

WPLYW ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA ORTOKSYLENEM NA LICZEBNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

Krystyna PRZYBULEWSKA¹, Andrzej WIECZOREK², Ewa KRZYWY-GAWROŃSKA³,
Natalia ZARĘBA¹, Anita TURAŁA¹

¹ Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska

² Instytut Chemii i Podstaw Ochrony Środowiska

³ Zakład Rekultywacji i Chemii Środowiska

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny

krystyna.przybulewska@zut.edu.pl

STRESZCZENIE

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny wpływu zanieczyszczenia gleby ortoksylenem na liczebność żyjących w niej drobnoustrojów glebowych należących do trzech grup taksonomicznych: bakterii, promieniowców i grzybów. Zastosowano trzy różne poziomy skażenia ksylenem domieszkując glebę jego nasyconym roztworem wodnym (R1) oraz roztworami R2 i R3 otrzymanymi poprzez rozcieńczenie roztworu R1 odpowiednio w stosunku 1:5 i 1:10. Próbkę kontrolną stanowiła gleba niezanieczyszczona. Ksylen wprowadzony do gleby wpływał na żyjące w niej mikroorganizmy. Wielkość tych zmian zależała od wprowadzonej ilości zanieczyszczenia, czasu jego działania i grupy badanych mikroorganizmów. Najbardziej niekorzystny wpływ wywierał ksylen na grzyby glebowe oraz bakterie, a mniejszy na promieniowce. Najsilniejsze niekorzystne oddziaływanie na mikroorganizmy wywierało skażenie gleby najbardziej stężonymi roztworami tj. R1 i R2. Mniejsze ujemne skutki powodował roztwór R3. Niekorzystny wpływ ortoksyleny na drobnoustroje utrzymywał się w zależności od ich grupy taksonomicznej przez okres od miesiąca u bakterii do ponad 6 tygodni u grzybów.

1. Wstęp

Lotne związki organiczne (LZO) zostały wyróżnione przez wielu badaczy jako jedne z najbardziej toksycznych substancji i to sprawiło, że zaczęto poświęcać im więcej uwagi. Istotnym faktem jest to, że lotne związki organiczne są bardzo niebezpieczne zwłaszcza dla organizmów żywych. Wśród nich wyróżniamy najbardziej toksyczną grupę związków tzw. BTX czyli: benzen, toluen i izomery ksylenu. Związki te są szeroko stosowane jako paliwa przemysłowe czy rozpuszczalniki i należą do najpowszechniej zidentyfikowanych substancji występujących w zanieczyszczonych wodach, glebie czy powietrzu [1-4]. Według Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska BTX są priorytetowym zagrożeniem, ze względu na kancerogeność oraz predyspozycje do akumulacji w środowisku [5-7].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu izomeru ksylenu (o-ksylen) na liczebność w glebie bakterii, promieniowców i grzybów.

2. Materiały i metody

Badania prowadzono na glebie sklasyfikowanej zgodnie z nomenklaturą PTG [8] jako glinę piaszczystą. Została ona pobrana z poziomu orno-próchniczego (0-20 cm) na obszarze Równiny Gumienieckiej, w miejscowości Ostoja w pobliżu Szczecina. Jest to czarna ziemia, zaliczana do IIIa i IIIb klasy bonitacyjnej. Miąższość poziomu próchniczego wynosiła około 30 cm. Odczyn gleby w dniu założenia doświadczenia wynosił $pH_{H_2O} = 7,0$.

Przygotowano próbki glebowe o masie 0,5 kg i zanieczyszczono roztworami ortoksylenu o trzech różnych stężeniach, w ilości 160 ml/kg gleby powietrznie suchej uzyskując wilgotność na poziomie 50-60% maksymalnej pojemności wodnej (m.p.w.). Sposób przygotowania roztworów podano w tabeli 1. Próbkę kontrolną stanowiła gleba bez dodatku ortoksylenu. Otrzymano w ten sposób 4 kombinacje o różnym stopniu zanieczyszczenia. Zanieczyszczone próbki gleby umieszczono w szklanych pojemnikach i wstawiono do eksykatora o pojemności 15 l. Wraz z badaną próbką umieszczano w eksykatorze dwie otwarte kolby po 250 ml roztworu ortoksylenu użytego do zanieczyszczenia gleby. Inkubację prowadzono w temperaturze 22 °C. Próbki gleb do analiz pobierano każdorazowo w trzech powtórzeniach począwszy od dnia założenia doświadczenia (termin 1), a następnie po 3, 7, 14, 28 i 48 dniach. Określano w nich liczebność drobnoustrojów (j.t.k.): bakterii na podłożu według Bunt'a i Rowiry [9], grzybów na podłożu według Martina [10] i promieniowców na podłożu według Cygano-wa i Zukovra [11].

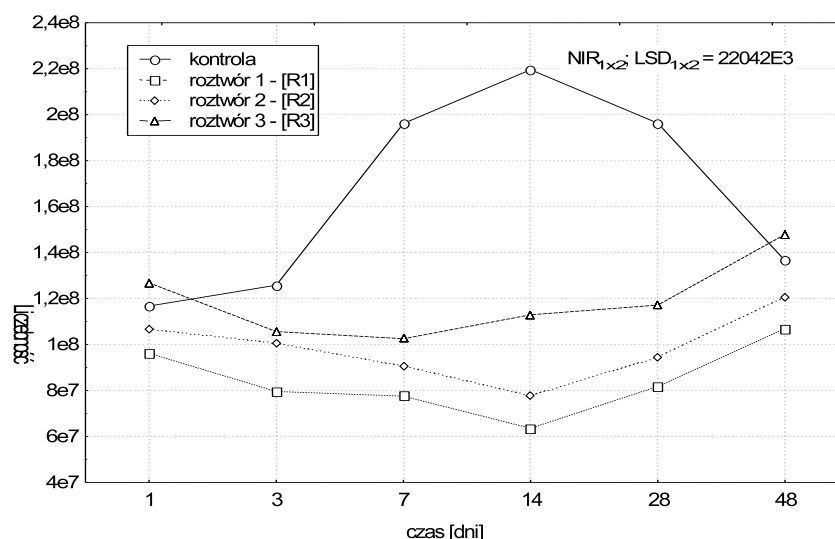
Otrzymane wyniki poddano ocenie statystycznej za pomocą analizy wariancji. Istotność wpływu badanych czynników testowano testem Duncan'a na poziomie $p = 0,05$.

Tabela 1. Schemat przygotowania roztworów ortoksylenu do zanieczyszczenia próbek glebowych

Roztwory	H ₂ O , cm ³	Ilość ortoksylenu lub roztworu cm ³
R1	5000	1,5
R2	500	100 roztworu R1
R3	500	50 roztworu R2

3. Wyniki i dyskusja

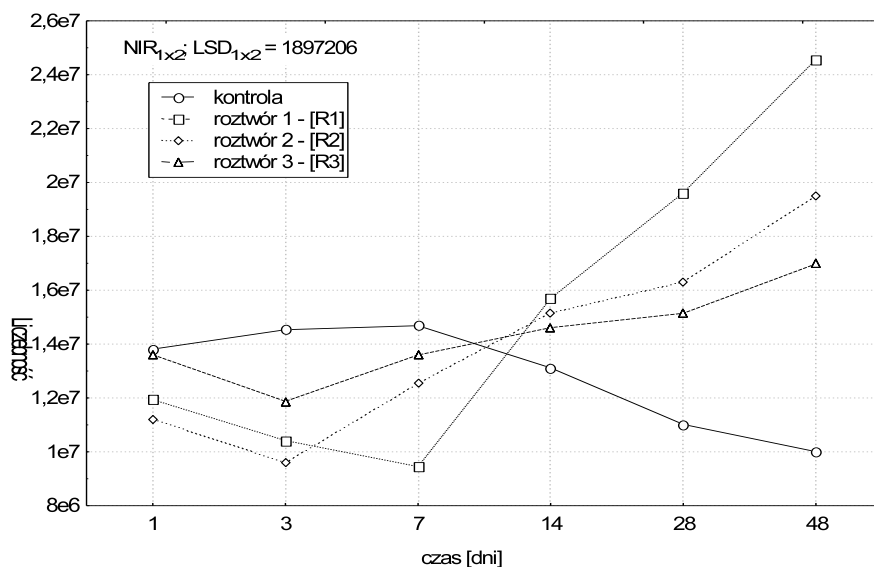
Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że ksylen wprowadzony do gleby wpływał na żyjące w niej mikroorganizmy. Wielkość tych zmian zależała od wprowadzonej ilości zanieczyszczenia, czasu jego działania i grupy badanych mikroorganizmów (rys.1-3) .



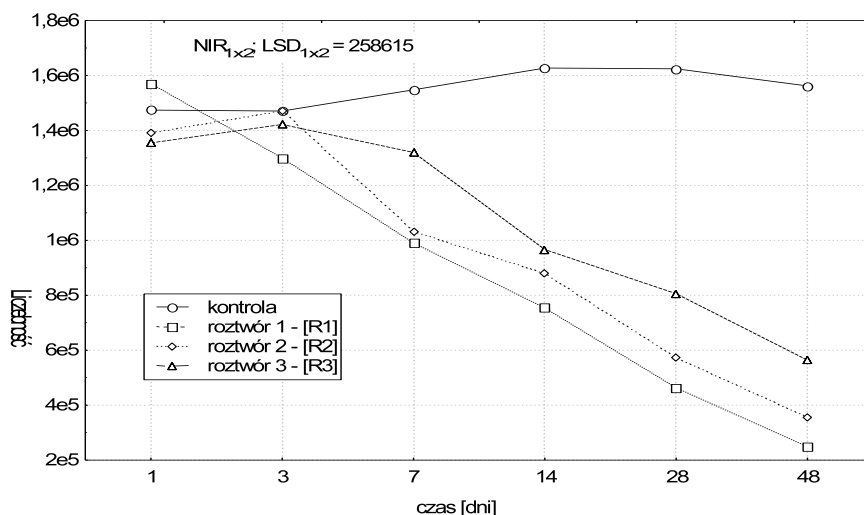
Rys. 1. Wpływ zanieczyszczenia gleby ortoksylenem na liczebność bakterii (j.t.k.) w 1 g s.m.

Liczebność bakterii glebowych w glebie niezanieczyszczonej (kontrola) na początku doświadczenia wynosiła 116 mln j.t.k. w 1g s.m. gleby (rys. 1) i do 3 dnia utrzymywała się na zbliżonym poziomie. W dniach 7 i 14 odnotowano jej wyraźny wzrost, a w dniach 28 i 48 spadek do poziomu zbliżonego do wyjściowego. Najwyższą liczebność bakterii 219 mln j.t.k.

przypadająca na 1 g s. m. gleby stwierdzono po 2 tygodniach od założenia doświadczenia. Zanieczyszczenie gleby ortoksylenem działało niekorzystnie na bakterie glebowe. Z wyjątkiem ostatniego dnia pomiarowego dla gleby skażonej roztworem o najniższym stężeniu ksylenu (R3) w pozostałych przypadkach zaobserwowano mniejszą liczebność mikroorganizmów w próbkach skażonych niż w próbce kontrolnej. W szczytowym momencie różnice liczebności sięgały nawet 50-70%. Te niekorzystne zmiany nasilały się pomiędzy 3 a 14 dniem pomiarowym w którym nastąpiła kulminacja. Z czasem niekorzystne oddziaływanie malało i pod koniec doświadczenia liczebność bakterii osiągnęła wartości zbliżone do kontroli w glebie o najmniejszym stężeniu ksylenu (R3) i od 10-20% mniejsze w glebie zanieczyszczonej bardziej stężonymi roztworami ksylenu (R2 i R1).



Rys. 2. Wpływ zanieczyszczenia gleby ortoksylenem na liczebność promieniowców (j.t.k.) w 1 g s.m.



Rys. 3. Wpływ zanieczyszczenia gleby ortoksylenem na liczebność grzybów (j.t.k.) w 1 g s.m.

Liczebność promieniowców w glebie kontrolnej na początku doświadczenia wynosiła prawie 14 mln j.t.k. w 1g s.m. gleby (rys. 2). Zanieczyszczenie gleby ksylenem niezależnie od wielkości zastosowanego stężenia obniżyło w niej liczebność promieniowców o 20 do

40% poniżej wartości kontrolnej na czas do 7 dnia pomiarowego. Później w skażonych glebach wystąpiło intensywne namnażanie promieniowców prowadzące do wzrostu ich liczebności do wartości przekraczających kontrolę nawet o 60-80%.

Liczebność grzybów w glebie kontrolnej na początku doświadczenia wynosiła prawie 1,5 mln j.t.k. w 1g s.m. gleby (rys. 3). W kolejnych terminach doświadczalnych utrzymywała się na zbliżonym poziomie z odchyleniami rzędu 100 tys. j.t.k. na 1 g s.m. Zanieczyszczenie gleby ortoksylenem niezależnie od zastosowanego stężenia wpływało istotnie na obniżenie liczebności mikroorganizmów. W czasie trwania doświadczenia liczebność grzybów systematycznie zmniejszała się aż do wartości mniejszej o około 80% od kontroli dla przypadku gleby najsilniej skażonej (roztwór R1). Niekorzystny wpływ ksyleny na mikroorganizmy w glebach mniej skażonych, to jest roztworami R2 i R3 był mniejszy o odpowiednio 10% i 20% w stosunku do stężenia R1.

Oceniając znaczenie przynależności mikroorganizmów do grupy taksonomicznej, należy stwierdzić że najbardziej niekorzystny wpływ wywierał ksylen na grzyby glebowe, których liczebność była średnio mniejsza się o 37%. Jak podaje Van Groenestijn i in.[12] grzyby są mniej wymagające niż bakterie ale za to mają mniejszą zdolność adaptacji, co można tłumaczyć otrzymane w niniejszych badaniach długotrwałe niekorzystne działanie na nie ksyleny. W przypadku bakterii ich liczebność w próbkach zanieczyszczonej gleby była średnio mniejsza od kontroli o 34% ale była ona skutkiem przeciwstawnych efektów, to jest wzrostu liczby mikroorganizmów w glebie nieskażonej i jej spadku w glebach skażonych. Wraz z upływem czasu niekorzystne oddziaływanie zmniejszało się, a pod koniec doświadczenia wystąpiło nawet działanie stymulujące. Mniejszy wpływ badana substancja wywierała na promieniowce glebowe. W początkowym okresie nastąpiło obniżenie ich liczebności średnio o 20 %, a następnie stymulacja wzrostu w porównaniu do obiektu kontrolnego. Podobny wzrost liczebności promieniowców w glebie zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi obserwowali Kosinkiewicz i Lubczyńska (1986) [13].

Wpływ stężenia ortoksylenu na mikroorganizmy glebowe był zgodny z oczekiwaniami to jest najsilniejszy w przypadku roztworu nasyconego (R1) o 38% oraz słabszy w przypadku roztworu R2 który zmienił liczebność średnio o 29%. Roztwór ksyleny 1:10 tj. R3 działał na drobnoustroje glebowe najsłabiej średnio do 19% w stosunku do gleby kontrolnej.

Wpływ zanieczyszczenia gleby ksylenem był również zależny od czasu jego działania. W przypadku bakterii toksyczne działanie utrzymywało się przez okres miesiąca, obniżając ich liczebność średnio o około 30%, a maksymalnie o 70%. W przypadku grzybów glebowych równie niekorzystne działanie nasilało się z czasem i utrzymywało przez cały okres badań. Promieniowce okazały się grupą drobnoustrojów, które po obniżeniu liczebności w początkowym okresie oddziaływania ksyleny, później zareagowały ich znacznym namnożeniem, prowadzącym do wyraźnego przekroczenia wartości kontrolnych.

4. Wnioski

1. O-ksylen wprowadzony do gleby wpływał na żyjące w niej mikroorganizmy. Wielkość tych zmian zależała od wprowadzonej ilości zanieczyszczenia, czasu jego działania i grupy badanych mikroorganizmów.
2. Najbardziej niekorzystny wpływ wywierał ksylen na grzyby glebowe i bakterie, a mniejszy na promieniowce glebowe.
3. Najbardziej niekorzystne oddziaływanie wywierało na mikroorganizmy skażenie gleby roztworem nasyconym ortoksylenu (R1), potem roztworem R2 o stężeniu sześciokrotnie mniejszym, a najsłabsze oddziaływanie stwierdzono w przypadku roztworu R3 o stężeniu jedenastokrotnie mniejszym od stężenia nasycenia.

4. Niekorzystne oddziaływanie ksyłenu zależało od grupy taksonomicznej drobnoustrojów i trwało od miesiąca u bakterii do 6 tygodni u grzybów.

Literatura

1. Greinert A.: Gleby obszarów zurbanizowanych-nowe podejście na nowe czasy. Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Zielonogórskiego nr 136. Inżynieria Środowiska 2009, 16, 13-27
2. Inderjit M., Malik A.U.: Effect of phenolic compounds on selected soil properties. Forest Ecology and Management. 1997, 92, 11-18
3. Oh Y.S., Choi S.C.: Characterization of BTX-degrading bacteria and identification of substrate interactions during their degradation. Microbiological Society of Korea 1997, 24, 213-229
4. Dean B.J.: Recent finding on the genetic toxicity of benzene, toluene, xylenes and phenols. Mutant. Res. 1995, 145, 153-181.
5. Otenio M.H., Lopes da Silva M.T., Marquez M.L.O., Roseiro J.C., Bidoia E.D.: Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM1 852. Braz. J. Microbiol. (2005) 36:258-261.
6. Guzik U., Wojcieszńska D., Hubert-Kocurek K.: Mikrobiologiczny rozkład związków aromatycznych w warunkach anoksji. Post. Microbiol. 2010, 49(3), 217-226
7. Xiao G., Cuibao P., Zhang Y., Ming-Fu Z.: Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality and the function of accessory gonad of exposed workers. Industrial Health, 2001, 206-210.
8. PTG (POLSKIE TOWARZYSTWO GLEBOZNAWCZE) 2008. Klasyfikacja uziarnienia gleb i utworów mineralnych, www.ptg.sggw.pl/images/Uziarnienie_PTG_2008.pdf.
9. Bunt J. S., Rovira A. D.: Microbiological studies of some subantarctic soil. J. Soil Sci., 1955, 6 (1): 119-128.
10. Martin J.P.: Use of Acid, Rose Bengales and Streptomycin in the plate Method for Estimating Soil Fungi. Soil Sci. 1950, 69, 215-233.
11. Cyganow V. A., Zukovr A.: Morfologobiochemiczne osobennosti novovo vida actinomyceta, Mikrobiologia 1964, 33 (5): 863-869
12. Van Groenestijn J.W., van Heiningen W.N.M., Kraakam N.J.R.: Biofilters based on the action of fungi. Water Science and Technology 2001, 43, 227-232
13. Kosinkiewicz B., Lubczyńska J.: Wykorzystanie i biotransformacja 3,4 benzo-a-pirenu przez mikroorganizmy glebowe. Arch. Ochr. Środ. 1986, 1-4, 133-141.