

Słowa kluczowe: trotyl, trinitrotoluen, TNT, Microtox, luminescencja, biodegradacja, remediacja

Grzegorz PASTERNAK*, Barbara KOŁWZAN*

ZMIANY TOKSYCZNOŚCI GLEBY SKAŻONEJ TRINITROTOLUENEM PODDANEJ PROCESOM REMEDIACJI EKSTRAKCYJNEJ I BIODEGRADACJI

Olbrzymie zapotrzebowanie na materiały wybuchowe kruszące doprowadziło do skażenia środowiska trinitrotoluenem. Zneutralizowanie ryzyka środowiskowego, jakie niesie ze sobą jego depozycja staje się bardzo istotne. Przedmiotem przeprowadzonych badań była ocena wpływu remediacji ekstrakcyjnej oraz biodegradacji na zmiany toksyczności gleby skażonej trinitrotoluenem oraz innymi związkami nitroaromatycznymi. Testy przeprowadzone z wykorzystaniem bakterii luminescencyjnych wykazały wysoką toksyczność skażonej gleby, szczególnie jej najdrobniejszych frakcji. Pomimo przeprowadzonej wieloetapowo remediacji ekstrakcyjnej toksyczność ta spadła jedynie nieznacznie, zauważalne zmiany toksyczności zanotowano jednak dla prób poddanych procesom biodegradacji, przy czym wzrosła ona dla próby wzbogaconej w substancje odżywcze.

1. WPROWADZENIE

Produkcja materiałów wybuchowych na wielką skalę od dziesięcioleci prowadziła do zanieczyszczenia środowiska. Spośród wszystkich związków wysokoenergetycznych największy problem stanowią związki nitroaromatyczne, a zwłaszcza trinitrotoluen (TNT). Jego wytwarzanie wymaga dużych ilości wody w celach oczyszczania. Powstałe w ten sposób ścieki, zwane czerwoną wodą zawierają do 30 innych związków nitroaromatycznych, włączając w to również związki wybuchowe [1]. Produkcja TNT niesie ze sobą duże zagrożenie toksykologiczne, którego niwelacja staje się koniecznością i obowiązkiem.

W niniejszej pracy badaniom poddano glebę skażoną głównie trinitrotoluenem, dokonując oceny toksykologicznej jej najbardziej pylistych frakcji oraz próbek przed i po procesach biodegradacji i remediacji ekstrakcyjnej.

* Politechnika Wroclawska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, ul Wybrzeże Wyspiańskiego, grzegorz.pasternak@pwr.wroc.pl.

2. MATERIAŁY I METODY

Próbki badanych gleb pobrane zostały z głębokości 20 cm z terenów skażonych związkami nitroaromatycznymi (woj. Dolnośląskie, Polska). Próbki wysuszono i przesiano przez sito o średnicy oczek równej 2 mm. Zawartość zanieczyszczeń w glebie została oceniona grawimetrycznie po ich uprzedniej ekstrakcji przy użyciu dichlorometanu, stężenie TNT zmierzono przy użyciu zestawu D TECH TNT Test Kit (Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA) zgodnie z dostarczoną przez producenta instrukcją. Podstawowe właściwości badanej gleby zawarto w tabeli 1.

Do bioremediacji gleb zastosowano inokulant w postaci zawiesiny sporządzony na bazie mikroorganizmów autochtonicznych. Z obu gleb wyizolowano czyste szczepy bakterii – 14 z gleby D oraz 13 z gleby T, przed eksperymentem hodowano je na agarze odżywczym. Po 72 godzinnej inkubacji biomasę z każdej płytki zbierano i doprowadzano do gęstości optycznej (OD_{600}) równej 0.6 przy długości fali 600 nm. W pierwszej fazie eksperymentu próbki doprowadzono do wilgotności 50% WHC z wykorzystaniem: wody destylowanej (kontrola 2), podłoża mineralnego Siskinej i Trocenko [2] oraz przygotowanych inokulatów bakteryjnych. W trakcie 60 dniowej inkubacji w 25°C, wilgotność utrzymywano na tym samym poziomie przy użyciu wody destylowanej. Po procesie biodegradacji oznaczono zawartość TNT w próbach gleby inokulowanej oraz nieinokulowanej (próby z wodą destylowaną), po czym dokonano oceny toksyczności z wykorzystaniem metody Microtox.

Aby dokonać oceny toksyczności poszczególnych frakcji gleby, przesiewano ją przez sита o średnicach oczek 0,1; 0,3 oraz 1,2 mm uzyskując w ten sposób frakcje o średnicach znajdujących się w przedziałach < 0,1 mm, 0,1–0,3 mm oraz 0,3–1,2 mm.

Remediację ekstrakcyjną prowadzono w sześciu etapach, każdy z nich obejmował wytrząsanie frakcji gleby o średnicy cząstek poniżej 1,2 mm w szklanych kolbkach przez 24 godziny. Następnie zawiesinę glebową dekantowano, a uzyskany w ten sposób materiał wirowano przez 10 minut przy prędkości 12000 rpm w temperaturze 20°C, aby zapobiec wytrącaniu się TNT. Supernatant filtrowano przez sączek bibułowy, a następnie przez filtr bakteriologiczny 0,45µm. Wszystkie próby były ważone, a powstały ubytek wody uzupełniany był do tej samej masy, znajdujący się w probówce osad zawracany był ponownie do kolbek.

Wszystkie ekstrakty wodne, w których oznaczano toksyczność uzyskiwane były w sposób analogiczny jak w przypadku remediacji. Gleba wytrząsana była w proporcji 10 g suchej masy do 20 ml wody destylowanej.

Toksyczność ekstraktów była mierzona względem *Vibrio fischeri* – bakterii luminescencyjnych, u których spadek intensywności luminescencji jest wynikiem toksyczności badanego materiału. Oznaczeń dokonano metodą Microtox (Strategic Diagnostics Inc., Newark, USA) z wykorzystaniem testu „basic test” zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

3. WYNIKI

Wartość pH badanej gleby pozwoliła zaklasyfikować ją do gleb kwaśnych, co zapewne było rezultatem uwalniania azotanów i azotynów w trakcie biodegradacji związków nitroaromatycznych. Na podstawie analizy granulometrycznej badaną glebę zaklasyfikowano do piasków średnich. Zawartość TNT w glebie oznaczono na poziomie 100 mg kg^{-1} natomiast ilość związków ekstrahowanych dichlorometanem na poziomie 2644 mg kg^{-1} .

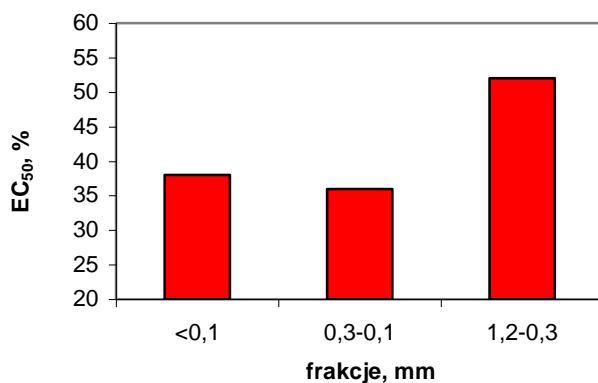
Tab 1. Wybrane właściwości badanej gleby

Właściwość	Jednostka	Gleba D
Związki ekstrahowalne dichlorometanem	mg kg^{-1}	2644
TNT	mg kg^{-1}	100
pH	w H_2O	5,74
	w KCl	5,13
Piasek	%	95
Fracja ilasta	%	3
Pył	%	2

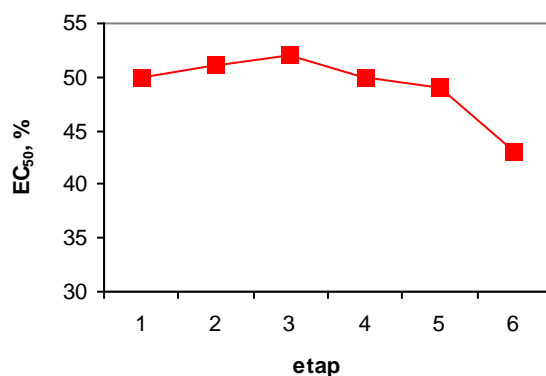
Badaną glebę rozdzielono na frakcje zawierające ziarna o średnicy zawierającej się w trzech przedziałach. Zmierzone wartości EC_{50} wykazały, że największą toksycznością charakteryzowały się najdrobniejsze, najbardziej pyliste frakcje gleby. W przypadku frakcji poniżej 0,1 mm oraz frakcji 0,1–0,3 mm nie zaobserwowano znaczącej różnicy uzyskanych wartości i wynosiły one 36 oraz 38%. Znaczną różnicę zaobserwowano jednak w przypadku frakcji 0,3–1,2 mm gdzie wartości EC_{50} kształtowały się na poziomie 52% (rys. 1).

Gleba poddana była wielokrotnej ekstrakcji z wykorzystaniem wody destylowanej jako ekstrahentu. W pierwszych trzech etapach obserwowano nieznaczny spadek toksyczności badanych ekstraktów, która malała w przedziale od 50 do 52%. Kolejne trzy dni eksperymentu przyniosły wzrost toksyczności, czego wynikiem był spadek uzyskanych wartości EC_{50} do poziomu 41% w ostatnim, szóstym etapie remediacji (rys. 2).

W wyniku przeprowadzonego eksperymentu wazonowego zaobserwowano znaczny spadek zawartości trinitrotoluenu w glebie na skutek biologicznego rozkładu zanieczyszczeń. Gleba wyjściowa przed bioremediacją zawierała TNT w stężeniu 100 mg kg^{-1} . Poddanie jej procesom biodegradacji doprowadziło do 70% spadku zawartości trotylu w przypadku próbki D_k – gleby nieinokulowanej, oraz 85% w przypadku próbki D_i – gleby inokulowanej (rys. 3).

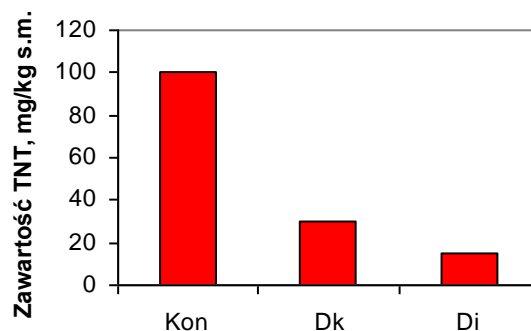


Rys. 1. Toksyczność frakcji gleby o różnych średnicach

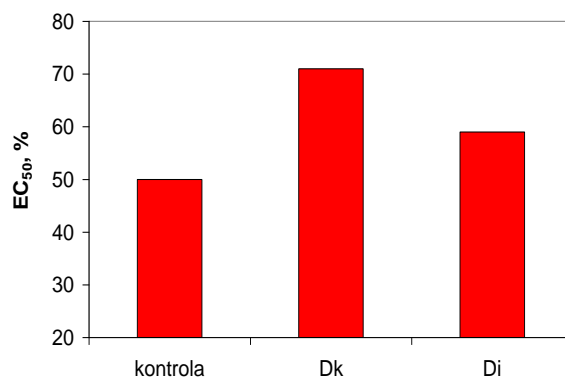


Rys. 2. Zmiany toksyczności gleby spowodowane wielostopniową ekstrakcją z wykorzystaniem wody destylowanej

Konsekwencją biodegradacji był nie tylko spadek zawartości trinitrotoluenu w poszczególnych próbkach gleby, ale również toksyczności jej ekstraktów. Podczas gdy próbę kontrolną charakteryzowała toksyczność na poziomie $EC_{50} = 50\%$, zanotowano znaczny spadek toksyczności ekstraktu do poziomu 71% w glebie D_k (nieinokulowanej). Zastanawiający jest fakt, że pomimo największego spadku stężenia TNT w glebie inokulowanej w przypadku próbki D_i spadek toksyczności jej ekstraktu był mniejszy o 12% i osiągnął wartość 59% .



Rys. 3. Zawartość TNT w glebie oznaczana metodą immunoenzymatyczną. Kon – gleba przed procesami biodegradacji, k – próba z wodą destylowaną, i – próba z inokulum



Rys. 4. Zmiany toksyczności gleby spowodowane biodegradacją związków nitroaromatycznych

4. DYSKUSJA

Poszczególne frakcje gleby charakteryzowała zróżnicowana toksyczność, największa dla frakcji o najmniejszych średnicach, co jest efektem zwiększonej powierzchni czynnej cząstek mineralnych wraz ze spadkiem średnicy przy zachowaniu tej samej masy próby. Brak znaczącej różnicy pomiędzy toksycznością najdrobniejszych cząstek może być spowodowany zróżnicowanym udziałem i charakterem glebowej materii organicznej w poszczególnych frakcjach, co w przypadku łatwo adsorbowanego przez próchnicę TNT [3] może mieć kolosalne znaczenie. Te najbardziej pyliste frakcje gleby niosą ze sobą bowiem największe ryzyko dla organizmów żywych.

Remediacja ekstrakcyjna doprowadziła do niewielkich zmian toksyczności w pierwszym jej okresie – pomimo dwukrotnego nadmiaru wody w stosunku do gleby toksyczność ekstraktów malała w niewielkim stopniu, co ponownie wskazuje na istotną rolę silnej sorpcji TNT na powierzchni połączeń mineralno – organicznych. W ostatnim okresie remediacji toksyczność rosła w każdym kolejnym etapie procesu wymywania. Wynik taki wskazuje na postęp biodegradacji próbek inkubowanych

w warunkach sprzyjających rozwojowi mikroorganizmów. W każdym etapie wmywania komórki były zawracane do próby wraz z peletem, który stanowiły cząstki gleby, ze względu na zastosowaną dużą prędkość wirowania. Powstałe w wyniku biodegradacji metabolity charakteryzować się mogły zwiększoną toksycznością w porównaniu do substratu wyjściowego, co zostało potwierdzone również przez innych autorów [4].

Potwierdzają to także wyniki uzyskane w badaniach nad wpływem bioremediacji na toksyczność gleb skażonych materiałami wybuchowymi. Stwierdzono w nich, że wzrost efektywności biodegradacji nie przekładał się na obniżenie toksyczności gleb. Wskazuje to na wzrost roli toksycznych metabolitów lub produktów reakcji chemicznych w układach będących sumami czynników: składniki podłoża – mikroorganizmy – reakcje chemiczne – reakcje fotochemiczne, na co wskazywały również inne wyniki badań podjętych przez autorów niniejszej pracy [5].

4. WNIOSKI

Badana gleba charakteryzowała się wysoką toksycznością, a jej najdrobniejsze frakcje stanowią zagrożenie dla organizmów żywych.

Przemiany zachodzące w glebie w wyniku procesów mikrobiologicznych lub abiotycznych mogą prowadzić do zwiększenia ryzyka związanego ze skażeniem gleb związkami nitroaromatycznymi.

Remediacja ekstrakcyjna prowadzi do zużycia znacznych ilości wody nie rozwiązując jednocześnie problemu toksyczności, podczas gdy, prowadzona w prosty sposób biodegradacja prowadzi do znacznego jej spadku.

LITERATURA

- [1] Urbański T. *Chemistry and technology of explosives*. Pergamon Press, Oxford, 1-80, 1985.
- [2] Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L. *Bioremediation of soils contaminated with explosives*. Journal of Environmental Management, Elsevier, 2004, 70, 291-307.
- [3] Ssiskna W.N., Trocenko J.A. *Svojstva novogo stamma Hyphomicrobium ispolusicego odhouglerodnyie soiedinenie*. Mikrobiologij, 5, 765-770, 1974.
- [4] Honeycutt M.E., Jarvis A.S., McFarland V.A. *Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1996, 35, 282-287.
- [5] Pasternak G. *Mikroorganizmy degradujące związki nitroaromatyczne*. Politechnika Wroclawska, Wroclaw, 64-91, 2007.

TOXICITY CHANGES OF SOIL CONTAMINATED WITH EXPLOSIVES DURING EXTRACTIVE REMEDIATION AND BIODEGRADATION PROCESSES

Explosives' use on a big scale caused the great contamination of the environment with nitroaromatic compounds. Therefore the neutralization of the environmental risk associated with its deposition in the environment has become a matter of a great importance. Such neutralization can be achieved by different treatment methods. In this study we assessed the influence of remediation and bioremediation methods on toxicity of soil in assay with *Vibrio fischeri*. The extractive remediation resulted the increase of toxicity when the controlled biodegradation significantly decreased it.