

ZNACZENIE MIKROORGANIZMÓW OSADOWYCH W
PRZEMIANACH AZOTU
W GLEBIE BIELICOWEJ WZBOGAČONEJ OSADEM ŚCIEKOWYM

JOLANTA JONIEC¹, JADWIGA FURCZAK², STANISŁAW BARAN³

¹Katedra Inżynierii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski, ul. Ofiar Katynia 6a,
37-450 Stalowa Wola,

²Katedra Mikrobiologii Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
ul. Leszczyńskiego7, 20-069 Lublin

³Instytut Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Leszczyńskiego7, 20-069 Lublin
Adres e-mail do korespondencji: jolajoniec1@gmail.com

Słowa kluczowe: Gleba, osad sterylny i niesterylny, bakterie i grzyby proteolityczne, amonifikacja, nityfikacja, proteaza.

Streszczenie: Doświadczenie laboratoryjne założono na glebie bielcowej w dwóch wariantach. W jednym z nich do ww. gleby wprowadzono niesterylny osad ściekowy, a w drugim ten sam osad, ale poddany uprzednio procesowi sterylizacji. W obu wariantach wprowadzono identyczne dawki osadu: 30 (1%), 75 (2,5%), 150 (5%), 300 (10%) i 600 Mg·ha⁻¹(20%). Następnie po upływie 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5-ciu miesięcy w glebie obu wariantów analizowano: liczebność bakterii i grzybów rozkładających białko, nasilenie procesu amonifikacji, nasilenie procesu nityfikacji oraz aktywność proteolityczną. Uzyskane wyniki wykazały stymulujący wpływ zarówno niesterylnego, jak i sterylnego osadu na liczebność badanych grup drobnoustrojów oraz nasilenie nityfikacji i aktywność proteazy. Jedynie proces amonifikacji podlegał hamowaniu. Odnotowane oddziaływanie najwyraźniej zaznaczyło się w przypadku większych dawek osadów. Istotnie wyższa liczebność grzybów rozkładających białko oraz aktywność prawie wszystkich (wyj. amonifikacja), analizowanych parametrów biochemicznych w glebie z osadem niesterylnym niż sterylnym wskazuje na udział mikroorganizmów pochodzenia osadowego w kształtowaniu mikrobiologicznych przemian azotu w glebie wzbogaconej osadem.

WSTĘP

Oddziaływanie osadu ściekowego na liczebność mikroorganizmów i aktywność biochemiczną gleby związanej z przemianami azotu w warunkach laboratoryjnych i polowych było już niejednokrotnie przedmiotem badań [3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 26]. Jednak były to prace fragmentaryczne, a ponadto nie analizowano w nich udziału w tych przemianach mikroorganizmów pochodzących z osadu. Jedynie Bonmati i in. [5] podjęli próbę w tym zakresie, jednakże ich badania dotyczyły tylko

procesu amonifikacji i nityfikacji. Niniejsze badania są częścią szerszej zakrojonych badań nad kierunkiem i natężeniem zmian w aktywności mikrobiologicznej i biochemicznej gleby wzbogaconej osadem ściekowym oraz rolą mikroorganizmów osadowych w tej aktywności. W poprzedniej pracy [13] zaprezentowano wyniki badań związane z przemianami węglowej, osadowej materii organicznej. Natomiast w niniejszych badaniach skoncentrowano się na kierunku i natężeniu przemian związków azotowych w glebie z osadem oraz udziale w nich mikroorganizmów osadowych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał glebowy użyty w tych badaniach pochodził z poziomu Ap gleby biellicowej, wytworzonej z piasku słabo gliniastego. Natomiast osad ściekowy pobrano z Mechaniczno-Biologicznej Oczyszczalni Ścieków w Końskich. Wybrane właściwości fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne gleby oraz osadu ściekowego zestawiono w Tabeli 1 za Baran i in. [1], Baran i in. [2] oraz Oleszczuk i Baran [19].

Tabela 1. Właściwości gleby i osadu ściekowego użytych w doświadczeniu

Właściwości	Jednostka		Gleba	Osad
Skład granulometryczny	% frakcji w mm	1-0,1	86,0	
		0,1-0,02	7,0	
		< 0,02	7,0	
pH	1 mol · dm ⁻³ KCl		6,0	6,4
T	mmol (+) · kg ⁻¹		71,3	607,7
C-organiczny (C _{org.})	g · kg ⁻¹		11,2	210,0
N-total (N _t)			1,4	17,8
C _{org.} : N _t			7,9	11,8
Cd zawartość	mg · kg ⁻¹		0,5	6,0
Cu zawartość			7,0	216,0
Pb zawartość			18,6	125,0
Suma 16 PAHs	μg · kg ⁻¹		43,0	3 894,0

Świeżą glebę przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm, a powietrznie suchy osad (zgodnie z powszechnie stosowaną procedurą w tego typu badaniach) rozdrobniono i przesiano przez sito o średnicy oczek 0,75 mm.

Doświadczenie laboratoryjne założono w dwóch wariantach. W jednym z nich do 1 kilogramowych naważek gleby, umieszczonych w szklanych pojemnikach przykrytych perforowanym wieczkiem umożliwiającym wymianę gazową, wprowadzono niesterylny osad w następujących dawkach: 30 Mg·ha⁻¹ (1%); 75 Mg·ha⁻¹ (2,5%); 150 Mg·ha⁻¹ (5%); 300 Mg·ha⁻¹ (10%) i 600 Mg·ha⁻¹ (20%) suchej masy. Natomiast w drugim wariacie zastosowano analogiczne dawki osadu wysterylizowanego termicznie. Osad sterylizowano w autoklawie (30 min., 0,1 HPa) trzykrotnie w odstępach dobowych [5]. Kontrolę doświadczenia stanowiła gleba bez dodatku osadu. Tak przygotowane próbki glebowe nawilżono do około 60% c.p.w. i inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 5 miesięcy, utrzymując zbliżony do ww. poziom wilgotności. Analizy mikrobiologiczne, biochemiczne oraz pH_{KCl} określano po 0,5, 1, 2, 3, 4 i 5-ciu miesiącach

trwania doświadczenia. Przed przystąpieniem do doświadczenia ww. analizami objęto również jednorazowo osad ściekowy.

Przeprowadzone analizy obejmowały określanie: liczebności bakterii rozkładających białko na podłożu żelatynowym Fraziera [21]; liczebności grzybów rozkładających białko na podłożu żelatynowym Fraziera [21], z dodatkiem antybiotyków w ilości zalecanej przez Martina [16]; nasilenia amonifikacji w 25-gramowych naważkach gleby zawierających 0,1% asparaginy, (po 3 dniach inkubacji jony amonowe ekstrahowano i określano ich zawartość metodą Nesslera [18]; nasilenia nitryfikacji w 25-gramowych naważkach zawierających 0,1% fosforanu jednoamonowego, (po 7 dniach inkubacji jony azotanowe ekstrahowano i mierzono ich poziom metodą brucynową [18]; aktywności proteazy zgodnie z metodą Ladda i Butlera [15]; odczyn potencjometrycznie w $1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ KCl.

Wszystkie analizy przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Wyniki okresowych analiz mikrobiologicznych i biochemicznych poddano opracowaniu statystycznemu metodą analizy wariancji. Istotność różnic określono testem Tuckey'a, przy $p = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Wzbogacenie gleby osadem niesterylnym i sterylnym skutkowało istotnym pobudzeniem rozwoju bakterii proteolitycznych (Tab. 2). Oddziaływanie to najwyraźniej uwidoczniło się pod wpływem wyższych dawek odpadu i wykazywało pewne wahania. Osad niesterylny wywarł największy wpływ po upływie pierwszego miesiąca, podczas gdy osad sterylny po upływie 1-go, 2-go i 4-go miesiąca. W pozostałych terminach pobudzenie rozwoju bakterii rozkładających białko utrzymywało się na niższym, na ogół zbliżonym poziomie.

Pobudzenie przez niesterylny osad ściekowy rozwoju analizowanej grupy drobnoustrojów w próbkach glebowych stwierdziły dotychczas jedynie Furczak i Joniec [7], w badaniach laboratoryjnych o charakterze metodycznym.

Z badań Hattori'ego i Mukai [11] wynika, że osady ściekowe są bogatym źródłem białka. Dlatego też odnotowana w niniejszym doświadczeniu stymulacja rozwoju bakterii proteolitycznych była prawdopodobnie wywołana głównie wzbogaceniem gleby w białko pochodzenia osadowego, będące źródłem pokarmu dla tej grupy drobnoustrojów. Kolejnym czynnikiem, który mógł częściowo przyczynić się do przyspieszenia rozwoju analizowanej grupy bakterii był zapewne wzrost pH gleby (Tab. 3).

Z danych zawartych w tabeli 4 wynika, że użyty w tym doświadczeniu osad ściekowy był licznie zasiedlony przez bakterie proteolityczne. W związku z tym wniesiono z nim do gleby pewną liczbę tych drobnoustrojów. Jednak mniejsza liczba bakterii proteolitycznych w glebie z osadem niesterylnym niż sterylnym (Tab. 2) świadczyłaby, że osadowe bakterie proteolityczne nie znalazły w niej dogodnych warunków rozwoju i ulegały stopniowemu obumarciu. O możliwości zamierania drobnoustrojów wnoszonych do gleby z osadem donoszą Sastre i in. [22]. Dodatkowo mikroorganizmy pochodzenia osadowego mogły początkowo oddziaływać niekorzystnie na analizowaną grupę bakterii glebowych, osłabiając pozytywny efekt zastosowania osadu. Podobne obserwacje odnotowano w odniesieniu do bakterii oligotroficznych i makrotroficznych wprowadzonych z osadem do gleby [13].

Tabela 2. Liczebność bakterii proteolitycznych, $\text{jtk} \cdot 10^6 \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. gleby

Kombinacje doświadczalne	Czas działania osadu na glebę, miesiące					Średnie dla kombinacji	Średnie dla dawki	Średnie dla rodzaju osadu
	0.5	1	2	3	4			
Gleba kontrolna	2.3	1.4	2.6	1.8	1.8	3.3	2.2	2.2
Gleba +1% osadu	9.0	2.8	4.1	6.1	4.0	9.8	6.0	7.7
Gleba +2,5% osadu	8.4	8.8	15.9	6.1	10.0	14.1	10.6	12.6
Gleba +5% osadu	11.4	13.4	16.7	6.5	8.2	25.3	13.6	17.2
Gleba +10% osadu	15.7	13.8	9.2	8.7	13.0	20.4	13.5	20.6
Gleba +20% osadu	17.9	18.3	19.3	13.1	21.5	21.0	18.5	23.8
Gleba +1% osadu	8.5	10.4	17.3	3.3	8.5	8.6	9.4	
Gleba +2,5% osadu	10.7	10.8	27.6	1.1	19.9	18.1	14.7	
Gleba +5% osadu	12.3	28.5	38.7	2.7	25.8	17.2	20.8	17.3
Gleba +10% osadu	11.6	6.4	57.2	15.6	47.4	28.7	27.8	
Gleba +20% osadu	15.1	48.6	39.1	17.6	31.3	22.2	29.0	
Średnie dla terminu	10.4	13.7	20.9	7.0	16.1	16.0		

NIR_(0.05): termin (T) – 2.3; sterylność (S) – 0.9; dawka (D) – 2.3

Interakcje: T x S – 3.7; T x D – 7.0; S x D – 3.7; T x S x D – 9.9

Tabela 3. Odczyn gleby, pH_{KCl}

Kombinacje doświadczalne		Zakres
Gleba kontrolna		5,9 – 6,0
Gleba +1% osadu	Seria z osadem niesterylnym	5,6 – 6,0
Gleba +2,5% osadu		5,9 – 6,7
Gleba +5% osadu		6,1 – 6,6
Gleba +10% osadu		6,5 – 6,8
Gleba +20% osadu		6,5 – 6,6
Gleba +1% osadu		5,8 – 6,6
Gleba +2,5% osadu	Seria z osadem sterylnym	6,3 – 6,8
Gleba +5% osadu		6,5 – 6,8
Gleba +10% osadu		6,6 – 6,7
Gleba +20% osadu		6,5 – 6,8

Tabela 4. Wybrane właściwości mikrobiologiczne i biochemiczne osadu ściekowego, użytego w doświadczeniu

Bakterie proteolityczne, $jtk \times 10^9 \times kg^{-1}s.m. osadu$	11,60
Grzyby proteolityczne, $jtk \times 10^6 \times kg^{-1}s.m. osadu$	308,10
Amonifikacja, $mg N-NH_4 \times kg^{-1}s.m. osadu \times 3d^{-1}$	213,33
Nitryfikacja, $mg N-NO_3 \times kg^{-1}s.m. osadu \times 7d^{-1}$	1617,77
Proteaza , $mg tyrozyny \times kg^{-1}s.m. osadu \times h^{-1}$	131,60

Silniejsze pobudzenie rozwoju bakterii proteolitycznych w glebie z osadem sterylnym było prawdopodobnie spowodowane częściowo dostarczeniem wraz z tym odpadem do gleby dodatkowego źródła pokarmu, tj. obumarłych w procesie sterylizacji mikroorganizmów. Do podobnych wniosków doszli we wcześniejszych badaniach Sastre i in. [22]. Kolejną przyczyną tego zjawiska mógł być brak ujemnych oddziaływań między rodzimymi bakteriami proteolitycznymi, a zespołem mikroorganizmów pochodzenia osadowego.

Podobnie jak w przypadku bakterii rozkładających białko obydwa rodzaje zastosowanego osadu spowodowały stymulację rozwoju grzybów proteolitycznych (Tab. 5). Efekt ten uwidocznił się najwyraźniej w początkowej fazie doświadczenia (tj. po upływie 0,5 i 1 miesiąca) i obserwowany był na ogół w kombinacjach z wyższymi dawkami. W pozostałych terminach badawczych jedynie wyższe dawki osadu niesterylnego wywołały wzrost liczby omawianej grupy drobnoustrojów, jednak nie zawsze był on istotny statystycznie. Zjawisko to utrzymywało się na ogół na zbliżonym poziomie do końca trwania doświadczenia (Tab. 5). Zagadnieniu temu nie poświęcono dotychczas uwagi. Jedynie Furczak i Joniec [7] w metodycznym doświadczeniu laboratoryjnym zarejestrowały podobne oddziaływanie osadu na liczbę grzybów rozkładających białko.

Odnotowany, analogicznie jak w przypadku bakterii, pozytywny wpływ osadu ściekowego na liczbę grzybów proteolitycznych, był zapewne głównie skutkiem wzbogacenia gleby w białko.

Tabela 5. Liczebność grzybów proteolitycznych, jtk10⁶·kg⁻¹ s.m. gleby

Kombinacje doświadczalne	Czas działania osadu na glebę, miesiące					Średnie dla kombinacji	Średnie dla dawki	Średnie dla rodzaju osadu
	0.5	1	2	3	4			
Gleba kontrolna	14.8	10.9	27.6	10.9	51.0	39.8	25.8	25.8
Gleba +1% osadu	48.3	76.2	29.5	14.9	84.4	47.0	50.0	40.8
Gleba +2,5% osadu	44.9	36.8	36.2	22.8	55.5	33.3	38.3	39.6
Gleba +5% osadu	64.8	29.8	34.1	15.4	50.6	49.0	40.6	38.2
Gleba +10% osadu	81.7	95.7	91.6	31.8	85.1	113.8	83.3	65.0
Gleba +20% osadu	166.2	70.6	77.1	33.9	125.5	98.7	95.3	72.9
Gleba +1% osadu	22.2	10.8	48.0	11.1	37.0	60.6	31.6	
Gleba +2,5% osadu	67.1	46.8	26.4	11.2	33.1	61.4	41.0	
Gleba +5% osadu	72.5	18.8	30.6	11.4	33.6	47.5	35.7	38.6
Gleba +10% osadu	58.0	45.0	15.8	35.1	46.7	80.3	46.8	
Gleba +20% osadu	83.4	81.0	31.9	16.7	50.1	39.6	50.5	
Średnie dla terminu	61.6	44.4	39.7	18.8	58.6	59.2		

NIR_(0.05): T – 12.6; S – 5.0; D – 12.6

Interakcje: T x S – 20.4; T x D – 38.3; S x D – 20.4; T x S x D – 54.1

Objaśnienia jak do tab. 2.

Tabela 6. Nasilenie amonifikacji, mg N-NH₄ · kg⁻¹s.m. gleby · 3d⁻¹

Kombinacje doświadczalne	Czas działania osadu na glebę, miesiące						Średnie dla kombinacji	Średnie dla dawki	Średnie dla rodzaju osadu
	0.5	1	2	3	4	5			
Gleba kontrolna	301.97	88.80	184.04	272.62	255.93	172.63	212.66	212.66	
Gleba +1% osadu	291.30	68.06	190.51	298.53	249.68	187.48	214.26	213.25	
Gleba +2,5% osadu	270.66	60.31	206.19	312.27	226.53	216.64	215.38	214.40	196.88
Gleba +5% osadu	263.35	62.04	181.85	280.23	221.08	181.94	198.41	198.35	
Gleba +10% osadu	198.64	37.79	158.97	312.16	196.35	134.67	173.10	176.80	
Gleba +20% osadu	107.29	30.84	170.48	310.51	236.73	148.84	167.45	149.79	
Gleba +1% osadu	306.14	76.85	203.80	276.71	239.32	170.65	212.24		
Gleba +2,5% osadu	287.88	88.73	218.06	251.31	250.79	183.70	213.41		
Gleba +5% osadu	297.12	66.58	196.10	272.01	192.05	165.80	198.28		191.54
Gleba +10% osadu	243.27	66.51	172.14	244.14	205.99	150.94	180.50		
Gleba +20% osadu	96.71	30.47	90.25	254.34	205.79	115.25	132.14		
Średnie dla terminu	247.19	63.82	179.70	279.79	228.02	166.74			

NIR_(0,05): T – 10.54; S – 4.18; D – 10.54

Interakcje: T x S – 17.09; T x D – 32.11; S x D – 17.09; T x S x D – 45.41

Objaśnienia jak do tab. 2.

Tabela 7. Nasilenie nitryfikacji, mg N=NO₃ · kg⁻¹s.m. gleby · 7d⁻¹

Kombinacje doświadczenia	Czas działania osadu na glebę, miesiące					Średnie dla kombinacji	Średnie dla dawki	Średnie dla rodzaju osadu
	0.5	1	2	3	4			
Gleba kontrolna	156.59	148.92	455.89	135.67	167.72	99.56	194.06	
Gleba +1% osadu	241.68	241.85	660.66	231.90	345.78	210.52	322.06	
Gleba +2,5% osadu	669.75	366.07	1120.08	369.13	707.31	447.32	613.28	665.67
Gleba +5% osadu	765.36	571.45	1205.35	677.59	791.84	646.28	776.31	765.81
Gleba +10% osadu	1068.19	808.18	1229.71	787.94	922.54	917.84	955.73	928.59
Gleba +20% osadu	1216.78	942.84	1349.17	942.93	1153.62	1190.14	1132.58	1077.98
Gleba +1% osadu	281.94	150.23	761.18	262.75	230.18	216.34	317.10	
Gleba +2,5% osadu	415.94	215.49	1000.92	386.58	641.16	332.34	498.74	
Gleba +5% osadu	872.00	562.78	1242.12	564.24	642.67	649.30	755.31	615.01
Gleba +10% osadu	1045.35	684.33	1272.08	813.52	860.39	734.77	901.45	
Gleba +20% osadu	1177.49	762.17	1413.02	909.24	998.71	881.72	1023.38	
Średnie dla terminu	672.30	466.94	1013.84	518.10	635.39	535.47		

NIR_(0.05): T – 21.24; S – 8.43; D – 21.24

Interakcje: T x S – 34.43; T x D – 64.67; S x D – 34.43; T x S x D – 91.45

Objasnienia jak do tab. 2.

Jest prawdopodobne, że część wniesionych z osadem grzybów proteolitycznych (Tab. 4), w przeciwieństwie do bakterii, znalazła dogodny warunki rozwoju w glebie i przyczyniła się do zwiększenia ogólnej puli tych drobnoustrojów. Wskazuje na to większa i dłużej utrzymująca się ich liczba w obiektach wzbogaconych osadem niesterylnym niż sterylnym (Tab. 5).

Dane przedstawione w tabeli 6 wskazują na obniżenie zarówno przez osad niesterylny jak i sterylny nasilenia amonifikacji.

Oslabienie mineralizacji azotu organicznego przez obydwaj rodzaje osadu (Tab. 6) najwyraźniej zaznaczyło się w początkowej fazie doświadczenia (0,5 i 1 miesiąc), przy czym statystycznie istotne było tylko w kombinacjach z najwyższą jego zawartością (10 i 20%). W kolejnych miesiącach niekorzystny wpływ osadu wyraźnie osłabił, a nawet zaobserwowano okresowo niewielkie pobudzenie amonifikacji, jednak nie było ono poparte statystycznie. W przypadku osadu sterylnego negatywne oddziaływanie wyższych jego dawek utrzymywało się do końca trwania doświadczenia (Tab. 6).

Uzyskane przez innych autorów wyniki [3, 5, 7, 10, 12, 14, 26] dotyczące oddziaływania osadów ściekowych na mineralizację azotu są niejednoznaczne. Beltran-Hernandez i in. [3], Bonmati i in. [5], Furczak i Joniec [7], Hattori [10], Kobus i in. [14] oraz Wong i in. [26], w przeciwieństwie do niniejszych badań, odnotowali wzrost natężenia amonifikacji, na ogół słabnący z upływem czasu. Natomiast Wong i in. [26] oraz Beltran-Hernandez i in. [3] zarejestrowali w niektórych kombinacjach spadek aktywności omawianego procesu. Niektórzy z tych autorów [7, 10, 12, 14, 26] stwierdzili ponadto dodatnią lub ujemną zależność amonifikacji od ilości osadu wprowadzonego do gleby. Obserwowane w niniejszych badaniach ograniczenie tempa mineralizacji azotu organicznego mogło być skutkiem niekorzystnego oddziaływania na ten proces szkodliwych składników osadu. Z danych zamieszczonych w tabeli 1 wynika bowiem, że zastosowany w niniejszym doświadczeniu osad ściekowy zawierał m.in. metale ciężkie oraz WWA. O ujemnym wpływie zanieczyszczeń chemicznych na amonifikację donoszą Giller i in. [9]. Efekt ten mógł być ponadto wywołany jednoczesnym wzrostem nasilenia nityfikacji (Tab. 7), podczas której zachodziło intensywne utlenianie jonów amonowych do azotanowych, przyczyniające się tym samym do zmniejszenia zawartości produktu amonifikacji.

Odnotowane w badaniach własnych osłabienie negatywnego oddziaływania osadu wraz z upływem czasu mogło być skutkiem transformacji tych zanieczyszczeń oraz wyselekcjonowaniem się bardziej odpornych na nie amonifikatorów.

Autorzy na podstawie uzyskanych wyników (Tab. 6) nie odnotowali istotnej różnicy w przebiegu procesu amonifikacji w glebie wzbogaconej osadem niesterylnym i sterylnym. Do podobnych wniosków doszli w swoich badaniach również Bonmati i in. [5].

Wprowadzone do gleby osady wywołały narastające wraz z dawką, istotne nasilenie procesu nityfikacji (Tab. 7).

W obu wariantach doświadczenia przez okres pierwszych czterech miesięcy oddziaływanie to (z wyj. 2-go miesiąca) utrzymywało się na ogół na zbliżonym poziomie (Tab. 7). Największą stymulację nityfikacji stwierdzono w końcowej fazie badań, ale najczęściej w obiektach z wyższymi dawkami osadu (5, 10 i 20%).

Pobudzenie utleniania azotu amonowego przez osad w warunkach laboratoryjnych odnotowało również wielu innych autorów [3, 5, 7, 10, 12, 14, 26]. Beltrand-Hernandez i in. [3] oprócz stymulacji zaobserwowali hamowanie przez osad przebiegu tego procesu w początkowej fazie doświadczenia.

Tabela 8. Aktywność proteazy, mg tyrozyny · kg⁻¹s.m. gleby · h⁻¹

Kombinacje doświadczalne	Czas działania osadu na glebę, miesiąc					Średnie dla kombinacji	Średnie dla dawki	Średnie dla rodzaju osadu
	0.5	1	2	3	4			
Gleba kontrolna	6.76	11.14	12.54	1.42	11.46	3.37	7.78	
Gleba +1% osadu	14.81	17.12	22.88	4.52	10.01	6.42	10.70	
Gleba +2,5% osadu	22.96	28.53	26.75	5.62	14.68	11.20	14.73	19.83
Gleba +5% osadu	34.49	23.76	38.56	10.46	14.25	6.57	16.45	
Gleba +10% osadu	39.59	36.76	46.38	13.68	16.54	12.33	19.34	
Gleba +20% osadu	50.88	38.78	57.44	17.17	11.73	12.19	22.33	
Gleba +1% osadu	11.17	14.09	15.61	4.45	5.67	1.62	8.77	
Gleba +2,5% osadu	17.82	19.44	12.18	5.01	3.71	8.91	11.18	
Gleba +5% osadu	19.86	16.85	19.69	6.30	2.14	4.50	11.56	10.62
Gleba +10% osadu	25.45	12.09	18.03	3.50	2.64	5.08	11.13	
Gleba +20% osadu	23.36	18.38	17.23	3.69	7.98	9.15	13.30	
Średnie dla terminu	22.86	20.67	24.99	6.44	9.36	7.06		

NIR_(0,05): T – 0.94; S – 0.37 D – 0.94

Interakcje: T x S – 1.52; T x D – 2.89; S x D – 1.52; T x S x D – 4.03

Objasnienia jak do tab. 2.

Obserwowana w niniejszej pracy stymulacja nityfikacji była prawdopodobnie związana z wprowadzeniem do gleby wraz z osadem substratu i pewnej ilości drobnoustrojów przeprowadzających ten proces. Przypuszczenie to potwierdzają dane zamieszczone w tabeli 1 wskazujące, że nasilenie nityfikacji w zastosowanym osadzie ściekowym kształtowało się na wysokim poziomie. O występowaniu w osadach ściekowych nityfikatorów oraz dużej ilości jonów amonowych donosi również Wielgosz [24, 25]. Na stymulację analizowanego procesu mogła mieć również wpływ poprawa warunków bytowania nityfikatorów, tj. wzrost odczynu gleby (Tab. 3).

Istotnie większe pobudzenie nityfikacji w glebie z odpadem niesterylnym sugeruje, że w utlenianiu azotu amonowego pewną rolę odgrywają również nityfikatory wniesione wraz z osadem. Natomiast Bonmati i in. [5] nie stwierdzili istotnych różnic w natężeniu tego procesu pomiędzy glebą wzbogaconą osadem niesterylnym i sterylnym.

Wyniki dotyczące aktywności proteazy wskazują na jej istotny wzrost w glebie wzbogaconej osadem niesterylnym i sterylnym (Tab. 8). W czasie pierwszych trzech miesięcy trwania doświadczenia stymulujący wpływ osadu niesterylnego potęgował się wraz ze wzrostem zawartości odpadu, przyjmując najwyższe wartości w obecności 10 i 20 %. Analizując zmiany natężenia oddziaływania tego osadu w miarę upływu czasu stwierdzono, że najsilniejsze pobudzenie uwidoczniło się dopiero po 3 miesiącach (Tab. 8). W końcowej fazie, tj. po 4 miesiącach stymulacja aktywności proteolitycznej zdecydowanie osłabła, nasilając się nieco w ostatnim terminie analiz (po 5 miesiącach).

W serii z osadem sterylnym aktywność proteazy podlegała również stymulacji, jednak była ona zdecydowanie słabsza niż w glebie wzbogaconej osadem niesterylnym (Tab. 8). Po upływie 4 miesięcy odnotowano nawet niewielkie, jednak poparte statystycznie hamowanie aktywności omawianego enzymu.

Pobudzenie aktywności proteolitycznej gleby z osadem ściekowym w warunkach laboratoryjnych odnotowali również Furczak i Joniec [7], Hattori [10], Pascual i in. [20], oraz Saviozzi i in. [23]. Ponadto Furczak i Joniec [7], Pascual i in. [20] oraz Saviozzi i in. [23] wykazali zależność tych zmian od wielkości dawki osadu.

Z badań ww. autorów wynika, że wzrost omawianej aktywności, podobnie jak w niniejszych badaniach, był najsilniejszy na początku doświadczenia i słabł wraz z upływem czasu [7, 10, 19, 23].

Dane literaturowe wskazują, że aktywność proteolityczna gleby zależy od poziomu węgla i azotu organicznego oraz odczynu tego środowiska [4, 6, 8, 10]. Z badań Żukowskiej i in. [27] wynika, że zastosowane analogiczne dawki osadu ściekowego przyczyniły się do wyraźnego wzrostu zawartości węgla ogółem. Wyniki zawarte w tabeli 3 informują, że wprowadzenie do gleby osadu ściekowego spowodowało w niej również wzrost pH. Było to zapewne główną przyczyną pobudzenia syntezy proteazy. Kolejną przyczyną wzrostu aktywności proteolitycznej gleby wydaje się być dostarczenie wraz z osadem niesterylnym enzymów proteolitycznych (Tab. 4) oraz częściowe zasiedlenie gleby przez osadowe grzyby proteolityczne (Tab. 5).

Natomiast proces sterylizacji osadu spowodował zniszczenie obecnych w nim mikroorganizmów proteolitycznych oraz wolnych proteaz, co skutkowało istotnie niższą stymulacją omawianej aktywności w glebie z tym osadem.

Uzyskane wyniki wskazują, że osadowe drobnoustroje mogą częściowo współuczestniczyć w procesach związanych z przemianami azotu w glebie. Podobne obserwacje przeprowadzono w odniesieniu do mikrobiologicznych przemian osadowej, węglowej materii organicznej [13].

WNIOSKI

1. Wprowadzony do gleby osad niesterylny i sterylny spowodował stymulację rozwoju bakterii i grzybów proteolitycznych. Efekt ten wyraźniej zaznaczył się pod wpływem wyższych dawek osadu. Niższa liczebność bakterii proteolitycznych w wariacie doświadczenia z osadem niesterylnym niż sterylnym sugeruje, że bakterie pochodzenia osadowego raczej nie zasiedliły gleby, co mogło być efektem antagonistycznych oddziaływań. Natomiast wyższa liczebność grzybów rozkładających białko w glebie z osadem niesterylnym może świadczyć, że niektóre grzyby osadowe znalazły w glebie dogodne warunki bytowania.
2. Proces amonifikacji podlegał istotnemu hamowaniu, utrzymującemu się na zbliżonym poziomie w obu wariantach doświadczenia. Wskazuje to na brak wpływu wniesionych z osadem ściekowym amonifikatorów na przebieg tej aktywności w glebie.
3. Wzbogacenie gleby osadem niesterylnym i sterylnym skutkowało narastającą wraz z jego dawką, istotną statystycznie stymulacją nasilenia procesu nityfikacji. Istotnie wyższy poziom tego parametru w glebie z osadem niesterylnym niż sterylnym pozwala przypuszczać, że pewną rolę w procesie nityfikacji w glebie odegrały również nityfikatory pochodzenia osadowego.
4. Wszystkie dawki osadu niesterylnego i sterylnego spowodowały statystycznie istotne pobudzenie aktywności proteolitycznej gleby. Wyższa aktywność proteazy w glebie z osadem niesterylnym sugeruje, że w kształtowaniu tego parametru mogły mieć pewne znaczenie osadowe grzyby proteolityczne oraz wolne proteazy wprowadzone z tym odpadem.
5. Uzyskane wyniki wskazują, że większość badanych aktywności związanych z przemianami azotu w glebie może być wspomagana przez jakiś czas przez mikroorganizmy osadowe i zawarte w nich enzymy.

LITERATURA

- [1] Baran S., E., J. Bielińska, A. Wójcikowska-Kapusta: *Effect of willow culture on dehydrogenase and phosphatase activity and on lead content in podzolic soil amended with sewage sludge*, Folia Univer. Agric. Stetin., 211, Agric. **84**, 19–24, (2000).
- [2] Baran S., A. Wójcikowska-Kapusta, T. Milczarek: *Sanitation of cadmium contaminated soil with use of willow*, Chem. Agricult., **4**, 461–468, (2003).
- [3] Beltran-Hernandez R.I., E. Coss-Munoz, M.L. Luna-Guido, F. Mercado-Garcia, C. Siebe, L. Dendooven: *Carbon and nitrogen dynamics in alkaline saline soil of the Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge*, Europ. J. Soil Sci., **50**, 601–608, (1999).
- [4] Bielińska E.J., G. Żukowska: *Protease activity in light soil amended with sewage sludge*, Acta Agroph., **70**, 41–47, (2002).
- [5] Bonmati M., M. Pujola, J. Sana, M. Soliva, M.T. Felipo, M. Garau, B. Ceccanti, P. Nannipieri: *Chemical properties, populations of nitrite oxidizer, urease and phosphatase activities in sewage sludge-amended soils*, Plant and Soil, **84**, 79–91, (1985).

- [6] Chazijew F. Ch.: *Sistemno-ekologiczeskij analiz fermentativnoj aktivnosti poczw*, Nauka, Moskwa (1982).
- [7] Furczak J., J. Joniec: *Studies upon influence of microbial and biochemical activities on a level of sludge crumbling*, Pol. J. Soil Sci., **35**, 59–67, (2002).
- [8] Geisseler D., W.R. Horwath: *Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon*, Soil Biol. Biochem., **40**, 3040–3045, (2008).
- [9] Giller K., E. Witter, S.P. McGrath: *Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review*, Soil Biol. Biochem., **30**, 1389–1414, (1998).
- [10] Hattori H.: *Microbial activities in soil amended with sewage sludges*. Soil Sci. Plant Nutr., **34**, 221–232, (1988).
- [11] Hattori H., S. Mukai: *Decomposition of sewage sludge in soil as affected by their organic matter composition*. Soil Sci. Plant Nutr., **32**, 421–432, (1986).
- [12] Herrero O., R. Canet, R. Albiach, F. Pomares: *Enzymatical activities and content of mineral nitrogen in soil after the application of two rates of different organic products*. Agrochimica, **62**, 296–303, (1998).
- [13] Joniec J., Furczak J.: *Numbers and activity of selected microbial groups involved in carbon transformations in podzolic soil amended with sewage sludge*, Ecol. Chem. Eng. A, **18**, (2011).
- [14] Kobus J., J. Czaban, A. Gajda: *Effect of sewage sludge on activity of degraded soils and on carbon, nitrogen, phosphorus, and zinc transformations in those soils*. Pam. Puł. – Prace IUNG, **96**, 121–137, (1990).
- [15] Ladd J.N., J.A.H. Butler: *Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates*, Soil Biol. Biochem., **4**, 19–30, (1972).
- [16] Martin J.: *Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi*, Soil Sci., **19**, 215–233, (1950).
- [17] Niewiadomska A., H. Sulewska, A. Wolna-Maruwka, J. Klama: *Effect of organic fertilization on development of proteolytic bacteria and activity of protease in the soil for cultivation of maize (Zea Mays L.)*, Arch. Environ. Prot., **36**, 47–56, (2010).
- [18] Nowosielski O.: *Methods for the determination of fertilisation requirements*. PWRiL, Warszawa (1974).
- [19] Oleszczuk P., S. Baran: *Content of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants grown on soils amended with various doses of sewage sludge*. Arch. Ochr. Środ., **30**, 35–50, (2004).
- [20] Pascual J.A., T. Hernandez, C. Garcia, M. Ayuso: *Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment*. Biores. Techn., **64**, 131–138, (1998).
- [21] Rodina A.: *Microbiological methods for the study of waters*, PWRiL, Warszawa (1968).
- [22] Sastre J., M.A. Vincente, H.C. Lobo: *Influence of the application of sewage sludges on soil microbial activity*. Biores. Techn., **57**, 19–23, (1996).
- [23] Saviozzi A., P. Bufalino, R. Levi-Minzi, R. Riffaldi: *Biochemical activities in a degraded soil restored by two amendments: a laboratory study*, Biol. Fertil. Soils, **35**, 96–101, (2002).
- [24] Wielgosz E.: *Biochemical activity in sewage sludge subjected to four-year vegetation transformation*. Ann. UMCS, sec. E, **55**, 185–193, (2000).
- [25] Wielgosz E.: *Dynamics of development of various microbial groups in municipal sewage sludge under cultures of certain plants*, Ann. UMCS, sec. E, **55**, 169–184, (2000).
- [26] Wong J.W.C., K.M. Lai, M. Fang, K.K. Ma: *Effect of sewage sludge amendment on soil microbial activity and nutrient mineralization*, Environ. Intern., **24**, 935–943 (1998).
- [27] Żukowska G., M. Flis-Bujak, S. Baran: *Zmiany składu frakcyjnego próchnicy gleby lekkiej nawożonej osadami ściekowymi*, Folia Univer. Agric. Stetin., 211, Agric., **84**, 551–556, (2000).