

## DYZELINO IR BIODYZELINO EKOTOKSIKOLOGINIŲ RODIKLIŲ AERUOJAMAME DIRVOŽEMYJE TYRIMAS

Asta Marija Lapinskienė, Povilas Martinkus, Vilija Rėbzdaitė

*Klaipėdos universitetas*

### Anotacija

Dyzelino ir biodyzelino ekotoksikologinis tyrimas apima tiriamųjų medžiagų toksinių koncentracijų neadaptuotame dirvožemyje nustatymą ir mikrobiologinės transformacijos proceso kiekybinį įvertinimą. Medžiagų toksiškumo lygis nustatytas remiantis mikroorganizmų kvėpavimo intensyvumu ir dehidrogenazės fermento aktyvumu. Tiriamųjų medžiagų biotransformacijos produktų kiekybinis vertinimas pagrįstas organinių junginių anglies balanso principu. Kiekybiškai įvertinti šie tiriamųjų medžiagų biotransformacijos produktai: a) anglies dioksidas; b) humusiniai junginiai; c) nebiodegradavęs tiriamosios medžiagos likutis; d) tarpiniai biodegradacijos produktai ir mikroorganizmų biomasė. PAGRINDINIAI ŽODŽIAI: *dirvožemis, toksiškumas, biotransformacija, dyzelinas, biodyzelinas.*

### Abstract

An eco-toxicological analysis of a diesel fuel and biodiesel fuel includes the toxic concentration determination of analysed materials in the non-adapted soil and the quantitative evaluation of microbiological transformation process. The level of material toxicity is being determined according to the activity of microorganisms. The analysis is fulfilled in two methods that is by measuring the intensity of microorganism breathing according to the exuded quantity of carbonic acid and by measuring the activity of dehydrogenases ferment. The quantitative evaluation of biotransformation products of analysed materials is based on the principle of carbon balance in the organic combinations. The following biotransformation products of the analysed materials are evaluated quantitatively: a) carbon dioxide; b) humus combinations; c) the rest of non-biodegraded analysed material; d) intermediate products of biodegradation and biomass of microorganisms. KEY WORDS: *soil, toxic concentration, biotransformation, diesel fuel, biodiesel fuel.*

### Įvadas

XX amžiuje antropogeninė dirvožemio tarša tapo aktuali mokslinių tyrimų sritis. Dirvožemio užterštumą galima apibūdinti kaip medžiagų, kurios kenksmingos gyviesiems organizmams ir trikdo dirvožemyje vykstančius natūralius medžiagų ir energijos apykaitos procesus, sankaupą. Ypač jautriai į cheminę užterštumą reaguoja dirvožemio organizmai [4].

Dirvožemio tarša naftos angliavandeniliais aktuali dėl nuolat gausėjančių transporto priemonių, didėjančių naftos produktų perkrovimo ir transportavimo apimčių. Gausėjant transporto priemonių, ieškoma ir naujų, ne tokių taršių kuro šaltinių. Kaip alternatyvą dyzelinui galima panaudoti įvairių aliejų (rapsų, sojų, kanapių, saulėgrąžų) etilo arba metilo esterius. Biodyzelinas jau nebėra eksperimentinis produktas: daugiau kaip 10 metų jo gamyba ir vartojimas nuolatos auga. Tačiau biodyzelinas – naujas kuras transporto srityje, ir jo poveikis dirvožemio faunai ligi šiol nėra pakankamai iširtas.

Neatsižvelgiant į tai, kaip patenka į dirvožemį, cheminės medžiagos jame kaupiasi ir veikia jo biotinius komponentus, todėl tokias medžiagas svarbu įvertinti ekotoksikologiniu požiūriu. Mikroorganizmai yra didžiausia dirvožemio biosistemos dalis. Jie yra labai svarbūs dirvožemio derlingumui ir savaiminiam apsivalymui nuo teršalų. Vienos ar kitos mikroorganizmų fiziologinės grupės normalaus vystymosi sutrikimas gali gerokai paveikti dirvožemyje vykstančius mikrobiologinius procesus.

Teršalai veikia ne tik dirvožemio biotą, bet ir jos tarpusavio ryšius. Savaiminis dirvožemio apsivalymo laipsnis priklauso ne tik nuo konkretaus dirvožemio tipo, buferinių savybių, biologinio aktyvumo, biotos rūšies, bet ir nuo teršalo judrumo, ilgaamžiškumo, toksiškumo, migracijos dirvožemio ore ir vandens tirpale. Toksiškumo laipsnį lemia medžiagų cheminė sudėtis, koncentracija aplinkoje, kontakto trukmė, aplinkos sąlygos ir organizmo fiziologinė būklė [5].

Naftos produktai, patekę į aplinką, atsižvelgiant į jų koncentraciją, iš esmės keičia biologinių sistemų funkcionavimo sąlygas. Keičiasi terpės pH, aeracija, toksiškai veikiami mikroorganizmai. Žinoma, kad maži jų kiekiai gali skatinti mikroorganizmų augimą, nes angliavandeniliai naudojami kaip maisto šaltinis. Esant tam tikram užterštumui, sumažėja mikroorganizmų skaičius, kinta jų rūšinė sudėtis ir kiekybiniai mikrobiologinių procesų rodikliai, pavyzdžiui, fermentinis aktyvumas. Todėl svarbu žinoti, kokios medžiagų koncentracijos sukelia toksišką poveikį dirvožemio mikroorganizmams.

Jau yra atlikti tyrimai, nagrinėjantys orimulsijos ir mazuto poveikį sliekų populiacijai, tačiau nebuvo tyrinėtas dyzelino ar biodyzelino poveikis dirvožemio mikroorganizmams, kurie yra jautresni teršalams, patenkantiems į dirvožemį, ir dalyvauja savaiminio dirvožemio apsivalymo procese [3].

Tiriant cheminių medžiagų poveikį dirvožemiui, taip pat svarbu žinoti, kaip medžiaga transformuojasi, veikiama mikroorganizmų, kokie yra jos biodegradaciniai rodikliai, kaip tai atsilieps dirvožemio ekotoksikologiniams parametrams ir derlingumui. Tokio pobūdžio tyrimai plačiai taikomi agrochemijos srityje, kai analizuojami nekenksmingų aplinkai medžiagų (augalai ir jų liekanos) perėjimai į skirtingas dirvožemio organines ir neorganines frakcijas, tačiau neanalizuojama tokių medžiagų kaip, pavyzdžiui, naftos ir jos produktų ar biodyzelino biotransformacija [11; 6].

Atsižvelgdami į tai, šio darbo tikslu pasirinkome biodyzelino ir dyzelino toksinių koncentracijų neadaptuotame dirvožemyje nustatymą bei šių medžiagų mikrobiologinės transformacijos proceso dirvožemio terpėje kiekybinį įvertinimą.

## 1. Tyrimų objektas ir metodai

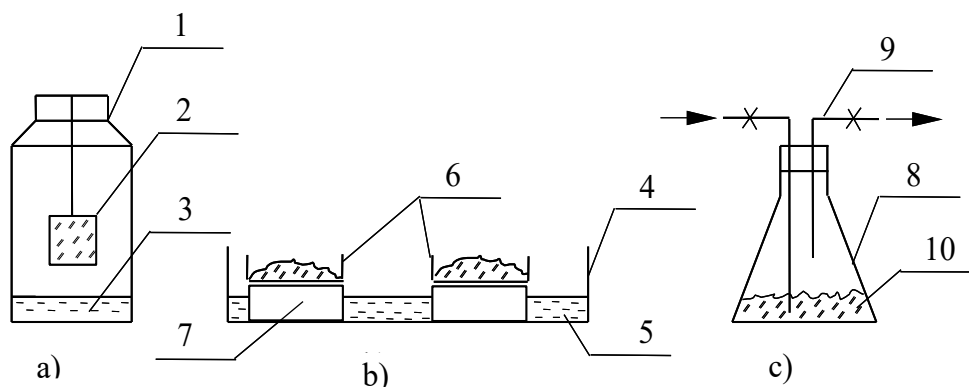
### 1.1. Tyrimų objektas

Tiriamasis darbas atliktas Klaipėdos universiteto mokslinių tyrimų laboratorijoje. Tyrimui buvo naudojamos šios medžiagos: dyzelinas (D), kuris atitinka LST EN 590 reikalavimus, ir biodyzelinas atitinkantis E DIN 51606 reikalavimus. Tiriamose medžiagose nustatytas tikslus organinės anglies kiekis.

Bandiniams paruošti naudojome neadaptuotą tiriamosioms medžiagoms dirvožemį, kur bandinio ėmimo vietoje paskutinius 15 metų vykdoma tik žemės ūkio veikla. Dirvožemio pavyzdžiai imti iš Vakarų Lietuvos regiono, Klaipėdos priemiesčio. Dirvožemio pavyzdžiai imti iš viršutinio sluoksnio (0–10 cm). Dirvožemyje buvo nustatyti pradiniai atskirų organinių frakcijų kiekiai. Pagal granulimetrinę sudėtį dirvožemis priskiriamas lengvam priemoliui (pagal N. A. Kačinskio klasifikaciją). Karbonatų kiekis dirvožemyje sudaro 18 mg  $\text{CaCO}_3$  ekv./g sauso dirvožemio.

### 1.2. Dirvožemio paruošimas ir inkubavimo sąlygos

Nustatant biodyzelino ir dyzelino toksines koncentracijas ir atliekant biotransformacijos produktų kiekybinį vertinimą sudarytos trijų tipų inkubacinės sistemos (1 pav.). Visiems tyrimams naudojome tą patį humusingą dirvožemį, iš kurio išvalytos stambiadispersinės priemaišos (akmenys, šaknys ir kt.). Bandiniams imta po 40 g orasausio dirvožemio, kuris sudrėkinamas iki 60% viso vandens imlumo. Tyrimo laikotarpiu dirvožemio pavyzdžiai laikomi termostate 25°C temperatūroje. Inkubavimo temperatūra ir dirvožemio drėgmė taikytos pagal ISO 11266 reikalavimus.



1 pav. Inkubacinės sistemos ekotoksikologiniams rodikliams nustatyti  
Mikrobiologinio aktyvumo nustatymas pagal anglies dioksido išsiskyrimą (a), pagal dehidrogenazės aktyvumą (b), biotransformacijos produktų nustatymas (c).  
1 – 1l talpos uždaras stiklinis indas; 2 – perforuotas indas su tiriamuoju substratu;  
3 – 0,2 M natrio šarmo vandeninis tirpalas; 4 – platus žemasienis indas; 5 – vanduo oro drėginiui palaikyti; 6 – Petri lėkštelės su tiriamuoju substratu; 7 – atrama; 8 – 300 ml kūginė kolba; 9 – aeraciniai vamzdeliai; 10 – tiriamasis substratas

### **1.3. Toksiškumo analizė**

Tiriamą biodyzelino ir dyzelino toksiškumą pasirinktos penkios tiriamų medžiagų koncentracijos, kurios atitinka 1, 3, 6, 9 ir 12 masės procentų. Maksimali 12% medžiagų koncentracija pasirinkta remiantis ankstesniais dyzelino ir biodyzelino sulaikymo rodiklių tyrimais dirvožemyje. Toksiškumo tyrimo duomenys gaunami po 6 parų inkubacijos. Inkubacijos laikotarpis pasirinktas remiantis ankstesniais biodegradacijos tyrimais, kuriuose intensyviausias CO<sub>2</sub> išsiskyrimas buvo stebimas pirmas 5–6 paras [13].

Medžiagų toksiškumo lygis nustatomas pagal mikroorganizmų aktyvumą. Tyrimas atliekamas dviem metodais. Pirmas metodas pagrįstas dirvožemio mikroorganizmų kvėpavimo intensyvumo matavimu, t. y. matuojant išsiskyrusio anglies dioksido kiekį tyrimo pabaigoje. Anglies dioksido dujos absorbuojamos natrio šarmo vandeniniu tirpalu. Absorbuotų dujų kiekis nustatomas titrimetriniu metodu su HCl, kaip indikatorių naudojant fenolftaleiną [14].

Antras metodas pagrįstas dehidrogenazės fermento aktyvumo matavimu. Metodo esmė – trifeniltetrachlorido (TTC) prisijungimas prie mikroorganizmų enzimų sistemos. Mikroorganizmai redukuoja TTC ir kaip redukcijos produktas gaunamas trifenilformacanas (TPF), kuris nustatomas kolorimetriniu metodu [1].

### **1.4. Biotransformacijos produktų kiekybinė analizė**

Biotransformacijos kiekybinio vertinimo dirvožemio substrato inkubacijos laikotarpis sudaro 45 paras (ISO 11266, 1994). Inkubacinės kolbos aeruojamos kas 24 valandas, jose palaikoma nuolatinė drėgmė ir temperatūra. Kiekvienai tiriamai medžiagai buvo paruoštos trys inkubacinės kolbos. Po 45 parų inkubacijos dirvožemio substratas paruošiamas atskirų biotransformacijos produktų analizei.

Tiriamų medžiagų biotransformacijos produktų kiekybinis vertinimas pagrįstas organinių junginių anglies balanso principu. Tyrimo metu kiekybiškai įvertinami šie tiriamų medžiagų biotransformacijos produktai: a) anglies dioksidas; b) humusiniai junginiai; c) nebiodegradavę tiriamos medžiagos likutis; d) tarpiniai biodegradacijos produktai ir mikroorganizmų biomasė.

Tiriamų medžiagų transformacija į anglies dioksidą ir humusinius junginius įvertinta pagal bendros organinės anglies ir humusinių medžiagų organinės anglies analizę dirvožemyje. Organinės anglies kiekis dirvožemyje nustatomas deginimo metodu deguonies terpėje (ISO 10694, 1995). Metodo esmė – organinių junginių oksidacija iki anglies dioksido ne žemesnėje kaip 900°C temperatūroje. Išsiskyres anglies dioksido kiekis nustatomas dujų chromatografijos metodu.

Humusinių junginių ekstrakcija iš dirvožemio atliekama natrio pirofosfato ir natrio šarmo tirpalu [2]. Nebiodegradavę tiriamų medžiagų likučiai nustatomi ekstrakciniu svorio metodu. Biodyzelinas ekstrahuojamas iš dirvožemio chloroformo-etanolio mišiniu (2:1), dyzelinas – anglies tetrachloridu [12; 17]. Kiekvienu atveju atliekama kontrolinė dirvožemio be tiriamųjų medžiagų ekstrakcija. Kontroliniai duomenys minusuojami iš darbo rezultatų.

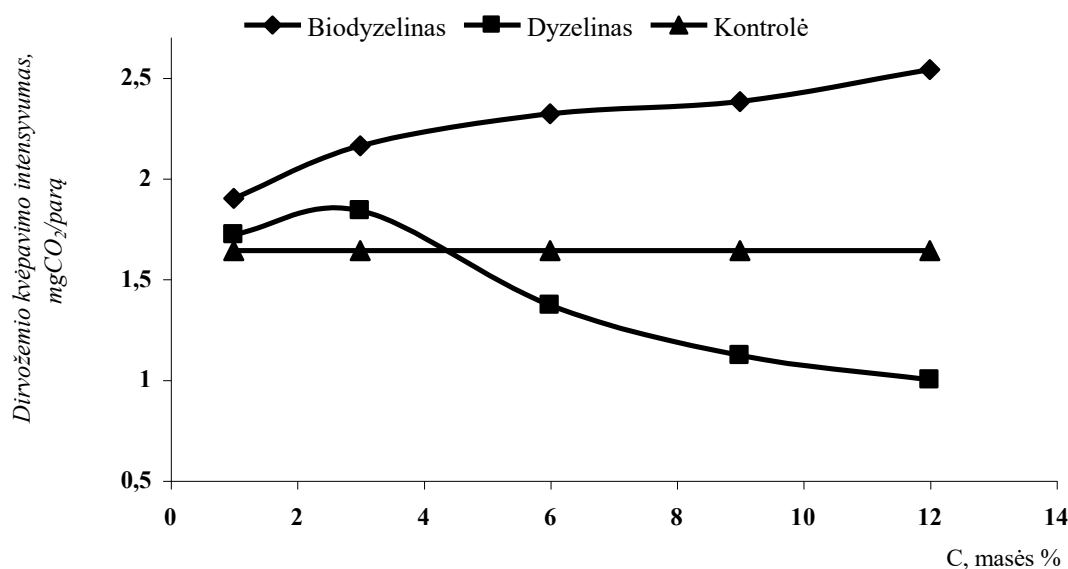
Tarpiniai biodegradacijos produktai ir mikroorganizmų biomasė apskaičiuojami sudarant tiriamų medžiagų anglies balansą iš anksčiau gautų duomenų. Siekiant gauti patikimus balanso duomenis, nustatytas faktinis anglies kiekis tiriamose medžiagose. Anglies kiekis nustatomas deginimo metodu deguonies terpėje (ISO 10694, 1995).

Visais atvejais lygiagrečiai paruošiami kontroliniai bandiniai su tuščiu dirvožemiu. Kontrolinių bandinių duomenys minusuojami iš tiriamųjų medžiagų analizės duomenų. Visi tyrimo rezultatai apskaičiuojami kaip aritmetinis vidurkis iš trijų lygiagrečiai paruoštų bandinių.

## **2. Rezultatai ir aptarimas**

Dyzelino ir biodyzelino pavojingumą dirvožemiui vertiname pagal toksiškumo tyrimo rezultatus. Tyrimai atlikti su penkiomis skirtingomis tiriamųjų medžiagų koncentracijomis, t. y. 1, 3, 6, 9 ir 12 masės procentų. Maksimali 12% medžiagų koncentracija pasirinkta remiantis ankstesniais dyzelino ir biodyzelino sulaikymo rodiklių tyrimais dirvožemyje. Remiantis šių tyrimų rezultatais nustatyta, kad esant 24% dirvožemio dėgnumui (tai atitinka 60% visą vandens imlumą) tiek dyzelino, tiek biodyzelino didžiausias sulaikomas kiekis atitinka 12% koncentraciją. Medžiagos toksiškumą nustatėme pagal mikroorganizmų kvėpavimo aktyvumą. Kvėpavimas yra sudėtingas biocheminis procesas, kuriam vykstant išsiskyrusi energija eikvojama mikroorganizmų augimui ir dauginimuisi.

Mikroorganizmų kvėpavimo aktyvumo tyrimai atlikti matuojant išsiskyrusio anglies dioksido kiekį per visą inkubacijos laikotarpį. Antrame paveiksle pateikti tyrimo rezultatų vidurkiai sudaryti iš 3 lygiagrečių bandinių, kurie parodo mikroorganizmų kvėpavimo aktyvumą po 6 parų inkubacijos. Tyrimų trukmė pasirinkta remiantis ankstesniais biodegradacijos tyrimais, kuriais nustatyta, kad intensyviausia mikrobiologinė veikla vyksta pirmas 5–6 paras [13]. Dyzelino ir biodyzelino tyrimų rezultatai pateikti atėmus kontrolinio bandinio rezultata.



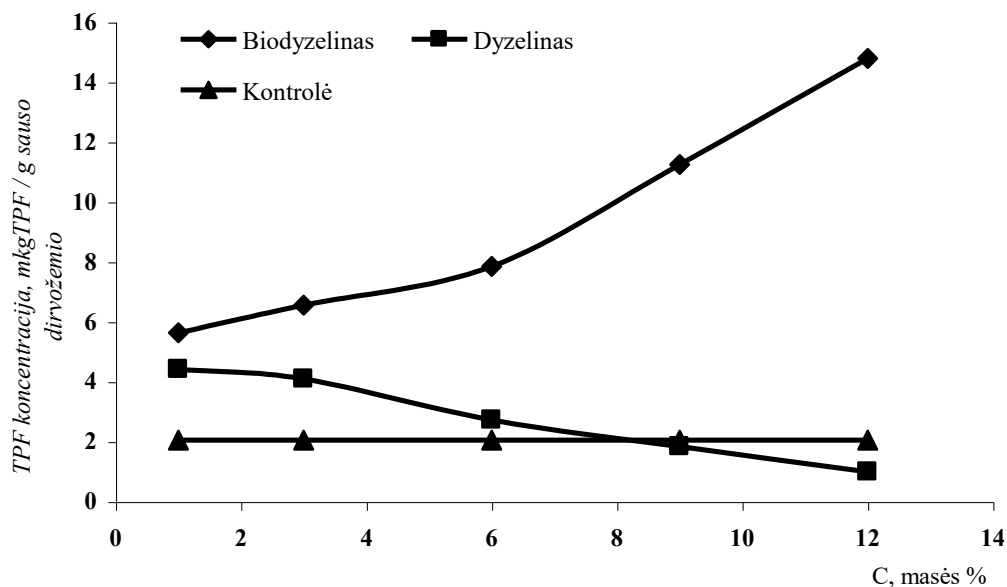
2 pav. Dirvožemio kvėpavimo intensyvumo priklausomybė nuo biodyzelino ir dyzelino koncentracijos

2 paveiksle pateiktus dyzelino ir biodyzelino toksiškumo rezultatus palyginome su R. Sūssmuto pateiktomis kreivėmis, kurios įvertina substrato koncentracijos įtaką dirvožemio mikroorganizmams [15]. Palyginę grafines priklausomybes nustatėme, kad biodyzelino biodegradacija visame koncentracijų intervale (1–12 masės procentai) pagal anglies dioksido išsiskyrimą atitinka Sūssmuto kreivę, kuri parodo, kad CO<sub>2</sub> išsiskyrimas didėja proporcingai substrato koncentracijai, t. y. substratas yra gerai skaidomas. Grafinė priklausomybė, sudaryta pagal dyzelino tyrimo duomenis (2 pav.), artima R. Sūssmuto pateiktai kreivei, kuri parodo, kad anglies dioksido išsiskyrimas, esant tam tikroms substrato koncentracijoms, pasiekia maksimumą, tačiau didėjant substrato koncentracijai dirvožemio kvėpavimo intensyvumas tampa mažesnis negu kontroliniame pavyzdyje. Tokio pobūdžio grafinė priklausomybė apibūdina substratą, kuris esant mažesnėms koncentracijoms skaidomas, esant didesnėms – pasižymi toksiškomis savybėmis. Duomenų lyginamoji analizė rodo, kad biodyzelinas yra netoksiška medžiaga, anglies dioksido išsiskyrimas nuosekliai didėja tirtose koncentracijų ribose, substratas yra gerai skaidomas. Nustatėme, kad dyzelinas toksiškas, kai jo koncentracija dirvožemyje viršija 3 masės procentus.

Siekiant patikrinti biodyzelino ir dyzelino toksiškumo duomenis, nustatytus pagal mikrobiologinio kvėpavimo intensyvumą, buvo atliktas analogiškas tyrimas, medžiagų toksiškumą vertinant pagal dehidrogenazės fermento aktyvumą, kurį išskiria mikroorganizmai, skaidydami medžiagas. Dehidrogenazės fermento aktyvumo testas rodo toksinių medžiagų, pvz., toluolo, fenolio, sunkiųjų metalų poveikį dirvožemiui ir charakterizuoja dirvožemio mikroorganizmų gyvybingumo priklausomybę nuo kenksmingų medžiagų poveikio. Aerobiniai mikroorganizmai medžiagų oksidacijai naudoja atmosferos deguonį. Šiose reakcijose deguonis naudojamas kaip protonų akceptorius, t. y. deguonis prisijungia atskeltą nuo medžiagos molekulės vandenilio joną. Pirmame oksidacijos proceso etape, veikiant fermentams, vandenilio jonas atskiriamas nuo substrato (dehidrinimas). Čia vykstantys procesai yra oksidacinio pobūdžio ir vyksta dėl nedidelių oksidacijos-redukcijos potencialo reikšmių kitimo, kurį lemia medžiagos savybė prisijungti arba atiduoti elektronus. Tai daro tiesioginę įtaką dehidrogenazės fermento, kurio aktyvumą gyvybinėse sistemose galima nustatyti įvairiais metodais, veiklai. Dirvožemio mikrobiologijoje dažniausiai taikomas metodas, pagrįstas trifeniltetrachlorido (TTC) kaip dirbtinio elektronų akceptoriaus panaudojimu vietoj deguonies arba fiziologinių elektronų akceptorių, tokių kaip citochromas. Mikroorganizmai redukuoja TTC

iki TPF (trifenilformacano), ir pagal TPF koncentraciją dirvožemyje vertinamas mikroorganizmų gyvybingumas.

3 paveiksle pateikti toksiškumo tyrimo rezultatai po 6 parų biodegradacijos aerobinėmis sąlygomis esant biodyzelino ir dyzelino analogiškomis koncentracijoms kaip ir pirmame tyrime.



3 pav. Dehidrogenazės aktyvumo priklausomybė nuo biodyzelino ir dyzelino koncentracijos dirvožemyje

Kaip matome iš 3 paveiksle pateiktų grafinių priklausomybių, dyzelino pavyzdžiuose, koncentracijų intervale nuo 0 iki 2,5 masės procentų, stebimas nedidelis dehidrogenazės aktyvumo mažėjimas. Akivaizdus dehidrogenazės aktyvumo slopinimas pasireiškia, kai dyzelino koncentracija dirvožemyje viršija 2,5%. Didėjant biodyzelino koncentracijai dirvožemyje, TPF koncentracija didėja proporcingai substrato koncentracijai, kas būdinga netoksiškoms medžiagoms.

Išanalizavus biodyzelino ir dyzelino toksiškumo tyrimo rezultatus, nustatytus pagal dirvožemio kvėpavimo intensyvumą ir dehidrogenazės fermento aktyvumą, galima teigti, kad biodyzelinas yra netoksiškas, o dyzelinas pasižymi toksinėmis savybėmis, kai jo koncentracija dirvožemyje viršija 3 masės procentus.

Siekdami patikrinti, ar nustatyti toksiškumo rodikliai atitinka bendruosius biodestrukcijos teiginus, atlikome dyzelino ir kitų naftos produktų toksiškumo lyginamąją analizę. Gautus dyzelino toksiškumo duomenis palyginome su Ekologijos instituto [4] ir Vilniaus Gedimino technikos universiteto [3] mokslininkų tyrimų duomenimis. Tyrimais nustatytas orimulsijos ir mazuto poveikis sliekų populiacijų vystymuisi. Remiantis šių tyrimų duomenimis, 50 g/kg (5%) mazuto ir orimulsijos dozės pasižymėjo stipriu toksiniu poveikiu, t. y. buvo stebimas didelis sliekų populiacijos sumažėjimas. Mūsų tyrimų duomenimis, didelis toksinis poveikis dirvožemio mikroorganizmams stebimas, kai dyzelino koncentracija viršija 25 g/kg (2,5%).

Galime daryti prielaidą, kad dyzeline, skirtingai nuo mazuto ar orimulsijos, yra mono- ir heterociklinių aromatinių angliavandenilių, kurie pasižymi toksiškumu ir dydžiausiu (angliavandenilių grupėje) biodestrukciniu atsparumu. Remiantis lyginamosios analizės išvadomis, galima teigti, kad nustatyta dyzelino toksinė koncentracija neprieštarauja bendriesiems biodestrukcijos teiginiams.

Tiriamų medžiagų mikrobiologinės transformacijos produktų kiekybinio įvertinimo paskirtis – nustatyti medžiagų bendrus biodegradacijos rodiklius ir mikrobiologinės transformacijos proceso greitį. Tyrimo duomenis galima panaudoti vertinant organinių medžiagų įtaką dirvožemio mikrobiologinei veiklai ir medžiagų apykaitos procesui. Tyrimui pasirinkta 2% medžiagos koncentracija, kuri pagal toksiškumo analizės duomenis, pateiktus šiame straipsnyje, patenka į netoksišią diapazoną.

Mūsų atliekamo tyrimo pagrindą sudaro mikrobiologinės transformacijos produktų kiekybinis įvertinimas pagal anglies kiekį medžiagoje ir tiriamosios medžiagos anglies balanso sudarymas, todėl labai svarbu tiksliai žinoti pradinį anglies kiekį tiriamojoje medžiagoje ir dirvožemyje.

Deginimo metodu (ISO 10694, 1995) nustatėme pagrindinių organinių medžiagų anglies kiekį kontroliniame dirvožemyje. Bendras organinių medžiagų anglies kiekis sudaro 26,44 mg/g sauso dirvožemio, humusinių medžiagų anglies kiekis sudaro 12,22 mg/g sauso dirvožemio.

Siekdami korektiškai atlikti eksperimentą, nustatėme bendrosios anglies kiekį tiriamose medžiagose. 1 lentelėje pateikiami tiriamųjų medžiagų organinės anglies nustatymo duomenys ir teoriniai duomenys iš žinytų [16; 9].

1 lentelė

Anglies kiekis tiriamose medžiagose

Medžiaga	Nustatytas C kiekis, masės %	Teorinis C kiekis, masės %
Dyzelinas	85,8	86,0
Biodyzelinas	76,2	77,0

1 lentelėje pateikti duomenys naudojami skaičiuojant medžiagų visiškos biodegradacijos (oksidacijos) lygį, taip pat nustatant anglies, perėjusios iš tiriamųjų medžiagų į dirvožemio organines frakcijas, kiekį.

Tiriamų medžiagų transformacijos produktus suskirstėme į 4 pagrindines grupes, kurios būtinos nustatant medžiagos pirminės biodegradacijos, visiškos biodegradacijos ir humifikacijos lygį.

Nustatant medžiagos pirminės biodegradacijos lygį tiriamųjų medžiagų likučiai ekstrahuojami iš dirvožemio ekstrakciniais tirpalais. Pirminės biodegradacijos lygis skaičiuojamas pagal (1) lygtį:

$$L_{deg.r.} = \frac{C \cdot M_{sub.} \cdot (100 - \chi)}{M_{tir.}}, \quad (1)$$

kur  $L_{degr.}$  – medžiagos pirminės biodegradacijos lygis, %;  
 $C$  – likutinė tiriamosios medžiagos koncentracija dirvožemyje, mg/g sauso dirvožemio;  
 $M_{sub.}$  – bendras orasausio substrato kiekis bandinyje, g;  
 $\chi$  – orasausio substrato drėgnumas, %;  
 $M_{tir.}$  – pradinis tiriamosios medžiagos kiekis bandinyje, mg.

Medžiagos visiškos biodegradacijos lygis parodo, kokia medžiagos dalis oksiduota iki anglies dioksido ir vandens. Medžiagos visiškos biodegradacijos lygis skaičiuojamas pagal (2) lygtį:

$$L_{oks.} = \frac{(C_{b.tir.} - C_{b.kontr.}) \cdot M_{sub.} \cdot (100 - \chi)}{M_{tir.} \cdot X_c}, \quad (2)$$

kur  $L_{oks.}$  – medžiagos visiškos biodegradacijos (oksidacijos) lygis, %;  
 $C_{b.tir.}$  – bendros organinės anglies likutinė koncentracija dirvožemyje su tiriamąja medžiaga, mgC/g sauso dirvožemio;  
 $C_{b.kontr.}$  – bendros organinės anglies likutinė koncentracija kontroliniame dirvožemyje, mgC/g sauso dirvožemio;  
 $X_c$  – anglies svorinė dalis tiriamojoje medžiagoje.

Medžiagos humifikacijos lygis parodo, kokia medžiagos dalis transformuojama į humusines medžiagas. Medžiagos humifikacijos lygis skaičiuojamas pagal (3) lygtį:

$$L_{hum.} = \frac{(C_{hum.tir.} - C_{hum.kontr.}) \cdot M_{sub.} \cdot (100 - \chi)}{M_{tir.} \cdot X_c}, \quad (3)$$

kur  $L_{hum.}$  – medžiagos humifikacijos lygis, %;  
 $C_{hum.tir.}$  – humusinių medžiagų anglies koncentracija dirvožemyje su tiriamąja medžiaga, mgC/g sauso dirvožemio;  
 $C_{hum.kontr.}$  – humusinių medžiagų anglies likutinė koncentracija kontroliniame dirvožemyje, mgC/g sauso dirvožemio;  
 $X_c$  – anglies svorinė dalis tiriamojoje medžiagoje.

Tarpinių biodegradacijos produktų ir mikroorganizmų biomasės kiekis apskaičiuojamas sudarant tiriamųjų medžiagų balansą (4):

$$M_{\text{tarp.}} = 100 - (L_{\text{deg r.}} + L_{\text{oks.}} + L_{\text{hum.}}), \quad (4)$$

kur  $M_{\text{tarp.}}$  – tiriamųjų medžiagų dalis, transformuota į tarpinius biodegradacijos produktus ir mikroorganizmų biomase.

Pagal sudarytą anglies balansą atlikome kiekybinį mikrobiologinės transformacijos produktų įvertinimą, kuris pateiktas 2 lentelėje.

2 lentelė

**Dyzelino ir biodyzelino transformacijos produktų pasiskirstymas po 45 parų aerobinės biodegradacijos**

Substratas	Tiriamoji medžiaga iki biodegradacijos	Išsiskyrė CO <sub>2</sub> pavidalu	Liko dirvožemyje		
			Pradinės medžiagos pavidalu	Tarpiniai biodegradacijos produktai ir mikroorganizmų biomase	Humusiniuose junginiuose
masės %					
Dirvožemis su dyzelinu	100,00	61,00	5,03	5,17	28,80
Dirvožemis su biodyzelinu	100,00	79,60	0,82	10,68	8,90

Iš 2 lentelėje pateiktų tyrimo rezultatų matome, kad dyzelinas atsparesnis mikrobiologiniam skaidymui negu biodyzelinas. Dirvožemio pavyzdžiuose su biodyzelinu vyko intensyvesnis dirvožemio kvėpavimas negu bandiniuose su dyzelinu. Šį procesą apibūdina visiškos biodegradacijos rodiklis. Visiškos biodegradacijos lygis išreiškia medžiagos mikrobiologinį atsparumą ir tiesiogiai priklauso nuo mikroorganizmų aktyvumo. Lyginant mikrobiologinio aktyvumo duomenis iš toksiškumo tyrimo su medžiagų visiškos biodegradacijos lygiu, abiem atvejais stebimas akivaizdus mikrobiologinio aktyvumo pranašumas bandiniuose su biodyzelinu.

Inkubacijos laikotarpio pabaigoje 39% dyzelino ir 20,4% biodyzelino liko dirvožemyje įvairių organinių junginių forma. Šiame darbe dirvožemio organiniai junginiai suskirstyti į tris pagrindines grupes, kurios apibūdina organinės medžiagos sąveiką su dirvožemio mikroorganizmais. Nustatyta, kad po 45 parų aerobinės inkubacijos dyzelino pirminės biodegradacijos lygis, sudarė 94,97%, o biodyzelino – 99,18%. Pirminės biodegradacijos lygis, kaip ir visiškos biodegradacijos lygis, tiesiogiai priklauso nuo mikroorganizmų ir jų fermentų sistemos aktyvumo. Daugelio organinių medžiagų mikrobiologinio skaidymo procesas inicijuojamas hidrolizės reakcijų, kurias katalizuoja fermentas hidrolazė [5]. Iš to išplaukia, kad hidrolazės fermento aktyvumas gali būti naudojamas kaip indikatorius ne tik toksiškumui analizuoti, bet ir įvertinant medžiagos biodegradacines savybes.

Atlikę anglies kiekio humusinėse rūgštyse tyrimus, nustatėme, kokia dalis tiriamų medžiagų transformavosi į humusą. Iš 2 lentelėje pateiktų duomenų matome, kad humifikacijos procesas intensyviau vyko dirvožemio pavyzdžiuose su dyzelinu negu su biodyzelinu. Tyrimo pabaigoje apie 30% dyzelino buvo transformuota į humusinius junginius. Organinių medžiagų humifikacijos savybes lemia medžiagos cheminė sandara. Dyzelinas, kurio sudėtyje yra aromatinių ir heterociklinių junginių, pasižymi didesniu humifikacijos laipsniu negu stambiamolekulių riebiųjų rūgščių dariniai, iš kurių sudarytas biodyzelinas. Šis humifikacijos teorijos teiginys yra patvirtintas daugelio tyrimų [11; 6; 10]. Remiantis humifikacijos teorija humusinių medžiagų sintezei mikroorganizmai daugiausia naudoja aromatinis fenolinio tipo junginius ir aminorūgščių darinius. Kitos organinių junginių klasės, tokios kaip angliavandeniai ar riebiosios rūgštys, mikroorganizmų naudojamos daugiausia kaip energijos šaltinis.

Išsiskyre dirvožemio organinių medžiagų grupę, apimančią tarpinius biodegradacijos produktus ir mikroorganizmų biomase. Šios grupės organinių medžiagų kiekis nustatomas ne analizės, o skaičiavimo būdu, sudarius tiriamosios medžiagos balanso lygtį. Pagal sudarytą tiriamųjų medžiagų balansą (4 lygtis) nustatėme, kad šiai grupei priklauso 5,17% dyzelino ir 10,68% biodyzelino organinių medžiagų. Remiantis tyrimų duomenimis, dirvožemio mikroorganizmų biomase sudaro iki 1% bendro organinių medžiagų kiekio [5]. Galima daryti išvadą, kad biodegraduojant biodyzelinui tarpinių biodegradacijos produktų kiekiai didesni negu dyzelino bandiniuose. Didėnis tarpinių biodegradacijos produktų kiekis biodyzelino

bandiniuose gali būti paaiškinamas skirtingu pirminės ir galutinės biodegradacijos procesų greičiu ir lėtu humifikacijos procesu.

Apibendrinant tiriamųjų medžiagų mikrobiologinės transformacijos proceso kiekybinio įvertinimo rezultatus galima teigti, kad dyzelino sudėtyje yra daugiau medžiagų, kurios atsparios mikrobiologinei oksidacijai, tačiau naudojamos humusinių medžiagų sintezei. Biodyzelino sudėtyje esantys organiniai junginiai lengvai prieinami kaip energijos ir maisto medžiagų šaltinis.

## Išvados

1. Biodyzelino ir dyzelino toksiškumo tyrimo rezultatai, nustatyti pagal dirvožemio kvėpavimo intensyvumą ir dehidrogenazės fermento aktyvumą, rodo, kad koncentracijų ribose nuo 0 iki 12 masės procentų biodyzelinas yra netoksiškas, o dyzelinas pasižymi toksinėmis savybėmis, kai jo koncentracija dirvožemyje viršija 2,5 masės procentų.
2. Atlikus mikrobiologinės transformacijos kiekybinį įvertinimą, nustatyta, kad per 45 paras ~29% dyzelino ir ~9% biodyzelino transformuota į humusinius junginius. Dyzelino visiškos biodegradacijos lygis sudaro 61%, biodyzelino – ~80%. Nustatytas dyzelino pirminės biodegradacijos lygis sudaro 95%, biodyzelino – ~99%.
3. Mikrobiologinės transformacijos proceso kiekybinio įvertinimo rezultatai parodė, kad dyzelino sudėtyje yra daugiau medžiagų, kurios atsparios mikrobiologinei oksidacijai, tačiau jos naudojamos humusinių medžiagų sintezei. Biodyzelino sudėtyje esantys organiniai junginiai lengvai prieinami kaip energijos ir maisto medžiagų šaltinis.

## Literatūra

1. Alef, K. (1992). *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie*. Landsberg: Eiomed., 284 S.
2. Александрова, Л. Н. (1980). *Органическое вещество почвы и процессы его трансформации*. Ленинград: Наука, 286 с.
3. Baltrėnas, P., Idzelis, R., Petraitis, E. (1999). Orimulsijos poveikis sliėkų populiacijai ir biomasei. *Aplinkos inžinerija*, 3, p. 111–113.
4. Eitminavičiūtė, I. ir kt. (1995). Pedobionts survival in soils polluted by oil products. *Ekologija*, 4, p. 70–80.
5. Eitminavičiūtė, I. (1997). *Dirvožemio biologija*. Vilnius: Mokslas, 122 p.
6. Головлёва, Л. А., Гарбанов, Х. Г. Разложение лигнина грибными культурами. *Микробиология*, 6, с. 83–88.
7. ISO 11266 – Soil quality – Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemical in soil under aerobic conditions. (1994). Vilnius, 6 p.
8. ISO 10694 – Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). (1995). Vilnius, 7 p.
9. Jučas, P. (1992). *Değalai ir tepalai*. Vilnius: Mokslas, 256 p.
10. Kalėdienė, L. (1999). Naftos angliavandenių mikrobiologinė degradacija. *Ekologija*, 3, p. 55–58.
11. Khind, C. S. (1992). Nutrients transformation in soils amended green manures. *Advances in Soil Science*, vol. 20, p. 239–246.
12. Кузнецов, Д. И., Гришина, Н. Л. (1977). *Унифицированная система методов выделения и количественного определения липидов пищевых продуктов*. Москва: Пищевая промышленность, 70 с.
13. Lapinskienė, A., Martinkus, P., Vaitukaitytė, J., Viėkus, M. (2003). Investigation into biodegradation kinetics of organic substances in the soil under aerobic conditions. *Journal of environmental engineering and landscape management*, vol. XI, No. 1, p. 23–31.
14. Schinner, F., Ohlinger, R., Kandler, E., Margesin, R. (1993). *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Berlin: Springer, 640 S.
15. Süssmuth, R., Haag, R., Springer, W. (1999). *Mikrobiologisch-Biochemisches Praktikum*. Stuttgart: Thieme, 485 S.
16. Тютюников, Б. Н., Бухштаб, З. И., Гладкий, Ф. Ф. и др. (1992). *Химия жиров*. Москва: Колос, 447 с.
17. *Vandens ir žemės teršimo naftos produktais laboratorinio tyrimo metodiniai nurodymai*. (1993). Vilnius: Aplinkos apsaugos departamentas, 43 p.

## Summary

## ANALYSIS OF ECO-TOXICOLOGICAL INDICES OF A DIESEL AND BIO-DIESEL IN THE AERATED SOIL

Asta Marija Lapinskienė, Povilas Martinkus, Vilija Rėbždaitė

An eco-toxicological analysis of a diesel fuel and biodiesel fuel includes the toxic concentration determination of analyzed materials in the non-adapted soil and the quantitative evaluation of microbiological transformation process. The level of material toxicity is being determined according to the activity of microorganisms. The analysis is performed in two methods, i.e. by measuring the intensity of microorganism breathing according to the exuded quantity of carbon dioxide and by measuring the activity of dehydrogenasis ferment. The quantitative evaluation of biotransformation products of analyzed materials is based on the principle of carbon balance in the organic compounds. The following biotransformation products of the analyzed materials are evaluated quantitatively: a) carbon dioxide; b) humous compounds; c) non-biodegraded remainder of the analyzed material; d) intermediate products of bio-



degradation and biomass of microorganisms. The results of toxic analysis of biodiesel fuel and diesel fuel according to the intensity of soil respiration and activity of dehydrogenasis ferment showed that biodiesel fuel is non-toxic from 0 to 12% of mass in concentration limits, while diesel fuel can be distinguished for its toxic features when its concentration in soil 3% of mass. After quantitative evaluation of microbiological transformation it was determined that ~29% of diesel fuel and ~9% of biodiesel fuel was transformed into humous compounds in 45 days. The level of full biodegradation of diesel fuel is 61% and biodiesel fuel - ~ 80%. The determined level of primary biodegradation of diesel is 95% and biodiesel fuel - ~99%. The results of quantitative evaluation of microbiological transformation process showed that there are more materials in the composition of diesel fuel that are resistant to microbiological oxidation, however they are used for synthesis of humous materials. Organic compounds in composition of biodiesel fuel are easily available as a source of energy and nutrition.

*Gauta 2003 10 05*

*Spausdinti rekomendavo: prof. habil. dr. V. Židonis, prof. habil. dr. P. Balčiūnas*