, co umożliwiło jego biodegradację.



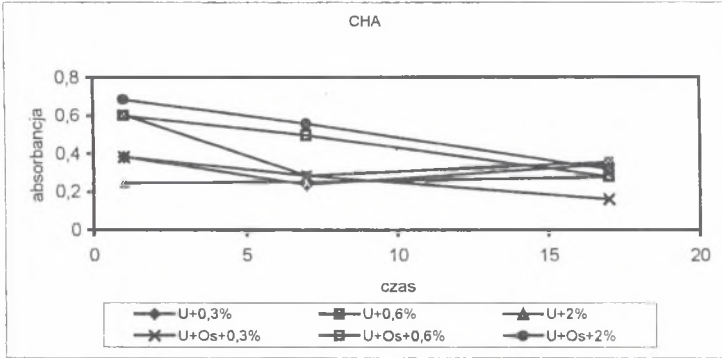
Rys. 4. Zmiany absorbancji grupy CH_2 w czasie dla gleby uprawnej

Fig. 4. CH_2 group oscillation changes during the exp. in agricultural soil

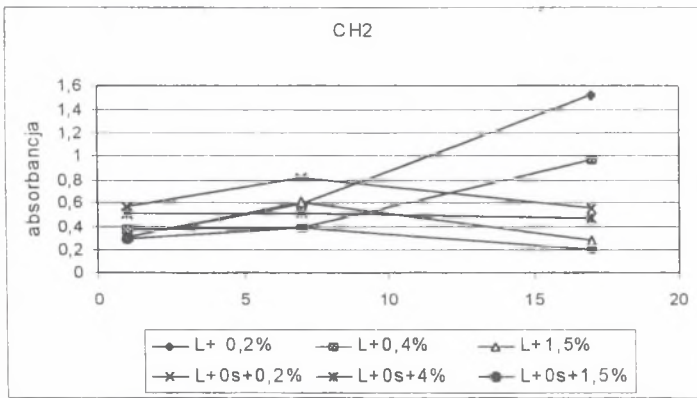


Rys. 5. Zmiany absorbancji grupy CH_3 w czasie dla gleby uprawnej

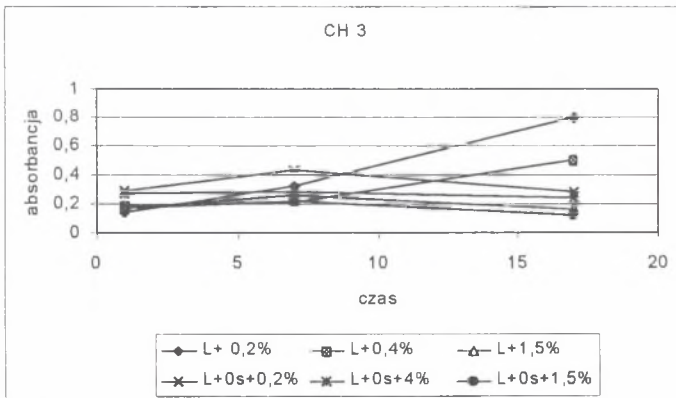
Fig. 5. CH_3 group oscillation changes during the exp. in agricultural soil



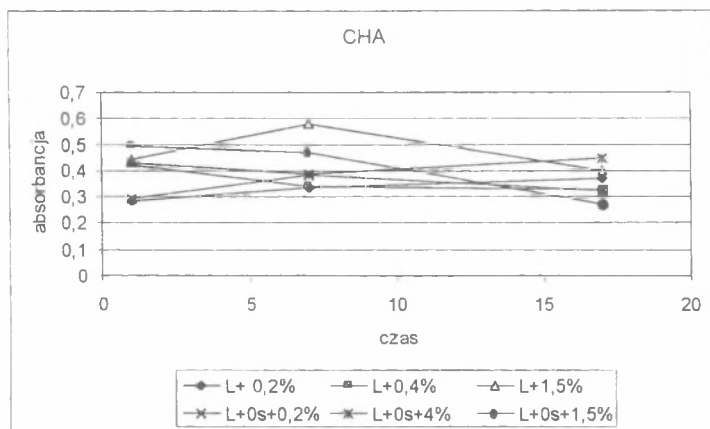
Rys. 6. Zmiany absorbancji grupy CH_A w czasie dla gleby uprawnej
 Fig. 6. CH₂ group oscillation changes during the exp. in agricultural soil



Rys. 7. Zmiany absorbancji grupy CH₂ w czasie dla gleby leśnej
 Fig. 7. CH₂ group oscillation changes during the exp. in forest soil



Rys. 8. Zmiany absorbancji grupy CH₃ w czasie dla gleby leśnej
 Fig. 8. CH₃ group oscillation changes during the exp. in forest soil



Rys. 9. Zmiany absorbancji grupy CH_3 w czasie dla gleby leśnej
 Fig. 9. CH_3 group oscillation changes during the exp. in forest soil

Chemizm biodegradacji oleju antracenowego

W celu stwierdzenia rozkładu związku organicznego należy wykazać obecność typowych grup funkcyjnych [6]. W tym przypadku celowe staje się przeanalizowanie obecności w widmie pasm charakterystycznych dla wiązań z tlenem: $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{O}-\text{H}$. Zazwyczaj bardzo silne pasmo grupy karbonylowej odpowiadające drganiom rozciągającym wiązania $\text{C}-\text{O}$ leży w zakresie $1900 \div 1600 \text{cm}^{-1}$ (pasmo około 1700cm^{-1} odpowiada wolnej grupie $\text{C}=\text{O}$).

Zaobserwowano mechanizm przemian podobny do mechanizmu degradacji węglowodorów alifatycznych. Dane literaturowe podają, że pierwszym etapem w biologicznym rozkładzie związków alifatycznych jest utlenianie łańcucha węglowodorowego do alkoholi, a następnie do kwasu karboksylowego. Badania wykazały, że mikroorganizmy przetwarzają węglowodory na alkohole i kwasy karboksylowe o takim samym łańcuchu jak substrat. Reakcje te zachodzą tylko i wyłącznie w obecności tlenu [2,3]. Pasma w zakresie wiązania $\text{C}=\text{O}$ ($1740 \div 1700 \text{cm}^{-1}$) sugerują powstanie ketonów, aldehydów lub kwasów. Po dwóch tygodniach badań zmniejszyła się intensywność pasm w omówionym zakresie. Stopniowe zmniejszanie się pasm w zakresie wiązań tlenowych sugeruje, iż w pierwszej kolejności następuje utlenianie powstałych już związków tlenowych, dopiero później mineralizowany jest kolejny łańcuch bądź pierścień węglowodorowy.

W przypadku mieszaniny węglowodorów otrzymuje się złożone mieszaniny alkoholi i kwasów karboksylowych, przy czym alkohole pierwszorzędowe dominują jako składnik mieszaniny reakcyjnej. Utlenianie łańcucha węglowodorowego poprzez pośrednio tworzące się alkohole, kwasy karboksylowe może prowadzić do powstania kwasu cytrynowego, który w cyklu kwasów trójkarboksylowych może być mineralizowany do dwutlenku węgla i wody. Ponieważ kwasy karboksylowe łatwiej niż alkohole ulegają metabolizmowi, nie wykryto ich obecności w analizowanych próbkach. W doświadczeniu nie zaobserwowano związków epoksydowych, powstających głównie w przypadku utleniania węglowodorów nienasyconych i aromatycznych.

WNIOSKI

1. Wyznaczone stężenia toksyczne oleju antracenowego to:

<i>Dla gleby uprawnej</i>	<i>Dla gleby leśnej</i>
EC ₂₀ = 0,3% (3 mg/g gleby)	EC ₂₀ = 0,2% (2 mg/g gleby)
EC ₅₀ = 0,6% (6 mg/g gleby)	EC ₅₀ = 0,4% (4 mg/g gleby)
EC ₈₀ = 2% (20 mg/g gleby)	EC ₈₀ = 1,5% (15 mg/g gleby)
2. Badania pozwoliły stwierdzić, że w okresie 14 dni zapoczątkowany zostaje proces utleniania oleju antracenowego w glebie.
3. W glebach wytworzyła się mieszanina częściowo utlenionych związków węglowodorowych, a stopniowe zmniejszanie się intensywności pasm w zakresie wiązań tlenowych sugeruje, iż w pierwszej kolejności następuje utlenianie powstałych już związków tlenowych, dopiero później metabolizowany jest kolejny łańcuch bądź pierścień węglowodorowy.
4. O postępującym procesie degradacji świadczą pasma występujące w zakresie drgań charakterystycznym dla wiązań wodorowych i alkoholi. Wyraźny pik tlenowy w zakresie odpowiadającym wiązaniu C=O sugeruje powstanie ketonów, aldehydów lub kwasów.

LITERATURA

1. Siuta J.: *Podstawy biodegradacji ropopochodnych składników w glebach i odpadach*, Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 1993.
2. Stewart J.E., Kallio R.E.: *Bacterial hydrocarbon oxidation, ester formation from alkanes*, Journal of Bacteriology, 1959.
3. Klug M.J., Markovetz A.J.: *Degradation of hydrocarbons by members of the Genus Candida, oxidation of n-alkanes and 1-alkanes by Candida Lipolytica*, Journal of Bacteriology, 1987.
4. Siuta J.: *Gleba – diagnozowanie stanu i zagrożenia*, Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 1995.
5. Turek-Szytów J., Miksch K., Popławska M.: *Wpływ oleju antracenowego na właściwości fizykochemiczne gleby*, Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Bioremediacja gruntów”, Wisła Bukowa 1998.
6. Postulka K., Turek J., Mrozowska J., Szeja W.: *Biodegradacja węglowodorów przy użyciu natywnych mikroorganizmów*, Materiały III Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 1995.
7. Olańczuk-Neyman K.: Chemical and bacteriological assessment of soil contamination of petroleum-derivatives fuel reloading station, *Biotechnologia* (50-60), 1994.

Abstract

Crude oil and its derivatives - introduced to an eco-system - create a series of disadvantageous phenomena. Degradation effect of petroleum derivatives depend on accent of nitrogen and phosphor, amount of water as well as on toxic and mutagenic effect to environment. Removal of hydrocarbons from soil is possible using biological methods, when concentration of these contamination does not exceed 5-10%. At lower concentrations i.e. within the range 0.5% - 1%, decomposition rate does not depend on hydrocarbons concentration [7].

The examinations carried out shown the following toxic effect of anthracene oil in:

- The toxicity effect of anthracene oil:

In agricultural soil

EC₂₀= 0,3% (3 mg oil/g soil)

EC₅₀= 0,6% (6 mg oil/g soil)

EC₈₀= 2% (20 mg oil/g soil)

In forest soil

EC₂₀= 0,2% (2 mg oil/g soil)

EC₅₀= 0,4% (4 mg oil/g soil)

EC₈₀= 1,5% (15 mg oil/g soil)

- The progressive biodegradation process of oil is evidenced by bands of oscillations which are characteristic for hydrogen bonds and alcohols. The distinct oxygen peak within the range which corresponds to C=O bond suggests creation of ketones, aldehydes or acids.
- In soils, a mixture of partly oxidized hydrocarbon compounds was created, and partial decrease of intensity of bands within oxygen bonds suggests that in the beginning - oxidation of already created oxygen compounds follows, and later the particular decomposed hydrocarbon chain is metabolised.

Recenzent: Prof. dr hab. Barbara Maliszewska-Kordybach