

# WYKORZYSTANIE MIKROBIOTESTÓW OSTREJ TOKSYCZNOŚCI JAKO NARZĘDZIE DO OCENY STOPNIA REMEDIACJI GLEB POCHODZĄCYCH Z TERENÓW PRZETWÓRSTWA RUD METALI NIEŻELAZNYCH

## USE OF ACUTE TOXIC MICROBIOTESTERS AS A TOOL TO ASSESS SOIL REMEDIATION DEGREE ORIGINATED FROM THE PROCESSING AREA OF NON-FERROUS METALS ORES

Dagmara Pułaczewska, Dominika Kufka – „Poltegor-Instytut” Instytut Górnictwa Odkrywkowego, Wrocław

*Przedmiotem badań przedstawionych w artykule była możliwość wykorzystania mikrobiotestów ostrej toksyczności jako wskaźnika jakościowego, przedstawiającego efekt remediacji gleb zanieczyszczonych metalami nieżelaznymi. Badane próbki gleb początkowo poddano oczyszczaniu przy użyciu karbonizatów, a następnie wykonywano mikrobiotesty fitotoksyczności wykorzystujące testy na kiełkowanie i wczesny wzrost roślin. Do badań użyto nasion sorga cukrowego, rzeżuchy i gorczycy białej, które w wyniku kontaktu z badaną substancją wykazują specyficzną reakcję. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie karbonizatów do oczyszczania gleb z metali nieżelaznych nie wpłynęło w znaczący sposób na ich jakość. Aby jednak umożliwić pełną ocenę stopnia remediacji gleb, konieczne jest wykonanie badań komplementarnych.*

**Słowa kluczowe:** mikrobiotesty, remediacja, metale nieżelazne

*The subject of the research presented in the article was the possibility of using microbiotests of acute toxicity as a qualitative indicator, showing the effect of remediation of soils contaminated by non-ferrous metals. Soil samples were initially purified using chars, then phytotoxicity microbiotests using germination and early plant growth tests were performed. Sugar sorghum, Cress and White mustard seeds were used for testing, which have specific reactions as a result of contact with the tested substance. The research carried out showed that the use of chars for soil cleaning from non-ferrous metals did not significantly affect their quality. However, to enable fully assess the degree of soil remediation, it is necessary to perform complementary research.*

**Keywords:** microbiotests, remediation, non-ferrous metals

### Wstęp

W związku z rosnącymi wymogami dotyczącymi ochrony środowiska przyrodniczego, szczególnie dużą uwagę przywiązuje się do zagospodarowania, a tym samym zmniejszenia ilości odpadów deponowanych na składowiskach. Polska, jako kraj z wysoko rozwiniętym przemysłem wydobywczym i przetwórczym kopalini, generuje znaczne ilości odpadów przemysłowych. Często skutkuje to powstawaniem zanieczyszczonych terenów antropogenicznych gromadzących tego rodzaju odpady, które w następstwie wymagają podejmowania szeregu działań zmierzających do ich rekultywacji. Każdorazowo w pracach rekultywacyjnych, w pierwszej kolejności istotne jest określenie stopnia zanieczyszczenia gleb należy wykonać prace nad ich oczyszczeniem i poprawą żyzności. W związku z powyższym w ramach badań prowadzonych w „Poltegor-Instytut”, podjęto prace nad zastosowaniem karbonizatów do rekultywacji zanieczyszczonych gruntów, pochodzących z terenów przetwórstwa rud metali nieżelaznych.

W niniejszym artykule przedstawiono częściowe wyniki badań, przeprowadzone na glebach, które otrzymano po procesie oczyszczania z zastosowaniem karbonizatów. Całościowy opis eksperymentu omówiono w artykule - Usuwanie metali nieżelaznych z wykorzystaniem właściwości sorpcyjnych wybranych karbonizatów [1].

Aby umożliwić weryfikację skuteczności zastosowanej metody oczyszczania gleb, przeprowadzono mikrobiotesty fitotoksyczności wykorzystujące testy na kiełkowanie i wczesny wzrost roślin Phytotoxkit [2]. Umożliwiają one ocenę toksyczności prób, opierając się na dwóch wskaźnikach wczesnego stadium rozwoju roślin, tj.: hamowanie kiełkowania nasion i inhibicja wzrostu korzeni w odniesieniu do próby kontrolnej. Uzyskane wyniki poddano analizie przy zastosowaniu programu R 211.1, będącego programem matematycznym przeznaczonym do zaawansowanych obliczeń statystycznych.

Celem przeprowadzonych badań była ocena użyteczności tego rodzaju testów jako wskaźnika stopnia remediacji gleb.

## Materiały i metody

### Material badawczy

Do badań wykorzystano próbki otrzymane w wyniku eksperymentów inkubacyjnych wielowariantowych mieszanin [1], w których do oczyszczania gleb zanieczyszczonych metalami nieżelaznymi wykorzystano karbonizaty z pelletu sosnowo-świerkowego oraz ze słomy, a wyniki badań zestawiono z próbkami kontrolnymi. Poniżej przedstawiono oznaczenia dla poszczególnych prób, ilość użytej wody destylowanej uzależniono od ich objętości:

#### Próbka kontrolna:

- **K** - zanieczyszczona gleba zwilżona wodą destylowaną.
- **KW** - zanieczyszczona gleba zalana wodą destylowaną

w ilości 170 ml.

#### Próbka badawcza I:

- **P** - zanieczyszczona gleba z dodatkiem karbonizatu z pelletu sosnowo-świerkowego, zwilżona wodą destylowaną.
- **PW** - zanieczyszczona gleba z dodatkiem karbonizatu z pelletu sosnowo-świerkowego, zalana wodą destylowaną w ilości 490 ml.

#### Próbka badawcza II:

- **S** - zanieczyszczona gleba z dodatkiem karbonizatu z pelletu ze słomy, zwilżona wodą destylowaną.
- **SW** - zanieczyszczona gleba z dodatkiem karbonizatu z pelletu ze słomy, zalana wodą destylowaną w ilości 490 ml.

### Mikrobiotesty ostrej toksyczności wraz z analizą obrazu

Do oceny stopnia oczyszczenia gleb z wykorzystaniem wybranych karbonizatów, zastosowano test kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin Phytotoxkit [2]. Tego rodzaju test umożliwia ocenę toksyczności próby opierając się na dwóch wskaźnikach wczesnego stadium rozwoju roślin: hamowanie kiełkowania nasion i inhibicja wzrostu korzeni w odniesieniu do próby gleby referencyjnej (zgodnie z normą ISO 11269-1: „Oznaczanie wpływu zanieczyszczeń na florę gleby – Część 1 Metoda pomiaru hamowania wzrostu korzeni”). Zasada działania fitotestu polega na ocenie kiełkowania nasiona sorga cukrowego (*Sorghum saccharatum*), rzeżuchy (*Lepidium*

*sativum*) i gorczycy białej (*Sinapis alba*), które w wyniku kontaktu z badaną substancją wykazują specyficzną reakcję (brak kiełkowania lub redukcję długości korzeni). Wykorzystanie standardowych nasion umożliwia ujednoczenie testu i otrzymanie powtarzalnych wyników niezależnie od laboratorium, w którym wykonywane są badania.

Test Phytotoxkit wykonano zgodnie z metodyką dostarczoną przez producenta testu - firmę Microbiotest (Belgia). Badania przeprowadzano w specjalnych przezroczystych pojemnikach, które umożliwiały bezpośrednią obserwację i pomiar długości korzenia metodą analizy obrazu.

Przygotowane próbki umieszczono pionowo w statywach i inkubowano w ciemności, przez 72 h, w temperaturze 25°C, w cieplarni typ CL3 (VWR).

Po zakończeniu inkubacji wykonano zdjęcia każdej płytki aparatem cyfrowym, a następnie korzystając z programu do analizy obrazu (UTHCSA IMAGETOOL 3.0) zliczono ilość nasion, które wykiełkowały oraz zmierzono długość korzeni. Obliczono procentowe zahamowanie kiełkowania oraz zahamowanie wzrostu korzenia wobec próby kontrolnej według poniższego wzoru [3]:

$$\frac{A-B}{A} \cdot 100 = \text{hamowanie}[\%]$$

gdzie:

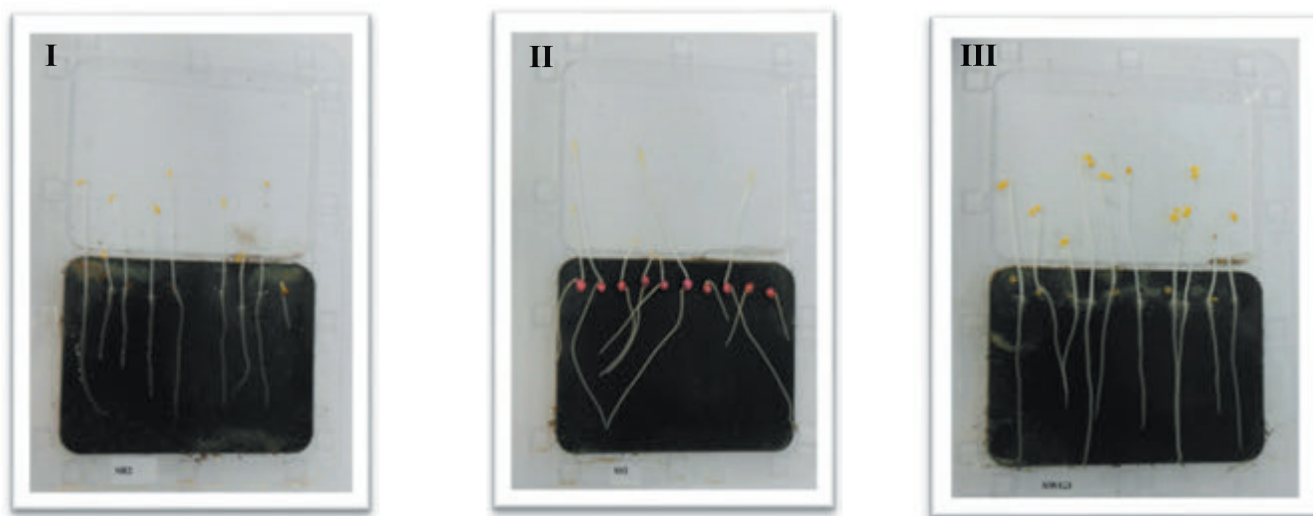
A – średnie hamowanie kiełkowania nasion lub długości korzeni w próbce kontrolnej,

B – średnie kiełkowanie nasion lub długość korzeni w próbce testowanej.

### Analiza statystyczna

Analizy statystycznej otrzymanych wyników testów fitotoksyczności dokonano przy zastosowaniu programu R 211.1, będącego programem matematycznym przeznaczonym do zaawansowanych obliczeń statystycznych.

Celem przeprowadzonej analizy było określenie czy wyniki przeprowadzonych mikrobiotestów, w których zostały zmierzone długości korzeni dla grupy badawczej, są statystycznie istotnie większe, przy zastosowaniu rozważanych w testach czynników, w porównaniu do grupy kontrolnej.



Fot. 1. Przykładowe zdjęcia roślin po testach kiełkowania I - gorczyca biała (*Sinapis alba*), II - sorgo cukrowe (*Sorghum saccharatum*), III - rzeżucha (*Lepidium sativum*)

Fig. 1. Exemplary photos of plants after germination tests I – white mustard (*Sinapis alba*), II - sorghum (*Sorghum saccharatum*), III - cress (*Lepidium sativum*)

## Wyniki

### Wyniki testów fitotoksyczności

Mikrobiotestom poddano próbki gleby zanieczyszczonej oraz próbki po przeprowadzonych eksperymentach sorpcyjnych.

Pojemniki testowe składały się z dwóch komór, gdzie dolną komorę wypełniano glebą, próbkę nawadniano do maksymalnej pojemności wodnej o objętości równej 39,5 ml (wartość wyliczona zgodnie z procedurą testu). Następnie, na tak przygotowanych próbkach gleb, przykrytych bibułą filtracyjną umieszczano po dziesięć nasion badanej rośliny (nasiona sorga cukrowego (*Sorghum saccharatum*), rzeżuchy (*Lepidium sativum*) i gorczycy białej (*Sinapis alba*) w równej odległości około 1 cm od jej górnego grzbietu. Testy wykonano w trzech powtórzeniach, dla każdego rodzaju nasion testowych. Po trzech dobach inkubacji utworzono cyfrowe obrazy płytek z kiełkującymi nasionami, a następnie poddano je analizie obrazu i pomiarowi długości korzeni. Przykładowe fotografie (fot. 1).

W tabeli 1 oraz na rysunkach 1, 2, 3 zestawiono uśrednione wartości długości korzeni dla poszczególnych grup roślin testowych.

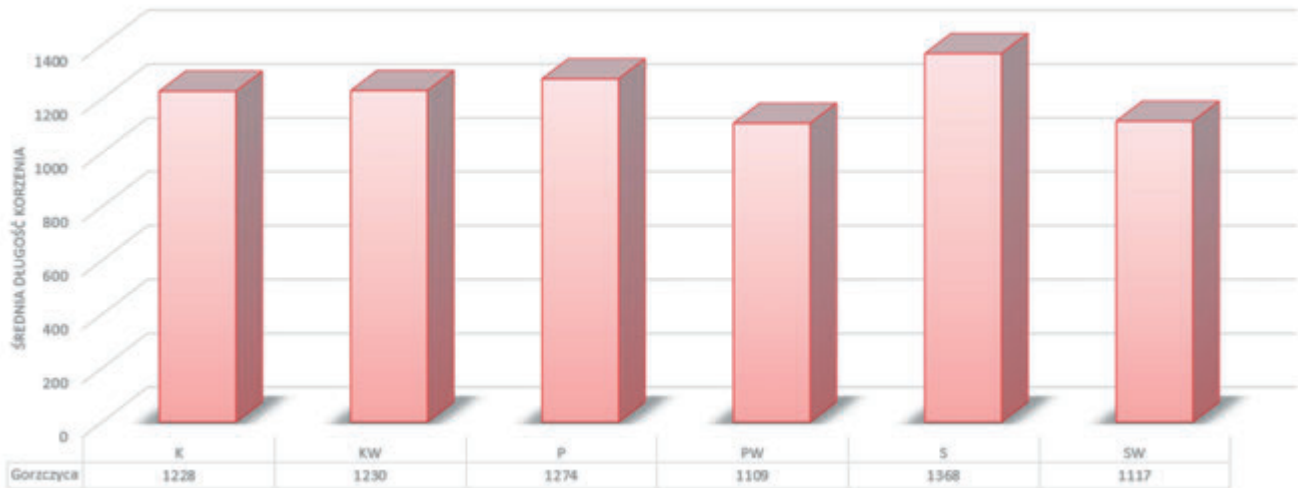
Tab. 1. Uśrednione wartości długości korzeni roślin testowych dla danych próbek

Tab. 1. Average values of test plants root length for samples

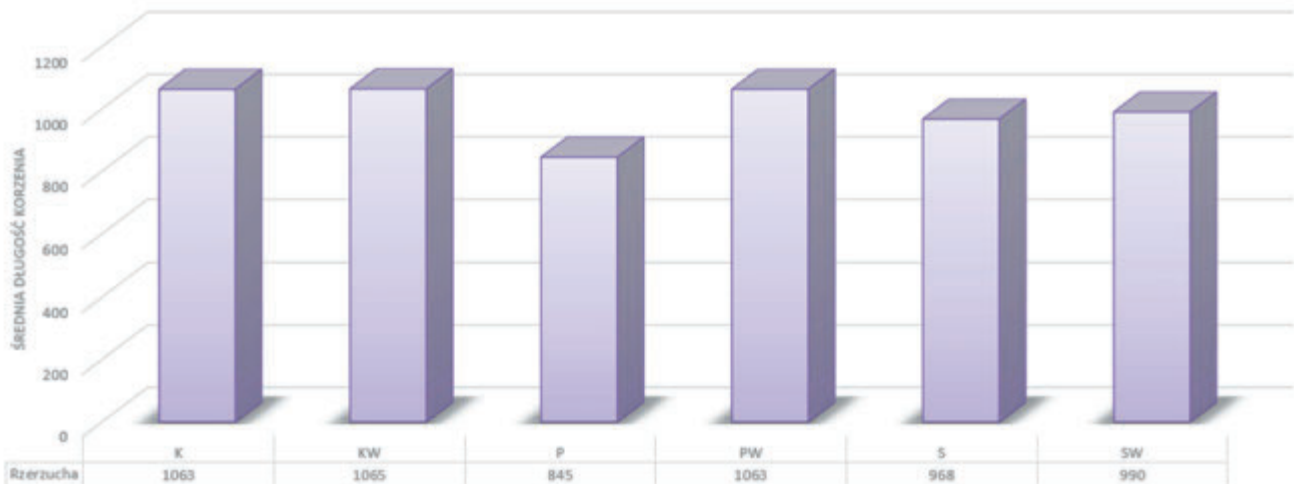
Nazwa próbki	Średnia długość korzenia [mm]		
	Gorczyca biała	Rzeżucha	Sorgo
K	1228	1063	1038
KW	1230	1065	1147
P	1274	845	1081
PW	1109	1063	1178
S	1368	968	1014
SW	1117	990	1021

### Wyniki analizy statystycznej

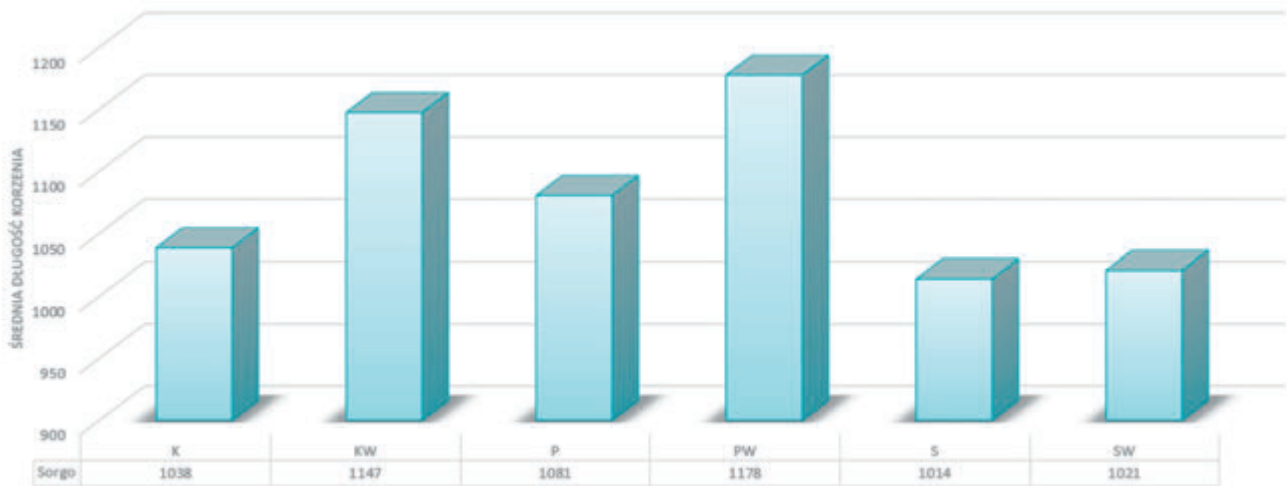
Analiza danych statystycznych wykazała znaczne zwiększenie wzrostu korzenia we wszystkich próbkach badawczych dla rzeżuchy i gorczycy w stosunku do gleby referencyjnej. W przypadku nasion sorga nastąpiło znaczne zahamowanie jego wzrostu. Porównanie wyników próbek badawczych (próbki po eksperymentach bez karbonatów a próbki z dodatkiem karbonizatu) wykazuje nieznaczny wpływ dodatków sorpcyjnych na wzrost długości korzenia, a w przypadku sorga i rzeżuchy wręcz ich zahamowanie. Wpływ badanych karbonizatów na nasiona



Rys. 1. Średnie długości korzenia – nasiona gorczycy białej  
Fig. 1. Average roots length – white mustard seeds



Rys. 2. Średnie długości korzenia – nasiona rzeżuchy  
Fig. 2. Average roots length - cress seeds



Rys. 3. Średnie długości korzenia – nasiona sorga  
Fig. 3. Average roots length - sorghum seeds

sorga cukrowego (*Sorghum saccharatum*), rzeżuchy (*Lepidium sativum*) i gorczycy białej (*Sinapis alba*) przedstawiają tabele 2, 3, 4. Zaprezentowano w nich zahamowanie wzrostu korzenia wobec prób kontrolnych (K, KW).

Rysunki 4, 5 i 6 prezentują wykresy pudełkowe, obrazujące główne charakterystyki (mediana, kwartyle, średnia, minimum i maksimum) empirycznych rozkładów długości korzeni dla sześciu grup eksperymentalnych, odpowiednio w przypadku gorczycy, rzeżuchy i sorga. Dolne i górne krawędzie prostokątów (pudełek) widocznych na tych wykresach oznaczają odpowiednio dolne i górne kwartyle rozkładów. Poziome linie wewnątrz prostokątów obrazują medianę. Za pomocą znacznika w kształcie x przedstawiono średnią, a za pomocą kropek – obserwacje odstające.

Tab. 2. Procentowe zahamowanie wzrostu korzenia – nasiona gorczycy  
Tab. 2. Percentage inhibition of roots growth - mustard seeds

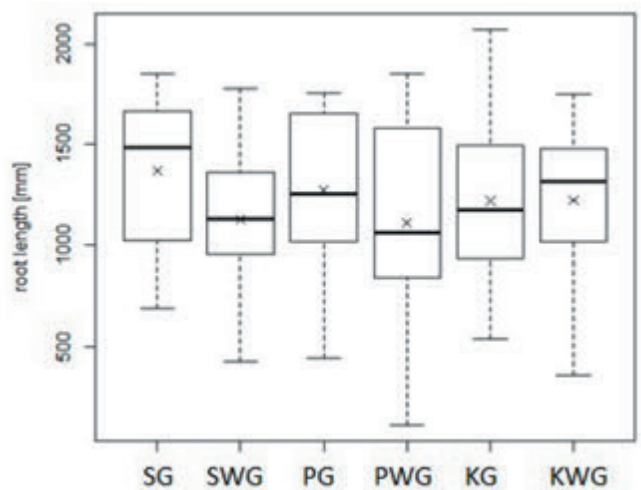
Nazwa próbki	Zahamowanie wzrostu korzenia [%]	
	K	KW
P	-4%	-4%
PW	10%	10%
S	-11%	-11%
SW	9%	9%

Tab. 3. Procentowe zahamowanie wzrostu korzenia – nasiona rzeżuchy  
Tab. 3. Percentage inhibition of roots growth - cress seeds

Nazwa próbki	Zahamowanie wzrostu korzenia [%]	
	K	KW
P	20%	21%
PW	0%	0%
S	9%	9%
SW	7%	7%

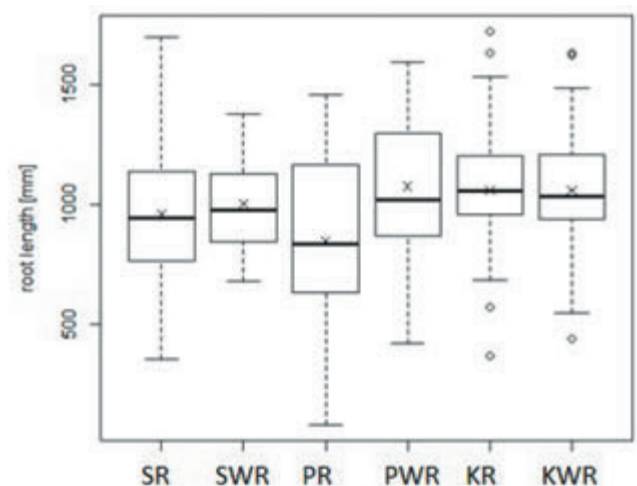
Tab. 4. Procentowe zahamowanie wzrostu korzenia – nasiona sorga  
Tab. 4. Percentage inhibition of roots growth - sorghum seeds

Nazwa próbki	Zahamowanie wzrostu korzenia [%]	
	K	KW
P	-4%	6%
PW	-13%	-3%
S	2%	12%
SW	2%	11%



Rys. 4. Wykresy pudełkowe dla długości korzeni wykiełkowanych nasion gorczycy\*

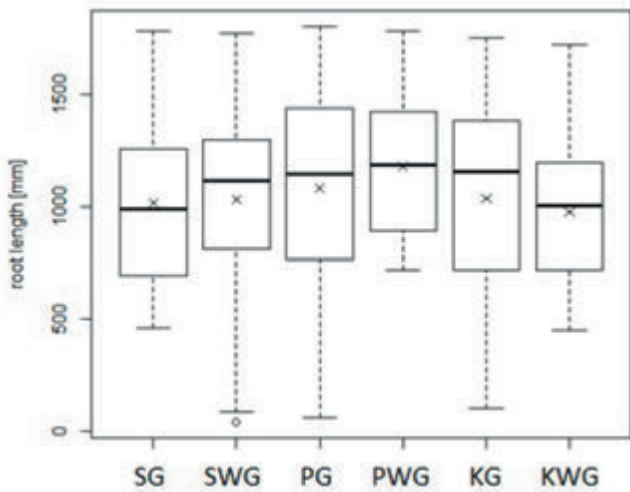
Fig. 4. Box plots for roots length of germinated mustard seeds



Rys. 5. Wykresy pudełkowe dla długości korzeni wykiełkowanych nasion rzeżuchy\*

Fig. 5. Box plots for roots length of germinated cress seeds

\* W oznaczeniach rysunków 4, 5 i 6 wprowadzono dodatkowe oznaczenia w nazwach próbek. W przypadku testów z nasionami gorczycy – G, rzeżuchy – R, sorga – S



Rys. 6. Wykresy pudełkowe dla długości korzeni wykiełkowanych nasion sorga\*

Fig. 6. Box plots for roots length of germinated sorghum seeds

Dla sprawdzenia statystycznej istotności różnic pomiędzy wybranymi grupami eksperymentalnymi, posłużono się dwustronnym testem rangowym Wilcozona-Manna-Whitneya do sprawdzania hipotezy, że dwie niezależne próby pochodzą z tych samych rozkładów.

W celu omówienia wyników analizy statystycznej przedstawiono p-wartości dla niezależnie przeprowadzonych obustronnych testów Wilcozona-Manna-Whitneya, do sprawdzenia hipotezy o równości rozkładów w grupach badawczych. P-wartość stanowi najmniejszy poziom istotności (czyli górne ograniczenie prawdopodobieństwa błędu I-go rodzaju, polegającego na odrzuceniu hipotezy prawdziwej), przy którym testowaną hipotezę należy odrzucić. Przy najczęściej przyjmowanym poziomie istotności wynoszącym 0,05, hipoteza o równości rozkładów powinna być odrzucana, gdy p-wartość jest mniejsza bądź równa 0,05 (w tabelach wartości takie oznaczono kolorem czerwonym). Jeżeli p-wartość jest większa niż 0,05, to wówczas na zadanym poziomie istotności, nie ma podstaw do odrzucenia testowanej hipotezy. Innymi słowy oznacza to, że p-wartość można interpretować jako prawdopodobieństwo tego, że zmierzone w badaniu różnice pomiędzy populacjami wystąpiły przypadkowo, wskutek losowej zmienności prób, podczas gdy rozkłady badanej cechy w obu populacjach w rzeczywistości są takie same.

#### Wyniki analizy statystycznej dla nasion gorczycy

##### Badanie istotności różnic dla próbek w grupach zwilżonych/zalanych wodą destylowaną

W tabeli 5 przedstawiono p-wartości otrzymane w niezależnie przeprowadzonych obustronnych testach Wilcozona-Manna-Whitneya, do sprawdzenia hipotezy o równości rozkładów w parach grup: KG i KWG, SG i SWG oraz PG i PWG.

Tab. 5. P-wartości dla rozkładów nasion gorczycy w grupach zwilżonych/zalanych wodą destylowaną

Tab. 5. P-values for distributed mustard seeds in groups moistened/flooded with distilled water

Porównywane Grupy	p-wartość
KG i KWG	0,9936
SG i SWG	0,0084
PG i PWG	0,1691

W badanym przypadku, jedynie pomiędzy grupami SG i SWG zachodzą istotne statystycznie różnice, które każą nam odrzucić hipotezę o równości rozkładów długości korzenia wykiełkowanych nasion gorczycy w obu grupach. Z porównania odpowiednich wykresów pudełkowych (rys. 4.) wynika, że długości korzeni w grupie SG są większe niż w grupie SWG, co świadczy w tym przypadku o negatywnym wpływie dodatkowej ilości wody na długość korzeni.

##### Badanie istotności różnic dla próbek w grupach bez/z dodatkiem karbonizatów

Tab. 6. P-wartości dla rozkładów nasion gorczycy w grupach bez/z dodatkiem karbonizatów

Tab. 6. P-values for distributed mustard seeds in groups without/with addition of chars

Porównywane Grupy	p-wartość
KG i SG	0,1235
KG i PG	0,6265
SG i PG	0,1567
KWG i SWG	0,2851
KWG i PWG	0,3875
SWG i PWG	0,9869

W żadnym z przypadków, na poziomie istotności 0,05, nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy o równości rozkładów. Tym samym nie ma podstaw do stwierdzenia o występowaniu statystycznie istotnych różnic w długości korzeni pomiędzy porównywanymi grupami.

#### Wyniki analizy statystycznej dla nasion rzeżuchy

##### Badanie istotności różnic dla próbek zwilżonych i zalanych wodą destylowaną

W tabeli 6 przedstawiono p-wartości otrzymane w niezależnie przeprowadzonych obustronnych testach Wilcozona-Manna-Whitneya, do sprawdzenia hipotezy o równości rozkładów w parach grup: KR i KWR, SR i SWR oraz PR i PWR.

Tab. 7. P-wartości dla rozkładów nasion rzeżuchy w grupach zwilżonych/zalanych wodą destylowaną

Tab. 7. P-values for distributed cress seeds in groups moistened/flooded with distilled water

Porównywane Grupy	p-wartość
KR i KWR	0,7852
SR i SWR	0,6371
PR i PWR	0,0198

Istotne statystycznie różnice w długości korzenia występują pomiędzy grupami PR i PWR. Na podstawie odpowiadających im wykresów pudełkowych wnioskujemy, że długości korzeni są większe w grupie PWR.

*Badanie istotności różnic dla próbek w grupach bez/z dodatkiem karbonizatów*

Tab. 8. P-wartości dla rozkładów nasion rzeżuchy w grupach bez/z dodatkiem karbonizatów

Tab. 8. P-values for distributed cress seeds in groups without/with addition of chars

Porównywane Grupy	p-wartość
ER i IR	0,2201
ER i AR	0,0607
IR i AR	0,2609
EL/R i I/LR	0,3491
EL/R i A/LR	1,0000
I/LR i A/LR	0,2277

W żadnym z przypadków, na poziomie istotności 0,05, nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy o równości rozkładów, co oznacza, że różnice pomiędzy porównywanymi grupami nie są statystycznie istotne.

*Wyniki analizy statystycznej dla nasion sorga*

*Badanie istotności różnic dla próbek zwilżonych i zalanych wodą destylowaną*

Tab. 9. P-wartości dla rozkładów nasion sorga w grupach zwilżonych/zalanych wodą destylowaną

Tab. 9. P-values for distributed sorghum seeds in groups moistened/flooded with distilled water

Porównywane Grupy	p-wartość
KS i KWS	0,3726
SS i SWS	0,6499
PS i PWS	0,6328

W tabeli 9 przedstawiono p-wartości otrzymane w niezależnie przeprowadzonych obustronnych testach Wilcoxon-Manna-Whitneya, do sprawdzenia hipotezy o równości rozkładów w parach grup: KS i KWS, SS i SWS oraz PS i PWS.

W żadnym z rozpatrywanych przypadków nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy porównywanymi grupami.

*Badanie istotności różnic dla próbek w grupach bez/z dodatkiem karbonizatów*

Tab. 10. P-wartości dla rozkładów nasion sorga w grupach bez/z dodatkiem karbonizatów

Tab. 10. P-values distributed for sorghum seeds in groups without/with addition of chars

Porównywane Grupy	p-wartość
KS i SS	0,7737
KS i PS	0,7634
SS i PS	0,4315
KWS i SWS	0,3337
KWS i PWS	0,0365
SWS i PWS	0,3157

Hipotezę o równości rozkładów należy odrzucić w przypadku pary KWS i PWS. Na podstawie odpowiednich wykresów pudełkowych widać, że większe długości korzeni są obserwowane w przypadku grupy PWS, a występujące różnice są statystycznie istotne. Oznacza to, że przy dodatkowej ilości wody, dodanie pelletu wpływa korzystnie na długość korzenia.

**Wnioski**

- Testy fitotoksyczności nie wykazały negatywnego wpływu zastosowania karbonizatów na wzrost korzeni roślin testowych, jednak ich zastosowanie nie wpłynęło również znacząco na zwiększenie ich wzrostu w stosunku do próbek skażonych.

- Wyniki dla nasion sorga cukrowego (*Sorghum saccharatum*) znacząco odbiegają od wyników dla nasion rzeżuchy (*Lepidium sativum*) i gorczycy białej (*Sinapis alba*) i wykazują zahamowanie wzrostu korzenia w grupach badawczych w stosunku do próbek kontrolnych.

- Przeprowadzone testy fitotoksyczności stanowią wstępną ocenę właściwości sorpcyjnych karbonizatów w kierunku możliwości oczyszczanie zanieczyszczonych metalami nieżelaznymi gruntów. W celu jednoznacznego określenia wpływu badanych karbonizatów na oczyszczanie gleb należałoby przeprowadzić dalsze badania w skali wazonowej lub polowej.

- Testy fitotoksyczności nie są dobrym wskaźnikiem stopnia remediacji, w przypadku gleb pochodzących z terenów przetwórstwa rud metali nieżelaznych, ponieważ uzyskane wyniki nie wykazują różnic pomiędzy próbkami kontrolnymi, a badawczymi. W celu określenia kierunków rekultywacji obszarów zdegradowanych niezbędne jest przeprowadzenie bardziej szczegółowych badań.

**Literatura**

- [1] Kufka D., Pułaczewska D., Usuwanie metali nieżelaznych z wykorzystaniem właściwości sorpcyjnych wybranych karbonizatów, *Górnictwo Odkrywkowe* 1/2017, 53-61, 2017
- [2] PHITOTOKKIT TM- MicroBioTests Inc., Mariakerke (Gent), Belgia
- [3] PHYTOTOKKIT. Test kiełkowania nasion i wczesnego wzrostu roślin. Standardowa procedura. Tigret Sp. z o.o. Warszawa