

Ewa ZABŁOCKA-GODLEWSKA, Korneliusz MIKSCH
Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska, Gliwice

EFEKTY ZASTOSOWANIA ROŚLINY MOTYŁKOWEJ I BIOPREPARATU NATURALNEGO W ZWIĘKSZENIU POTENCJAŁU DEGRADACYJNEGO GLEB O ZASTARZAŁYM ZANIECZYSZCZENIU SUBSTANCJAMI ROPOPOCHODNYMI

Streszczenie. Badano efekty zastosowania rośliny motylkowej (koniczyny białej - *Trifolium pratense*) oraz bioaugmentacji namnożoną mikroflorą autochtoniczną gleby o zastarzałym zanieczyszczeniu substancjami ropopochodnymi. Badaną glebę pobrano z terenu rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach i zaklasyfikowano jako silnie zdegradowaną o stosunku C:N=100:0,7. Najlepsze efekty usunięcia zanieczyszczeń ropopochodnych uzyskano w przypadku zastosowania samej koniczyny.

THE EFFECTS OF USING PAPILIONACEOUS PLANT AND NATURAL BIOPREPARATION IN ORDER TO INCREASING DEGRADING POTENTIAL OF AGED-POLLUTED BY PETROLEUM HYDROCARBONS SOIL

Summary. The effects of using papilionaceous plant (*Trifolium pratense*) and multiplied autochthonous microorganisms bioaugmentation in aged-petroleum-polluted soil was studied. The samples of soil were taken from refinery in Czechowice-Dziedzice and classified as heavy degraded with proportion C:N=100:0,7. The best effect on petroleum hydrocarbons removing was achieved in case of using plant only.

Wstęp

Większość substancji ropopochodnych trafiających do środowiska gruntowo-wodnego ulega procesom biologicznych przemian, polegających na ich biotransformacji lub biodegradacji. Zakres i szybkość procesów rozkładu zależą od wielu czynników środowiskowych i mikrobiologicznych, właściwości gleby, „wieku” zanieczyszczenia, jego stężenia i substancji towarzyszących oraz przede wszystkim właściwości tych związków [12, 16, 18].

Przyjmuje się, że rekultywacja metodami biologicznymi jest możliwa, gdy stężenie substancji ropopochodnych w gruncie nie przekracza 10% [6].

W celu intensyfikacji procesów usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntów w technologiach oczyszczania zaleca się stosowanie zabiegów wpływających na zwiększenie biomasy degradatorów poprzez np. stosowanie biopreparatów lub wysiewanie odpowiednich gatunków roślin [7, 13, 17, 18].

Cel badań

Celem przeprowadzonych badań było porównanie wpływu zarówno oddzielnego, jak i łącznego zastosowania modyfikacji, polegające na wysianiu rośliny motylkowej oraz wprowadzeniu biopreparatu naturalnego, na aktywność biologiczną, właściwości fizykochemiczne gleby oraz możliwości biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

Metodyka badań

Do badań użyto gleby o zastarzałym zanieczyszczeniu substancjami ropopochodnymi, pobranej z terenu wysypiska odpadów ropopochodnych rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach. Materiał pobrano z warstwy 0-30 cm i zaklasyfikowano jako glebę gliniastą. Założono hodowle wazonowe, w których utrzymywano wilgotność na poziomie 25 % wagowych przez cały okres trwania badań.

Wykonano oznaczenia analityczne zawartości frakcji ciężkich węglowodorów (metoda wagowa), WWA (HPLC z detekcją fluorescencyjną), niepolarnych węglowodorów alifatycznych TPH (chromatografia gazowa), węgla organicznego, azotu ogólnego i pH [14]. Oznaczenia mikrobiologiczne obejmowały oznaczenia metodą posiewu powierzchniowego ogólnej liczby bakterii heterotroficznych na podłożu YS, grzybów na podłożu Czapek-Doxa, promieniowców na podłożu z arginina [15].

Próby badawcze poddano przewidzianym w eksperymencie modyfikacjom polegającym na zaszczepleniu biopreparatem (bioaugmentacja) i wysianiu roślin. Do bioaugmentacji użyto mieszaniny mikroorganizmów autochtonicznych, wyizolowanych z badanej gleby, których wprowadzona biomasa odpowiadała wartości $6,5 \times 10^5$ komórek na gram gleby. Rośliną zastosowaną w eksperymencie była roślina motylkowa – koniczyna biała *Trifolium repens* L.

Kontrolę stanowiła próba niemodyfikowana. Próby umieszczono w fitotronie w celu zapewnienia stabilnych warunków termicznych i świetlnych.

Wyniki i dyskusja

W ocenie stopnia zanieczyszczenia węglowodorami grunty zawierające w poziomie próchnicznym ponad 0,04% ekstraktu eterowego uznaje się za zanieczyszczone [18]. Zawartość substancji ropopochodnych w badanej glebie wskazuje na jej silną degradację. Główny ładunek zanieczyszczeń stanowiły tu frakcje ciężkie – ok.16%, TPH – 1,9% oraz relatywnie niewielka zawartość WWA 2-6 pierścieniowych, których suma wynosiła 32,135 mg/kg s.m. gleby (0,0032%) (tab. 1). Istotnym kryterium oceny zdegradowania gleby jest stosunek zawartości węgla do zawartości azotu w próchnicznej warstwie gleby [18]. Na ogół przyjmuje się optymalny dla biodegradacji stosunek C:N jako 250:10, zaleca się również proporcję 100:10 [9, 18]. Stosunek C:N = 100 : 0,7 (tab. 2) i brak szaty roślinnej w miejscu poboru próby wskazuje na silną degradację badanej gleby.

Tabela 1

Zawartość węglowodorów ropopochodnych w glebie gliniastej
(TPH, frakcje ciężkie i WWA)

TPH [g/kg suchej masy]	Frakcje ciężkie [g/kg suchej masy]	WWA [g/kg s.m.]	
19,11	159,11	0,032	
		2-3 p WWA	4-6 p WWA
		0,011	0,021

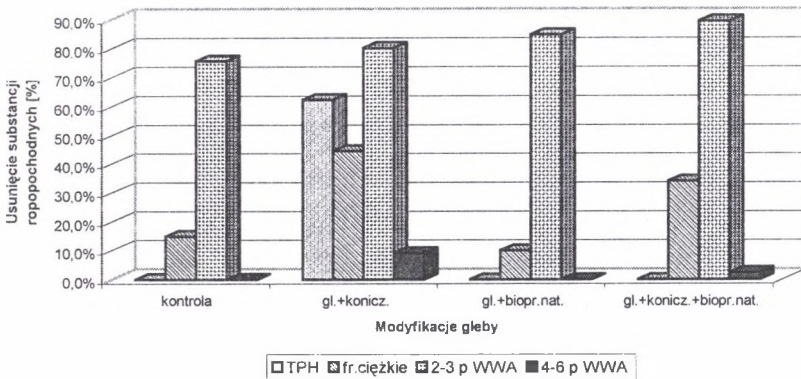
Tabela 2

Zawartość węgla organicznego i azotu ogólnego oraz pH zanieczyszczonej gleby gliniastej

Rodzaj modyfikacji	N _{org} [g N _{org} /kg gleby]				C [gC/ kg gleby]				pH			
	0 td.	4 td.	8 td.	12 td.	0 td.	4 td.	8 td.	12 td.	0 td.	4 td.	8 td.	12 td.
kontrola	1,24	1,06	1,13	1,18	175	182	164	201	5,8	6,3	6,6	6,0
gl. + koniczyna		1,33	1,37	1,31		161	179	133		5,8	6,2	5,9
gl. + biopreparat		1,17	1,18	1,16		165	236	182		6,4	6,3	6,5
gl. + konicz. + biopr.		1,43	1,63	1,55		179	201	157		6,1	6,3	5,9

Efektywność procesów biodegradacji zależy od wielu czynników, jednym z nich jest zwiększenie liczebności i aktywności rodzimej mikroflory degradacyjnej, a w razie potrzeby wzbogacenie (bioaugmentacja) gleby mikroorganizmami intensywnie rozkładającymi zanieczyszczenia [3, 5, 8, 10, 18].

Uzyskane wyniki wskazują, że procesy biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych przebiegały w próbie z koniczyną, gdzie stopień usunięcia poszczególnych frakcji był następujący: TPH - 63%, frakcji ciężkich - 44%, 4-6 pierścieniowych WWA 9%. Usunięcie 2-3 p. WWA (80%) było zbliżone do poziomu kontroli (76%) (rys. 1). Niska masa cząsteczkowa i wysokie ciśnienie par 2 p. WWA mogło być przyczyną znacznego udziału procesów abiotycznych w stratach tej grupy [12, 16].



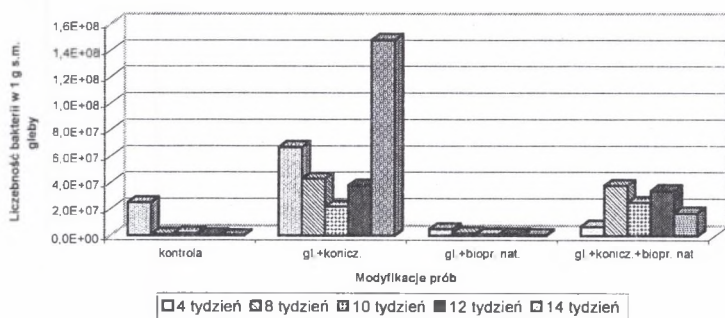
Rys. 1. Procent usunięcia substancji ropopochodnych w zależności od wprowadzonej modyfikacji gleby
Fig. 1. Percentage of removing petroleum hydrocarbons in modified soil

Najwyższa efektywność eliminacji zanieczyszczeń ropopochodnych w próbie z koniczyną, koresponduje z uzyskanymi w niej najwyższymi wartościami liczebności bakterii i grzybów, które w stosunku do kontroli w pewnych okresach wzrastały 100-krotnie i więcej (rys. 2 i 3). Rośliny motylkowe, dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi, są w dużym stopniu niezależne od zawartości azotu w glebie, nie uczestniczą w powiększaniu jego deficytu, a poprzez skład wydzielin korzeniowych wzbogacają glebę w ten składnik [1, 16, 18]. W badanej glebie w próbach z roślinami już w pierwszych tygodniach stwierdzono większy przyrost azotu ogólnego (tab. 2).

Pokrywające się fluktuacje liczebności bakterii i grzybów wskazują na opisywaną przez Cernigłę [4] możliwość współdziałania obu grup w detoksykacji gleby, polegającą na metabolizowaniu przez grzyby trudno rozkładalnych węglowodorów i dostarczaniu bakteriom łatwiej przyswajalnych, pośrednich produktów rozkładu. Bakterie z kolei poprzez możliwość produkcji biosurfaktantów mogą zwiększać biodostępność substratów wzmagając ich desorpcję z cząstek glebowych.

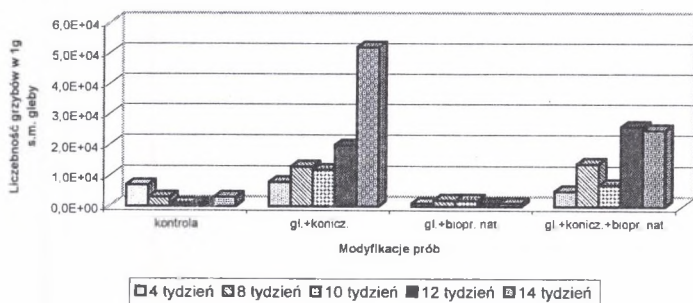
W próbie z koniczyną nie stwierdzono obecności promieniowców, w pozostałych próbach ich liczebność była tak niska (ok. 10^1 spor/ g s. m. gleby), że nie miała wpływu na

przebieg badanych procesów. Wyeliminowanie tej grupy mikroorganizmów mogło być wynikiem silnej konkurencji pokarmowej ze strony dynamicznie rozwijającej się mikroflory bakteryjnej lub antybiozy ze strony licznie reprezentowanych grzybów.



Rys. 2. Wpływ zastosowanych modyfikacji gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi na zmiany ogólnej liczebności bakterii

Fig. 2. Influence of using modifications in hydrocarbons contaminated soil on changes of total bacterial number



Rys. 3 Wpływ zastosowanych modyfikacji gleby skażonej substancjami ropopochodnymi na zmiany liczebności grzybów

Fig. 3. Influence of using modifications in hydrocarbons contaminated soil on changes of total fungi number

W eksperymencie zastosowano biopreparat naturalny - namnożoną biomasę mieszaniny mikroorganizmów autochtonicznych. Na zalety stosowania takich zabiegów wskazują liczni autorzy [2, 3, 10], gdyż otrzymane w ten sposób biopreparaty są stosowane w warunkach, do jakich są zaadaptowane. Wprowadzona do gleby biomasa mikroorganizmów odpowiadała ilości 4×10^5 komórek na gram gleby. Kańska [5] podaje, że wraz ze wzrostem liczby wprowadzonych komórek bakterii od 2×10^3 do 2×10^7 kom./g s.m. gruntu efekt eliminacji zanieczyszczeń wzrósł od 39 do 94%.

Wprowadzenie biopreparatu do badanej gleby nie przyniosło jednak oczekiwanych rezultatów. Podobnie jak w kontroli nie stwierdzono tu usunięcia TPH i 4-6 p. WWA,

usunięcie frakcji ciężkich spadło o 5%, o 10% wzrosło jedynie usunięcie 2-3 p. WWA (rys. 1). Po wprowadzeniu biopreparatu naturalnego nie stwierdzono również wzrostu liczebności bakterii i grzybów; wręcz przeciwnie obserwowano ich spadek (rys. 2 i 3). Zważywszy na wiek skażenia badanej gleby (kilkadziesiąt lat) należy spodziewać się, że w okresie tym zaszły procesy selekcji i adaptacji mikroflory, ustaliła się więc swoista równowaga i wykształciły mechanizmy homeostatyczne, które przeciwdziałają jakiegokolwiek ingerencji z zewnątrz, w tym również próbom sztucznego zagęszczenia mikrobiocenozy, co szczególnie podkreśla Alexander [1].

Łączne zastosowanie rośliny i biopreparatu spowodowało większy niż w kontroli i próbie z samym biopreparatem wzrost usunięcia frakcji ciężkich (34%), 2-3 p. WWA (89%) oraz 4-6 p. WWA (2%) (rys. 1). Wyniki te są jednak gorsze aniżeli przy zastosowaniu samej koniczyny. Podobne tendencje obserwowano w przypadku przyrostów biomasy mikroorganizmów (rys. 2 i 3). Wyniki powyższe wskazują, że skala wzrostów liczebności mikroorganizmów, która przekłada się na efektywność biodegradacji zanieczyszczeń, jest wypadkową stymulacji ze strony zastosowanej rośliny i konkurencji pokarmowej ze strony innych grup mikroorganizmów.

Podsumowanie

Wieloletni charakter skażenia badanej gleby wpłynął na ustalenie się w niej swoistej równowagi układu – homeostazy, której mechanizmy ograniczały możliwości zasiedlenia się introdukowanej namnożonej mikroflory autochtonicznej. Natomiast wysianie rośliny motylkowej stworzyło korzystne warunki rozwoju mikroorganizmów i biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych, a analizy chemiczne wykazały wpływ tej rośliny na wzrost zawartości azotu w glebie. Z kolei łączne zastosowanie rośliny i biopreparatu wpłynęło na ograniczenie pozytywnego oddziaływania samej rośliny na liczebność mikroorganizmów i procesy usuwania zanieczyszczeń. W celu uzyskania dobrych efektów w praktyce bioremediacyjnej, jakiegokolwiek próby modyfikacji gleby *in situ* należałoby więc poprzedzić badaniami laboratoryjnymi, obrazującymi skuteczność i zasadność stosowania danych zabiegów.

LITERATURA

1. Alexander M.: Ekologia mikroorganizmów. PWN, Warszawa 1975.
2. Bastiaens L., Springael D., Remes G., Vereecken J., Diels L., Verachtert H.: Metabolization and cometabolization of single PAHs and PAH mixtures in liquid cultures, soil slurries and dry solid reactors (DSR). Int. Symp. Env. Biot. April 1997, Ostende 1997, p.109-112.
3. Bauman-Kaszubska H., Ciarcieńska B.: Zastosowanie biopreparatów z własnych hodowli oraz biopreparatów handlowych. Materiały II Sympozjum Naukowego „Zastosowanie biopreparatów bakteryjnych do oczyszczania wody, ścieków i gruntów”, Płock 1997, s. 13-21.
4. Cerniglia C.E.: Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19, 1997, p. 324-333.
5. Kańska Z., Łebkowska M., Sztompka E.: Eliminacja zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntu. Bioinżynieria, zesz.1, Politechnika Warszawska, Warszawa 1997, s.231-242.
6. Kołwzan B., Traczewska T., Piekarska K., Juchniewicz M.: Mikrobiologiczna ocena możliwości bioremediacji gruntów skażonych produktami naftowymi, Materiały V Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Ustroń-Jaszowiec 1997, s.11-16.
7. Kondzielski I., Buczkowski R.: Fitoremediacja – nowa, obiecująca metoda stosowana w ochronie środowiska. Ekologia i Technika, vol. VII, nr 3, 1999, s.79-84.
8. Kurek E., Stec A., Staniak D.: Bioremediacja ex situ gleby skażonej produktami ropopochodnymi, Ekoinżynieria, nr 9(34), 1998, s.5-11.
9. Kwapisz E.: Problemy biodegradacji węglowodorów ropy naftowej. Materiały VI Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wrocław 1999, s. 227-229.
10. Łebkowska M.: Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym, Gaz, Woda i Technika Sanitarna, 3/96, 1996, s. 117-119.
11. Malicka M.: Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów ropopochodnych. Materiały firmy „Malex” sp. z o. o. Łódź, 1996.
12. Maliszawska-Kordybach B.: The relationship between the properties of PAH and the rate of their disappearance from different soils, Toxicol. Environ. Chem., 66, 1998, p.47-52.

13. Muszyński A., Karwowska E., Kaliszewski M.: Bioremediacja gleby z produktów ropopochodnych przy zastosowaniu mikroorganizmów immobilizowanych na nośnikach stałych. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, 8/96, 1996, s.299-301.
14. Ostrowska A., Gawliński S., Szczubiałka Z.: *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*. Warszawa 1991.
15. Praca zbiorowa pod red. Mrozowskiej J.: *Laboratorium z mikrobiologii ogólnej i środowiskowej*. Skrypt Politechniki Śląskiej, nr 2144, Wydawnictwo Polit. Śl., Gliwice 1999.
16. Reilley K.A., Banks M.K., Schwab A.: Organic chemicals in the environment. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere, *J. Environ. Qual.* 25, 1996, p.212-219.
17. Salt D. E., Smith R. D., Raskin I.: Phytoremediation , *Annual review plant physiology. Plant molecular biology*, Annual Reviews no.49, 1998, p.643-668.
18. Siuta J.: *Biodegradacja ropopochodnych składników w glebach i w odpadach*. Instytut Ochrony Środowiska, Warszawa 1993.

Recenzent: Prof.dr hab.inż. Jan Suschka

Abstract

In studied aged-petroleum-polluted soil was specific balance – homeostasis, that mechanisms were limiting possibilities of introduction multiplied autochthonous microorganisms. Presence of papilionaceous plant (*Trifolium pratense*) appeared to be benefit modification, which made good conditions for microorganisms' growth and biodegradation processes. Chemical analysis showed plant influence for increase of nitrogen concentration in degraded soil. Bioaugmentation and connected using plant and bioaugmentation wasn't as good modification as literatura date show because of limiting microorganisms' growth and biodegradation processes. So, the best modification for removing hydrocarbons from soil was using papilionaceous plant only. In order to achieve good bioremediation results *in situ* it is necessary to do laboratory researches, which can shows and make us sure that our choice is correct.