

AGNIESZKA KLIMKOWICZ-PAWLAS, BARBARA MALISZEWSKA-KORDYBACH

WPLYW WYBRANYCH ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH NA AKTYWNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

EFFECT OF THE SELECTED ORGANIC SOLVENTS ON THE ACTIVITY OF SOIL MICROORGANISMS

Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Gleboznawstwa, Erozji i Ochrony Gruntów
24-100 Puławy, ul. Czartoryskich 8
e-mail: bkord@iung.pulawy.pl

W badaniach ekotoksykologicznych mających na celu ocenę oddziaływania stałych hydrofobowych substancji organicznych niezbędne jest stosowanie rozpuszczalników organicznych, które ze swej strony mogą wpływać na aktywność biologiczną gleb. Oceniono oddziaływanie dwóch powszechnie stosowanych rozpuszczalników (aceton i dichlorometan) na ogólną i specyficzną aktywność mikroorganizmów glebowych w zróżnicowanych warunkach eksperymentalnych.

Słowa kluczowe: aktywność, mikroorganizmy, badania ekotoksykologiczne

Key words: activity, microorganisms, ecotoxicity studies

WSTĘP

Badania ekotoksykologiczne zmierzające do oceny oddziaływania stałych hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych (np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne - WWA) na mikrobiologiczne parametry glebowe wymagają wprowadzania tych substancji do gleb w formie roztworów. Związki te charakteryzują się bardzo niską rozpuszczalnością w wodzie, niezbędne jest więc stosowanie rozpuszczalników organicznych. Dobór rozpuszczalnika determinowany jest rozpuszczalnością dodawanego związku oraz toksycznością i trwałością rozpuszczalnika [23]. Idealny rozpuszczalnik to taki, który nie zmienia właściwości dodawanego związku i struktury gleby, łatwo odparowuje z gleby lub ulega rozkładowi i nie wykazuje właściwości toksycznych w stosunku do mikroorganizmów glebowych [23]. Do wprowadzania związków organicznych do gleb wykorzystywanych jest wiele rozpuszczalników m.in. takich jak: dichlorometan [17, 20, 22, 28], aceton [7, 17, 26, 29], cykloheksan [18], octan etylu [14], toluen [23] i chloroform [5]. Rozpuszczalniki te z jednej strony mogą stanowić dodatkowe źródło węgla dla mikroorganizmów wpływając na wzrost ich aktywności i liczebności, a z drugiej mogą oddziaływać toksycznie [1]. Toksyczne oddziaływanie rozpuszczalników organicznych w glebie może zacierać efekty powodowane przez badane związki organiczne,

a przez to utrudniać interpretację wyników. Niestety, informacje z zakresu wpływu rozpuszczalników na mikroorganizmy glebowe są bardzo ograniczone [3, 22, 28].

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu wybranych rozpuszczalników organicznych na aktywność mikroorganizmów glebowych. Wytypowano dwa najczęściej stosowane rozpuszczalniki o zróżnicowanych właściwościach: dichlorometan i aceton. Dichlorometan jest związkiem niepolarnym, hydrofobowym, bardzo lotnym, po dodaniu do gleby wilgotnej nie miesza się z wodą [26], z gleby suchej szybko odparowuje może być jednak toksyczny dla bakterii glebowych. Aceton (2-propanon) jest wysoce polarną cieczą o stosunkowo silnych właściwościach toksycznych. Dobrze miesza się z wodą, wydaje się więc być doskonałym rozpuszczalnikiem do stosowania w wilgotnych glebach, niemniej, w niektórych warunkach może wpływać niekorzystnie na strukturę gleby i powodować jej pęcznienie [2, 26].

Oddziaływanie rozpuszczalników oceniano na podstawie pomiarów aktywności dehydrogenaz (enzymów wewnątrzkomórkowych z grupy oksydoreduktaz) oraz aktywności bakterii nityfikacyjnych. Aktywność DH jest wskaźnikiem potencjalnej aktywności mikroorganizmów i odzwierciedla całą fizjologicznie aktywną biomasę mikroflory glebowej włączając w to zarówno bakterie, jak i grzyby [27]. Degradacja dehydrogenaz w glebie następuje bardzo szybko po obumarciu komórek i nie ulegają one w glebie akumulacji [25, 27]. Oznaczenia DH są rzadko stosowane w ocenie bezwzględnej aktywności mikroflory glebowej, ze względu na problemy metodyczne, natomiast często pomiar ten wykorzystywany jest w badaniach ekotoksykologicznych [20, 27]. Potencjał nityfikacji odzwierciedla aktywność specyficznej grupy mikroorganizmów glebowych – bakterii utleniających amoniak przeprowadzających pierwszy etap nityfikacji autotroficznej w glebie i szczególnie wrażliwych na zmiany stanu środowiska [8]. Parametr ten jest zalecany do badań oddziaływania substancji szkodliwych w środowisku glebowym [8, 11].

Ze względu na bardzo zróżnicowane warunki stosowane powszechnie w testach ekotoksykologicznych w przeprowadzonych badaniach uwzględniano zarówno właściwości materiału glebowego jak różnice w warunkach doświadczeń.

MATERIAŁ I METODY

Badania laboratoryjne obejmowały trzy serie doświadczeń, w których wpływ rozpuszczalników na aktywność mikrobiologiczną oceniano z uwzględnieniem zróżnicowanych czynników takich jak: czas oddziaływania, rodzaj rozpuszczalnika oraz właściwości gleb – Tabela I.

Materiał glebowy

Wykorzystany w doświadczeniach materiał glebowy pobrano z poziomu orno-próchniczego (0 – 20 cm) gleb użytkowanych rolniczo z terenów województwa lubelskiego oddalonych od źródeł emisji zanieczyszczeń, a w jednym przypadku (gleba N3) z terenu województwa śląskiego z południowo-zachodniej części Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego. Pobrane próbki gleb po przetransportowaniu do laboratorium wysuszono na powietrzu w temperaturze pokojowej w ciemności, wymieszano starannie i przesiano przez sito $\phi < 0.02$ mm. Otrzymany materiał glebowy przechowywano w temperaturze ok. $18 \pm 2^\circ\text{C}$ przez okres nie przekraczający 6 miesięcy przed wykonaniem dalszych badań. W celu określenia biologicznych właściwości gleb pobierano pod-próbki świeżych gleb natychmiast po ich przetransportowaniu do laboratorium i przechowywano je w ciemnościach w temperaturze $4 \pm 2^\circ\text{C}$ (w lodówce) przez okres nie przekraczający 1 miesiąca.

R o z p u s z c z a l n i k i

Tabela I. Układ i warunki doświadczeń (temperatura - 20 ± 2 $^{\circ}\text{C}$; wilgotność gleby - 60 % pełnej pojemności wodnej).
The scheme of the experiments (temperature - 20 ± 2 $^{\circ}\text{C}$; soil humidity - 60 % full water capacity)

Parametr	Seria I	Seria II	Seria III	
			a	b
Gleby (symbol)	N1, N2	N3, N4	N5, N6, N7	N6, N7
Rozpuszczalnik	aceton	aceton; dichloro- metan	dichlorometan	
Metoda dodawania roz- puszczalnika	1-stopniowa; gleba wilgotna	1-stopniowa; gleba sucha	1-stopniowa; gleba wilgotna	2-stopniowa; gleba sucha
Ilość rozpuszczalnika ($\text{cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$)	0, 8, 25, 75, 125	0, 20, 60, 180	0, 10, 20, 60, 180	20
Czas inkubacji (dni)	7; 30	7	15	
Czas aktywacji wstępnej (dni)	14	—	14	-
Mierzony efekt	DH	DH	PN	

DH - aktywność dehydrogenaz, PN - potencjał nityfikacji

W badaniach zastosowano dwa rozpuszczalniki o czystości 99,5 % firmy POCH S.A. Gliwice o następujących właściwościach

- Aceton - $\text{CO}(\text{CH}_3)_2$ – masa molowa 58,08 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, temperatura wrzenia 56°C , gęstość 0,79 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i nieograniczona rozpuszczalność w wodzie (∞);
- Dichlorometan – CH_2Cl_2 - masa molowa 84,93 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, temperatura wrzenia 40°C , gęstość 1,32 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ i rozpuszczalność w wodzie 20 $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Metody analityczne

Oznaczenia fizykochemicznych właściwości gleb

Podstawowe właściwości fizyko-chemiczne gleb (Tabela II) oznaczano według metod powszechnie stosowanych w laboratoriach stacji chemiczno-rolniczych [24].

Oznaczenia aktywności mikrobiologicznej

Aktywność dehydrogenaz (DH) określano metodą *Casidy* i in. [4] przy wykorzystaniu chlorku trifenylotetrazolu jako akceptora elektronów. Powstający trifeniloformazan (TPF) ekstrahowano etanolem i intensywność czerwonej barwy roztworu mierzono przy długości fali 485 nm na spektrofotometrze Beckman DU-68.

Potencjał nityfikacji (PN) oznaczono zgodnie z zmodyfikowaną metodyką ISO/DIS 15685 [9], według której do oceny potencjalnej aktywności bakterii nityfikujących wykorzystywany jest pierwszy etap nityfikacji (utlenianie amoniaku). Do próbek gleby zbuforowanej do pH 7,2 dodawano siarczanu (VI) amonu jako substratu dla bakterii „nitroso”. Powstające w wyniku aktywności bakterii azotany (III) oznaczano po 6 godzinach inkubacji próbek glebowych w temperaturze $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ poprzez pomiar intensywności purpurowej barwy przy długości fali 543 nm na spektrofotometrze Beckman DU-68.

Intensywność oddychania (IR) w I i II Serii doświadczeń określano według metody *Jenkinsona* i *Powlsona* [12] przez inkubowanie próbek glebowych przez 10 dni w zamkniętych pojemnikach zawierających naczynka z 0,5 M NaOH wiążącym wydzielający się CO_2 ; nadmiar NaOH zobojętniano 0,25 M HCl. Natomiast w III Serii badań parametr ten mierzono zgodnie z metodyką podaną w normie ISO 16072 [10].

Tabela II. Charakterystyka materiału glebowego
Characteristic of soil material

Właściwości gleby	Gleby						
	Seria I		Seria II			Seria III	
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
skł. granul. ^a	glp	gs	gl	gl	glp	pgl	pgl
fr <0,02 mm ^b	33	46	23	29	33	14	15
C _{org} ^c	15,3	15,3	59,3	16,8	15,3	6,3	7,2
pH _{KCl}	7	6,9	5,9	6,6	7	5,4	5,5
N _{og} ^d	0,099	0,114	0,12	0,118	0,099	0,070	0,100
DH ^e	113,3	119,1	23,1	80,2	95,5	38,0	9,4
IR	89,5 ^f	165,3 ^f	74,3 ^f	109,8 ^f	4,1 ^g	4,6 ^g	2,9 ^g

^a/skład granulometryczny - texture;

^b/ zawartość frakcji o $< 0,02$ mm – content of the fraction $< 0,02$ mm (%);

^c/ zawartość węgla organicznego – organic carbon content ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$);

^d/ zawartość azotu ogólnego - total nitrogen content (%);

^e/ aktywność dehydrogenaz – soil dehydrogenases activity ($\mu\text{g TPF g}^{-1}\text{s.m. gleby} - \text{d.w.soil}$);

^f/ intensywność oddychania - intensity of respiration ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{dw } 10 \text{ days}^{-1}$) wg metody *Jenkinson i Powlson* (1976);

^g/ intensywność oddychania - intensity of respiration ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{dw h}^{-1}$) wg metody ISO 16072 (2002).

Sposób prowadzenia doświadczeń

Seria I

W I Serii badań oceniano wpływ acetonu na aktywność dehydrogenaz w glebach poddanych wstępnej aktywacji. Suche próbki gleb (120 g) umieszczano w szklanych zlewkach, doprowadzano do poziomu wilgotności 60 % ppw i przechowywano w temperaturze pokojowej (20 ± 2 °C) przez okres 14 dni w celu reaktywowania aktywności biologicznej (aktywacja wstępna). Następnie do każdej (wilgotnej) próbki dodawano, starannie mieszając, aceton w ilości 1, 3, 9, 15 cm^3 na 120 g gleby tj. 8, 25, 75, 125 $\text{cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$. Próbki gleb inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 30 dni utrzymując stały poziom wilgotności 60 % ppw. Aktywność biologiczną gleb określano po 7 i 30 dniach inkubacji na podstawie oznaczeń aktywności dehydrogenaz.

Seria II

W II Serii porównywano wpływ acetonu i dichlorometanu na aktywność dehydrogenaz wprowadzając obydwaj rozpuszczalniki do gleb bez wstępnej aktywacji. Do suchych próbek gleb (50 g) dodawano aceton lub dichlorometan w ilości 1, 3, 9 cm^3 na 50 g gleby tj. 20, 60, 180 $\text{cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ i pozostawiano na 24 h w celu ich odparowania. Po upływie doby próbki gleb uwilgotniano do poziomu 60 % ppw i inkubowano przez okres 7 dni w temperaturze 20 ± 2 °C. Po tym czasie oznaczano aktywność dehydrogenaz.

Seria III

W III Serii badań określano wpływ dichlorometanu na aktywność bakterii nityfikacyjnych w próbkach gleb aktywowanych wstępnie i nieaktywowanych przy wykorzystaniu zróżnicowanych metodyk dodawania rozpuszczalnika.

- Do wilgotnych próbek gleb (200 g), poddanych uprzednio wstępnej aktywacji w warunkach opisanych dla I Serii, wprowadzono dichlorometan w ilości 2, 4, 12, 36 cm^3 na 200 g gleby tj. 10, 20, 60, 180 $\text{cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ i inkubowano je przez kolejne 15 dni w temperaturze pokojowej. Po tym czasie oznaczano aktywność nityfikacji.
- Do suchych próbek gleb (bez aktywacji wstępnej) dodawano dichlorometan w ilości 2 cm^3 na 100 g gleby czyli 20 $\text{cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ przy zastosowaniu metody stopniowego dodawania rozpuszczalnika. Prób-

kę podzielono na 2 części w stosunku wagowym 1:4; do 20 g gleby dodano rozpuszczalnik i pozostawiano na dobę (w ciemności w temperaturze pokojowej) w celu jego odparowania, następnie dodano pozostałą część próbki (80 g). Całość starannie wymieszano, inkubowano przez okres 15 dni w temperaturze pokojowej i oznaczano aktywność nityfikacji.

W każdej serii doświadczeń kontrolę stanowiły gleby bez dodatku rozpuszczalnika.

O c e n a s t a t y s t y c z n a

Wyniki oznaczeń aktywności biologicznej wyrażano jako średnią arytmetyczną. Oceny wpływu badanych czynników na mierzone parametry dokonywano porównując odchylenia standardowe (Seria I i II) lub w oparciu o analizę wariancji szacując istotność różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$ (ANOVA, test LSD). Zależności pomiędzy oznaczanymi parametrami opisywano równaniami regresji liniowej. Stosowano program komputerowy *Statgraphics Centurion* wersja XV.

WYNIKI

Materiały glebowe wykorzystywane w każdej serii badań charakteryzowały się zróżnicowanymi właściwościami – Tabela II. Gleby w pierwszej serii doświadczeń pochodziły z terenów nie zanieczyszczonych. Obydwie gleby (N1 - glina lekka pylasta i gleba N2 - glina średnia) charakteryzowały się niską zawartością węgla organicznego ($C_{org} = 15,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) i odczynem obojętnym, natomiast różniły się właściwościami biologicznymi (gleba N2 była aktywniejsza mikrobiologicznie niż gleba N1). Materiał glebowy w Serii II pochodził z dwóch gleb pobranych z terenów o zróżnicowanym stopniu narażenia na imisję zanieczyszczeń. Gleba N3 (glina piaszczysta) pochodziła z terenów użytkowanych rolniczo z rejonu Górnego Śląska, zaś gleba N4 (glina lekka) z terenów rolniczych okolicy Puław. Gleba N3 charakteryzowała się wysoką zawartością C_{org} ($59,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), lekko kwaśnym odczynem i niską aktywnością mikrobiologiczną. W glebie N4 natomiast zawartość węgla organicznego wynosiła $16,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, zaś $\text{pH}_{\text{KCl}} = 6,6$. Gleba ta wykazywała natomiast dwukrotnie wyższą aktywność biologiczną niż gleba N3. W III Serii doświadczeń wykorzystano materiał glebowy z terenów nie zanieczyszczonych. Gleby N6 i N7, o składzie granulometrycznym piasku gliniastego lekkiego, charakteryzowały się bardzo niską zawartością węgla organicznego (odpowiednio 6,3

Tabela III. Wpływ acetonu na aktywność dehydrogenaz w glebach po 7 i 30 dniach inkubacji próbek aktywowanych wstępnie przez okres 15 dni

The effect of acetone on the activity of dehydrogenases after 7 and 30 days of incubation of soil samples pre-activated during 15 days)

Zawartość acetonu * ($\text{cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$)	DH ($\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s.m.}$)			
	gleba N1		gleba N2	
	7 dni	30 dni	7 dni	30 dni
0 (kontrola)	145,5 ^a	111,4 ^a	165,7 ^a	115,9 ^a
8	136,6 ^b	107,4 ^a	114,3 ^b	87,8 ^b
25	104,1 ^c	84,5 ^b	102,7 ^c	61,8 ^c
75	97,9 ^c	65,3 ^c	106,5 ^c	74,8 ^d
125	83,9 ^d	57,3 ^d	97,0 ^c	38,0 ^e

Wartości oznaczone w kolumnach tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny (ocena na podstawie wartości odchylenia standardowego).

*/ wartości nominalne (ilość wprowadzona do gleby)

i $7,2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), kwaśnym odczynem i niską aktywnością biologiczną. Najwyższe wartości DH odpowiadały glebie N5 (głina lekka pylasta, $C_{\text{org}} 15,3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, i $\text{pH}_{\text{KCl}} = 7$), gdzie aktywność dehydrogenaz była nawet 10-krotnie wyższa niż w glebie N7.

W Serii I doświadczeń oceniano wpływ acetonu na aktywność DH w glebach wstępnie aktywowanych przez okres 14 dni przy zróżnicowaniu dwóch czynników: właściwości gleb (2 gleby) i czasu kontaktu rozpuszczalnik-gleba (7 i 30 dni). Już po 7 dniach po wprowadzeniu do obu wilgotnych (60 % ppw) gleb najniższej dawki acetonu ($8 \text{ cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$) zaobserwowano istotną inhibicję aktywności dehydrogenaz; w glebie N2 o 31 %, a w glebie N1 tylko o 6 % (Tabela III). Wydłużenie czasu inkubacji z 7 do 30 dni wpłynęło na zmniejszenie bezwzględnej aktywności DH (do 60–80 %), zarówno w glebach kontrolnych jak i w glebach z dodatkiem acetonu – Tabela III. Równocześnie zwiększył się (choć czasami w niewielkim stopniu) wpływ acetonu na względną aktywność DH szczególnie przy wyższych poziomach rozpuszczalnika ($> 25 \text{ cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$) – Ryc. 1. I tak przy najwyższej dawce acetonu $125 \text{ cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ wartość DH dla gleby N2 po 7 i 30 dniach oddziaływania rozpuszczalnika wynosiła odpowiednio 58 i 33 % kontroli. Pomimo niewielkich różnic w właściwościach obu gleb (Tabela II), bardziej aktywna biologicznie gleba N2 o większej zawartości frakcji spławialnej charakteryzowała się większą podatnością na wpływ acetonu niż gleba N1. Różnice te uwidaczniały się szczególnie w warunkach silniejszego stresu; przy najwyższym poziomie acetonu i po czasie 30 dni wartość DH dla gleby N1 wynosiła 51 %, a dla gleby N2 – 33 % kontroli.

Tabela IV. Ocena wpływu acetonu i dichlorometanu na aktywność dehydrogenaz w glebach nie aktywowanej wstępnie.

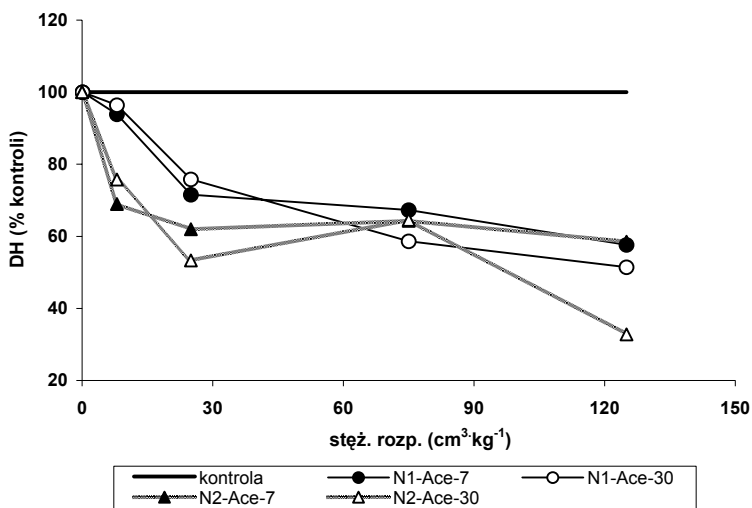
Assessment of the effects of acetone and dichloromethane on the activity of dehydrogenases in soils without pre-activation treatment.

Zawartość acetonu * ($\text{cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$)	DH ($\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{s.m.}$)			
	gleba N3		gleba N4	
	aceton	dichlorometan	aceton	dichlorometan
0 (kontrola)	40,6 ^a	40,6 ^a	93,4 ^a	93,4 ^a
20	38,1 ^a	35,7 ^a	95,5 ^a	94,7 ^a
60	24,6 ^b	25,3 ^b	49,9 ^b	72,4 ^b
180	19,9 ^c	19,2 ^c	43,2 ^b	54,2 ^c

Wartości oznaczone w kolumnach tymi samymi literami nie różnią się od siebie w sposób istotny (ocena na podstawie odchylenia standardowego).

*/ wartości nominalne (ilość wprowadzona do gleby)

W Serii II doświadczeń porównywano wpływ dwóch rozpuszczalników, acetonu i dichlorometanu na aktywność dehydrogenaz przy zróżnicowanych właściwościach materiału glebowego. Dla zróżnicowania warunków doświadczalnych, w tej serii badań rozpuszczalniki wprowadzono do gleb suchych, bez aktywacji wstępnej. Przy najniższym zastosowanym stężeniu $20 \text{ cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ żaden z rozpuszczalników nie wpływał na aktywność DH lub powodował nieznaczną stymulację tego parametru - Tabela IV. Pierwsze efekty toksyczne rozpuszczalników (53 – 77 % kontroli) zaobserwowano przy poziomie $60 \text{ cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ - Tabela IV, Rycina 2. Dalszy wzrost zawartości zarówno acetonu, jak i dichlorometanu do poziomu $180 \text{ cm}^3\cdot\text{kg}^{-1}$ powodował spadek aktywności DH do około 50 % kontroli - Ryc 2. Różnice pomiędzy oddziaływaniem acetonu i dichlorometanu były ściśle uzależnione od właściwości gleb: w bar-

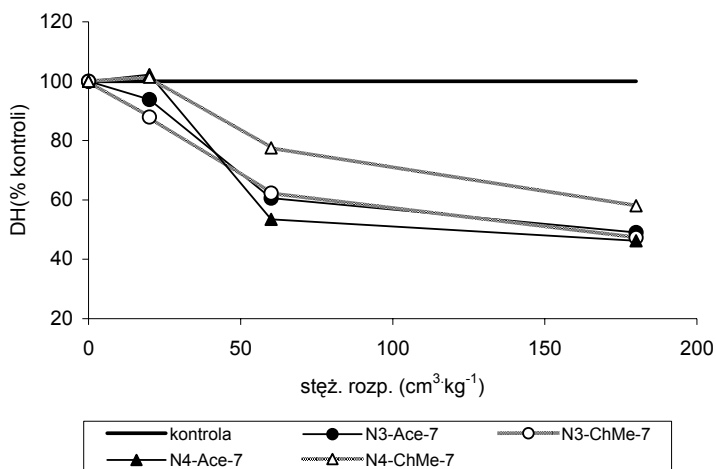


Ryc. 1. Względna aktywność dehydrogenaz (DH) po 7 i 30 dniach oddziaływania acetonu w glebach N1 i N2 (kontrola=100%) – Seria I.

Relative activity of dehydrogenases (DH) after 7 and 30 days of incubation of soils N1 and N2 amended with acetone - Series I.

dziej aktywnej biologicznie glebie N4 o niższej zawartości C_{org} (Tabela II) wpływ acetonu był wyraźnie silniejszy i kształtował się na tym samym poziomie, co w glebie N3, gdzie różnice pomiędzy oddziaływaniem obu rozpuszczalników były minimalne - Rycina 2.

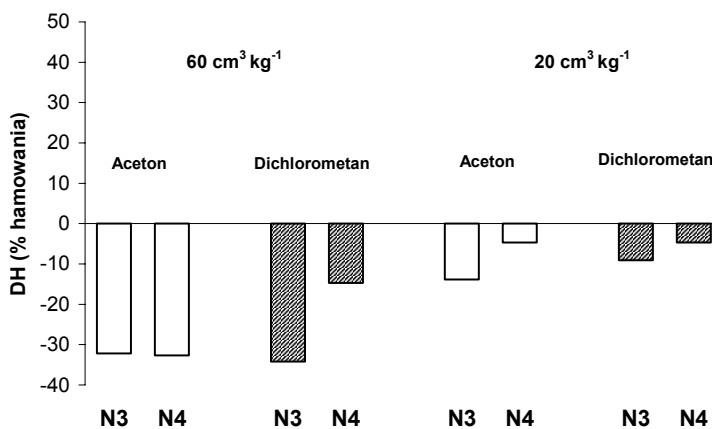
Na podstawie danych przedstawionych na Rycinach 1 i 2 wyznaczono odpowiednie równania regresji liniowej opisujące zależność względnych wartości DH od zawartości rozpusz-



Ryc. 2. Względna aktywność dehydrogenaz (DH) po 7 dniach inkubacji gleb N3 i N4 z dodatkiem acetonu (Ace) i dichlorometanu (ChMe) (kontrola=100%) – Seria II.

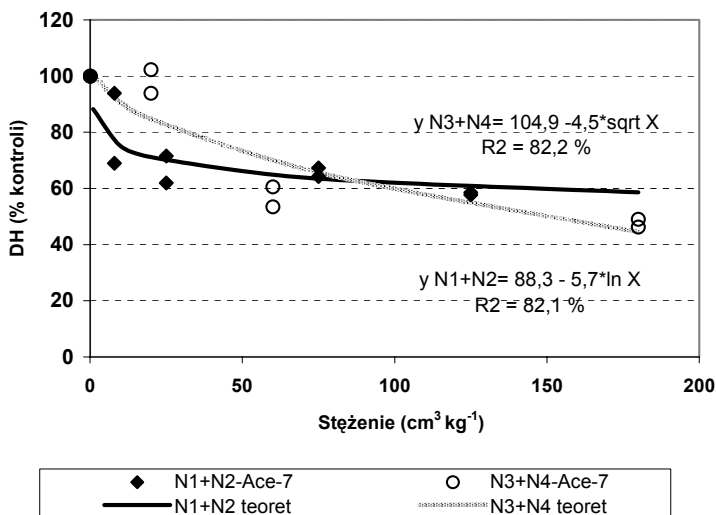
Relative activity of dehydrogenases (DH) after 7 days of incubation of soils N3 and N4 amended with acetone (Ace) and dichloromethane (ChMe) (control = 100%) – Series II.

czalnika w glebie. Dla odpowiednich kombinacji rozpuszczalnik/gleba miały one formy: aceton/N3: $-20,39 \ln(x)+151$ (R^2 0.92), aceton/N4: $-25,48 \ln(x)+171$ (R^2 0.84), dichlorometan/N3 $-18,48 \ln(x)+141$ (R^2 0.97) i dichlorometan/N4: $-0,25x+100$ (R^2 0.89). Równania te pozwoliły na obliczenie względnych wartości DH dla gleb N3 i N4 przy zawartościach acetonu i dichlorometanu $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ i $60 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ odpowiadających maksymalnym dawkom stosowanym w innych badaniach [15, 17, 26]. Na podstawie tych wartości wyznaczono odpowiednie stopnie hamowania DH zgodnie z równaniem [20]: $\text{SH} = (\text{DH-pr} / \text{DH-k} - 1) \times 100 \%$, gdzie: SH – stopień hamowania, DH-pr – DH próbki, DH-k – DH kontroli. Wyniki porównane na Rysunku 3 wskazują na tendencję silniejszej zależności oddziaływania dichlorometanu od właściwości gleb, niż w przypadku acetonu.



Ryc. 3. Stopień hamowania aktywności dehydrogenaz (DH) przy stężeniu acetonu i dichlorometanu $60 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ i $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ po 7 dniach oddziaływania rozpuszczalników w glebach N3 i N4
Inhibition of dehydrogenases activity (DH) at the concentration of acetone and dichloromethane of $60 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ i $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ after 7 days of incubation of soils N3 and N4.

W celu oceny wpływu wstępnej aktywacji gleb na oddziaływanie rozpuszczalników na aktywność mikrobiologiczną gleb porównano wyniki uzyskane w I i II Serii badań dla acetonu po 7 dniach inkubacji wyznaczając krzywe regresji linowej opisujące wyniki zbiorcze dla obu gleb w każdej serii: regresja logarymiczna dla gleb N1+N2 w serii I i regresja kwadratowa dla gleb N3+N4 w Serii II – Rycina 4. W obu przypadkach wyznaczone równania objaśniały 82 % zmienności wyników. Przebieg krzywych nie wskazuje na znaczący wpływ wstępnego aktywowania gleb na oddziaływanie acetonu na wartość DH, niemniej przy niskich dawkach rozpuszczalnika ($<70 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$) można zaobserwować tendencję silniejszego jego oddziaływania w glebach nie aktywowanych, gdzie aceton wprowadzano do gleby suchej. Porównanie wyników dla poszczególnych gleb (np. gleb N2 i N4 o zbliżonych właściwościach) także wskazuje na słabsze oddziaływanie acetonu w glebach nie aktywowanych (po 7 dniach inkubacji w glebie N2 pierwszy efekt przy $8 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$, a w glebie N4 – przy $60 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$).



Ryc. 4. Regresje liniowe opisujące wpływ acetonu na względną aktywność dehydrogenaz (DH) w glebach aktywowanych wstępnie (N1+N2) i nie aktywowanych (N3+N4). Czas inkubacji 7 dni.

Linear regressions describing effect of acetone on the dehydrogenases activity in soils pre-activated (N1+N2) and without pre-activation treatment (N3+N4) after 7 days incubation

W Serii III doświadczeń oceniano oddziaływanie dichlorometanu na aktywność bakterii nityfikacyjnych w glebach wstępnie aktywowanych przez okres 14 dni (IIIa) i w glebach nie aktywowanych (IIIb). W wszystkich glebach poddanych aktywacji wstępnej istotne zmniejszenie wartości PN po 15 dniach oddziaływania dichlorometanu nastąpiło już przy najniższym zastosowanym stężeniu $10 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ – Tabela V. Toksyczny wpływ rozpuszczalnika był najsilniejszy w glebie N5, w której stwierdzono 92 % (w stosunku do kontroli) obniżenie aktywności bakterii nityfikacyjnych w stosunku do 33 % i 29 % odpowiednio w glebach

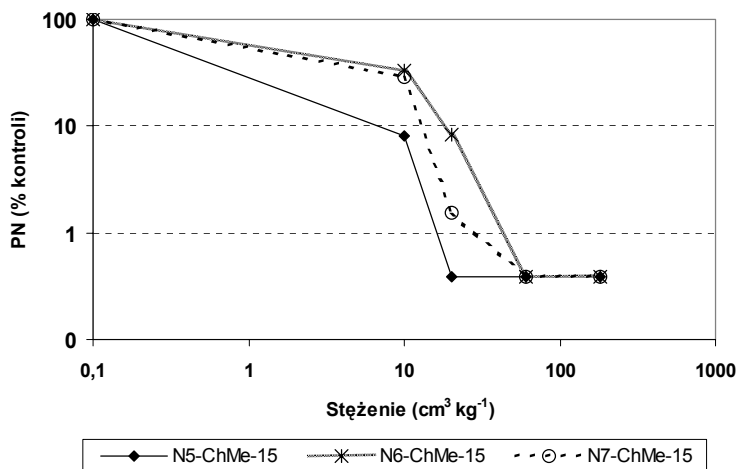
Tabela V. Wpływ dichlorometanu na potencjał nityfikacji (Seria IIIa - gleby aktywowane wstępnie, jednostopniowe dodawanie rozpuszczalnika, Seria IIIb - gleby nie aktywowane wstępnie, dwustopniowe dodawanie rozpuszczalnika).

The effect of dichloromethane on the potential of nitrification (Series IIIa –soil pre-activated, one-step solvent addition, Series IIIb – soils without pre-activation treatment, two-steps solvent addition)

Zawartość dichlorometanu * ($\text{cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$)	PN ($\mu\text{g NO}_2^- \text{ g}^{-1} \cdot \text{s.m.}$)				
	Seria III a			Seria III b	
	N5	N6	N7	N6	N7
0 (kontrola)	2,61 ^a	0,12 ^a	0,65 ^a	1,41 ^a	0,48 ^a
10	0,21 ^b	0,04 ^b	0,19 ^b	-	-
20	0	0	0	1,43 ^a	0,47 ^a
60	0	0	0	-	-
180	0	0	0	-	-

* / wartości nominalne (ilość wprowadzona do gleby) ; -) nie badano.

N6 i N7 - Rycina 4. Wzrost ilości dodawanego rozpuszczalnika do poziomu $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ powodował całkowite zahamowanie aktywności bakterii utleniających amoniak. Natomiast ta sama dawka dichlorometanu wprowadzona stopniowo do suchych gleb nie aktywowanych nie powodowała efektów toksycznych; nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w aktywności bakterii nityfikacyjnych w stosunku do kontroli - Tabela V.



Ryc. 5. Względny potencjał nityfikacji (PN) po 15 dniach inkubacji z dodatkiem dichlorometanu (kontrola = 100%) – Seria IIIa.

Relative potential of nitrification (PN) in soils amended with dichloromethane after 15 days of incubation of soils amended with dichloromethane (control = 100%) – Series IIIa.

DYSKUSJA

Z przeprowadzonych badań wynika, że przeciętnie stosowane w badaniach ekotoksykologicznych [6, 15, 16, 17, 28] ilości rozpuszczalników ($20\text{--}25 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$) mogą wpływać negatywnie na ogólną aktywność mikroorganizmów glebowych; w zależności od warunków doświadczalnych i właściwości gleb pierwsze efekty były obserwowane w zakresie $8\text{--}60 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ - (Tabele III i IV). Stąd obserwowana w wielu badaniach tendencja do zmniejszania ilości rozpuszczalników, szczególnie dla substancji o wyższej rozpuszczalności, do dawek nie przekraczających $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ [16, 28]. Jednak wprowadzanie związków w tak małych objętościach rozpuszczalnika może powodować niewystarczającą homogeniczność próbek oraz stwarzać problemy przy przygotowywaniu roztworów związków, zwłaszcza przy ich wysokich stężeniach [7, 23].

Aktywność specyficznych bakterii utleniających amoniak była czulszym wskaźnikiem zanieczyszczenia gleb rozpuszczalnikami niż ogólna aktywność dehydrogenaz (Tabele III - V), co potwierdza opinie o dużej przydatności oznaczeń potencjału nityfikacji w badaniach ekotoksykologicznych [8, 11, 25, 29].

Informacje z zakresu oddziaływania rozpuszczalników na mikroflorę glebową są dość ograniczone, co utrudnia porównanie uzyskanych wyników z rezultatami innych autorów.

Brinch i in. [3] wykazali, że dichlorometan przy poziomie $25 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ zmniejsza liczebność bakterii o około 20 % silniej niż aceton. *Kanazawa* i *Filip* [13] zauważyli, że dodanie do gleby dichlorometanu w ilości $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ hamowało aktywność bakterii utleniających NH_4 , ale nie wywierało wpływu na szczepy przeprowadzające rozkład glukozy i naftalenu. *Miller* i in. [1997] zanotowali 60–80 % hamowania procesu nityfikacji w glebie zawierającej $10 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ dichlorometanu. Podobny poziom zaobserwował oraz *Crawford* i *Chalk* [6] w glebie z dodatkiem acetonu w ilości $25 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$. Natomiast *Sverdrup* [29] nie zauważyła istotnej różnicy w aktywności nityfikacji pomiędzy próbkami z dodatkiem acetonu w ilości $200 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$, a glebą nie zawierającą rozpuszczalnika.

Jednym z istotnych problemów przy porównywaniu wyników badań ekotoksykologicznych jest stosowanie przez różnych autorów zróżnicowanych warunków doświadczeń, takich jak np. czas kontaktu organizm-zanieczyszczenie. Zaobserwowany ogólny spadek aktywności mikrobiologicznej gleb przy dłuższych czasach ich inkubacji w warunkach laboratoryjnych bez uzupełniania substancji odżywczych (Tabela III, Ryc. 1) jest zjawiskiem notowanym często [6, 8, 15]. Towarzyszący mu spadek odporności mikrobiologicznej na oddziaływanie acetonu może być związany z kumulowaniem się warunków stresowych (niedobór składników pokarmowych i obecność zanieczyszczenia) lub obumieraniem mniej odpornych mikroorganizmów [6, 22, 29]. Ponieważ niewątpliwie w tym samym czasie następuje znaczny spadek zawartości acetonu w glebie (np. w wyniku parowania z wodą lub degradacji chemicznej i biologicznej [19], stąd różnice obserwowane były głównie przy wysokich poziomach rozpuszczalnika. Przedłużone działanie rozpuszczalników po ich jednorazowym wprowadzeniu do gleb obserwowano również w innych pracach. *Kanazawa* i *Filip* [13] wskazywali na toksyczny wpływ rozpuszczalników na aktywność enzymów β -glukozydazy i proteiny po 28 dniach ich oddziaływania, a *Brinch* i in. [3] zauważyli oddziaływanie rozpuszczalników na liczebność bakterii nawet po 33 dniach. Uzyskane dane potwierdzają wcześniejsze obserwacje autorów [15], że mikrobiologiczne testy ekotoksyczności w warunkach laboratoryjnych nie powinny przekraczać okresu 7-15 dni.

Wstępna aktywacja gleb, stosowana dość często w badaniach oddziaływania zanieczyszczeń na mikroorganizmy glebowe, wskazywała na słabsze oddziaływanie acetonu na aktywność dehydrogenaz (przy niższych poziomach rozpuszczalnika – Ryc. 4) oraz dichlorometanu na aktywność bakterii nityfikacyjnych (Tabela V) w glebach nie aktywowanych. Uzyskany materiał doświadczalny wydaje się jednak wskazywać, że sam proces aktywacji mikroorganizmów nie odgrywał w tym przypadku decydującej roli. W przypadku acetonu istotne znaczenie może tu mieć fakt, że w glebach nie aktywowanych aceton wprowadzono do gleby suchej (w przeciwieństwie do gleb aktywowanych uwilgotnionych na poziomie 60 % ppw), z których rozpuszczalnik ten ulatniał się łatwo. Natomiast dodanie dobrze rozpuszczalnego w wodzie acetonu do gleby wilgotnej (Seria I) mogło zwiększać jego biodostępność dla mikroorganizmów glebowych i intensyfikować negatywny wpływ na aktywność dehydrogenaz [2]. Przy wyższych zawartościach acetonu, udział strat przez ulatnianie był najprawdopodobniej mniejszy. W drugim przypadku (efekt dichlorometanu na PN) decydującym czynnikiem był najprawdopodobniej sposób dodawania rozpuszczalnika. Dichlorometan dodany do małej pod-próbki gleby odparowywał przez okres 1 doby i następne wymieszanie tej porcji z pozostałą częścią próbki nie powodowało już reakcji nawet tak czułych mikroorganizmów jak bakterie nityfikacyjne. Obniżenie toksyczności dichlorometanu dodawanego do gleb suchych mogło być także związane z silną sorpcją rozpuszczalnika i zmniejszeniem jego biodo-

stępności [22]. Dwustopniowy sposób wprowadzania roztworów związków organicznych do gleb był zalecany i stosowany w innych pracach [3, 15, 17, 20, 22, 23].

Charakterystyka gleb wpływała na oddziaływanie rozpuszczalników (Tabela III, Ryc. 3), chociaż w przeprowadzonym zakresie badań trudno było ustalić istotne zależności między właściwościami gleb i oddziaływaniem związków organicznych takich acetonu lub dichlorometanu. Obszerniejsze informacje z zakresu powiązania podatności gleb na ekotoksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń organicznych z ich właściwościami przedstawiono w wcześniejszych publikacjach [16, 19, 20, 21].

Zaobserwowany wzrost aktywności DH przy niskich stężeniach dichlorometanu (Tabela IV, Ryc. 2) może wskazywać, że dichlorometan w niewielkiej dawce mogą być wykorzystywane przez mikroorganizmy glebowe jako źródło węgla i energii [1, 6]. Ponadto obecność rozpuszczalników może przyczynić się do zwiększenia rozpuszczalności węgla organicznego zawartego w glebach, a tym samym zwiększenia jego biodostępności dla mikroorganizmów [6].

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Rozpuszczalniki takie jak aceton i dichlorometan mogą oddziaływać negatywnie na aktywność mikroorganizmów glebowych w ilościach stosowanych powszechnie w badaniach ekotoksykologicznych ($10 - 20 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$). Ich wpływ na aktywność bakterii glebowych jest uzależniony zarówno od właściwości materiału glebowego jak i od warunków doświadczenia (czas kontaktu, wstępna aktywacja, wilgotność gleby, sposób dozowania rozpuszczalnika). Bardzo istotne znaczenie ma też mierzony parametr (wskaźnik aktywności mikrobiologicznej); aktywność specyficznych bakterii nityfikacyjnych jest znacznie czulszym wskaźnikiem zanieczyszczenia gleb niż ogólna aktywność dehydrogenaz. Ograniczenie negatywnego oddziaływania rozpuszczalników można uzyskać poprzez zmniejszanie ich ilości (uwzględniając jednakże możliwość jednorodnego wprowadzenia zanieczyszczenia do próbki gleb) oraz dwustopniowe wprowadzanie roztworu zanieczyszczeń do gleby. Niemniej w wszystkich badaniach toksyczności związków hydrofobowych konieczne jest uwzględnienie każdorazowo serii badań kontrolnych gleby z dodatkiem rozpuszczalnika, w ilościach, jakie są zastosowane przy dodawaniu badanych związków.

A. Klimkowicz-Pawlas, B. Maliszewska-Kordybach

WPLYW WYBRANYCH ROZPUSZCZALNIKÓW ORGANICZNYCH NA AKTYWNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu rozpuszczalników organicznych stosowanych w badaniach ekotoksykologicznych na aktywność mikroorganizmów glebowych. Do badań wytypowano dwa rozpuszczalniki stosowane najczęściej w ocenie oddziaływań hydrofobowych organicznych zanieczyszczeń środowiskowych: aceton i dichlorometan. Ocenę oddziaływania wybranych rozpuszczalników oparto na pomiarach dwóch parametrów określających: - ogólną aktywność mikrobiologiczną gleb (aktywność dehydrogenaz), - aktywność specyficznej grupy bakterii nityfikacyjnych (potencjał nityry-

fikacji). Badania prowadzono w zróżnicowanych warunkach laboratoryjnych (właściwości materiału glebowego, czas oddziaływania, metoda dozowania rozpuszczalnika). Stwierdzono, że zastosowane rozpuszczalniki dozowane do gleb w ilościach stosowanych w badaniach ekotoksykologicznych (10-20 cm³ kg⁻¹) mogą wpływać hamująco na aktywność mikrobiologiczną gleb, szczególnie w przypadku specyficznych bakterii nityfikacyjnych. Zastosowanie metody stopniowego dozowania rozpuszczalników do gleby w istotny sposób może zmniejszyć te negatywne efekty.

A. Klimkowicz-Pawlas, B. Maliszewska-Kordebach

EFFECT OF THE SELECTED ORGANIC SOLVENTS ON THE ACTIVITY OF SOIL MICROORGANISMS

Summary

The aim of the study was to evaluate the effect of organic solvents, commonly used in ecotoxicity studies on the activity of soil microorganisms. Two solvents, often applied in the studies of the effects of hydrophobic organic contaminants in the environment, acetone and dichloromethane, were employed in the experiments. The evaluation of the effects of the solvents was based on the measurements of two parameters describing the overall activity of soil microorganisms (activity of dehydrogenases) and the activity of the specific group of nitrification bacteria (potential of nitrification). The experiments included different laboratory conditions (soil material properties, time of contact, methods of solvent amendment). The results show that the solvents introduced to soils in the amount commonly used in the ecotoxicity studies (10-20 cm³ kg⁻¹) may inhibit the activity of soils microorganisms; the effect was particularly visible in the case of potential of nitrification determinations. Employment of the method of gradual application of the solvents to soils led to significant decrease of those negative effects.

PIŚMIENNICTWO

1. Alexander M.: How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29, 2713-2717.
2. ATSDR – US Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service: Toxicological profile for acetone 1994.
3. Brinch U.C., Ekelung F., Jacobsen C.S.: Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds. *Applied Environ. Microb.* 2002, 68, 1808-1816.
4. Casida L.E., Klein D.A., Santoro T.: Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 1964, 98, 371-376.
5. Criquet S., Joner E., Leglise P., Leyval C.: Athracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa L.*). *Biotechnology Letters*, 2000, 22, 1733-1737.
6. Crawford D.M., Chalk P.M.: Mineralization and immobilization of soil and fertilizer nitrogen with nitrification inhibitors and solvents. *Soil Biol. Biochem.* 1992 24, 559-568
7. Doick K.J., Lee P.H., Semple K.T.: Assessment of spiking procedures for the introduction of a phenanthrene-LNAPL mixture into field-wet soil. *Environmental Pollution*, 2003, 126, 399-406.
8. Hicks R. J., Stotzky G., Van Voris P.: Review and Evaluation of the Effects of Xenobiotic Chemicals on Microorganisms in Soil. *Adv. App. Microb.* 1990, 35, 195-253.
9. ISO/DIS 15685: Soil quality – Determination of potential nitrification – Rapid test by ammonium oxidation. 2001
10. ISO 16072: Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration (N65). 2002
11. ISO 15799: Soil quality - Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials. 2003

12. *Jenkinson D.S., Powlson D.S.*: The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. - V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 1976, 8, 209-213.
13. *Kanazawa S., Filip Z.*: Effects of trichloroethylene, tetrachloroethylene and dichloromethane on enzymatic activities in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1986, 25, 76-81.
14. *Kästner M., Breuer-Jammali M., Mahro B.*: Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 359-362.
15. *Klimkowicz-Pawlas A.*: Wpływ wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na aktywność mikrobiologiczną gleb i na rośliny. Praca doktorska, IUNG-PIB, Puławy, 2005
16. *Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B.*: Effect of soils contamination with phenanthrene on soil dehydrogenases activity. *Chemia i Inż. Ekologiczna.* 2004, 11, 595-602.
17. *Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B.*: Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. *Water Air and Soil Pollution*, 2003, 145, 169-186
18. *Maliszewska-Kordybach B.*: Trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie. Praca habilitacyjna, 81 pp. Wyd. IUNG, H Puławy, 1993.
19. *Maliszewska-Kordybach B.*: Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshly contaminated soils – the effect of soil physicochemical properties and aging. *Water, Air and Soil Pollution*, 2005, 168, 113-128.
20. *Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B.*: Changes of soil microbial properties in the course of PAH dissipation in soils artificially contaminated with these compounds. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2003, 23, 1-21
21. *Maliszewska-Kordybach B., Klimkowicz-Pawlas A., Smreczak B.*: Effect of soil physicochemical properties on toxicological bioavailability of phenanthrene for soil microorganisms”. *Mat. of International Workshop “Bioavailability of pollutants and soil remediation”, Sevilla, Spain, 10-13 September, 2006.*
22. *Miller J.L., Sardo M.A., Thompson T.L., Miller R.M.*: Effect of application solvents on heterotrophic and nitrifying populations in soil microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 1997, 16, 447-451
23. *Northcott G. L., Jones K.C.*: Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment: a review and critique of adopted procedures. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000, 19, 10, 2418-2430.
24. *Ostrowska A., Gawliński K., Szczubialka Z.*: Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin. Instytut Ochrony Roślin, Warszawa. 1991.
25. *Pankhurst C.E., Rogers S.L., Gupta V.S.R.*: Microbial parameters for monitoring soil pollution. W: *Lynch J.M., Wiseman A.* (eds). *Environmental Biomonitoring: The Biotechnology Ecotoxicology Interface.* : p. 46-68. Cambridge University Press, Cambridge. 1998
26. *Reilley K. A., Banks M. K., Schwab A. P.*: Dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 1996, 25, 212-219.
27. *Rossel D., Tarradellas J., Bitton G., Morel J.L.*: Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case of dehydrogenase and hydrolytic enzymes. W: *Tarradellas J., Bitton G., Rossel D.* (eds.). *Soil Ecotoxicology.* : p. 179 – 206 Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London, Tokyo 1997
28. *Schwartz E., Tinh S., Scow K. M.*: Impact of methylene chloride on microorganisms and phenanthrene mineralization in soil. *J. Environ. Qual.* 2002, 31, 144-149.
29. *Sverdrup L.E.*: Toxicity of tar constituents in terrestrial ecosystem. Effects of eight polycyclic aromatic compounds on terrestrial plants, soil invertebrates and microorganisms. Ph.D. Thesis, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo. 2001.