

Małgorzata HAWROT-PAW, Mirosław KOTLIŃSKI

WSTĘPNE BADANIA NAD WPŁYWEM ODPADÓW Z PRODUKCJI GAZU KOKSOWNICZEGO NA LICZEBNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

PRELIMINARY STUDY ON THE INFLUENCE OF WASTES IN GAS COKE PRODUCTION ON THE NUMBER OF SOIL MICROORGANISMS

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Abstract. Subject of research presented in this paper was to evaluate the effect of depositing waste from the production of coke oven gas in the soil microorganisms inhabiting it, especially those with potential properties for biodegradation of hydrocarbons present in the waste. The number of microorganisms was evaluated according to MPN method (Most Probable Number) using microtiter plates. In the samples of the analyzed soil material were detected microorganisms are active in the decomposition of aliphatic, aromatic and mixtures of hydrocarbons. Depending on the level of soil sampling (0–30 and 30–60 cm) the quantitative microbial diversity has been demonstrated. With increasing depths seen considerable increase in the number of microbial cells participating in the biological decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons, which are the main component of pollution.

Słowa kluczowe: gaz koksowniczy, gleba, mikroorganizmy, węglowodory aromatyczne.
Key words: aromatic hydrocarbons, coke oven gas, microorganisms, soil.

WSTĘP

Węglowodory aromatyczne są wszechobecne w przyrodzie, a pierścień benzenowy jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych struktur chemicznych (Smith 1990). Węglowodory aromatyczne obecne w środowisku, przede wszystkim szczególnie szkodliwe formy wielopierścieniowe (WWA), pochodzą ze źródeł naturalnych (np. procesy pirolizy) lub antropogennych (m.in. niepełne spalanie materii organicznej, działalność przemysłowa związana z przetwarzaniem węgla lub ropy naftowej). W związku ze słabą rozpuszczalnością w wodzie i dużym powinowactwem do materii organicznej większość WWA, należących do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych, gromadzi się w powierzchniowych warstwach gleby (Baran i Oleszczuk 2002; Wilcke 2007). Obecność tych zanieczyszczeń w glebie stwarza realne niebezpieczeństwo przedostawania się ich do roślin, a w konsekwencji do kolejnych ogniw łańcucha troficznego. WWA związane z cząstkami gleby mogą podlegać redystrybucji i sekwestracji w miejscach ograniczających ekstrakcję i powodujących niską biodostępność (Lu i in. 2012).

Większość drobnoustrojów gromadzi się w powierzchniowych warstwach gleby, według Lavahuna i in. (1996) na głębokości 5–20 cm. W głąb profilu ich liczba znacznie zmniejsza się z uwagi m.in. na zmniejszoną zawartość wody, tlenu oraz dostępność składników pokarmowych (próchnicy, wydzielin korzeniowych). Odpady powstające podczas procesów przemysłowych stanowią bezpośrednie zagrożenie dla wszystkich składników środowiska, a technologie związane z koksowaniem węgla należą do jednych z najbardziej uciążliwych (Alwaeli 2009). Niniejsza praca ma na celu przedstawienie składu mikroflory gleby zanieczyszczonej odpadami z procesu technologicznego produkcji gazu koksowniczego, zawierającymi węglowodory aromatyczne, ze szczególnym uwzględnieniem grup mikroorganizmów aktywnych w procesach ich biologicznej transformacji.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań pobrano ze zbiornika napelnionego glebą i odpadami powstałymi w procesie technologicznym produkcji gazu koksowniczego. Zbiornik zlokalizowany był na terenie byłej wytwórni gazu koksowniczego w Kostrzynie nad Odrą. Próbkę gleby pobierano z poziomów 0–30 cm i 30–60 cm. Analizę chemiczną prób glebowych przeprowadzono w Instytucie Chemii i Technologii Nafty i Węgla Politechniki Wrocławskiej. Obejmowała ona m.in. jakościowe określenie charakteru chemicznego substancji organicznej (tab. 1).

Tabela 1. Analiza składu chemicznego pobranych prób glebowych
Table 1. The analysis of the chemical composition of soil samples

Oznaczenie – Designation	Próba dostarczona Delivered sample (% mas. – mass %)	Próba sucha Dry sample (% mas. – mass %)
Zawartość substancji bitumicznej, w tym:	26,1	32,2
The content of bituminous substances, including:		
– rozpuszczalne w toluenie – soluble in toluene	13,9	17,1
– nierozpuszczalne w toluenie – insoluble in toluene	12,2	15,1
Zawartość substancji mineralnej	55,4	67,8
The content of mineral substances		

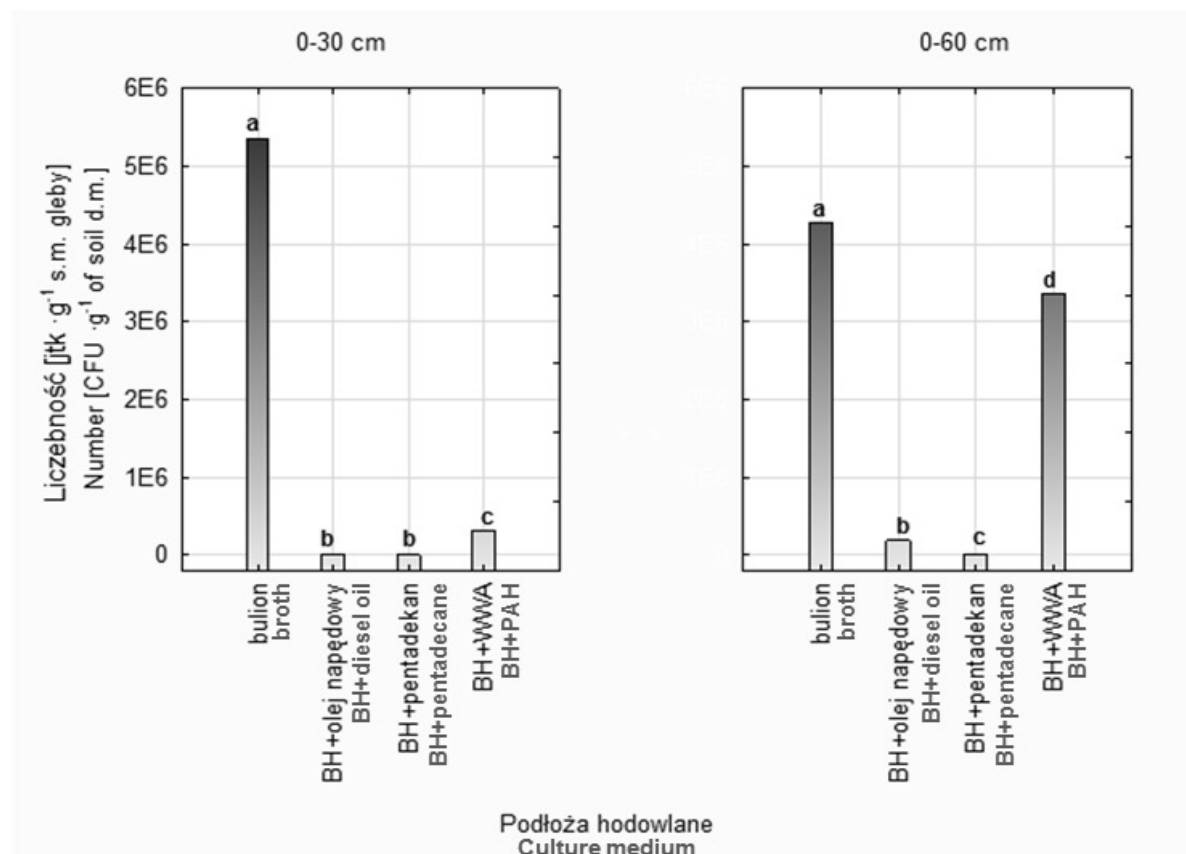
Analizowana próbka zawierała przede wszystkim związki o charakterze aromatycznym typu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) i ich metylowych pochodnych, związków heterocyklicznych, biaryli i fenoli. W ekstrakcie heksanowym występowały m.in. związki zawierające od dwóch (naftalen i pochodne metylowe) do czterech (piren i pochodne) skondensowanych pierścieni aromatycznych. Przeważały niepodstawione wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Z bardzo dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że pozostałą część substancji bitumicznej, której nie można analizować metodą chromatografii gazowej, stanowią związki o podobnym charakterze chemicznym, lecz wyższym stopniu skondensowania pierścieni aromatycznych.

Liczebność mikroorganizmów oznaczano metodą MPN (Most Probable Number), określając najbardziej prawdopodobną liczbę mikroorganizmów (Wrenn i Venosa 1996). W badaniach określono ogólną liczebność mikroorganizmów w bulionie oraz liczebność mikroorganizmów uczestniczących w biologicznym rozkładzie węglowodorów, w tym rozkładających składowe oleju napędowego, węglowodory alifatyczne i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. W tym celu posłużono się podłożem hodowlanym BH (Bushnell-Haas 1941), w którym jako źródło węgla i energii dla tych organizmów zastosowano odpowiednio: olej napędowy (produkt handlowy), pentadekan – $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$, fluoren – $\text{C}_{13}\text{H}_{10}$ oraz antracen – $\text{C}_{14}\text{H}_{10}$. Oznaczenia mikrobiologiczne wykonano na płytkach titracyjnych z otworami o pojemności 400 μl . Wszystkie analizy wykonano w pięciu powtórzeniach. Płytki titracyjne inkubowano w ciemności, w temperaturze 28°C. Ogólną liczebność mikroorganizmów oznaczano po 14 dniach, natomiast liczebność organizmów uczestniczących w rozkładzie oleju napędowego i węglowodorów alifatycznych określano po trzech tygodniach z zastosowaniem INT (fiolet jodonitrotetrazoliowy). Liczbę mikroorganizmów uczestniczących w rozkładzie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych określono po sześciu tygodniach inkubacji. Wyniki badań opracowano na podstawie metodyki BAM – Bacteriological Analytical Manual (www.cfsan.fda.gov), przeliczono na 1 g s.m. gleby i podano jako jtk (jednostki tworzące kolonie).

WYNIKI

Na podstawie wyników stwierdzono istotne zróżnicowanie liczebności poszczególnych badanych mikroorganizmów glebowych w zależności od głębokości w profilu (rys. 1). Ogólna liczba mikroorganizmów heterotroficznych w warstwie 0–30 cm wynosiła $5,5 \cdot 10^6$ jtk w 1 g s.m. gleby, natomiast liczebność pozostałych grup drobnoustrojów była znacznie niższa i wynosiła odpowiednio $2,4 \cdot 10^4$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby mikroorganizmów korzystających z węgla zawartego w oleju napędowym oraz na podłożu z pentodekanem zaledwie około $8 \cdot 10^3$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby. Liczebność mikroorganizmów wykorzystujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, w stosunku do dwóch poprzednich grup, była stosunkowo wysoka i wynosiła około $3,2 \cdot 10^5$ jtk w 1 g s.m. gleby.

Podobne relacje obserwowano w próbkach glebowych pobranych z warstwy 30–60 cm. Ogólna liczebność mikroorganizmów była niższa niż w warstwie 0–30 cm i wynosiła około $4,2 \cdot 10^6$ jtk w 1 g s.m. gleby, odnotowano natomiast ponad 8-krotny wzrost liczby komórek na podłożu hodowlanym z dodatkiem oleju napędowego, a ponad 100% zwiększyła się też liczba mikroorganizmów wykorzystujących pentadekan. Na podłożu BH z dodatkiem mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczono $3,4 \cdot 10^6$ jtk w 1 g s.m. gleby.



Rys. 1. Liczebność mikroorganizmów w próbkach glebowych pobranych z warstwy 0–30 cm i 30–60 cm w głąb profilu

Fig. 1. The number of microorganism in soil samples collected from the 0–30 cm and 30–60 cm in the soil profile

DYSKUSJA

Procesy technologiczne związane z produkcją gazu koksowniczego generują powstawanie wielu zanieczyszczeń, odpadów zawierających m.in. szkodliwe wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Ich obecność w glebie wpływa na jej życie biologiczne, w tym na mikroorganizmy. Według Walkera i in. (2002), niektóre drobnoustroje mogą być eliminowane z zanieczyszczonego środowiska, liczebność innych może zmniejszyć się i ustabilizować na nowym, niższym poziomie tak długo, jak długo będzie obecne skażenie.

Zazwyczaj przyjmuje się, że w powierzchniowej warstwie gleby znajduje się więcej mikroorganizmów niż w jej warstwach głębszych (Nowak i in. 1998; Zmysłowska 2002), na co istotny wpływ ma m.in. dostępność tlenu. W niniejszej pracy wykazano, że ogólna liczebność mikroorganizmów heterotroficznych oznaczona w warstwie 30–60 cm, w stosunku do warstwy 0–30 cm, istotnie uległa zmniejszeniu, jednak w odniesieniu do pozostałych oznaczanych grup drobnoustrojów odnotowano wzrost liczby ich komórek – do ponad 100% na podłożu z pentadekanem i około 1000% w przypadku mieszaniny wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Podobne wyniki otrzymali Nowak i in. (1998). Autorzy

ci potwierdzili możliwość występowania mikroorganizmów rozkładających węglowodory nawet do głębokości 1 metra i więcej. W glebie skażonej substancjami ropopochodnymi w stężeniu 1%, zależnie od głębokości z jakiej zostały pobrane próby glebowe, oznaczyli oni średnio 10^5 – 10^6 komórek w 1 g s.m. gleby, podobnie jak w prezentowanych badaniach.

Określanie liczebności bakterii wykorzystujących węglowodory jako jedyne źródło węgla i energii jest jednym z parametrów pozwalających ocenić intensywność przebiegu procesów rozkładu skażeń oraz potencjalną zdolność mikroorganizmów do ich biodegradacji (Piekarska i in. 2000). Znajomość aktywności biologicznej gleby oraz struktury i ilości zanieczyszczeń pozwala wybrać odpowiednią, indywidualną dla każdego obszaru metodę oczyszczania. Szybkość rozkładu węglowodorów przez mikroflorę glebową zależy m.in. od ich wyjściowego stężenia w środowisku (Maliszewska-Kordybach 1987). Jak podają Kołżan i in. (1997) oraz Nowak i in. (1998), liczebność mikroorganizmów potrzebnych do prawidłowego przebiegu procesu bioremediacji gruntu powinna wahać się w granicach 10^5 – 10^7 komórek w 1 g gleby. Duża ilość mikroorganizmów, jaką w przeprowadzonych badaniach oznaczono na podłożach hodowlanych, zwłaszcza z dodatkiem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, może świadczyć o ich adaptacji do panujących warunków środowiska. W badaniach nad biodegradacją Margesin i in. (2000) już po 21. dniu obserwowali zrównanie liczebności organizmów rozkładających olej napędowy z ogólną liczebnością organizmów heterotroficznych. Przystosowywanie się mikroorganizmów do obecności węglowodorów w glebie potwierdzili w swoich badaniach również Thomas i Ward (1989) oraz Ulfing i in. (1997). W przypadku gdy liczebność naturalnej mikroflory jest na odpowiednim poziomie, nie zachodzi konieczność wprowadzania wyspecjalizowanych mikroorganizmów pochodzących z innych środowisk. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wskazują, że autochtoniczna mikroflora, która może potencjalnie uczestniczyć w procesach biochemicznej transformacji WWA (główny element skażenia badanej gleby), jest odpowiednio liczna, zwłaszcza w warstwie 30–60 cm. Zwiększona liczebność mikroorganizmów na tym poziomie może świadczyć o zwiększonej, w stosunku do warstwy powierzchniowej, zawartości węglowodorów aromatycznych (w pracy nie analizowano jednak różnicowania ich zawartości w profilu).

PODSUMOWANIE

Składniki występujące w odpadach koksowniczych determinują skład mikrobiocenoz glebowych. W badanym materiale stwierdzono obecność drobnoustrojów posiadających układy enzymatyczne do rozkładu węglowodorów alifatycznych, jak i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zarówno na głębokości do 30 cm, jak i do 60 cm w głąb profilu. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość pozyskiwania szczepów aktywnych w procesach biodegradacji węglowodorów ropopochodnych na znacznie większych głębokościach niż zazwyczaj się przyjmuje.

PIŚMIENNICTWO

Alwaeli M. 2009. Recykling odpadów przemysłu koksowniczego. Arch. Gos. Odpad. Ochr. Śr. 11 (1), 63–72.

- Baran S., Oleszczuk P.** 2002. Zanieczyszczenie gleb lotniska w Dęblinie substancjami ropopochodnymi. Arch. Ochr. Środ. 28, 105–115.
- Bushnell L.D., Haas H.F.** 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. J. Bacteriol. 41(5), 653–673.
- Kołwzan B., Traczewska T., Piekarska K., Juchniewicz M.** 1997. Mikrobiologiczna ocena możliwości bioremediacji gruntów skażonych produktami naftowymi [w: Biotechnologia środowiska]. Materiały z Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego, Ustroń-Jaszowiec 10–12 grudnia, 11–16.
- Lavahun M.F.E., Joergensen R.G., Meyer R.B.** 1996. Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. Biol. Fertil. Soils 23, 38–42.
- Lu Z., Zeng F., Xue N., Li F.** 2012. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in organo-mineral particles of alluvial sandy soil profiles at a petroleum-contaminated site. Sci. Total Environ. 433, 50–57.
- Maliszewska-Kordybach B.** 1987. Mikrobiologiczne przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym. Postępy Mikrobiol. 3, 235–247.
- Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner A.** 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere 40, 339–346.
- Nowak A., Hawrot M., Foltá K.** 1998. Zmiany liczebności mikroorganizmów zdolnych do rozkładu substancji ropopochodnych w profilu glebowym i ich wymagania temperaturowe [w: Bioremediacja gruntów]. Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego, Wisła-Bukowa 8–11 grudnia, 55–58.
- Piekarska K., Kołwzan B., Traczewska T.M.** 2000. Zastosowanie metod biologicznych do prognozowania biodegradacji substancji ropopochodnych w gruntach. Zesz. Nauk. Politech. Śląskiej, Inż. Śr. 45, 89–99.
- Smith M.R.** 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. Biodegradation 1, 191–206.
- Thomas J.M., Ward C.H.** 1989. In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. Environ. Sci. Technol. 23, 760–765.
- Ulfig K., Płaza G., Tien A., Mańko T., Worsztynowicz A.** 1997. Zmiany liczebności i aktywności drobnoustrojów procesie oczyszczania gleby z substancji ropopochodnych [w: Biotechnologia środowiska]. Materiały Sympozjum Naukowo-Technicznego, Ustroń-Jaszowiec 10–12 grudnia, 17–25.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B.** 2002. Podstawy ekotoksykologii. PWN, Warszawa.
- Wilcke W.** 2007. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. Geoderma 141 (3–4), 157–166.
- www.cfsan.fda.gov**, dostęp z dnia 01.10.2004 r.
- Wrenn B.A., Venosa A.D.** 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon-degrading bacteria by a most-probable number procedure. Can. J. Microbiol. 42, 252–258.
- Zmysłowska I.** 2002. Mikrobiologia ogólna i środowiskowa: teoria i ćwiczenia. Wydaw. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn.