

WPLYW OLEJU NAPĘDOWEGO NA LICZEBNOŚĆ WYBRANYCH GRUP MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

INFLUENCE OF DIESEL FUEL ON THE NUMBER OF SELECTED SOIL MICROORGANISMS GROUP

Małgorzata Hawrot-Paw

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Słowa kluczowe: olej napędowy, gleba, mikroorganizmy

Keywords: diesel oil, soil, microorganisms

STRESZCZENIE

Wprowadzenie. Wśród szeregu ksenobiotyków, które dostają się do środowiska, szczególnie niebezpieczne są substancje ropopochodne. Drobnoustroje uczestnicząc w rozkładzie substancji ropopochodnych, mogą być dobrym wskaźnikiem efektywności procesu biodegradacji.

Cel badań. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu zanieczyszczenia gleby olejem napędowym na zmiany liczebności podstawowych grup taksonomicznych mikroorganizmów, w tym bakterii, promieniowców i grzybów.

Material i metoda. Badania prowadzono w dwóch glebach: piasku gliniastym i glinie piaszczystej, które poza uziarnieniem różniły się również zawartością materii organicznej. Zastosowano dwa poziomy skażenia olejem napędowym: 5% i 15% w/w na s.m. gleby. Próby gleby nieskażone paliwem pozostawiono jako obiekty kontrolne doświadczenia. Liczebność mikroorganizmów oceniano metodą automatyczną poprzez pomiar impedancji w podłożach hodowlanych z zastosowaniem analizatora BacTrac 4100.

Wyniki. Najliczniejszą grupą mikroorganizmów w badanych glebach były bakterie, znacznie mniej było grzybów i promieniowców. Stwierdzono, że istotny wpływ na przesunięcia w składzie ilościowym mikrobiocenoz miała zarówno dawka skażenia, jak i rodzaj gleby. Olej napędowy w stężeniu 5% stymulował liczebność bakterii i grzybów w glebie piaszczystej. Wzrost koncentracji zanieczyszczenia na ogół wpływał niekorzystnie na mikroorganizmy, zwłaszcza w glebie gliniastej. Skażenie gleb olejem napędowym powodowało obniżenie współczynnika stopnia rozwoju mikroorganizmów (SR) - w ponad 55% w glebie piaszczystej i około 39% w glebie gliniastej, a więc miało wpływ na ich żywność. Redukcja współczynnika SR była skorelowana ze wzrostem dawki zanieczyszczenia.

Wnioski. Olej napędowy narusza równowagę biologiczną gleby i w zależności od dawki paliwa stymuluje lub redukuje liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów. Obecność paliwa powoduje obniżenie wartości wskaźnika urodzajności gleb, proporcjonalnie do wzrostu poziomowi skażenia.

ABSTRACT

Background. Among a range of xenobiotics, that are introduced into the environment, especially dangerous are petroleum substances. Microorganisms participating in their decomposition, may be a good effectiveness indicator of biodegradation process.

Objective. The aim of this study was to determine the influence of soil contamination with diesel oil for changes in number of basic taxonomic groups of microorganisms, including bacteria, actinomycetes and fungi.

Material and method. The study was carried out in two soils, loamy sand and sandy clay, which, apart from granulometric composition also differed in organic matter content. Two levels of diesel contamination was used: 5% and 15% w/w of soil d.m. The soil samples, not contaminated with diesel oil, was left as a experience control objects. The number of microorganisms were evaluated by automated method with measuring impedance in media, using the analyzer BacTrac 4100.

Results. In the studied soils the largest group of microorganisms were bacteria, significantly less was fungi and actinomycetes. Based on the results of research it was found a significant effect on the quantitative composition of microflora was both contamination dose and type of soil. Diesel fuel at a concentration of 5% stimulated the number of bacteria and fungi in sandy soil. In general, increase in concentration of pollutants adversely affect the microorganisms, especially in loamy

Adres do korespondencji: Małgorzata Hawrot-Paw, Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, 71-434 Szczecin, ul. Słowackiego 17, tel. +48 91 44 96 423, e-mail: Małgorzata.Hawrot-Paw@zut.edu.pl

soils. Soil contamination with diesel oil resulted in a reduction in the degree of microbial growth rate (55% in loamy sand and 39% in sandy clay), and thus have an impact on their fertility. The reduction of SR index was correlated with increasing dose of pollutants.

Conclusions. Diesel oil affect the biological balance of soil and stimulates or reduces the number of different groups of microorganisms, depending on the amount of fuel. The presence of fuel decrease index of soil fertility, proportion to increase in the level of contamination.

WSTĘP

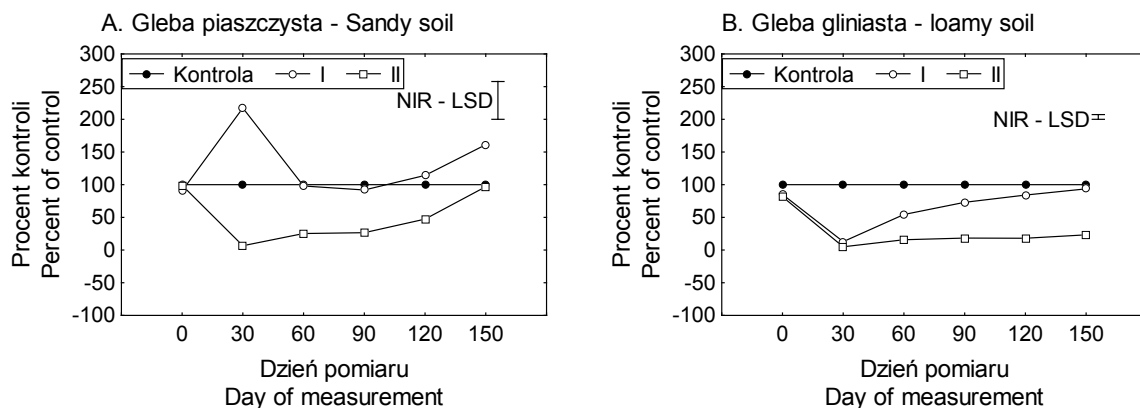
Wśród szeregu ksenobiotyków, które dostają się do środowiska, szczególnie niebezpieczne są substancje ropopochodne, zwłaszcza w sytuacji stale rosnącego popytu na paliwa [23]. Zagrożenia pojawiają się na etapie ich produkcji, przetwarzania i transportu [24]. Zanieczyszczenie środowiska wpływa niekorzystnie na właściwości fizyko-chemiczne gleb i znacznie ogranicza ich ochronną funkcję, zakłóca aktywność metaboliczną, zmniejsza żyzność oraz negatywnie wpływa na produkcję roślinną [12]. Substancje ropopochodne obecne w środowisku wpływają również na liczebność i aktywność mikroflory glebowej [2, 25]. Z uwagi na relatywnie krótki czas reakcji mikroorganizmów na pojawienie się w glebie zanieczyszczeń, dość powszechnie wykorzystywane są one jako wskaźniki jej zdrowia, dające możliwość oceny intensywności i rodzaju oraz czasu oddziaływania zanieczyszczeń [4, 9, 14]. Bakterie, grzyby i promieniowce, uczestnicząc w rozkładzie substancji ropopochodnych, mogą być również dobrym wskaźnikiem efektywności procesu biodegradacji [3, 7, 19].

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu oleju napędowego, zastosowanego w dwóch różnych dawkach (5% i 15% w/w na s.m. gleby) na zmiany liczebności wybranych mikroorganizmów w glebach zróżnicowanych pod względem składu granulometrycznego oraz zawartości materii organicznej.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono w glebie piaszczystej (piasek gliniasty lekki pylasty) oraz gliniastej (głina lekka pylasta). Przed rozpoczęciem doświadczenia gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i pozostawiono na 7 dni w temperaturze pokojowej w celu uaktywnienia mikroflory glebowej i ustalenia się równowagi biologicznej, a następnie podzielono na dwie części, z których jedna została skażona olejem napędowym w stężeniu 5% (obiekt I), a druga 15% wagowych (obiekt II). Kombinację kontrolną stanowiła gleba nieskażona (K). Doświadczenie prowadzono przez okres 5 miesięcy. Co 30 dni pobierano próbki glebowe do analiz mikrobiologicznych (określano liczebność bakterii, promieniowców, grzybów), które wykonano w oparciu o automatyczne metody polegające na pomiarze impedancji, przy wykorzystaniu analizatora BacTrac 4100 według metodyki opracowanej przez Nowaka i Hawrot [21]. Liczebność bakterii oznaczano na podłożu z wyciągiem glebowym wg *Bunta i Roviry* [5], liczebność grzybów na pożywce Martina [16] z różem bengalskim, liczebność promieniowców na pożywce *Cyganova i Žukova* [8]. Na podstawie otrzymanych wyników określono również współczynnik stopnia rozwoju mikroorganizmów- SR, który może być ważnym wskaźnikiem monitorowania jakości gleby [11].

Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki poddano analizie statystycznej stosując wieloczynnikową analizę wariancji oraz test *Tukeya*.



Ryc. 1. Wpływ skażenia gleby olejem napędowym na liczebność bakterii wyrażoną jako procent kontroli
Effect of soil contamination with diesel oil on the numbers of bacteria presented as percent of control

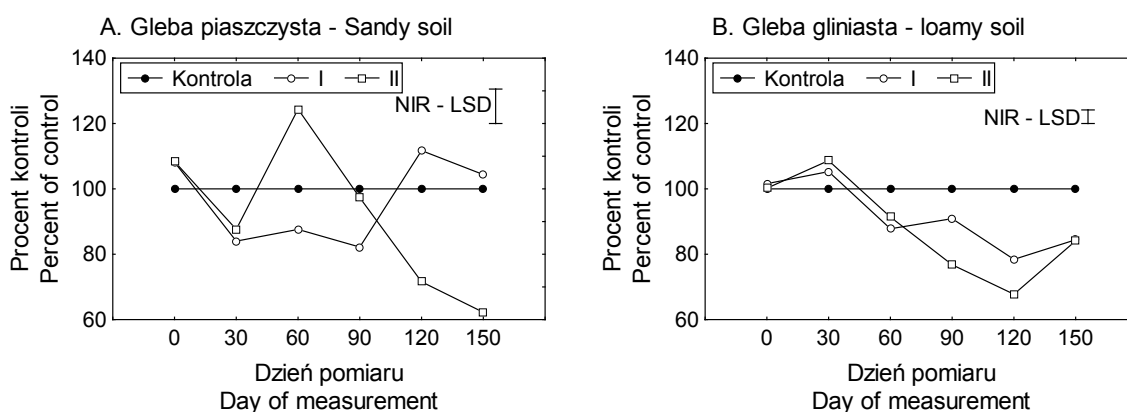
WYNIKI I DISKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że najliczniejszą grupą mikroorganizmów w badanych glebach były bakterie, znacznie mniej było grzybów i promieniowców. Materia organiczna posiada zdolność do adsorbowania zanieczyszczeń, zmniejszając tym samym ich koncentrację [10] zatem wyższa jej zawartość, w porównaniu z glebą piaszczystą, powinna stanowić czynnik ograniczający negatywne oddziaływanie oleju napędowego na mikroflorę. W prezentowanych badaniach nie odnotowano jednak tej zależności - na ogół, niezależnie od badanej grupy mikroorganizmów oraz dawki skażenia, w glebie gliniastej obserwowano redukcję lub inhibicję liczebności.

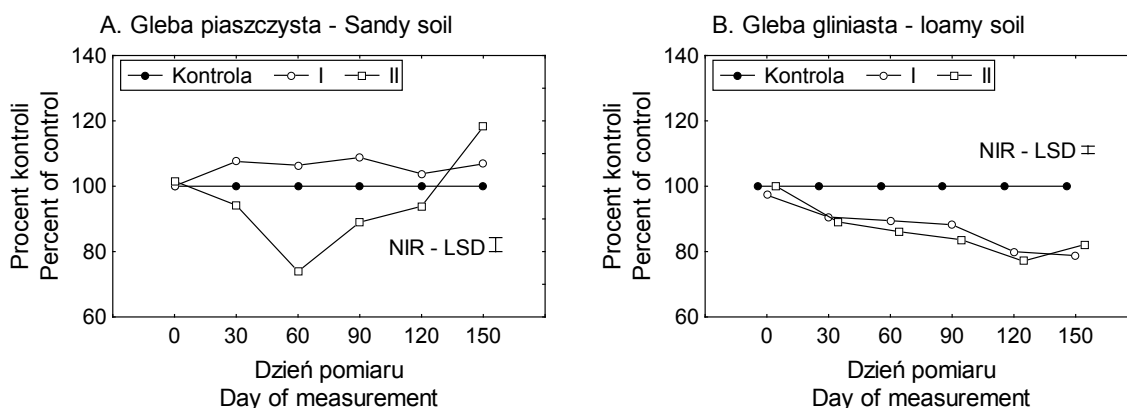
Liczba bakterii była skorelowana z zastosowaną dawką skażenia. Stymulację liczebności odnotowano w glebie piaszczystej skażonej 5% dawką oleju napędowego (Ryc. 1A), podobnie jak *Michalcewicz* [17], *Nowak* i wsp. [22] oraz *Zabłocka-Godlewska* i *Mrozowska* [28]. Zupełnie odmienną sytuację zaobserwowano w glebie gliniastej (Ryc. 1B). Liczba bakterii w stosunku do obiektu kontrolnego zmniejszyła się o 13-94%. Negatywną reakcję mikroorganizmów obserwowano

również po wprowadzeniu oleju napędowego w stężeniu 15%. W glebie piaszczystej liczba komórek bakterii zmniejszyła się o 23-92%. W trakcie doświadczenia liczebność stopniowo zwiększała się, jednak wzrost powyżej wartości kontrolnych odnotowano dopiero po 150 dniach inkubacji. Według *Zabłockiej-Godlewskiej* i *Mrozowskiej* [28] mikroorganizmy mogą wymagać dłuższego czasu adaptacji do nowego źródła węgla i energii oraz wytworzenia kompleksu enzymatycznego niezbędnego do rozkładu związków ropopochodnych. W badaniach własnych w glebie gliniastej inhibicja (77-95% mniej niż w obiekcie kontrolnym) utrzymywała się przez cały okres inkubacji, natomiast w badaniach *Zabłockiej-Godlewskiej* i *Mrozowskiej* [28], nawet przy stężeniu 25% oleju, obserwowano nadal stymulację.

Olej napędowy nie wywoływał jednoznacznych zmian w liczebności promieniowców, zwłaszcza w odniesieniu do gleby piaszczystej (Ryc. 2A). W zależności od kombinacji badawczej i od terminu pomiaru, obserwowano stymulację lub inhibicję. W glebie gliniastej tylko na początku doświadczenia, niezależnie od dawki zanieczyszczenia, liczebność promieniowców była wyższa w stosunku do obserwowanej w obiekcie kontrolnym (Ryc. 2B). W literaturze można znaleźć in-



Ryc. 2. Wpływ skażenia gleby olejem napędowym na liczebność promieniowców wyrażoną jako procent kontroli
Effect of soil contamination with diesel oil on the numbers of actinomycetes presented as percent of control



Ryc. 3. Wpływ skażenia gleby olejem napędowym na liczebność grzybów wyrażoną jako procent kontroli
Effect of soil contamination with diesel oil on the numbers of fungi presented as percent of control

formacje potwierdzające stymulację [19, 27], inhibicję [17, 28], jak również brak zmian w liczebności promieniowców w obecności substancji ropopochodnych [15].

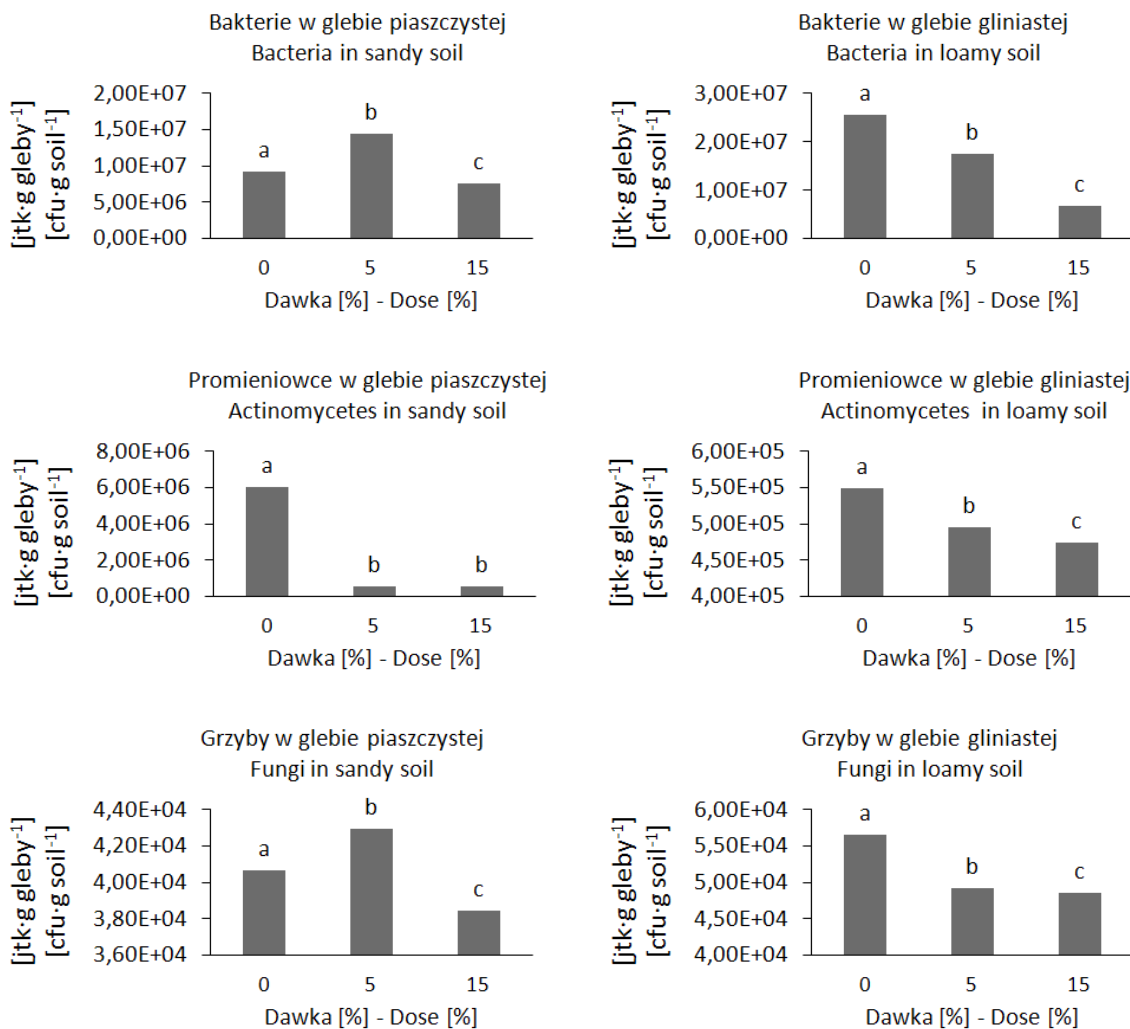
W glebie piaszczystej, do której wprowadzono olej napędowy w stężeniu 5% (Ryc. 3A), obserwowano nieznaczną stymulację wzrostu grzybów (o 4-7% w porównaniu do obiektu kontrolnego), co według *Zabłockiej-Godlewskiej* i *Buczowskiej-Wesołowskiej* [27] wskazuje na to, że olej stanowił dla nich łatwo przyswajalny składnik pokarmowy lub też w zastosowanym stężeniu był dla nich obojętny. Wzrost liczby grzybów w glebie piaszczystej zanieczyszczonej olejem napędowym potwierdzają też badania *Nowaka* i wsp. [22]. W glebie gliniastej, do której wprowadzono olej napędowy w dawce 5% oraz przy stężeniu 15% (w obu glebach) obserwowano jednak wyraźną inhibicję (Ryc. 3B). Dane literaturowe potwierdzają możliwość zarówno wzrostu liczebności grzybów [18] jak i jej redukcji pod wpływem obecnych w glebie produktów ropopochodnych [26, 28]. Stymulację i zahamowanie

rozwoju grzybów w glebie skażonej olejem napędowym w dawce 5% obserwowała również *Michacewicz* [17].

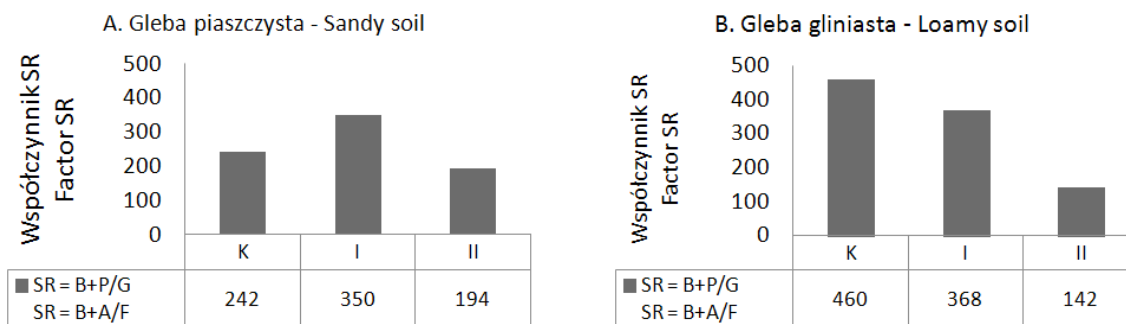
Biorąc pod uwagę średnie wartości z całego okresu inkubacji wzrost dawki skażenia miał w większości przypadków istotny statystycznie wpływ na liczebność badanych grup mikroorganizmów w obu glebach (Ryc. 4).

Obecność oleju napędowego w glebach wpłynęła na zmianę stosunku liczby bakterii i promieniowców do grzybów (Ryc. 5). Według *Mysłkowa* [20] współczynnik SR może być wskaźnikiem urodzajności gleby. W przeprowadzonych badaniach obecność oleju napędowego na ogół obniżała jego wartość. Tylko w glebie piaszczystej i przy stężeniu 5% wielkość współczynnika SR była wyższa w stosunku do obiektu kontrolnego. Współczynnik ten może być również wykorzystywany w ocenie przebiegu procesów biodegradacji, wówczas najbardziej korzystny jest stosunek $B+P/G > 1$ [1, 6].

Na podstawie wyników stwierdzono, że wzrost dawki skażenia obniżył wartość współczynnika o po-



Ryc. 4. Średnia liczebność badanych grup mikroorganizmów (wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie na poziomie $\alpha = 0,05$)
Average number of microbial groups (values marked with different letters differ significantly at $\alpha = 0.05$)



Ryc. 5. Wartość współczynnika SR w glebie piaszczystej (A) i w gliniastej (B)
SR coefficient in sandy (A) and loamy soil (B)

nad 55% w glebie piaszczystej i niemal 39 % w glebie gliniastej.

Obserwowane przesunięcia w składzie ilościowym badanych grup mikroorganizmów mogą wynikać bezpośrednio z wpływu składników wprowadzonego skażenia [26], w tym jego dawki [13], jak również pośrednio poprzez zmianę we właściwościach fizyko-chemicznych gleb wywołanych obecnością oleju napędowego.

WNIOSKI

1. Obecność oleju napędowego w glebie wpływała na jej równowagę biologiczną.
2. 5% dawka oleju napędowego w glebie wpływała stymulująco na wzrost liczby komórek bakterii i grzybów w glebie piaszczystej natomiast wzrost stężenia oleju napędowego w glebie ograniczał liczebność mikroorganizmów, zwłaszcza w glebie gliniastej.
3. Na ogół, pod wpływem oleju napędowego w badanych glebach obserwowano obniżenie wartości wskaźnika ich rodzajności, które było skorelowane ze wzrostem dawki zanieczyszczenia.

PIŚMIENNICTWO

1. *Alexander M.*: Ekologia mikroorganizmów. PWN, Warszawa 1975.
2. *Andreoni V., Cavalca L., Rao M.A., Nocerino G., Bernasconi S., Dell'Amico E., Colombo M., Gianfreda L.*: Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 2004, 57, 401-412.
3. *Bento F.M., Camargo F.A. O., Okeke B.*, 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Biores. Technol.* 2005, 96, 1049-1055.
4. *Blakely J.K., Neher D.A., Spongberg A.L.*: Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Soil Ecol.* 2002, 21, 71-88.
5. *Bunt J. S., Rovira A. D.*: Microbiological studies of some subantarctic soils. *J. Soil Sci.* 1995, 6 (1), 119-128.
6. *Cerniglia C.E.*: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 1992, 3, 351-368.
7. *Chaineau C.H., Yéprémian C., Vidalie J.F., Ducreux J., Ballerini D.*: Bioremediation of a crude oil polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollut.* 2003, 144, 419-440.
8. *Cyganov V.A., Žukov R.A.*: Morfologobiochemiciske osobennosti novovo vida actionomiceta. *Mikrobiologija* 1964, 33(5), 863-869.
9. *Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M.*: Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 2006, 64, 408-414.
10. *El-Tarabily K.A.*: Total microbial activity composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. *Can. J. Microbiol.* 2002, 48, 176-182.
11. *Filip Z.*: International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agric. Ecosys. Environ.* 2002, 88, 169-174.
12. *Gong P., Sun T-H., Beudert G., Hahn H.H.*: Ecological effects of combined organic or inorganic pollution on soil microbial activities. *Water, Air and Soil Pollution* 1996, 96, 133-143.
13. *Hawrot-Paw M., Rylów M.*: Biologiczna aktywność gleby zanieczyszczonej antracenenem. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin, Agric., Aliment., Pisc., Zootech.* 2011, 290 (20), 33-40.
14. *Hayat S., Ahmad I., Azam Z.M., Ahmad A., Inam A., Samiullah S.*: Effect of long-term application of oil refinery waste water on soil health, with special reference to microbial characteristic. *Biores. Technol.* 2002, 84, 159-16.
15. *Marshall T.R., Devinny J.S.*: The microbial ecosystem in petroleum wasteland treatment. *Water Sci. Technol.* 1988, 20, 285-291.
16. *Martin J.P.*: Use of acid rose bengale and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 1950, 6, 215-233
17. *Michalcewicz W.*: Wpływ oleju napędowego do silników Diesla na liczebność bakterii, grzybów, promieniowców oraz biomasę mikroorganizmów glebowych. *Rocz. PZH* 1995, 46 (1), 91-97.

18. *Miłkowska-Jankowska D., Maleszewska J., Łuczak J.*: Przenikanie produktów destylacji ropy naftowej przez glebę i ich wpływ na drobnoustroje w glebie i w wodzie. *Rocz. PZH* 1976, 27, 679-687.
19. *Molina-Barahona L., Rodriguez-Vazquez R., Hernandez-Valezco M., Vega-Jarquín C., Zapata-Perez O., Mendoza-Cantu A., Albores A.*: Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl. Soil Ecol.* 2004, 27, 165-175.
20. *Myśków W.*: Próby wykorzystania wskaźników aktywności mikrobiologicznej do oceny żyzności gleby. *Post. Mikrobiol.* 1981, 20 (3-4), 173-192.
21. *Nowak A., Hawrot M.*: Ocena liczebności mikroorganizmów w glebach skażonych związkami ropopochodnymi przy zastosowaniu analizatora typu BacTrac 4100. *Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby*, Poznań 6-9 września 1998, 223-231.
22. *Nowak A., Nowak J., Hawrot-Paw M., Telesiński A., Błaszczak M., Kłódka D., Przybulewska K., Smolik B., Szymczak J.*: Biodegradation of diesel fuel in soils modified with compost or bentonite and with optimized strains of bacteria. Part II. Changes in microorganisms counts and activity. *Ecol. Chem. Eng.* 2008, 15 (7), 607-622.
23. *Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 2002, 20, 243-248.
24. *Saterback A., Toy R.J., MacMain B.J., Williams M.P., Dorn P.B.*: Ecotoxicology and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000, 19, 2643-2652.
25. *Serrano A., Tejada M., Gallego M., Gonzalez J.L.*: Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 4056-4061.
26. *Wyszkowska J., Kucharski J.*: Correlation between number of microbes and degree of soil contamination by petrol. *Polish J. Environ. Stud.* 2001, 10 (3), 175-181.
27. *Zabłocka-Godlewska E., Buczkowska-Wesołowska K.*: Ocena wpływu wybranych WWA oraz modyfikacji układu na zmiany jakościowo-ilościowe głównych grup mikroorganizmów w glebie piaszczysto-bielicowej. *Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Bioremediacja gruntów”*, Wisła-Bukowa 8-11 grudnia 1998, 59-73.
28. *Zabłocka-Godlewska E., Mrozowska J.*: Wpływ WWA na aktywność mikrobiologiczną gleby w zmodyfikowanych układach modelowych. V *Ogólnopol. Symp. Nauk.-Tech. „Biotechnologia środowiskowa”*, Ustroń-Jaszowiec 10-12 grudnia 1997, 61-72.

Otrzymano: 03.11. 2011

Zaakceptowano do druku: 07.05.2012