

## WPŁYW SZCZEPIONEK GRZYBOWYCH NA UBYTEK ZANIECZYSZCZEŃ ROPOPOCHODNYCH Z GLEBY

WIOLETTA PRZYSTAŚ<sup>1</sup>, KRZYSZTOF ULFIG<sup>2</sup>, KORNELIUSZ MIKSCH<sup>1</sup>,  
ALEKSANDRA WITAŁA<sup>1</sup>, JERZY SZDZUJ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Politechnika Śląska, Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki,  
44-101 Gliwice, ul. Akademicka 2

<sup>2</sup>Instytut Ekologii Terenów Przemysłowych, 40-832 Katowice, ul. Kossutha 6

Keywords: soil bioremediation, petroleum hydrocarbons biodegradation, keratinolytic fungi, biopreparation.

### INFLUENCE OF FUNGAL INOCULA ON THE REMOVAL OF PETROLEUM CONTAMINANTS FROM SOIL

The aim of this work was to determine the influence of native and alien keratinolytic fungi inocula on the petroleum hydrocarbon removal rate in soil covered and not covered with hair. The hair was the major nutrient for keratinolytic fungi and other soil microorganisms. The fungal inocula accelerated the petroleum hydrocarbon biodegradation process during the first month of the experiment. During the second month, TPH removal rates were similar for soil inoculated and not inoculated with fungi. The highest petroleum hydrocarbon removal rate was observed in soil inoculated with native fungal strains. The TPH removal rates were about 64% in soil covered with hair and 77% in soil not covered with hair. The lowest removal rate was observed in soil not inoculated with fungi (60%). The hair applied as additional nitrogen, sulfur and carbon source did not impact, or slightly inhibited, the petroleum hydrocarbon biodegradation process. The fungal inocula caused dramatic changes in soil fungal qualitative composition.

#### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu szczepionek, zawierających grzyby keratynolityczne auto- lub allochtonicznego pochodzenia, na stopień usunięcia węglowodorów ropopochodnych z gleby pokrytej i nie pokrytej włosami. Włosy stanowiły podstawowy substrat odżywczy dla grzybów keratynolitycznych i innych drobnoustrojów glebowych. Najwyższy ubytek węglowodorów stwierdzono w glebie zaszczipionej grzybami autochtonicznymi. Wynosił on 63,7 i 76,6% TPH odpowiednio w glebie z włosami i bez włosów. Najniższy stopień usunięcia zanieczyszczeń ropopochodnych zaobserwowano w glebie nie zaszczipionej grzybami (60,1%), identyczny dla próbek z włosami i bez włosów. Pod wpływem szczepionek zaszły istotne zmiany w składzie gatunkowym grzybów keratynolitycznych w glebie.

#### WPROWADZENIE

Jednym z najczęściej spotykanych zanieczyszczeń glebowych są węglowodory i ich pochodne. Dostają się one do środowiska glebowego poprzez celowe wprowadzenie ze ściekami petrochemicznymi oczyszczanymi na polach filtracyjnych oraz w wyniku

niezamierzonych strat podczas produkcji, transportu i stosowania surowców chemicznych [5, 7, 30]. W metodach biologicznego oczyszczania gruntu często stosuje się auto- i allochtoniczną mikroflorę bakteryjną, wprowadzaną do gleby w postaci tzw. biopreparatów. Coraz częściej stosuje się również preparaty grzybowe w agrotechnologiach i bioremediacji [15].

Badania prowadzone przez Johnstona i wsp. [11] wykazały, iż grzyby pełnią istotną rolę w biodegradacji materiałów wybuchowych w glebie. Takada i wsp. [25] obserwowali degradację polichlorowanych dibenzofuranów i dioksyn przez grzyby. Z kolei Lestan i wsp. [15] udowodnili, że lignolityczne podstawczaki (Basidiomycetes) mają zdolność do degradacji wielu toksycznych związków organicznych, takich jak: polichlorowane bifenyle, pentachlorofenol (PCP), WWA i inne. O rozkładzie węglowodorów ropopochodnych przez grzyby donieśli m.in. Field [3, 4], Zieńko [30], MacGillivray [17] i Łebkowska [16]. Grzyby najaktywniejsze w rozkładzie węglowodorów ropopochodnych zaliczono do następujących rodzajów: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mortierella*, *Candida*, *Saccharomyces* i *Fusarium* [2, 8, 16].

W badaniach Ulfiga i wsp. [27] oraz Przysaś i wsp. [23] stwierdzono, że grzyby keratynolityczne mają zdolność do usuwania węglowodorów ropopochodnych z pożywki podczas biodegradacji białek. W badaniach tych stosowano m.in. włosy dziecięce, których głównym składnikiem jest białko keratyna. Grzyby keratynolityczne są wyspecjalizowane w rozkładzie tego białka. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu szczepionek, zawierających grzyby keratynolityczne auto- i allochtonicznego pochodzenia, na ubytek węglowodorów ropopochodnych z gleby pokrytej i nie pokrytej włosami.

## MATERIAŁ I METODYKA

W doświadczeniu wykorzystano glebę pobraną z terenu pastwiska farmy krowiej. W klasyfikacji PTG była to glina średnia [BN-78/9180-11]. Powietrznie suchą glebę przesiano przez sita o 2 mm oczkach i uśredniono, następnie skażono wyjałowioną w autoklawie ropą naftową w ilości 15 g/kg suchej masy (s.m.) gleby. Do jałowych szalek Petriego naważono po 30 g gleby skażonej ropą naftową. Do części szalek wprowadzono szczepionki grzybowe: szczepionkę S1 zawierającą szczepy allochtoniczne, mające zdolność do usuwania węglowodorów ropopochodnych podczas rozkładu białek [23] oraz szczepionkę S2 zawierającą szczepy wyizolowane z badanej gleby (szczepy autochtoniczne tworzące tzw. autoszczepionkę). W obu szczepionkach zastosowano szczepy *Trichophyton ajelloi* (Vanbreuseghem) Ajello i *Chrysosporium keratinophilum* D. Frey ex Carmichael. Część szalek pokryto odłuszczoneymi, drobno pociętymi i wyjałowionymi w autoklawie włosami dziecięcymi w ilości 0,3 g na szalkę. W ten sposób przygotowano następujące kombinacje doświadczenia:

- gleba z ropą naftową (G);
- gleba z ropą naftową i włosami (G+W);
- gleba z ropą naftową i szczepionką S1 (G+S1);
- gleba z ropą naftową, szczepionką S1 i włosami (G+S1+W);
- gleba z ropą naftową i szczepionką S2 (G+S2);
- gleba z ropą naftową, szczepionką S2 i włosami (G+S2+W).

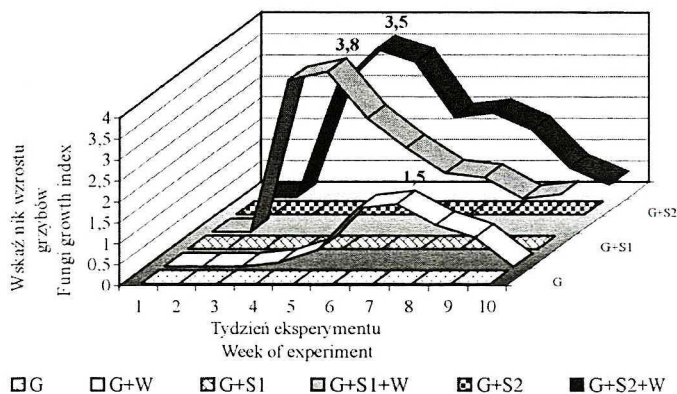
Procedura postępowania w doświadczeniu była podobna do procedury stosowanej w metodzie przynęty włosowej [8]. Doświadczenie trwało dwa miesiące. W odstępach tygodniowych prowadzono ocenę wzrostu grzybów na włosach stosując 4-stopniową skalę: 0 – brak wzrostu grzybów; 1 – grzyby zarastają ok. 25% powierzchni szalki; 2 – grzyby

zarastają ok. 50% powierzchni szalki; 3 - grzyby zarastają ok. 75% powierzchni szalki; oraz 4 - grzyby zarastają 100% powierzchni szalki. Prowadzono również obserwacje makro- i mikroskopowe włosów, jak również posiewy pojedynczych włosów zaatakowanych przez grzyby na pożywkę Sabourauda 1:10 z solami mineralnymi, chloramfenikolem ( $100 \text{ mg/dm}^3$ ) i aktidionem ( $500 \text{ mg/dm}^3$ ) [26]. Wyizolowane szczepy zaklasyfikowano do gatunków lub rodzajów na podstawie ich makro- i mikroskopowych cech, wykorzystując wybrane piśmiennictwo taksonomiczne [10, 22].

W glebie oznaczano następujące parametry fizyko-chemiczne: zawartość węglowodorów ropopochodnych (TPH – nie polarne węglowodory ropopochodne i TPOC – nie polarne węglowodory + polarne pochodne) w ekstraktach w czterochlorku węgla metodą spektrometrii w podczerwieni IR, wilgotność metodą grawimetryczną, pH w  $\text{H}_2\text{O}$  i 1 M KCl [21], zawartość różnych form azotu (ogólny, amonowy, azotanowy i azotynowy) [9] i siarki siarczanowej [21]. Analizy te przeprowadzono zaraz po nastawieniu doświadczenia oraz po miesiącu i dwóch miesiącach inkubacji. Ocenę wzrostu grzybów i analizy fizyko-chemiczne wykonano w trzech powtórzeniach (szalkach Petriego).

## WYNIKI

Zmiany wskaźnika wzrostu grzybów na glebie skażonej ropą naftową i na włosach wyłożonych na glebie skażonej ropą zilustrowano na rysunku 1. Na glebie nie pokrytej włosami (G, G+S1 i G+S2) nie stwierdzono wzrostu grzybów. Na włosach w kombinacji G+W pierwsze „kolonie” grzybów keratynolitycznych pojawiły się w 3 tygodniu doświadczenia, lecz średnia wartość wskaźnika wzrostu była niska (0,1). Rosła ona w toku dalszej inkubacji osiągając w 5 i 6 tygodniu maksimum (około 1,5). W ostatnim, dziewiątym tygodniu doświadczenia stwierdzono obumarcie grzybni we wszystkich szalkach. W glebie z włosami i szczepionkami S1 i S2 pierwsze kolonie grzybów pojawiły się po upływie około 2 tygodni, a średnia wartość wskaźnika wzrostu wynosiła 3,6 i 2,6 odpowiednio dla gleb ze szczepionką S1 i S2. Po 3 tygodniach wartość tego wskaźnika osiągnęła poziom maksymalny (3,8 – dla



Rys. 1. Zmiany wskaźnika wzrostu grzybów na glebie skażonej ropą naftową i na włosach wyłożonych na glebie skażonej ropą naftową

The fungal growth index changes on petroleum-contaminated soil and on hair laid on petroleum-contaminated soil



kombinacji G+S1+W i 3,5 – dla kombinacji G+S2+W). Od czwartego tygodnia wartości wskaźnika wzrostu spadały aż do 0,8 dla kombinacji G+S1+W i 0,3 dla G+S2+W w dziewiątym tygodniu doświadczenia. Na włosach w kombinacji G+W dominowały *Trichophyton ajelloi* i *Chrysosporium keratinophilum*. Z kolei na włosach w kombinacjach G+S1+W i G+S2+W dominowały odpowiednio *Microsporium gypseum* (Bodin) Guiart & Grigorakis i *Trichophyton ajelloi*.

Ubytek węglowodorów wyrażony w % i g/kg s.m. gleby przedstawiono w tabeli 1. Po miesiącu inkubacji w glebie nie zaszczonej grzybami (G i G+W) stwierdzono ubytek TPH o 4,9 g/kg s.m. (39%) w szalkach bez włosów oraz o 3,6 g/kg s.m. (29,2%) w szalkach z włosami. W glebie zaszczonej grzybami allochtonicznymi ubytek TPH wynosił 9,0 i 8,7 g/kg s.m. (62,5 i 61,9%) odpowiednio w G+S1 i G+S1+W. Z kolei w glebie zaszczonej grzybami autochtonicznymi ubytek TPH wynosił 11,1 i 10,2 g/kg s.m. (70,6 i 64,8%) odpowiednio w G+S2 i G+S2+W. Po dwóch miesiącach inkubacji ubytek TPH zwiększył się do 7,5 i 7,4 g/kg s.m. (60,1%) w szalkach bez dodatku grzybów (G i G+W). W glebie ze szczepionką S1 ubytek TPH miał wartości 8,5 i 8,4 g/kg s.m. (59,1 i 59,8%) odpowiednio w szalkach bez włosów (G+S1) i z włosami (G+S1+W). W glebie ze szczepionką S2 ubytek TPH wynosił 12 i 10,1 g/kg s.m. (76,6 i 63,7%) odpowiednio w szalkach bez włosów (G+S2) i z włosami (G+S2+W). Wyższą wartość ubytku TPH uzyskano w szalkach bez włosów. Podobne zależności dotyczyły sumy węglowodorów ropopochodnych nie polarnych i związków polarnych (TPOC). Po miesiącu ubytek TPOC w glebie nie zaszczonej wynosił 5,9 i 3,3 g/kg s.m. (43,6 i 26,6%) odpowiednio w kombinacji bez włosów i z włosami. W glebie zaszczonej S1 ubytek TPOC wynosił 6,9 i 9,2 g/kg s.m. (45,2 i 58,3%), a w glebie zaszczonej S2 9,1 i 7,9 g/kg s.m. (58,2 i 52,6%) odpowiednio w kombinacji bez włosów i z włosami. Po dwóch miesiącach spadek TPOC był większy i wynosił 6,6 i 4,8 g/kg s.m. (49,3 i 38,6%) w glebie nie zaszczonej, 7,1 i 8 g/kg s.m. (47 i 50,5%) w glebie ze szczepionką S1, wreszcie 11,3 i 9,4 g/kg s.m. (72 i 59,3%) w glebie ze szczepionką S2, odpowiednio w kombinacjach bez włosów i z włosami.

Tabela 1. Ubytek węglowodorów ropopochodnych z gleby  
Petroleum hydrocarbon removal from soil

Ubytek Loss / Kombinacja Combination	TPH				TPOC			
	Po miesiącu After month		Po 2 miesiącach After 2 months		Po miesiącu After month		Po 2 miesiącach After 2 months	
	g/kg s.m.	%	g/kg s.m.	%	g/kg s.m.	%	g/kg s.m.	%
G	4,9 ± 0,64	39,0	7,5 ± 0,98	60,1	5,9 ± 0,77	43,6	6,6 ± 0,86	49,3
G+W	3,6 ± 0,47	29,2	7,4 ± 0,96	60,1	3,3 ± 0,43	26,6	4,8 ± 0,62	38,6
G+S1	9,0 ± 1,17	62,5	8,5 ± 1,11	59,1	6,9 ± 0,90	45,2	7,1 ± 0,92	47,0
G+S1+W	8,7 ± 1,31	61,9	8,4 ± 1,09	59,8	9,2 ± 1,20	58,3	8,0 ± 1,04	50,5
G+S2	11,1 ± 1,44	70,6	12,0 ± 1,56	76,6	9,1 ± 1,18	58,2	11,3 ± 1,47	72,0
G+S2+W	10,2 ± 1,33	64,8	10,1 ± 1,31	63,7	7,9 ± 1,03	52,6	9,4 ± 1,22	59,3

Zmiany pozostałych parametrów fizyko-chemicznych przedstawiono w tabeli 2. W toku doświadczenia wilgotność prób wahała się w granicach 23–36,5%. Na początku doświadczenia pH w H<sub>2</sub>O wahało się pomiędzy 8,9–9,6 odpowiednio w kombinacjach G+S1+W i G. Po miesiącu pH zmniejszyło się; wahania tego parametru mieściły się w zakresie

7–7,9 odpowiednio w G+S1+W i G+S2. Po dwóch miesiącach pH uległo dalszemu spadkowi mieszcząc się w zakresie 6,5–7,7 odpowiednio w G+S1+W i G+S2. Na początku doświadczenia pH w 1 M KCl wahało się w granicach 8,3–8,9 odpowiednio w G+S2+W i G. Po miesiącu nastąpił spadek wartości tego parametru do zakresu 7,0–7,7 w G+S1+W i G+S1. Po dwóch miesiącach pH było jeszcze mniejsze i mieściło się w zakresie 6,5–7,4 odpowiednio w G+S1+W oraz G+S1 i G+S2.

Na początku doświadczenia w glebie nie pokrytej włosami zawartość siarki siarczanowej mieściła się w zakresie 0,018–0,022% a w glebie z włosami w zakresie 0,013–0,019%. Wyższe zawartości siarki siarczanowej stwierdzono po pierwszym i drugim miesiącu inkubacji. Po miesiącu w glebie z włosami odnotowano znaczny wzrost zawartości siarki siarczanowej do zakresu 0,041–0,065% odpowiednio w G+S2+W i G+S1+W. Po dwóch miesiącach zawartość siarki siarczanowej w kombinacji G+W uległa zwiększeniu i osiągnęła wartość 0,096%. W tym czasie zawartość siarki siarczanowej w G+S1+W spadła do 0,033%, a w G+S2+W nieznacznie wzrosła do wartości 0,050%. Zawartość siarki siarczanowej w glebie nie pokrytej włosami uległa również podwyższeniu w toku doświadczenia, do znacznie mniejszych jednak wartości niż w glebie pokrytej włosami.

W toku doświadczenia zawartość azotu ogólnego wahała się w granicach 5,6–8,6 g N/kg s.m. Na początku doświadczenia zawartość azotu amonowego mieściła się w zakresie 19,9–38,1 mg N-NH<sub>4</sub>/kg s.m. odpowiednio w kombinacjach G i G+W. Po miesiącu zawartość azotu amonowego wzrosła; zakres zmienności dla tego parametru wynosił 43,9–51,4 mg N-NH<sub>4</sub>/kg s.m. odpowiednio w G+S2 i G+W. Po dwóch miesiącach odnotowano spadek zawartości azotu amonowego; zakres zmienności wynosił 29,1–45,1 mg N-NH<sub>4</sub>/kg s.m. odpowiednio w G+S1+W i G+S2. W ciągu pierwszych dwóch miesięcy inkubacji nie stwierdzono azotynów we wszystkich kombinacjach doświadczenia. Azotyny pojawiły się po dwóch miesiącach. Wahania zawartości azotu azotynowego mieściły się w zakresie 0,8–2,5 mg N-NO<sub>2</sub>/kg s.m. odpowiednio w G+W i G+S1. Zawartość azotu azotanowego w glebie nie zaszczipionej i nie pokrytej włosami (G) wynosiła początkowo 70,5 mg N-NO<sub>3</sub>/kg s.m. i stopniowo spadała do wartości 21,8 po miesiącu i 15,7 mg N-NO<sub>3</sub>/kg s.m. po dwóch miesiącach inkubacji. W glebie pokrytej włosami (G+W) stwierdzono również spadek zawartości tej formy azotu od 30 do 24,6 mg N-NO<sub>3</sub>/kg s.m. po miesiącu i braku azotanów po dwóch miesiącach inkubacji. W glebie zaszczipionej – dla odmiany – stwierdzono wzrost zawartości azotu azotanowego w toku doświadczenia. Po dwóch miesiącach zakres zawartości azotu azotanowego w tej glebie wynosił 21,8–65,3 mg N-NO<sub>3</sub>/kg s.m. odpowiednio w kombinacjach G+S2 i G+S2+W.

## DYSKUSJA

Doświadczenie miało na celu określenie ubytku zanieczyszczeń ropopochodnych z gleby zaszczipionej grzybami keratynolitycznymi auto- lub allochtonicznego pochodzenia oraz pokrytej i nie pokrytej włosami. Szczepionki miały wzbogacić glebę w propagule grzybów keratynolitycznych zdolnych do usuwania ropy naftowej będącej głównym źródłem węgla organicznego dla mikroorganizmów. Wprowadzenie do gleby węglowodorów podwyższa stosunek C:N w glebie powodując niedobór azotu, co może spowolnić procesy biodegradacyjne [12, 18]. Włosy miały zapobiec temu niedoborowi azotu w glebie, przede wszystkim jednak stanowiły podstawowe źródło azotu, siarki i węgla organicznego dla grzybów keratynolitycznych [13, 20, 29].



Tabela 2. Wartości parametrów fizyko-chemicznych gleby  
 Values of soil physico-chemical parameters

Kombinacja Combination	Dzień Day	Wilgotność Humidity	pH H <sub>2</sub> O	pH KCl	S-SO <sub>4</sub>	Azot Nitrogen			
		%				N ogólny total N	NH <sub>4</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>
						% s.m.	g/kg s.m.	mg/kg s.m.	
G	1	25,2	9,6	8,9	0,018	7,0	19,9	0,0	70,5
	31	32,7	7,8	7,4	0,026	5,6	47,4	0,0	21,8
	63	32,5	7,2	7,3	0,024	6,4	38,4	0,9	15,7
G+W	1	27,7	9,1	8,4	0,013	7,8	38,1	0,0	30,0
	31	28,5	7,8	7,5	0,053	8,2	51,4	0,0	24,6
	63	35,0	6,8	6,8	0,096	7,3	38,5	0,8	0,0
G+S1	1	29,6	9,2	8,4	0,020	8,1	25,8	0,0	0,0
	31	32,2	7,8	7,7	0,022	7,9	49,3	0,0	6,8
	63	34,7	7,5	7,4	0,029	7,5	39,6	2,5	63,4
G+S1+W	1	30,0	8,9	8,5	0,016	8,6	25,6	0,0	4,1
	31	28,0	7,0	7,0	0,065	7,8	48,1	0,0	13,5
	63	35,4	6,5	6,5	0,033	6,9	29,1	1,6	24,2
G+S2	1	31,1	9,1	8,5	0,022	6,5	25,6	0,0	9,9
	31	32,2	7,9	7,6	0,019	6,6	43,9	0,0	22,3
	63	36,5	7,7	7,4	0,028	8,3	45,1	1,1	21,8
G+S2+W	1	23,0	9,0	8,3	0,019	6,4	20,1	0,0	25,5
	31	27,0	7,2	7,1	0,041	5,7	48,4	0,0	25,3
	63	36,4	6,6	6,6	0,050	5,9	42,3	1,3	65,3

Wzrost grzybów keratynolitycznych na włosach wyłożonych na glebie zaszczonej był znacznie obfitszy od wzrostu grzybów na glebie nie zaszczonej. Obfitszy wzrost grzybów w glebach zaszczonej można wytłumaczyć wyższą liczbą propagul grzybowych na początku doświadczenia i korzystnymi warunkami środowiskowymi dla wzrostu powyższych drobnoustrojów. Na korzystny wpływ szczepionki na wzrost drobnoustrojów glebowych zwróciło uwagę kilku innych badaczy [12, 16]. W glebie zaszczonej zaobserwowano jednak istotne zmiany w składzie gatunkowym grzybów keratynolitycznych. W glebie zaszczonej szczepami autochtonicznymi (G+S2+W), mimo wprowadzenia dwóch naturalnie dominujących w tym siedlisku gatunków (*Trichophyton ajelloi* i *Chrysosporium keratinophilum*), zaobserwowano dominację tylko jednego z nich, tj. *Trichophyton ajelloi*.

Z kolei w glebie zaszczipionej szczepami allochtonicznymi (G+S1+W) stwierdzono dominację *Microsporium gypseum*, gatunku nie występującego w kombinacjach G+W i G+S2+W. Zjawiska takie znane są w badaniach bioremediacyjnych. Wprowadzenie szczepionek może bowiem zachwiać równowagę homeostatyczną gleby, co prowadzi do zmian jej właściwości fizyko-chemicznych oraz składu ilościowego i jakościowego drobnoustrojów [12].

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na aktywność i skład mikroorganizmów glebowych jest odczyn. Dermatofity geofilne i inne grzyby keratynolityczne bytują w szerokim zakresie pH. Przyjmuje się jednak, że *Trichophyton ajelloi* jest gatunkiem acidofilnym a *Chrysosporium keratinophilum* preferuje siedliska alkaliczne [6]. Można więc wnosić, że zakwaszenie wyeliminowało *Chrysosporium keratinophilum* z badanej gleby i stworzyło korzystne warunki dla wzrostu *Trichophyton ajelloi*. W kwestii dominacji *Microsporium gypseum* w glebie zaszczipionej grzybami allochtonicznymi można postawić hipotezę, że szczepy allochtoniczne nie przeżyły w badanej glebie a ich resztki były pokarmem dla innych drobnoustrojów, wśród których znalazł się *Microsporium gypseum*, dobrze znoszący zakwaszenie.

Ubytek TPH i TPOC był wyższy w pierwszym niż w drugim miesiącu doświadczenia. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami Maliszewskiej-Kordybach [19]. Po początkowo szybkim ubytku zanieczyszczeń następuje spowolnienie procesów biodegradacyjnych, wynikające z nagromadzenia się toksycznych produktów przemian metabolicznych, zakwaszenia gleby i wyczerpania się łatwiej przyswajalnych substancji odżywczych oraz sorpcji zanieczyszczeń. Zastosowanie szczepionek grzybowych przyspieszyło proces usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z badanej gleby w pierwszym miesiącu doświadczenia, co zgodne jest m.in. z obserwacjami Bieszkiewicza i wsp. [1]. Z kolei dodatek węgla nie wpłynął lub nawet nieznacznie obniżył ubytek TPH/TPOC. Maliszewska-Kordybach [19] zauważyła, że dodatkowe źródła węgla nie zawsze stymulują rozkład węglowodorów. Z jednej strony aktywność mikroorganizmów może koncentrować się na substracie łatwiej przyswajalnym lub na substracie, do rozkładu którego drobnoustroje są lepiej przystosowane, a z drugiej strony – dodatkowa substancja organiczna może zwiększyć sorpcję zanieczyszczeń ropopochodnych, a więc zmniejszyć ich biodostępność. Nie do końca wyjaśniony jest wpływ różnych form azotu na procesy biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych [4, 19]. Nie można również wykluczyć, że grzyby keratynolityczne nie wytrzymały konkurencji ze strony mikroflory glebowej zdolnej do rozkładu węglowodorów, jako jedyne źródła węgla. W tych warunkach aktywność grzybów na włosach miała niewielki wpływ na proces oczyszczania gleby z powyższych zanieczyszczeń.

Istotnym zmianom podlegały również inne parametry fizyko-chemiczne. W pierwszym miesiącu miał miejsce wzrost zawartości azotu amonowego we wszystkich kombinacjach doświadczenia. Świadczy to o zachodzących w glebie procesach rozkładu materii organicznej i amonifikacji. Dodatek węgla nie wpłynął jednak na zawartość azotu amonowego. W drugim miesiącu zawartość azotu amonowego zmniejszyła się. Było to prawdopodobnie wynikiem wykorzystania tej formy azotu przez drobnoustroje oraz utlenienia amoniaku do azotanów w procesie nityfikacji [14, 24]. W doświadczeniu zaobserwowano również wzrost zawartości siarki siarczanowej, zwłaszcza w glebie pokrytej włosami. Zawartość siarki we włosach (głównie w aminokwasach siarkowych: cystynie, cysteinie i metioninie) wykorzystanych w doświadczeniu wynosiła 3,6%. Końcowym produktem utleniania siarki organicznej przez grzyby keratynolityczne są siarczany [13]. Nie ulega, zatem wątpliwości, że głównym źródłem siarczanów w badanej glebie był proces rozkładu węgla zachodzący przy udziale tych drobnoustrojów. Zarówno azotany, jak i siarczany przyczyniły się do wspomnianego silnego zakwaszenia gleby.



## PODSUMOWANIE

Zastosowanie szczepionek grzybowych wyraźnie przyspieszyło proces biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w pierwszym miesiącu doświadczenia. W drugim miesiącu ubytki związków nie polarnych (TPH) w glebie nie zaszczonej i zaszczonej grzybami allochtonicznymi były jednak zbliżone i wynosiły ok. 60%. W glebie zaszczonej grzybami autochtonicznymi ubytek TPH był wyższy i wynosił ok. 77%. Różnice te były wyraźniejsze dla sumy związków nie polarnych i ich polarnych pochodnych (TPOC). Zastosowanie dodatkowego źródła azotu, siarki i węgla organicznego w postaci włośów nie miało wpływu na proces rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych lub nieznacznie proces ten hamowało. Zaobserwowano jednak wyraźny wpływ szczepionek na skład jakościowy grzybów keratynolitycznych w badanej glebie.

*Pracę wykonano w ramach projektu badawczego 3T09C00817 (nr umowy 1306/r09/99/17) finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w Warszawie w latach 1999–2002.*

## LITERATURA

- [1] Bieszkiewicz E., A. Pakuła, H. Boszczyk-Maleszak, R. Mycielski: *Badania nad rozkładem frakcji olejowej pochodzącej z mechanicznej oczyszczalni ścieków rafineryjno-petrochemicznych przez szczone wyizolowane z osadu czynnego*, Materiały VI Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wrocław 1999, 39–46.
- [2] Cerniglia C.E.: *Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future application in bioremediation*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, **19**, 324–333 (1997).
- [3] Field J.A., E. Heessels, R. Wijngaarde, M. Koterman, E. De Jong, J.A.M. De Bont: *The physiology of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by the white-rot fungus Bjerkandera sp. strain BOS55*, Applied Biotechnology for Site Remediation, 143–151 (1994).
- [4] Field J.A., H. Feiken, A. Hage, M.J.J. Kotterman: *Application of White-Rot Fungus to Biodegrade Benzo(a)pyrene in Soil*, Bioremediation, **3(3)**, 165–171 (1995).
- [5] Galas E., E. Kwapisz: *Biodegradacja węglowodorów ropy naftowej*, II Ogólnopolskie Sympozjum „Biotechnologia w Uczelniach Technicznych”, Warszawa 1997, 177–182
- [6] Garg A.P., S. Gandotra, K.G. Mukerji, G.J.F. Pugh: *Ecology of keratinophilic fungi*, Proc. Indian Acad. Sci., **94**, 149–163 (1985).
- [7] Gierak A.: *Zagrożenie środowiska produktami ropopochodnymi*, Ochrona Środowiska, **2 (57)**, 31–41 (1995).
- [8] Hausemann M.H.: *Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils – Limitations in bioavailability or inherent recalcitrance?*, Bioremediation Journal, **1(1)**, 27–39 (1997).
- [9] Hermanowicz W.: *Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków*, Arkady, Warszawa 1976.
- [10] Hoog de, G.S., J. Guarro: *Atlas of clinical fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Baarn-Reus 1995.
- [11] Johnston C.G., M.A. Becerra, R.L. Lutz, M.A. Staton, C.A. Axtel, B.D. Bass: *Fungal remediation of PCP and TNT contaminated soil in the field*, In Situ and On-Site Bioremediation, **2**, 537–544 (1994).
- [12] Kańska Z., M. Łebkowska, E. Sztompka, K. Kasiura, H. Vogtman: *Eliminacja zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntu*, Bioinżynieria, **1**, 231–242 (1997).
- [13] Kunert J.: *Physiology of keratinophilic fungi*. [In:] R.K.S. Kushwaha and J. Guarro eds., *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao 2000, 77–85.
- [14] Kunicki-Goldfinger W.J.H.: *Życie bakterii*, PWN, Warszawa 1994.
- [15] Lestan D., M. Lestan, R.T. Lamar : *Fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils*, International Symposium Environmental Biotechnology, Oostende 1997, 357–360.
- [16] Łebkowska M.: *Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym*, Gaz woda i technika sanitarna, **3**, 117–118 (1996).



- [17] MacGillivray A.R., M.P. Skiaris: *Biotransformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Yeast Isolated from Coastal Sediments*, Applied and Environmental Microbiology, **59**, 1613–1618 (1993).
- [18] Malina G., A. Szczepański: *Wskazówki metodyczne do oceny stopnia zanieczyszczenia gruntów i wód podziemnych produktami ropopochodnymi i innymi substancjami chemicznymi w procesie rekultywacji*, PIOŚ, Warszawa 1994
- [19] Maliszewska-Kordybach B.: *Trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie*, praca habilitacyjna, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Dział Wydawnictw Naukowych, Puławy 1993.
- [20] Marshall R.C., D.F.G. Orwin, J.M. Gillespie: *Structure and biochemistry of mammalian hard keratin*, Electron Microsc. Rev., **4**, 47–83 (1991).
- [21] Nowosielski O.: *Metody oznaczania potrzeb nawożenia*, PWRiL, Warszawa 1974.
- [22] Oorschot van C.A.N.: *A revision of Chrysosporium and allied genera*, Studies in Mycology, **20**, **1** (1980).
- [23] Przysaś W., K. Ulfig, i wsp.: *Usuwanie węglowodorów ropy naftowej przez wybrane grzyby keratynolityczne podczas biodegradacji białek*, Materiały VII Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”, Wisła-Jarzębata 2001, 419–426.
- [24] Schlegel H.G.: *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa 2000.
- [25] Takada S., T. Matsueda, R. Kondo, K. Sakai: *Degradation of dioxins in fly ash by Phanerochaete sordida YK-623*, In Situ and On-Site Bioremediation, **2**, 545–550 (1994).
- [26] Takashio M.: *Etudes des phénomènes de reproduction liés au vieillissement et au rajeunissement des cultures de champignons*, Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **53**, 427 (1973).
- [27] Ulfig K.: *The occurrence of keratinolytic fungi in waste and waste contaminated habitats. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi*, Revista Iberoamericana de Micologia, Bilbao 2000, 44–50.
- [28] Vanbreuseghem R.: *Technique biologique pour l'isolment des dermatophytes du so*, Ann. Soc. Belge Med. Trop., **32**, 173 (1952).
- [29] Wolski T.: *Zmodyfikowane białka keratynowe, ich właściwości fizyko-chemiczne, analiza oraz zastosowanie*, Rozprawa habilitacyjna, Lublin 1985.
- [30] Zieńko J.: *Substancje ropopochodne w środowisku przyrodniczym (część I. Kryteria i ocena stopnia zanieczyszczenia)*, Ekologia i Technika, **1(19)**, 18–23 (1996).

Wpłynęło: 24 lutego 2003, zaakceptowano do druku: 1 sierpnia 2003.