

WYKORZYSTANIE SYSTEMU BIOLOG ECOPLATE®  
DO MONITOROWANIA STANU EKOTOKSYKOLOGICZNEGO  
OSADÓW ŚCIEKOWYCH (artykuł przeglądowy)

*Agata Gryta, Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Nina Bilińska*

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
e-mail: m.frac@ipan.lublin.pl

**Streszczenie.** Rosnąca ilość osadów ściekowych i pofermentacyjnych stwarza konieczność ich racjonalnego zagospodarowania, gdyż składowanie może być niebezpieczne dla środowiska. Ze względu na zawartość w osadach materii organicznej oraz składników pokarmowych niezbędnych dla roślin mogą być one stosowane jako nawozy organiczne. Jednak poza cennymi substancjami osady mogą zawierać również składniki toksyczne i niebezpieczne. Dlatego też istnieje konieczność opracowania metod szybkiej oceny ekotoksyczności osadów, które pozwolą określić możliwość zastosowania danego osadu w rolnictwie. System Biolog Ecoplate® umożliwia ocenę profilu metabolicznego odzwierciedlającego stan aktywności populacji mikroorganizmów w próbkach środowiskowych. Jest to szybka i nowoczesna technika, która wykorzystując biologiczne właściwości pozwala charakteryzować stan ekologiczny próbek środowiskowych, tj. osady ściekowe i pofermentacyjne.

**Słowa kluczowe:** osady ściekowe, Biolog Ecoplate®, ekotoksyczność, metaboliczny odcisk palca, aktywność mikroorganizmów, profil metaboliczny

#### WSTĘP

Intensywnie zachodzący w ostatnich latach proces urbanizacji i rozwoju gospodarki powoduje powstawanie nowych problemów natury ekologiczno-biologicznej, jak na przykład rosnącą ilość osadów ściekowych czy pofermentacyjnych. Oczyszczalnie ścieków komunalnych i przemysłowych produkują ogromne ilości osadów. Jak wynika z raportu sporządzonego przez Główny Urząd Statystyczny, w roku 2010 w Polsce zostało wytworzonych 2309,4 hm<sup>3</sup> ścieków przemysłowych i komunalnych wymagających oczyszczenia (GUS, 2012). Gospodarka osadami ściekowymi jest jednym z najważniejszych problemów, przed którymi stoi dziś społec-

czeństwo, ponieważ ilość wytwarzanych osadów ściekowych w Europie (około 10,9 mln ton suchej masy osadu dla UE-27 w 2005 r.) stale wzrasta w ostatnich dziesięcioleciach (Kelessidis i Stasinakis 2012). Racjonalne ich wykorzystanie jest bardzo istotne, z uwagi na fakt, że składowanie stanowi zagrożenie dla środowiska naturalnego (Kłapeć i Cholewa 2012). Składowanie osadów niesie ryzyko przenikania toksycznych składników do wód podziemnych i tym samym może prowadzić do ich skażenia (Kijo-Kleczkowska i in. 2012, Kłapeć i in. 2003). Problem zagospodarowania osadów stawia więc wyzwanie nauce, jak i rolnictwu, których zadaniem jest opracowanie bezpiecznych dla środowiska metod utylizacji tych odpadów oraz prowadzenie odpowiedniego monitoringu środowiska podczas ich rolniczego wykorzystania.

W Polsce, jak i innych krajach Unii Europejskiej osady ściekowe znajdują zastosowanie głównie w rolnictwie (nawożenie i ulepszanie właściwości gleb), przy kształtowaniu powierzchni gruntów i rekultywacji gleb, a także wykorzystywane są na cele energetyczne i budowlane. Z uwagi na skład i właściwości osadów najbardziej odpowiednie do zastosowania w rolnictwie wydają się być te, pochodzące z przemysłu rolno-spożywczego, m.in. osady z oczyszczalni ścieków mleczarskich. Zawierają one duże ilości składników pokarmowych, w tym azotu, fosforu i wapnia (Frąc i Jezierska-Tys 2011, Joniec i in. 2012). Jednakże należy zdawać sobie sprawę, iż poza cennymi składnikami, osady mogą zawierać również metale ciężkie, związki toksyczne takie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), chlorowcopochodne związki organiczne (AOX), polichlorowane bifenylole (PCB) i dioksyny (Oleszczuk 2009, Oleszczuk i in. 2012). Ponadto mogą być źródłem mikroorganizmów chorobotwórczych, fitopatogenicznych i toksynotwórczych (Frąc i in. 2012). Są to istotne czynniki ograniczające możliwość rolniczej utylizacji osadów. Dlatego też konieczna jest analiza składu chemicznego i biologicznego tych spośród nich, które mają zostać dopuszczone do użycia jako użyźniacze gleb.

#### CHARAKTERYSTYKA OSADÓW ŚCIEKOWYCH

Osady ściekowe stanowią zawiesinę organiczno-mineralną, w której faza płynna jest tworzona przez wodę wraz z rozpuszczonymi w niej substancjami, fazę stałą tworzą natomiast cząstki substancji nierozpuszczalnych i mikroorganizmy (Podedworna i Umiejewska 2008). Właściwości fizyczne, skład chemiczny oraz stan sanitarny osadów są determinowane głównie przez rodzaj oczyszczanych ścieków oraz przez zastosowane procesy obróbki tych odpadów.

Podczas procesu oczyszczania ścieków mogą powstawać trzy rodzaje osadów o różnych właściwościach (Fytili i Zabaniotou 2008, Henze i in. 2002):

- Osady wstępne – powstające w wyniku sedymentacji łatwo opadających zawiesin organicznych i mineralnych. Są one zatrzymywane w komorach osadowych osadników wstępnych.
- Osady wtórne – powstające w osadnikach wtórnych po procesie biologicznego oczyszczania. W układach przepływowych z osadem czynnym osad wtórny dzieli się na osad recyrkulowany, który jest zawracany do reaktora biologicznego w celu utrzymania w nim stałego poziomu suchej masy oraz osad nadmierny, powstający przez przyrost biomasy, usuwany z układu oczyszczania i poddawany procesom unieszkodliwiania i utylizacji.
- Osady po chemicznym oczyszczeniu – powstające podczas chemicznego strącania.

Osady ściekowe, w zależności od przygotowania i właściwości, stanowią odpad do składowania lub produkt do przyrodniczego wykorzystania. Z uwagi na fakt, że osady pochodzące z biologicznego oczyszczania obfitują w substancje organiczne, azot, fosfor, wapń, magnez, siarkę i mikroelementy niezbędne do wzrostu roślin oraz pozytywnie wpływają na właściwości biologiczne gleby (Frąc 2012, Kazanowska i Szaciło 2012, Siuta 2001), mogą zostać wykorzystane do nawożenia lub rekultywacji gruntów. Przyrodnicze zastosowanie osadów ściekowych może polegać na: nawożeniu gleb i roślin, melioracyjnym użyźnianiu gleb, rekultywacji powierzchni bezglebowych, biologicznym, roślinnym utrwalaniu powierzchni pyłących i rozmywanych przez wody opadowe oraz produkcji kompostu i preparatów nawozowych (Siuta 2001). Osady przeznaczone do wykorzystania przyrodniczego muszą zostać odpowiednio przygotowane w procesach stabilizacji i higienizacji, do których zaliczyć można pasteryzowanie, wapnowanie i radiację. Celem tych zabiegów jest usunięcie toksycznych związków i organizmów chorobotwórczych, mogących negatywnie wpłynąć na środowisko przyrodnicze (Jezińska-Tys i in. 2010). Proces obróbki osadów jest zabiegiem skomplikowanym technologicznie, wieloetapowym, w którym następuje wzajemne przemieszczanie fazy stałej i ciekłej, mające na celu ich oddzielenie, a następnie odprowadzenie fazy ciekłej z osadu (Werle i Wilk 2010).

Proces przygotowania osadów do ich przyrodniczego wykorzystania składa się z kilku etapów, do których zalicza się obróbkę wstępną i końcową. Obróbka wstępna składa się natomiast z kilku faz, obejmujących:

- kondycjonowanie, doprowadzające do zmian w strukturze osadu oraz powierzchni cząstek stałych, co skutkuje zwiększeniem rozmiarów cząstek i zmniejszeniem sił wiążących cząstki z wodą,
- zagęszczanie osadów, które może być wykonane metodą grawitacyjną, mechaniczną lub flotacyjną,

- stabilizację osadów, z wykorzystaniem różnych metod (tlenowej, beztlenowej, psychrofilnej lub termofilnej). Osad stabilny charakteryzuje się niską zawartością substancji organicznych podatnych na rozkład biologiczny, niską efektywnością oddychania, nie jest uciążliwy zapachowo i dobrze się odwadnia,
- uzdatnianie, polegające na usunięciu z osadów zanieczyszczeń toksycznych, do których należą m.in. metale ciężkie, dioksyny, furany i pestycydy (Oleszczuk i in. 2012).

#### EKOTOKSYCZNOŚĆ OSADÓW ŚCIEKOWYCH – CZYNNIKI OGRANICZAJĄCE PRZYRODNICZE WYKORZYSTANIE OSADÓW

Osady ściekowe mogą zawierać metale ciężkie, przy czym ich ilość i skład zależy od jakości ścieków poddawanych oczyszczaniu. Znaczny udział ścieków przemysłu metalurgicznego czy chemicznego w stosunku do ścieków komunalnych powoduje wzrost zawartości metali ciężkich w osadach. Obecność metali ciężkich, mających zdolność do kumulowania w organizmach żywych, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych, jest jednym z czynników ograniczających wykorzystanie przyrodnicze i rolnicze osadów. Dopuszczalna zawartość metali ciężkich w osadach przeznaczonych do rolniczego wykorzystania została przedstawiona w tabeli 1. Do najbardziej toksycznych dla ludzi i zwierząt metali należą kadm, chrom, nikiel, ołów i rtęć. Wszystkie te metale, poza niklem mają dużą zdolność do bioakumulacji. Poza tym osady zawierają również inne pierwiastki, takie jak: cynk, miedź, kobalt, bor i molibden. Są to mikroelementy naturalnie występujące w przyrodzie, niezbędne do prawidłowego rozwoju roślin, jednakże zbyt duże ich stężenie w glebie może negatywnie oddziaływać na życie biologiczne (Gondek i in. 2010, Wyszowska i in. 2007).

Do kolejnej grupy związków szkodliwych, występujących w osadach, należą związki chemiczne z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), chlorowcopochodne związków organicznych (AOX), polichlorowane bifenyly (PCB), polichlorowanediobenzodioksyny (PCDD) – dioksyny oraz polichlorowane dibenzenofurany (PCDF) – furany (Oleszczuk 2007).

Kolejnym czynnikiem, który ogranicza rolnicze wykorzystanie osadów ściekowych, jest zawartość biologicznych substancji szkodliwych, w tym chorobotwórczych bakterii i wirusów oraz jaj pasożytów przewodu pokarmowego. Większość chorobotwórczych bakterii czy wirusów obecnych w środowisku zachowuje stan wirulencji, czyli zjadliwości przez długi okres czasu (Stroczyńska-Sikorska i in. 2003). W zależności od rodzaju, gatunku, a także od formy występowania patogeny mogą zachowywać swoje zdolności inwazyjne od kilku do kilkunastu miesięcy. Najbardziej odpornymi organizmami na zabiegi higienizacji osadów są

pierwotniaki oraz tasiemce, które zachowują inwazyjność około 12 miesięcy, szczególnie jednak trwale są jaja nicieni pasożytniczych (*Ascaris* sp., *Trichuris* sp., *Toxocara* sp.), aktywne nawet do kilkunastu lat (Zamorska 2007). Na czas przetrwania patogenów w środowisku wpływają: rodzaj i pH gleby oraz warunki środowiskowe, takie jak: temperatura, wilgotność i nasłonecznienie. W ostatnim czasie pojawiają się również doniesienia dotyczące występowania grzybów patogenicznych i toksynotwórczych, które mogą zasiedlać osady ściekowe (Frąc 2012). Ze względu na ograniczenia w zagospodarowaniu osadów ściekowych, wynikające ze składu i właściwości tych odpadów, przed użyciem muszą zostać odpowiednio przygotowane. Ponadto, powinny spełniać szereg wymogów jakościowych oraz mieć odpowiednią formę do ich składowania.

**Tabela 1.** Dopuszczalna zawartość metali ciężkich, w  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  s.m., w osadach przeznaczonych do rolniczego i nierolniczego wykorzystania, według Rozporządzenia Ministra Środowiska z 1 sierpnia 2002  
**Table 1.** Permissible content of heavy metals ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dry weight) in sludge intended for agricultural and non-agricultural use, according to the Decree of the Minister of the Environment of 1 August 2002

Sposób wykorzystania osadów ściekowych – The use of sewage sludge			
Metal Metal	Rekultywacja gruntów nierolniczych Recultivation of non-agricultural land	Nawożenie i rekultywacja gruntów rolniczych Fertilization and recultivation of agricultural land	Produkcja kompostu, roślinne utrwalanie gruntów Compost and plants production, consolidation of land
Chrom Chrome	1000	500	2500
Cynk Zinc	3500	2500	5000
Kadm Cadmium	25	10	50
Miedź Cooper	1200	800	2000
Nikiel Nickel	200	100	500
Ołów Lead	1000	1000	1500
Rtęć Mercury	10	10	25

Wszystkie te zagrożenia skłaniają do poszukiwania metod monitorowania osadów ściekowych pod kątem ekotoksykologicznym i szybkiej oceny ich przydatności rolniczej. Jedną z metod, która w ostatnich latach coraz częściej wykorzystywana jest w tego typu badaniach monitoringowych stanowi ocena profilu metabolicznego środowiska, w tym odpadów (Frąc 2012). Zmiany różnorodności funkcjonalnej mikroorganizmów zasiedlających próbki środowiskowe wykorzystywane są do szacowania bioróżnorodności ekosystemów. Przyjmuje się, że zmniejszenie różnorodności funkcjonalnej czy też liczby grup funkcjonalnych w danym zespole lub ekosystemie, dowodzi zaburzenia jego funkcji. W ocenie różnorodności funkcjonalnej konieczne jest określenie grup funkcjonalnych, które mają podobny wpływ na dany proces w ekosystemie lub charakteryzują się podobną odpowiedzią na warunki środowiskowe (Hooper i in. 2005). Zmiany różnorodności funkcjonalnej mogą wynikać również z zanieczyszczeń, wywołujących bezpośrednie toksyczne efekty zmniejszające szanse przeżycia organizmu lub prowadzące do jego śmierci, jak również mogą zmieniać zależności między poszczególnymi gatunkami występującymi w danym środowisku (Van Straalen i in. 2005).

#### CHARAKTERYSTYKA SYSTEMU BIOLOG

System BIOLOG<sup>®</sup> służy do szybkiej identyfikacji mikroorganizmów, wykorzystując zasadę „metabolicznego odcisku palca” (ang. *metabolic fingerprint*). Różne gatunki bakterii czy grzybów, w wyniku asymilacji prostych lub złożonych substratów węglowych, charakteryzują się specyficznym profilem metabolicznym, który może być wykorzystywany podczas ich identyfikacji. Zwiększona aktywność metaboliczna, w obecności wykorzystywanego źródła węgla, jest wynikiem wysokiej aktywności enzymatycznej dehydrogenazy, której wykrywanie polega na redukcji bezbarwnego fioletu tetrazoliowego do zabarwionego formazanu. Aktywność dehydrogenaz jest ściśle powiązana z aktywnością fizjologiczną mikroorganizmów, dlatego też użycie jej jako wskaźnika oceny aktywności mikrobiologicznej jest uzasadnione (Wolińska i Stępniewska 2012). Pomimo faktu, że idea identyfikacji mikroorganizmów za pomocą oceny ich właściwości biochemicznych nie jest nowa, to wydaje się, że opracowany system Biolog uzyskuje przewagę nad klasycznymi metodami ze względu na swoje cechy i zalety. Przed wszystkim test jest przeprowadzany w standaryzowanym zminiaturyzowanym układzie, co umożliwia jednoczesne testowanie kilkudziesięciu (95 lub 31) a nawet kilkuset (PM – *phenotype microarray plates*) źródeł węgla. Dokładna i jasna standaryzacja jest kolejną zaletą metody, gdyż substraty węglowe znajdują się w studzienkach w formie zliofilizowanej, co umożliwia bezpośrednią inokulację zawiesiną mikroorganizmów lub próbki środowiskowej, jak gleba, ścieki czy osady. Ponadto, identyfikacja mikroorganizmów następuje w oparciu o obiektyw-

ne komputerowe metody numeryczne, a otrzymane wyniki są porównywane z bazami danych, dzięki czemu analiza uzyskanych wyników jest szybka i prosta (Garland i Mills, 1991). Zastosowanie systemu Biolog daje możliwość charakterystyki metabolicznej mikroorganizmów w próbkach środowiskowych, tj. glebie, ściekach, wodzie, osadach, masie fermentacyjnej oraz pulpie pofermentacyjnej, ze względu na ilościową ocenę zdolności wykorzystywania różnych substratów węglowych (węglowodanów, kwasów karboksylowych i ketonowych, aminokwasów, amin i amidów, polimerów) (Floch i in. 2011, Frąc 2012).

Do badań próbek środowiskowych opracowano specjalny typ płytek EcoPlate<sup>®</sup>, w których uwzględnionych jest 31 różnych źródeł węgla, z czego każde w trzech powtórzeniach (ma to na celu przeprowadzenie analiz statystycznych) (Insam 1997). Sposób rozmieszczenia substratów na płytce Ecoplate przedstawia tabela 2. Podczas zaszczepienia płytek Biolog EcoPlate<sup>®</sup> (rys. 1) mieszanymi kulturami mikroorganizmów i pomiaru metabolicznego fingerprintingu uzyskuje się dane o całej społeczności mikroorganizmów, tzw. funkcjonalne zróżnicowanie na poziomie zespołów mikroorganizmów (ang. CLPP, Community-Level Physiological Profiles) (Frąc i in. 2012). Metoda CLPP jest często stosowana do określania wpływu różnych czynników środowiskowych na mikrobiologiczny stan gleby, ścieków czy wody. Jednak, jak opisuje Garland (1996), metoda ta ma istotną wadę. Podczas wzrostu mikroorganizmów zachodzi zjawisko współzawodnictwa o dostępne w studzience płytki źródło węgla, co może skutkować błędną analizą uzyskanych danych. Pomimo tego, ilość informacji jaką można uzyskać z analizy jednej płytki jest na tyle duża, że metoda ta znajduje coraz więcej nowych zastosowań w badaniach środowiskowych. Porównując metodę identyfikacji mikroorganizmów z zastosowaniem płytek Biolog EcoPlate do analizy składu bakteryjnych i grzybowych fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (ang. PLFA, phospholipid fatty acid) izolowanych bezpośrednio z próbki środowiskowej okazuje się, że metoda Biolog jest bardziej czuła i wrażliwa na zmiany środowiskowe (Firestone i in. 1998), w tym takich parametrów, jak: temperatura czy wilgotność.

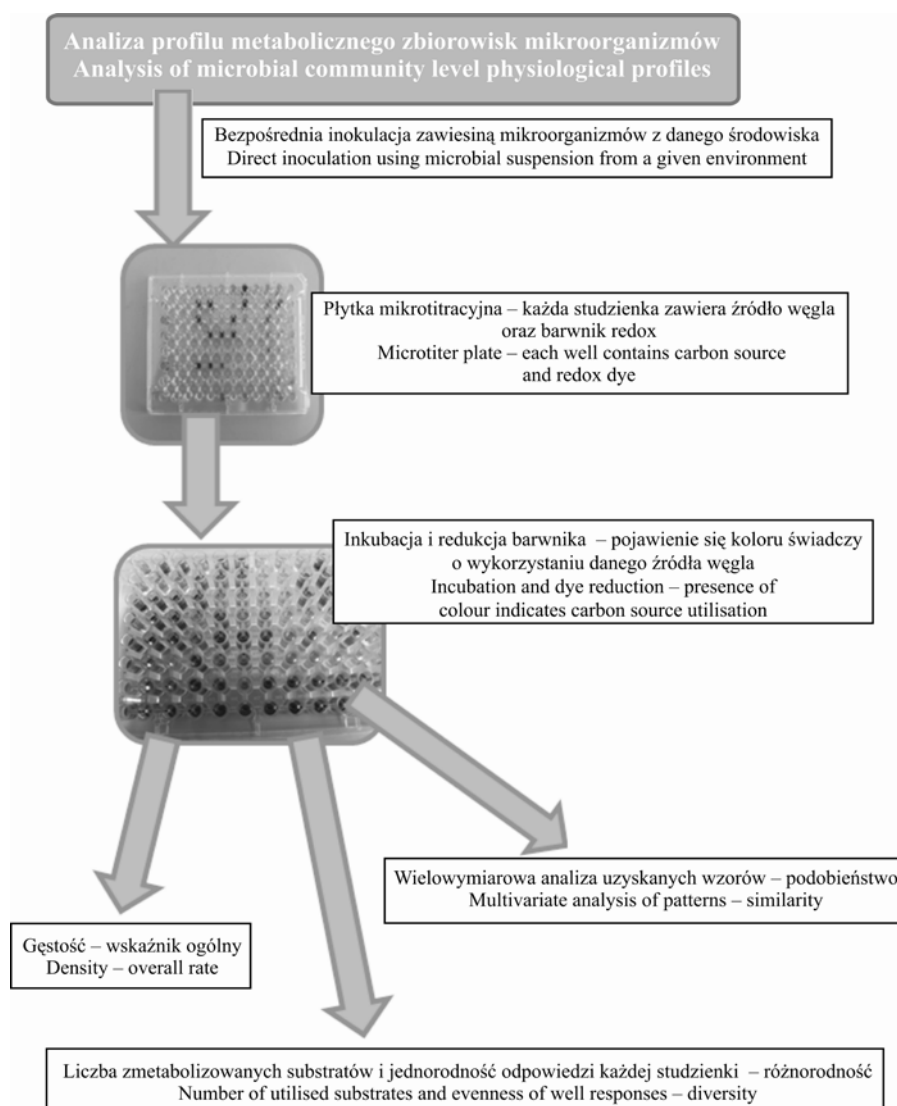
Zastosowanie systemu Biolog EcoPlate<sup>®</sup> w badaniach ekotoksykologicznych jest uzasadnione wrażliwością mikroorganizmów na warunki środowiskowe i zanieczyszczenia. Mikroorganizmy bardzo szybko reagują na niekorzystne zmiany w środowisku, dzięki czemu pełnią rolę bioindykatorów jakości danego środowiska. Wykorzystanie biologicznych i biochemicznych parametrów do oceny stanu ekologicznego środowiska dostarcza precyzyjnych informacji o procesach, w których uczestniczą mikroorganizmy. W przeciwieństwie do właściwości fizykochemicznych, które zmieniają się bardzo wolno, właściwości biologiczne szybko reagują i są czułe nawet na niewielkie zmiany środowiskowe. Z ekotoksykologicznego punktu widzenia niezwykle istotne są więc badania nad populacjami mikroorganizmów bytujących w danym materiale (gleba, woda, osady, ścieki, masa fermenta-

**Tabela 2.** Rozmieszczenie substratów węglowych na płytce Biolog Ecoplate®  
**Table 2.** Carbon sources in Ecoplate®

A1 Woda Water	A2 β-acetylo- D-glukozyl- β-Methyl- D-Glucoside	A3 γ-lakton kwasu D- galaktanowego D-Galactonic Acid-γ-Lactone	A4 L-arginina L-Arginine	A5 Woda Water	A6 β-acetylo- D-glukozyl β-Methyl- D-Glucoside	A7 γ-lakton kwasu D-galaktano- wego D-Galactonic Acid-γ-Lactone	A8 L-arginina L-Arginine	A9 Woda Water	A10 β-acetylo- D-glukozyl β-Methyl- D-Glucoside	A11 γ-lakton kwasu D-galaktano- wego D-Galactonic Acid-γ-Lactone	A12 L-arginina L-Arginine
B1 Progesteron metylu Pyrnic Acid Methyl Ester	B2 D-ksyloza D-Xylose	B3 Kwas D- galaktanowy D-Galacturonic Acid	B4 L-asparagina L-Asparagine	B5 Progesteron metylu Pyrnic Acid Methyl Ester	B6 D-ksyloza D-Xylose	B7 Kwas D-galakturo- nowy D-Galacturonic Acid	B8 L-asparagina L-Asparagine	B9 Progesteron metylu Pyrnic Acid Methyl Ester	B10 D-ksyloza D-Xylose	B11 Kwas D-galakturo- nowy D-Galacturonic Acid	B12 L-asparagina L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 Erytrytol i-Erythritol	C3 Kwas 2-hydroksy- benzoesowy 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-fenylalanina L-Phenylalanine	C5 Tween 40	C6 Erytrytol i-Erythritol	C7 Kwas 2-hydro- ksybenzoesowy 2-Hydroxy Benzoic Acid	C8 L-fenylalanina L-Phenylalanine	C9 Tween 40	C10 Erytrytol i-Erythritol	C11 Kwas 2-hydroksy- benzoesowy 2-Hydroxy Benzoic Acid	C12 L-fenylalanina L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-mannitol D-Mannitol	D3 Kwas 4-hydroksy- benzoesowy 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-seryna L-Serine	D5 Tween 80	D6 D-mannitol D-Mannitol	D7 Kwas 4-hydroksyben- zoesowy 4-Hydroxy Benzoic Acid	D8 L-seryna L-Serine	D9 Tween 80	D10 D-mannitol D-Mannitol	D11 Kwas 4- hydroksybenzoe- sowy 4-Hydroxy Benzoic Acid	D12 L-seryna L-Serine
E1 α-cyklo- dekstryna α-Cyelo- dextrin	E2 N-acetylo-D- glukozamina N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 Kwas γ- hydroksy- masłowy γ-Hydroxy- xybutyric Acid	E4 L-treonina L-Threonine	E5 α-cyklo- dekstryna α-Cyelo-dextrin	E6 N-acetylo- D-glukozamina N-Acetyl- D-Glucosamine	E7 Kwas γ- hydroksy- masłowy γ-Hydroxy- xybutyric Acid	E8 L-treonina L-Threonine	E9 α-cyklo- dekstryna α-Cyelo-dextrin	E10 N-acetylo- D-glukozamina N-Acetyl- D-Glucosamine	E11 Kwas γ-hydroksy- masłowy γ-Hydroxy- xybutyric Acid	E12 L-treonina L-Threonine
F1 Glikogen Glycogen	F2 Kwas D-glukoza- minowy D-Glucosaminic Acid	F3 Kwas itaonowy Itaconic Acid	F4 Kwas glicylo- L-glutaminowy Glycyl-L- Glutamic Acid	F5 Glikogen Glycogen	F6 Kwas D-glukoza- minowy D-Glucosaminic Acid	F7 Kwas itaonowy Itaconic Acid	F8 Kwas glicylo L-glutaminowy Glycyl- L-Glutamic Acid	F9 Glikogen Glycogen	F10 Kwas D-glukoza- minowy D-Glucosaminic Acid	F11 Kwas itaonowy Itaconic Acid	F12 Kwas glicylo L-glutaminowy Glycyl- L-Glutamic Acid
G1 D-celobioza D-Cellobiose	G2 Fosforan I-glukozy Glucose- 1-Phosphate	G3 Kwas α-oksomasłowy α-Ketobutyric Acid	G4 Fenyloty- loamina Phenylethyl- tylamine	G5 D-celobioza D-Cellobiose	G6 Fosforan I-glukozy Glucose- 1-Phosphate	G7 Kwas α-oksomasłowy α-Ketobutyric Acid	G8 Fenyloty- loamina Phenylethyl- tylamine	G9 D-celobioza D-Cellobiose	G10 Fosforan I-glukozy Glucose- 1-Phosphate	G11 Kwas α-oksomasłowy α-Ketobutyric Acid	G12 Fenyloty- loamina Phenylethyl- tylamine
H1 α-D-laktaza α-D-Lactase	H2 Fosforan D, L-glicerolu D, L-α-Glycerol Phosphate	H3 Kwas D-jabłkowy D-Malic Acid	H4 Putrescyna Putrescine	H5 α-D-laktaza α-D-Lactase	H6 Fosforan D, L-α-glicerolu D, L-α-Glycerol Phosphate	H7 Kwas D-jabłkowy D-Malic Acid	H8 Putrescyna Putrescine	H9 α-D-laktaza α-D-Lactase	H10 Fosforan D, L-glicerolu D, L-α-Glycerol Phosphate	H11 Kwas D-jabłkowy D-Malic Acid	H12 Putrescyna Putrescine



cyjna), gdyż to one zapewniają równowagę tych środowisk oraz przeciwdziałają zaburzeniu tej homeostazy (Cycoń i Piotrowska-Seget 2012). Ponadto, mikroorganizmy pełnią istotną rolę w szeregu procesów biologicznych, związanych z obiegiem pierwiastków w ekosystemie oraz rozkładem materii organicznej.



**Rys. 1.** Analiza profilu katabolicznego zbiorowisk mikroorganizmów (Frąc 2012)

**Fig. 1.** Analysis of microbial community catabolic profiles (Frąc 2012)

Ocena populacji mikroorganizmów całego ekosystemu jest niezwykle ważna, gdyż w ten sposób można uzyskać najbardziej prawdopodobne odzwierciedlenie stanu środowiska naturalnego. Analiza pojedynczych szczepów czy gatunków mikroorganizmów w kontekście badań ekotoksykologicznych jest mniej istotna. Aktywność enzymatyczna mikroorganizmów populacji ściśle koreluje z jej składem (Teng i in. 2008). Zmiany w aktywności enzymatycznej mogą być wskaźnikiem zachwiania równowagi w populacji mikroorganizmów zachodzących pod wpływem różnych czynników. W pełni uzasadnione są więc badania związane z charakterystyką populacji mikroorganizmów w badanych próbkach środowiskowych.

#### PODSUMOWANIE

Pomimo coraz szerszego wykorzystania odpadów, w tym osadów ściekowych, do celów rolniczych ilość niezagospodarowanych odpadów pozostaje wciąż poważnym problemem dla środowiska przyrodniczego. Ponadto, pojawiają się nowe typy odpadów, powstające w biogazowniach pulpy pofermentacyjnej, które muszą zostać zagospodarowane w sposób przyjazny środowisku. Należy mieć na uwadze, że odpady wprowadzane do środowiska mogą wpływać na wiele procesów przebiegających w glebie oraz na jakość i żyzność ekosystemów. Istnieje wiele technik i metod wykorzystywanych w badaniach monitoringowych środowiska, jednak ciągle pojawiające się zagrożenia ze strony różnego typu odpadów sprawiają, że konieczne jest poszukiwanie nowych technik, będących często modyfikacjami istniejących schematów. Modyfikacje te prowadzą do zwiększenia efektywności i precyzji metod wykorzystywanych w badaniach nad jakością odpadów organicznych. System profilowania metabolicznego, wykorzystywany głównie do identyfikacji i charakterystyki uzdolnień mikroorganizmów, z powodzeniem stosowany jest coraz częściej w badaniach ekotoksykologicznych do oceny możliwości rolniczego zagospodarowania odpadów. Metoda ta jest czuła na zanieczyszczenia i toksyczne substancje występujące w materiałach odpadowych, a ponadto jest łatwym i szybkim testem do oceny zagrożeń ze strony odpadów organicznych. Dlatego też, szersze wykorzystanie systemu Biolog Ecoplate® wydaje się być obiecującą techniką do oceny jakości ekologicznej organicznych produktów odpadowych.

## PIŚMIENNICTWO

- Cycoń M., Piotrowska-Seget Z., 2012. Response of soil microflora to pesticides. In: Pesticides: evaluation of environmental pollution. (Eds H. S. Rathore, L. M. L. Nollet). CRC Press, Belgium, 233-258.
- Firestone M., Balsler T., Herman D., 1998. Defining soil quality in terms of microbial community structure. *Ann. Rep. Res. Proj.*, UC Berkeley.
- Floch C., Chevremont A.C., Joanico K., Capowiez Y., Criquet S., 2011. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog Ecoplates. *Eur. J. Soil Biol.*, 47, 256-263.
- Frać M., 2012. Ocena mikologiczna osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich oraz jego wpływ na różnorodność funkcjonalną mikroorganizmów glebowych. *Acta Agropysica Monographiae*, 1, 1-142.
- Frać M., Jezierska-Tys S., 2011. Agricultural utilisation of dairy sewage sludge: its effect on enzymatic activity and microorganisms of the soil environment. *Afr. J. Micr. Res.*, 5, 14, 1755-1762.
- Frać M., Oszust K., Lipiec J., 2012. Community Level Physiological Profiles (CLPP), characterization and microbial activity of soil amended with dairy sewage sludge. *Sensors*, 12, 3253-3268.
- Fytılı D., Zabaniotou A., 2008. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods – A review. *Renew. Sust. Energy Rev.*, 12, 116-140.
- Garland J., 1996. Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential c source utilization. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 213-221.
- Garland J., Mills A., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2351-2359.
- Główny Urząd Statystyczny (GUS), 2012. Polska w liczbach, 4-5.
- Gondek K., Filiation-Mazur B., Koncewicz-Baran M., 2010. Content of heavy metals in maize cultivated in soil amended with sewage sludge and its mixtures with peat. *Int. Agrophys.*, 24, 35-42.
- Henze M., Zygadło M., Bartkiewicz B., 2002. Oczyszczanie ścieków: procesy biologiczne i chemiczne. *Wyd. Politechniki Świętokrzyskiej*, 293.
- Hooper D.U., Chapin III F.S., Ewel J.J., Hector A., Inchausti P., Lavorel S., Lawton J.H., Lodge D.M., Loreau M., Naeem S., Schmid B., Setälä H., Symstad A.J., Vandermeer J., Wardle D.A., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol. Monogr.*, 75, 3-35.
- Insam H., 1997. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples. In: *Microbial communities: functional versus structural approaches.* (Eds H. Insam, A. Rangger). Springer-Verlag, Berlin, 259-260.
- Jezierska-Tys S., Frać M., Tys J., 2010. Microbiological hazards resulting from application of dairy sewage sludge: effects on occurrence of pathogenic microorganisms in soil. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 73, 1194-1201.
- Joniec J., Furczak J., Baran S., 2012. The importance of sludge microorganisms in nitrogen transformations in podzolic soil amended with sewage sludge. *Arch. Environ. Protect.*, 38, 1, 35-47.
- Kazanowska J., Szaciło J., 2012. Analiza jakości osadów ściekowych oraz możliwość ich przyrodniczego wykorzystania. *Acta Agrophys.*, 19, 2, 343-353.
- Kelessidis A., Stasinakis A.S., 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manag.*, 32, 1186-1195.

- Kijo-Kleczkowska A., Otwinowski H., Środa K., 2012. Properties and production of sewage sludge in Poland with reference to the methods of neutralizing. *Arch. Waste. Manag. Environ. Protect.*, 14, 4, 59-78.
- Kłapeć T., Cholewa A., 2012. Zagrożenia dla zdrowia związane ze stosowaniem nawozów organicznych i organiczno-mineralnych. *Med. Ogól. Nauk. Zdr*, 18, 2, 131-136.
- Kłapeć T., Stroczyńska-Sikorska M., Galińska E., 2003. Helminologiczne skażenie środowiska – zagrożeniem zdrowia. *Med. Ogól.*, 9, 347-354.
- Oleszczuk P., 2007. Zanieczyszczenia organiczne w glebach użyźnianych osadami ściekowymi. Część I. Przegląd badań. *Chem. Inż. Ekol.*, 14, 65-76.
- Oleszczuk P., 2009. Application of three methods used for the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility for sewage sludge composting. *Biores. Technol.* 100, 413-420.
- Oleszczuk P., Hale S.E., Lehmann J., Cornelissen G., 2012. Activated carbon and biochar amendments decrease pore-water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge. *Biores. Technol.* 111, 84-91.
- Podedworna J., Umiejewska K., 2008. *Technologia osadów ściekowych*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Siuta J., 2001. Gospodarka odpadami w środowisku. *Zesz. Prob. Post. Nauk Roln.*, 477, 275-285.
- Stroczyńska-Sikorska M., Kłapeć T., Galińska E., 2003. Biologiczna ocena nawozów organicznych oraz organiczno-mineralnych przeznaczonych do nawożenia gleb i roślin. *Med Środ.*, 6, 1, 65-68.
- Teng Y., Luo Y.M., Huang Ch.Y., Long J., Li Z.G., Christie P., 2008. Tolerance of grasses to heavy metals and microbial functional diversity in soils contaminated with copper mine tailings. *Pedosphere* 18,3, 363-370.
- Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., Van Gestel C.A.M., 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environ. Pollut.*, 136, 409-417.
- Werle S., Wilk R.K., 2010. A review of methods for the thermal utilization of sewage sludge: The Polish perspective. *Renew. Energy* 35, 1914-1919.
- Wolińska A., Stępniewska Z., 2012. Dehydrogenase activity in the soil environment. *Bioch. Genet. Mol. Biol.*, 14, 183-210.
- Wyszkowska J., Boros E., Kucharski J., 2007. Effect of interactions between nickel and other heavy metals on the soil microbiological properties. *Plant Soil Environ.*, 53, 12, 544-552.
- Zamorska J., 2007. Organizmy patogenne w osadach ściekowych. *Zesz. Nauk. PTIE i PTG Oddz. Rzeszów*, 9, 91-98.

## APPLICATION OF BIOLOG ECOPLATE® TO MONITOR THE ECOTOXICITY STATUS OF SEWAGE SLUDGE (A REVIEW)

*Agata Gryta, Magdalena Frąc, Karolina Oszust, Nina Bilińska*

Institute of Agrophysics Polish Academy of Sciences  
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
e-mail: m.frac@ipan.lublin.pl

**Abstract.** Increasing amount of sewage sludge requires their reasonable management, whereas a storage might be environmentally hazardous. Due to organic matter and nutrients presence in sludge, they may be used as organic fertilizers. However, beyond the valuable contents, sewage sludge can also contain toxic or dangerous components. Therefore, there is a need to devel-

---

op methods for rapid assessment of sediments ecotoxicity, that will determine their possible applicability in agriculture. The Biolog® Ecoplate enables the metabolic profiles diversity evaluation of microbial populations in environmental samples, which reflects the state of their activity. It is regarded as modern technology, that by means of biological properties allows quick characterization of the ecological status of environmental samples, such as sewage sludge.

**Key words:** sewage sludge, Biolog Ecoplate®, ecotoxicity, metabolic fingerprint, microbial activity, metabolic profile