

Teresa Steliga*, Piotr Kapusta, Piotr Jakubowicz***

OCENA EFEKTYWNOŚCI PROCESÓW BIOREMEDIACYJNYCH NA PODSTAWIE TESTÓW TOKSYKOLOGICZNYCH

1. WPROWADZENIE

Analiza bioindykacyjna jest częścią rozległej wiedzy określanej mianem ekotoksykologii. Współczesna ekotoksykologia jest interdyscyplinarną, intensywnie rozwijającą się gałęzią nauki obejmującą chemię, ekologię i toksykologię, której celem jest między innymi ocena stanu środowiska i pośrednio ochrona zdrowia człowieka. W bioindykacji jako wskaźniki wykorzystywane są żywe organizmy, których reakcja może być podstawą do oceny ogólnej aktywności badanego układu [10, 11].

Produkty ropopochodne, które stanowią złożoną mieszaninę związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, mogą być przyczyną niekorzystnych dla człowieka zmian zachodzących w skażonych ekosystemach. Należy również nadmienić, że w wyniku przemian chemicznych i mikrobiologicznych mogą powstawać metabolity o zróżnicowanej lub słabo poznanej aktywności biologicznej. Całkowite wyeliminowanie zanieczyszczeń w procesach bioremediacyjnych gleb skażonych substancjami ropopochodnymi jest niezmiernie trudne do osiągnięcia, gdyż nawet niewielkie ilości metabolitów mogą być niebezpieczne. Oznaczenie poziomu stężeń pozostałych zanieczyszczeń jest trudne i dlatego coraz częściej ocenę stopnia skażenia wykonuje się za pomocą testów toksykologicznych, które ponadto dają obraz badanych populacji w zakresie śmiertelności, wzrostu, reprodukcji i zaburzeń fizjologicznych. Dobór metod testowych jest niezwykle ważnym elementem w badaniach toksykologicznych.

Zastosowany w biotestach żywy organizm musi odpowiadać surowym wymaganiom, między innymi ciągłej dostępności i jednorodności genetycznej. Obecnie wprowadzane są gotowe testy sporządzane w postaci pakietów, pozwalające na ocenę toksyczności badanych

* Instytut Nafty i Gazu Oddział Krosno

** Instytut Nafty i Gazu Kraków

prób w krótkim czasie. Zawierają one formy kryptobiotyczne bioindykatorów pochodzące ze standardowych hodowli, które mogą być długo przechowywane i w razie potrzeby w krótkim czasie przygotowane do testu [9].

2. METODYKA BADAWCZA

W prowadzonych badaniach nad oczyszczaniem odpadów z dołów urobkowych ocenę skuteczności stosowanych zabiegów bioremediacyjnych uzupełniono o monitoring toksykologiczny. Zastosowanie żywych organizmów jako bioindykatorów należących do różnych grup taksonomicznych (bakterii, skorupiaków i roślin wyższych) reprezentujących wszystkie grupy troficzne: producentów, konsumentów i reducentów, pozwala na kompleksową ocenę stanu badanego środowiska (tab. 1).

Tabela 1

Zestawienie testów oceny toksykologicznej gleby z dołów urobkowych

Poziom troficzny	Organizm	Nazwa testu	Reakcje testowe	Czas trwania	Typ testu
Bakterie					
Reducenci	<i>Vibro fischeri</i>	Microtox® SPT	zahamowanie luminescencji	15 min	ostry
Skorupiaki					
Konsumenci	<i>Heterocypris incongruens</i>	Ostracodtoxkit™	zahamowanie wzrostu, śmierć	6 dni	ostry
Rośliny wyższe					
Producenci	<i>Sorghium Sacharatum</i>	Phytotoxkit™	kiełkowanie i wczesny wzrost	3 dni	chroniczny
	<i>Lepidium sativum</i>				
	<i>Sinapis alba</i>				

Microtox Solid Phase – test fazy stałej

Na szczególną uwagę zasługuje test Microtox®, który jako pierwszy test bioindykacyjny powstał w 1979 r. w USA. Łączy on właściwą bioindykację z precyzją analityczną. Jako bioindykator zastosowane zostały bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*, które w normalnych warunkach około 10% metabolizmu zużywają na wytwarzanie światła, którego natężenie może być mierzone fotometrem. W obecności substancji toksycznych, wpływających ujemnie na metabolizm, bakterie bardzo szybko reagują spadkiem luminescencji, która obniża się wraz ze wzrostem toksyczności ogólnej próbki [1–3, 6].

Test Microtox Solid Phase umożliwia bezpośredni kontakt bakterii luminescencyjnych z próbką gleby, co pozwala na wykrycie nie tylko substancji rozpuszczalnych w wodzie, ale

także związków lipofilnych lub słabo rozpuszczalnych w wodzie. Test ten jest produkowany przez firmę SDI (USA) i rozprowadzany w Polsce przez firmę Tigret. Zakupione liofilizowane bakterie mogą być przechowywane przez rok w temperaturze -20°C i użyte do testu w każdej chwili po zawieszeniu w wodzie dejonizowanej.

Test przesiewowy wykonuje się wg standardowej procedury z użyciem analizatora Delta Tox i liofilizowanych bakterii *Vibro fischeri*. Test zasadniczy przeprowadzany jest dla próbek, które w teście przesiewowym były toksyczne. Wyniki obliczone z wykorzystaniem oprogramowania SDI podawane są jako EC_{50} , czyli stężenie badanej próbki, które powoduje powstanie 50% efektu toksycznego. W celu lepszego zobrazowania wyników, wartości EC_{50} przeliczono na jednostki toksyczności $TU = 100/EC_{50}$.

Test bezpośredniego kontaktu Ostracodtoxkit(F)TM

Zastosowany w badaniach gleby z dołów urobkowych Test Ostracodtoxkit(F)TM należy do testów bezpośredniego kontaktu (TBT) i służy do oceny toksyczności chronicznej z wykorzystaniem skorupiaka *Heterocypris incongruens* [4] (rys. 1). Testy te produkowane są przez MicroBiotest z Belgii i rozprowadzane w Polsce przez firmę Tigret.

Interpretacja wyników polega na obliczeniu ilości żywych mikroorganizmów w każdym dołku mikro płytki oraz zmierzeniu ich długości. Na tej podstawie można obliczyć: wskaźnik zahamowania wzrostu (w %) oraz śmiertelność – jeżeli w przypadku zastosowanych mikroorganizmów przekracza 50%, to efekt przeżyciowy (obniżenie przyrostu mikroorganizmów) nie jest brany pod uwagę i w tabeli wyników oznaczany jest znakiem X.



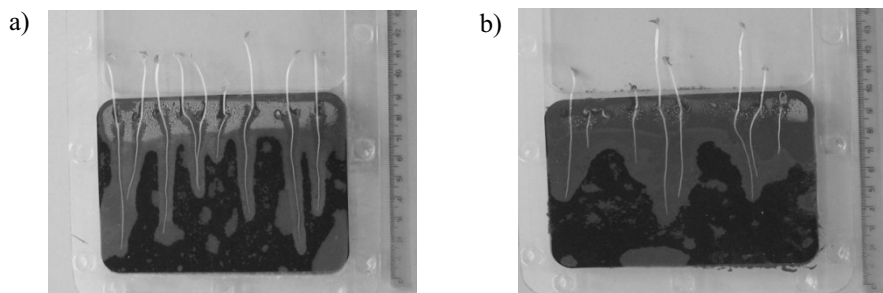
Rys. 1. Obraz skorupiaka *Heterocypris incongruens*

Test fitotoksyczności

Konwencjonalnie testy fitotoksyczności produkowane według międzynarodowych lub krajowych norm są skomplikowane, wymagają dużej przestrzeni laboratoryjnej i są czasochłonne. Specyfika testu Phytotoxkit pozwala ominąć niepraktyczne i czasochłonne czynności związane z kiełkowaniem nasion konieczne w wielu oznaczeniach fitotoksyczności i umożliwia bezpośredni pomiar długości korzeni metodą analizy obrazu [5]. Test ten należy do grupy testów Toxkit produkowanych przez firmę MicroBiotest i jest rozprowadzany w Polsce przez firmę Tigret.

Test PhytotoxkitTM należy do testów oceny toksyczności chronicznej i jest oparty na ocenie kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin. W standardowym teście używane są trzy

rodzaje roślin wyselekcjonowanych ze względu na szybkość kiełkowania i szybkość wzrostu korzeni: jednoliścienne – sorgo (*Sorghum saccharatum*), dwuliścienne – rzeżucha (*Lepidium sativum*) oraz gorczyca (*Sinapis alba*). Test ten umożliwia wykonanie pełnego oznaczenia w ciągu jedynie trzech dni inkubacji. Rejestracja wyglądu płytki testowej na końcu trwania testu może być wykonana przy użyciu aparatu fotograficznego lub skanera płaskiego (rys. 2). W celu analizy obrazu oraz pomiaru długości korzeni roślin stosuje się program ImageTool. Zdjęcia należy wykonywać na tle ramki umożliwiającej kalibrację.



Rys. 2. Przykładowy obraz wzrostu roślin testowych na próbce gleby kontrolnej (a) oraz na glebie z dołu urobkowego w trakcie procesu oczyszczania (b) – test Phytotoxkit™

Analiza testu polega na:

- obliczeniu ilości wykiełkowanych roślin – wskaźnik kiełkowania (w %),
- pomiarze długości korzeni,
- obliczeniu wskaźnika zahamowania wzrostu korzenia w stosunku do próbki kontrolnej (w %).

Test Ames

Wiele zanieczyszczeń ropopochodnych oraz metabolitów powstałych podczas procesu ich biodegradacji zawiera związki o charakterze rakotwórczym. Zastosowanie do ich identyfikacji metod analitycznych stwarza duże problemy, gdyż związki te w środowisku występują w ilościach śladowych. W przypadku gruntów silnie skażonych substancjami ropopochodnymi, które poddane zostały zabiegom rekultywacyjnym, wskazane jest rozszerzenie testów biologicznych o wykrywanie substancji o potencjalnych własnościach mutagennych i rakotwórczych. Do tego celu wykorzystano test Ames [8, 14], który jest stosowany nie tylko do badań pojedynczych związków, ale i różnego rodzaju mieszanin, np. ropa naftowa, woda pitna, ścieki itp. Zasada testu Ames polega na określeniu mutacji powrotnych z histydynowej auktotrofii do prototrofii w mutantach, którymi są szczepy testowe *Salmonella triphimurium*. Szczepy testowe są mutantami niezdolnymi do syntezy histydyny. Pod wpływem substancji o własnościach mutagennych dochodzi do rewersji mutacji i przywrócona zostaje zdolność do syntezy histydyny, czego efektem jest pojawienie się kolonii rewertantów na podłożu bez histydyny [7].

Do przeprowadzenia testu Ames zastosowano nowoczesny mikropłytkowy test AMES MPF, który może być stosowany do wykrywania genotoksycznej aktywności gleby

skażonej substancjami ropopochodnymi i metabolitami powstałymi w trakcie procesów bioremediacyjnych. Dostarczone mikroorganizmy *Salmonella typhimurium* T-98 i T-100 podlegają ścisłej kontroli jakościowej (genotyp i fenotyp). Rezultatem prowadzenia testu jest reakcja barwna, kolor żółty oznacza wystąpienie mutacji powrotnej, a purpurowy – jej brak.

3. CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU BADAWCZEGO

W opisywanych pracach, jako materiał badawczy wykorzystano glebę i ziemię pobraną z dołu urobkowego Graby-67 (tab. 2) w trakcie prowadzenia procesów oczyszczania obejmujących następujące etapy: remediację wstępną (drenaż melioracyjno-odciekowy), bioremediację podstawową, inokulację biopreparatami na bazie mikroorganizmów autochtonicznych i grzybów [12, 13].

Tabela 2

Charakterystyka zawartości zanieczyszczeń w materiale badawczym
– gleba z dołu urobkowego Graby-67

Próbka	Zawartość [mg/kg s.m.]		
	TPH	BETX	Σ WWA
A	153 448	167,8	2,127
B	5689	20,60	0,625
C	1006	6,280	0,289

- A – próbka surowa gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-67 (przed rozpoczęciem oczyszczania).
- B – próbka gleby i ziemi po I serii inokulacji biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych.
- C – próbka gleby i ziemi po zakończeniu procesów bioremediacyjnych (po okresie trzech lat oczyszczania).

W trakcie procesów oczyszczania metodą *in situ* prowadzono monitoring chemiczny, chromatograficzny i mikrobiologiczny oraz zastosowano dodatkowo monitoring toksykologiczny z wykorzystaniem testów biologicznych obejmujących wszystkie poziomy troficzne.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykonane wstępnie badania skринingowe pozwoliły na wytypowanie próbek charakteryzujących się istotnym efektem toksyczności (poziom obniżenia luminescencji powyżej 50%). Następnie wykonano testy podstawowe z rozcieńczeniami, które pozwoliły na określenie EC_{50} (tab. 3).

Tabela 3

Wartości stężenia efektywnego powodującego hamowanie luminescencji uzyskane dla wyciągów gleb pobranych z terenu dołu urobkowego Graby-67

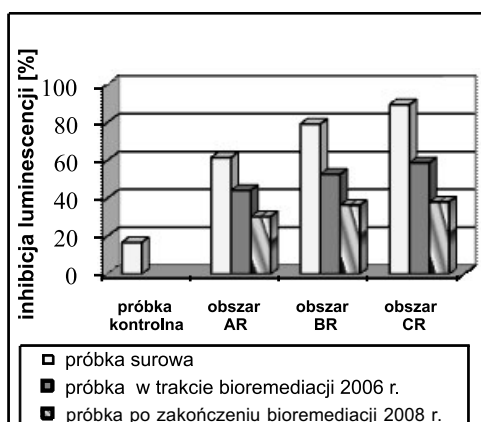
Parametr	Ujednociona próbka gleby z obszaru AR (trzy powtórzenia)			Ujednociona próbka gleby z obszaru BR (trzy powtórzenia)			Ujednociona próbka gleby z obszaru CR (trzy powtórzenia)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
EC ₅₀	14,8	21,3	b.t.	4,3	23,8	b.t.	3,8	20,8	b.t.
TU	6,75	4,69	–	23,1	4,20	–	26,7	4,80	–

b.t. – brak toksyczności.

AR, BR, CR – obszary wyodrębnione z dołu urobkowego różniące się stopniem zanieczyszczenia substancjami ropopochodnymi

Próbki gleby surowej pobranej z poszczególnych obszarów dołu urobkowego Graby-67 charakteryzowały się toksycznością szczególnie widoczną dla obszaru CR o najwyższym stopniu skażenia. Zanieczyszczenia zawarte w testowanych próbkach spowodowały ponad 50% inhibicję luminescencji w zakresie: 61,5–89,5%. Wykonane testy z rozcieńczeniami wykazały, że stężenie efektywne (w okresie 15 min) powodujące spadek luminescencji o 50% uzyskane dla wyciągu gleb surowych wynosi $EC_{50} = 3,8–14,8\%$ (współczynnik toksyczności $TU = 6,75–26,7$), co wskazuje na widoczną toksyczność na obszarze BR i CR.

Dodatkowo wykonano także analizę toksyczności prób wyciągów z gleby pobranej w toku procesu bioremediacji prowadzonej metodą *in situ* (po okresie dwóch lat). Zanotowano zmniejszenie stopnia toksyczności gleby ($TU = 4,2–4,8$), co może wskazywać, że odnotowana toksyczność może pochodzić od metabolitów powstających w trakcie prowadzonego procesu bioremediacji lub węglowodorów, które nie uległy biodegradacji (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ wyciągów próbek glebowych z dołu urobkowego Graby-67 na inhibicję luminescencji

Próbki gleby i ziemi po procesie biologicznego oczyszczania nie hamowały luminescencji bakterii testowych w stopniu wskazującym na obecność związków toksycznych (czyli nie było możliwości wyznaczenia dla nich wartości EC_{50}).

Na podstawie przeprowadzonych testów toksyczności Microtox[®] SPT z wykorzystaniem jako bio wskaźników bakterii *Vibrio fischeri* można stwierdzić, że gleba na terenie dołu urobkowego Graby-67 po przeprowadzonym procesie oczyszczania metodą *in situ* jest nietoksyczna.

Badania toksyczności dla poziomu troficznego konsumentów prowadzono z wykorzystaniem testu Ostracodtoxikit F^{MT}. Jest to 6-dniowy test toksyczności chronicznej określający śmiertelność i hamowanie wzrostu oparty na skorupiakach *Heterocypris incongruens*. Należy on do testów, za pomocą których wstępnie określa się toksyczność gleby. W przypadku próbki gleby surowej pobranej z poszczególnych obszarów dołu urobkowego Graby-67 śmiertelność bioindykatorów zawiera się w granicach: 46,6–61,6%, co dowodzi bardzo wysokiej toksyczności gleby z obszarów BR i CR (wysoki stopień skażenia substancjami ropopochodnymi) i znacznie niższej toksyczności próbki gleby z obszaru AR o niższym stopniu skażenia. Zahamowanie wzrostu skorupiaków dla próbki surowej z obszaru AR wyniosło 38,7% (tab. 4).

Tabela 4

Zestawienie wyników testu Ostracodtoxikit FTM przeprowadzonego na próbkach gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-67

Badany parametr	Próbka kontrolna	Ujednolicona próbka gleby z obszaru AR (sześć powtórzeń)			Ujednolicona próbka gleby z obszaru BR (sześć powtórzeń)			Ujednolicona próbka gleby z obszaru CR (sześć powtórzeń)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Śmiertelność										
Średnia śmiertelność [%]	10,0	46,6	27,1	20,6	53,3	35,6	21,6	61,6	38,1	23,3
Współczynnik zmienności średniej śmiertelności [%]	–	2,85	4,72	6,12	2,43	3,92	4,95	2,25	3,75	4,76
Zahamowanie wzrostu										
Średnia długość organizmów [μm]	219	148	172	201	135	169	195	125	172	199
Średni przyrost organizmów [μm]	431	264	289	402	X	252	395	X	245	382
Średnia hamowania wzrostu [%]	–	38,7	32,9	9,7	X	41,9	8,3	X	43,1	11,3

W trakcie prowadzonego procesu oczyszczania (inokulacja biopreparatem na bazie mikroorganizmów autochtonicznych) śmiertelność testowanych organizmów uległa zmniejszeniu do poziomu 27,1 i 35,6%, a zahamowanie wzrostu wyniosło: 32,9–41,9%. W przypadku próbki z najbardziej zanieczyszczonego obszaru CR śmiertelność organizmów wyniosła 38,1%, przy zahamowaniu wzrostu o 43,1%. Przedstawione wyniki wskazują na istotny efekt toksyczności pomimo obniżenia stopnia skażenia, co może wskazywać na obecność metabolitów powstałych w wyniku biodegradacji węglowodorów ropopochodnych.

Badania przeprowadzone na ujednoczonych próbkach gleby z dołu urobkowego Graby-67 (obszary: AR, BR i CR) po zakończeniu procesu oczyszczania wykazują zmniejszenie się stopnia śmiertelności do poziomu: 20,6–23,3%, zbliżonego do średniej śmiertelności (w %) określonej dla próbki kontrolnej. Drugi badany parametr (zahamowanie wzrostu) uległ znacznemu obniżeniu i kształtował się na niskim poziomie w zakresie: 8,3–11,3%. Uzyskane wyniki wskazują, że oczyszczana gleba i ziemia z dołu urobkowego Graby-67 są nietoksyczne.

Testy fitotoksyczności z wykorzystaniem testu Phytotoxkit™ zastosowano w celu przebadania toksyczności gleby dla poziomu troficznego producentów. Testy wykazały znaczne różnice pomiędzy badanymi próbkami gleby oraz pomiędzy różnymi gatunkami roślin dla tej samej próbki gleby (tab. 5).

Badane próbki gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-67 przed procesem oczyszczania były toksyczne dla rzeżuchy, gdyż powodowały zahamowanie wzrostu korzenia w granicach: od 94,8 do 98,4%, co koreluje z zawartością zanieczyszczeń ropopochodnych w analizowanych próbkach z wyodrębnionych obszarów dołu urobkowego.

Pomimo znacznego obniżenia zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych na poszczególnych obszarach dołu urobkowego Graby-67 po przeprowadzeniu inokulacji biopreparatem G-67-1 zahamowanie wzrostu rzeżuchy nadal było wysokie i zawierało się w granicach: 42,8–54,3%, co może wskazywać, że rzeżucha jest bardzo wrażliwa na obecne w glebie metabolity i węglowodory ropopochodne, które nie uległy biodegradacji. Ilość wykiełkowanych nasion dla próbki surowej wahała się w granicach: 13,3–23,32%, zaś w trakcie prowadzenia procesu bioremediacji wzrosła do 43,3–66,6%. Po zakończeniu prac bioremediacyjnych, prowadzonych przez trzy lata, procent wykiełkowanych nasion rzeżuchy kształtował się na wysokim, zbliżonym do próbki testowej poziomie wynoszącym 93,3%, a zahamowanie wzrostu korzenia zawierało się w granicach od 18,8 do 30,1%.

Znacznie mniej wrażliwe na zanieczyszczenia zawarte w glebie i ziemi z dołu urobkowego okazały się gorczyca i sorgo. W przypadku gorczycy, która wykazała największą odporność na zanieczyszczenia w badanych próbkach gleby, procent wykiełkowanych nasion był wysoki w odniesieniu do wszystkich analizowanych próbek, gdyż wynosił od 83,3 do 96,6%. Zahamowanie wzrostu korzenia w próbkach surowych z poszczególnych obszarów wyniosło 47,6–66,7%, w trakcie bioremediacji 27,8–32,1%, natomiast po zakończeniu prac bioremediacyjnych wskaźnik zahamowania wzrostu korzenia gorczycy zawierał się w przedziale od –7,8 do –16,6% (większy przyrost niż w próbce kontrolnej). W przypadku sorgo dla gleby surowej ilość wykiełkowanych nasion wahała się w granicach: 56,6–80,0% w stosunku do próbki kontrolnej. Wzrost korzenia w próbkach surowych z poszczególnych obszarów uległ zahamowaniu w granicach: 54,4–79,2%. Natomiast w toku bioremediacji ilość wykiełkowanych nasion wynosiła: 93,3%, a zahamowanie wzrostu korzenia zawierało się w przedziale 35,3–40,2%.

Tabela 5

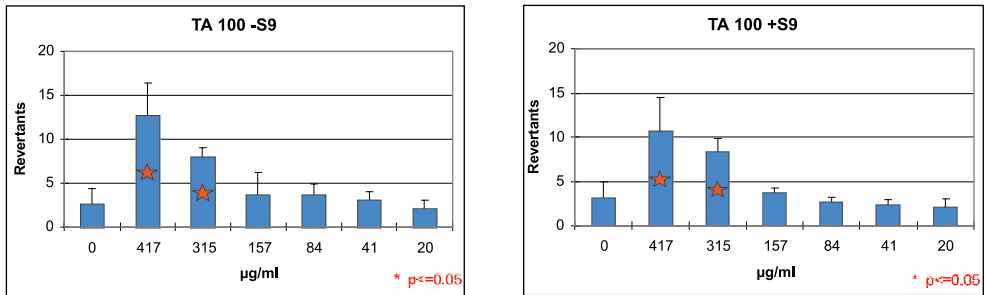
Zestawienie wyników testu Phytotoxkit™ przeprowadzonego na próbkach gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-67

Parametr	Próbka kontrolna	Ujednolicona próbka gleby z obszaru AR (trzy powtórzenia)			Ujednolicona próbka gleby z obszaru BR (trzy powtórzenia)			Ujednolicona próbka gleby z obszaru CR (trzy powtórzenia)		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
Rzeżucha (<i>Lepidium Sativum</i>)										
Kielkowanie [%]	100	16,6	66,6	96,6	13,3	53,3	93,3	23,3	43,3	93,3
Średnia długość korzenia [mm]	42,53	1,21	24,31	34,52	0,92	21,83	31,52	0,62	19,21	29,75
Zahamowanie wzrostu [%]	–	94,8	42,8	18,8	97,8	48,6	25,8	98,4	54,3	30,1
Współczynnik zmienności [%]	29,4	40,3	39,5	41,2	59,6	41,5	36,5	51,2	43,8	39,5
Gorzycza (<i>Sinapis alba</i>)										
Kielkowanie [%]	96,6	86,6	96,6	93,6	83,3	90,0	93,3	83,3	93,3	96,6
Średnia długość korzenia [mm]	36,72	19,21	24,92	42,84	13,25	23,81	37,01	12,45	22,49	39,78
Zahamowanie wzrostu [%]	–	47,6	32,1	–16,6	63,9	34,8	–7,8	66,7	27,8	–8,3
Współczynnik zmienności [%]	24,5	49,5	32,5	23,5	41,2	35,9	29,5	42,8	39,5	29,5
Sorgo (<i>Sorghum saccharatum</i>)										
Kielkowanie [%]	96,6	83,3	93,3	96,6	80,0	80,0	96,6	56,6	80,0	96,6
Średnia długość korzenia [mm]	58,73	26,73	38,01	50,21	14,85	36,02	48,31	12,11	35,09	46,2
Zahamowanie wzrostu [%]	–	54,4	35,3	14,5	74,7	38,2	17,7	79,2	40,2	21,3
Współczynnik zmienności [%]	41,2	49,5	39,2	34,2	62,3	42,3	38,2	55,2	45,8	29,5

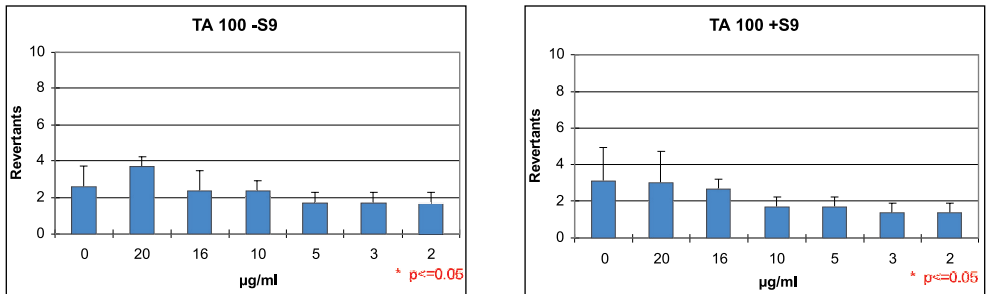
Stosunkowo wysoki stopień zahamowania wzrostu korzenia testowanych roślin w trakcie procesu bioremediacji po przeprowadzonych procesach biologicznego oczyszczania może wskazywać na obecność metabolitów, które powstały podczas procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych.

Po zakończeniu prac bioremediacyjnych na terenie dołu urobkowego Graby-67 zahamowanie wzrostu korzeni kształtowało się na niskim poziomie: 14,5–21,3% przy dobrym kiełkowaniu roślin na poziomie 96,6%. Uzyskane wyniki badań dowodzą, że gleba i ziemia na terenie dołu urobkowego Graby-67 jest nietoksyczna.

W celu zbadania właściwości mutagennych surowej i oczyszczonej gleby z dołu urobkowego wykonano test Ames, wykorzystując standardowe szczepy TA98 i TA100 posiadające własności mutagenne. Ekstrakty (dichlorometan) pochodzące ze skażonych gleb odparowano i rozpuszczono w dimetylosulfotlenku (DMSO). Wyniki badań zilustrowano na rysunku 4 (gleba surowa) i rysunku 5 (gleba po procesie bioremediacji) w postaci zmian liczby (%) rewertantów indukowanych w zależności od koncentracji zanieczyszczeń ropopochodnych. Do obliczeń wykorzystano program komputerowy producenta testu Ames.



Rys. 4. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na procentowy udział rewertantów – gleba surowa z dołu urobkowego Graby-67



Rys. 5. Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na procentowy udział rewertantów – gleba oczyszczona z dołu urobkowego Graby-67

W przypadku próbek gleby surowej z dołu urobkowego Graby-67 stwierdzono statystycznie istotne zwiększenie mutacji powrotnych ($p < 0,05$) dla szczepu TA100, natomiast w przypadku szczepu TA98 nie stwierdzono mutacji powrotnych. Aktywator frakcji mikrosomalnej S9 z wątroby szczura nie miał wpływu na liczbę mutacji powrotnych. Wskaźnik mutagenności, przy którym próby uznano za mutagenne, zawierał się w granicach 2,15–3,38. Ekstrakty z próbek gleby oczyszczonej z dołu urobkowego Graby-67 nie wykazywały cech mutagennych (rys. 5). Wskaźnik mutagenności kształtował się na poziomie 0,27–0,98.

5. PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań potwierdzają wysoką efektywność przeprowadzonych kolejnych etapów oczyszczania gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-67 metodą *in situ*.

Ocenę skuteczności stosowanych metod oczyszczania gleby i ziemi z dołu urobkowego Graby-67 skażonej substancjami ropopochodnymi potwierdzono wykonanymi testami toksykologicznymi. Zastosowanie bioindykatorów należących do różnych grup taksonomicznych (bakterii, skorupiaków i roślin wyższych), reprezentujących wszystkie poziomy troficzne: producentów, konsumentów i reducentów, pozwoliły na kompleksową ocenę stanu badanego środowiska.

Na podstawie wyników badań z wykorzystaniem testu Amesa stwierdzono, że przeprowadzony proces bioremediacji spowodował obniżenie w glebie zawartości substancji o własnościach potencjalnie mutagennych.

Testy toksykologiczne wykonane zostały zarówno na materiale glebowym pobranym przed rozpoczęciem bioremediacji, jak i po zakończeniu procesu oczyszczania. Wyniki testów toksykologicznych przeprowadzonych po zakończeniu oczyszczania terenu dołu urobkowego Graby-67 wskazują, że oczyszczana gleba jest nietoksyczna.

Rozwój technik biologicznych umożliwił opracowanie i wdrożenie do praktyki laboratoryjnej testów biotoksykologicznych – skutecznych, wiarygodnych i łatwych do przeprowadzenia nawet w zwykłych laboratoriach chemicznych. Testy te pozwalają na stwierdzenie szkodliwości materiału glebowego bez konieczności określania grup związków chemicznych (zarówno zanieczyszczeń, jak i metabolitów) mogących negatywnie wpływać na organizmy żywe, a co za tym idzie – bez wykonywania wielu skomplikowanych i kosztownych analiz chemicznych.

LITERATURA

- [1] Acheson C.M., Qin Z., Yonggui. S., Sayles G.D., Kupferle M.: *Comparing the soil phase and saline extract Microtox assays for two polycyclic hydrocarbon contaminated soil*. „Environmental toxicology and chemistry” 2004, 23, s. 245–251
- [2] Araujo C.V.M., Oliveira C.A., Strotmann U.J., de Silva E.M.: *The use Microtox to assess toxicity removal of industrial effluents from the industrial district of Camacari (BA, Brazil)*. „Chemosphere” 2005, 58, s. 1277–1281
- [3] Casseils N.P., Lane C.S., Depala M., Saeed M., Craston D.H.: *Microtox testing of pentachlorophenol in soil extracts and quantification by capillary electrochromatography (CEC) – A rapid screening approach for contaminated land*. „Chemosphere” 2000, 40, s. 609–618
- [4] Chial B., Persoone G.: *Cyst-based toxicity tests XV-Application of ostracod solid-phase microbiotest for toxicity monitoring of contaminated soils*. „Environmental Toxicology” 2003, 18, s. 347–352
- [5] Czerniawska-Kusza I., Ciesielczuk T., Kusza G., Cichoń A.: *Comparison of the Phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments*. „Environmental Technology” 2006, 21, s. 367–372

- [6] Harky G.A., Young T.M.: *Effect of soil contaminant method determining toxicity using Microtox assay*. „Environmental toxicology and chemistry” 2000, 19, s. 276–282
- [7] Kołwzan B.: *Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną*. „Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Politechniki Wrocławskiej” 2005, 44, s. 1–186
- [8] Maron D.M., Ames B.N.: *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. „Mutation Res.” 1983, 113, s. 173–215
- [9] Nałęcz-Jawecki G.: *Badanie toksyczności środowiska wodnego metodą bioindykacji*. „Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie” 2003, 2, s. 1–12
- [10] Persoone G., Marszałek B., Bilinowa I., Torokone A., Zarina D., Manusadziannas L., Nałęcz-Jawecki G.: *A practical and user friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters*. „Environmental Toxicology” 2003, 18, s. 395–402
- [11] Sawicki J., Nałęcz-Jawecki G., Mankiewicz-Boczek J., Sumorok B., Drobniewska A., Kaza M.: *Kompleksowa analiza ekotoksykologiczna wód powierzchniowych*. Projekt MNiI nr. POF 056 28, 2007
- [12] Steliga T.: *Optymalizacja procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w zestarzałych odpadach z dołów urobkowych*. „Gospodarka Surowcami Mineralnymi PAN” 2008, 24, s. 87–111
- [13] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Effectiveness of bioremediation processes of hydrocarbon pollutants in weathered drill wastes*. „Water, Air, Soil and Pollut.” akceptacja do druku 22.12.2008, 2009
- [14] Zeiger E., Anderson B.E., Haworth S., Lawlor T., Mortelmans K.: *Salmonella mutagenicity test. V. Results from the testing of 311 chemicals*. „Environmental Mol. Mutagen.” 1992, 19, s. 2–141