

Małgorzata Hawrot-Paw, Małgorzata Martynus, Adam Koniuszy

Mikrobiologiczna aktywność metaboliczna gleb zanieczyszczonych olejem napędowym i biodieslem

Spalanie paliw konwencjonalnych prowadzi do powstawania szeregu zanieczyszczeń, które wpływają niekorzystnie na stan środowiska i mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie zdrowia ludzi. Alternatywą dla powszechnie stosowanego oleju napędowego ma być czyste ekologicznie i odnawialne paliwo – biodiesel. Są to estry metylowe lub etylowe wyższych kwasów tłuszczowych, powstające w procesie transestryfikacji, czyli reakcji trójglicerydów z olejów roślinnych lub tłuszczów zwierzęcych z alkoholem przy udziale katalizatora [1]. Możliwe jest również wykorzystanie w tym celu zużytych olejów [2], co wpisuje się w racjonalne gospodarowanie odpadami.

Spalanie biodiesla, w porównaniu z paliwem konwencjonalnym, ogranicza o ponad 90% sumę emitowanych niespalonych węglowodorów, o 75÷90% emisję wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [3], ale również ilość wydzielanego tlenu węgla [4] i wielu lotnych związków organicznych [5]. Podkreśla się też jego wysoką podatność na biologiczny rozkład w środowisku wodnym, dochodzący w warunkach laboratoryjnych do 90% w ciągu 28 d [6, 7]. W mniej korzystnych warunkach panujących w glebie wartości te są zdecydowanie niższe [8]. Biodiesel wprowadzony do środowiska zanieczyszczonego olejem napędowym może stymulować rozkład węglowodorów ropopochodnych w procesie kometabolizmu [9], a więc wspomagać procesy bioremediacji, jednak wpływ jego obecności na biotyczne elementy ekosystemów nie jest jednoznaczny. Wyniki badań wskazują zarówno na mniejszą toksyczność biodiesla, w porównaniu do pochodnych ropy naftowej [10], jak i na oddziaływanie niekorzystne [11, 12]. Różnice mogą wynikać z odmiennych metod prowadzenia badań, ale także materiałów badawczych.

Biodiesel wykorzystywany jest jako biopaliwo, lecz przede wszystkim jest stosowany jako biokomponent do tworzenia dowolnych mieszanek z olejem napędowym [13, 14], stąd też konieczne jest prowadzenie badań z zakresu bezpieczeństwa jego produkcji, przetwarzania i transportu oraz stosowania w kontekście jego wpływu na środowisko naturalne.

Celem badań omówionych w pracy było określenie wpływu obecności paliw w glebie na liczebność mikroorganizmów wybranych grup metabolicznych mikrobiecoz glebowych, istotnych z punktu widzenia prawidłowego

funkcjonowania środowiska glebowego, zachowania równowagi biologicznej – ciągłości przemiany materii i przepływu energii. Należą one do czułych wskaźników zanieczyszczeń pojawiających się w środowisku glebowym i są częstym elementem analiz ekotoksykologicznych.

Materiał i metody badań

Badania laboratoryjne prowadzono z wykorzystaniem gleb o zróżnicowanym składzie granulometrycznym i zawartości związków organicznych. Materiał pobrano z głębokości 0÷15 cm poziomu orno-próchnicznego w miejscowości Lipnik, na terenie Rolniczej Stacji Doświadczalnej należącej do Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (piasek gliniasty, zawartość węgla 10 gC/kg) oraz w Ostoi koło Szczecina (głina piaszczysta, zawartość węgla 19 gC/kg). W pracy zastosowano olej napędowy pobrany z dystrybutora stacji paliw. Jest on mieszaniną tysięcy węglowodorów, przede wszystkim alifatycznych oraz aromatycznych. Była to klarowna ciecz, o słomkowo-żółtej barwie i gęstości 0,845 g/cm³. Biodiesel, udostępniony do badań przez jedną z polskich rafinerii, miał intensywny żółty kolor, charakterystyczny zapach i gęstość 0,875 g/cm³. Biopaliwo nie zawiera składników klasyfikowanych jako substancje niebezpieczne, a więc nie powinno być szkodliwe dla człowieka i środowiska. W jego składzie występują przede wszystkim estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) w ilości 96,5% (m/m), a ponadto estry metylowe kwasu linolenowego, estry metylowe wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz niewielkie ilości (<1% m/m) alkoholu metylowego oraz mono-, di- i triacylogliceroli. W ramach analiz chemicznych wykonano podstawowe badanie reologiczne paliw obejmujące wyznaczenie ich lepkości dynamicznej z użyciem wiskozymetru Brookfield DV-II+.

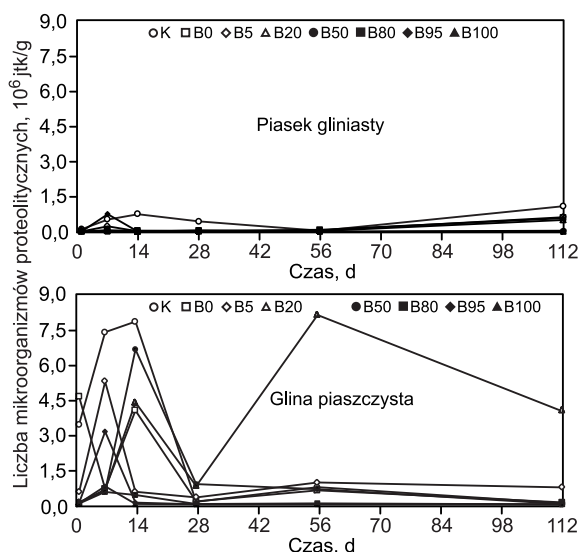
Oba materiały glebowe (piasek gliniasty i glina piaszczysta) podzielono na 8 próbek, każda o masie 500 g. Następnie doprowadzono je do 50% kapilarnej pojemności wodnej i umieszczono w polietylenowych pojemnikach. W dalszej kolejności próbki zanieczyszczono olejem napędowym (B0) lub biodieslem (B100) oraz ich mieszaniną w stosunku procentowym 95:5 (B5), 80:20 (B20), 50:50 (B50), 20:80 (B80) i 5:95 (B95). W tym celu naważki paliwa w ilości 5% suchej masy gleby wprowadzano stopniowo do poszczególnych próbek i jednocześnie mieszano w celu ich równomiernego rozproszania w całej objętości gleby. Jedną naważką każdej gleby, do której nie dodano żadnego paliwa, stanowiła próbka kontrolną (K).

Dr hab. M. Hawrot-Paw, mgr inż. M. Martynus, dr hab. A. Koniuszy: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Inżynierii Systemów Agrotechnicznych, ul. Papieża Pawła VI 1, 71-459 Szczecin
małgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl

Próbki gleby inkubowano w temperaturze 20°C. Analizy wykonywano w dniu zanieczyszczenia gleby, a następnie po upływie 7d, 14d, 28d, 56d i 112d. Metodą posiewu rozcieńczeń glebowych na odpowiednie podłoża hodowlane oznaczono liczebność mikroorganizmów lipolitycznych [15], proteolitycznych [16], amylolitycznych [17] oraz celulolitycznych [18]. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki przeliczono na 1 g suchej masy gleby i podano jako jednostki tworzące kolonie (jtk). Liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów przeliczono również na wartości średnie z całego czasu inkubacji i przedstawiono jako różnice procentowe w porównaniu do próbki kontrolnej. Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica ver. 10, przygotowując analizę wariancji i testy post-hoc Tukeya na poziomie istotności $p \leq 0,05$.

Dyskusja wyników

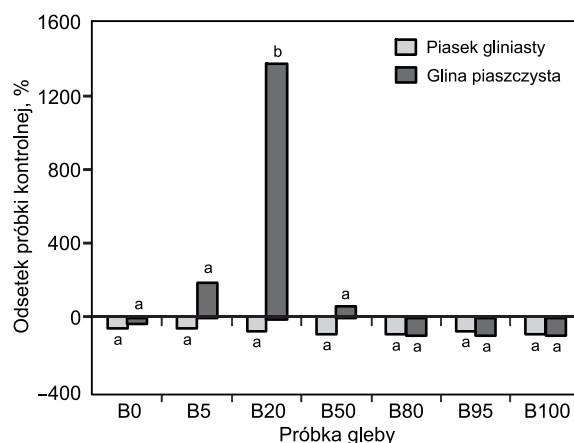
Wprowadzenie paliw do gleby modyfikowało liczebność mikroorganizmów w obrębie badanych grup metabolicznych, przy czym wpływ ten nie był jednoznaczny. Na podstawie analizy wariancji stwierdzono, że zastosowane paliwa i ich mieszanki, czas inkubacji, a także interakcja tych czynników wpływały istotnie na liczbę mikroorganizmów proteolitycznych w obu badanych glebach. W piasku gliniastym (rys. 1 – góra) negatywny wpływ paliw odnotowano już w pierwszej dobie od ich wprowadzenia do gleby i pomimo niewielkich zmian liczebności w poszczególnych obiektach podczas inkubacji, po 112d nadal była ona poniżej wartości kontrolnej ($1,1 \cdot 10^6$ jtk/g) i w zależności od zawartości biopaliwa mieściła się w zakresie od $5,9 \cdot 10^5$ jtk/g (B0) do $1,1 \cdot 10^2$ jtk/g (B100). W glinie piaszczystej (rys. 1 – dół), w pierwszych dwóch tygodniach doświadczenia, niezależnie od rodzaju zanieczyszczenia, liczba komórek mikroorganizmów proteolitycznych stanowiła od 1% do maksymalnie 85% wartości oznaczonych w glebie niezanieczyszczonej. Przez dłuższy czas, głównie w próbkach B5 i B20, liczba mikroorganizmów utrzymywała się na wyższym poziomie w stosunku do próbki kontrolnej, natomiast zwiększająca się zawartość biodiesla była czynnikiem oddziałującym negatywnie.



Rys. 1. Liczba mikroorganizmów proteolitycznych w piasku gliniastym i w glinie piaszczystej

Fig. 1. Number of proteolytic microorganisms in loamy sand and sandy loam

Zróznicowana reakcja mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleby paliwami może wynikać z ich odmiennego składu chemicznego. Obecność węglowodorów ropopochodnych w oleju napędowym może sprzyjać rozwojowi drobnoustrojów, dla których są one cennym źródłem węgla i energii, bądź też powodować inhibicję w zależności od dawki i rodzaju zanieczyszczenia, a także od typu gleby [19], co potwierdzają wyniki przeprowadzonych badań. Niewątpliwie istotnym aspektem jest również wrażliwość poszczególnych grup mikroorganizmów na obecność zanieczyszczeń w glebie. W badaniach opisanych w pracy [20] biodiesel stymulował wzrost i rozwój bakterii oraz grzybów, natomiast ograniczał liczbę promieniowców. Biorąc pod uwagę wartość średnią w całym czasie inkubacji w odniesieniu do mikroorganizmów proteolitycznych, stwierdzono różnice w reakcji badanych drobnoustrojów w zależności od rodzaju gleby (rys. 2).

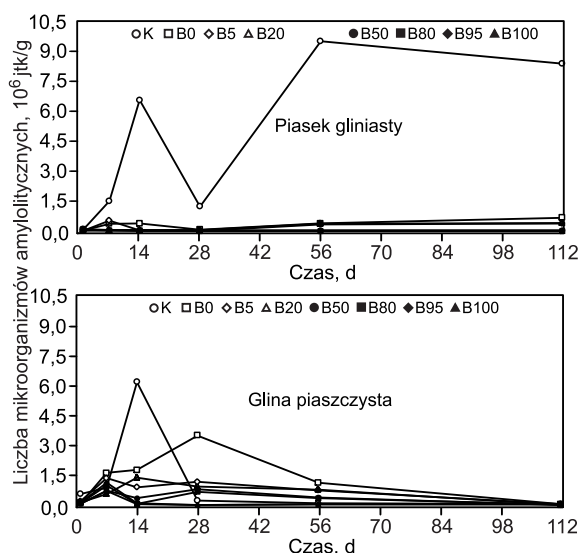


Rys. 2. Średnia liczba mikroorganizmów proteolitycznych w próbkach gleby zanieczyszczonej paliwami (odsetek w stosunku do próbki kontrolnej; wartości nieoznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie na poziomie $p < 0,05$)

Fig. 2. Average number of proteolytic microorganisms (as percentage to the control; values marked with different letters differ significantly at $p < 0,05$)

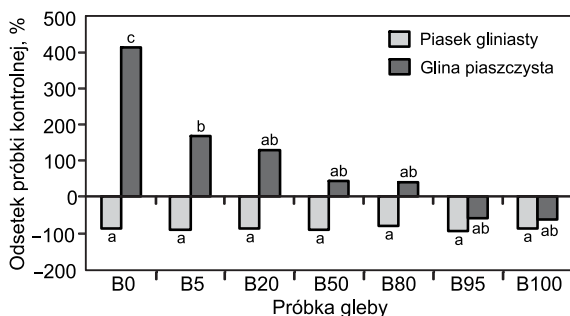
W piasku gliniastym, we wszystkich badanych próbkach gleby, obserwowano inhibicję w zakresie 50–90% w stosunku do próbki kontrolnej, natomiast w glinie piaszczystej negatywną reakcję mikroorganizmów odnotowano głównie przy większej zawartości bioskładnika w mieszaninie z olejem napędowym i w próbce B100 (97% inhibicja). Podobne wyniki w odniesieniu do paliw konwencjonalnych uzyskali autorzy pracy [21], którzy badali wpływ oleju lekkiego w tej samej ilości 5% na aktywność mikroorganizmów proteolitycznych i zaobserwowali jej spadek do zaledwie 20%. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o wyraźnej selekcji mikroorganizmów i wyparciu mikroorganizmów proteolitycznych na rzecz innych grup drobnoustrojów, bądź też pojawieniu się toksycznych metabolitów pośrednich powstających w wyniku degradacji węglowodorów. Być może jest to także związane z tym, że węglowodory wprowadzone do gleby nie są typowym źródłem węgla i energii dla tej grupy organizmów. Zachodząca w glebie proteoliza i powstający w jej wyniku azot może też ograniczać rozkład węglowodorów, co przedstawiono w badaniach dotyczących wpływu hydrolizy białka na rozkład oleju napędowego w glebie [22]. Ograniczenie liczby mikroorganizmów proteolitycznych wpływa negatywnie na procesy hydrolizy białek przy udziale wydzielanych przez nie enzymów proteolitycznych, a więc również na mineralizację organicznych połączeń azotu w glebie.

W trakcie prowadzonych doświadczeń obserwowano zarówno wzrost liczby, jak i hamowanie rozwoju drobnoustrojów rozkładających skrobię. Taką reakcję ze strony mikroorganizmów amylolitycznych potwierdzają w swoich badaniach również inni autorzy [21]. W piasku gliniastym (rys. 3 – góra) liczba mikroorganizmów przez cały czas inkubacji, we wszystkich próbkach, była mniejsza od wartości kontrolnych. Odnotowano statystycznie istotną zależność pomiędzy zmniejszeniem liczby mikroorganizmów amylolitycznych a zwiększającą się zawartością biodiesla, jako składnika zanieczyszczenia w glinie piaszczystej (rys. 3 – dół). Wzrost liczby drobnoustrojów powyżej wartości kontrolnych obserwowano przede wszystkim w glebie zanieczyszczonej paliwem konwencjonalnym (B0), gdzie liczba komórek mikroorganizmów amylolitycznych systematycznie rosła, aż do 28 d inkubacji, osiągając maksymalnie $3,5 \cdot 10^6$ jtk/g. Istotny wzrost liczby komórek w odniesieniu do gleby niezanieczyszczonej odnotowano również w próbkach od B5 do B80, a stymulacja utrzymywała się aż do 56 d inkubacji.



Rys. 3. Liczba mikroorganizmów amylolitycznych w piasku gliniastym i w glinie piaszczystej
Fig. 3. Number of amylolytic microorganisms in loamy sand and sandy loam

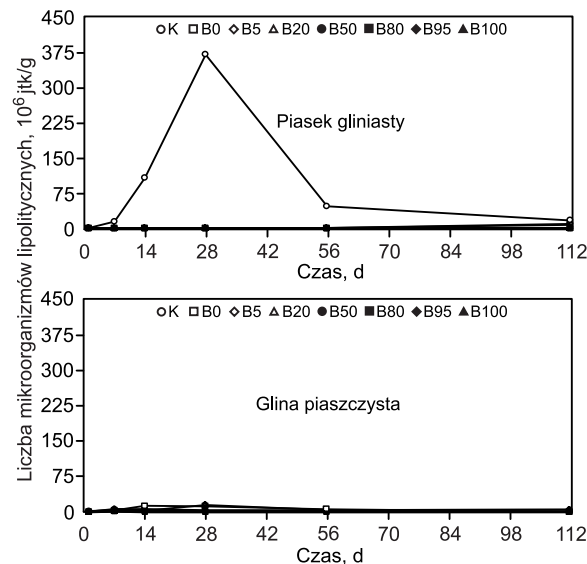
Średnia liczba tej grupy drobnoustrojów glebowych w piasku gliniastym była mniejsza w porównaniu do próbki kontrolnej w zakresie od 82% do 91% (rys. 4). Podobne zależności obserwowali też autorzy pracy [23]. W glinie



Rys. 4. Średnia liczba mikroorganizmów amylolitycznych w próbkach gleby zanieczyszczonej paliwami (odsetek w stosunku do próbki kontrolnej; wartości nieoznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie na poziomie $p < 0,05$)
Fig. 4. Average number of amylolytic microorganisms (as percentage to the control; values marked with different letters differ significantly at $p < 0,05$)

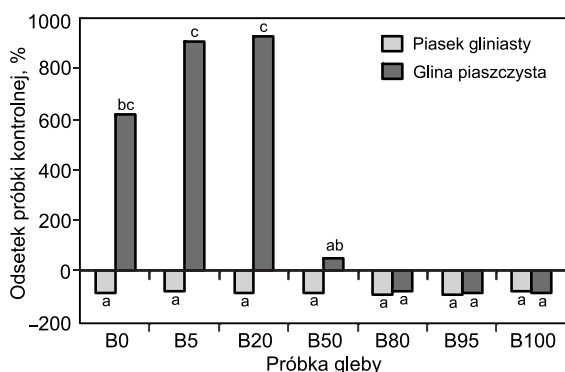
piaszczystej tylko w glebie próbek B95 i B100 odnotowane wartości były mniejsze od kontrolnych, odpowiednio o 58% i 63%.

Autorzy pracy [24] stwierdzili, że enzymy lipolityczne mogą być użytecznym wskaźnikiem w procesie biodegradacji paliw, wykazując istotną ujemną korelację pomiędzy aktywnością lipaz i zawartością węglowodorów obecnych w oleju napędowym. W przeprowadzonych badaniach obecność paliw ograniczała wzrost i rozwój mikroorganizmów lipolitycznych we wszystkich próbkach z piaskiem gliniastym (rys. 5 – góra) i ich negatywne oddziaływanie utrzymywało się przez cały czas inkubacji. W glinie piaszczystej (rys. 5 – dół) negatywna reakcja drobnoustrojów związana była z rodzajem zanieczyszczenia. Liczba mikroorganizmów lipolitycznych w próbce zanieczyszczonej paliwem konwencjonalnym (B0) istotnie wzrosła między 7 d a 14 d doświadczenia, osiągając $1,3 \cdot 10^6$ jtk/g. W kolejnych terminach analiz obserwowano systematyczne zmniejszenie liczby komórek do około 53% wartości odnotowanych w próbce kontrolnej w ostatniej dobie doświadczenia. Wprowadzenie do gleby mieszaniny oleju napędowego z biodieslem wpływało stymulująco na mikroorganizmy lipolityczne, jednak wyłącznie przy jego niewielkim udziale w mieszaninie. W próbce B5 zwiększoną, w porównaniu do próbki kontrolnej, liczbę komórek drobnoustrojów rozkładających tłuszcze odnotowano już w pierwszym tygodniu doświadczenia, a w próbce B20 po 14 d. Stymulujący wpływ paliw w tych próbkach utrzymywał się do końca czasu inkubacji. Większa zawartość biodiesla wpływała jednak negatywnie na liczebność tych mikroorganizmów, zwłaszcza powyżej 50% jego udziału w mieszaninie. Odnotowane zależności znalazły odzwierciedlenie w wartościach średnich z całego czasu inkubacji (rys. 6).



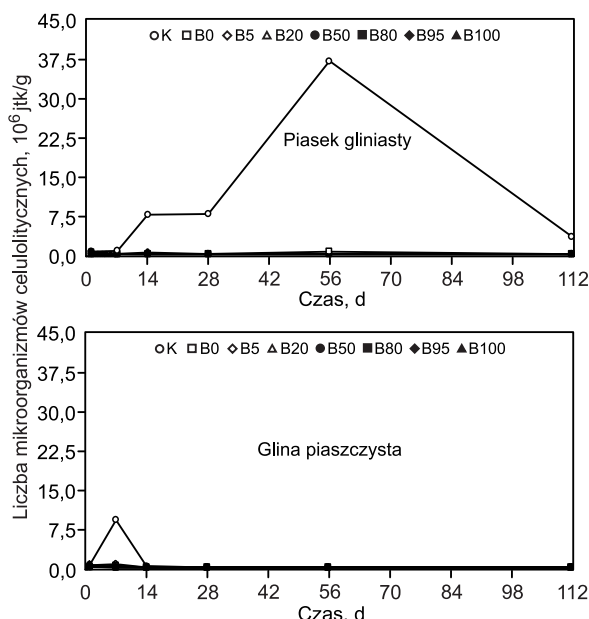
Rys. 5. Liczba mikroorganizmów lipolitycznych w piasku gliniastym i w glinie piaszczystej
Fig. 5. Number of lipolytic microorganisms in loamy sand and sandy loam

Najmniej zróżnicowaną reakcją na wprowadzony do gleby olej napędowy, biodiesel lub ich mieszaninę charakteryzowały się mikroorganizmy celulolityczne. W piasku gliniastym (rys. 7 – góra), niezależnie od rodzaju zanieczyszczenia, liczba mikroorganizmów tej grupy była istotnie mniejsza, w porównaniu z próbką kontrolną. W glebie niezanieczyszczonej były to wartości rzędu $10^6 \div 10^7$ jtk/g, natomiast w pozostałych obiektach $10^2 \div 10^3$ jtk/g. Negatywny



Rys. 6. Średnia liczba mikroorganizmów lipolitycznych w próbkach gleby zanieczyszczonej paliwami (odsetek w stosunku do próbki kontrolnej; wartości nieoznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie na poziomie $p < 0,05$)

Fig. 6. Average number of lipolytic microorganisms (as percentage to the control; values marked with different letters differ significantly at $p < 0.05$)

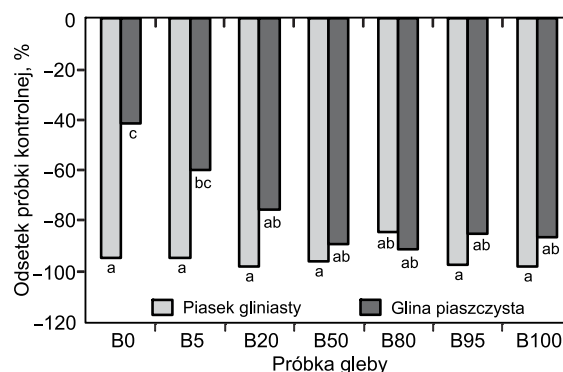


Rys. 7. Liczba mikroorganizmów celulolitycznych w piasku gliniastym i w glinie piaszczystej

Fig. 7. Number of cellulolytic microorganisms in loamy sand and sandy loam

wpływ obecności paliw odnotowano również w glinie piaszczystej (rys. 7 – dół), jednak w tym przypadku liczebność mikroorganizmów malała wraz ze wzrostem zawartości biodiesla w mieszaninie z olejem napędowym.

Średnia liczba mikroorganizmów celulolitycznych w piasku gliniastym w poszczególnych próbkach była stosunkowo niska i wynosiła od 70% do niewiele ponad ułamek procenta w stosunku do próbki kontrolnej (rys. 8). Niekorzystny wpływ paliw obserwowano również w glinie piaszczystej, podobnie jak w opisanych badaniach [11], zwłaszcza w próbkach B50 i B80 – średnio 89% i 91% mniej w stosunku do próbki kontrolnej. W doświadczeniach autorów pracy [21] aktywność celulolityczna w glebie zanieczyszczonej paliwami utrzymywała się w zakresie 95–97,5% aktywności próbki kontrolnej. Zmniejszenie liczby mikroorganizmów celulolitycznych może wpływać negatywnie na rozkład celulozy, która jest podstawowym składnikiem biomasy roślinnej. Jej biologiczna degradacja ma istotne znaczenie w obiegu węgla [25].



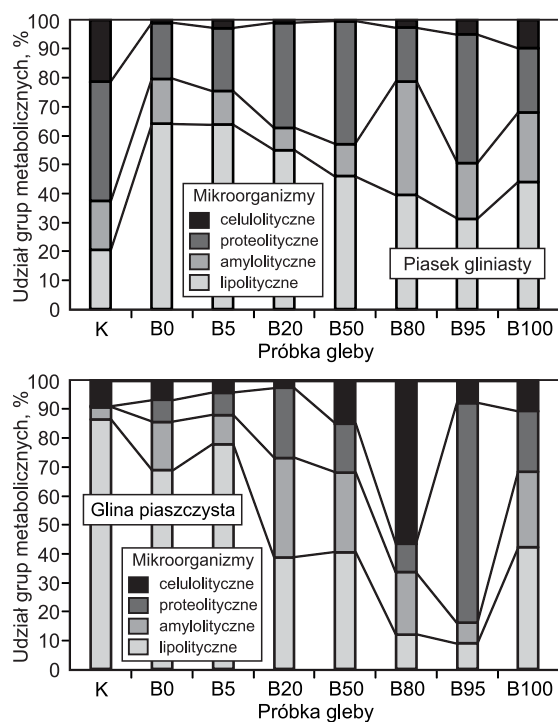
Rys. 8. Średnia liczba mikroorganizmów celulolitycznych w próbkach gleby zanieczyszczonej paliwami (odsetek w stosunku do próbki kontrolnej; wartości nieoznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie na poziomie $p < 0,05$)

Fig. 8. Average number of cellulolytic microorganisms (as percentage to the control; values marked with different letters differ significantly at $p < 0.05$)

W temperaturze odpowiadającej warunkom prowadzenia badań biologicznych ustalono, że paliwa różniły się nie tylko gęstością, ale przede wszystkim lepkością dynamiczną – oznaczona wartość tego wskaźnika w przypadku biodiesla wynosiła 6,07 mPa·s, a oleju napędowego 4,04 mPa·s. Lepkość paliw wpływa na ich zachowanie w glebie, przede wszystkim na proces adsorpcji, a więc na biodostępność składników zanieczyszczeń i ich oddziaływanie na mikroorganizmy, co mogło mieć również bezpośredni wpływ na zmiany obserwowane podczas omawianych badań. W glebach gliniastych, o większej zawartości związków organicznych, obserwuje się zwiększoną tendencję do adsorpcji zarówno składników odżywczych, jak i zanieczyszczeń, które następnie są powoli uwalniane do środowiska i stają się przyswajalne przez mikroorganizmy [26]. Gleby takie zapewniają więc korzystniejsze warunki do wzrostu i rozwoju autochtonicznych mikroorganizmów, wspomagają też ich przeżycie w obecności zanieczyszczeń [27] oraz przystosowanie się do nowych – zmienionych – warunków środowiskowych.

Zanieczyszczenie olejem napędowym, biodieslem lub ich mieszaniną powoduje zaburzenia równowagi biologicznej gleby [28, 29]. Przeprowadzone badania wykazały, że w piasku gliniastym niezanieczyszczone paliwem (K) najliczniejszą grupę ogółem stanowiły drobnoustroje proteolityczne, natomiast w glinie piaszczystej – lipolityczne. Zanieczyszczenie olejem napędowym spowodowało zmiany w składzie jakościowym mikrobiocenozy obu rodzajów gleby (rys. 9). Procentowy udział poszczególnych grup metabolicznych zmieniał się również zależnie od zawartości biodiesla w składzie zanieczyszczenia. Dominującymi grupami w glebie piaszczystej były mikroorganizmy lipolityczne i proteolityczne, natomiast w glebie gliniastej, w wybranych próbkach, również mikroorganizmy amylolityczne.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że wpływ biodiesla na mikrobiocenozę glebową był bardziej niekorzystny niż oleju napędowego. Biopaliwo wykorzystywane w badaniach, w skład którego wchodziły estry kwasów tłuszczowych syntetyzowane także w naturze [30], powinno stymulować wzrost i rozwój mikroorganizmów. Z badań wynika jednak, że biodiesel powodował inhibicję wzrostu podstawowych grup metabolicznych mikroorganizmów. Podczas produkcji biodiesla wprowadza się do niego między innymi stabilizatory,



Rys. 9. Udział procentowy poszczególnych grup metabolicznych mikroorganizmów w piasku gliniastym i glinie piaszczystej
Fig. 9. Percentage share of individual metabolic groups of microorganisms in loamy sand and sandy loam

depresatory oraz środki biobójcze, które mogą być odpowiedzialne za negatywną reakcję mikroflory. Ponadto istotnym składnikiem biopaliwa są również syntetyczne przeciwutleniacze, w tym butylohydroksytoluen (BHT), butylohydroksyanizol (BHA) czy tert-butylohydrochinon (TBHQ) [31,32]. Przeciwutleniacze te mają negatywny wpływ na drobnoustroje [33], ograniczając im dostępność do źródeł węgla [34]. W wyniku odwrócenia reakcji transestryfikacji w glebie może pojawiać się również toksyczny dla mikroorganizmów metanol [35,36].

Wyjaśnienia wymaga kwestia, czy reakcja drobnoustrojów na obecność biodiesla wynika bezpośrednio z toksycznego – jak się wydaje – oddziaływania paliwa na ich komórki, czy też ze zmian fizykochemicznych spowodowanych jego obecnością w glebie. Negatywne oddziaływanie biopaliw może być również efektem pojawiania się w glebie produktów ubocznych ich degradacji [12].

Podsumowanie

Obecność paliw w glebie modyfikowała skład jakościowo-ilościowy mikrobiocenozy glebowych, a w dłuższym czasie zmiany te miały na ogół charakter niekorzystny, ograniczając liczebność mikroorganizmów. Istotny wpływ na obserwowane zmiany miał rodzaj paliw, co mogło mieć bezpośredni związek z ich składem chemicznym, ale również poziom zanieczyszczenia i rodzaj gleb. W piasku gliniastym odnotowano negatywną reakcję ze strony wszystkich badanych grup drobnoustrojów, niezależnie od rodzaju zanieczyszczenia, a inhibicja utrzymywała się przez cały czas inkubacji. W glinie piaszczystej niekorzystne oddziaływanie badanych paliw dotyczyło głównie mikroorganizmów celulolitycznych, natomiast w przypadku pozostałych grup drobnoustrojów zwiększało się ono wraz ze wzrostem zawartości biopaliwa w glebie. Większa

zawartość związków organicznych w glebie sprzyjała rozwojowi mikrobiocenozy, mogła być więc czynnikiem ograniczającym negatywne oddziaływanie paliw w glinie piaszczystej, podobnie jak adsorpcja zanieczyszczeń na glebowych substancjach organicznych.

Badane paliwa, wpływając negatywnie na mikroorganizmy, oddziaływały również na procesy, w których uczestniczą te drobnoustroje – rozkład związków organicznych oraz uwalnianie pierwiastków biogennych i ich obieg w przyrodzie. Analizując wyniki badań stwierdzono, że biodiesel może ograniczać aktywność metaboliczną mikroorganizmów w większym stopniu niż paliwo konwencjonalne. Warto zwrócić uwagę, że biodiesel – zaliczany do biopaliw – jest jednak substancją obcą w środowisku, może więc powodować zmianę struktury gleby, jej pH, a podczas degradacji mogą pojawiać się toksyczne metabolity.

LITERATURA

1. R. von WEDEL: Technical Handbook for Marine Biodiesel. CytoCulture International, Point Richmond (USA) 1999.
2. A. DEMIRBAS: Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management* 2009, Vol. 50, No. 1, pp. 14–34.
3. A. DEMIRBAS: Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* 2007, Vol. 35, No. 9, pp. 4661–4670.
4. C.-Y. LIN, H.A. LIN, L.-B. HUNG: Fuel structure and properties of biodiesel produced by the peroxidation process. *Fuel* 2006, Vol. 85, No. 12–13, pp. 1743–1749.
5. S. FERNANDO, C. HALL, S. JHA: NO_x reduction from biodiesel fuels. *Energy Fuels* 2006, Vol. 20, No. 1, pp. 376–382.
6. X. ZHANG: Biodegradability of biodiesel in the aquatic and soil environments. Ph.D. dissertation, University of Idaho, Department of Biological and Agricultural Engineering, Moscow 1996.
7. X. ZHANG, C. PETERSON, D. REECE, R. HAWS, G. MOLLER: Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Transactions of the ASAE* 1998, Vol. 41, No. 5, pp. 1423–1430.
8. M. HAWROT-PAW, B. SMOLIK, A. KAMIENIECKA: Preliminary study of the efficiency of biodiesel biological decomposition with autochthonous soil microflora. *Ecological Chemistry and Engineering* 2011, Vol. 18, No. 11, pp. 1401–1406.
9. J.C. PASQUALINO, D. MONTANE, J. SALVADO: Synergic effect of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels. *Biomass and Bioenergy* 2006, Vol. 30, No. 10, pp. 874–879.
10. A. LAPINSKIENE, P. MARTINKUS, V. REBZDAITE: Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environmental Pollution* 2006, Vol. 142, No. 3, pp. 432–437.
11. M. HAWROT-PAW: Biologiczna aktywność gleb zanieczyszczonych biodieslem oraz możliwości ich rekultywacji. Wydawnictwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Szczecin 2011.
12. I.S. TAMADA, R.N. MONTAGNOLLI, P.R.M. LOPES, E.D. BIDOIA: Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012, Vol. 43, No. 4, pp. 1576–1581.
13. A. MONYEM, J.H. van GERPEN: The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biomass and Bioenergy* 2001, Vol. 20, No. 4, pp. 317–325.
14. A. DEMIRBAS: Biodiesel production from vegetable oil via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. *Progress in Energy and Combustion Science* 2005, Vol. 31, pp. 466–487.
15. M. BURBIANKA, A. PLISZKA: Mikrobiologia żywności. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1977.

16. W. KĘDZIA, H. KONIAR: Diagnostyka mikrobiologiczna. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1974.
17. D.G. CONNEY, R. EMERSON: Termophilic Fungi. Freeman and Co., London 1964.
18. W. MALISZEWSKA: Proponowana szczegółowa metodyka analiz mikrobiologicznych gleby. Instytut Upraw, Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy 1954.
19. M. HAWROT, A. NOWAK: Ocena wpływu dawki skażenia olejem napędowym i stosowanych zabiegów bioremediacyjnych na ilość biomasy żywych organizmów w glebie. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Agricultura* 2004, vol. 234, nr 93, ss. 123–130.
20. M. HAWROT-PAW, M. IZWIKOW: Ecotoxicological effects of biodiesel in the soil. *Journal of Ecological Engineering* 2015, Vol. 16, No. 5, pp. 34–39.
21. A. MAŁACHOWSKA-JUTSZ, J. MROZOWSKA, M. KOZIŁSKA, K. MIKSCH: Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi w procesie jej detoksykacji. *Biotechnologia* 1997, vol. 1, nr 36, ss. 79–91.
22. A. B. HARRISON, M. B. RIPLEY, R. K. DART, W. B. BETTS, A. J. WILSON: Effect of protein hydrolysate on the degradation of diesel fuel in soil. *Enzyme and Microbial Technology* 2000, Vol. 26, No. 5–6, pp. 388–393.
23. W. PRZYSTAŚ, K. MIKSCH, A. MAŁACHOWSKA-JUTSZ: Zmiany aktywności enzymatycznej gleby w procesie biodegradacji zanieczyszczeń naftowych przy użyciu biopreparatów. *Archiwum Ochrony Środowiska* 2000, vol. 2, nr 26, ss. 59–70.
24. R. MARGESIN, A. ZIMMERBAUER, F. SCHINNER: Soil lipase activity – a useful indicator of soil biodegradation. *Biotechnology Techniques* 1999, Vol. 13, No. 12, pp. 859–863.
25. J. PÉREZ, J. MUÑOZ-DORADO, T. de la RUBIA, J. MARTÍNEZ: Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *International Microbiology* 2002, Vol. 5, No. 2, pp. 53–63.
26. V. LABUD, C. GARCIA, T. HERNANDEZ: Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 2007, Vol. 66, No. 10, pp. 1863–1871.
27. D. MEYER, K. HECK, M. ANDRIGHETTI, F. BENTO: Microbial activity in two soils with different clay content contaminated by different diesel/biodiesel mixtures. *African Journal of Microbiological Research* 2015, Vol. 9, No. 17, pp. 1175–1183.
28. M. HAWROT-PAW, M. IZWIKOW: Microbiome of soil contaminated by fuels. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica* 2015, Vol. 322, No. (36)4, pp. 57–66.
29. M. HAWROT-PAW, A. WIJATKOWSKI, M. MIKICIUK: Influence of diesel and biodiesel-contaminated soil on microorganisms, growth and development of plants. *Plant, Soil and Environment* 2015, Vol. 61, No. 5, pp. 189–194.
30. A. LAPINSKIENE, P. MARTINKUS: Research of anaerobic biodegradation of fats, biodiesel fuel and diesel fuel in soil medium. *Environmental Research, Engineering and Management (EREM)* 2007, Vol. 1, No. 39, pp. 30–37.
31. D. BORSATO, J.R.M. CINI, H.C. SILVA, R.L. COPPO, K.G. ANGILELLI, I. MOREIRA, E.C.R. MAIA: Oxidation kinetics of biodiesel from soybean mixed with synthetic antioxidants BHA, BHT and TBHQ: Determination of activation energy. *Fuel Processing Technology* 2014, Vol. 127, pp. 111–116.
32. M.L. MEDEIROS, A.M.M.T. CORDEIRO, N. QUEIROZ, L.E.B. SOLEDADE, A.L. SOUZA, A.G. SOUZA: Efficient antioxidant formulations for use in biodiesel. *Energy Fuels* 2014, Vol. 28, No. 2, pp. 1074–1080.
33. N. OOI, I. CHOPRA, A. EADY, J. COVE, R. BOJAR, A. J. O'NEIL: Antibacterial activity and mode of action of *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) and its oxidation product, *tert*-butylbenzoquinone (TBBQ). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013, Vol. 68, No. 6, pp. 1297–1304.
34. D. WIECZOREK, O. MARCHUT-MIKOLAJCZYK, B. STRZELECKI, M. GAJEWSKA, A. POLEWCZYK, T. ANTCHAK: The effect of *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) on biodiesel bioremediation in soil samples inoculated with bacterial cells. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2016, Vol. 115, pp. 205–211.
35. M.B. LEITE, M.M. de ARAÚJO, I.A. NASCIMENTO, A.C. da CRUZ, S.A. PEREIRA, N.C. do NASCIMENTO: Toxicity of water-soluble fractions of biodiesel fuels derived from castor oil, palm oil, and waste cooking oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2011, Vol. 30, No. 4, pp. 893–897.
36. A.C. da CRUZ, M.B. LEITE, L.E. RODRIGUES, I.A. NASCIMENTO: Estimation of biodiesel cytotoxicity by using acid phosphatase as a biomarker of lysosomal integrity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2012, Vol. 89, No. 2, pp. 219–224.

Hawrot-Paw, M., Martynus, M., Koniuszy, A. Microbial Metabolic Activity of Soils Contaminated with Diesel Oil and Biodiesel. *Ochrona Środowiska* 2017, Vol. 39, No. 3, pp. 25–30.

Abstract: The paper presents results of the research on the influence of fuels on numbers of selected metabolic groups of soil microorganisms. Response of proteolytic, amylolytic, lipolytic and cellulolytic microorganisms to the presence of diesel oil, biodiesel and their mixtures in soil at the concentration of 5% (w/w per dry mass of soil) was analyzed. The research was carried out on soils with varied mechanical composition (loamy sand and sandy loam) and organic matter content. Negative response of all microbial groups in the loamy sand was noted, regardless of contamination type, and the inhibition was maintained throughout the whole incubation period. In

the sandy loam, the adverse impact of fuels was demonstrated mainly for cellulolytic microorganisms, while for other microbial groups it increased with the biodiesel soil content. The higher soil organic matter content facilitated development of microbiocenoses. It could therefore limit adverse impact of fuels in sandy clay, similarly to adsorption of contaminants on the soil organic matter. Analysis of the research results indicates that biodiesel might limit metabolic activity of microorganisms to a higher extent than conventional fuel. Biodiesel as a biofuel is a foreign substance in the environment and may therefore trigger changes in the soil structure and its pH as well as toxic metabolite production upon its degradation.

Keywords: Proteolytic microorganisms, amylolytic microorganisms, lipolytic microorganisms, cellulolytic microorganisms, contaminated soil, diesel oil, biodiesel.