

Anna GAŁĄZKA  
Maria KRÓL  
Andrzej PERZYŃSKI

Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa –  
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

## WPŁYW BAKTERII RYZOSFEROWYCH NA ZMIANĘ LICZEBNOŚCI DROBNOUSTROJÓW W RĘDZINIE WAPIENNEJ ŚWIEŻO SKAŻONEJ MIESZANINĄ WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH Z OLEJEM NAPĘDOWYM

W pracy przedstawiono badania wpływu ochronnego szczepów *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* na liczebność mikrobiologiczną w rędzinie wapiennej świeżo skażonej mieszaniną WWA i ON. Po zastosowaniu szczepienia roślin stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby drobnoustrojów glebowych (ogólnej liczby bakterii, promieniowców, bakterii amonifikacyjnych, proteolitycznych, celulolitycznych, rozkładających fosforany oraz kopiotrofów i oligotrofów) oraz statystycznie znaczny spadek ogólnej liczby grzybów. Stwierdzono ponadto stymulujący wpływ oleju napędowego w dawkach 0,1 i 1% na wzrost liczby wymienionych drobnoustrojów.

### 1. Wprowadzenie

Procesy bioremediacji gleb skażonych wielopierścieniowymi węglowodarami aromatycznymi (WWA) oraz olejem napędowym (ON) prowadzone są przez stymulację wzrostu mikroorganizmów autochtonicznych, naturalnie obecnych w skażonym środowisku, bądź też przez wprowadzenie do gleby wyselekcjonowanych mikroorganizmów zdolnych do degradacji WWA [1, 2, 7, 13]. Poprawnie przeprowadzony proces bioaugmentacji wymaga wprowadzenia do gleby mikroorganizmów zdolnych do przetrwania i zaadaptowania się do warunków skażenia oraz wykorzystujących związki organiczne jako jedyne źródło węgla i energii [3, 5, 17]. Skażenie gleb trwałymi zanieczyszczeniami organicznymi (w tym WWA) powoduje drastyczne zmniejszenie liczby autochtonicznych drobnoustrojów glebowych oraz zakłócenie procesów fizjologicznych naturalnie zachodzących w glebie [7, 8, 10, 14, 15].

*Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* to bakterie diazotroficzne wiążące wolny azot, wykorzystujące WWA jako jedyne źródło węgla i energii oraz produkujące biosurfaktanty [7, 11, 12]. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są powszechnie znane w literaturze jako mikroorganizmy efektywnie rozkładające zanieczyszczenia organiczne w procesie kometabolizmu w naturalnym środowisku zarówno wodnym, jak i glebowym [12, 18, 19, 21]. W dostępnej literaturze brakuje danych dotyczących udziału bakterii z rodzaju *Azospirillum spp.* w procesach bioremediacji. Wolno żyjące bakterie wiążące azot, tj. *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri*, zdolne są do tworzenia trwałych asocjacji z korzeniami większości wykorzystywanych w produkcji roślinnej zbóż i traw [11, 12]. Ryzodegradacja jest biologicznym procesem usuwania zanieczyszczeń organicznych z gleby przy udziale mikroorganizmów zdolnych do ich rozkładu w strefie korzeniowej roślin [1, 4, 24]. Wydzieliny korzeniowe roślin, tj. cukry, alkohole, kwasy organiczne, stają się źródłem węgla dla mikroorganizmów glebowych, przez co zwiększają ich aktywność, wzrost i efektywność biodegradacji [1, 2, 24].

Celem podjętych badań było określenie wpływu szczepienia kostrzewy łąkowej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* na zmianę liczebności mikrobiologicznej w rędzinie wapiennej świeżo skażonej antracem, fenantrenem, pirenem, olejem napędowym oraz mieszaniną WWA i ON.

## 2. Materiały i metody badań

**Materiał glebowy.** Glebę (rędzinę wapienną), użytą rolniczo i oddaloną od źródeł emisji zanieczyszczeń, pobrano z poziomu orno-próchniczego (0-30 cm) w Międmierzu koło Kazimierza Dolnego. Chemiczne właściwości gleby przedstawiono w tab. 1.

**Zanieczyszczenie.** Do badań użyto antracenu, fenantrenu i pirenu w dawkach: 100, 500 oraz 1000 mg · kg<sup>-1</sup>s.m. gleby oraz oleju napędowego (Multi Motor Oil Jasol 12 SG/CE 5W/4 pochodzący z Rafinerii Jasło S.A.) w dawkach: 0,1%, 0,5%, 1% w/w (procent wagowo-wagowy) s.m. gleby. Węglowodory oraz olej napędowy dodawano do gleby pojedynczo w poszczególnych dawkach oraz jako mieszaninę 3 WWA i ON o następującym składzie:

- mieszanina 1. – Σ 3WWA antracen, fenantren, piren (100 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i olej napędowy w stężeniu 0,1%,
- mieszanina 2. – Σ 3WWA antracen, fenantren, piren (500 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i olej napędowy w stężeniu 0,5%,
- mieszanina 3. – Σ 3WWA antracen, fenantren, piren (1000 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i olej napędowy w stężeniu 1%.

**Szczepy bakteryjne.** Szczepy bakterii *Azospirillum spp.* (12/6, 15/7, 77Bb1) i *Pseudomonas stutzeri* (5<sub>3</sub>, 5<sub>7</sub>, 40T<sub>4</sub>) pochodziły z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB w Puławach. Bakterie te wyizolowano z endoryzosfery owsa (*Hordeum sativum*), kukurydzy (*Zea mays L.*) oraz trawy (*Elymus arena-*

rius). Metody izolacji, przeszczepiania oraz przechowywania szczepów oraz opis ich podstawowych właściwości zostały przedstawione przez Król [11, 12].

**Rośliny.** Do doświadczeń wybrano roślinę z klasy jednoliściennych – kostrzewę łąkową (*Festuca pratensis* L.).

Tabela 1. Chemiczne właściwości gleby

Procentowy skład granulometryczny [mm]	Rędzina wapienna
1,0-0,1	59
0,1-0,02	23
< 0,02	26
C <sub>org</sub> [%]	2,2
N [%]	0,127
pH <sub>H2O</sub>	6,81
pH <sub>KCl</sub>	6,52
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [mg · 100 g <sup>-1</sup> gleby]	8,7
K <sub>2</sub> O [mg · 100 g <sup>-1</sup> gleby]	16,5
Mg [mg · 100 g <sup>-1</sup> gleby]	4,8
N-NH <sub>4</sub> [mg N · kg <sup>-1</sup> św. m. gleby]	0,96
N-NO <sub>3</sub> [mg N · kg <sup>-1</sup> św. m. gleby]	28,6

Objaśnienia:

% skład granulometryczny [mm] – metoda Casagrande w modyfikacji Prószyńskiego, PN-R-04032:1998

Węgiel ogólny – metoda Tiurina, PB 20.1:1999

Azot ogólny – według normy PB 16.3 Wyd. I – 14.10.2002

pH<sub>H2O</sub>; pH<sub>KCl</sub> – PN-ISO 10390:1997

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 12- K<sub>2</sub>O – metoda Egnera-Riehma, PN-R-04023:1996

N-NH<sub>4</sub> and N-NH<sub>3</sub> – PB 8.1 Wyd. III – 08.09.2004, PB 8.1

**Oznaczenia mikrobiologiczne.** Wpływ zastosowanego szczepienia roślin na liczebność mikrobiologiczną w rędzinie wapiennej świeżo skażonej WWA i olejem napędowym oraz mieszaniną WWA i ON wykonano, przyjmując niżej oznaczenia:

- ogólna liczba bakterii i promieniowców [23],
- ogólna liczba grzybów [16],
- ogólna liczba bakterii amonifikacyjnych, proteolitycznych, rozkładających fosforany [20],
- ogólna liczba bakterii celulolitycznych [22],
- ogólna liczba bakterii kopiotroficznych oraz oligotroficznych [9].

**Szczepienie roślin.** Doświadczenia doniczkowe prowadzono w kontrolowanych warunkach w fitotronie. Rośliny (kostrzewa łąkowa 50 sztuk/doniczkę) szczepiono 48 h zawiesiną bakterii *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* w ilości 1 ml (gęstość 10<sup>6</sup> j.t.k. · g<sup>-1</sup>) na 500 g gleby. Szczepy stosowano łącznie w mieszaninie. Po upływie 10 dni rośliny ponownie doszczepiano tą samą ilością za-

wiesiny. Wzrost roślin utrzymywany był w kontrolowanych warunkach temperatury (w dzień – 16 h, 24°C, w nocy – 8 h, 18°C) oraz wilgotności 60% przez okres 30 dni. Gleby codziennie uwilgotniano do poziomu 60% ppw, utrzymując stałą wilgotność przez cały okres doświadczenia. Jeden tylko raz w ciągu okresu wegetacji rośliny nawożono:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,305 g,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  – 0,093 g, KCl – 0,245 g na 500 g gleby. Doświadczenia prowadzono w układzie zrandomizowanym. Każdą kombinację doświadczenia powtarzano 3-krotnie. Po zakończeniu doświadczeń wykonano podstawowe oznaczenia chemiczne i mikrobiologiczne gleby.

**Statystyka.** Do oceny statystycznej wyników wykorzystano pakiet programu STATISTICA.PL (7) (Stat. Soft. Inc., 95% poziom istotności).

### 3. Wyniki badań i dyskusja

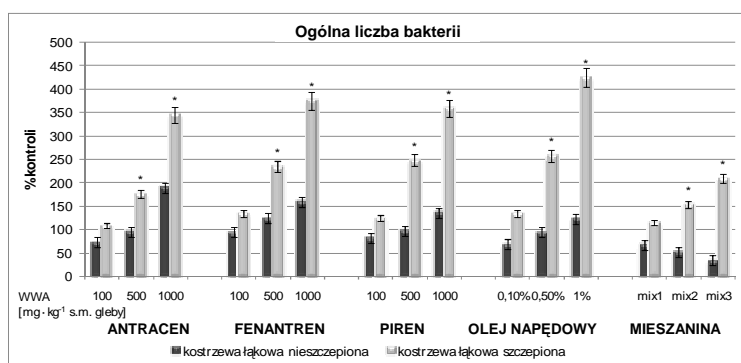
Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne obecne w skażonych glebach stanowią potencjalne zagrożenie dla środowiska, zarówno cytotoksyczne, mutagenne, jak i kancerogenne [1, 2, 7, 13]. Znanych jest wiele mikroorganizmów zdolnych do wykorzystywania WWA jako jedyne źródła węgla i energii. Efektywność mikrobiologicznej degradacji węglowodorów zależy m.in. od właściwości fizykochemicznych zanieczyszczenia oraz fizycznych i biologicznych właściwości skażonego środowiska [2, 10, 14, 15].

Wpływ zastosowanego szczepienia kostrzewy łąkowej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* na zmianę właściwości mikrobiologicznych rędziny wapiennej świeżo skażonej WWA i olejem napędowym oraz mieszaniną WWA z ON przedstawiono na rys. 1-3.

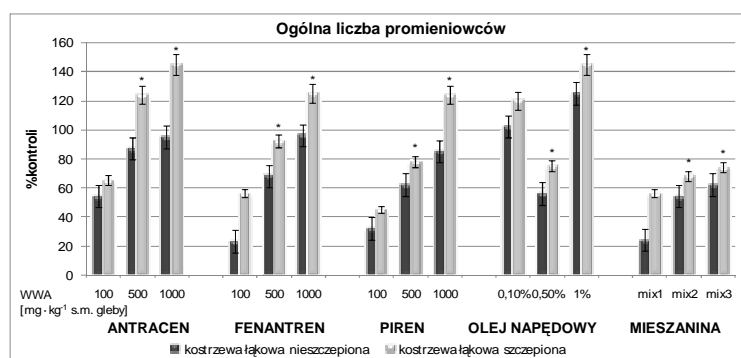
W strefie korzeniowej roślin obserwuje się zwiększone tempo procesu bioremediacji organicznych zanieczyszczeń w porównaniu z glebą nieryzosferową [1, 4, 5, 6, 7, 10, 18, 24]. Wiąże się to przede wszystkim z aktywnością metaboliczną mikroflory licznie zasiedlającą ryzosferę. Okazuje się, że istotne znaczenie mają też mikroorganizmy bezpośrednio związane z rośliną, żyjące wewnątrz tkanek korzenia, łodygi i liści. Do tej grupy mikroorganizmów należą właśnie szczepy *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* [7, 11, 12]. Ryzobakterie z rodzaju *Azospirillum spp.*, wiążące wolny azot, zalicza się do fakultatywnych endofitów zdolnych do kolonizacji zarówno zewnętrznej powierzchni korzenia, jak i wewnętrznej przestrzeni międzykomórkowej, korzystnie oddziałujących na wzrost i rozwój roślin [11].

Zmiany ogólnej liczby bakterii, promieniowców i grzybów w warunkach skażenia rędziny wapiennej WWA, ON oraz mieszaniną WWA i ON w przypadku wzrostu kostrzewy łąkowej szczepionej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* przedstawiono na rys. 1. Najmniejszą liczbę bakterii, promieniowców i grzybów stwierdzono po silnym skażeniu gleby mieszaniną WWA z ON. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono blisko 300-500-krotny wzrost ogólnej liczby bakterii w rędzinie wapiennej w kombinacjach szczepionych

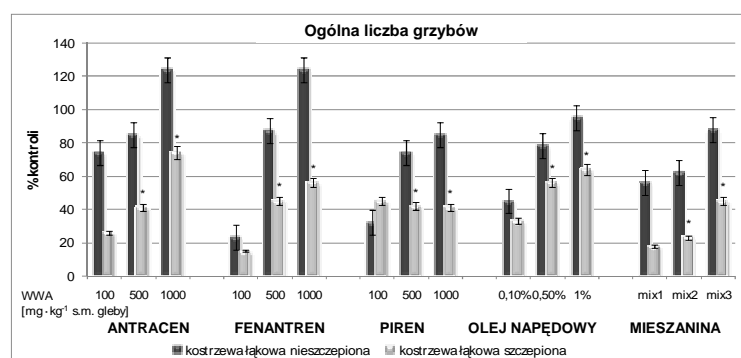
a)



b)



c)



\* wartości statystycznie istotne ( $\alpha \leq 0,05$ )

mix 1 – suma 3WWA (w stężeniu 100 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 0,1%)

mix 2 – suma 3WWA (w stężeniu 500 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 0,5%)

mix 3 – suma 3WWA (w stężeniu 1000 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 1%)

Rys. 1. Ogólna liczba bakterii, promieniowców i grzybów w rzedzinie wapiennej skażonej WWA, ON oraz mieszaniną WWA i ON

roślin. Statystycznie istotny wzrost ( $\alpha \leq 0,05$ ) ogólnej liczby bakterii i promieniowców stwierdzono w przypadku wszystkich zastosowanych dawek

skażenia gleby przy wzroście kostrzewy łąkowej szczepionej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri*. Skażenie gleby 0,1 i 1% olejem napędowym stymulowało wzrost liczby bakterii i promieniowców (powyżej 100% względem kontroli), zarówno przy braku, jak i w obecności zastosowanego szczepienia roślin. Statystycznie znaczący ( $\alpha \leq 0,05$ ) spadek liczby grzybów stwierdzono we wszystkich kombinacjach skażenia rędziny wapiennej po szczepieniu kostrzewy łąkowej bakteriami ryzosferowymi. Wprowadzona do ryzosfery roślin zawieszina bakterii *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* spowodowała zmniejszenie ogólnej liczby grzybów nawet o ok. 65% w przypadku szczepienia kostrzewy łąkowej w glebie skażonej pirenem w dawce  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  oraz o ok. 55% przy skażeniu fenantrenem w tej samej dawce (rys. 1.).

Pomiędzy stopniem rozwoju bakterii i promieniowców a stopniem rozwoju grzybów zachodzą określone proporcje – intensywnemu namnażaniu się bakterii i promieniowców odpowiada słabszy rozwój grzybów i odwrotnie. Zależność tę (SR) można wyrazić liczbowo poprzez stosunek liczby bakterii (B) i promieniowców (P) do liczby grzybów (G) [7]:

$$\text{SR} = (B + P)/G.$$

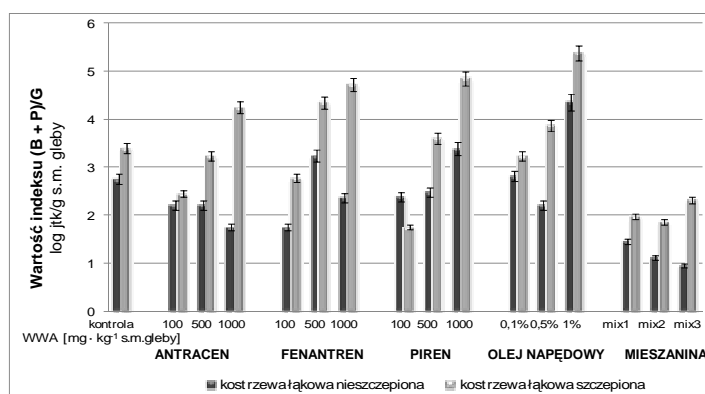
Większe wartości tego wskaźnika będą informować o stosunkowo słabszym rozwoju grzybów, natomiast mniejsze o silniejszym ich rozwoju w glebie.

Na rysunku 2. przedstawiono zlogarytmowane wartości indeksu  $(B + P)/G$  w rędzinie wapiennej skażonej WWA, olejem napędowym oraz mieszaniną WWA z olejem napędowym. Najkorzystniejszy stosunek bakterii i promieniowców do grzybów (z punktu widzenia aktywności biologicznej gleby) występował w warunkach szczepienia kostrzewy łąkowej po zastosowaniu średnich ( $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) oraz najwyższych ( $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) dawek skażenia.

O adaptacji wprowadzonych szczepów *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* do środowiska glebowego skażonego WWA i olejem napędowym świadczą także analizy ogólnych liczb innych grup mikroorganizmów glebowych, tj.: ogólnej liczby bakterii amonifikacyjnych, ogólnej liczby bakterii proteolitycznych, ogólnej liczby kopiotrofów, oligotrofów, bakterii celulolitycznych oraz drobnoustrojów zdolnych do rozkładu fosforanów (rys. 3.). Wzrost liczby wymienionych drobnoustrojów w przypadku zastosowanego szczepienia kostrzewy łąkowej świadczy o dobrej adaptacji wprowadzonych szczepów do zaistniałych warunków skażenia gleby oraz o niezakłócaniu przez wprowadzone szczepy wzrostu badanych grup mikroorganizmów naturalnie bytujących w glebach.

Bakterie amonifikacyjne stanowią grupę mikroorganizmów heterotroficznych, mających zdolność rozkładu organicznych związków azotu, aminokwasów z wytworzeniem amoniaku (dezaminacja), którego obecność świadczy o zachodzeniu mineralizacji organicznych połączeń azotowych [20]. Statystycznie istotny wzrost liczby bakterii amonifikacyjnych stwierdzono w przypadku średnich

(1000 mg · kg<sup>-1</sup>, 500 mg · kg<sup>-1</sup>) i najwyższych (1000 mg · kg<sup>-1</sup>) dawek WWA po zastosowanym szczepieniu kostrzewy łąkowej bakteriami ryzosferowymi (rys. 3a).



\* wartości statystycznie istotne ( $\alpha \leq 0,05$ )

mix 1 – suma 3 WWA (w stężeniu 100 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 0,1%)

mix 2 – suma 3 WWA (w stężeniu 500 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 0,5%)

mix 3 – suma 3 WWA (w stężeniu 1000 mg · kg<sup>-1</sup> każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 1%)

Rys. 2. Wartość indeksu (B + P)/G w rędzinie wapiennej skażonej WWA, olejem napędowym oraz mieszaniną WWA i ON po wzroście kostrzewy łąkowej

Z kolei ogólna liczba bakterii proteolitycznych zależy w dużym stopniu od warunków siedliskowych, np. temperatury i pH. Ich obecność w glebie jest wskaźnikiem stopnia zanieczyszczenia środowiska związkami organicznymi podatnymi na biodegradację [20]. Dużą liczbę bakterii proteolitycznych stwierdzono w kombinacjach średnich (500 mg · kg<sup>-1</sup>) i najwyższych (1000 mg · kg<sup>-1</sup>) dawek WWA oraz we wszystkich dawkach oleju napędowego po zastosowanym szczepieniu *Festuca pratensis* bakteriami *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri*. Duża ogólna liczba tych bakterii świadczy o dobrym dostępie łatwo przyswajalnych źródeł węgla, jakimi mogą być węglowodory aromatyczne i ich produkty rozkładu (rys. 3b).

W warunkach skażenia gleby WWA i olejem napędowym oraz mieszaniną WWA i ON wykazano także dużą liczbę bakterii kopiotroficznych (rys. 3c) oraz oligotroficznych (rys. 3d). Największą liczbę tych bakterii stwierdzono przede wszystkim przy skażeniu fenantrenem (1000 mg · kg<sup>-1</sup>) i olejem napędowym w dawce 1%. Najniższą liczbę zarówno kopiotrofów, jak i oligotrofów stwierdzono we wszystkich dawkach mieszaniny WWA z olejem napędowym.

W przypadku liczby bakterii celulolitycznych statystycznie znaczny ich wzrost (powyżej 100% w stosunku do kontroli) stwierdzono jedynie w kombinacjach średnich (0,5%) i najwyższych (1%) dawek oleju napędowego po zastosowanym szczepieniu kostrzewy łąkowej bakteriami (ryc. 3e). Statystycznie

istotny wzrost tych bakterii (ale poniżej 100% kontroli) stwierdzono przy średnich i największych dawkach skażenia rędziny wapiennej pirenem i mieszaniną WWA z olejem napędowym po szczepieniu roślin.

Na rysunku 3f przedstawiono ogólną liczbę drobnoustrojów zdolnych do rozkładu fosforanów w rędzinie wapiennej skażonej WWA i olejem napędowym po wzroście kostrzewy łąkowej. Najwyższą liczbę drobnoustrojów (powyżej 100% w stosunku do kontroli, statystycznie udowodnione) stwierdzono w przypadku szczepienia roślin przy średnich ( $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) i największych ( $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) dawkach antracenu, fenantrenu oraz oleju napędowego (0,5 i 1%) (rys. 3f). W przypadku braku szczepienia roślin we wszystkich kombinacjach skażenia stwierdzono znacznie mniejszą liczbę tych drobnoustrojów (poniżej 100% względem kontroli).

W glebie wybranej do badań nie stwierdzono obecności szczepów *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri*. Szczepy te jednak po wprowadzeniu do ryzosfery roślin szybko adaptowały się do warunków skażenia. Jednak po zakończeniu doświadczenia i usunięciu roślin szczepy te szybko wyginęły w glebie. Analiza mikroskopowa potwierdziła obecność zaledwie kilku komórek bakteryjnych w polu widzenia mikroskopu. Bakterie *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* jako typowe endofity żyją jedynie w bliskim połączeniu ze strefą korzeniową roślin [11, 12].

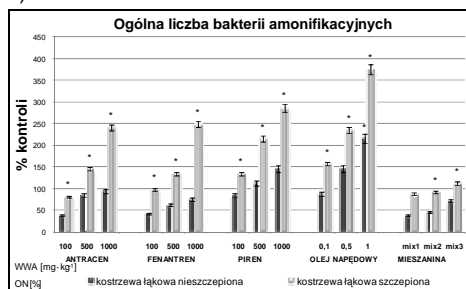
W procesie bioremediacji bardzo ważny jest odpowiedni dobór roślin. Nie wszystkie bowiem rośliny tolerują tak wysokie stężenie węglowodorów w glebie. Z badań Listego i Prutza [13] wynika, że u ponad połowy z spośród 13 roślin (traw, ziół, roślin krzyżowych i strączkowych) rosnących na glebie skażonej substancjami ropopochodnymi i WWA stwierdzono spowolnienie ich kiełkowania oraz mniejszy plon. U roślin zaszczipionych bakteriami ryzosferowymi tzw. ARDB (z ang. *Aromatic Ring Dioxygenase-Expressing Bacteria*) stwierdzono zwiększoną aktywność i liczbę drobnoustrojów w strefie korzeniowej roślin oraz znaczny spadek ok. 60% dibenzo(ah)antracenu. Wśród bakterii z grupy ARDB stwierdzono m.in. następujące rodzaje: *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*. Z kolei Chen i inni [4] udowodnili spadek zawartości pirenu w glebach skażonych tym związkiem w procesie fitoremediacji z wykorzystaniem trawy *Festuca arundinaces*. W badaniach własnych stwierdzono dużą liczbę drobnoustrojów glebowych w rędzinie wapiennej skażonej WWA i ON po wzroście trawy *Festuca pratensis* szczepionej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* (kostrzewa łąkowa wykazująca stosunkowo małą wrażliwość na skażenie gleby).

Metody biologiczne polegają na stworzeniu optymalnych warunków dla rozwoju mikroorganizmów glebowych zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych. Prowadzi to do przyspieszenia procesów, które naturalnie zachodzą w środowisku [1, 2, 10, 24]. Bioremediacja wymaga zwiększenia liczebności i aktywności degradacyjnej endogennej mikroflory, a w razie potrzeby wprowa-

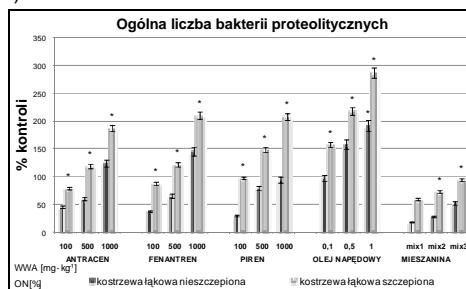


denia w postaci szczepionki mikroorganizmów intensywnie degradujących zanieczyszczenia [1, 7, 10, 24].

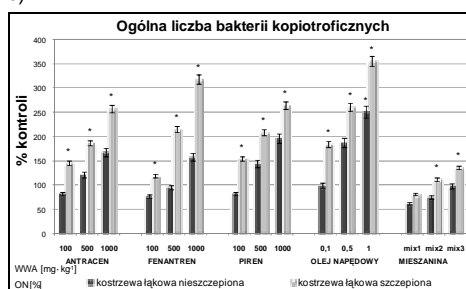
a)



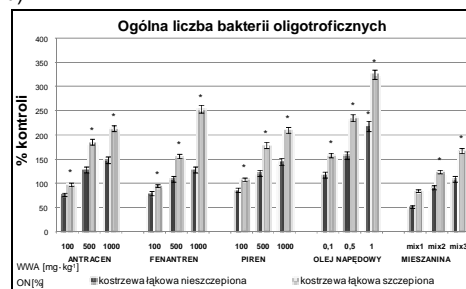
b)



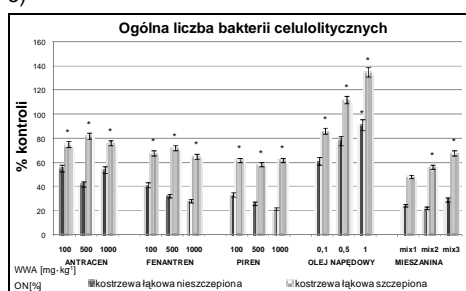
c)



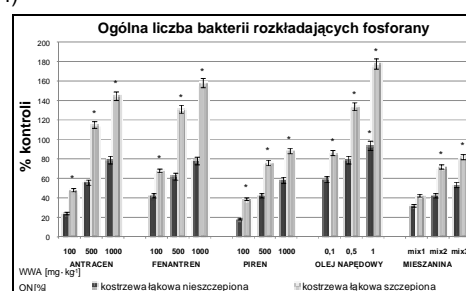
d)



e)



f)



\* wartości statystycznie istotne ( $\alpha \leq 0,05$ )

mix 1 – suma 3WWA (w stężeniu  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 0,1%)

mix 2 – suma 3WWA (w stężeniu  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 0,5%)

mix 3 – suma 3WWA (w stężeniu  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  każdy) i oleju napędowego (w stężeniu 1%)

Rys. 3. Ogólna liczba bakterii: a) amonifikacyjnych, b) proteolitycznych, c) kopiotroficznych, d) oligotroficznych, e) celulolitycznych, f) rozkładających fosforany w rędzinie wapiennej skażonej WWA, ON oraz mieszaniną WWA i ON po szczepieniu kostrzewy łąkowej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri*

Najlepsze wyniki dają szczepionki złożone z mieszaniny kultur drobnoustrojów [7, 18, 19, 24]. Znane są także prace, w których nie stwierdzono zależności pomiędzy ogólną liczbą bakterii i promieniowców a zawartością węglowodorów [7, 24]. Jednak, jak potwierdzają inni autorzy [18, 19, 24], ogólna

liczba bakterii jest odpowiednim parametrem do opisu biologicznych właściwości gleby, które mają znaczenie dla procesów degradacji WWA, szczególnie w procesach bioaugmentacji.

W laboratorium zwykle uzyskuje się szczepionkę o bardzo wysokiej aktywności degradacyjnej w stosunku do skażenia. Jednakże po jej wprowadzeniu do środowiska naturalnego najczęściej uzyskuje się znacznie słabsze zdolności biodegradacyjne. Warunki naturalne, takie jak: pH, wilgotność, potencjał redoks, zawartość substancji mineralnych, znacząco zmieniają jej aktywność [7, 14, 15], przy czym nie należy także zapominać też o czynnikach biologicznych, takich jak: drapieżnictwo, konkurencja z endogenną mikroflorą, zanieczyszczenie stanowiące źródło węgla czy inne związki odżywcze, antybioza, represja kataboliczna itp. Na efekt bioaugmentacji wpływa także sam sposób wprowadzania i rozmieszczania mikroorganizmów oraz przemieszczania ich w glebie [1].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają stymulujący wpływ oleju napędowego w dawce 0,1 i 1% na wzrost liczby bakterii i promieniowców (rys. 1-3).

Wzbogacenie gleby w dodatkowe źródło węgla, jakim jest dodatek oleju napędowego może oddziaływać dwukierunkowo na rozkład WWA w środowisku glebowym [1]. Z jednej strony dodatkowe ilości łatwo przyswajalnego węgla i energii stwarzają lepsze warunki dla rozwoju mikroflory glebowej, powodując zwiększenie tempa biodegradacji WWA. Z drugiej zaś strony znaczna ilość oleju napędowego zmniejsza ich biodostępność. Korzystny wpływ oleju napędowego na zwiększenie ogólnej liczby drobnoustrojów zdolnych do degradacji WWA stwierdzono także w pracy Balda i innych [3] oraz Gogoi i innych [8].

Uzyskane wyniki badań potwierdzają ochronny wpływ szczepienia kostrzewy łąkowej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri* na zmianę liczby drobnoustrojów w glebie skażonej WWA i ON. Przedstawiony temat badań wymaga jednak dalszych prac, które będą prowadzić do przygotowania aktywnej szczepionki o silnych właściwościach degradacyjnych związków ropopochodnych w zanieczyszczonych glebach.

#### 4. Wnioski

1. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby bakterii i promieniowców oraz znaczny spadek liczby grzybów zasiedlających świeżo skażoną glebę po szczepieniu kostrzewy łąkowej *Azospirillum spp.* i *Pseudomonas stutzeri*.
2. Wzrost liczebności mikrobiologicznych po zastosowaniu szczepienia roślin wskazuje na dużą żywotność wprowadzonych szczepów bakteryjnych i potwierdza ich zdolność adaptacyjną do warunków skażenia.

3. Stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby badanych grup mikroorganizmów zarówno przy braku, jak i w obecności zastosowanego szczepienia roślin.
4. Stwierdzono stymulujący wpływ 0,1 i 1% ON na wzrost liczby badanych grup mikroorganizmów zarówno w przypadku braku, jak i w obecności zastosowanego szczepienia roślin.

## Literatura

1. Anderson T.A., Guthrie E.A., Walton B.T.: Bioremediation in the rhizosphere: plant roots and associated microbes clean contaminates soil. *Environ. Sci. Technol.*, 1993 (27), 2630-2636.
2. Atlas R.M.: Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.*, 1995(31), 178-182.
3. Balba M.T., Al-Awadhi N., Al-Daher R.: Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiol. Methods*, 1998(32), 155-164.
4. Chen Y., Banks M.K., Schwab A.P.: Pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*) and switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Environ. Sci. Tech.*, 2003(37), 5778-5782.
5. Corgië S.C., Beguiristain T., Leyval C.: Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004(70), 3552-3557.
6. Fan S., Li P., Gong Z., Ren W., He N.: Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere*, 2008(71), 1593-1598.
7. Gałązka A.: Effect of *Azospirillum* spp. and *Pseudomonas stutzeri* inoculation of plants on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (in polish). IUNG-PIB, Puławy 2008.
8. Gogoi B.K., Dutta N.N., Goswami P., Mohan T.R.K.: A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill. *Adv. Environ. Res.*, 2003(70), 757-782.
9. Hattori R., Hattori T.: Sensitivity to salts and organic compound of soil bacteria isolated on diluted media. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1980(26), 1-14.
10. Joner E.J. et al.: Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environ. Sci. Technol.*, 2001(35), 2773-2777.
11. Król M.J.: *Azospirillum* – association bacteria free nitrogen fixing (in polish). Monografie i rozprawy naukowe, IUNG-PIB, Puławy 2006.
12. Król M.J., Perzyński A., Leśniak A.: *Pseudomonas stutzeri* – endorhizosphere's association bacterium (in polish). *Postępy Nauk Rol.*, 2007(1), 81-91.
13. Liste H.H., Prutz I.: Plant performance, dioxygenase – expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*, 2006(62), 1411-1420.

14. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., Klimowicz-Pawlas A., Janauskaite D.: Ecotoxicological effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties. *J. Environ. Qual.*, 2007(36), 1635-1645.
15. Margesin R., Schinner F.: Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 2000(40), 339-346.
16. Martin J.P.: Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Science*, 1950(69), 215-232.
17. Muratova A. et al.: Plantrhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation*, 2003(5), 137-151.
18. Nichols T.D., Wolf D.C., Rogers H.B., Beyrouthy C.A., Reynolds C.M.: Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air and Soil Pollution*, 1997 (95), 165-178.
19. Rentz J.A., Alvarez P.J.J., Schnoor J.L.: Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene – degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environ. Microbiol.*, 2005(6), 574-583.
20. Rodina A.: Mikrobiologiczne metody badania wód. PWRiL, Warszawa 1968.
21. Santos E. et al.: Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. *Bioresource Technology*, 2008(99), 2644-2649.
22. Strzelczyk E., Szpotański T.: Cellulolytic and pectolytic activity of streptomycetes isolated from root-free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Biol. Fertil. Soils.*, 1989(7), 365-369.
23. Wallace R., Lockhead A.: Qualitative studies of soil microorganisms. Aminoacid requirements of rhizosphere bacteria. *Can. J. Research, section C*, 1950(28), 1-6.
24. Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z.: New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Intern.*, 2007(33), 406-413.

## **EFFECT OF RHIZOSPHERE BACTERIA ON NUMBER OF MICROORGANISMS IN RENDZINA FRESHLY POLLUTED WITH MIXTURE OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAH'S) AND DIESEL FUEL (DF)**

### **Abstract**

Rhizodegradation is the breakdown of organic contaminants in soil by soil dwelling microbes which is enhanced by the rhizospheres presence. The soil used in the experiment was collected from 0-30 cm layer in the uncontaminated area of agricultural use (Mięćmierz, Kazimierz Dolny, Poland). Pot experiment was conducted to evaluate the number of microorganisms in rendzina freshly contaminated with PAH's, diesel fuel and mixtures of PAH's and diesel fuel using inoculation of meadow feascue with rhizospheric bacteria *Azospirillum spp.* and *Pseudomonas stutzeri*. The strains of *Azospirillum spp.* and *Pseudomonas stutzeri* were able to nitrogen fix and degrade PAH's as the only source of carbon and energy. Experiment was carried out as a chamber pot study. Plants had been cultivated for 30 days and then harvested. The total number of various bacteria (ammonifying, proteolytic, able to degrade phosphorus, copiotrophic, oligotrophic), actinomycetes and fungi in soil before and after vegetation period of investigated soil were the basis for the determination of the effectiveness of the inoculation of plants with *Azospirillum spp.* and *Pseudomonas stutzeri*. This research has confirmed higher total number of microorganisms

after inoculation of plants with all doses of PAH's: total number of bacteria, actinomycetes and lower number of fungi. Statistically important decrease of total number of different bacteria and actinomycetes and statistically important increase on total number of fungi in rendzina after grown of meadow feascue inoculated with *Azospirillum spp.* and *Pseudomonas stutzeri* were observed together with increase of pollution doses. Number of different bacteria and actinomycetes were statistically higher in soils polluted with diesel fuel at the doses 0,1 and 1%.

The differences in concentration between the inoculated or non-inoculated soils indicate that the presence of plant roots, in addition to the period of time, contributes to grown and adaptation of *Azospirillum spp.* and *Pseudomonas stutzeri* to a soil freshly polluted with PAH's and diesel fuel.

*Wpłynęło do Oficyny Wydawniczej w marcu 2009 r.*