

PATRYK OLESZCZUK, STANISŁAW BARAN

ZASTOSOWANIE BIOTESTÓW DO OCENY  
ZANIECZYSZCZENIA GLEB  
PRZEZ WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY  
AROMATYCZNE\*

APPLICATION OF BIOTESTS TO EVALUATION OF SOIL  
CONTAMINATION BY POLYCYCLIC AROMATIC  
HYDROCARBONS

Instytut Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska, Akademia Rolnicza w Lublinie

*Abstract:* The aim of the present study was to determine relationships between the content of polycyclic aromatic hydrocarbons and results from biotests (Phytotoxkit F, Ostracodtoxkit F). The experimental soils were collected from: Silesia, Lublin, Biała Podlaska and Sokolniki. The PAH content ranged widely from 363 to 27883  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Only in the case of *L. sativum* significant statistical relationships were noted between root lengths after 3 days of incubation and PAH content, and between root length of *S. alba* and the content of 5- and 6-ring PAHs after 6 days of incubation.

*Słowa kluczowe:* WWA, toksyczność, gleba, antropopresja, TZO, biotesty.

*Key words:* PAHs, toxicity, soil, anthropopressure, POPs, biotests.

## WSTĘP

Oznaczenie całkowitej zawartości ksenobiotyków w glebie tzw. monitoring chemiczny nie zawsze daje pełne odzwierciedlenie realnego ekotoksykologicznego zagrożenia związanego z ich obecnością w środowisku. W celu uzupełnienia badań chemicznych od pewnego czasu [Kuczyńska i in. 2005] stosowane są metody biologiczne, np. bioindykacja. Badania przy zastosowaniu organizmów żywych mogą stanowić

\*Praca naukowa finansowana ze środków MNiI jako projekt badawczy Nr 3 P06S 012 24.

stanowiąc uzupełnienie obecnej wiedzy na temat zależności między całkowitą i biodostępną zawartością ksenobiotyków a ich ekotoksykologicznym oddziaływaniem na środowisko. W związku z tym celem podjętych badań było określenie możliwości zastosowania biotestów do oceny zanieczyszczenia gleb przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Badano również wpływ frakcji potencjalnie biodostępnej (rozpuszczonej w wodzie glebowej) na wzrost organizmów testowych.

## MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Próbki gleb do badań pobierano z obszarów charakteryzujących się zróżnicowanymi wpływami antropogenicznymi. Na podstawie wcześniejszych badań [Oleszczuk, Baran 2005] wytypowano pięć ogródków działkowych w miejscowościach: Bytom (50°19' N; 18°51' E), Miasteczko Śląskie (50°32' N; 18°50' E), Lublin (51°13' N; 22°34' E), Biała Podlaska (52°02' N; 28°07' E) i Sokolniki (50°36' N; 21°48' E). Próbki do badań pobierano z warstwy gleby 0–20 cm. Glebę suszono w temperaturze pokojowej, a następnie przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm. Podstawowe właściwości fizykochemiczne oznaczano zgodnie z procedurami stosowanymi w laboratoriach glebowochemicznych [Misztal i in. 1997]. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tabeli 1. Zawartość WWA oznaczano metodą HPLC-UV [Oleszczuk, Baran 2004].

TABELA 1. Właściwości fizyko-chemiczne badanych gleb  
TABLE 1. The physico-chemical properties of investigated soils

Właściwość – Property		B	MS	L	BP	S
Skład granulometr. Texture [mm]	1–0,1	64	47	26	63	74
	0,1–0,02	25	35	62	27	19
	<0,02	11	18	12	10	7
pH <sub>KCl</sub>		7,2	6,8	7,0	5,5	5,3
Corg	g · kg <sup>-1</sup>	2,4	4,6	2,4	3,7	2,2
Nog	g · kg <sup>-1</sup>	0,21	0,32	0,20	0,27	0,21
Hh	mmol · kg <sup>-1</sup>	7,0	10,5	7,0	38,5	38,5
S	mmol · kg <sup>-1</sup>	407,9	257,1	163,2	109,1	73,6

B – Bytom, MS – Miasteczko Śląskie, L – Lublin, BP – Biała Podlaska, S – Sokolniki; pH – odczyn; reactivity; Corg – zawartość węgla organicznego – organic carbon content; Nog – zawartość azotu ogólnego – the total amount of nitrogen; Hh – kwasowość hydrolityczna – hydrolytic acidity; S – suma kationów zasadowych – the cation exchange capacity

W standardowym teście Phytotoxkit F<sup>TM</sup> używane są 3 rodzaje nasion. Biorąc pod uwagę szybkość kiełkowania i szybkość wzrostu korzeni, wykonanie oznaczenia możliwe jest w ciągu 3 dni inkubacji (według producenta testu). W niniejszych badaniach zastosowano: sorgo (*Sorghum saccharatum*), rukiew (*Eruca sativa*) i gorczycę (*Sinapis alba*) dostarczone przez producenta testów (Microbiotests Inc, Belgia) oraz rzeżuchę ogrodową (*Lepidium sativum*) otrzymaną z firmy PNOiS (Ożarów Mazowiecki, Polska). W przypadku *S. saccharatum*, *E. sativa* i *S. alba* oceniano przyrost długości korzeni dodatkowo po 6 dniach inkubacji nasion.

Test toksyczności chronicznej wykonano przy wykorzystaniu zestawu Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup> (Microbiotests Inc, Belgia). Procedura testu polega na wystawieniu młodych skorupiaków (*Heterocypris incongruens*) na sześciodniowe działanie w cienkiej warstwie gleby. Na końcu okresu testowego określane są śmiertelność i zahamowanie wzrostu. Wyniki są porównywane z danymi uzyskanymi w równoległe prowadzonym teście z osadem kontrolnym [Chial, Persoone 2003].

Zawartość WWA w wodzie glebowej wyliczona została na podstawie równowagowego współczynnika podziału [Klimkowicz-Pawlas, Maliszewska-Kordybach 2003]:

$$WWA_w = WWA_s / (K_{oc} \times f_{oc}) \quad (1)$$

gdzie:  $WWA_w$  – stężenie WWA w fazie wodnej ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $WWA_s$  – stężenie WWA w glebie ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ );  $f_{oc}$  – zawartość węgla organicznego w glebie ( $\text{kg}\cdot\text{kg}^{-1}$ );  $K_{oc}$  – współczynnik podziału woda-węgiel organiczny ( $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Analizę statystyczną wykonano posługując się programem Statistica 5.0. Związek między zawartością WWA w glebie a zahamowaniem wzrostu organizmów testowych określano na podstawie współczynników korelacji, oceniając istotność na poziomie  $P \leq 0,05$ . Istotność różnic szacowano testem Tukeya na poziomie  $P \leq 0,05$ . Oznaczenie WWA dla każdej próbki wykonano trzykrotnie i jako wynik podano średnią arytmetyczną z tych oznaczeń.

## WYNIKI I DYSKUSJA

### Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych

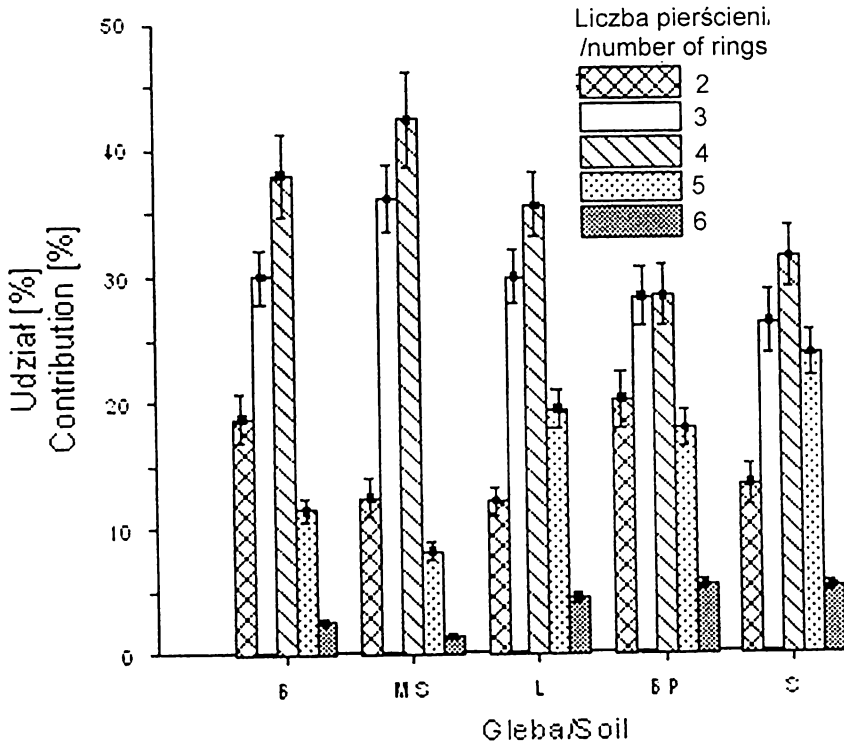
W tabeli 2 przedstawiono zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w badanych próbkach glebowych. Największą zawartością WWA charakteryzowały się gleby pobrane z obszaru Górnego Śląska (B, MS). Według klasyfikacji zaproponowanej przez IUNG [Maliszewska-Kordybach, Smreczak 1997], gleby te należy zaliczyć do bardzo silnie zanieczyszczonych wymagających natychmiastowych zabiegów rekultywacyjnych. Próbki glebowe z obszaru Lublina (L) oraz miejscowości Sokolniki (S) charakteryzowała umiarkowana zawartość WWA kwalifikująca je do zanieczyszczonych. Poziom zanieczyszczenia tych gleb jest podobny do gleb pochodzących z obszarów podlegających umiarkowanemu wpływom antropogenicznym [Maliszewska-Kordybach, 1999; Oleszczuk, Baran 2005]. Najniższą zawartością WWA

TABELA 2. Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ] w próbkach glebowychTABLE 2. Polycyclic aromatic hydrocarbons content [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ] in soil samples

WWA	MS*	B*	L*	BP*	S*
Na	2203,0±220	3456,8±415	389,0±35	73,0±8,0	257,2±31
Ace	1541,4±123	5586,6±447	510,8±46	46,9±4,7	233,8±28
Ac	588,4±47	1323,5±119	230,3±16	33,5±3,0	132,0±12
Fl	208,3 ±13	524,5±37	57,7±3	10,6±0,6	20,1±2
Phen	968,3±87	2210,0±155	133,7±9	9,7±0,6	84,7±8
Ant	225,0±11	419,4±25	29,9±2	2,0±0,2	32,7±3
Fluo	1923,8±135	5118,4±461	415,0±33	36,6±2,9	216,1±15
Pyr	1300,8±117	3626,6±290	334,9±20	24,9±2,2	165,1±13
BaA	767,9±77	1749,6±157	236,3±19	24,9±2,5	140,7±11
Ch	483,7±39	1309,2±131	159,3±11	16,5±1,3	81,2±7
BbF	460,3±32	847,1±76	194,0±12	35,8±2,5	179,1±13
BkF	235,3±16	479,4±38	121,0 8	17,0±1,4	87,5±6
BaP	579,0±52	868,5±78	270,0±24	29,0±2,3	189,0±15
DahA	71,2±7	74,9±5	37,6±4	n.d.	n.d.
BghiP	144,7±12	175,5±12	71,0±6	11,5±0,8	45,4±4
Ind	148,0±13	187,8±11	69,1±6	8,4±0,7	54,6±5
Suma	11849,3±963	27957,8±2289	3259,8±251	380,3±33,7	1919,3±179

\*Opis oznaczeń jak w Tabeli 1 – description of symbols as in Table 1; Na – Naftalen, Ace – Acenaftylen, Ac – Acenaften, Fl – Fluoren, Fen – Fenantren, Ant – Antracen, Fln – Fluoranten, Pir – Piren, BaA – Benz[a]antracen, Ch – Chryzen, BbF – Benzo[b]fluoranten, BkF – Benzo[k]fluoranten, BaP – Benzo[a]piren, DahA – Dibenz[ah]antracen, BghiP – Benzo[ghi]perylene, IP – Indeno[1,2,3-cd]piren

charakteryzowały się gleby Białej Podlaskiej (BP). Skład WWA w zależności od liczby pierścieni był bardzo zbliżony bez względu na pochodzenie próbki (rys. 1). Dominowały węglowodory 4- oraz 3-pierścieniowe, których udział w analizowanym materiale wahał się odpowiednio 28–45 oraz 26–36%. Zbliżony skład badanych węglowodorów może

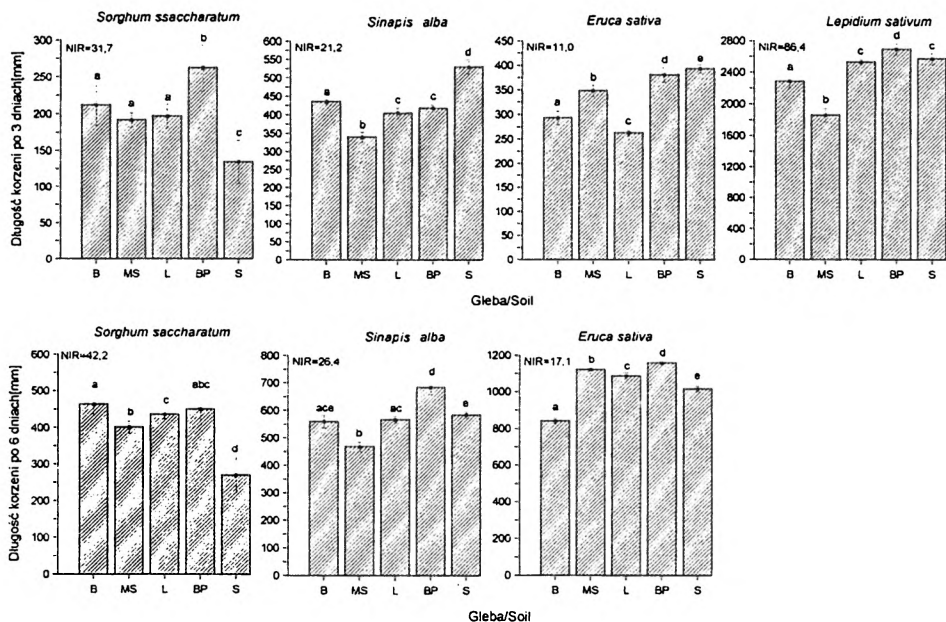


RYSUNEK 1. Udział [%] poszczególnych grup WWA w badanych glebach  
 FIGURE 1. Contribution [%] of individual PAHs (in relation to number of rings) in investigated soils

wskazywać na podobne źródło zanieczyszczenia gleb przez te związki. Spośród oznaczanych WWA największy udział wykazały: naftalen (12–20%), fluoranten (10–18%) oraz piren (7–13%).

### Biotesty a toksyczny wpływ zanieczyszczenia gleb

Z prezentowanych na rysunku 2 danych (długość korzeni po 3 dniach od rozpoczęcia badań) wyraźnie widać ekotoksyczne zróżnicowanie wpływu WWA kumulowanego w glebach w zależności od gatunku rośliny. W przypadku hodowli rukwi (*E. sativa*) i rzeżuchy (*L. sativum*) zanotowano istotne ( $P \leq 0,05$ ) różnice między niemal wszystkimi badanymi glebami. Mniejsze zróżnicowanie obserwowano w odniesieniu do gorczycy (*S. alba*), natomiast w przypadku sorgo (*S. saccharatum*) wyróżniono jedynie trzy grupy różniące się istotnie statystycznie. Po 6 dniach od rozpoczęcia badań (rys. 2) istotne różnice w długości korzeni między poszczególnymi glebami notowano w przypadku *E. sativa*, *S. saccharatum* i *S. alba*. Na podstawie przeprowadzonych testów najbardziej wyraźne zahamowanie wzrostu w pierwszym terminie badań odnotowano na bardzo silnie zanieczyszczonych glebach pobranych z Miasteczka Śląskiego (*S. alba*, *L. sativum*) i

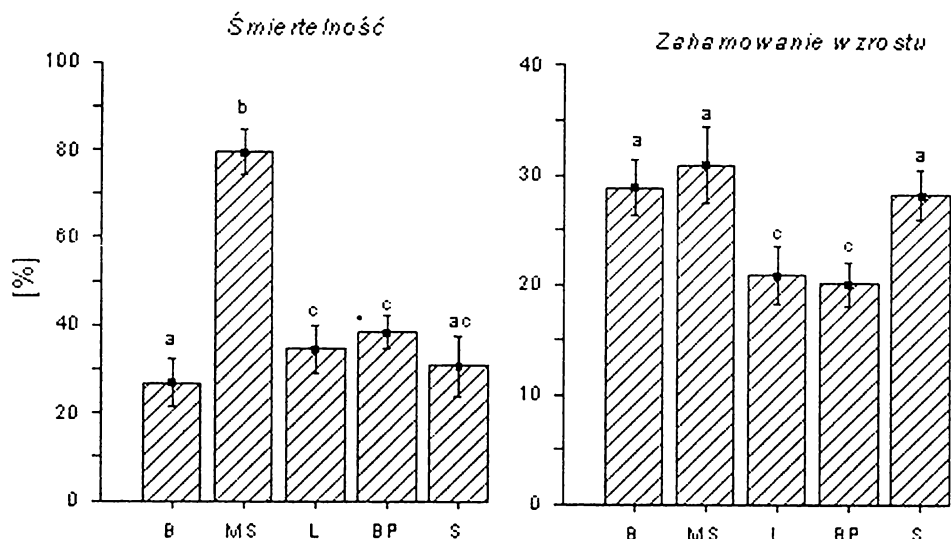


RYSUNEK 2. Długość korzeni roślin testowych po 3 i 6 dniach inkubacji  
 FIGURE 2. The length of tested plant roots after 3 and 6 days of incubation

Bytomia oraz na glebach zanieczyszczonych z Lublina (*E. sativa*) i miejscowości Sokolniki (*S. saccharatum*). W drugim terminie badań niekorzystne oddziaływanie gleb na długość korzeni zaznaczyło się przede wszystkim w próbkach pobranych z obszaru Górnego Śląska (Miasteczko Śląskie – *S. alba*, Bytom *L. sativum* I).

Największy niekorzystny wpływ gleby zanieczyszczonej WWA w stosunku do testowanych skorupiaków (rys. 3) stwierdzono dla gleb z obszaru Miasteczka Śląskiego (Górny Śląsk). Określona śmiertelność kształtowała się na poziomie 70% i była ponad dwukrotnie większa aniżeli w pozostałych badanych glebach (średnio  $32,7 \pm 5\%$ ). Zahamowanie wzrostu *H. incongruens* najwyraźniej zaznaczyło się w glebach Górnego Śląska oraz miejscowości Sokolniki.

Jednym z celów podjętych badań było określenie możliwości zastosowania biotestów do oceny poziomu zanieczyszczenia gleb przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Badania prowadzone przez wielu autorów nad wrażliwością roślin na WWA wskazują na jej znaczne zróżnicowanie [Sverdrup 2001; Maila, Cloete 2002; Smreczak, Maliszewska-Kordybach 2003]. Maila i Cloete [2002] wskazali na dużą wrażliwość *L. sativum* na zanieczyszczenie gleb przez WWA. Testowana roślina okazała się – zarówno pod względem siły kiełkowania oraz zahamowania rozwoju – dobrym wskaźnikiem zanieczyszczenia gleb przez WWA. W prezentowanych w niniejszej pracy badaniach, w przypadku większości WWA (w pierwszym terminie badań) uzyskano szereg istotnych ujemnych zależności między zawartością WWA w glebie a długością korzeni (rys. 4a).

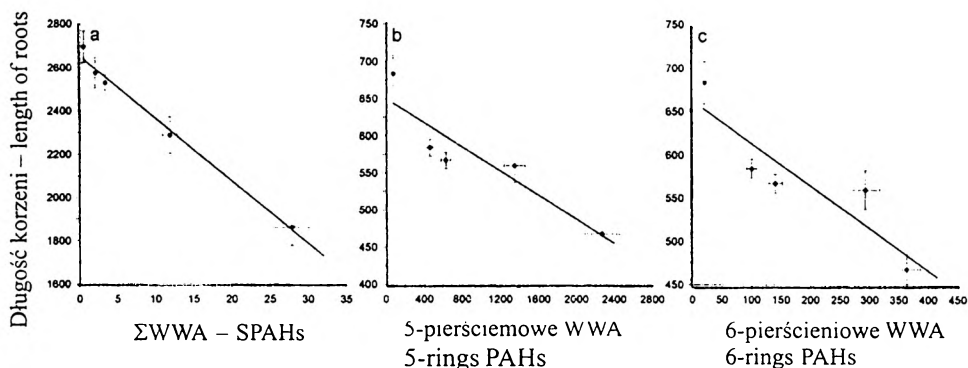


RYSUNEK 3. Śmiertelność i zahamowanie wzrostu *H. incongruens* po 6 dniach inkubacji w badanych glebach

FIGURE 3. The mortality and inhibition of *H. incongruens* growth after 6 days of incubation in studied soils

Może to świadczyć o jej wrażliwości na oznaczane ksenobiotyki oraz daje możliwość zastosowania *L. sativum* w ocenie toksyczności gleb zanieczyszczonych przez WWA. Dodatkowo w drugim terminie badań podobna zależność dotycząca jednak wyłącznie 5- i 6-pięścieniowych WWA (z wyjątkiem dibenz[ah]antracenu) zaznaczyła się w przypadku *S. alba* (rys. 4b). Podobnie jednak jak Svedrup [2001] nie obserwowano wpływu lekkich WWA (fluoren, fenantren, fluoranten i piren) na tę roślinę. Smreczak i Maliszewska-Kordybach [2003] testowały wrażliwość *Zea mays* L., *Hordeum vulgare* L., *Sinapis alba* L. oraz *Helianthus annuus* L. na mieszaninę 4 WWA (3- i 4-pięścieniowych) podanych w stężeniu 1, 10 i 100 mg/kg gleby. Autorki nie stwierdziły wyraźnego wpływu WWA na kiełkowanie nasion, w przypadku natomiast zahamowania wzrostu korzeni notowano istotną zależność między ich długością a zawartością w glebie WWA. Najbardziej wrażliwą rośliną okazał się *H. vulgare*.

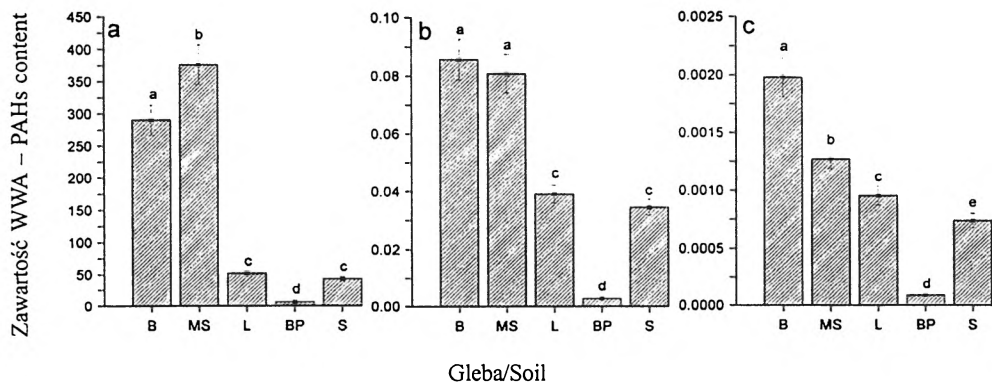
Istniejące w literaturze informacje wskazują, że skorupiaki (np. *Daphnia magna* lub *Daphnia pulex*) mogą stanowić dobry wskaźnik zanieczyszczenia środowiska (przede wszystkim wód i osadów dennych) przez wielopięścieniowe węglowodory aromatyczne [Wik, Dave 2005]. Obserwowana w niniejszych badaniach wrażliwość *Heterocypris incongruens* najwyraźniej zaznaczyła się w glebach Śląska, charakteryzujących się największą zawartością WWA. Nie uzyskano jednak istotnej zależności między zawartością WWA a śmiertelnością i zahamowaniem wzrostu *H. incongruens* dla wszystkich badanych gleb. Na dużą śmiertelność skorupiaków w glebie Miasteczka Śląskiego mogą również mieć wpływ obecne w niej inne zanieczyszczenia.



RYSUNEK 4. Zależność między zawartością WWA [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ] a długością korzeni [mm]: a – *L. sativum*, b i c – *S. alba*

FIGURE 4. Correlation between PAHs content [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ] and length of roots [mm]: a – *L. sativum*, b i c – *S. alba*

Dotychczas prowadzone badania wskazują, że całkowita zawartość zanieczyszczeń organicznych nie zawsze jest dobrym wskaźnikiem w ocenie ekotoksyczności zanieczyszczonych gleb [Alexander 2000]. Materia organiczna może redukować biodostępność ksenobiotyków [Haitzer i in. 1998], a także ich toksyczność w stosunku do bezkręgowców [Sverdrup i in. 2002]. Równowagowy współczynnik podziału, wyznaczany na podstawie całkowitej zawartości zanieczyszczenia oraz jego współczynnika podziału  $K_{oc}$  i zawartości węgla organicznego w glebie, pozwala na oszacowanie frakcji ksenobiotyku rozpuszczonego w wodzie glebowej. Na rysunku 5 przedstawiono



RYSUNEK 5. Zawartość WWA [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ] w wodzie glebowej wyliczona na podstawie równowagowego współczynnika podziału (wzór 1): a – dla sumy 16 WWA, b – dla 5-pierścieniowych WWA, c – dla 6-pierścieniowych WWA

FIGURE 5. PAHs content [ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ] in pore water evaluated on the basis of an equilibrium partition model (equ. 1). a – sum of 16 PAHs, b – 5-rings PAHs, c – 6-rings PAHs

zawartości sumy (SWWA), jak również 5- i 6-pierścieniowych WWA, wyliczonych na podstawie równowagowego współczynnika podziału. Mimo istotnej różnicy w całkowitej zawartości WWA (ekstrahowanej dichlorometanem) między poszczególnymi glebami (tab. 2), zawartość związków rozpuszczonych w wodzie glebowej (rys. 5) nie charakteryzowała się już tak wyraźnym zróżnicowaniem. Bardzo zbliżone zawartości  $WWA_w$  notowano w próbkach gleb Miasteczka Śląskiego i Bytomia oraz Lublina i Sokolnik. Tłumaczy to nieznaczne różnice między wskazanymi próbkami gleb obserwowane w przypadku badania fitotoksyczności (rys. 2) oraz zbliżone wyniki między Miasteczkiem Śląskim i Bytomiem w testach toksyczności chronicznej (zahamowanie wzrostu) z wykorzystaniem skorupiaków (rys. 3). Sugeruje to potrzebę dalszych badań szczególnie z uwzględnieniem frakcji biodostępnej i jej toksycznego oddziaływania na środowisko.

## WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki badań wskazują na specyficzne zachowanie się roślin w zależności od prawdopodobnego stopnia zanieczyszczenia gleb przez WWA.
2. Po trzech dniach kiełkowania najlepszym wskaźnikiem okazała się rzeżucha ogrodowa (*L. sativum*). Rozszerzenie badań do sześciu dni inkubacji wskazało również na istotną wrażliwość gorczycy (*S. alba*) na 5- i 6-pierścieniowe związki.
3. Brak zależności między śmiertelnością/zahamowaniem wzrostu *H. incongruens* a zawartością WWA w badanych glebach może wskazywać, że toksyczny wpływ WWA na testowe organizmy ma miejsce dopiero przy pewnym poziomie ich zawartości w glebie.
4. Wyliczone na podstawie współczynnika podziału poszczególne zawartości  $WWA_w$  mogą tłumaczyć podobne ich toksyczne działanie na organizmy testowe mimo istotnie różnej całkowitej zawartości WWA.

## LITERATURA

- ALEXANDER M. 2000: Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 4259–4265.
- CHIAL B., PERSOONE G. 2003: Cyst-based toxicity tests XV. Application of the ostracod solid-phase microbioassay for toxicity monitoring of contaminated soils. *Environ. Toxicol.* **18**: 347–352.
- HAITZER M., HÖSS S., TRAUNSPURGER W., STEINBERG C. 1998: Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentrations of organic chemicals in aquatic organisms – a review. *Chemosphere* **37**: 1335–1362.
- KLIMKOWICZ-PAWLAS A., MALISZEWSKA-KORDYBACH B. 2003: Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. *Water Air Soil Poll.* **145**: 169–181.
- KUCZYŃSKA A., WOLSKA L., NAMIEŚNIK J. 2005: Application of biotests in environmental research. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **35**: 135–154.
- MAILA M.P., CLOETE T.E. 2002: Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Inter. Biodeter. Biodegrad.* **50**: 107–113.

- MALISZEWSKA-KORDYBACH B., SMRECZAK B. 1997: The content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in agricultural soils in Lublin district. *Rocz. Glebozn.* **1–2**: 95–110.
- MISZTAŁ M., SMAL H., WÓJCIKOWSKA-KAPUSTA A. 1997: Litosfera i jej ochrona. Wydaw. AR, Lublin.
- OLESZCZUK P., BARAN S. 2004: Application of solid-phase extraction to determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge. *J. Hazard. Matter* **113**: 237–245.
- OLESZCZUK P., BARAN S. 2005: Zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach ogródków działkowych o różnym nasileniu procesów antropogenicznych. *Rocz. Glebozn.* **56**: 60–70.
- SMRECZAK B., MALISZEWSKA-KORDYBACH B. 2003: Seed germination and root growth of selected plants in PAH contaminated soil. *Fres. Environ. Bull.* **12**: 946–949.
- SVERDRUP L.E. 2001: Toxicity of tar constituents in terrestrial ecosystems: Effect of eight polycyclic aromatic compounds on terrestrial plants, soil invertebrates and microorganisms. Ph.D. Thesis, University of Oslo, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Oslo.
- WIK A., DAVE G. 2005: Environmental labeling of car tires-toxicity to *Daphnia magna* can be used as a screening method. *Chemosphere* **58**: 645–651.

*Dr Patryk Oleszczuk*  
*Instytut Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska AR*  
*ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin*  
*patryk.oleszczuk@ar.lublin.pl*