

ACTA AGROPHYSICA



Małgorzata Brzezińska

**AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
ORAZ PROCESY JEJ TOWARZYSZĄCE
W GLEBACH ORGANICZNYCH NAWADNIANYCH
OCZYSZCZONYMI ŚCIEKAMI MIEJSKIMI**

(Badania polowe i modelowe)

131

**Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
w Lublinie**

**Rozprawy i Monografie
2006 (2)**

ACTA AGROPHYSICA



Małgorzata Brzezińska

**AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
ORAZ PROCESY JEJ TOWARZYSZĄCE
W GLEBACH ORGANICZNYCH NAWADNIANYCH
OCZYSZCZONYMI ŚCIEKAMI MIEJSKIMI**

(Badania polowe i modelowe)

131

**Instytut Agrofizyki
im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
w Lublinie**

**Rozprawy i Monografie
2006 (2)**

Komitet Redakcyjny

Redaktor Naczelny
Ryszard T. Walczak, czł. koresp. PAN

Zastępca Redaktora Naczelnego
Józef Horabik

Sekretarz Redakcji
Wanda Woźniak

Rada Redakcyjna

Tomasz Brandyk, czł. koresp. PAN – przewodniczący

Ryszard Dębicki	Jerzy Lipiec
Bohdan Dobrzański	Piotr P. Lewicki
Danuta Drozd	Stanisław Nawrocki, czł. rzecz. PAN
Franciszek Dubert	Edward Niedźwiecki
Tadeusz Filipek	Viliam Novák, Słowacja
Józef Fornal	Josef Pecen, Czechy
Jan Gliński, czł. rzecz. PAN	Tadeusz Przybysz
Grzegorz Józefaciuk	Stanisław Radwan, czł. koresp. PAU
Eugeniusz Kamiński	Jan Sielewiesiuk
Andrzej Kędziora	Witold Stępniewski
Tadeusz Kęsik	Zbigniew Ślipek
Krystyna Konstankiewicz	Bogusław Szot
Janusz Laskowski	

Opiniowali do druku

Prof. dr hab. Jan Gliński
Prof. dr hab. Jan Koper

Adres redakcji

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, P.O. Box 201
20-290 Lublin 27, tel. (0-81) 744-50-61, e-mail: editor@demeter.ipan.lublin.pl
<http://www.ipan.lublin.pl>

Praca wykonana częściowo w ramach projektów badawczych nr 5 P06H 035 16 i nr 3 P04G 080 25
finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji Departament Badań Naukowych w latach
1999-2001 i 2003-2005 oraz działalności statutowej IA PAN

Publikacja indeksowana przez
Polish Scientific Journal Contents – Life Sci. w sieci Internet
pod adresem <http://psjc.icm.edu.pl>

©Copyright by Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin 2006

ISSN 1234-4125

Wydanie I. Nakład 150 egz. Ark. wyd. 12,5
Skład komputerowy: Marek Pazur, Małgorzata Brzezińska
Druk: Drukarnia *ALF-GRAF*, ul. Kościuszki 4, 20-006 Lublin

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP I CEL PRACY	7
2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA GLEBY I PROCEJ JEJ TOWARZYSZĄCE	11
2.1. Aktywność dehydrogenaz w glebie	11
2.2. Aktywność katalazy w glebie	12
2.3. Oddychanie gleby	13
2.4. Biomasa drobnoustrojów glebowych	13
2.5. Potencjał oksydoredukcyjny gleby	14
3. OBIEKT I METODYKA BADAŃ	16
3.1. Obiekt badawczy	16
3.1.1. Doświadczenie polowe	20
3.1.2. Doświadczenie na monolitach glebowych	20
3.1.3. Doświadczenie na próbkach glebowych	21
3.2. Metodyka pomiarów	23
3.2.1. Oznaczanie aktywności dehydrogenaz w glebie	23
3.2.2. Oznaczanie aktywności katalazy w glebie	24
3.2.3. Oznaczanie stężenia gazów w powietrzu nad glebą	24
3.2.4. Oznaczanie biomasy drobnoustrojów w glebie	24
3.2.5. Pomiar potencjału redoks gleby	24
3.2.6. Inne oznaczenia	25
4. WYNIKI I DYSKUSJA	26
4.1. Doświadczenie polowe	26
4.1.1. Zróznicowanie aktywności enzymatycznej w glebach kontrolnych	26
4.1.2. Zmiany właściwości gleb pod wpływem ścieków	27
4.1.3. Procesy oksydoredukcyjne w glebach	38
4.1.4. Aktywność dehydrogenaz i katalazy dla całych profili (wartości średnie)	41
4.1.5. Zależność aktywności oksydoreduktaz od potencjału redoks gleby	42
4.1.6. Podsumowanie wyników doświadczenia polowego	48
4.2. Doświadczenie modelowe na monolitach glebowych	49
4.2.1. Charakterystyki wodne i biologiczne gleb	49
4.2.2. Potencjał redoks gleb	56
4.2.3. Analiza statystyczna wyników	58
4.2.4. Podsumowanie wyników badań na monolitach glebowych	59
4.3. Doświadczenie modelowe na próbkach z wierzchnich warstw gleb	60
4.3.1. Aktywność dehydrogenaz	61
4.3.1.1. Aktywność dehydrogenaz w glebie inkubowanej bez dodatku glukozy	61
4.3.1.2. Aktywność dehydrogenaz w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy	63
4.3.2. Aktywność oddechowa	67
4.3.2.1. Aktywność oddechowa w glebie inkubowanej bez dodatku glukozy	68
4.3.2.1.1. Wydzielanie CO ₂	68
4.3.2.1.2. Pobranie O ₂	72
4.3.2.1.3. Współczynnik oddechowy RQ	74

4.3.2.2. Aktywność oddechowa w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy	77
4.3.2.2.1. Wydzielanie CO ₂	77
4.3.2.2.2. Mineralizacja netto glukozy	79
4.3.2.2.3. Pobranie O ₂	81
4.3.2.3. Relacje pomiędzy aktywnością dehydrogenaz i oddychaniem	83
4.3.3. Biomasa drobnoustrojów	85
4.3.4. Relacje pomiędzy C _{org} , C _{mic} i innymi właściwościami biologicznymi gleby	90
4.3.4.1. Relacje pomiędzy C _{org} i aktywnością biologiczną gleb	90
4.3.4.2. Wartości wskaźnika dostępności węgla (C _{mic} /C _{org})	95
4.3.4.3. Relacje pomiędzy C _{mic} i wydzielaniem CO ₂	97
4.3.4.4. Wartości współczynnika metabolicznego qCO ₂	99
4.3.4.5. Wartości specyficznej aktywności biomasy drobnoustrojów qDHA	102
4.3.4.6. Wartości wskaźnika C:N	103
4.3.5. Aktywność metanotroficzna	104
4.3.6. Emisja i sorpcja N ₂ O	107
4.3.7. Potencjał redoks i odczyn gleby	111
4.3.7.1. Eh i pH gleby inkubowanej bez dodatku glukozy	111
4.3.7.2. Eh i pH gleby inkubowanej z dodatkiem glukozy	114
4.3.8. Aktywność katalazy	116
4.3.9. Redukcja żelaza	117
4.3.9.1. Zawartość Fe ⁺² w glebie inkubowanej bez dodatku glukozy	117
4.3.9.2. Zawartość Fe ⁺² w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy	119
4.3.10. Przemiany gazowe związane z obniżeniem Eh gleby	119
4.3.10.1. Emisja i sorpcja N ₂ O w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy	120
4.3.10.2. Emisja i sorpcja H ₂ w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy	121
4.3.10.3. Emisja CH ₄ w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy	123
4.3.10.4. Relacje pomiędzy potencjałem redoks i wskaźnikami aktywności biologicznej gleby	125
4.3.11. Podsumowanie wyników doświadczenia na próbkach glebowych	134
5. WNIOSKI	143
6. PIŚMIENNICTWO	145
7. STRESZCZENIE	160
8. SUMMARY	162

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

- BZT₅ – biologiczne zapotrzebowanie na tlen w okresie 5 dni ($\text{g O}_2 \cdot \text{m}^{-3}$),
C:N – wskaźnik stosunku C_{org} (% w/w) do N ogółem (% w/w),
ChZT – chemiczne zapotrzebowanie na tlen ($\text{g O}_2 \cdot \text{m}^{-3}$),
C_{mic} – węgiel zawarty w biomase mikroorganizmów glebowych ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),
 $\Delta\text{C}_{\text{mic}}$ – zmiana biomasy mikroorganizmów glebowych ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),
C_{mic}/C_{org} – wskaźnik dostępności węgla dla mikroorganizmów (% w/w),
C_{org} – węgiel organiczny (% w/w; $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),
DOC – rozpuszczalne związki organiczne (*dissolved organic carbon*),
DHA – aktywność dehydrogenaz ($\text{nmol TPF g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),
efekt – zmiana wskaźnika w stosunku do gleby kontrolnej,
E₀' – potencjał standardowy przy pH 7 (V),
Eh – potencjał oksydoredukcyjny (mV),
 ΔEh – zmiana wartości Eh (mV),
Eh(*t*₀) – wartość Eh wyjściowa (w czasie *t*₀) (mV),
Eh₇ – wartość Eh korygowana do pH 7 (mV),
glc – glukoza,
KAT – aktywność katalazy ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),
LSD – test oparty na metodzie najmniejszych istotnych różnic,
N_{og} – azot ogółem (% w/w),
qCO₂ – współczynnik metaboliczny ($\mu\text{g C-CO}_2 \cdot (\text{mg C}_{\text{mic}})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),
qDHA – specyficzna aktywność biomasy ($\text{nmol TPF} \cdot (\text{mg C}_{\text{mic}})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),
RQ – współczynnik oddechowy (*respiratory quotient*, $\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$),
SIR – respiracja indukowana substratem (*substrate induced respiration*),
*t*₀ – czas zerowy (stan wyjściowy),
*t*₃₀₀ – czas obniżenia Eh do 300 mV w glebie zalanej w temperaturze 20°C (dni),
WHC – pełna pojemność wodna (*water holding capacity*),
ΣCO₂ – ilość wydzielonego CO₂ w danym czasie ($\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$),
A – gleba kontrolna, pobrana z pola nawadnianego opadami atmosferycznymi,
B – gleba pobrana z pola zalewanego ściekami miejskimi w niższej dawce (600 mm/rok),
C – gleba pobrana z pola zalewanego ściekami miejskimi w wysokiej dawce (1200 mm/rok),
D – gleba pobrana z pola nawadnianego czystą wodą (600 mm/rok),
E – gleba pobrana z pola nawadnianego czystą wodą (1200 mm/rok),
K – wariant gleby o wilgotności ok. 60% pełnej pojemności wodnej (WHC),
W – wariant gleby zalanej wodą,
Śc – wariant gleby zalanej ściekami.

1. WSTĘP I CEL PRACY

Jednym z ważniejszych zadań dotyczących ochrony środowiska jest obecnie utylizacja ścieków komunalnych. Często stosowaną w tym celu metodą jest wprowadzanie wstępnie oczyszczonych ścieków do gleby dla ich dalszego oczyszczenia na polach depozycyjnych, oczyszczalniach hydrofitowych bądź wykorzystanie wód ściekowych w rolnictwie [28,30,84,165,208,214,261].

Zastosowanie ścieków do nawadniania pól uprawnych i użytków zielonych należy do najstarszych zabiegów ulepszających jakość gleby, jednakże obecnie ich stosowanie wymaga spełnienia szeregu warunków (Prawo wodne, Dz.U. nr 115 poz. 1229, ustawa z dnia 18 lipca 2001; Dz.U. 02.212.1799 z dnia 16 grudnia 2002). Coraz częściej zakładane są niewielkie oczyszczalnie przydomowe, wykorzystujące przystosowanie niektórych roślin, np. wierzby (*Salix sp.*), topoli (*Populus sp.*), trzciny (*Phragmites sp.*), pałki (*Typha sp.*), sita (*Juncus sp.*) do rozwoju w terenach podmokłych. Atrakcyjność zastosowania wierzby i topoli wynika między innymi z szybkiego tempa ich wzrostu, wysokiego współczynnika transpiracji, zdolności pobierania i biodegradacji zanieczyszczeń organicznych oraz akumulacji metali ciężkich. Rośliny te nie stanowią pokarmu dla ludzi i zwierząt, a ich drewno może być wykorzystane dodatkowo jako surowiec energetyczny [28,151,152].

Zatem zastosowanie wód ściekowych do nawadniania gleby może jednocześnie rozwiązać problem utylizacji ścieków i dalszego ich oczyszczenia (co zmniejsza niebezpieczeństwo eutrofizacji zbiorników wodnych), wykorzystania znacznych ilości wody (ważnego zwłaszcza w regionach wykazujących jej deficyt), odzyskania związków biogennych (mających ekonomicznie wymierną wartość nawozową), rozwoju plantacji roślin energetycznych.

Wody ściekowe z reguły powinny wpływać korzystnie na produktywność gleby z uwagi na znaczną zawartość pierwiastków biogennych i mikroskładników. Istnieje jednak niebezpieczeństwo wprowadzenia mineralnych i organicznych związków toksycznych, zwłaszcza przy systematycznym stosowaniu zabiegów. Niektóre zanieczyszczenia wprowadzane ze ściekami nie mogą być rozłożone lub są rozkładane powoli, zalegając w środowisku w ilościach toksycznych, np. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, rozpuszczalniki organiczne, związki tłuszczowe, detergenty, związki nieorganiczne metali. Istotny jest przy tym nie tylko poziom wprowadzanych zanieczyszczeń, ale też czas ich oddziaływania oraz częstość stosowania [17,100,251].

Nawadniana ściekami gleba pełni rolę filtru oczyszczającego ścieki z elementów biogennych i szkodliwych przed ich przesiąknięciem do wody gruntowej (tzw. III^o oczyszczenia). Najodpowiedniejsze są przepuszczalne gleby piaszczyste – piaski słabo gliniaste i gliniaste lekkie [165]. Gleby organiczne traktowane

są jako mniej wskazane ze względu na konieczność kontroli stosunków wodnych. Doświadczenia przeprowadzone na glebach murszowych i torfach przesuszonych wykazały ich przydatność do nawadniania [29,34,152,165].

Zdolność gleby do oczyszczania ścieków wynika z zachodzących w niej procesów fizycznych, chemicznych, fizykochemicznych i biologicznych. Sorpcja biologiczna obejmuje pobieranie składników pokarmowych i zanieczyszczeń przez rośliny oraz przekształcanie i asymilację przez drobnoustroje glebowe. Aktywność biochemiczna gleby jest zatem podstawowym elementem systemu poprawy jakości biofiltru glebowego i oczyszczanych wód.

Właściwości biologiczne i biochemiczne od dawna uznawane są za niezbędne elementy kształtujące jakość i żyzność gleby, czyli zdolność do funkcjonowania w ramach ekosystemu w sposób zapewniający biologiczną produktywność i sprzyjający utrzymaniu odpowiedniej jakości środowiska oraz zdrowia roślin i zwierząt [12]. Powszechnie stosowanymi wskaźnikami aktywności biologicznej gleby jest aktywność enzymatyczna, aktywność oddechowa, biomasa drobnoustrojów, skład i liczebność drobnoustrojów. Czynniki, które zakłócają lub hamują czynności życiowe organizmów glebowych naruszają z reguły prawidłowe funkcjonowanie ekosystemu. Dlatego aktywność biologiczna jest szeroko wykorzystywana do określania jakości gleby oraz szacowania zmian zachodzących w glebie, wywołanych stosowaniem czynników potencjalnie niebezpiecznych [93,136,155-158,187,231,242].

Pomimo stwierdzanych zmian właściwości fizycznych i chemicznych wywołanych systematycznym zalewaniem gleby ściekami [66,67,125,128,184,253] problematyka oddziaływania ścieków na aktywność biologiczną gleby nie jest dokładnie poznana. W literaturze istnieje stosunkowo niewiele danych, dotyczących tego zagadnienia. Badania koncentrują się najczęściej na przeżywalności drobnoustrojów patogennych, obiegu pierwiastków biogennych i metali ciężkich, uprawie i właściwościach roślin oraz sytuacjach zagrożenia dla ludzi i zwierząt [86,152,210,268]. Zbyt często przyjmowane wydaje się założenie, że zdolność samooczyszczania gleby jest jej właściwością niezmienną [83]. Zauważalne luki w badaniach dotyczą zwłaszcza tych funkcji metabolicznych drobnoustrojów glebowych, które wiążą się z ich adaptacją i wydajnością energetyczną oraz prowadzą do przemian glebowej substancji organicznej. Procesy redoks, mające silny związek z aktywnością biochemiczną drobnoustrojów w warunkach zalania gleby są znacznie lepiej rozpoznane w glebach mineralnych i bagiennych, natomiast niewiele badań dotyczy gleb pobagiennych.

Zdecydowana większość publikowanych prac opisuje albo rezultaty doświadczeń polowych, albo też doświadczeń modelowych, które z reguły przeprowadzane są na glebach pobranych z innych miejsc niż te, na których prowadzono doświadczenia polowe. W związku z tym porównanie wyników jest rzeczą bardzo

trudną, jeśli nie niemożliwą, szczególnie w przypadku procesów biologicznych, na które znaczący wpływ mają warunki środowiskowe.

Zgodnie z przyjętą w pracy hipotezą, dysponując wynikami otrzymanymi z doświadczeń polowych, nie można precyzyjnie określić związku pomiędzy aktywnością biologiczną a czynnikami fizyko-chemicznymi działającymi w glebie. Dotyczy to zarówno czynników naturalnych, jak również antropogenicznych. Mierzona wartość aktywności odzwierciedla stan *in situ* determinowany nie tylko przez aktualne warunki istniejące w glebie, ale też w znacznej mierze przez historię zdarzeń poprzedzających oznaczenie (w tym warunków klimatycznych, stosowanych zabiegów, lokalizację gleby, obecność roślin). Badania polowe mają bezsprzecznie ogromną wartość, pozwalają bowiem określić rzeczywisty, aktualny status biologiczny *żyjącego układu glebowego* w ramach danego ekosystemu. Jednak precyzyjne określenie mechanizmów zmian aktywności biologicznej gleby oraz relacji pomiędzy aktywnością drobnoustrojów i czynnikami abiotycznymi wymaga przeprowadzenia badań modelowych na próbkach glebowych przygotowanych i poddanych pre-inkubacji w ustalonych warunkach fizycznych. Silne oddziaływanie całego splotu wielkości determinujących środowisko glebowe zakłóca bowiem poszczególne wpływy działające zarówno na poziomie pojedynczej komórki, jak też całej biocenozy utworzonej przez populacje różnych gatunków organizmów glebowych. Sytuacją idealną jest późniejsze wykorzystanie zależności rozpoznanych w warunkach laboratoryjnych do modelowania i przewidywania zmian w skali ekosystemu.

Niniejsza rozprawa miała na celu kompleksowe zbadanie wpływu systematycznego nawadniania gleb organicznych oczyszczonymi ściekami miejskimi na zmianę aktywności biologicznej mikroorganizmów glebowych i procesów z nią związanych.

Szczególne uwagę skupiono na aktywności drobnoustrojów heterotroficznych decydujących o przekształceniach substancji organicznej gleby oraz na właściwościach i procesach istotnych z punktu widzenia nadmiernego uwilgotnienia gleby, takich jak procesy redoks, zmiany pH, przemiany gazowe, zmiany dostępności węgla organicznego.

Wpływ ścieków miejskich na aktywność biologiczną gleby badano począwszy od gleb w warunkach polowych, poprzez nienaruszone monolity glebowe a skończywszy na ściśle kontrolowanych badaniach laboratoryjnych próbek glebowych. Wszystkie badania prowadzono na glebach zlokalizowanych i pobranych w tych samych miejscach:

- w warunkach polowych badano aktywność wybranych oksydoreduktaz (dehydrogenaz i katalazy) oraz śledzono zmiany potencjału redoks gleby *in situ* z różną pokrywą roślinną;

- w celu eliminacji wpływu czynników klimatycznych i bezpośredniego oddziaływania roślin, podobne badania przeprowadzono w przewiezionych do laboratorium monolitach glebowych o nienaruszonej strukturze;
- z uwagi na trudny w interpretacji charakter wyników badań polowych i monolitowych, podjęto badania laboratoryjne na próbkach glebowych pobranych z wierzchnich warstw gleb nawadnianych ściekami oraz gleb kontrolnych. Dysponowanie większą ilością materiału glebowego w identycznych warunkach inkubacji znacznie zmniejszyło efekty zmienności przestrzennej gleby oraz pozwoliło na podjęcie próby oceny związków pomiędzy wskaźnikami biologicznymi. Jednocześnie został rozszerzony zakres oznaczanych wskaźników aktywności biologicznej. Badania obejmowały biomasę i metabolizm oddechowy drobnoustrojów glebowych – wydzielanie CO₂, pobieranie O₂, aktywność denitryfikacyjną, metanotroficzną, metanogenną, dehydrogenazową, katalazową, a także stężenie Fe⁺² oraz dynamikę przemian oksydoredukcyjnych (Eh) i odczyn gleby (pH). Przebieg procesów metabolicznych określano też w obecności łatwo dostępnego źródła węgla (glukozy) dla oceny wpływu ścieków na potencjalną aktywność biologiczną gleby. Obserwacje zmian aktywności drobnoustrojów oparto również na wskaźnikach wyznaczonych na podstawie danych doświadczalnych (RQ, qCO₂, qDHA, C_{mic}/C_{org}, C:N) oraz na relacjach pomiędzy badanymi wskaźnikami.

Oznaczane w pracy wielkości charakteryzują procesy oddechowe, które są podstawą utrzymania prawidłowych funkcji życiowych mikroorganizmów glebowych. Ich kontrola jest konieczna szczególnie w warunkach stosowania zabiegów silnie zmieniających właściwości gleby, takich jak nawadnianie.

Praca stanowi kontynuację badań, wynikających z zainteresowania autorki problemami aktywności biologicznej gleby [37-51,101-104,107,108,265,266,274,275,299-306].

2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA GLEBY I PROCESY JEJ TOWARZYSZĄCE

Aktywność biologiczna gleb charakteryzowana jest przez aktywność enzymatyczną, biomasę drobnoustrojów, aktywność oddechową – wydzielanie CO₂, pobór O₂, skład i liczebność drobnoustrojów, a także przez aktywność specyficzną dla określonych warunków glebowych, między innymi metanotroficzną, denitryfikacyjną, metanogenną. Towarzyszą jej procesy redoks, zmiany pH i zmiany zawartości Fe(II), N₂O, H₂, CH₄.

2.1. Aktywność dehydrogenaz w glebie

Dehydrogenazy są enzymami uczestniczącymi w procesach oddechowych komórki, stanowią liczną grupę oksydoreduktaz zlokalizowanych w cytoplazmie lub specyficznych strukturach utworzonych z błon cytoplazmatycznych. Dehydrogenazy katalizują utlenianie związków organicznych przez odłączenie od nich elektronów i protonów, przenoszonych następnie na akceptor końcowy. W obecności tlenu, transport ten odbywa się, poprzez szereg pośredników, na elementy łańcucha oddechowego i ostatecznie na O₂. W warunkach beztlenowych funkcję końcowego akceptora pełnią dostępne, utlenione formy nieorganiczne NO₃⁻, Mn(IV), Fe(III), SO₄⁻², CO₂ (oddychanie beztlenowe) lub związki organiczne (fermentacja). Niezależnie zatem od stanu natlenienia gleby, dehydrogenazy są elementem metabolizmu oddechowego, ściśle związanego z wytwarzaniem energii biologicznie dostępnej (ATP) [2]. Za pośrednictwem koenzymów dehydrogenaz (głównie NAD i NADP), protony odłączone od utlenianych substratów, uczestniczą również w procesach anabolicznych.

Aktywność dehydrogenaz związana jest z czynnością wielu białek enzymatycznych lub nawet systemów enzymatycznych, powszechnie występujących w drobnoustrojach glebowych (zarówno tlenowych, jak i bez-tlenowych) [236]. W zasadzie czynne katalitycznie dehydrogenazy występują w glebie jako integralna część nienaruszonych komórek. Oznaczenie aktywności tych enzymów w glebie jest zatem stosowane jako wskaźnik intensywności metabolizmu oddechowego wszystkich populacji mikroorganizmów glebowych, co służy do określania całkowitej aktywności mikrobiologicznej gleby [53,167,230]. Aktywność dehydrogenaz jest powszechnie stosowana do oceny czynników niekorzystnie działających na drobnoustroje glebowe. Obserwowano ścisłą zależność pomiędzy aktywnością dehydrogenaz oraz zawartością materii organicznej, żyznością gleby, liczebnością i biomasą drobnoustrojów glebowych, C_{org}, N_{org}, aktywnością proteolityczną, nitry-

fikacją, denitryfikacyjną, respiracją oraz czynnością innych enzymów obecnych w glebie, m.in. fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, sulfatazy, β -glukozydazy, katalazy, amylazy, sacharazy [27,78,89,96,98,131,148-150,155,236,294,298,301,305]. Przydatność pomiaru aktywności dehydrogenaz w glebie jako testu eko-toksykologicznego potwierdzona została licznymi badaniami dotyczącymi zmian aktywności biologicznej gleby przy różnym systemie uprawy i nawożenia, a także w przypadku jej zanieczyszczenia metalami ciężkimi, pestycydami, preparatami ropopochodnymi, policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi [146-148,156-158,186,191,231,254]. Wiele badań wskazuje na istotny wpływ stanu natlenienia gleby na aktywność dehydrogenaz [37,44-49,104,105,224,266,285,301].

2.2. Aktywność katalazy w glebie

Funkcja katalazy (rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego) jest bardzo cenna dla każdej komórki. Naturalny substrat enzymu, H_2O_2 , powstaje w trakcie metabolizmu oddechowego jako produkt uboczny czynności pewnych oksydoreduktaz (dysmutazy ponadtlenu i niektórych oksydaz) i stanowi jedną z reaktywnych postaci tlenu – silnie utleniającą i łatwo reagującą z białkami, DNA i innymi składnikami komórek. Prawdopodobnie bez przeszkód pokonując błony komórkowe, H_2O_2 powoduje nieodwracalne uszkodzenia struktur biologicznych [117].

Katalaza (EC 1.11.1.6.) jest enzymem bardzo aktywnym, reaguje z H_2O_2 ok. 10 000 razy szybciej niż np. peroksydazy roślinne. W ciągu sekundy cząsteczka katalazy może rozłożyć ok. 200 000 cząsteczek nadtlenu wodoru [20]. Mikroorganizmy posiadają pojedynczą katalazę produkowaną konstytutywnie lub kilka izozymów (2-6), których synteza jest ściśle zależna od fazy wzrostu populacji [307]. Szeroko rozpowszechniona wśród organizmów żywych, katalaza występuje w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. W środowisku glebowym obecna jest w komórkach wszystkich drobnoustrojów wykorzystujących tlen do procesów oddechowych (tlenowce, beztlenowce fakultatywne). Beztlenowce obligatoryjne zazwyczaj nie wykazują aktywności katalazy (lub bardzo niską) [82].

Katalaza jest przede wszystkim enzymem wewnątrzkomórkowym, chroniącym komórki przed toksycznym H_2O_2 , wytwarzanym w cytoplazmie i peroksyzomach. Formę zewnątrzkomórkową enzymu charakteryzuje niski poziom aktywności, nawet poniżej 2% aktywności całkowitej [82]. Katalaza, podobnie do innych enzymów uwolnionych z komórek, wykazuje znaczną stabilność dzięki sorpcji przez minerały ilaste i materię organiczną kosztem pewnego obniżenia aktywności [54,92,245].

Wykazano istotne dodatnie korelacje pomiędzy aktywnością katalazy w glebie i zawartością materii organicznej, biomasą drobnoustrojów, poborem O₂, wydzielaniem CO₂, zawartością ATP, żyznością gleby, a także aktywnością dehydrogenaz, amidazy glukozydazy, fosfodiesterazy oraz stopniem zredukowania gleby [37,89,104,105,148,170,190,235,265].

2.3. Oddychanie gleby

Procesom utleniania biologicznego, związanego z wytwarzaniem energii, towarzyszy uwalnianie do atmosfery CO₂, odłączanego przez dekarboksylazy komórek heterotroficznych od wyjściowych zredukowanych związków węglowych. Oddychanie (respiracja) jest procesem uniwersalnym, przeprowadzanym przez wszystkie organizmy heterotroficzne bytujące w glebie, wykorzystujące dostępne elementy glebowej materii organicznej. Pomiar ilości wydzielonego CO₂ oraz pobranego O₂, jest zatem metodą ilościowego oznaczenia aktywności metabolicznej mikroorganizmów heterotroficznych, tradycyjnie stosowaną do wielu układów biologicznych, w tym również gleby [3,53]. Podobnie jak inne funkcje metabolizmu komórkowego, intensywność oddychania determinowana jest stanem fizjologicznym komórek oraz istotnie zależy od wielu czynników fizycznych i chemicznych (wilgotności i struktury gleby, temperatury, dostępności składników pokarmowych) [3,33]. Respiracja gleby istotnie koreluje z zawartością materii organicznej i większością parametrów biochemicznych i mikrobiologicznych, modyfikowana jest też przez zabiegi uprawowe, wprowadzanie pestycydów, metali ciężkich, policyklicznych węglowodorów aromatycznych, oleju napędowego, ścieków [26,186, 198,261,294]. Oddychanie gleby jest jednocześnie miarą mineralizacji węgla organicznego oraz metodą oceny dynamiki rozkładu związków organicznych w glebie [198]. Jednakże w warunkach naturalnych, należy wziąć pod uwagę wkład korzeni roślin w ilość emitowanego CO₂, który może być istotny. W glebach organicznych może on wy-nosić 10-50% całkowitej emisji dwutlenku węgla [106].

2.4. Biomasa drobnoustrojów glebowych

Biomasa mikroorganizmów glebowych (C_{mic}) jest labilnym składnikiem materii organicznej gleby, istotnym z punktu widzenia przemian składników pokarmowych. Szacuje się, że węgiel biomasy stanowi do 4% całkowitego C_{org} gleby [97]. Zawartość biomasy w glebie istotnie koreluje z innymi wskaźnikami aktywności biologicznej, np. aktywnością dehydrogenaz, respiracją, zawartością C_{org} [12,59,98]. Ulega ona zmianie w obecności pestycydów, ścieków, metali ciężkich i jest modyfikowana przez nawożenie mineralne i organiczne [55, 136,

198,234,243]. Biomasa drobnoustrojów glebowych jest użytecznym parametrem dla opisu zmian materii organicznej zachodzących w glebie [21,294]. Badania wykazały, że ilość wydzielonego CO₂ jest proporcjonalna do C_{mic} (węgla zawartego w biomase drobnoustrojów danej próbki glebowej) [6,259,260]. Wartość biomasy, wyznaczona metodą SIR (*substrate induced respiration*) – oddychania indukowanego dodatkiem łatwo przyswajalnego substratu – silnie koreluje z biomasa drobnoustrojów określoną innymi technikami, np. metodą ekstrakcji-fumigacji (FE) czy mikroskopową [7,173].

2.5. Potencjał oksydoredukcyjny gleby

Potencjał redoks (Eh) jest fizykochemicznym parametrem wykorzystywanym do charakterystyki stanu natlenienia gleby. Wielkość potencjału redoks, będącego formalną miarą aktywności elektronów w roztworze glebowym, dostarcza informacji o warunkach tlenowych panujących w glebie. Jest to parametr, który szczególnie istotnie odzwierciedla przemiany biogeochemiczne w glebie niedotlenionej [106,116,142,221,271].

Aktywność drobnoustrojów glebowych zależy w znacznym stopniu od warunków tlenowych gleby, determinowanych przez jej właściwości fizyczne i chemiczne [41,44,104,106,107]. Gleba prawidłowo przewietrzona wykazuje wartości Eh powyżej 300 mV. Zalanie gleby drastycznie zmienia jej hydrosferę, atmosferę, biosferę i biogeochemię, a silne obniżenie dyfuzji O₂ do gleby (10⁴ razy) uruchamia serię procesów fizycznych, chemicznych i biologicznych, które nie są spotykane w glebie przewietrzanej. Obecny w porach glebowych i rozpuszczony w roztworze tlen zostaje stosunkowo szybko wyczerpany przez organizmy glebowe, prowadząc do zmiany we wzajemnych proporcjach populacji drobnoustrojów [224]. Promieniowce, grzyby, drożdże i bakterie tlenowe stają się mniej aktywne, giną lub przyjmują formy spoczynkowe. Zaczynają natomiast dominować bakterie beztlenowe fakultatywne, które w warunkach dobrego natlenienia wykorzystują O₂, a w stanie anaerobiozy zmieniają metabolizm, korzystając z utlenionych składników nieorganicznych lub organicznych, jako końcowych akceptorów elektronów i protonów uwalnianych z substratów organicznych w trakcie procesów oddechowych. Następuje stopniowa redukcja gleby, przejawiająca się obniżaniem Eh nawet do wartości ujemnych, zmianą pH oraz pojawianiem się zredukowanych form azotu, żelaza i manganu. Przedłużające się niedotlenienie wywołuje procesy fermentacyjne i rozwój beztlenowców bezwzględnych, prowadzący do wydzielania siarczków i metanu [116,142,241]. Odprowadzenie nadmiaru wody i uzupełnienie porów glebowych powietrzem umożliwia stopniowy powrót układu do sytuacji wyjściowej. Czynnikiem

szczególnie silnie wpływającym na intensywność procesów oksydoredukcyjnych w glebie niedotlenionej jest temperatura i zawartość dostępnego źródła węgla [41, 44,102,103,106,116].

Stan natlenienia porowatego układu glebowego jest zmienny i zależny od panujących warunków fizycznych, przede wszystkim wodno-powietrznych i termicznych oraz składu chemicznego, szczególnie od zawartości łatwo przyswajalnego, zredukowanego substratu węglowego oraz tych związków, które mogą przyjmować elektrony i protony od metabolizujących drobnoustrojów [122,221]. Intensywność przemian oksydoredukcyjnych jest zatem deter-minowana przez szereg czynników [106,116,142]. Jednocześnie, warunki aeracyjne gleby silnie modyfikują relacje pomiędzy drobnoustrojami, jej fazą ciekłą i gazową, a dalej także fazą stałą gleby poprzez uruchamianie lub immobilizację niektórych jej składników. Kluczowe miejsce w badaniach, związanych z relacją aktywności biologicznej gleby do jej warunków aeracyjnych zajmują nieorganiczne formy azotu (będące podstawowym składnikiem pokarmowym roślin, stwarzające też niebezpieczeństwo eutrofizacji), dostępne formy żelaza (wykazujące znaczną zdolność zabezpieczenia układu przed gwałtownym, niekorzystnym obniżeniem Eh) oraz metan (przyczyniający się wraz z N₂O i CO₂ do zwiększenia efektu cieplarnianego).

3. OBIEKT I METODYKA BADAŃ

3.1. Obiekt badawczy

Obiekt doświadczalny w dolinie rzeki Bystrzycy, w pobliżu oczyszczalni ścieków Hajdów koło Lublina (północno-zachodnia część Płaskowyżu Świdnickiego przylegająca do krawędzi Płaskowyżu Nałęczowskiego), założony został w 1996 r. dla realizacji projektu badawczego zamawianego PBZ 31-03 AR, PL i IA PAN w Lublinie „Opracowanie zintegrowanego systemu oczyszczania ścieków miejskich połączonego z nawadnianiem upraw przemysłowych”.

Gleby, na których założono pole doświadczalne są hydrogenicznymi, pobażnymi glebami torfowo-murszowymi oraz mineralno-murszowymi, wytworzonymi z torfu niskiego turzycowiskowego [86,253] (według klasyfikacji FAO, odpowiednio, Terric Histosol oraz Histi-Mollic Gleysol [128]). Podstawowe właściwości badanych gleb przedstawia tabela 1.

Do nawodnień stosowano ścieki komunalne po dwóch stopniach oczyszczenia (mechanicznym i biologicznym), pochodzące z miejskiej oczyszczalni ścieków (Hajdów k. Lublina). Oczyszczalnia zbiera ścieki z Lublina (ok. 360 tys. mieszkańców) oraz Świdnika (ok. 40 tys. mieszkańców). Wielkości zanieczyszczeń BZT₅, ChZT i zawartości metali ciężkich w stosowanych ściekach nie przekraczały wartości dopuszczalnych ustawami, natomiast okresowo wykazywały pewne przekroczenia w zakresie substancji biogennych – azotu azotanowego(V), azotu amonowego oraz azotu i fosforu ogółem [86,153].

Wielkości parametrów i zawartości poszczególnych substancji w stosowanych ściekach wahały się w zakresie (wartości wyrażone w g·m⁻³): ChZT 30,1-56,3; BZT₅ 8,3-22,6; N-NH₄⁺ 1,0-7,1; N-NO₃⁻ 20,2-38,4; N_{og} 22,3-43,6; P-PO₄³⁻ 3,1-6,8; P_{og} 3,7-7,0; Na⁺ 24,3-69,4; K⁺ 11,8-27,7; Ca²⁺ 59,7-95,2; Mg²⁺ 12,6-19,7; SO₄²⁻ 43,6-116,3; Cl⁻ 67,8-121,6; Zn 0,018-0,800; Cu 0,006-0,198; Pb 0,007-0,096; zaś pH w zakresie 6,5-8,4.

Dawkę ścieków (jednorazową pojedynczą, odpowiadającą 60 milimetrowemu zalaniu gleby) wyznaczono w oparciu o wymagania roślin odnośnie podstawowych składników pokarmowych (N, P, K) i wody [86].

Przed rozpoczęciem prac obszar doświadczalny użytkowany był ekstensywnie jako łąka. W roku 1996 na omawianym obiekcie przeprowadzone zostały intensywne inżynierskie prace ziemne. Dla potrzeb dalszych badań przyjęto założenie, że w każdej z gleb system drenażu, przygotowany przed wprowadzeniem nawodnień, był jednakowo sprawny.

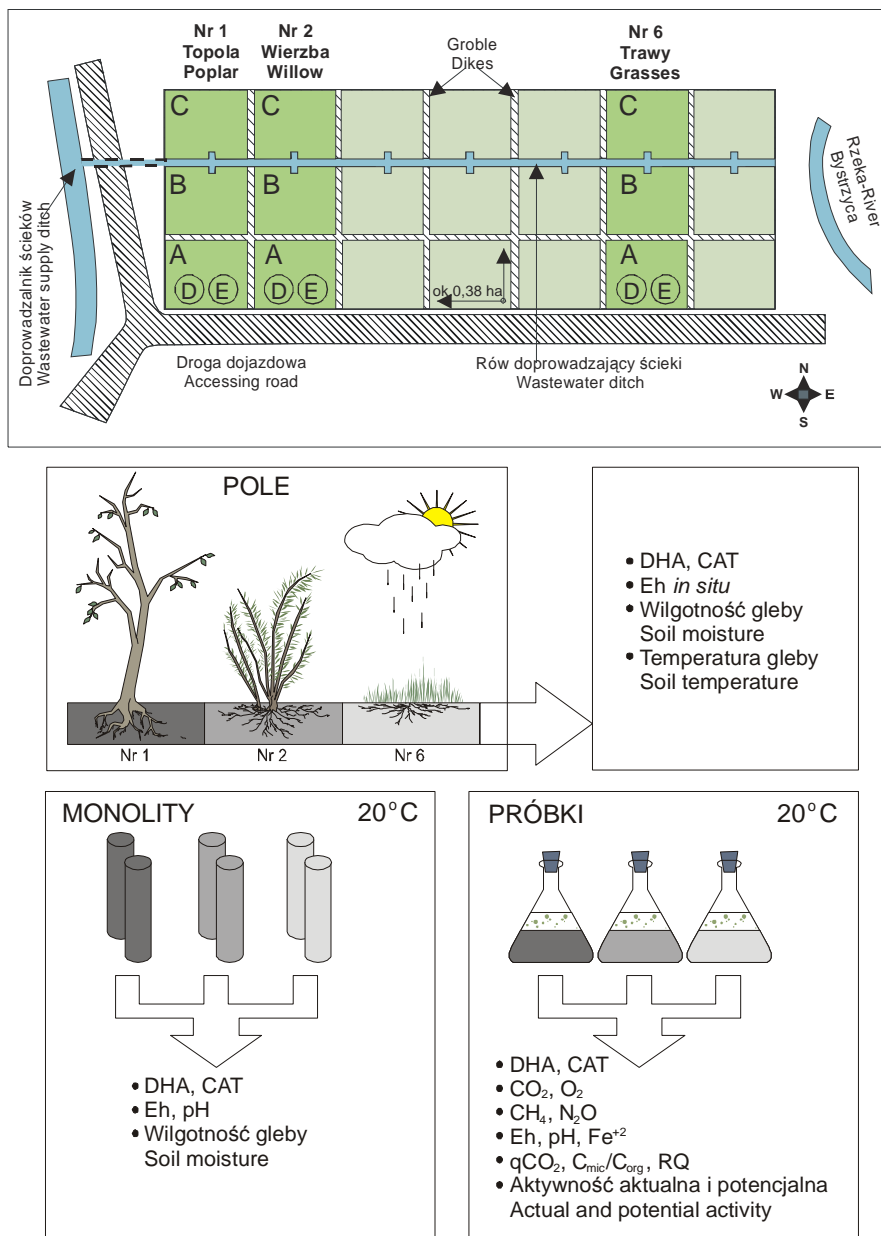
W roku 1997 na wydzielonych polach o powierzchni ok. 1 ha każde, wprowadzono do uprawy rośliny: topolę (*Populus nigra* i *Populus alba*), wierzbę krze-

wiastą (*Salix americana* i *Salix viminalis*) oraz mieszanek traw (z dominacją *Alopecurus pratensis*, *Phalaris arundinacea* i *Festuca pratensis*). Na każdym polu (odpowiednio nr 1, nr 2 i nr 6), wyodrębniono trzy poletka eksperymentalne, rozdzielone groblami o wysokości ok. 50 cm.

Tabela 1. Podstawowe właściwości badanych gleb
Table 1. Basic characteristics of tested soils

Gleba Soil	Warstwa Layer (cm)	Substancja organiczna Organic matter (%)	pH CaCl ₂	Gęstość Density (Mg·m ⁻³)
1A	0-10	30,3	7,93	0,515
	10-30	36,5	7,81	0,460
	30-50	47,9	8,92	0,307
	50-70	43,6	8,21	0,443
1B	0-10	33,8	7,76	0,405
	10-30	38,4	8,35	0,460
	30-50	35,3	8,29	0,562
	50-70	41,4	8,69	0,378
1C	0-10	38,6	7,89	0,463
	10-30	48,3	8,92	0,487
	30-50	31,2	8,60	0,560
	50-70	40,2	8,05	0,394
2A	0-10	35,1	7,81	0,578
	10-30	41,1	7,80	0,627
	30-50	32,5	7,85	0,504
	50-70	42,6	9,13	0,375
2B	0-10	33,4	7,83	0,572
	10-30	30,1	7,83	0,648
	30-50	37,3	7,76	0,459
	50-70	33,2	7,80	0,423
2C	0-10	36,6	7,76	0,429
	10-30	36,7	7,79	0,547
	30-50	37,8	7,81	0,494
	50-70	39,0	7,74	0,421
6A	0-10	17,1	7,84	0,911
	10-30	24,6	7,63	0,976
	30-50	38,8	7,66	0,550
	50-70	31,0	7,76	1,042
6B	0-10	18,9	7,64	0,904
	10-30	26,0	7,64	0,606
	30-50	46,4	7,36	0,575
	50-70	26,0	7,15	0,826
6C	0-10	20,9	7,81	0,864
	10-30	20,1	7,49	1,041
	30-50	21,9	7,86	0,858
	50-70	29,0	7,77	1,231

Schemat obiektu i ogólny układ doświadczeń ilustruje rysunek 1.



Rys. 1. Schemat obiektu i ogólny układ doświadczeń. Objasnienia w tekście

Fig. 1. The scheme of the experimental site and general set of experiments. Explanation in the text

Poletka A (kontrolne) nawadniane były tylko opadami atmosferycznymi (włączając naturalne procesy podsiąkania), poletka B i C w latach 1997-2000 zalewano oczyszczonymi ściekami miejskimi. Na poletkach kontrolnych (A), w roku 1999 wyodrębniono dodatkowo nienaruszone profile D i E, które odizolowano od pozostałej gleby rurami PCV do głębokości 70 cm. Nawadniano je czystą wodą w latach 1999-2000 w ilościach i terminach odpowiadających zalewom zasadniczym. Zatem w przypadku każdego układu gleba-roślina zastosowano następujące warianty:

- A – gleba kontrolna, nawadniana jedynie opadami atmosferycznymi;
- B – gleba nawadniana wodami ściekowymi w dawce pojedynczej (60 mm);
- C – gleba nawadniana wodami ściekowymi w dawce podwójnej (120 mm);
- D – gleba nawadniana czystą wodą w dawce pojedynczej (60 mm);
- E – gleba nawadniana czystą wodą w dawce podwójnej (120 mm).

Poletka doświadczalne (A, B, C) oraz profile D i E posiadały odpowiednie oprzyrządowanie do pomiaru potencjału redoks. Na głębokościach 10 cm, 30 cm, 50 cm i 70 cm umieszczono po trzy elektrody platynowe z przewodami wyprowadzanymi na powierzchnię.

Wody ściekowe z oczyszczalni doprowadzono w ustalonych terminach na teren obiektu doświadczalnego przepompowując je poprzez system rur kanalizacyjnych do zbiornika przylegającego do poletek. Ze zbiornika ścieki kierowane były do rowu doprowadzającego, zaopatrzonego w otwierane zastawki, pozwalające na dozowanie odpowiednich ilości ścieków na odpowiednie pola. Rów doprowadzający biegł wzdłuż grobli znajdującej się pomiędzy poletkami B i C (rys. 1). Prędkość wpływania wód ściekowych na poletka była tak dobrana, aby okres nawadniania każdego pola trwał 12 godzin. Po tym czasie zastawki w rowie zamykano aż do następnego zalewu. Nawadnianie ściekami rozpoczęto w roku 1997. W ciągu doświadczalnych sezonów wegetacyjnych 1999 i 2000 r. (od kwietnia do września) wykonano po 10 cykli zalewowych. Poletka B i C otrzymywały więc rocznie odpowiednio 600 i 1200 mm ścieków, a poletka D i E – równoważne ilości czystej wody. Średnie roczne opady atmosferyczne na terenie badań wynoszą ok. 550 mm.

Analiza składu wód ściekowych wykazała, że dostarczały one substancji biogenych w ilościach odpowiadających intensywnemu nawożeniu gleby. Niższa zastosowana dawka zalewowa (10 zalewów 60 mm, wariant B) dostarczała rocznie co najmniej 180 kg N·ha⁻¹, 30 kg P·ha⁻¹ i 110 kg K·ha⁻¹. Nawadnianie niższą dawką ścieków powodowało w ciągu roku zanieczyszczenie gleby metalami średnio 0,9 kg Zn·ha⁻¹, 0,12 kg Pb·ha⁻¹, 0,09 kg Cu·ha⁻¹. Przy dawce podwójnej (wariant C) powyższe ilości były dwukrotnie większe [86,153].

3.1.1. Doświadczenie polowe

W latach 1997-1998 przeprowadzono badania wstępne aktywności dehydrogenaz i katalazy gleb obiektu doświadczalnego. Ze względu na przyczyny obiektywne, oznaczenia te nie były prowadzone systematycznie, obejmowały jedynie wstępne warunki glebowe bezpośrednio po założeniu obiektu, a istniejący układ doświadczeń nie uwzględniał dodatkowego wariantu kontrolnego gleby zalewanej czystą wodą.

Doświadczenie polowe przeprowadzono w trakcie dwóch sezonów wegetacyjnych 1999-2000 na obiekcie opisanym wyżej (rys. 1), w ramach projektu badawczego KBN nr 5 P06H 035 16 [39]. Doświadczenie polowe obejmowało:

- 3 warianty pola porośniętego: topolą (nr 1), wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6);
- 5 wariantów zalewowych (A, B, C, D i E);
- 4 głębokości profilu glebowego (0-10, 10-30, 30-50, 50-70 cm).

W ten sposób uzyskano 60 kombinacji, w których wielokrotnie oznaczano wybrane wskaźniki aktywności biologicznej gleby. Na polu nr 1 wykonywano analizy w trakcie 6 cykli zalewowych (próby glebowe ze wszystkich kombinacji dla każdego pola pobrano w 26 terminach); na polach 2 i 6 analizowano po 8 zalewów (36 terminów). We wszystkich terminach (dniach analiz), na czterech głębokościach profili A, B, C, D i E przeprowadzano pomiary potencjału redoks Eh *in situ* oraz pobierano próbki glebowe skalowaną łaską gleboznawczą z głębokości 0-10, 10-30, 30-50, 50-70 cm, dla oznaczenia aktywności dehydrogenaz (DHA) i katalazy (CAT) oraz wilgotności gleby. Pobrany materiał bezpośrednio przewożono do laboratorium i analizowano. Aktywność enzymatyczną oznaczano w 2-3 powtórzeniach.

3.1.2. Doświadczenie na monolitach glebowych

Ze względu na niejednoznaczny wpływ ścieków na aktywność dehydrogenaz obserwowany w doświadczeniu polowym oraz z uwagi na znaczną zmienność warunków środowiskowych w prowadzonych doświadczeniach polowych a także fakt, iż reakcja drobnoustrojów na zalewanie ściekami jest w układzie gleba – roślina silnie determinowana przez samą roślinę, założono, że eliminacja rośliny z układu pozwoli na określenie rzeczywistego wpływu ścieków na właściwości biochemiczne gleby. W tym celu podjęto badania monolitów glebowych w warunkach laboratoryjnych, realizowane w ramach projektu badawczego KBN nr 3 P04G 080 25 „Wpływ nawadniania gleb organicznych oczyszczonymi ściekami miejskimi na aktywność respiracyjną drobnoustrojów glebowych”.

Nienaruszone monolity glebowe pobrano w październiku 2003 r., po upływie trzech lat od zaprzestania stosowania 4-letnich zalewów. Bezpośrednią reakcję na ścieki określono zarówno w glebie uprzednio nawadnianej ściekami, jak również w materiale, który nie miał nigdy kontaktu ze ściekami. Zachowanie 3-letniej

przerwy miało na celu dodatkowe określenie trwałości zmian aktywności biochemicznej gleby, spowodowanych nawodnieniami ściekami.

Monolity z głębokości 0-70 cm pobrano do rur PCV o średnicy 110 mm. Każda kolumna była zabezpieczona od spodu mocną tkaniną. Na odpowiednich głębokościach kolumny miały otwory, zabezpieczone wodoszczelnymi osłonami, w celu umieszczenia elektrod pomiarowych. Przygotowano po 10 monolitów z każdego pola (nr 1, nr 2, nr 6); po 6 monolitów z poletek kontrolnych, które nie miały poprzednio kontaktu ze ściekami (A) oraz po 4 monolity z poletek zalewanych w latach 1997-2000 podwójną dawką ścieków (C).

Monolity przewieziono do laboratorium, usunięto rośliny oraz pre-inkubowano w warunkach stałej temperatury 10°C i kontrolowanej wilgotności przez 60 dni. Okres pre-inkubacji miał na celu usunięcie obecnych wydzielin korzeniowych, mogących oddziaływać na drobnoustroje (drogą naturalnych procesów zachodzących w glebie). Ustalono stosunkowo niską temperaturę, by zbyt intensywne procesy glebowe nie spowodowały całkowitego wyczerpania substratów. Następnie temperaturę pomieszczenia podwyższono do 20°C. Po 3-dniowej adaptacji do wyższej temperatury, monolity zalano ściekami lub wodą w ilości odpowiadającej podwójnej dawce stosowanej w warunkach polowych (120 mm).

Zastosowano następujące kombinacje, po dwa monolity dla każdej kombinacji:

A – gleba pobrana z pola kontrolnego (wilgotność aktualna);

AW – gleba z pola kontrolnego, zalana wodą;

AŚc – gleba z pola kontrolnego, zalana ściekami;

CW – gleba z pola nawadnianego podwójną dawką ścieków przez 4 lata, zalana wodą;

CŚc – gleba z pola nawadnianego podwójną dawką ścieków przez 4 lata, zalana ściekami.

Glebę nawadniano tak, żeby wierzchnia warstwa była zalana przez około 2 godziny. W określonych terminach (0, 1, 3, 6, 12 dzień po zastosowaniu zalania) wykonywano pomiary potencjału redoks i pH gleby w poszczególnych warstwach (0-10, 10-30, 30-50, 50-70 cm). Następnie pobierano materiał glebowy do oznaczenia aktywności dehydrogenaz i katalazy.

3.1.3. Doświadczenie na próbkach glebowych

Materiał glebowy do doświadczeń pobrano również po upływie trzech lat od zaprzestania zalewów z poletek kontrolnych (A) – nawadnianych tylko naturalnie opadami atmosferycznymi oraz z poletek (C) – systematycznie zalewanych przez cztery lata podwójną dawką ścieków (120 mm/zalew). Materiał najbardziej aktywnej biologicznie warstwy gleby (0-10 cm) pozbawiono widocznych korzeni i mezofauny, przesiano w stanie wilgotnym przez sito o oczkach 4 mm i prze-

chowywano w lodówce przez 30 dni. Następnie dla każdej gleby przygotowano zestaw 5-g próbek glebowych w szczelnie zamykanych szklanych naczyniach o pojemności 60 cm³. Takie przygotowanie materiału glebowego miało na celu zapewnienie możliwie jak największej jego jednorodności, by zmiany wszystkich badanych cech zachodziły w identycznych warunkach. Wybrane właściwości badanego materiału zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Wybrane właściwości materiału wierzchnich warstw (0-10 cm) badanych gleb
Table 2. Selected properties of surface material (0-10 cm) of tested soils

Właściwość gleby Soil property	Gleba – Soil					
	Nr 1		Nr 2		Nr 6	
	A	C	A	C	A	C
C _{org} (mg·g ⁻¹)	175,9	224,2	203,6	212,4	99,3	121,4
N _{og} (%)	1,10	1,18	1,26	1,24	0,77	0,85
NH ₄ ⁺ (mg N·kg ⁻¹) ^a	35,4	44,9	127,3	182,3	12,3	18,6
NO ₃ ⁻ (mg N·kg ⁻¹) ^a	44,6	64,4	43,2	114,2	11,9	25,2
NO ₂ ⁻ (mg N·kg ⁻¹) ^a	0,79	0,50	0,01	0,03	0,05	0,20
C:N	16,0	19,0	16,2	17,1	12,9	14,3
pH (CaCl ₂)	7,93	7,89	7,81	7,76	7,84	7,81
W _{akt} (% WHC) ^b	56,4	69,3	63,1	56,2	65,7	61,7

^awartość wyjściowa – initial value (t_0); ^bW_{akt} – wilgotność aktualna – actual moisture;
WHC – pełna pojemność wodna – water holding capacity.

Dla materiału glebowego pobranego z poletek kontrolnych (nr 1A, nr 2A, nr 6A) i z poletek zalewanych ściekami (nr 1C, nr 2C, nr 6C) zastosowano po trzy warianty doświadczalne: K – gleba o wilgotności równej ok. 60% pełnej pojemności wodnej (WHC), W – gleba zalana wodą destylowaną w stosunku 1:1 w/w oraz Śc – gleba zalana ściekami w stosunku 1:1 w/w:

- AK – gleba pobrana z pola kontrolnego, wilgotność kontrolna;
- AW – gleba pobrana z pola kontrolnego, zalana wodą;
- AŚc – gleba pobrana z pola kontrolnego, zalana ściekami;
- CK – gleba pobrana z pola nawadnianego ściekami, wilgotność kontrolna;
- CW – gleba pobrana z pola nawadnianego ściekami, zalana wodą;
- CŚc – gleba pobrana z pola nawadnianego ściekami, zalana ściekami.

Kombinacje doświadczalne obejmowały więc:

- trzy gleby organiczne: porośnięta topolą (nr 1), wierzbą (nr 2) i trawami nr 6);
- dwa sposoby nawadniania stosowanego poprzednio w warunkach polowych: gleba kontrolna (A), gleba zalewana ściekami (C);
- trzy warianty aktualnych warunków inkubacji: próbki o wilgotności kontrolnej odpowiadającej 60% pełnej pojemności wodnej (K), próbki zalane wodą (W) oraz próbki zalane ściekami (Śc).

Zalewano próbki o wilgotności kontrolnej (K). Próbki inkubowano w temperaturze 20°C. Prowadzono inkubację próbek bez wzbogacenia substratem węglowym (oznaczenia aktywności aktualnej) oraz z dodatkiem łatwo przyswajalnej glukozy w ilości 6 mg·g⁻¹ gleby (oznaczenia aktywności potencjalnej).

Zakres badań został istotnie rozszerzony. Oprócz aktywności dehydrogenaz i katalazy, Eh i pH, oznaczano też wydzielanie CO₂, pobór O₂, aktywność denitryfikacyjną i metanotroficzną, aktywność metanogenną, biomasę drobnoustrojów, żelazo Fe⁺², a także potencjalną aktywność biologiczną (w obecności glukozy).

Przygotowano osobne zestawy próbek, przeznaczone do oznaczeń gazowych, które nie były otwierane w trakcie doświadczenia. Każdy wskaźnik oznaczano w trzech powtórzeniach (w trzech losowo wybranych próbkach).

3.2. Metodyka pomiarów

W doświadczeniu polowym oraz w monolitach glebowych oznaczano aktywność dehydrogenaz i katalazy, potencjał redoks oraz wilgotność gleby. W doświadczeniu na próbkach glebowych, oprócz aktywności dehydrogenaz i katalazy, oznaczano wydzielanie CO₂, pobór O₂, utlenianie CH₄ (dodanego w stężeniu ok. 1,5% i 10% (v/v), emisję N₂O w obecności acetylenu, biomasę drobnoustrojów, Eh, pH, Fe⁺², aktywność potencjalną w obecności glukozy (dehydrogenazy, Eh, pH, Fe⁺², stężenie CO₂, O₂, N₂O, H₂, CH₄).

3.2.1. Oznaczanie aktywności dehydrogenaz w glebie

Do oznaczeń stosowano metodę Casida i in. [56], polegającą na inkubacji gleby z bezbarwnym, rozpuszczalnym w wodzie substratem, TTC (chlerek 2,3,5-trójfenylotetrazolu), który jest redukowany enzymatycznie do barwnego, nierozpuszczalnego w wodzie trójfenyloformazanu (TPF). TTC zastępuje naturalnie występujące akceptory, przejmując elektrony i protony, odłączone przez dehydrogenazy od utlenianych związków organicznych. Wytworzony produkt reakcji enzymatycznej ekstrahowany był z gleby alkoholem metylowym i oznaczany kolorymetrycznie ($\lambda = 485$ nm). Wyniki podawano w jednostkach aktywności dehydrogenazowej wynoszących nmol TPF·g⁻¹ s.m.·min⁻¹.

Z uwagi na możliwość chemicznej redukcji TTC przez substancje zredukowane obecne w glebie, stosowano korektę aktywności dehydrogenaz dla próbek glebowych o Eh < 300 mV wyznaczoną na podstawie redukcji TTC w glebie autoklawowanej (1 Atm., 120°C, 1 godz.).

3.2.2. Oznaczanie aktywności katalazy w glebie

Do oznaczeń stosowano metodę Johnson i Temple [132], polegającą na inkubacji gleby z dodanym nadtlenkiem wodoru (naturalnym substratem enzymu). Pozostały w glebie H_2O_2 , nierozłożony przez katalazę, odmiareczkowany nadmanganianem potasu w środowisku kwaśnym. Wyniki podawano w jednostkach aktywności katalazy, równych $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.3. Oznaczanie stężenia gazów w powietrzu nad glebą

Analizy gazów wykonywano na chromatografie gazowym GC-14 Shimadzu, wyposażonym w detektor przewodnictwa cieplnego (TCD) z kolumną wypełnioną Porapakem Q (oznaczenia CO_2 , N_2O , H_2 , CH_4) lub sitem molekularnym (oznaczenia O_2) [115,297]. Stężenie równowagowe gazów w powietrzu nad glebą wyrażano w $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$, stężenie tlenu w % v/v. Szybkość respiracji odnoszono do zmian zawartości CO_2 ($\text{mg C} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.} \cdot \text{h}^{-1}$ lub $\mu\text{g C} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.} \cdot \text{h}^{-1}$) i tlenu w powietrzu glebowym ($\text{cm}^3 \text{ O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.} \cdot \text{h}^{-1}$).

3.2.4. Oznaczanie biomasy drobnoustrojów w glebie

Zawartość biomasy mikroorganizmów glebowych (określoną przez ilość węgla biomasy mikroorganizmów, C_{mic}) oznaczano metodą SIR [250,260] na podstawie ilości CO_2 wydzielonego po 2 godz. inkubacji z glukozą ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) na łaźni wodnej w temperaturze 25°C . Zawartość biomasy wyrażano w $\text{mg} C_{\text{mic}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$. Oznaczenie biomasy metodą SIR, oparte na szybkiej reakcji komórek na dodanie glukozy charakteryzuje drobnoustroje aktualnie obecne w glebie. C_{mic} traktowane jest jako wskaźnik stanu aktualnego gleby (a nie aktywności potencjalnej).

3.2.5. Pomiar potencjału redoks gleby

Potencjał redoks (Eh, mV) określano za pomocą pomiaru potencjału elektrody platynowej względem nasyconej elektrody kalomelowej. Podczas pomiarów w laboratorium stosowano wysokiej klasy pH-metr PHM 82 firmy Radiometer Copenhagen, a w warunkach polowych mniej dokładny przenośny pH-metr pIONeer 10 (Radiometer Analytical) [106]. Oba urządzenia kalibrowano tymi samymi standardowymi roztworami buforowych. W doświadczeniach polowych oraz w monolitach glebowych stosowano pomiar *in situ*. W doświadczeniu na próbkach glebowych, Eh mierzono w zawiesinie glebowej o stosunku fazy stałej do ciekłej 1:1 (w/w).

3.2.6. Inne oznaczenia

Zawartość żelaza Fe^{+2} ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.) oznaczano metodą kolorymetryczną w ekstraktach $0,05\text{M}\text{H}_2\text{SO}_4$, wykorzystując reakcję barwną z α,α' -dipyridylem w buforze octanowym o $\text{pH} = 4,5$ [5].

Odczyn gleby oznaczano za pomocą zespolonej elektrody szklanej przy użyciu pH-metru pIONneer 10. W doświadczeniach polowych oraz w monolitach glebowych stosowano pomiar *in situ*. W doświadczeniu na próbkach glebowych, pH mierzone w zawieszynie glebowej o stosunku fazy stałej do ciekłej równym 1:1 (w/w).

Gęstość gleby oznaczono metodą grawimetryczną na podstawie stosunku masy gleby wysuszonej w temperaturze 105°C do jej objętości wyjściowej (100 cm^3) przy nienaruszonej strukturze [252].

Zawartość substancji organicznej (OM) oznaczano na podstawie straty masy po wyprażeniu suchej gleby w 500°C . Do obliczenia ilości węgla organicznego C_{org} stosowano wzór: $C_{\text{org}} = \text{OM} \cdot 0,58$ [286]. Zawartość C_{org} podawano w procentach lub $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.

Zawartość rozpuszczalnych form azotu NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ oznaczano w ekstraktach $0,0125\text{M}\text{CaCl}_2$ przy użyciu przepływowego analizatora spektrofotometrycznego FIA-Star 5010, Foss Tecator [152] i wyrażano w przeliczeniu na azot, np. N-NO_3^- , $\text{mg N}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.

Wilgotność wagową gleby (% w/w) określano metodą wagową po 24 godz. suszeniu w temperaturze 105°C [33,286].

Oznaczenia aktywności potencjalnej gleby [53] przeprowadzono wzbogacając glebę glukozą ($6\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby) na starcie doświadczenia (w czasie t_0). Próbki inkubowano równolegle do oznaczeń aktywności opartej na wykorzystaniu natywnych (naturalnych) związków organicznych. W czasie inkubacji z glukozą oznaczano wszystkie wskaźniki oprócz aktywności katalazy (pominięta ze względów metodycznych).

Ocenę wpływu systematycznych zalewów ściekami oparto w doświadczeniu polowym na podstawie wartości średnich badanych wskaźników uzyskanych ze wszystkich cykli zalewowych w ciągu dwóch sezonów wegetacyjnych objętych badaniami, w doświadczeniach laboratoryjnych natomiast – na podstawie wszystkich pomiarów wykonanych w pojedynczych zalewach. Analizy statystyczne otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 6. Dla oceny oddziaływania ścieków na badane charakterystyki aktywności biochemicznej zastosowano metodę jedno- lub wieloczynnikowej analizy wariancji (testowanie istotności różnic pomiędzy poszczególnymi średnimi oparte na metodzie najmniejszych istotnych różnic, test LSD).

4. WYNIKI I DYSKUSJA

4.1. Doświadczenie polowe

4.1.1. Zróżnicowanie aktywności enzymatycznej w glebach kontrolnych

W warunkach naturalnych wielkość populacji i czynności życiowe drobno-ustrojów środowiska glebowego podlegają stałym wahaniom. Aktywność enzymatyczna gleby wykazuje wyraźną zmienność sezonową i dobową oraz znaczne fluktuacje, zależne głównie od warunków klimatycznych i dostępności substratu. Trudne jest więc znalezienie punktu odniesienia do oceny wpływu wybranego czynnika na właściwości biologiczne gleby. Należy zatem określać zakres zmienności badanej właściwości w układzie kontrolnym.

Materiałem kontrolnym w doświadczeniu polowym były gleby pobierane z poletek naturalnie nawadnianych opadami atmosferycznymi. W okresie doświadczenia, temperatura gleb kontrolnych na głębokości 10 cm wynosiła od 7 do 27°C, a wilgotność wagowa w stosunku do suchej masy gleby, od 37 do 311% w/w (tab. 3).

Tabela 3. Wilgotność i temperatura gleb kontrolnych (nawadnianych tylko opadami atmosferycznymi). Wartości średnie (w nawiasach odchylenie standardowe), maksymalne i minimalne na poszczególnych głębokościach w sezonach wegetacyjnych 1999-2000

Table 3. Gravimetric water content and temperature of control soils (atmospheric precipitation only). Mean values with standard deviations (in brackets), and maximum and minimum values detected at different soil depths during 1999-2000 vegetation seasons

Gleba – Soil Roślina – Plant	Parametr – Parameter	Głębokość Depth (cm)	Średnia Mean	Max	Min
Nr 1	Temperatura – Temperature (°C)	0-10	16,1 (5)	27	7
Topola Poplar	Wilgotność – Moisture (% w/w)	0-10	141,1 (35)	189,7	58,6
		10-30	183,4 (51)	312,3	99,4
		30-50	192,0 (40)	275,8	133,8
		50-70	217,6 (51)	311,2	135,1
Nr 2	Temperatura – Temperature (°C)	0-10	16,9 (4)	25	11
Wierzba Willow	Wilgotność – Moisture (% w/w)	0-10	126,7 (11)	147,7	84,6
		10-30	163,2 (39)	262,2	86,1
		30-50	183,4 (34)	294,7	112,4
		50-70	203,2 (54)	308,9	93,4
Nr 6	Temperatura – Temperature (°C)	0-10	16,7 (3)	22	11
Trawy Grasses	Wilgotność – Moisture (% w/w)	0-10	55,2 (12)	85,5	37,2
		10-30	76,8 (25)	156,8	48,9
		30-50	133,4 (33)	209,6	70,5
		50-70	121,6 (35)	182,9	70,3

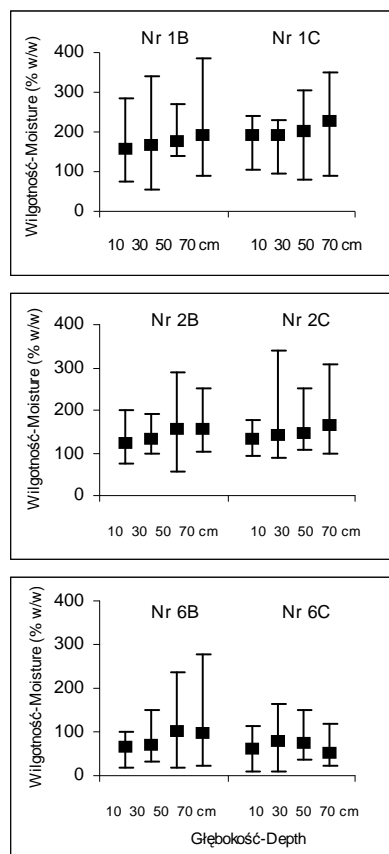
Konsekwencją naturalnych wahań parametrów fizycznych gleby były fluktuacje jej funkcji biochemicznych. Aktywność dehydrogenazowa (DHA) gleb kontrolnych zmieniała się od 0,0015 do 1,56 nmolTPF·g⁻¹·min⁻¹. Gleba porośnięta topolą wykazywała najwyższy poziom DHA, średnio 1,8 razy i 2,3 razy wyższy niż odpowiednio gleba z udziałem wierzby i mieszanki traw. Aktywność dehydrogenaz wierzchnich warstw istotnie przewyższała aktywność warstw głębszych ($P < 0,001$), co związane jest ze spadkiem liczebności i aktywności drobnoustrojów w głąb profilu. Zjawiska takie są powszechnie obserwowane [63,111,131,145,148,284]. Katalaza natomiast, szczególnie w przypadku gleby znajdującej się pod uprawą traw, często była bardziej aktywna poniżej 30 cm niż w wierzchniej warstwie. Podobny wzrost aktywności katalazy w głębszych partiach profilu glebowego obserwował m.in. Pawluczuk [223]. Zakres aktywności katalazy w badanych glebach kontrolnych wynosił od 6,95 do 34,2 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Średnia jej wartość w glebie mineralno-murszowej była o ok. 15% niższa niż w glebach torfowo-murszowych.

Zróźnicowanie aktywności biochemicznej w glebach kontrolnych wynikało z naturalnych różnic procesów biotycznych i abiotycznych zachodzących w różnych glebach.

4.1.2. Zmiany właściwości gleb pod wpływem ścieków

Zalanie gleby ściekami spowodowało dostarczenie wody w ilościach przekraczających te, jakie gleba otrzymuje w wyniku opadów atmosferycznych. Jednocześnie wniesione zostały znaczne ilości związków chemicznych oraz populacje drobnoustrojów zymogennych [159,210]. Wymuszone przesiąkanie wody i ścieków przez profile glebowe implikowało wystąpienie szeregu dodatkowych, współzależnych procesów fizycznych, chemicznych i biologicznych. Skład ścieków nie był przy tym stały – doświadczenie symulowało ich wykorzystanie rolnicze, a więc skład ścieków był zależny od jakości odpadów aktualnie dopływających do oczyszczalni oraz wydajności procesów technologicznych w trakcie oczyszczania [18].

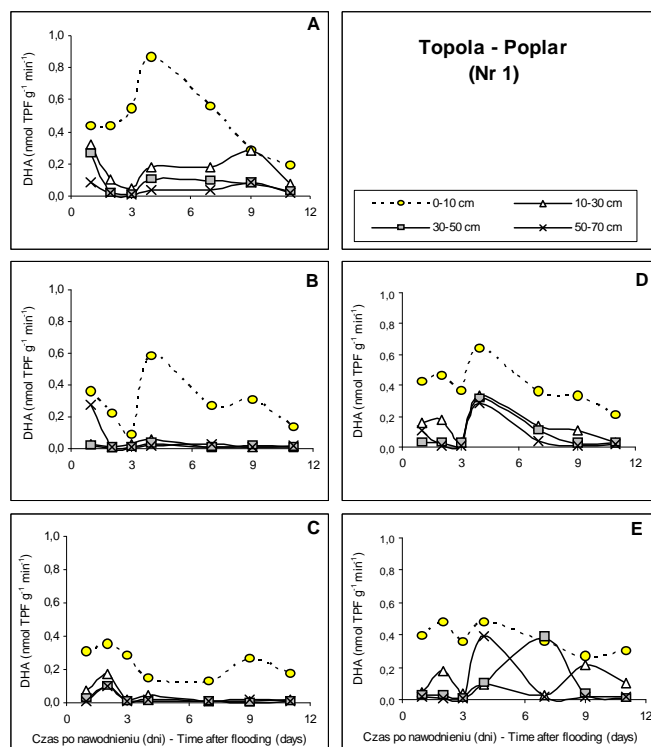
Temperatura gleby zalewanej ściekami wynosiła średnio 15,7°C, 16,7°C i 16,9°C odpowiednio na poletkach z topolą, wierzbą i trawami. Wilgotność gleby w wierzchnich warstwach dochodziła do 286%, w głębszych warstwach profilu sporadycznie przekraczała 350% w/w (rys. 2).



Rys. 2. Wilgotność gleb torfowo-murszowych (porośniętej topolą nr 1 i wierzbą nr 2) oraz gleby mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6) nawadnianych ściekami miejskimi w doświadczeniu polowym. Wartości średnie z 2 lat oraz minimalne i maksymalne (słupki). B i C – gleba zalewana pojedynczą i podwójną dawką ścieków (600 mm i 1200 mm rocznie)

Fig. 2. Gravimetric water content in peat-muck soils (under poplar No. 1 and under willow No. 2) and mineral-muck soil (under grasses No.6) irrigated with municipal wastewater – field experiment. Two-year averages, minimal and maximal values. B and C – soil flooded with low and high wastewater dose (600 and 1200 mm per year)

Dynamika aktywności enzymatycznej w warunkach doświadczenia polowego przedstawiona została na przykładzie zalewów letnich dwóch gleb torfowo-murszowych (rys. 3 i 4). W przypadku gleby porośniętej topolą (rys. 3), zalanie ściekami spowodowało wyraźne obniżenie aktywności dehydrogenaz we wszystkich warstwach profilu, szczególnie w glebie nawadnianej wyższą dawką ścieków (C).

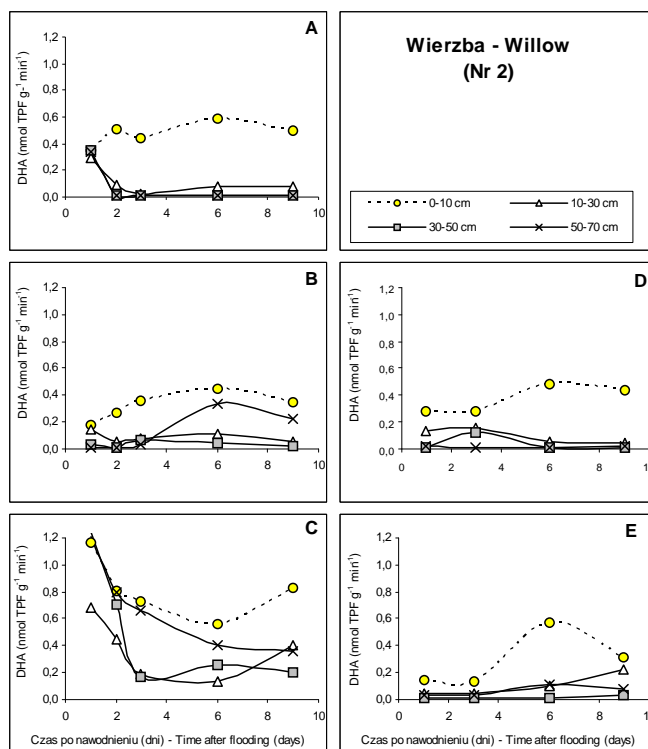


Rys. 3. Dynamika aktywności dehydrogenaz (DHA) w poszczególnych warstwach gleby torfowo-murszowej porośniętej topolą (nr 1) w letnim cyklu zalewowym (16-27.08.1999 r., doświadczenie polowe). A – gleba kontrolna; B i C – gleba zalewana pojedynczą i podwójną dawką ścieków; D i E – gleba zalewana pojedynczą i podwójną dawką czystej wody (odpowiednio 600 i 1200 mm rocznie)

Fig. 3. Dehydrogenase activity (DHA) at different soil depth under poplar (soil No.1) during irrigation period of 16-27 August 1999 (field experiment). A – control soil; B and C – soil irrigated with low and high wastewater doses); D and E – soil irrigated with low and high tap water doses (600 and 1200 mm per year), respectively

W glebach kontrolnych zalewanych wodą (D i E) obserwowano lekkie obniżenie aktywności w wierzchniej warstwie oraz stymulację w warstwach niższych. Zachowanie gleby torfowo-murszowej z uprawą wierzby było po zalaniu odmienne. Przy podwójnej dawce ścieków, aktywność dehydrogenaz znacznie wzrosła w całym profilu, zwłaszcza bezpośrednio po wprowadzeniu ścieków (rys. 4).

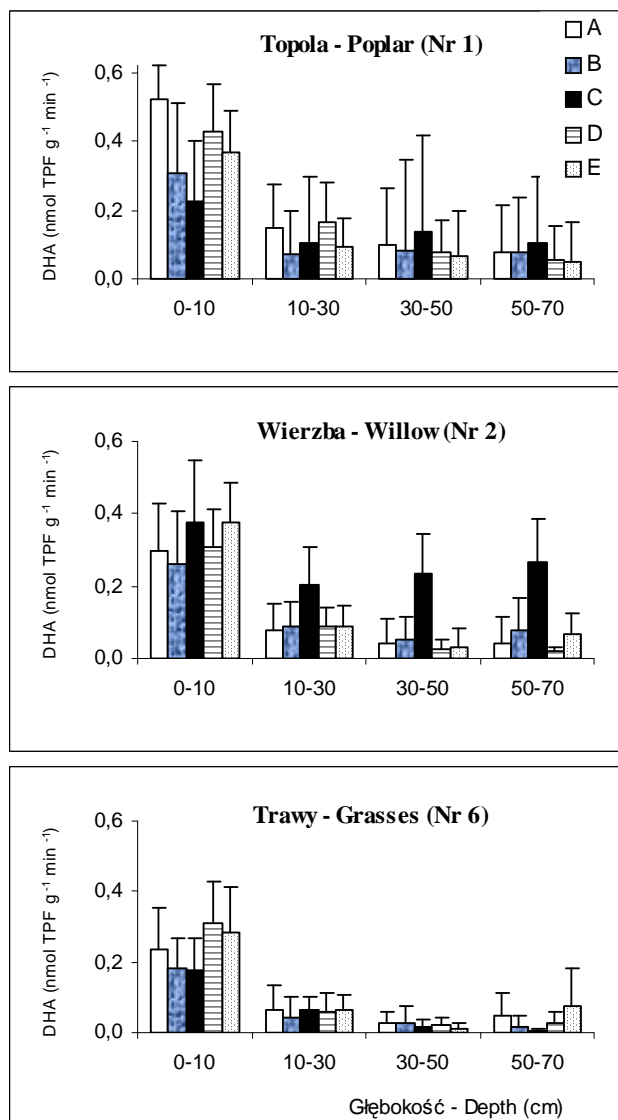
Wartości średnie aktywności enzymów w poszczególnych warstwach profili poletek doświadczalnych, wyznaczone na podstawie 2-letniego doświadczenia polowego, przedstawione zostały na rysunkach 5 i 6. Reakcja dehydrogenaz na zastosowane zalewy miała nieco inny charakter w każdym układzie glebowo-roślinnym.



Rys. 4. Dynamika aktywności dehydrogenaz (DHA) w poszczególnych warstwach gleby torfowo-murszowej porośniętej wierzbą (nr 2) w zalewie letnim (19-29.07.1999). Objaśnienia jak na rysunku 3
Fig. 4. Dehydrogenase activity (DHA) at different soil depth under willow (soil No. 2) during irrigation period of 19-29 July 1999. Explanation as in Fig. 3

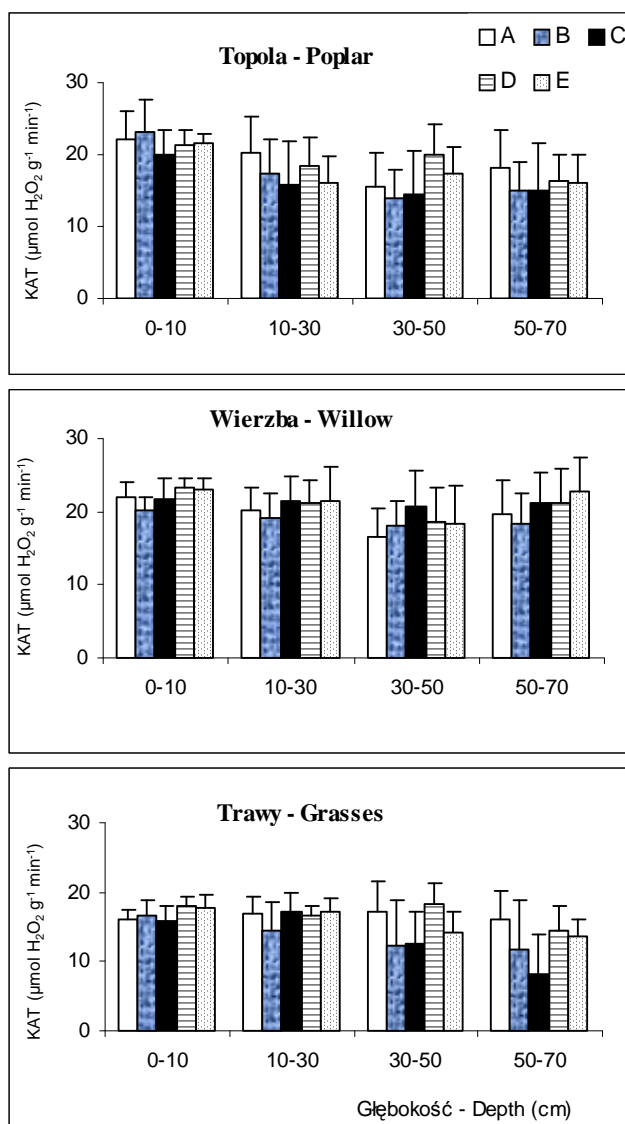
W glebie torfowo-murszowej porośniętej topolą oraz mineralno-murszowej z udziałem traw, ścieki powodowały obniżenie aktywności dehydrogenaz. W wierzchniej warstwie hamowanie aktywności DHA nasilało się przy wyższej dawce ścieków, szczególnie pod uprawą topoli. Zmiany aktywności dehydrogenaz w warstwach poniżej 10 cm nie miały jednolitego charakteru: w obrębie każdej kombinacji zróżnicowanie było wysokie. W glebie porośniętej wierzbą wpływ ścieków na aktywność dehydrogenaz był zdecydowanie inny. Zalewy podwójną dawką ścieków powodowały podwyższenie DHA w całym profilu, szczególnie poniżej 10 cm.

Czysta woda na ogół wpływała korzystniej niż ścieki na aktywność oksydoreduktaz. W glebie z uprawą wierzby i mieszanki traw zalewy wodne stymulowały aktywność dehydrogenaz do wartości równych lub nawet wyższych niż zalewy ściekami. Aktywność dehydrogenaz wierzchniej warstwy gleby z udziałem topoli była w mniejszym stopniu hamowana zalewami czystą wodą niż ściekami.



Rys. 5. Aktywność dehydrogenaz (DHA) na poszczególnych głębokościach zastosowanych kombinacji nawodnień testowanych gleb. Wartości średnie z dwóch sezonów wegetacyjnych doświadczenia polowego wraz z odchyleniami standardowymi. Objasnienia jak na rysunku 3

Fig. 5. Soil dehydrogenase activity (DHA) at a different soil depth of experimental plots in field experiment. Averaged values of two consecutive years with standard deviations. Explanation as in Fig. 3



Rys. 6. Aktywność katalazy (KAT) na poszczególnych głębokościach zastosowanych kombinacji nawodnień testowanych gleb. Wartości średnie z dwóch sezonów wegetacyjnych wraz z odchyleniami standardowymi. Objasnienia jak na rysunku 3

Fig. 6. Soil catalase activity (KAT) at a different soil depth of experimental treatments, field experiment. Averaged values of two consecutive years with standard deviations. Explanation as in Fig. 3

Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi aktywności dla zastosowanych wariantów nawodnień wyznaczono na podstawie jednoczynnikowej analizy wariancji. Przedstawiony w tabelach 4 i 5 wpływ nawodnień na aktywność enzymów (*efekt* DHA, *efekt* KAT) wyznaczono według wzoru $[(Akt_{B,C,D,E} - Akt_A) / Akt_A] \cdot 100$, gdzie $Akt_{B,C,D,E}$ oznacza aktywność w kombinacji nawadniającej (B,C,D lub E), zaś Akt_A – aktywność w kombinacji kontrolnej (A).

Tabela 4. Zmiany aktywności dehydrogenaz (*efekt* DHA) wywołane nawadnianiem ściekami (warianty B i C) lub czystą wodą (warianty D i E) w doświadczeniu polowym. Efekt nawodnień wyrażono w procentach jako obniżenie (minus) lub podwyższenie (plus) wartości w stosunku do materiału kontrolnego. Wartości istotnie różne od kontroli oznaczono czcionką pogrubioną ($P < 0,001$)

Table 4. Effect of wastewater (B and C) or tap water (D and E) on soil dehydrogenase activity (*effect* DHA) in tested soils as related to control soils in plus (stimulation) or minus (inhibition) in field experiment; bold – for significant differences ($P < 0.001$)

Gleba, roślina Soil, plant	Głębokość Depth (cm)	<i>Efekt</i> DHA– <i>Effect</i> DHA (%)			
		B	C	D	E
Nr 1	0-10	-42	-57	-18	-30
Topola	10-30	-51	-31	+10	-36
Poplar	30-50	-16	+43	-20	-35
	50-70	-3	+32	-34	-38
Nr 2	0-10	-11	+27	+4	+27
Wierzba	10-30	+16	+160	+12	+12
Willow	30-50	+35	+494	-38	-23
	50-70	+92	+562	-53	+74
Nr 6	0-10	-22	-26	+32	+20
Trawy	10-30	-31	+1	-7	-1
Grasses	30-50	+2	-38	-12	-55
	50-70	-62	-84	-42	+64

Ścieki powodowały istotne ($P < 0,001$) obniżenie aktywności dehydrogenaz w wierzchnich warstwach gleby torfowo-murszowej porośniętej topolą (średnio o 50%) oraz gleby mineralno-murszowej porośniętej trawami (średnio o 24%), natomiast podwyższenie aktywności przy dawce podwójnej ścieków w profilu gleby torfowo-murszowej z udziałem wierzby (silne poniżej 10 cm, średnio o 400%). Zalewy wodne modyfikowały istotnie aktywność jedynie w wierzchniej warstwie gleby mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6), gdzie obserwowano stymulację aktywności dehydrogenaz średnio o 26%.

W przypadku katalazy, oddziaływanie systematycznych nawodnień było stosunkowo niewielkie. Enzym oznaczany w wierzchnich warstwach w mniejszym stopniu reagował na stosowane nawodnienia niż enzym niższych partii profili (tab. 5). Stoso-

wanie ścieków powodowało na ogół obniżenie aktywności w warstwach głębszych. Hamowanie aktywności katalazy było istotne w glebie mineralno-murszowej przy obydwu poziomach nawodnień ściekami (średnio o 30%, $P < 0,001$). W glebie porośniętej wierzbą, podobnie do dehydrogenaz, katalaza była stymulowana obecnością ścieków (istotnie w warstwie 30-50 cm, o 25% w porównaniu do kontroli). Czysta woda na ogół wpływała korzystniej na aktywność katalazy, niż ścieki.

Tabela 5. Zmiany aktywności katalazy (*efekt KAT*) wywołane nawadnianiem ściekami lub czystą wodą w doświadczeniu polowym. Efekt nawodnień wyrażono w procentach jako obniżenie (minus) lub podwyższenie (plus) wartości w stosunku do materiału kontrolnego. Oznaczenia jak w tabeli 4
Table 5. Effect of wastewater (B and C) or tap water (D and E) on soil catalase activity (*effect KAT*) in tested soils as related to control soils (A). Explanations as in Table 4

Gleba, roślina Soil, plant	Głębokość Depth (cm)	<i>Efekt KAT – Effect KAT (%)</i>			
		B	C	D	E
Nr 1	0-10	+5	-9	-3	-2
Topola	10-30	-15	-22	-20	-20
Poplar	30-50	-10	-7	+29	+13
	50-70	-17	-17	-11	-11
Nr 2	0-10	-8	-1	+7	+5
Wierzba	10-30	-6	+6	+5	+6
Willow	30-50	+10	+25	+13	+11
	50-70	-7	+8	+8	+16
Nr 6	0-10	+4	0	+12	+12
Trawy	10-30	-14	+2	-1	+2
Grasses	30-50	-29	-27	+6	-18
	50-70	-27	-48	-10	-15

Otrzymane wyniki trudne są do interpretacji. Jednak dane literaturowe również nie są jednoznaczne. Niewolak i Tucholski [209] określali wpływ nawadniania czystą wodą i ściekami w 2-letnim doświadczeniu polowym. Autorzy nie stwierdzili większych różnic w liczebności bakterii heterotroficznych, promieniowców, grzybów nitkowatych oraz drożdżoidalnych w glebach mineralnych kontrolnych i nawadnianych ściekami. Natomiast liczebność bakterii cyklu azotowego (m.in. amonifikacyjnych, denitryfikacyjnych, wiążących azot, proteolitycznych) była z reguły wyższa w glebach nawadnianych. Wzrastało też zagęszczenie drobnoustrojów w głębszych warstwach profilu. Zmiany te nie były jednak istotne [208,210,211]. Liczba bakterii autochtonicznych w glebie wynosiła ok. 10^6 - 10^{10} komórek na 1 g gleby. Po dodaniu ścieków obserwowano na ogół przejściowy zanik drobnoustrojów autochtonicznych i zmniejszenie liczebności gatunków. Po fazie wstępnego przyrostu namnożonych zymogennych bakterii heterotroficznych, promieniowców i grzybów nitkowatych, ich liczba malała, a po

pewnym okresie została przywrócona naturalna równowaga właściwa dla danej gleby [165,181,209]. Przyczyną jest szybkie pobranie jednego lub kilku istotnych składników odżywczych, znaczenie mają też zjawiska antybiozy, wytwarzanie toksyn i „pożeranie” bakterii i grzybów przez pierwotniaki [209]. Jak podaje Kutera [165] jeśli nawadniane są ściekami ubogie gleby piaszczyste, lub ścieki ubogie są w azot, to dłuższe przerwy w nawodnieniach mogą spowodować zanik drobnoustrojów. Słabo oczyszczone ścieki bytowo-gospodarcze zawierają bakterie, np. *E.coli*, nawet do 10^6 komórek $\cdot\text{cm}^{-3}$ [181]. Na zalewane powierzchnie Hajdowa trafiało przeciętnie od 10500 do 21000 komórek okrężnicy na 1 cm^2 na rok i jak szacują autorzy [185], na 1 g gleby przypadałoby ich średnio 55, czyli glebę można uznać za czystą. Wody drenarskie odpływające z nawadnianych powierzchni zawierały stężenia *E.coli* mniejsze o ok. 99,9%. Natomiast liczebność pałeczek *Salmonella* w ściekach wynosiła średnio w stosunku do pałeczek okrężnicy 1:2300000. Stopień usunięcia komórek w procesie ich transportu przez profile glebowe wynosił od $4\cdot 10^6$ do $1\cdot 10^3$, co jest zgodne z rzędami wielkości podawanymi przez innych autorów [185]. Badania modelowe wskazują na silny wpływ inokulacji gleby bakteriami i grzybami nie tylko na poziom jej aktywności biologicznej, ale też na właściwości fizyczne i fizyko-chemiczne gleby [133,182,203].

Ross i in. [237] badali aktywność biologiczną gleby mineralnej (4% C_{org}) nawadnianej oczyszczonymi ściekami przez 16 miesięcy. Obserwowane różnice w respiracji, biomase drobnoustrojów, aktywności inwertazy, amylazy, ureazy, fosfatazy, sulfatazy pomiędzy glebą nawadnianą ściekami i wodą były rzadko istotne, nie zaobserwowano też wyraźnego trendu zmian przy wzbogaceniu ścieków w łatwo dostępny węgiel.

Schipper i in. [240] prowadzili 3-letnie obserwacje właściwości biologicznych i chemicznych gleby leśnej (7,8% C_{org}) nawadnianej ściekami. Autorzy otrzymali niejednoznaczne wyniki i ostrożnie je komentują. Niejednakowa reakcja, brak stymulacji aktywności mikrobiologicznej, a nawet jej obniżenie w glebie nawadnianej ściekami może wskazywać na wystąpienie zmian niekorzystnych. Nie jest jednak jasne, dlaczego ścieki po II^o oczyszczania wpływają niekorzystnie lub różnie na parametry biologiczne gleby, podczas gdy wycieki z mleczarni, zawierające znaczne ilości składników pokarmowych i wysoki wskaźnik BZT, podwyższały biomasę i aktywność enzymów. Autorzy sugerują, że być może ścieki, wzbogaciwszy ubogą glebę w składniki odżywcze, spowodowały przyspieszenie mineralizacji ściółki i dostępnej materii organicznej jeszcze przed rozpoczęciem doświadczenia. Gleba w czasie pomiarów zawierała więc mniejszą populację o zmienionym składzie i aktywności niż nienawadniana gleba kontrolna. Możliwe jednak, zastrzegają autorzy, że wystąpiły tu szkodliwe oddziaływania, wywołane przez te składniki ścieków, których nie analizowano.

Filip i in. [84,85] obserwowali korzystny wpływ długotrwałego (prawie 100 lat) nawadniania gleb mineralnych ściekami. Pomimo niebezpieczeństwa akumulacji toksyn i metali ciężkich, wzbogacenie gleby w składniki pokarmowe spowodowało wzrost liczebności mikroorganizmów, zawartości ATP i aktywności β -glukozydazy,

proteiny i fosfatazy. Podwyższony poziom czynności enzymów autorzy wiążą m.in. z nagromadzeniem substratów organicznych wskutek długotrwałych zabiegów. Ponadto obserwowano lekkie podwyższenie pH gleby kwaśnej, wzrost zawartości C i N oraz obniżenie wartości C:N, dodatkowo sprzyjające aktywności życiowej drobnoustrojów. Podwyższony poziom czynności biochemicznej zaobserwowano też w wariancie gleby, w której zakończono praktykę nawadniania ściekami przed 20 laty. Fakt ten autorzy tłumaczą obecnością trwałych kompleksów organiczno-mineralnych immobilizujących enzymy i/lub różnicą w populacji drobnoustrojów w porównaniu do gleby kontrolnej.

Goyal i in. [112] obserwowali podwyższenie aktywności dehydrogenaz i biomasy mikrobiologicznej, a Monnett i in. [201] – szybkości denitryfikacji w wyniku stosowania ścieków. Meli i in. [195] nie stwierdzili niekorzystnego wpływu 15-letnich nawodnień ściekami na zawartości i aktywności biomasy oraz analogiczne zmiany po zalewach czystą wodą gleby klimatu suchego (1% C_{org}). Natomiast Ghinogeanu i in. [99] oraz Kandeler i in. [137] stwierdzili, że aktywność pewnych enzymów (sacharazy, ureazy, arylsulfatazy i ksylanazy) może być hamowana przez wody ściekowe i jest ściśle uzależniona od ilości i częstości stosowanych nawodnień. Tam [283] obserwowano podwyższenie czynności alkalicznej fosfatazy, zawartości ATP, liczebności amonifikatorów i denitryfikatorów oraz, po przejściowym obniżeniu w początkowym okresie inkubacji, podwyższenie aktywności dehydrogenaz. Badając oddziaływanie wód ściekowych na hydrolazy, uczestniczące w rozkładzie materii organicznej, Shackle i in. [246] zanotowali istotne obniżenie aktywności sulfatazy i β-glukozydazy oraz brak wpływu na czynność fosfatazy.

Ramirez-Fuentes i in. [232] obserwowali zwiększenie zawartości materii organicznej, biomasy i respiracji, lecz obniżenie tempa mineralizacji N w glebach mineralnych zalewanych ściekami przez 5-90 lat. Zanotowano też zahamowanie aktywności prowadzącej do utleniania toksycznego NO₂⁻. Na tej podstawie, pomimo braku ewidentnych efektów szkodliwych, autorzy sugerują jednak możliwość wystąpienia niekorzystnych zmian w funkcjonowaniu drobnoustrojów glebowych, jakie mogą wynikać z długotrwałego stosowania ścieków.

Shapir i in. [247] określali zdolność mineralizacji atrazyny w doświadczeniu lizymetrycznym, w warunkach stosowania ścieków i osadów ściekowych. Liczebność bakterii znacznie wzrastała w całym profilu, w porównaniu do gleby zalanej czystą wodą, natomiast aktywność hydrolityczna uległa istotnemu podwyższeniu tylko w warstwie wierzchniej. Przeprowadzone badania genetyczne materiału glebowego (analiza genów związanych z rozkładem atrazyny) potwierdziły zachowanie zdolności bioremediacji tego herbicydu w warunkach zalewania gleby ściekami.

Biernacka i in. [29] obserwowali istotny wpływ wieloletniego nawadniania gleb murszowo-torfowych ściekami przemysłu rolno-spożywczego na ich właściwości

chemiczne (kwasowość, zawartość kwasów huminowych, makro- i mikroelementów) i biochemiczne (wydzielanie CO₂, przemiany azotu, rozkład błonnika).

Speir [261] w przeglądzie literatury, dotyczącej nawadniania gleb ściekami różnego pochodzenia wskazuje na niejednorodny charakter zmian i niekiedy trudne do interpretacji wyniki. Zatem reakcja drobnoustrojów na zalewanie gleby ściekami nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniona i dostarcza sprzecznych informacji. Jednakże zainteresowanie problemem skutków wywoływanych w glebie nawadnianiem ściekami jest coraz większe. Dostarczanie ścieków do gleby jest metodą ich utylizacji, oczyszczenia, odzyskania składników pokarmowych, wykorzystania wody do nawodnienia roślin oraz uzupełnienia zasobów wody gruntowej. Zasadne jest takie wykorzystanie fizycznych, chemicznych i biologicznych właściwości układu gleba-roślina, żeby jakość środowiska glebowego nie uległa zmniejszeniu [175,176]. O przydatności gleb do nawadniania ściekami decyduje jej przepuszczalność i przewiewność. Najodpowiedniejsze są piaski słabo gliniaste, lecz przy zastosowaniu właściwej techniki nawadniania mogą być również wykorzystane gleby organogeniczne. Szczególnie godne polecenia są tu gleby murszowe i torfy przesuszone, a nie nadają się w zasadzie tylko te gleby, których nie można należycie odwodnić [165]. Doświadczenia przeprowadzone na glebach torfowych wykazały dobre efekty oczyszczania ścieków i produkcji łąkowej [34].

Rozbieżności w intensywności, ale też i kierunku zmian aktywności drobnoustrojów pod wpływem nawodnień ściekami (tab. 6) mogą w znacznej części wynikać z właściwości gleby, jakości samych ścieków i niejednorodności materiału glebowego – fizycznej, biologicznej i chemicznej [124,125,133,182]. Ponadto, jak wykazały badania, nawet w glebie o większym stopniu jednorodności (upakowane kolumny), ścieki przemieszczają się niejednocie [183].

Tabela 6. Porównanie efektu działania ścieków na aktywność biologiczną – dane literaturowe
Table 6. The effect of wastewater of some soil biological properties – informations from literature

Wskaźnik – Index	Kierunek zmian wywołany ściekami Change after flooding with wastewater	
	Podwyższenie – Stimulation	Obniżenie – Inhibition
DHA – Dehydrogenase activity	[39,43,112,283]	[39,43,283]
Biomasa drobnoustrojów Microbial biomass	[112,232,237,261]	[237,261]
Oddychanie – Respiration	[29,232,237,261]	[237,261]
Inne – Other	[29,39,43,84,85,201,210, 237,240,247,261,283]	[38,39,43,99,137,232, 237,240,246,261]

Wydajność bio-filtracji w układzie glebowym jest efektem wypadkowym wszystkich procesów w nim zachodzących. Interpretację wyników badań utrudnia znacznie fakt, że ścieki nie mają określonego i stałego składu. Szacując wpływ ście-

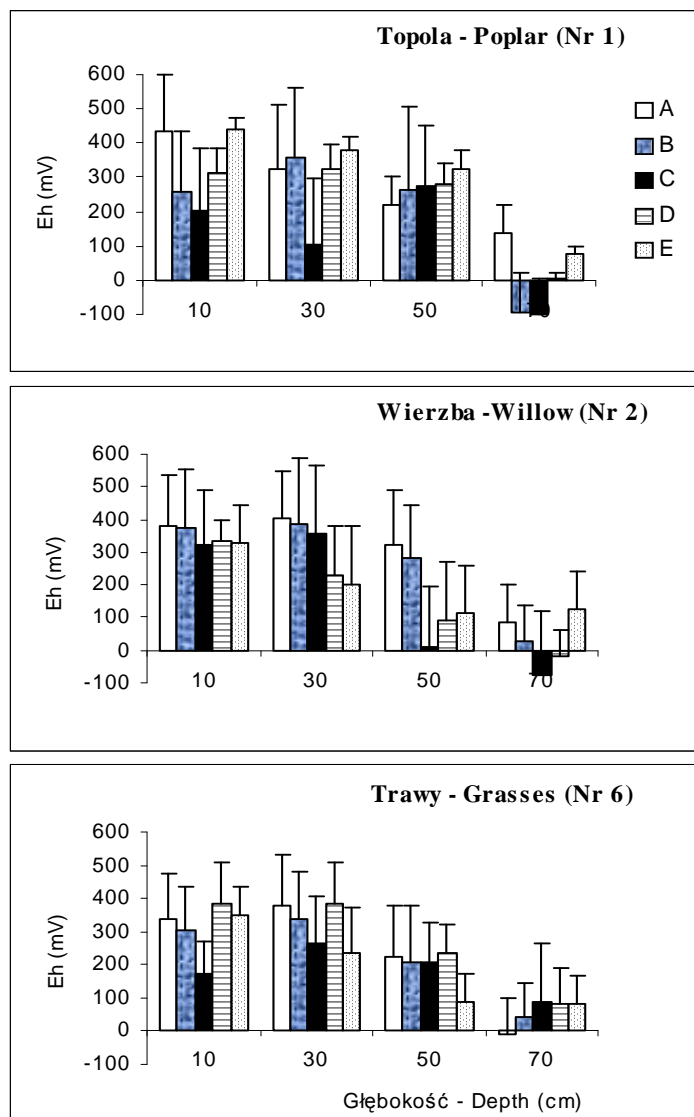
ków na głębie mamy więc do czynienia z układem niesprecyzowanym i zmiennym. Prawdopodobnie jednak, wykorzystanie ścieków może być w przyszłości koniecznością nie tylko w obszarach aktualnie wykazujących deficyt wody [10,219]. Dokładne badanie efektów działania ścieków na glebę jest zatem coraz bardziej uzasadnione.

Oznaczenia wstępne w pierwszym roku nawodnień (1997 r.) wskazywały na wyższą aktywność enzymatyczną we wszystkich glebach zalewanych ściekami, również w układzie z topolą i trawami (dane nie zostały przedstawione graficznie). W odniesieniu do gleb kontrolnych różnice te były jednak nieistotne i prawdopodobnie wynikały z naruszenia struktury gleby w trakcie prac przygotowawczych. W następnym sezonie wegetacyjnym (1998 r.) stwierdzono zmianę tendencji – obniżenie aktywności oksydoreduktaz w glebach z udziałem topoli (nr 1) i mieszanki traw (nr 6) w stosunku do gleb kontrolnych. Jak wspomniano w części metodycznej, w niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki tylko z lat 1999-2000, ponieważ poprzednie oznaczenia prowadzone były niesystematycznie i nie obejmowały kombinacji gleb zalewanych czystą wodą. Wartości średnie aktywności w poszczególnych wariantach wyznaczone dla lat 1999 i 2000 – analizowanych w niniejszej pracy – nie różniły się istotnie.

4.1.3. Procesy oksydoredukcyjne w glebach

Nadmiar wody w glebowym ośrodku porowatym wywołuje szereg powiązanych ze sobą przemian o charakterze fizycznym, chemicznym i biologicznym. O intensywności przemian redoks decyduje stan całego układu – wzajemne proporcje każdej z faz glebowych, ich skład jakościowy oraz bardzo istotne zmienne – organizmy żywe i korzenie roślin. Wprowadzanie ścieków do gleby, wraz z rozpuszczonymi substancjami organicznymi i nieorganicznymi oraz cząstkami zawieszonymi i drobnoustrojami, ma wpływ zarówno na wewnątrzkomórkowe procesy biologiczne jak też fizyczne i chemiczne, w tym przemiany oksydoredukcyjne, zachodzące w środowisku zewnętrznym komórek, lecz w znaczącym stopniu powiązane z procesami biochemicznymi.

Wartości Eh gleb kontrolnych były wyższe od 300 mV na głębokości 10 cm, wynosiły średnio 435 mV, 379 mV i 337 mV (odpowiednio w glebie porośniętej topolą nr 1, wierzbą nr 2 i trawami nr 6) oraz obniżały się w głąb profili. Na głębokości 70 cm wartości średnie Eh wynosiły 137 mV, 87 mV i -12 mV (odpowiednio w glebie porośniętej topolą nr 1, wierzbą nr 2 i trawami nr 6). Nawadnianie poletek ściekami powodowało na ogół obniżenie Eh (rys. 7, tab.7). Zmiany były istotne ($P < 0,001$) w skrajnych warstwach gleby porośniętej topolą (nr 1) przy obu dawkach ścieków (obniżenie od 175 do 235 mV) oraz na głębokości 30 cm przy dawce podwójnej (obniżenie średnio o 220 mV). W glebie porośniętej wierzbą (nr 2) obniżenie Eh przy dawce podwójnej wynosiło na 50 i 70 cm średnio 240 mV, a w glebie porośniętej trawami (nr 6) na głębokości 10 i 30 cm o ok. 140 mV.



Rys. 7. Potencjał oksydoredukcyjny (Eh) na poszczególnych głębokościach zastosowanych kombinacji nawodnień testowanych gleb. Wartości średnie z dwóch sezonów wegetacyjnych wraz z odchyleniami standardowymi. Objasnienia jak na rysunku 3

Fig. 7. Soil redox potential (Eh) at different soil depths of experimental treatments under field conditions. Averaged values of two consecutive years with standard deviations. Explanation as in Fig. 3

Zalewy czystą wodą w mniejszym stopniu modyfikowały stan natlenienia gleby, a istotne obniżenie wartości Eh ($P < 0,001$) zanotowano w warstwach środkowych profili gleb porośniętych wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6) – w ostatnim przypadku tylko przy podwójnej dawce wody. Obserwowane w kilku wypadkach wyższe wartości Eh w glebach zalewanych niż w kontrolnych nie były istotne, w glebie porośniętej trawami (nr 6) różnica ta dochodziła prawie do 100 mV (rys. 7, tab. 7). Intensywność przemian redoks była więc nieco inna w poszczególnych profilach doświadczalnych. Również oddziaływanie wody i ścieków nie wykazywało jednolitej tendencji. Podobnie jak w przypadku aktywności enzymatycznej, kierunek zmian miał indywidualny charakter.

Tabela 7. Zmiany wartości Eh (mV) w stosunku do kontroli (*efekt* Eh = Eh_{B,C,D,E} - Eh_A). Wartości istotnie różne od kontroli oznaczono pogrubioną czcionką ($P < 0,001$). Oznaczenia jak w tabeli 4

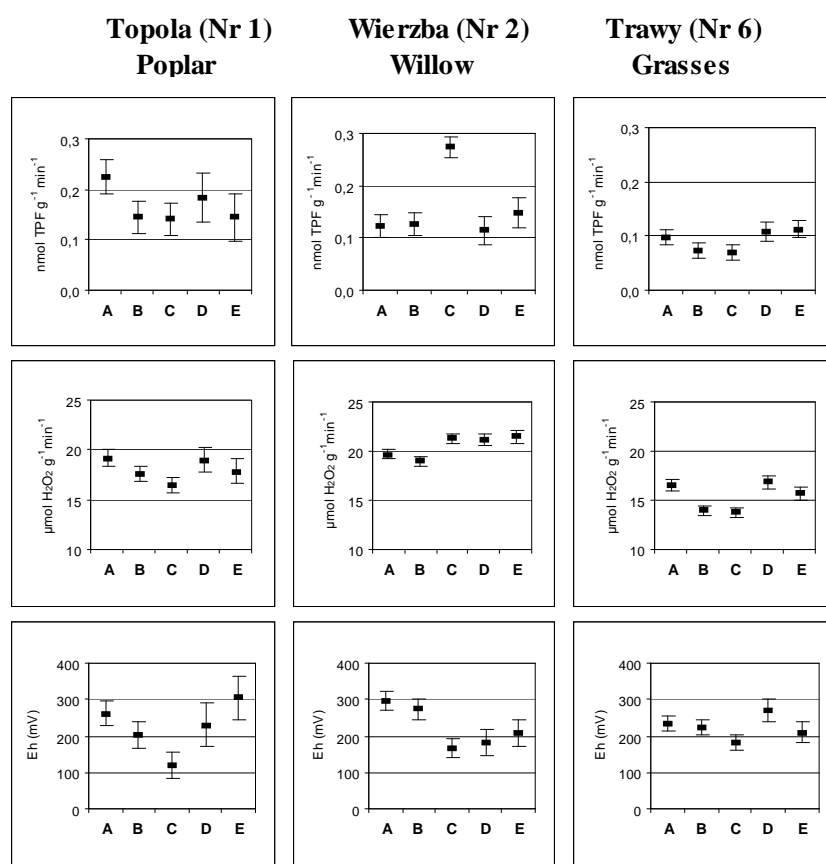
Table 7. The changes in Eh (*effect* Eh = Eh_{B,C,D,E} - Eh_A, mV); bold – for significant differences ($P < 0.001$). Explanations as in Table 4

Gleba, roślina Soil, plant	Głębokość Depth (cm)	<i>efekt</i> Eh – <i>effect</i> Eh (mV)			
		B	C	D	E
Nr 1	0-10	-175	-234	-120	+7
Topola	10-30	+35	-223	-3	+53
Poplar	30-50	+45	+55	+58	-25
	50-70	-232	-235	-134	-62
Nr 2	0-10	-7	-55	-45	-51
Wierzba	10-30	-18	-47	-177	-202
Willow	30-50	-41	-309	-230	-210
	50-70	-59	-165	-105	+41
Nr 6	0-10	-32	-163	+45	+10
Trawy	10-30	-42	-116	-104	-140
Grasses	30-50	-19	-18	+9	-140
	50-70	+52	+99	+96	+93

Na podkreślenie zasługuje niewielka zmiana potencjału redoks w górnych warstwach gleby z udziałem wierzby (nr 2), gdzie nawadnianie ściekami spowodowało tylko nieznaczne obniżenie Eh. Na głębokości 10 cm tej gleby średnie wartości Eh we wszystkich kombinacjach były wyższe od 320 mV, a obniżenie wartości Eh w stosunku do gleby kontrolnej (*efekt* Eh) mieścił się w wąskim zakresie od 7 do 55 mV. Natomiast poniżej 30 cm obniżenie potencjału redoks pod wpływem zalewów ściekami przekraczało 300 mV (i towarzyszyło silnemu podwyższeniu aktywności dehydrogenaz, patrz tab. 4). Dodatkowo wartości Eh (do 237 mV) na głębokości 100 cm w tych samych glebach zalewanych ściekami obserwowali też Stępniewska i in. [270].

4.1.4. Aktywność dehydrogenaz i katalazy dla całych profili (wartości średnie)

W oczyszczaniu przesiąkających ścieków uczestniczy cały profil glebowy. Traktując badane gleby jako określone układy biologiczne, porównano wartości średnie z całych zakresów głębokości (0-70 cm). Przyjęto, że otrzymane wielkości określały wypadkowe tendencje przemian zachodzących w całych profilach (rys. 8). Porównanie tych średnich nie zmieniło zasadniczo oceny dokonanej na podstawie wyników dotyczących poszczególnych warstw gleby.



Rys. 8. Aktywność dehydrogenaz, aktywność katalazy, Eh (odpowiednio górna, środkowa i dolna linia wykresów) w glebach z uprawą topoli, wierzby i mieszanki traw (średnie dla całych profili z 2-letniego doświadczenia polowego, wraz z 95% przedziałami ufności LSD). Objasnienia jak na rysunku 3

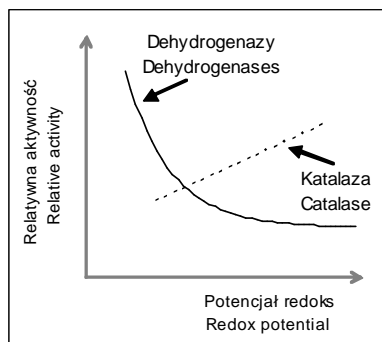
Fig. 8. Dehydrogenase and catalase activities, and redox potential characterizing organic soils underneath poplar, willow and grasses (averages for soil profiles under two-year field experiment with 95% LSD intervals). Explanation as in Fig. 3

W glebie torfowo-murszowej znajdującej się pod uprawą topoli (nr 1) oraz w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6), aktywność badanych enzymów była istotnie niższa w warunkach okresowego wprowadzania oczyszczonych ścieków niż w glebie kontrolnej (średnio dla podwójnej dawki: aktywność katalazy o 15%, aktywność dehydrogenaz o 33%, $P < 0,001$). Natomiast w glebie torfowo-murszowej z uprawą wierzby (nr 2), aktywność enzymów przy nawadnianiu podwójną dawką ścieków była istotnie wyższa (aktywność katalazy o 8%, dehydrogenaz ponad dwukrotnie, $P < 0,001$). Średnie wartości Eh obniżały się wraz z dawką ścieków.

Systematyczne zalewanie czystą wodą w mniejszym stopniu modyfikowały aktywność biologiczną. W porównaniu do gleb kontrolnych istotne statystycznie było tylko podwyższenie aktywności katalazy w profilu z udziałem wierzby. Należy też zauważyć, że średnia aktywność enzymów w wariantach zalewanych wodą była na ogół wyższa niż w profilach zalewanych ściekami (z wyjątkiem dehydrogenaz w glebie z wierzbą).

4.1.5. Zależność aktywności oksydoreduktaz od potencjału redoks gleby

Funkcje oznaczanych enzymów, należących do tej samej grupy oksydoreduktaz, szczególnie powiązanych z warunkami redoks środowiska, mają różne znaczenie dla metabolizmu komórki. Aktywność katalazy, której rola polega na ochronie komórki przed nadtleniem wodoru, uszkodzającym białka i większość struktur komórkowych, w dużej mierze regulowana jest dostępnością substratu (na zasadzie: mniej tlenu w środowisku \rightarrow mniejsza produkcja H_2O_2 \rightarrow niższa aktywność katalazy). Udział dehydrogenaz w metabolizmie jest bardziej złożony, ponieważ są one bezpośrednio związane z metabolizmem oddechowym, a więc energetycznym komórki. Występują one licznie i w różnych postaciach, wykazują różną specyfikę działania, niektóre są białkami allosterycznymi i elementami kompleksów lub nawet systemów enzymatycznych. Właściwości te sprawiają, że dehydrogenazy podlegają złożonym mechanizmom regulacji wewnątrzkomórkowej [36]. Często zmiany czynnych szlaków metabolicznych modyfikujących wewnątrzkomórkowe dehydrogenazy, wymuszone zostają warunkami fizycznymi i składem chemicznym środowiska, w którym bytują mikroorganizmy. Konsekwencją zalania gleby jest wypełnienie porów glebowych wodą, co prowadzi do ograniczenia wymiany gazowej oraz niedotlenienia gleby. W rezultacie następuje zmiana metabolizmu drobnoustrojów na oddychanie beztlenowe mniej wydajne niż respiracja w obecności tlenu. Podwyższenie aktywności dehydrogenaz ma na celu zabezpieczenie potrzeb energetycznych mikroorganizmów, a jednocześnie obniżenie aktywności katalazy jest efektem mniejszego na nią zapotrzebowania w warunkach hypoksji (rys. 9).



Rys. 9. Typowa zależność aktywności oksydoreduktaz od potencjału redoks, obserwowana w większości gleb mineralnych (Według: [44,51,75,104,106])

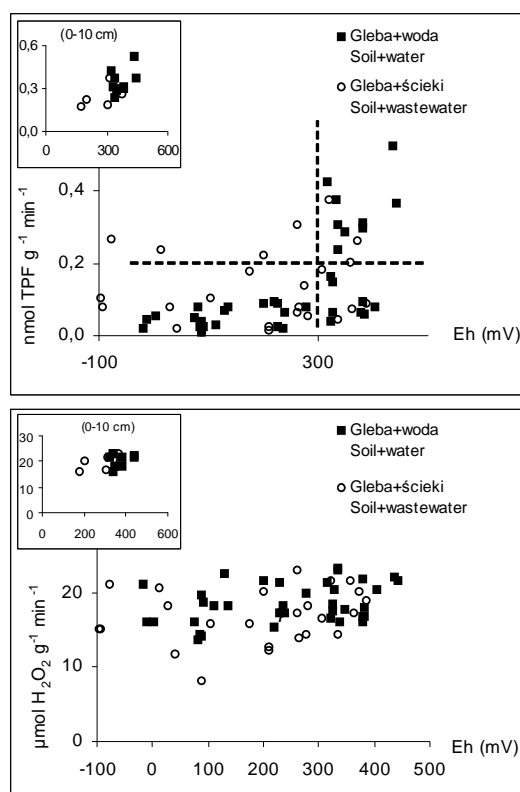
Fig. 9. Typical pattern of relationship between soil activity of soil oxidoreductases and redox potential observed in most of mineral soils tested (According to: [44,51,75,104,106])

Zmiany takie obserwowano w większości badanych gleb mineralnych, zarówno w doświadczeniach laboratoryjnych, jak również w glebach pobranych z siedlisk naturalnie zróżnicowanych pod względem stanu aeracji [41,44-49,104,105,266,275,299,301]. W dostępnej literaturze brak jest dokładnych informacji dotyczących relacji pomiędzy aktywnością omawianych oksydoreduktaz i procesami redoks gleb organicznych w warunkach nawadniania ściekami. Wyniki otrzymane z przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doświadczeń polowych wykazały, że w testowanych glebach organicznych przebieg zależności dehydrogenaz od Eh nie miał typowego charakteru (rys. 10, górny wykres). W glebach zalewanych ściekami (warianty B i C) nie obserwowano oczekiwanej tendencji w szerokim przedziale Eh od -100 do $+450$ mV. Natomiast w glebach, które nigdy nie miały kontaktu ze ściekami (tzn. w kombinacjach A, D i E) stwierdzono nawet obniżenie funkcji dehydrogenaz w warunkach hypoksji < 300 mV, wynikające raczej z faktu, że najniższy potencjał redoks notowano w głębszych warstwach gleby, charakteryzujących się stosunkowo niewysoką aktywnością DHA.

Do wyjaśnienia pozostało zatem zagadnienie, czy specyficzne właściwości badanych gleb rzeczywiście indukują inny przebieg procesów biochemicznych w warunkach niedotlenienia i czy występują dodatkowe interferencje w obecności ścieków. Jak wspomniano, w większości badanych gleb mineralnych czynność dehydrogenaz jest stymulowana niedotlenieniem gleby, przy czym nasilenie procesów redoks i wzrost aktywności dehydrogenaz są tym silniejsze, im zalane gleby są zasobniejsze w materię organiczną [42,44,216]. Szczególne cechy materii organicznej badanych gleb hydrogenicznych mogą zapewne implikować zmiany procesów biochemicznych i fizyko-chemicznych. Należy jednak zwrócić uwagę, że wysokie wartości DHA ($> 0,2$ nmol TPF \cdot g $^{-1}$ ·min $^{-1}$) odpowiadają próbkom

z wierzchnich warstw, które w większości wykazywały $Eh > 300$ mV (rys. 10, górny wykres). Natomiast niskie wartości aktywności dehydrogenaz ($< 0,15$ nmol TPF·g⁻¹·min⁻¹) odpowiadają próbkom z niższych warstw profili, w których enzymy były na ogół mniej aktywne, a potencjał redoks niższy.

Ocena wyników dotyczących tylko aktywnych biologicznie wierzchnich warstw w zróżnicowanym zakresie Eh, przemawia za brakiem istotnego powiązania aktywności dehydrogenaz z potencjałem oksydoredukcyjnym zarówno w glebach kontrolnych jak i w glebach systematycznie zalewanych ściekami. Dane otrzymane z przeprowadzonych doświadczeń polowych nie były wystarczające do wyjaśnienia tego zjawiska.

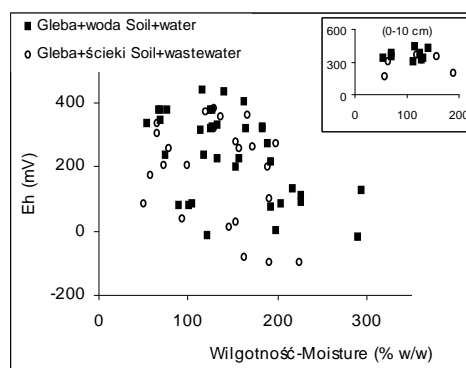


Rys. 10. Aktywność dehydrogenaz (górny wykres) i katalazy (dolny wykres) w funkcji potencjału redoks w doświadczeniu polowym (■–Gleba+woda – kombinacje A,D,E; ○–Gleba+ścieki – kombinacje B,C). Wartości średnie dla wszystkich warstw profili oraz zastosowanych kombinacji. Małe wykresy dotyczą tylko wierzchnich warstw

Fig. 10. Soil dehydrogenase and catalase activities (upper and lower graph, respectively) versus Eh under field (■–Soil+water – A,D,E plots; ○–Soil+wastewater – B,C plots). Two-year averages calculated for all treatments at each soil depth. Insertions – results for surface soil only

Aktywność katalazy, podobnie do aktywności dehydrogenaz, nie wykazywała określonej tendencji zmian w zakresie Eh od -100 do $+450$ mV, zarówno w glebach kontrolnych, jak też zalewanych ściekami (rys. 10, dolny wykres). Zjawisko zachowywania zdolności rozkładu H_2O_2 w warunkach hypoksji obserwować można też w niektórych glebach mineralnych [49,51]. Mikroorganizmy beztlenowe (względne i bezwzględne) posiadają często nie tylko pojedynczą katalazę produkowaną konstytutywnie, lecz również od 2 do 6 izozymów, których synteza jest ściśle zależna od fazy wzrostu populacji [20,307]. W przypadku katalazy istotne jest również to, że enzym uwolniony z komórki wykazuje w glebie znaczną stabilność ze względu na połączenia z koloidami mineralnymi i organicznymi [4,54,245]. Forma abiotyczna katalazy zachowuje swe funkcje katalityczne (rozkład egzogenego H_2O_2), lecz nie odzwierciedla aktualnych właściwości komórek – nie ulega represji czy indukcji i jest znacznie mniej podatna na te czynniki środowiskowe, które wywierają wpływ na stan fizjologiczny mikroorganizmów [206]. Źródłem aktywności katalazy, utrzymującej się na stosunkowo wysokim poziomie w warunkach niedotlenienia gleby, są przede wszystkim enzymy wytwarzane przez drobnoustroje fakultatywnie beztlenowe, dominujące w początkowym okresie niedotlenienia oraz enzymy abiotyczne, katalizujące reakcję rozkładu H_2O_2 niezależnie od rozwoju tlenowców.

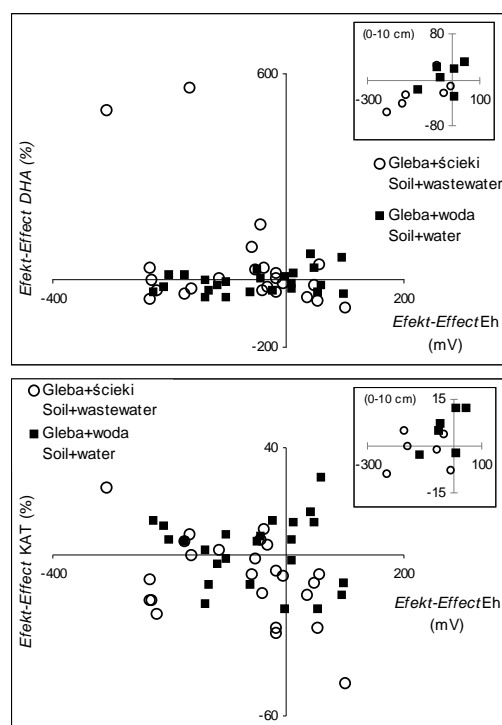
Niejednoznaczny wpływ nawodnień na materiał glebowy zaznaczył się również w obrazie potencjał redoks versus wilgotność gleby (rys. 11). Brak oczekiwanego obniżenia Eh wraz ze wzrostem wilgotności wykazywały zwłaszcza aktywne, wierzchnie warstwy gleb (mały wykres).



Rys. 11. Potencjał redoks (Eh) w funkcji wilgotności gleby (% w/w) w doświadczeniu polowym (■–Gleba+woda – kombinacje A,D,E; ○–Gleba+ścieki – kombinacje B,C). Wartości średnie dla wszystkich zastosowanych kombinacji. Mały wykres – tylko wierzchnie warstwy (0-10 cm)

Fig. 11. Soil redox potential (Eh) versus soil moisture under field conditions (■–Soil+water, A,D,E plots; ○–Soil+wastewater, B,C plots). Two-year averages calculated for all soil treatments and depths. Insertion – results only for surface soil (0-10 cm)

Nietypowe tendencje obserwowane w badanych glebach organicznych, np. wyższa wilgotność gleb kontrolnych niż gleb zalewanych ściekami, niewyraźna zależność Eh od wilgotności mają prawdopodobnie związek ze specyficznymi właściwościami wodno-fizycznymi i fizyko-chemicznymi gleb organicznych, m.in. silnie hydrofobowym charakterem materiału, szczególnym charakterem oddziaływań międzyfazowych, zróżnicowaniem charakterystyk porów i powierzchni właściwej, różnym uruchamianiem związków organicznych, utlenialnej frakcji węgla i anionów dla utworów o różnym stopniu zmurszenia, a także zależnością retencji wody i właściwości wodno-powietrznych od zawartości substancji organicznej [118,119,217,256,258, 267,292,293,296].



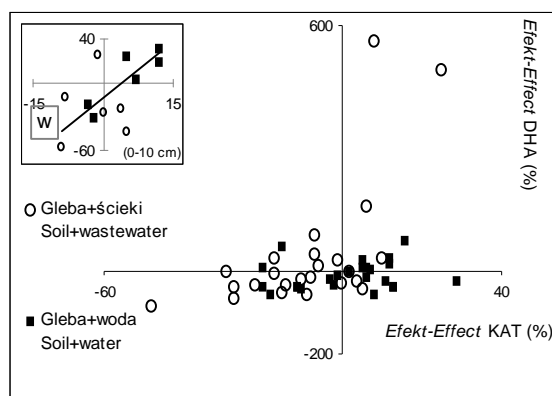
Rys. 12. Zmiany aktywności dehydrogenaz i katalazy w stosunku do gleb kontrolnych (odpowiednio, *Efekt DHA* i *Efekt KAT*) w funkcji zmiany Eh (*Efekt Eh*); ■–Gleba+woda – kombinacje A,D,E; ○–Gleba+ścieki – kombinacje B,C. Wartości średnie dla wszystkich kombinacji trzech gleb. Wykresy wstawione – tylko wierzchnie warstwy

Fig. 12. Effect of soil irrigation in dehydrogenase and catalase activities (*Effect DHA* and *Effect KAT*, respectively) versus the effect in Eh (*Effect Eh*); ■–Soil+tap water, A,D,E plots; ○–Soil+wastewater, B,C plots. Two-year averages calculated for all treatments at each soil depth under field experiment. Insertions – results for surface layer only

Zmiany aktywności enzymów wywołane zalewami (*efekt* DHA, *efekt* KAT) w funkcji zmian wartości potencjału redoks (*efekt* Eh) przedstawia rysunek 12 (wartości średnie z 2-letniego doświadczenia dla poszczególnych warstw profili B,C,D,E odniesione do kontroli A). Należy zauważyć, że wiele punktów doświadczalnych znajdowało się w zakresie dodatnich wartości *efektu* Eh, co odpowiadało trudnemu do wytłumaczenia podwyższeniu Eh gleb zalewanych w odniesieniu do gleb kontrolnych. Wysokie dodatnie wartości *efektu* DHA (prawie 600%) towarzyszące silnemu obniżeniu potencjału redoks (*efekt* Eh nawet -309 mV) wystąpiły jedynie w glebie z udziałem wierzby w mało aktywnych warstwach poniżej 30 cm (patrz rys. 5 i tabela 4). Zatem regulacja aktywności oksydoreduktaz nie była jednoznacznie determinowana zmianami potencjału redoks.

Zależność pomiędzy zmianami w aktywności katalazy i aktywności dehydrogenaz wywołanymi przez nawodnienia przedstawia rysunek 13. W przypadku zalewów ściekami dodatnią tendencję determinowały głównie dane dotyczące niższych warstw gleby z udziałem wierzby (nr 2). Dla zalewów czystą wodą stwierdzono istotną korelację tylko w obrębie wierzchnich warstw ($R^2 = 0,76$, $P < 0,01$).

Analiza skomplikowanych relacji pomiędzy rośliną a drobnoustrojami w glebie wykracza poza ramy niniejszej pracy. Wpływ rośliny na aktywność metaboliczną mikroorganizmów glebowych, najsilniejszy w ryzosferze, znany jest od dawna. Badania różnych autorów wskazują też na oddziaływania poza strefą bezpośredniego wpływu korzeni, zarówno w siedliskach naturalnych, jak również w glebie uprawianej [31,113,205,220,295].



Rys. 13. Relacje pomiędzy zmianą aktywności dehydrogenaz (*Efekt* DHA) i katalazy (*Efekt* KAT) wywołaną zalewaniem gleb w warunkach polowych. Objasnienia jak na rysunku 12

Fig. 13. Effect of soil irrigation observed in the dehydrogenase (*Effect* DHA) versus effect in the catalase activities (*Effect* KAT) Explanation as in Fig. 12

4.1.6. Podsumowanie wyników doświadczenia polowego

Otrzymane wyniki są trudne do interpretacji, lecz niejednakowe zmiany aktywności biologicznej gleby zalewanej ściekami obserwowali też inni autorzy. W przeprowadzonym doświadczeniu polowym notowano zarówno stymulację jak i hamowanie aktywności drobnoustrojów w efekcie systematycznego nawadniania gleb ściekami. Przyjęta we wstępie hipoteza, że wyniki otrzymane z badań przeprowadzonych w warunkach polowych nie są wystarczające do określenia mechanizmów zmian aktywności biologicznej gleby oraz jej relacji z czynnikami abiotycznymi znalazła potwierdzenie.

Zjawisko stymulacji aktywności biologicznej w glebie następuje w wyniku wprowadzenia substancji pokarmowych, mikroelementów, a także wody w przypadku jej deficytu. Oprócz zwiększenia szybkości reakcji enzymatycznych lub indukcji nowych enzymów, pozytywny wpływ dodanych ścieków na czynność enzymatyczną gleby może mieć przyczynę również w zwiększeniu liczebności mikroorganizmów oraz ujawnieniu czynności metabolicznej populacji dostarczonych ze ściekami.

Oczyszczone ścieki w zasadzie nie powinny zawierać znacznych ilości związków toksycznych, jednak inhibicja aktywności drobnoustrojów może być reakcją na kumulację np. metali ciężkich, substancji toksycznych, czy nawet antybiotyków [81,161] lub występować wskutek przekształceń takich substancji, które (w zasadzie) są obojętne, ale w określonych warunkach glebowych, np. w warunkach przedłużającej się anaerobiozy, mogą być przekształcane w związki szkodliwe. Zmiana aktywności metabolicznej gleby może też być efektem okresowych zmian w proporcjach pomiędzy poszczególnymi grupami drobnoustrojów, wynikających ze złożonych relacji pomiędzy mikroorganizmami, które naturalnie zasiedlają daną glebę oraz tymi dodanymi wraz ze ściekami. Obniżenie aktywności danego enzymu nie zawsze jest rezultatem oddziaływań niekorzystnych, ponieważ zmiana ilości i aktywności enzymu w komórce jest naturalnym sposobem regulacji metabolizmu a więc takiego dostosowania do aktualnej sytuacji, aby wszystkie funkcje życiowe przebiegały dla komórki najkorzystniej [36,246]. Istnieje jednak opinia, oparta na powiązaniu badań biochemicznych z oceną zanieczyszczenia gleby, że hamowanie czynności enzymatycznej gleby (szczególnie dotyczy to dehydrogenaz) ma z reguły przyczynę w naruszeniu równowagi układu.

Przeprowadzone doświadczenie wykazało istotny, lecz trudny do jednoznacznego zinterpretowania, wpływ systematycznego nawadniania oczyszczonymi ściekami miejskimi na status biochemiczny gleby. Reakcja drobnoustrojów zależała od zastosowanej dawki ścieków, typu gleby, warstwy w profilu, a także od uprawianej rośliny. W glebie torfowo-murszowej z uprawą wierzby występowało zjawisko stymulacji aktywności dehydrogenaz i katalazy (przy wyższej dawce

średnio w profilu o 125% i 8%). Zmiana była istotna ($P < 0,001$) poniżej 10 cm głębokości w przypadku dehydrogenaz (wzrost średnio o 400%) oraz w warstwie 30-50 cm w przypadku katalazy (wzrost o 25%). W dwóch pozostałych układach, w glebie torfowo-murszowej porośniętej topolą i glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami, obserwowano obniżenie aktywności dehydrogenaz (przy wyższej dawce średnio w profilu o 32%) i katalazy (o 14%). Obniżenie aktywności dehydrogenaz było istotne przy obydwu dawkach ścieków w wierzchniej warstwie (średnio dla obu gleb o 37%, $P < 0,001$) oraz mniej silne w przypadku katalazy, istotne w glebie porośniętej trawami (nr 6) w warstwach poniżej 10 cm (średnio o 30%, $P < 0,001$), a w glebie obsadzonej topolą (nr 1) tylko w warstwie 10-30 cm (o 22%, $P < 0,001$).

Zahamowanie funkcji enzymatycznej należy przypisać działaniu ścieków, gdyż dostarczanie analogicznych ilości czystej wody powodowało z reguły mniejsze, nieistotne zmiany aktywności enzymów.

Zmiany potencjału redoks miały zróżnicowany charakter: od istotnego obniżenia wartości Eh (maksymalnie o 309 mV) do nieistotnego statystycznie podwyższenia o 99 mV. Na podkreślenie zasługuje fakt, że nie zaobserwowano typowej relacji pomiędzy potencjałem redoks i aktywnością oksydoreduktaz (patrz rys. 9).

Z uwagi na niejednoznaczność wyników badań polowych i trudności interpretacyjne, w następnym etapie badań wyeliminowano te czynniki, które wydawały się powodować największe fluktuacje otrzymanych wyników, a więc wpływ rośliny i wahania temperatury.

4.2. Doświadczenie modelowe na monolitach glebowych

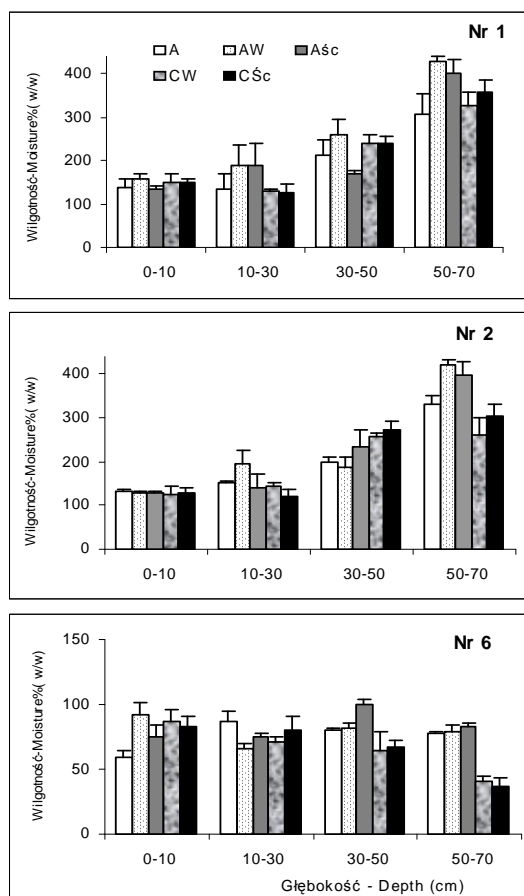
4.2.1. Charakterystyki wodne i biologiczne gleb

W warunkach laboratoryjnych, w stałej temperaturze i bez przypadkowych oddziaływań czynników zewnętrznych, oznaczane właściwości wodne i charakterystyki biologiczne gleb wykazywały znacznie mniejsze zróżnicowanie niż w warunkach polowych. Wartości średnie wilgotności materiału glebowego wyznaczone dla wszystkich zastosowanych kombinacji w doświadczeniu z monolitami ilustruje rysunek 14.

Przykład zmian czynności dehydrogenaz i katalazy w czasie inkubacji monolitów w temperaturze 20°C przedstawiony został na przykładzie profili pobranych z pola porośniętego wierzbą (nr 2) po trzech latach od zaprzestania systematycznych zalewów (rys. 15).

Profile kontrolne charakteryzowały się wyższym poziomem aktywności dehydrogenaz wierzchnich warstw niż w warunkach polowych (średnio dla trzech gleb o 56%), natomiast aktywność głębszych warstw była średnio o 38% niższa

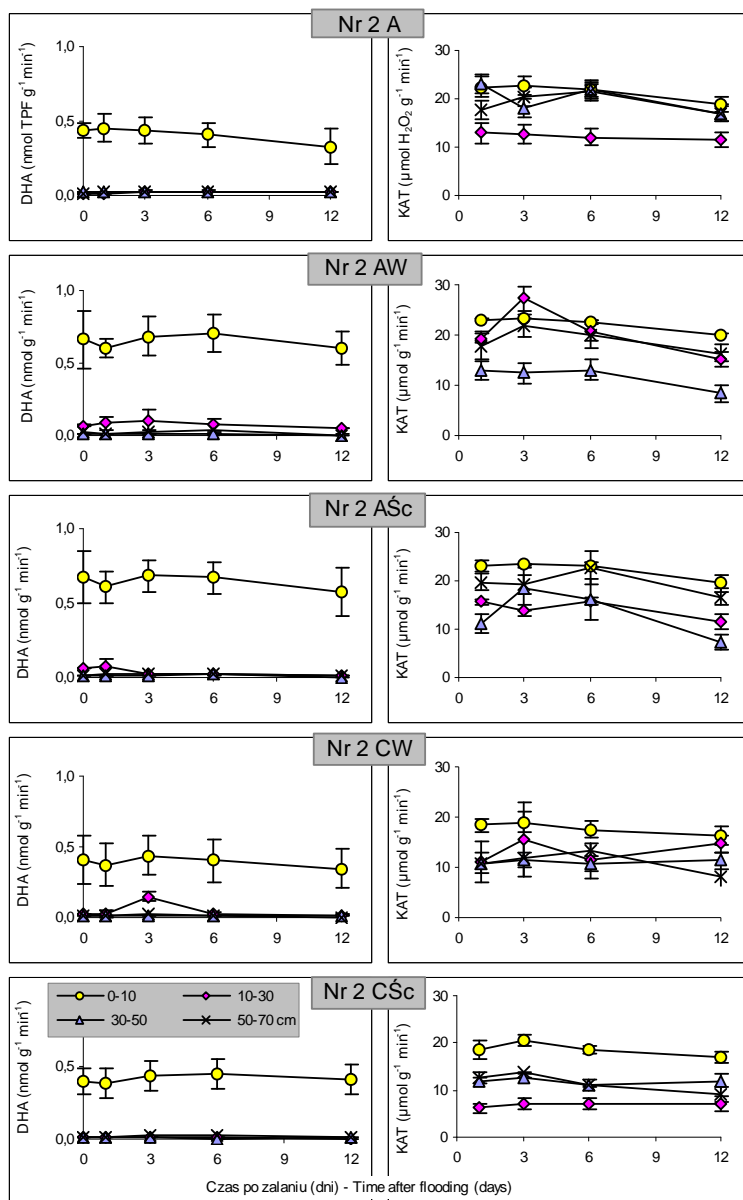
(w glebach torfowo-murszowych) oraz o 85% wyższa (w glebie mineralno-murszowej) niż w profilach naturalnych (rys. 16, rys. 5 i 6).



Rys. 14. Wilgotność gleby w monolitach (inkubacja 12 dni, 20°C); Wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym; A – gleba kontrolna o wilgotności aktualnej; AW, AŚc i CW, CŚc – odpowiednio, monolity A i C zalane czystą wodą lub ściekami (120 mm)

Fig. 14. Gravimetric water content in soil monoliths incubated at 20°C (averages from 12-day experiment with standard deviations). A – control soil (actual moisture); AW, AŚc and CW, CŚc – monoliths A or C flooded with 120 mm of tap water or wastewater, respectively

Aktywność katalazy w wierzchnich warstwach gleb kontrolnych utrzymywała się na tym samym poziomie w obydwu doświadczeniach, lecz w głębszych warstwach w warunkach modelowych była o ok. 16% niższa, niż w warunkach naturalnych. W wierzchniej warstwie, gdzie szybciej zachodzi mineralizacja materii organicznej, a aktywność biologiczna jest prawdopodobnie silniejsza, niż w niższych



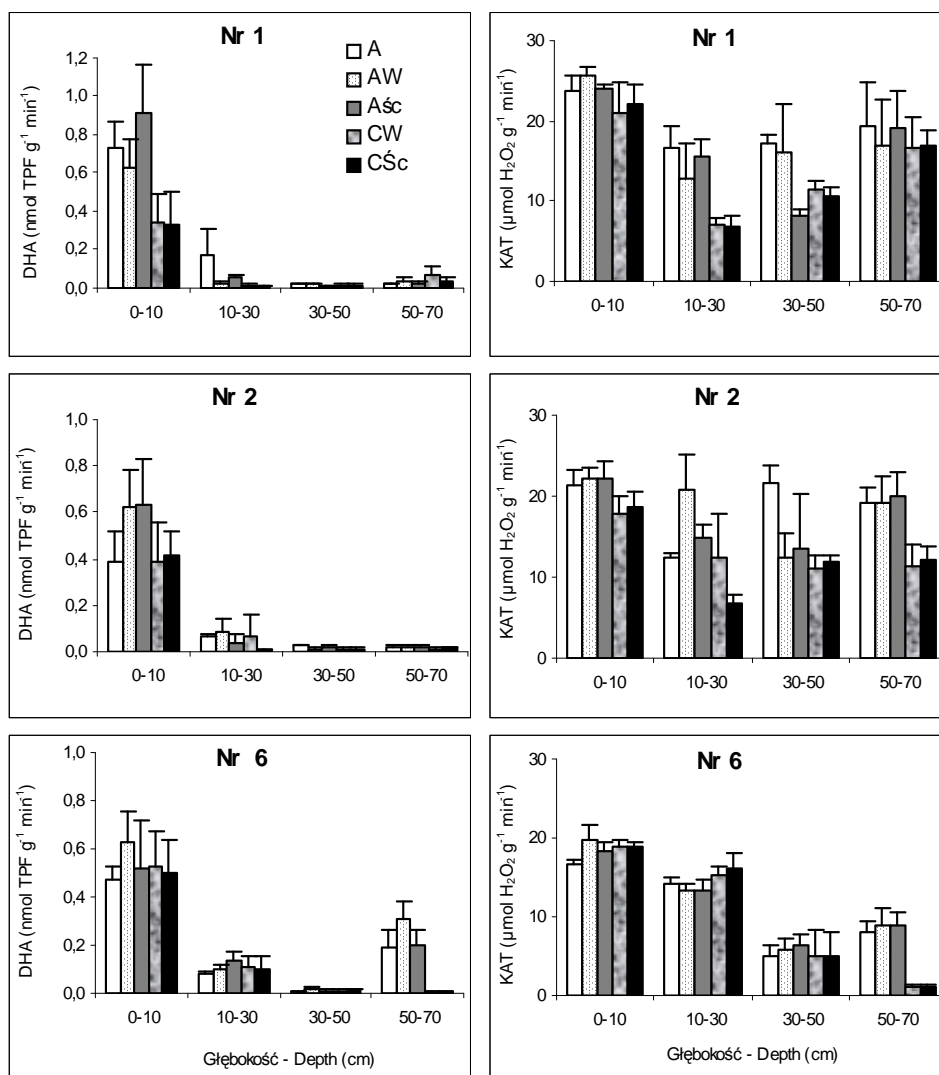
Rys. 15. Aktywność dehydrogenaz (DHA) i katalazy (KAT) w monolitach gleby porośniętej wierzbą (nr 2) – średnie z 6 powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym. Objaśnienia jak na rysunku 14

Fig. 15. Soil dehydrogenase (DHA) and catalase (KAT) activities in monoliths of soil planted with willow (No.2) – averages from 6 replications with standard deviations. Explanations as in Fig. 14

partiach monolitów, brak dodatkowego zaopatrzenia w substancje odżywcze z zewnętrznych źródeł nie spowodował drastycznego obniżenia czynności drobnoustrojów (silniejsze właściwości buforujące). Dostarczenie związków biogennych do gleby kontrolnej (warianty AŚc) wywołało podwyższenie aktywności w materiale wierzchnich warstw, lecz nie w głębszych warstwach.

Po trzyletniej przerwie w nawodnieniach, aktywność dehydrogenaz gleb poddawanych poprzednio zalewom ściekami (C) była w wierzchnich warstwach o ponad 50% wyższa, niż w doświadczeniu polowym (rys. 16). Natomiast w warstwach głębszych aktywność enzymatyczna była znacznie niższa: w glebach torfowo-murszowych porośniętych topolą (nr 1) i wierzbą (nr 2) aktywność dehydrogenaz średnio o 88%, aktywność katalazy o 38% w stosunku do wartości obserwowanych w warunkach naturalnych. W przypadku profilu pobranego z pola z udziałem wierzby (nr 2) sytuacja była więc zupełnie odmienna niż w doświadczeniu polowym. Ponieważ obniżenie to dotyczyło też wariantu CW – gleby pobranej z pola zalewanego ściekami oraz zalanej w laboratorium czystą wodą – więc osłabienia metabolizmu drobnoustrojów nie można przypisać bezpośrednio substancjom zawartym w ściekach, lecz zmianom, jakie zaszły w samym materiale glebowym w okresie następującym po zaprzestaniu zabiegów. Prawdopodobną przyczyną tej sytuacji mogła być utrwalona zmiana zespołu drobnoustrojów, wywołana systematycznymi zalewami ściekami w układzie gleba – wierzba. Wydaje się prawdopodobne, że powtarzające się dostarczanie ścieków na pole mogło prowadzić do dominacji drobnoustrojów eutroficznych. Wierzba jest rośliną wodolubną, chętnie wykorzystywaną w oczyszczalniach hydrofitowych, symulujących warunki hydrauliczne i siedliskowe naturalnych ekosystemów bagiennych – mokradeł, ze względu na przystosowanie do bytowania w tych ekosystemach i szybki przyrost biomasy, związany z intensywnym poborem wody i związków biogennych [14,30,79,214,226,282]. Rodzaj *Salix* charakteryzuje nieco szersza tolerancja w zakresie klimatu i gleby oraz większa plastyczność w pierwszych fazach wzrostu wobec czynników abiotycznych i zoogenicznych, niż rodzaj *Populus* [80].

Systematyczne dostarczanie substancji pokarmowych stymulowało wzrost wierzby, a w wierzchniej warstwie silną rozbudowę systemu korzeniowego [280]. Dobrze rozwijające się rośliny modyfikowały przestrzeń fizyczną gleby, przeciwdziałały nadmiernemu gromadzeniu wody, sprzyjały więc rozwojowi mezofauny i zaopatrywały mikroorganizmy w znaczne ilości substancji odżywczych. Wierzba została posadzona dosyć gęsto, w rozstawach 45x10 cm i 45x20 cm, topola natomiast w rozstawie 4x2 m, czyli zasięg oddziaływania korzeni na polu obsadzonym słabo rosnącymi drzewkami topoli (nr 1) był przypuszczalnie znacznie mniejszy. Wilgotność gleby zalewanej ściekami była w warunkach polowych niższa pod uprawą wierzby niż na przylegającym polu z topolą. Zatem w czasie nawodnień intensywnie metabolizujące drobnoustroje wspomagane fizycznym i chemicznym oddziaływaniem korzeni wierzby, swoją aktywność wyrażały podwyższeniem czynności enzymatycznej w całym



Rys. 16. Aktywność dehydrogenaz (DHA) i katalazy (KAT) w poszczególnych wariantach monolitów glebowych. Wartości średnie wyznaczone z 12-dniowej inkubacji dla poszczególnych kombinacji wraz z odchyleniami standardowymi. Objaśnienia jak na rysunku 14

Fig. 16. Soil dehydrogenase (DHA) and catalase (KAT) activities in incubated soil monoliths (averages from 12-day experiment with standard deviations). Explanation as in Fig. 14

profilu gleby. Zaprzestanie nawodnień obiektu mogło ograniczyć dostawę substancji pokarmowych, a pre-inkubacja profili w laboratorium, bez dostawy substratu z zewnątrz, dodatkowo przyczyniła się do wyczerpania zasobu łatwiej dostępnych

substancji odżywczych. W efekcie, po upływie trzech lat od zaprzestania zalewów nastąpiło zahamowanie rozwoju dominujących mikroorganizmów.

Jednokrotny zalew w laboratorium nie był wystarczający do przywrócenia intensywnego metabolizmu mikroflory głębszych partii profilu. Aktywność enzymatyczna była obniżona w obydwu wariantach gleby pobranej z pola porośniętego wierzbą poprzednio zalewanego ściekami (monolity zalane wodą nr 2CW i ściekami 2CŚc). Czynnikiem ograniczającym aktywność biologiczną mógł być niedostatek substratu pokarmowego dla drobnoustrojów heterotroficznych, wynikający z zaprzestania zalewów i izolowania profili ze środowiska poprzednio eutroficznego. Zalewy ściekami prowadzone w warunkach polowych niosły substancje odżywcze, a obecność prawidłowo rosnącej rośliny w układzie pozwalała na odprowadzaniu ich nadmiaru oraz wystarczające przewietrzenie gleby.

Tabela 8. Wpływ nawodnień gleby ściekami (CŚc) i czystą wodą (AW) na aktywność dehydrogenaz (*efekt* DHA) w warunkach naturalnych ('pole') i w monolitach inkubowanych w laboratorium ('monolithy'). Zmiany istotne ($P < 0,001$) zaznaczono pogrubioną czcionką. Oznaczenia jak w tabeli 4
Table 8. Effect of soil irrigation with wastewater (CŚc) and tap water (AW) on soil dehydrogenase activity (*effect* DHA) under field ('field') and laboratory ('monoliths') experiments; bold – for significant differences ($P < 0.001$). Explanations as in Table 4

Gleba, roślina Soil, plant	Głębokość Depth (cm)	Wpływ nawodnień na aktywność dehydrogenaz Effect of flooding on soil dehydrogenases (%)					
		CŚc			AW		
		'pole'	'field'	'monolithy'- 'monoliths'	'pole'	'field'	'monolithy'- 'monoliths'
Nr 1	0-10	-57		-55		-30	-15
Topola	10-30	-31		-93		-36	-89
Poplar	30-50	+43		-20		-35	-2
	50-70	+32		+53		-38	+51
Nr 2	0-10	+27		+9		+27	+62
Wierzba	10-30	+160		-53		+12	+22
Willow	30-50	+494		-51		-23	-51
	50-70	+562		-23		+74	-4
Nr 6	0-10	-26		+7		+20	+33
Trawy	10-30	+1		+27		-1	+23
Grasses	30-50	-38		+74		-55	+122
	50-70	-84		-89		+64	+64

Należy też zauważyć, że aktywność dehydrogenaz była stymulowana w kombinacjach AŚc – monolitach pobranych z poletek kontrolnych A, które nie były zalewane poprzednio ściekami (rys. 16). Można przypuszczać, że w omawianym doświadczeniu również w przypadku monolitów CŚc, nie ścieki, lecz inne czynniki ograniczały metabolizm mikroflory glebowej. Przeprowadzone doświadczenie pośrednio wskazuje na rolę rośliny w kreowaniu reakcji drobnoustrojów glebowych na zabiegi zalewania gleb

ściekami. W warunkach polowych, aktywność enzymów gleby pod uprawą wierzby prawdopodobnie nie była bezpośrednio stymulowana obecnością ścieków, lecz specyficznym charakterem wytworzonego układu gleba – wierzba.

Zahamowanie aktywności dehydrogenaz było silne w wyższych warstwach monolitu pobranego z pola obsadzonego topolą zalewanego ściekami (nr 1C), podobnie jak w doświadczeniu polowym. W dwóch pozostałych glebach obniżenie aktywności dotyczyło tylko głębszych warstw. W materiale wierzchnich warstw, pobranym z pól z udziałem wierzby (nr 2) i traw (nr 6) zalewanych ściekami, notowano nawet nieistotne podwyższenie wartości DHA (ok. 8%).

Tabele 8 i 9 przedstawiają porównanie efektów działania zalewów ściekami i czystą wodą w warunkach polowych i laboratoryjnych odniesionych do gleb kontrolnych (*efekt DHA, efekt KAT*). Z wyjątkiem niższych warstw profilu pobranego z pola porośniętego wierzwą (nr 2), stwierdzono względnie dużą zgodność zmian w obydwu doświadczeniach. Wartości średnie dla danej kombinacji istotnie różne od gleby kontrolnej oznaczone zostały pogrubioną czcionką ($P < 0,001$).

Tabela 9. Wpływ nawodnień gleby ściekami (CŚc) i czystą wodą (AW) na aktywność katalazy (*efekt KAT*) w warunkach naturalnych ('pole') i w monolitach ('monolithy'). Zmiany istotne ($P < 0,001$) zaznaczono pogrubioną czcionką. Oznaczenia jak w tabeli 4

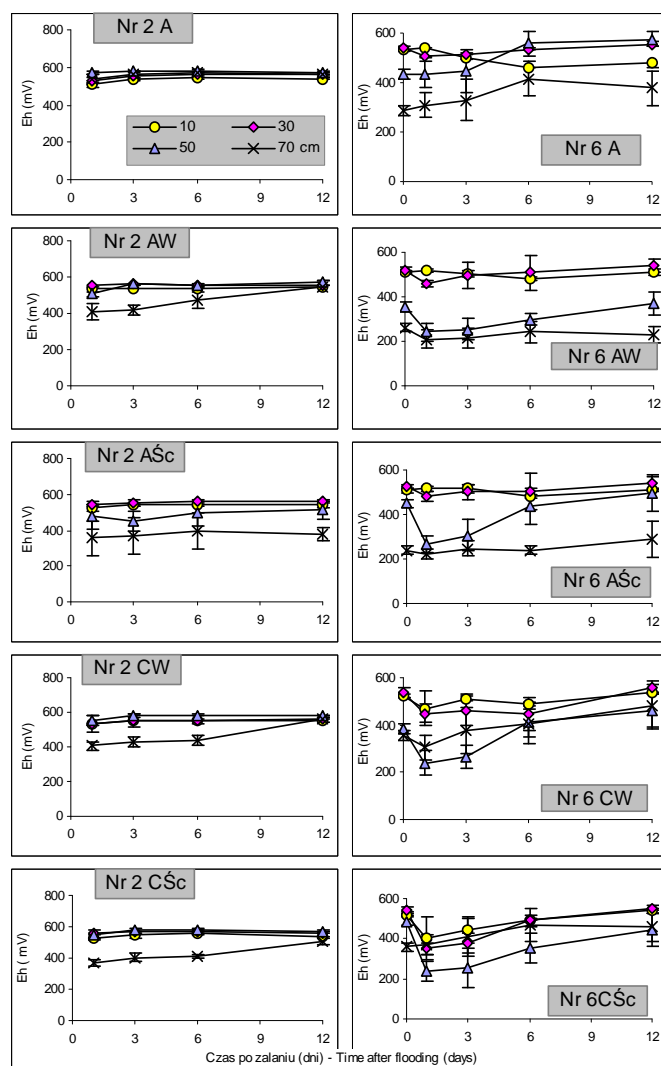
Table 9. Effect of soil irrigation with wastewater (CŚc) and tap water (AW) on soil catalase activity (*effect CAT*) under field ('field') and laboratory ('monoliths') experiments; bold – for significant differences ($P < 0.001$). Explanations as in Table 4

Gleba, roślina Soil, plant	Głębokość Depth (cm)	Wpływ nawodnień na aktywność katalazy Effect of flooding on soil catalase (%)			
		CŚc		AW	
		'pole' 'field'	'monolithy'- 'monoliths'	'pole' 'field'	'monolithy'- 'monoliths'
Nr 1	0-10	-9	-6	-2	+8
Topola	10-30	-22	-60	-20	-24
Poplar	30-50	-7	-37	+13	-5
	50-70	-17	-14	-11	-12
Nr 2	0-10	-1	-10	+5	+3
Wierzba	10-30	+6	-47	+6	+67
Willow	30-50	+25	-45	+11	-43
	50-70	+8	-37	+16	-1
Nr 6	0-10	0	+12	+12	+8
Trawy	10-30	+2	+14	+2	-6
Grasses	30-50	-27	0	-18	+14
	50-70	-48	-87	-15	+12

Oprócz modyfikacji procesów biochemicznych, obserwowano też zmianę właściwości wodnych – obniżenie wilgotności gleby C w niższych partiach profilu, w stosunku do wariantów AW i AŚc, a nawet w porównaniu do gleby kontrolnej A (rys. 14). Podobną tendencję zmiany właściwości wodnych obserwował Magesan [182].

4.2.2. Potencjał redoks gleb

Potencjał redoks mierzony w trakcie inkubacji przedstawiono na przykładach monolitów pobranych z pola porośniętego wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6), wykazujących odpowiednio najmniejsze i największe jego wahania (rys. 17).

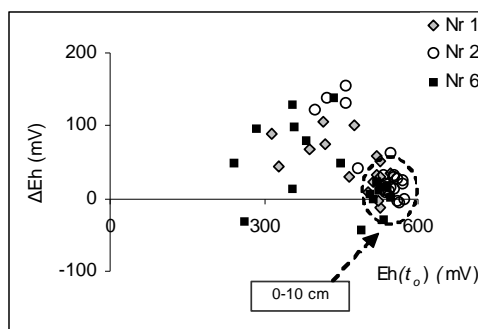


Rys. 17. Zmiany Eh w czasie inkubacji monolitów gleby porośniętej wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6), wartości średnie z 6 powtórzeń, wraz z odchyleniem standardowym. Objaśnienia – rysunek 14

Fig. 17. Changes in Eh during incubation monoliths of soil planted with willow (No. 2) and grasses (No. 6), averages from 6 replications with standard deviations. Explanation as in Fig. 14

W glebie torfowo-murszowej pobranej z pola z udziałem wierzby (nr 2, rys. 17), a także z udziałem topoli (gleba nr 1, dane nie zostały przedstawione na rysunku) potencjał redoks nie obniżył się poniżej 300 mV, umownej granicy warunków utlenionych i zredukowanych [106]. Natomiast w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6) procesy redoks zachodziły nieco intensywniej. Wartości Eh, obniżone po zalaniu do 200 mV, powróciły w tej glebie do poziomu > 300 mV po trzecim dniu inkubacji, tzn. po usunięciu roztworu z naczyń u podstawy kolumn. Charakterystyczne jest, że w materiale wierzchnich warstw potencjał redoks na ogół był wyższy od 500 mV nawet w monolitach zalanych wodą lub ściekami, a $E_h < 500$ mV obserwowano jedynie w kombinacji CŚC mineralno-murszowej gleby łąkowej.

Na rysunku 18 przedstawiono zmianę wartości Eh względem wartości wyjściowych ($\Delta E_h = E_h(t_{12}) - E_h(t_0)$). W przeprowadzonym doświadczeniu woda i ścieki stosunkowo szybko przesiąkały przez monolity glebowe. Czas zalewu prawdopodobnie nie był wystarczająco długi do wytworzenia hypoksji. Większość punktów znajduje się w zakresie dodatnich wartości ΔE_h . Zmiany potencjału redoks, zwłaszcza w materiale wierzchnich warstw, były minimalne.



Rys. 18. Zmiany Eh (ΔE_h) po 12 dniach inkubacji w funkcji wartości początkowych $E_h(t_0)$ – średnie dla poszczególnych wariantów doświadczalnych badanych gleb. Linia przerywaną otoczono wartości dla wierzchnich warstw (0-10 cm)

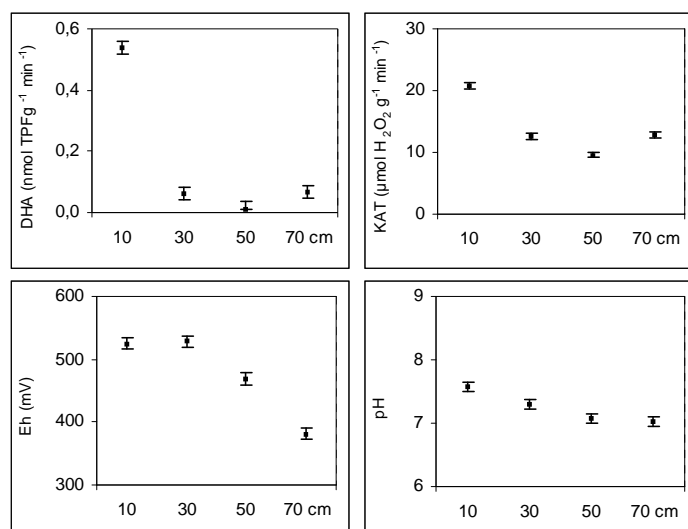
Fig. 18. Changes in Eh (ΔE_h) after 12-day incubation of soil columns in laboratory versus initial values $E_h(t_0)$. Averages calculated for experimental variants of tested soils. Results for surface soil (0-10 cm) encircled

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki wydaje się, że badane gleby organiczne, szczególnie torfowo-murszowe, charakteryzują się specyficznymi właściwościami redoks, a szczególnie wyjątkowo dużą odpornością na redukcję. Zatem oddziaływanie ścieków na aktywność oksydoreduktaz w pełnej anaerobiozie, możliwej przy intensywnym nawadnianiu w warunkach polowych, zostało nadal problemem nierozstrzygniętym.

4.2.3. Analiza statystyczna wyników

Dysponując wynikami otrzymanymi z doświadczenia przeprowadzonego w warunkach bardziej kontrolowanych w porównaniu do warunków polowych (stała temperatura, eliminacja roślin i mezofauny), wykorzystano wieloczynnikową analizę wariancji w celu określenia, czy bezpośredni wpływ ścieków w pojedynczym zalewie istotnie wpływa na badane właściwości gleby oraz jak silne jest bezpośrednie oddziaływanie ścieków na tle efektów wywieranych przez inne czynniki. Najsilniejszy wpływ na aktywność enzymatyczną wywierała warstwa gleby oraz system nawodnień (A – gleba, która nie miała przedtem kontaktu ze ściekami, C – gleba nawadniana periodycznie przez 4 lata oczyszczonymi ściekami). Natomiast bezpośrednio oddziaływanie ścieków w czasie 12-dniowej inkubacji, okazało się nieistotne w porównaniu do oddziaływania wody destylowanej. Podobnie, istotny wpływ na parametry fizykochemiczne Eh i pH miał typ i warstwa w profilu ($P < 0,001$), natomiast różnice pomiędzy wartościami w obecności wody lub ścieków były nieistotne.

Dehydrogenazy były średnio 9-krotnie aktywniejsze w materiale wierzchnich warstw, niż w materiale podpowierzchniowym i aż 25-krotnie aktywniejsze, niż w warstwach głębszych. Aktywność katalazy była w warstwie 0-10 cm około dwukrotnie wyższa, niż w materiale położonym głębiej (rys. 19).



Rys. 19. Aktywność dehydrogenaz (DHA) i katalazy (KAT) oraz Eh i pH na różnych głębokościach monolitu glebowego. Wartości średnie z 12-dniowej inkubacji trzech gleb organicznych wraz z 95% przedziałami ufności, test LSD

Fig. 19. Soil dehydrogenase (DHA) and catalase (KAT) activities, Eh and pH at different depths of soil monoliths. Averages for 12-day incubation experiment of three organic soils with 95% LSD intervals

Analizując wpływ ścieków nie można pominąć całokształtu warunków glebowych wytworzonych wskutek przeprowadzonych zabiegów. Procesy fizyczne, zwłaszcza status wodno-powietrzny, istotnie determinują warunki siedliskowe drobnoustrojów [62,71,144,160,222,309,310]. Dodatkowo, gleby organiczne są trudnym materiałem badawczym. Dotyczy to również gleb pobagiennych, w których materia organiczna podlega ciągłym przemianom. Kierunek i intensywność tych przemian są uwarunkowane szeregiem czynników, wśród których wyróżnia się szatę roślinną, aktywność mikroorganizmów, fizyczne i chemiczne właściwości utworu oraz zmienne warunki wodno-powietrzne i termiczne [281].

Inne rezultaty nawodnień obserwowane w glebie z udziałem topoli (nr 1), niż w glebie z udziałem wierzby (nr 2) – obie gleby torfowo-murszowe, poletka sąsiadujące ze sobą – należy zapewne przypisać wpływowi rośliny i gęstości pokrycia. Znaczenie ewapotranspiracji w procesie oczyszczania ścieków na filtryze glebowym podkreśla Stottmeister i in. [276]. Przy wyższym uwilgotnieniu gleby obsadzonej topolą oraz zalewanej ściekami (nr 1C), w trakcie zalewów następowało prawdopodobnie osłabienie tempa mineralizacji materii organicznej i ograniczenie liczebności drobnoustrojów w całym profilu w porównaniu do kontrolnej gleby obsadzonej topolą (nr 1A), a także w porównaniu do gleby zalewanej ściekami w obecności wierzby (nr 2C). O niekorzystnych warunkach fizycznych gleby z udziałem topoli zalewanej ściekami świadczy też masowe wypadanie drzewek [86]. Ponieważ zastosowano podobny system drenażu na wszystkich poletkach zalewanych ściekami, można przypuszczać, że topola nie jest odpowiednią rośliną w przypadku obiektów usytuowanych na glebach torfowo-murszowych.

4.2.4. Podsumowanie wyników badań na monolitach glebowych

Doświadczenie laboratoryjne, przeprowadzone w kontrolowanej temperaturze, bez udziału roślin, na monolitach glebowych o nienaruszonej strukturze, pobranych po trzyletniej przerwie w nawodnieniach, dostarczyło kilku cennych informacji. Eliminacja rośliny z układu istotnie zmieniła reakcję drobnoustrojów w niższych warstwach gleby z uprawą wierzby (gleba nr 2). O ile w wierzchniej warstwie wariantu zalewanego ściekami aktywność dehydrogenaz pozostała lekko podwyższona w stosunku do gleby kontrolnej (o 9%), to w warstwach głębszych obserwowano silne obniżenie aktywności oksydoreduktaz (ok. 50%, $P < 0,001$). Reakcja enzymów była więc zbliżona do tej, jaką notowano w glebie z udziałem topoli (nr 1) w obydwu doświadczeniach. Zatem stymulacja żywotności drobnoustrojów pod wpływem ścieków obserwowana w warunkach polowych w głębszych warstwach gleby z udziałem wierzby była nietrwała i wynikała najprawdopodobniej z aktywnego udziału korzeni dobrze rozwijających się roślin.

Zaprzestanie nawodnień ściekami gleby mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6) spowodowało zmiany korzystne dla drobnoustrojów, zwłaszcza w górnych warstwach profilu. Powyżej 50 cm stwierdzono stymulację dehydrogenaz i katalazy (w odniesieniu do gleb kontrolnych odpowiednio około 35% i 10%).

Położenie warstwy w profilu (głębokość), system nawodnień zastosowany poprzednio w warunkach polowych (A lub C) oraz właściwości gleby wywierały silniejszy wpływ na aktywność oksydoreduktaz, potencjał redoks i pH, niż aktualne warunki inkubacji wynikające z zalania wodą lub ściekami. W materiale wierzchnich warstw dehydrogenazy były średnio 9- i 25-krotnie aktywniejsze, niż w materiale podpowierzchniowym i w warstwach głębszych. Aktywność katalazy w wierzchnich warstwach była średnio 2-krotnie wyższa, niż w warstwach głębszych ($P < 0,001$).

Bezpośredni wpływ netto ścieków (różnica pomiędzy aktualnym działaniem ścieków i czystej wody) w pojedynczym zalewie nie był istotny dla kształtowania aktywności oksydoreduktaz, potencjału redoks i odczynu badanych gleb.

Badane gleby, zwłaszcza torfowo-murszowe (nr 1 i nr 2), charakteryzowały się znaczną odpornością na redukcję. Czas zalania nie był wystarczający do wytworzenia warunków niedotlenienia zwłaszcza w wierzchnich warstwach, gdzie wartości Eh pozostawały wyższe od +400 mV.

Ponieważ wierzchnia warstwa, najbardziej aktywna i odgrywająca ważną rolę w utrzymaniu żyzności gleby jest w największym stopniu narażona na działanie ścieków poprzez swoje położenie w profilu, wskazane jest dokładne prześledzenie zmian w warunkach anaerobiozy. W następnej części pracy podjęto zatem próbę rozszerzenia zakresu badań o inne funkcje biologiczne drobnoustrojów glebowych, istotne dla utrzymania ich funkcji oddechowych w układzie modelowym, na materiale pobranym z wierzchniej warstwy gleby.

4.3. Doświadczenie modelowe na próbkach z wierzchnich warstw gleb

Z uwagi na wieloznaczny i trudny w interpretacji charakter wyników badań polowych i monolitowych oraz w celu bardziej dokładnego poznania związków przyczynowo-skutkowych w glebie nawadnianej ściekami, podjęto badania modelowe z rozszerzonym zakresem oznaczanych wskaźników aktywności biologicznej dla tych samych gleb, dla których prowadzono poprzednie doświadczenia. Inkubacja próbek glebowych wiąże się z utratą naturalnej struktury gleby i bezpośredniego kontaktu z ekosystemem, lecz z uwagi na większą jednorodność materiału glebowego i możliwość ścisłej kontroli warunków eksperymentalnych, daje możliwość zdecydowanie bardziej dokładnej oceny działania określonych czynników w glebie. Dysponowanie większą ilością materiału glebowego w identycznych warunkach inkubacji znacznie zmniejsza efekty zmienności przestrzennej gleby i pozwala na podjęcie próby oceny związków pomiędzy wieloma wskaźnikami biologicznymi.

Dla skróconego i wygodniejszego opisu prezentowanych wyników, w rozdziale 4.3. stosowano dalej określenie: gleba porośnięta topolą (nr 1), gleba porośnięta wierzbą (nr 2) i gleba porośnięta trawami (nr 6), choć badania dotyczyły już tylko materiału glebowego z wierzchniej warstwy (0-10 cm) gleby porośniętej, odpowiednio, topolą, wierzbą i trawami. Materiał pobrano po upływie trzech lat od zaprzestania czteroletnich nawodnień ściekami.

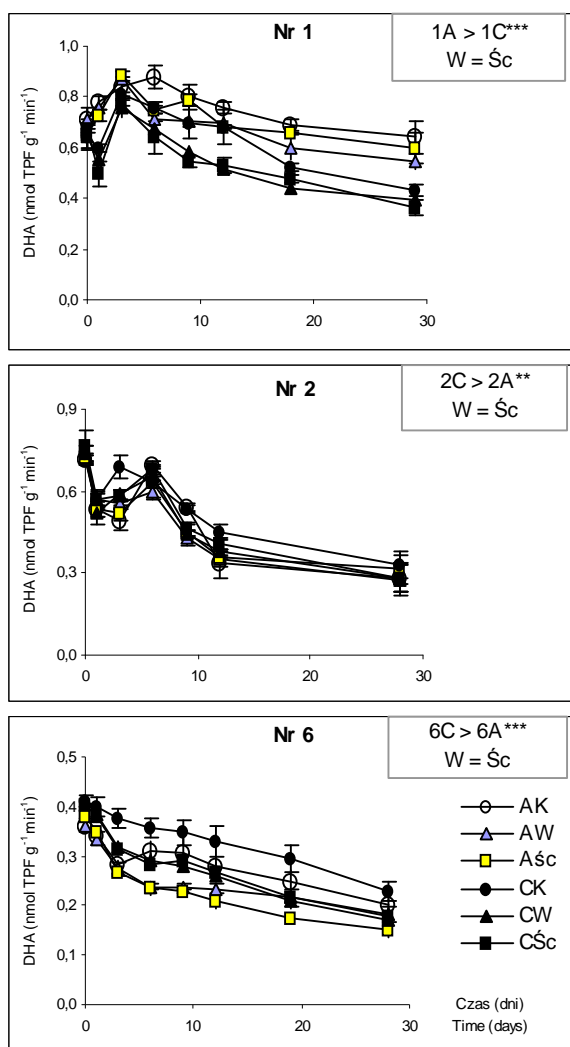
4.3.1. Aktywność dehydrogenaz

4.3.1.1. Aktywność dehydrogenaz w glebie inkubowanej bez dodatku glukozy

Materiał przygotowany do doświadczenia modelowego charakteryzował się wilgotnością ok. 60% pełnej pojemności wodnej, nie został więc przesuszony i zachował wysoki poziom aktywności oksydoreduktaz, zbliżony do zakresu obserwowanego w środowisku naturalnym. Aktywność dehydrogenaz wykazywała ogólną tendencję do obniżania się w czasie inkubacji (rys. 20). W próbkach porośniętej topolą gleby kontrolnej (nr 1A) stwierdzono początkowo ok. 25% wzrost aktywności dehydrogenaz. W próbkach porośniętej topolą gleby zalewanej ściekami (nr 1C), podwyższenie wartości DHA (średnio o 19%) poprzedzone było niewielkim jej spadkiem. Generalnie, w glebie porośniętej topolą, obniżenie aktywności dehydrogenaz było wyraźnie mniejsze w glebie kontrolnej (1A), średnio o 14%, a większe w glebie zalewanej ściekami (1C), średnio o 40%.

Również w dwóch pozostałych glebach aktywność dehydrogenaz wykazywała tendencję spadkową we wszystkich wariantach. W glebie porośniętej wierzbą (nr 2) utrata aktywności przy końcu inkubacji sięgała aż 60% wartości wyjściowych, a różnice pomiędzy wariantami były mniejsze, niż w pozostałych glebach. Zmiany aktywności dehydrogenaz w próbkach gleby porośniętej wierzbą (nr 2) pośrednio wskazują na rolę wierzby w selekcji drobnoustrojów o wysokich wymaganiach pokarmowych, szczególnie w glebie nawadnianej ściekami (substancje odżywcze w ściekach plus rozbudowany system korzeniowy). W doświadczeniu polowym aktywność dehydrogenaz wierzchniej warstwy gleby porośniętej wierzbą była o 27% wyższa w kombinacji zalewanej ściekami (nr 2C), niż w glebie kontrolnej (2A), (patrz tab. 4), natomiast w doświadczeniu na próbkach glebowych – tylko o 7%.

W glebie porośniętej trawami (nr 6) spadek aktywności był nieco mniejszy przy niższej wilgotności próbek (o 45% w stosunku do wartości początkowej) niż w wariantach zalanych (średnio o 56%). Obniżanie aktywności dehydrogenaz w czasie inkubacji próbek glebowych obserwowane było również przez innych autorów [50,60,187,301].



Rys. 20. Dynamika aktywności dehydrogenaz (DHA) w inkubowanych próbkach gleb. AK i CK – wilgotność kontrolna (ok. 60% WHC) gleb A i C; AW i CW – próbki zalane wodą destylowaną (1:1 w/w); AŚc i CŚc próbki zalane ściekami (1:1 w/w). Wartości średnie z trzech niezależnych powtórzeń wraz z odchyleniem standardowym (W ramkach wyniki wieloczynnikowej analizy wariancji: = oznacza brak istotnych różnic; * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$)

Fig. 20. Changes in dehydrogenase activity (DHA) during soil samples incubation. AK and CK – samples at 60% WHC; AW and CW – flooded with distilled water; AŚc and CŚc – flooded with wastewater (triplicate-means with standard deviation, in the boxes multifactor analysis of variance: = no significant difference; * – $P < 0.05$; ** – $P < 0.01$; *** – $P < 0.001$)

Aktywność dehydrogenaz gleby porośniętej topolą (nr 1) była istotnie wyższa w próbkach gleby, która nie miała wcześniej kontaktu ze ściekami ($1A > 1C$, $P < 0,001$). Odwrotna sytuacja wystąpiła w glebie porośniętej wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6) – dehydrogenazy były bardziej aktywne w próbkach gleb nawadnianych ściekami C ($P < 0,001$).

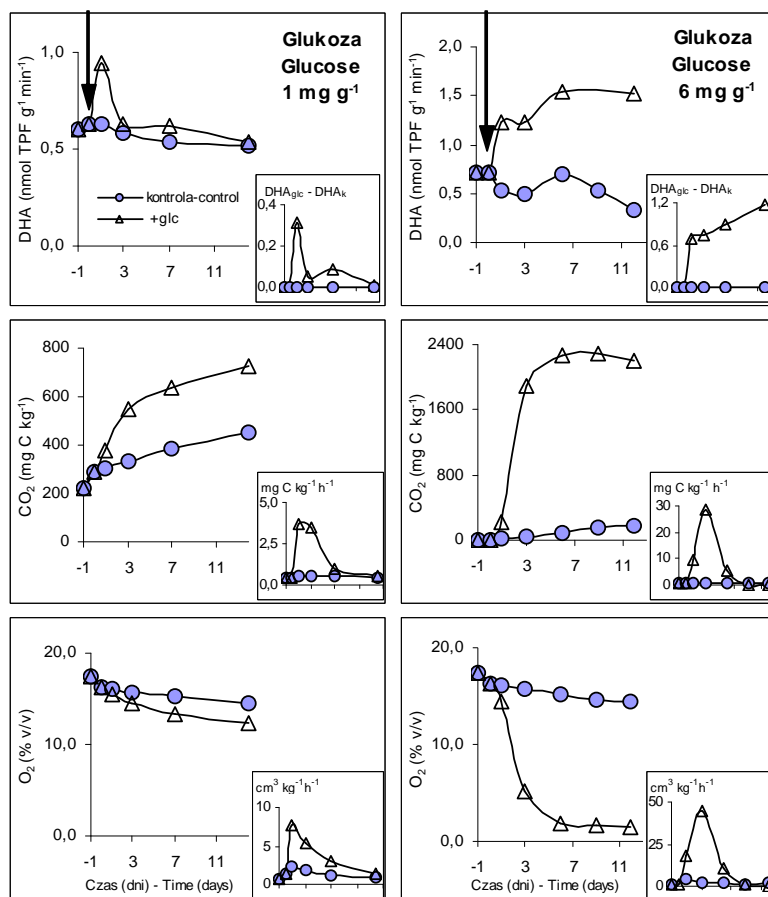
We wszystkich glebach bezpośrednia obecność ścieków nie wywołała istotnych różnic w aktywności dehydrogenaz w porównaniu do tych, jakie spowodowała woda destylowana ($W = Śc$). Natomiast zalanie próbek zarówno wodą, jak też ściekami, prowadziło do istotnego obniżenia aktywności dehydrogenaz ($K > W$, $K > Śc$, $P < 0,001$).

4.3.1.2. Aktywność dehydrogenaz w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy

W celu określenia wpływu ścieków na potencjalną aktywność biologiczną gleby w warunkach nielimitowanego dostępu drobnoustrojów do łatwo przyswajalnego źródła węgla i energii, zastosowano kombinacje z dodatkiem cukru prostego, glukozy. W badaniach wstępnych przetestowano wpływ glukozy na aktywność dehydrogenaz i oddechową w zakresie stężenia glukozy od 1 do 10 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby. Wybrane wyniki tego testu – dynamikę aktywności dehydrogenaz i respiracji w glebie porośniętej wierzbą bez zalewów ściekami (nr 2A) przy dodatku glukozy 1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ i 6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby przedstawia rysunek 21.

Niższa dawka powodowała szybki, lecz krótkotrwały wzrost aktywności dehydrogenaz pierwszego dnia inkubacji (o 50% wartości DHA). Wykorzystaniu łatwo przyswajalnego cukru towarzyszyło intensywne wydzielanie CO_2 i pobór O_2 , odpowiednio 6- i 3-krotnie wyższe niż w próbkach bez wzbogacenia. W ciągu 14 dni drobnoustroje pobrały ponad 2 razy więcej tlenu oraz wydzieliły prawie 3 razy więcej CO_2 niż w glebie bez dodatku cukru.

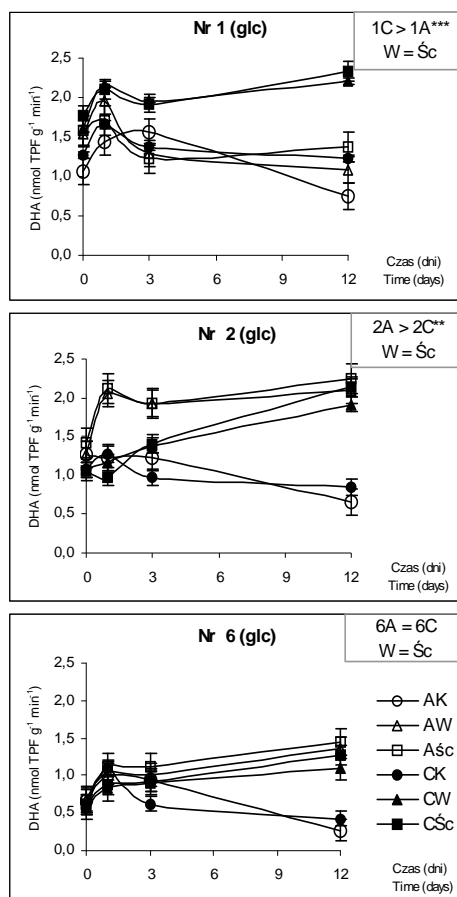
Glukoza w stężeniu 6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ zwiększyła znacznie intensywność katabolizmu (rys. 21). Maksymalną aktywność respiracyjną zanotowano trzeciego dnia inkubacji – ponad 60-krotnie wyższe wydzielanie CO_2 i 30-krotnie wyższy pobór O_2 niż w próbkach gleby bez uzupełnienia substratu. Przy tej dawce glukozy, już pierwszego dnia inkubacji aktywność respiracyjna była 3-krotnie wyższa niż maksymalna przy niższym dodatku. Aktywność dehydrogenaz dwukrotnie wzrosła bezpośrednio po dodaniu glukozy i utrzymywała się na wysokim poziomie aż do końca inkubacji. Podwyższona aktywność dehydrogenaz po wyczerpaniu tlenu przemawia za dużym udziałem dehydrogenaz w metabolizmie beztlenowym [44,224]. Wzbogacenie glukożą w ilości 6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ zostało zastosowane do dalszych badań określających wpływ ścieków na potencjalną aktywność biologiczną gleb.



Rys. 21. Aktywności dehydrogenaz (górne wykresy), wydzielanie CO₂ (środkowe) i pobór O₂ (dolne) w próbkach gleby porośniętej wierzbą (nr 2) inkubowanej z dodatkiem glukozy 1 mg·g⁻¹ i 6 mg·g⁻¹, odpowiednio lewa i prawa strona. Strzałki – dodanie glukozy. Małe wykresy: (DHA_{glc} – DHA_k), szybkość wydzielania CO₂ i poboru O₂

Fig. 21. Dehydrogenase activity, CO₂ evolution, O₂ uptake (upper, middle and lower graphs, respectively) in soil planted with willow (No. 2) incubated with low (1 mg·g⁻¹, left) or high (6 mg·g⁻¹, right) glucose amendment. Arrows – glucose addition. Insertions: (DHA_{glc} – DHA_k), CO₂ evolution and O₂ uptake rate

Zmiany aktywności dehydrogenaz w trakcie inkubacji z dodatkiem glukozy próbek reprezentujących zastosowane warianty doświadczalne przedstawia rysunek 22. W przypadku każdej gleby obecność dodanych ścieków nie modyfikowała aktywności dehydrogenaz w sposób istotnie różny od działania wody (W = Śc). Natomiast wartości DHA w próbkach zalanych wodą lub ściekami były tu, inaczej niż w próbkach bez wprowadzonej glukozy, istotnie wyższe od wartości notowanych przy wilgotności kontrolnej ($P < 0,01$).



Rys. 22. Dynamika aktywności dehydrogenaz (DHA) w próbkach badanych gleb (inkubacja w obecności glukozy, 6 mg·g⁻¹). Objasnienia jak na rysunku 20

Fig. 22. Dynamics of dehydrogenase activity (DHA) in soil samples (incubation with glucose, 6 mg g⁻¹). Explanation as in Fig. 20

W glebie wzbogaconej dodatkowym substratem obserwowano istotną różnicę pomiędzy glebami różnie nawadnianymi (A lub C). Obecność glukozy stymulowała w większym stopniu dehydrogenazy w próbkach tej gleby, która wykazywała niższą aktywność podczas inkubacji bez glukozy (w obecności glukozy 1C > 1A, 2A > 2C). Informacja ta jest pierwszym sygnałem prowadzącym do wniosku, że obniżenie czynności biochemicznych drobnoustrojów w glebie porośniętej topolą i zalewanej ściekami (nr 1C) obserwowane w poprzednich doświadczeniach nie było skutkiem toksyczności ścieków.

Po 12 dniach inkubacji z glukozą, aktywność dehydrogenaz próbek o wilgotności kontrolnej obniżyła się do poziomu bliższego próbkom bez wzbogacenia, natomiast w wariantach zalanych pozostawała znacznie podwyższona (tab. 10).

Tabela 10. Wpływ glukozy ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ gleby) na aktywność dehydrogenaz (DHA_{glc}) po 12 dniach inkubacji. Efekt wyznaczono według wzoru $[(\text{DHA}_{\text{glc}} - \text{DHA})/\text{DHA}] \cdot 100$ i wyrażono jako procentowe podwyższenie (plus) lub obniżenie (minus) wartości w stosunku do próbek inkubowanych bez glukozy (DHA)

Table 10. Effect of glucose ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) on soil dehydrogenase activity (DHA_{glc}) after 12-day incubation. The effect was calculated according to equation $[(\text{DHA}_{\text{glc}} - \text{DHA})/\text{DHA}] \cdot 100$ and expressed as percent of stimulation (plus) or inhibition (minus) of the activity in soil samples incubated without glucose (DHA)

Wariant gleby Soil treatment	DHA_{glc} (%)		
	Nr 1	Nr 2	Nr 6
	Topola – Poplar	Wierzba – Willow	Trawy – Grasses
AK	0	+97	-3
AW	+56	+492	+488
AŚc	+103	+531	+590
CK	+79	+88	+29
CW	+325	+407	+325
CŚc	+341	+426	+370

Rozpatrzenie zmian aktywności dehydrogenaz w odniesieniu do wartości początkowej (dla t_0), pozwala bliżej określić zdolność poszczególnych wariantów doświadczalnych do utrzymania wysokiego poziomu aktywności w trakcie inkubacji. W początkowej fazie glukoza indukowała dehydrogenazy niemal we wszystkich próbkach. Trzeciego dnia stwierdzono przejściowe hamowanie aktywności (prawdopodobnie związane z uruchomieniem innych szlaków metabolicznych), a następnie – w próbkach zalanych – stabilizację lub nawet silne podwyższenie w porównaniu do aktywności wyjściowej. Aktywność próbek o wilgotności kontrolnej była po 12 dniach niższa nawet o połowę od początkowych. Prawdopodobną przyczyną mogła być regresja aktywności wywołana szybszym wyczerpaniem tlenu (co jest omawiane w dalszej części pracy) oraz niewystarczającą, przy tym uwilgotnieniu, dostępnością innych akceptorów elektronów, na przykład rozpuszczalnych form azotu. Aktywność próbek zalanych wodą lub ściekami pozostawała znacznie podwyższona w odniesieniu do kontroli – próbek bez wzbogacenia oraz w odniesieniu do wartości początkowej. Zatem aktywacja dehydrogenaz, obserwowana przez wielu autorów w glebach zalanych, w przypadku badanych gleb organicznych nastąpiła dopiero po przełamaniu pewnej bariery, w tym wypadku po dostarczeniu mikroorganizmom nadmiaru łatwego do wykorzystania substratu węglowego. Związek powyższych procesów z przemianami redoks omawiany będzie w dalszych częściach pracy.

Zakładając, że wysoki poziom aktywności dehydrogenaz w glebie jest wyrazem intensywnie zachodzących procesów dostarczających komórkom glebowym energii,

na podstawie przeprowadzonego doświadczenia z dodatkiem glukozy można stwierdzić poza jednym przypadkiem, że metabolizm drobnoustrojów nie był hamowany w obecności ścieków. Wyjątkiem tym była gleba 1AŚc, w której po początkowym przyroście aktywności obserwowano spadek DHA poniżej wartości wyjściowej. Podobny przebieg w wariantcie 1AW (zawiesina wodna) wskazuje jednak, że przyczyną obniżenia aktywności były właściwości gleby, a nie substancje obecne w ściekach. Wysoki poziom aktywności w tych wariantach (ok. $2 \text{ nmol TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, rys. 22) i jednocześnie dość szybki powrót do poziomu DHA gleby bez wzbogacenia (tab. 10) sugerują raczej regulację uaktywnionych szlaków metabolicznych spowodowaną wyczerpaniem substratu, a nie efekt toksyczności ścieków.

Jak wcześniej wspomniano, aktywność glebowych dehydrogenaz związana głównie z procesami katabolicznymi heterotroficznych komórek prokariotycznych i grzybów, reaguje na ogół silnie na zmiany stanu natlenienia gleby [37,61,107,265,266,275]. Natlenienie nie jest jednak jedynym czynnikiem modyfikującym aktywność tych oksydoreduktaz w tak bio-różnorodnym środowisku gleby. Wszystkie grupy drobnoustrojów bytujących w glebie doświadczają stosunkowo częstych zmian dostępności źródła węgla i energii oraz końcowych akceptorów elektronów. Ważną strategią mikroorganizmów jest więc odpowiednia adaptacja szlaków metabolicznych w odpowiedzi na zmiany zachodzące w otoczeniu [36,200]. Przykładem możliwości takiej adaptacji jest metabolizm *Paracoccus denitrificans*, bakterii obecnej m.in. w glebie i ściekach, która może żyć chemolitoautotroficznie (z wodorem, formaldehydem lub mrówczanem jako jedynym źródłem energii) lub heterotroficznie (korzystając z wielu związków organicznych – cukrów, aminokwasów, alkoholi). *P. denitrificans* preferuje tlenowy typ oddychania heterotroficznego, dostarczającego maksimum energii. W warunkach beztlenowych rolę terminalnych akceptorów elektronów pełnią dla tych bakterii tlenki azotu (V,III,II,I). Enzymy związane z tym typem respiracji uruchamiane są w sytuacji braku tlenu. Możliwość represji pewnych enzymów dostarcza drobnoustrojom fakultatywnym maksymalne korzyści energetyczne oraz zabezpiecza je przed akumulacją toksycznych NO i NO_2^- . Z kolei możliwość utleniania związków jednowęglowych narzuca konieczność konstytutywnej produkcji innych enzymów (np. dehydrogenazy formaldehydowej) [288].

4.3.2. Aktywność oddechowa

Oddychanie gleby (respiracja) jest miarą mineralizacji węgla organicznego, jak też metodą oceny dynamiki rozkładu związków organicznych i ich dostępności dla drobnoustrojów [78,198]. Wyższa respiracja wskazuje na wyższą aktywność mikrobiologiczną. Powtarzające się cykle zalewania i osuszania gleby mogą przyczyniać się do zwiększania aktywności respiracyjnej, a tym samym tempa rozkładu substancji organicznej gleby [106]. Torfy mniej rozłożone wykazują większe tempo minera-

lizacji (mniejsze wyczerpanie substancji łatwo ulegających rozkładowi) niż torfy o znacznym stopniu rozkładu [154]. Odwodnienie gleb organicznych przyspiesza procesy mikrobiologiczne [63,217], chociaż obserwowano też odwrotną tendencję w nieużytkach torfowych [218].

Wydzielanie CO₂ jest bezpośrednim efektem aktywności drobnoustrojów heterotroficznych. Ponieważ utlenianie materii organicznej gleby jest kluczowym procesem cyklu krążenia węgla w ekosystemie, aktywność oddechową wykorzystano jako wskaźnik aktywności biologicznej gleby przy określaniu reakcji drobnoustrojów na nawodnienia gleby ściekami.

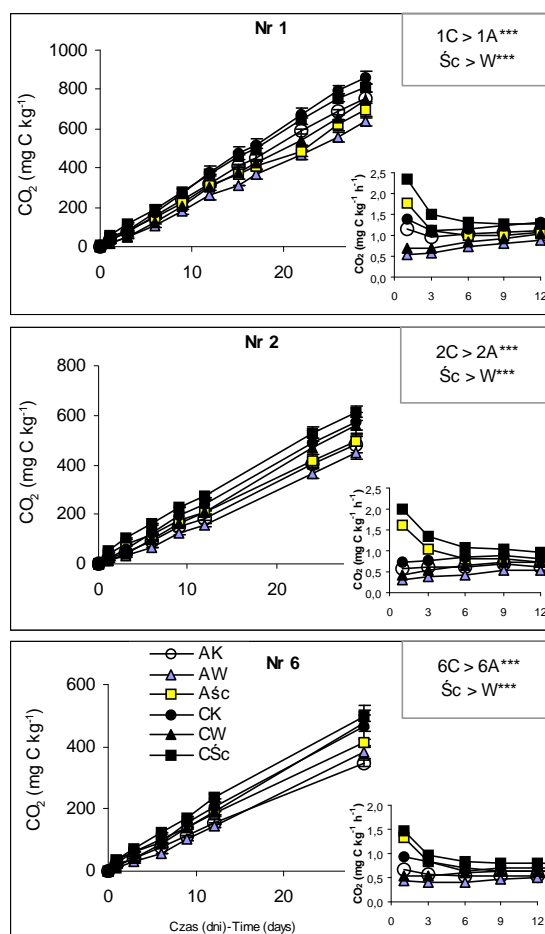
4.3.2.1. Aktywność oddechowa w glebie inkubowanej bez dodatku glukozy

4.3.2.1.1. Wydzielanie CO₂

Dane przedstawione na rysunku 23 wskazują, że aktywność oddechowa mierzona ilością wydzielonego CO₂ była istotnie wyższa w glebach systematycznie zalewanych ściekami (C) niż nawadnianych jedynie opadami atmosferycznymi (A), a także wyższa w obecności ścieków niż czystej wody ($P < 0,001$).

Tabela 11. Wydzielanie CO₂ w czasie inkubacji gleb w 20°C (równowagowa ilość CO₂ nad glebą)
Table 11. CO₂ evolution during soils incubation at 20°C (CO₂ equilibrium content in soil headspace)

Wariant Variant	Kumulacja CO ₂ we wskazanych dniach inkubacji Cumulative CO ₂ emission after days as indicated (mg C-CO ₂ kg ⁻¹)			
	0-3	4-6	0-12	0-29
1AK	72,4	82,4	320,1	757,9
1AW	45,3	62,2	260,4	640,7
1AŚc	82,8	66,0	312,3	694,5
1CK	81,1	87,0	380,0	862,3
1CW	52,7	73,1	300,2	743,7
1CŚc	111,4	80,6	370,4	810,2
2AK	46,1	47,6	184,8	482,3
2AW	31,6	34,6	157,7	455,1
2AŚc	77,6	42,3	209,8	495,8
2CK	58,6	65,3	240,7	575,0
2CW	41,0	54,9	209,2	559,2
2CŚc	101,1	59,1	275,7	610,1
6AK	42,8	35,2	156,7	347,4
6AW	29,9	29,2	147,2	384,2
6AŚc	61,4	39,8	186,0	412,1
6CK	61,4	33,5	205,7	468,0
6CW	41,1	49,0	189,4	475,7
6CŚc	72,2	49,5	235,4	499,0

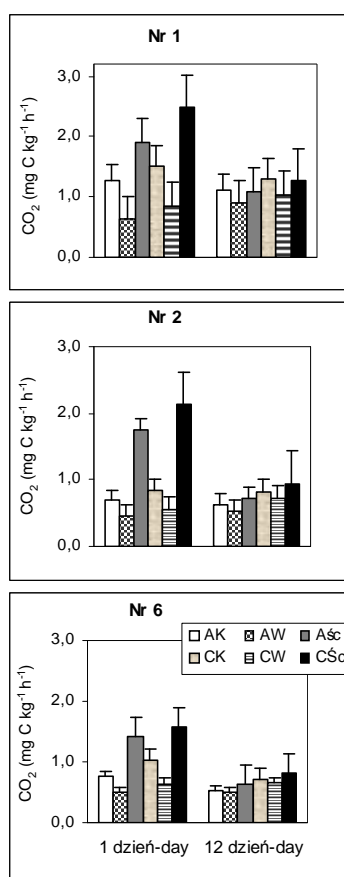


Rys. 23. Emisja CO₂ w próbkach badanych gleb – krzywe kumulatorywne (inkubacja bez glukozy). Małe wykresy – szybkość respiracji. Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 23. Cumulative CO₂ emission in soil samples (incubation without glucose). Inserts – respiration rate. Explanation as in Fig. 20

Mercik i in. [198] wyróżniają oddychanie początkowe (dwutlenek węgla wydzielony w ciągu pierwszych 3 dni w temperaturze 28°C), podstawowe (w ciągu 4-7 dni w 28°C) oraz długotrwałe (mierzone w czasie 0-35 dni w temperaturze 25°C). Zestawienie ilości CO₂ w analogicznych okresach inkubacji (wszystkie pomiary w 20°C) dla próbek gleb objętych doświadczeniem przedstawia tabela 11. Podobnie jak w doświadczeniu Mercika i in. [198], na początku doświadczenia zaobserwowano większe różnice pomiędzy poszczególnymi wariantami. W fazie respiracji początkowej próbki wydzielily najwięcej CO₂ w obecności ścieków

(w glebach A i C). Ta tendencja została utrzymana do końca doświadczenia w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6). W glebie torfowo-murszowej porośniętej topolą (nr 1) oraz wierzbą (nr 2), ilość nagromadzonego CO₂ pomiędzy czwartym i szóstym dniem była największa w wariantach o wilgotności kontrolnej (ok. 60% WHC).



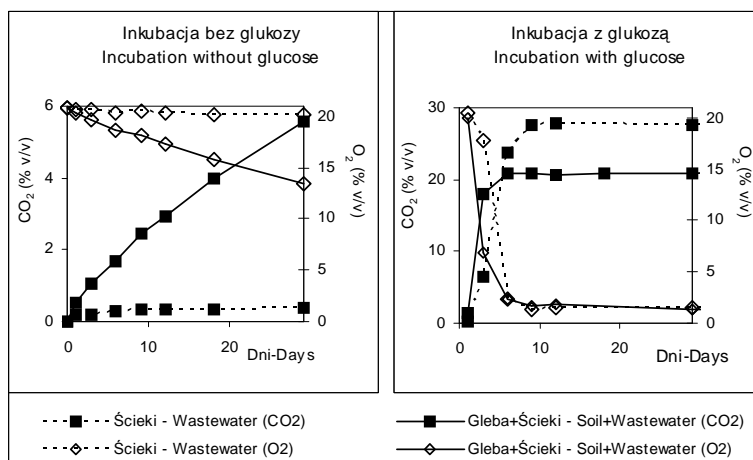
Rys. 24. Szybkość respiracji po 1 i 12 dniach inkubacji bez glukozy. Objaśnienia jak na rysunku 20
Fig. 24. Respiration rates after 1 and 12 days of soil incubation without glucose. Explanation in Fig. 20

W następnych fazach relacje te ulegały pewnym zmianom z zachowaniem reguły wyższego wydzielania CO₂ przez gleby pobrane z pól nawadnianych ściekami. Pozytywny wpływ nawodnień gleby organicznej wodami ściekowymi z krochmalni i browaru na wydzielanie CO₂ obserwowali Biernacka i in. [29]. Autorzy notowali oddychanie w ilości ok. 300 mg CO₂·100 g⁻¹, odpowiadające ok. 800 mg C-CO₂·kg⁻¹ po 4-tygodniowej inkubacji gleb, czyli zakres zbliżony do

kumulacji CO₂, jaki obserwowany był po 29 dniach inkubacji gleby porośniętej topolą oraz zalewanej ściekami (nr 1C).

Rysunek 24 przedstawia aktywność oddechową gleb po 1 i 12 dniach inkubacji. Maksymalne wartości aktywności oddechowej w próbkach glebowych ze ściekami zanotowano w fazie początkowej inkubacji. Podobną tendencję obserwowali m.in. Bernal i in. [26] oraz Mamilov i Dilly [188]. Natomiast w większości próbek zalanych wodą, aktywność respiracyjna wzrastała dopiero po kilkudniowej adaptacji, utrzymując się od 9 dnia prawie na stałym poziomie (patrz rys. 23, małe wykresy). W porównaniu do danych literaturowych, oddychanie z szybkością 1 mg C-CO₂·kg⁻¹·h⁻¹ było umiarkowane, lecz podobną aktywność obserwowali też inni autorzy [33,50,77,90,96,106,297,300,305].

Część dwutlenku węgla wydzielanego przez próbki glebowe zalane ściekami, zwłaszcza w ciągu pierwszych 24 godzin inkubacji, należy przypisać aktywności drobnoustrojów dostarczonych wraz ze ściekami. Przeprowadzono kontrolną inkubację próbki ścieków (5 ml) bez gleby w warunkach identycznych do inkubacji właściwej (rys. 25, lewy wykres). Początkowo relatywnie duży wkład wniesionych komórek w ilość wydzielonego CO₂ (prawie 40% objętości CO₂ wydzielonego przez glebę ze ściekami) zmniejszał się w czasie, prawdopodobnie z powodu wyczerpania substancji pokarmowych w samej próbce ścieków.



Rys. 25. Zmiany stężenia CO₂ (■) i O₂ (◇) (% obj.) nad powierzchnią próbki ścieków (5 cm³, linie przerywane) oraz gleby zalanej ściekami (5 g+5 cm³, linie ciągłe). Inkubacja w 20°C bez glukozy (lewy wykres) i z dodatkiem glukozy, 6 mg·g⁻¹ (prawy wykres)

Fig. 25. CO₂ (■) and O₂ (◇) concentration (% v/v) in the headspace of wastewater (5 cm³, broken lines) and soil with wastewater (5 g+5 cm³, solid lines). Incubation at 20°C without glucose (left) and with glucose addition, 6 mg g⁻¹ (right)

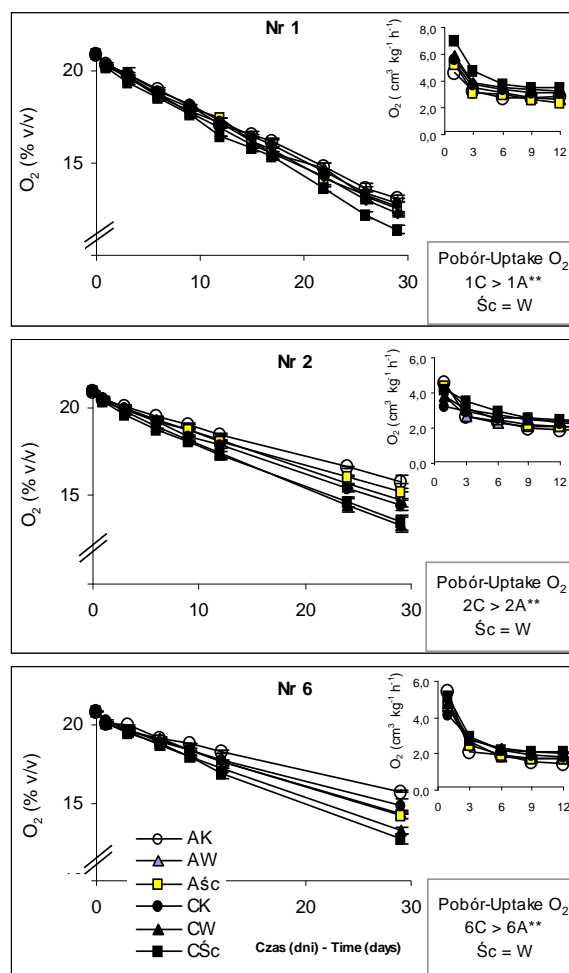
Ilość nagromadzonego CO₂ po 4 tygodniach inkubacji wynosiła mniej niż 5% objętości gazu oznaczonego w próbce gleby ze ściekami. Dobowe przyrosty CO₂ po 12 dniach inkubacji były już prawie 100-krotnie niższe w próbkach samych ścieków niż w glebie zalanej ściekami.

Oszacowanie rzeczywistego wkładu komórek wprowadzonych ze ściekami nie jest łatwe. Próba jego określenia na podstawie różnicy pomiędzy próbką zalaną wodą i ściekami może prowadzić do pominięcia zjawiska stymulacji respiracji komórek autochtonicznych przez substancje zawarte w ściekach. Natomiast zastosowanie ścieków sterylizowanych może zawyżyć wyniki poprzez wprowadzenie łatwo dostępnego substratu metabolicznego dla komórek glebowych (np. aminokwasów uwolnionych z komórek zniszczonych w czasie sterylizacji).

4.3.2.1.2. Pobranie O₂

Czynnikiem regulującym mineralizację materii organicznej jest dostępność tlenu i innych akceptorów elektronów. Pobranie tlenu, podobnie jak w przypadku wydzielania CO₂, było istotnie wyższe w glebach poprzednio zalewanych ściekami (C), $P < 0,01$, natomiast zróżnicowanie pomiędzy kombinacjami gleba-woda i gleba-ścieki było mniej wyraźne (rys. 26). Najwyższy dobowy pobór O₂ obserwowano na początku inkubacji ($3-7 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), podobnie do dehydrogenaz (patrz rys. 20). W ciągu pierwszego dnia najsilniejsze oddychanie stwierdzono w obecności ścieków, w próbkach porośniętej topolą gleby zalewanej ściekami (nr 1CŚc). Gleba ta do końca inkubacji utrzymywała najwyższą szybkość poboru O₂. Gleba porośnięta wierzwą (nr 2) w całym okresie inkubacji charakteryzowała się nieco niższą aktywnością oddechową, niż pozostałe gleby. Natomiast gleba porośnięta trawami (nr 6) po początkowo intensywnym poborze tlenu, wykazywała silne obniżenie aktywności oddechowej już w 3 dniu inkubacji. Po upływie 9-12 dni szybkość poboru O₂ ustaliła się na określonych poziomach ($2-4 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) we wszystkich zastosowanych wariantach doświadczenia (rys. 26, małe wykresy). Według badań innych autorów intensywność oddychania gleby może wahać się w różnych glebach od 0,1 do $20 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ [106].

Najmniej tlenu pobrały próbki o kontrolnym uwilgotnieniu z poletek, które nie miały wcześniej kontaktu ze ściekami (AK), średnio 2,9% (v/v) O₂ po 12 dniach oraz 6,0% (v/v) O₂ po 29 dniach inkubacji, a najwięcej – próbki zalane ściekami z poletek systematycznie nawadnianych w warunkach polowych (CŚc), średnio 4,0 i 8,4% O₂, odpowiednio po 12 i 29 dniach (tab. 12). Przedłużenie inkubacji spowodowało systematyczne, choć niewielkie, obniżanie szybkości poboru tlenu. Różnice w zapotrzebowaniu na tlen w poszczególnych wariantach zostały utrzymane – w efekcie 117-dniowej inkubacji gleby porośniętej trawami (nr 6) w powietrzu nad glebą pozostało od 5,5% do 1,6% O₂ (odpowiednio warianty 6AK i 6CŚc).



Rys. 26. Zmiany stężenia tlenu nad powierzchnią próbek badanych gleb w czasie inkubacji bez glukozy. Małe wykresy – szybkość poboru O₂. Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 26. Changes in oxygen concentration in soil headspace over time (incubation without glucose). Inserts – O₂ uptake rate. Explanation as in Fig. 20

Zalanie gleby wodą prowadzi na ogół do obniżenia poboru tlenu, wynikającego przede wszystkim z fizycznego ograniczenia dyfuzji O₂ w fazie wodnej. W przeprowadzonym doświadczeniu, próbki o kontrolnym uwilgotnieniu (ok. 60% pełnej pojemności wodnej) wykazywały jednak istotnie niższy pobór tlenu niż gleby zalane wodą lub ściekami. Zbyt niskie uwilgotnienie, które może prowadzić do hamowania aktywności oddechowej drobnoustrojów glebowych można w tym przypad-

ku wykluczyć, ponieważ wydzielanie CO₂ pozostawało w wariancie kontrolnym na wyższym poziomie niż w glebach zalanych wodą destylowaną (patrz rys. 23).

Inkubacja próbki ścieków bez gleby spowodowała niewielki ubytek tlenu – 0,54% i 0,79% odpowiednio w ciągu 12 i 29 dni inkubacji (rys. 25, prawy wykres). Dalsze przedłużanie inkubacji nie zmieniło tej sytuacji i po 62 dniach stężenie tlenu w naczyniach pozostawało więc bliskie atmosferycznemu, ok. 20% O₂ (v/v). Warunki przeprowadzonych doświadczeń nie pozwalają ustalić jak przebiegało oddychanie drobnoustrojów zymogennych w kontakcie z glebą.

Tabela 12. Porównanie ilości O₂ pobranego przez próbki glebowe w ciągu 12 i 29 dni inkubacji w temperaturze 20°C – poszczególne warianty doświadczalne gleby porośniętej topolą (nr 1), wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6)

Table 12. Oxygen consumed during 12 and 29 days of incubation at 20°C in experimental variants of soil planted with poplar (No. 1), willow (No. 2) and grasses (No. 6)

Wariant gleby Soil treatment	Ilość pobranego tlenu – Oxygen consumption (O ₂ , % v/v)					
	12 dni – 12 days			29 dni – 29 days		
	Nr 1	Nr 2	Nr 6	Nr 1	Nr 2	Nr 6
AK	3,77	2,42	2,59	7,80	5,13	5,15
AW	3,73	2,78	3,20	8,33	6,12	6,56
AŚc	3,46	2,82	3,28	8,26	5,65	6,74
CK	3,61	3,07	3,13	8,08	6,43	6,00
CW	4,03	3,54	3,72	8,65	7,44	7,66
CŚc	4,41	3,60	3,97	9,50	7,43	8,20

Gleba z jednej strony jest źródłem substancji pokarmowych dla drobnoustrojów pojawiających się z zewnątrz, z drugiej jednak jest środowiskiem, które nie sprzyja ich rozwojowi. Aktywność i przeżywalność w glebie mikroorganizmów pochodzących ze ścieków jest uzależniona od wielu czynników, m.in. od częstości stosowania nawodnień i warunków panujących w glebie [159,165,181,208].

4.3.2.1.3. Współczynnik oddechowy RQ

Współczynnik oddechowy RQ określany jest jako stosunek objętości wytworzonego CO₂ do objętości O₂ pobranego w czasie oddychania materiału biologicznego. Przy oddychaniu tlenowym z wykorzystaniem węglowodanów, wartość RQ wynosi 1,0 (przy całkowitym utlenieniu glukozy: 6 mol CO₂/6 mol O₂), dla kwasów organicznych średnia wartość RQ = 1,3. Podczas utleniania bardziej zredukowanych cząsteczek wskaźnik RQ < 1: w warunkach tlenowych dla tłuszczów średnia wartość RQ wynosi 0,7 a dla białek 0,8 [106]. Współczynnik oddechowy jest niższy od 1 również wówczas gdy utlenienie cukru jest niekompletne (np. nagromadzają się produkty niecałkowitego utlenienia) oraz przy asymilacji

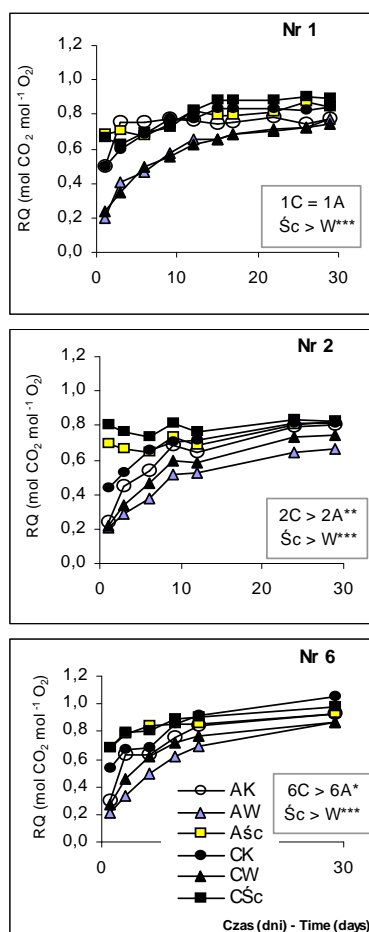
CO₂. Niskie wartości RQ mogą wskazywać na duże zapotrzebowanie na tlen i przewagę procesów mineralizacji alifatycznych związków organicznych. Do obniżenia RQ prowadzą też procesy autotroficznej nityfikacji wskutek wykorzystania O₂ bez wydzielania CO₂ oraz inne przemiany wynikające z wykorzystania tlenu przez drobnoustroje litotroficzne. Na podstawie przybliżonego składu kwasów huminowych (C₃₀₈H₃₂₈O₉₀N₅, stosunek molowy C/O ok. 3,42), Dilly [77] postuluje, że utlenianie tych związków może zachodzić w glebie w szerokim zakresie RQ od 0,29 do 0,91. Ponadto, złożone związki organiczne gleby (np. lignina, związki humusowe) dostępne są dla aerobów dzięki aktywności monoi dioksygenaz. Większy pobór tlenu niż wydzielanie CO₂ może świadczyć właśnie o wbudowywaniu tlenu do cząsteczek tych związków w wyniku katalizy oksygenaz [69]. Wartości RQ > 1, obserwowane w warunkach naturalnych, mogą przemawiać za intensywnym rozkładem związków typu kwasów organicznych, których źródłem są wydzieliny korzeniowe [76].

Zmiany współczynnika oddechowego wyznaczonego dla poszczególnych wariantów badawczych, przedstawione zostały na rysunku 27. Zalanie gleby ściekami spowodowało podwyższenie RQ w stosunku do gleby o uwilgotnieniu kontrolnym, zalanie wodą natomiast – wyraźne obniżenie RQ. Wartości wskaźnika wzrastały w czasie, najszybciej przekraczając jedność w glebie mineralnomurszowej porośniętej trawami (nr 6). W efekcie przedłużenia inkubacji próbek tej gleby do 117 dni, współczynnik zbliżył się lub przewyższył 1,0 we wszystkich zastosowanych wariantach.

Współczynnik oddechowy osiągał na ogół wyższe wartości w glebach pobranych z poletek intensywnie nawadnianych ściekami, niż w glebach z poletek kontrolnych, istotne dla gleby porośniętej wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6).

Wartość współczynnika oddechowego nie daje jednoznacznej oceny charakteru metabolizmu dominującego w układzie glebowym, odzwierciedla jednak do pewnego stopnia stan fizjologiczny biomasy mikroorganizmów [69]. Obserwowane istotne różnice pomiędzy wariantami z wodą lub ściekami pozwalają podkreślić silny wpływ ścieków na oddychanie gleby. Początkowo wyraźnie wyższe wartości współczynnika w obecności ścieków przemawiają prawdopodobnie za wykorzystaniem dostarczonych substancji pokarmowych o niższym stopniu zredukowania. Bezpośredni związek z niskimi wartościami RQ w wariantach gleby zalanej wodą destylowaną miało osłabione w tych warunkach wydzielanie CO₂ (patrz rys. 23, małe wykresy).

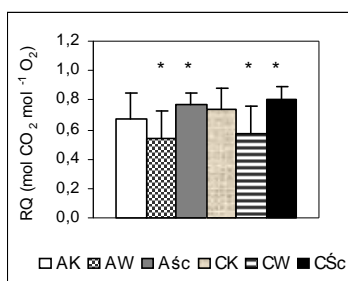
Tendencja wzrostu wartości wskaźnika RQ w trakcie inkubacji badanych gleb mogła wynikać ze zmniejszającego się dostępu tlenu. W warunkach hypoksji obecne w glebie alternatywne akceptory elektronów włączane są w degradację substancji organicznych, co przy zachowaniu funkcji wydzielania CO₂ na poziomie mniej więcej stałym, prowadzi do podwyższania wartości RQ.



Rys. 27. Zmiany współczynnika oddechowego (RQ) w czasie inkubacji próbek glebowych bez glukozy. Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 27. Respiratory quotient (RQ) during incubation of soil samples without glucose. Explanation as in Fig. 20

Przedstawione na rysunku 28 wartości średnie RQ wskazują, że wydzielanie CO₂ było niższe niż pobranie O₂ – przy wilgotności kontrolnej o 32% i 27%, w próbkach zalanych wodą o 47% i 43%, a w obecności ścieków o 23% i 20%, odpowiednio w glebach kontrolnych (A) i nawadnianych ściekami (C), $P < 0,001$.



Rys. 28. Współczynnik oddechowy (RQ) wyznaczony na podstawie 12-dniowej inkubacji próbek gleb organicznych – wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (*– istotnie różne od AK lub CK, $P < 0,001$)

Fig. 28. Respiratory quotient (RQ) calculated for 12-day experiment of organic soil samples – average values with standard deviations (* – significantly different from AK or CK, $P < 0.001$)

4.3.2.2. Aktywność oddechowa w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy

Doświadczenie uwzględniało też określenie wpływu ścieków na potencjalną aktywność oddechową drobnoustrojów glebowych w warunkach łatwego dostępu do źródła węgla i energii. Glukoza przyswajana jest przez znaczną część bakterii (heterotroficzne, miksotroficzne i fakultatywne litotroficzne) oraz drobnoustroje eukariotyczne, głównie grzyby. Wykorzystanie niskocząsteczkowych związków organicznych jest dla drobnoustrojów korzystne energetycznie, dlatego pomimo niskich stężeń w roztworze glebowym, związki te w znacznym stopniu przyczyniają się do wydzielania CO₂ z gleby. Glukoza, octan, czy mleczan obecne są w zakresie od < 1 do $1000 \mu\text{mol}$, natomiast aminokwasy i aminocukry – w zakresie od $0,1$ do $5 \mu\text{mol}$ [287].

4.3.2.2.1. Wydzielanie CO₂

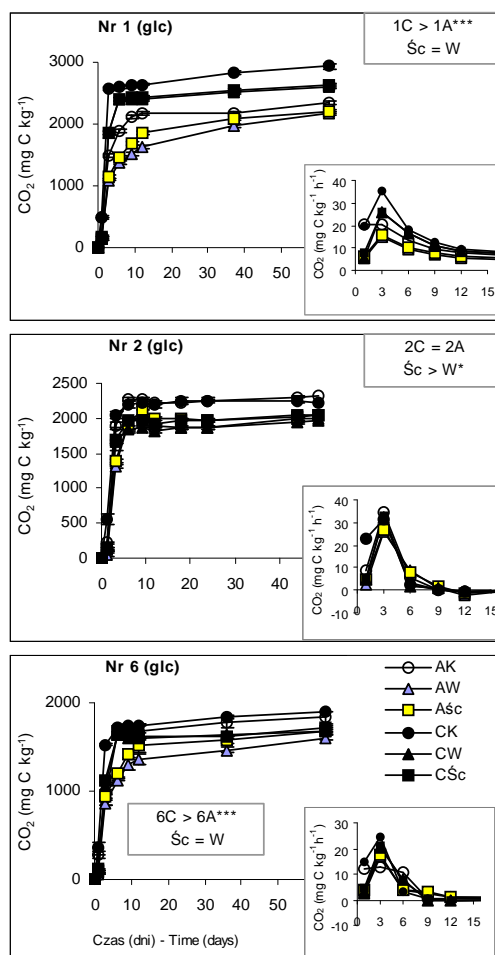
Wysoki dodatek glukozy ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ gleby) wywołał silną stymulację czynności dehydrogenaz (patrz rys. 22). Porównując glebę z poletek A i C badanych gleb, nie zaobserwowano jednak jednolitego charakteru tych zmian. Podobną sytuację stwierdzono w przypadku indukowanego wydzielania dwutlenku węgla (rys. 29). O ile w przypadku respiracji podstawowej (*basal respiration*, przypisywanej procesom związanym z mineralizacją węgla natywnego, naturalnie występującego w glebie) aktywność wszystkich gleb była wyższa w próbkach C niż A oraz w obecności ścieków niż wody, o tyle potencjalne możliwości wykorzystania łatwo przyswajalnego cukru ujawniły pewne różnice pomiędzy badanymi glebami.

Mineralizacja węgla w obecności glukozy przebiegała w początkowej fazie inkubacji bardzo intensywnie (rys. 29). Próbkę gleby porośniętej topolą (nr 1) i trawami (nr 6) pobrane z poletek nawadnianych ściekami przez 4 lata (C) emitowały istotnie więcej CO₂ niż próbki z poletek kontrolnych (A). Dla gleby porośniętej topolą (nr 1) występuje zbieżność z tendencją zanotowaną dla aktywności dehydrogenaz indukowanych glukozą. Różnica pomiędzy respiracją w wariantach z wodą lub ściekami była tu nieistotna. Natomiast w próbkach gleby porośniętej wierzbą (nr 2) mineralizacja glukozy zachodziła nieco silniej w obecności ścieków niż wody, lecz poprzednie użytkowanie gleby, przeprowadzane w warunkach polowych, nie przyczyniło się w tym przypadku do modyfikacji mineralizacji (A = C).

Stymulacja procesów respiracyjnych, wywołana dodatkiem glukozy, była najszybsza w próbkach o niższej wilgotności, dotyczyło to gleb pobranych z pól kontrolnych (AK), jak też zalewanych ściekami (CK). Wystarczające uwilgotnienie i jednocześnie łatwa dyfuzja gazów pomiędzy fazą stałą i powietrzem glebowym spowodowały, że ilość wydzielonego CO₂ była tu już po 24 godz. inkubacji średnio 17-krotnie wyższa niż w próbkach bez dodatku cukru (maksymalnie 28-krotnie wyższa w glebie porośniętej wierzbą nr 2CK). W tym samym czasie próbki gleby zalanej wodą uwolniły średnio 7 razy, a próbki zalane ściekami 3 razy więcej CO₂ niż odpowiednie próbki bez dodatku glukozy. Po 3 dniach inkubacji z glukozą ilość nagromadzonego CO₂ była w porównaniu do gleby bez wzbogacenia średnio 29-, 33- i 16 razy większa odpowiednio w wariantach K, W i Śc, maksymalnie 41 razy w glebie porośniętej wierzbą (nr 2). W początkowej fazie inkubacji łatwy dostęp do korzystnego źródła energii znacznie zwiększył intensywność procesów katabolicznych, wpływając tym samym silnie na cały układ glebowy. Podobnie silną stymulację respiracji dodatkiem glukozy obserwowali m.in. Dassonville i in. [70].

Po szczycie aktywności przypadającym trzeciego dnia procesy respiracji uległy silnemu osłabieniu, zwłaszcza w próbkach metabolizujących w początkowej fazie najsilniej (rys. 29). Zjawisko hamowania syntezy enzymów przez produkt końcowy szlaku jest naturalnym zjawiskiem regulacji metabolizmu, rozpoznawanym w pojedynczych populacjach drobnoustrojów [36]. W omawianym przypadku sytuacja jest bardziej złożona.

Wraz z upływem czasu inkubacji podwyższenie respiracji przez glukozę było coraz mniejsze. Po pierwszym dniu kumulatywna ilość CO₂ w glebie wzbogaconej była średnio 17, 7 i 3-razy wyższa (odpowiednio dla wariantów K, W i Śc), niż w glebie bez glukozy. Po 60 dniach we wszystkich wariantach była ona około dwukrotnie, zaś po 112 dniach już tylko o 40-60% wyższa.



Rys. 29. Emisja CO₂ w próbkach badanych gleb – krzywe kumulatorywne (inkubacja w obecności glukozy, 6 mg·g⁻¹). Małe wykresy – szybkość wydzielania CO₂. Objaśnienia jak na rysunku 20
Fig. 29. Cumulative CO₂ emission in soil samples (incubation with glucose, 6 mg g⁻¹). Inserts – respiration rate. Explanation as in Fig. 20

4.3.2.2.2. Mineralizacja netto glukozy

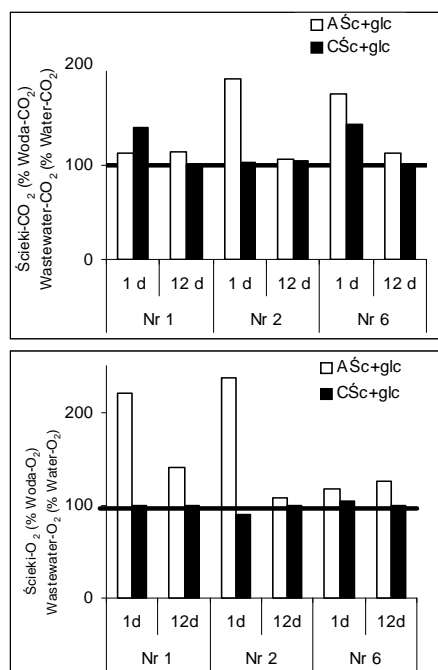
Mineralizacja netto glukozy mierzona była jako różnica pomiędzy ilością CO₂ wydzielonego w glebie z dodatkiem glukozy i w glebie bez dodatku [162,263]. Obliczona w ten sposób ilość CO₂ pochodząca z utlenienia glukozy w pierwszej fazie (po 24 godz.) była wyraźnie zależna od aktualnych warunków inkubacji i stanowiła 92-96%, 77-90% i 60-69% całej puli wydzielonego CO₂ odpowiednio

w wariantach K, W i Śc. Po trzech dniach zakres ten wynosił 93-98% we wszystkich układach, a następnie malał do 83-92%, 46-62% i 28-40%, odpowiednio po 12, 60 i 117 dniach inkubacji.

Nasilone utlenianie glukozy zachodziło trzeciego dnia po wykorzystaniu łatwo dostępnych glebowych związków organicznych (por. rys. 23 i rys. 29). Opóźnienie mineralizacji dodanych substratów (glukozy i celulozy) w stosunku do mineralizacji związków natywnych obserwowali też inni autorzy [74]. Wprowadzenie glukozy, lub innego substratu, do układu glebowego wiąże się z nie do końca jeszcze wyjaśnioną stymulacją (lub opóźnieniem) procesu mineralizacji glebowej materii organicznej w początkowej fazie utleniania substancji dodanej. Zjawisko to ('torowanie', *priming effect*) tłumaczone jest zastępowaniem istniejącej biomasy drobnoustrojów przez nowe populacje, lub współzawodnictwem o źródło energii pomiędzy populacjami wyspecjalizowanymi w rozkładzie świeżo dodanej substancji organicznej i tymi populacjami, które mineralizują spolimeryzowaną glebową materię organiczną [88,166,180,248]. Rzeczywisty zakres tego zjawiska możliwy jest tylko przy zastosowaniu dodatku glukozy znakowanej węglem ^{14}C [162,263].

Porównując całkowite wydzielanie CO_2 przez wzbogacone glukozą próbki gleby można zauważyć analogię do zmian aktywności dehydrogenaz (patrz rys. 22). Silniejsza aktywacja dehydrogenaz była obserwowana w tych glebach, które bez glukozy wykazywały niższy poziom aktywności. Podobna sytuacja wystąpiła w przypadku indukowanego wydzielania CO_2 , zwłaszcza tuż po rozpoczęciu inkubacji. Bezpośredni wpływ ścieków na wydzielanie CO_2 , wyrażony w stosunku do zmian wywołanych wodą destylowaną był wówczas większy w glebie 1C niż w glebie 1A (respiracja 1CŚc wyższa o 40% od 1CW; 1AŚc = 1AW) oraz w glebie 2A niż 2C (respiracja 2AŚc istotnie wyższa o 90% od 2AW; 2CŚc = 2CW). Początkowe wydzielanie CO_2 w glebie porośniętej trawami (nr 6) było wyższe w próbkach zalanych ściekami – zarówno w wariantcie 6AŚc jak i 6CŚc, odpowiednio o 76% i 43% (rys. 30, górny wykres). Ta dodatkowa stymulacja oddychania substancjami dostarczonymi ze ściekami (plus oddychanie komórek zymogennych) nie miała trwałego charakteru i obniżyła się po upływie trzech dni, zmieniając się już nieistotnie w zakresie od 0 do 12% CO_2 wydzielonego w glebie zalewanej wodą.

Ilość CO_2 wydzielonego w wyniku mineralizacji netto glukozy (różnica pomiędzy skumulowanym C- CO_2 w ciągu 12-dniowej inkubacji z dodatkiem glukozy i bez dodatku) stanowiła średnio 38% dodanego C-glukozy (w wariantach o wilgotności kontrolnej, zalanych wodą i ściekami odpowiednio 42, 35 i 36%). Stenger i in. [263] obserwowali nieco wyższe wykorzystanie dodanej glukozy (49-56%) w glebach mineralnych. W przypadku badanych gleb organicznych wskaźnik wykorzystania glukozy był nieco wyższy w utworze mineralnomurszowym (39%, gleba porośnięta trawami nr 6) niż w glebach torfowomurszowych (średnio 37,3% dla gleby porośnięta topolą nr 1 i wierzbą nr 2).



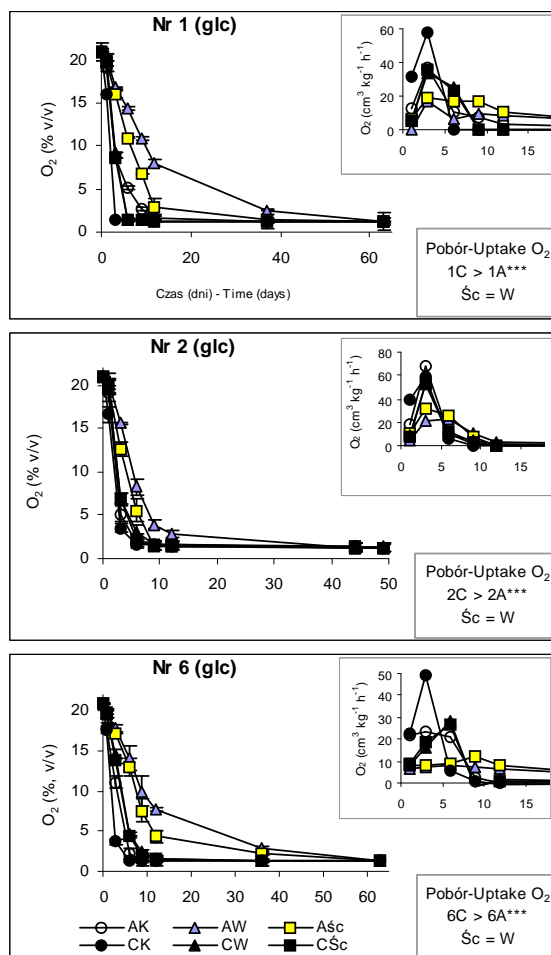
Rys. 30. Bezpośredni wpływ ścieków na wydzielanie CO₂ (górny wykres) i pobór O₂ (dolny wykres) w próbkach badanych gleb po 1 dniu (1d) i 12 dniach (12 d) inkubacji w obecności glukozy, 6 mg·g⁻¹ (procent zmian obserwowanych w próbkach zalanych wodą destylowaną)

Fig. 30. Effect of wastewater on CO₂ emission (upper graph) and O₂ uptake (lower graph) after 1 day (1d) and 12 days (12 d) of incubation with glucose, 6 mg g⁻¹ (percent of distilled water-variants)

4.3.2.2.3. Pobranie O₂

Pobór tlenu przez próbki glebowe wzbogacone glukozą był istotnie wyższy w tych glebach, które poprzednio nawadniane były ściekami (C > A, P < 0,001), (rys. 31).

Podobnie do oddychania podstawowego (bez wzbogacenia), różnica pomiędzy pobraniem O₂ w obecności ścieków i wody była nieistotna. Zapotrzebowanie na tlen odzwierciedlało wydzielanie CO₂, przedstawione poprzednio na rysunku 29. Większe różnice pomiędzy wariantami obserwowano w próbkach gleby porośniętej topolą (nr 1) i trawami (nr 6) niż w glebie porośniętej wierzwą (nr 2). We wczesnej fazie inkubacji najintensywniejszy pobór tlenu wykazywały próbki gleb uprzednio nawadnianych ściekami w wariantcie o wilgotności kontrolnej (CK). Największe opóźnienie poboru O₂ zanotowano w próbkach zalanych wodą gleby porośniętej trawami pobranej z pola kontrolnego (nr 6A), (rys. 31, małe wykresy).



Rys. 31. Zmiany stężenia tlenu nad powierzchnią próbek glebowych (inkubacja z glukozą, 6 mg·g⁻¹). Małe wykresy – szybkość poboru O₂. Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 31. Changes in oxygen concentration over time in the soil headspace (incubation with glucose, 6 mg g⁻¹). Inserts – O₂ uptake rate. Explanation as in Fig. 20

Intensywny metabolizm gleby wzbogaconej glukozą spowodował szczególnie szybkie wyczerpanie tlenu w próbkach CK. W ciągu 3 dni inkubacji stwierdzono ubytek 17,3-19,5% (v/v) O₂, odpowiadający 2,9-4,2 cm³ O₂·g⁻¹ s.m. gleby. Niższy, ale w miarę stały poziom aktywności w próbkach zalanych wodą lub ściekami gleby z pól kontrolnych (A) doprowadził do pobrania w ciągu 12 dni od 12,8% aż do 19,4% (v/v) O₂ (2,04-4,02 cm³·g⁻¹).

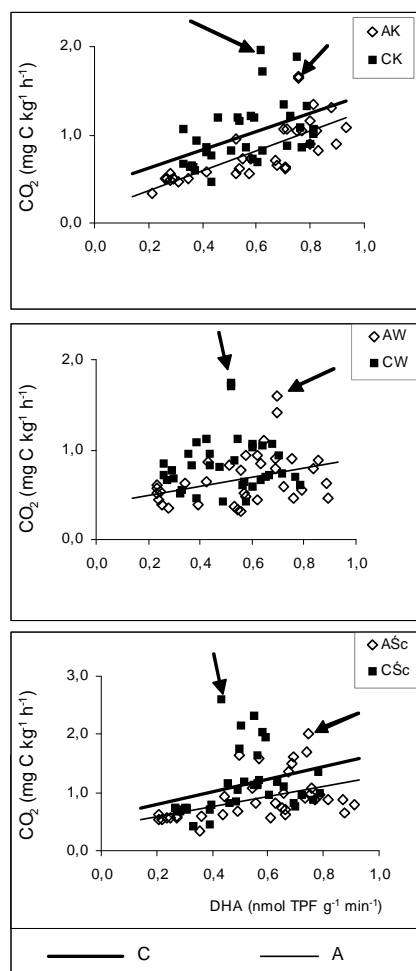
W początkowej fazie inkubacji próbek gleby torfowo-murszowej porośniętej topolą (nr 1) i wierzbą (nr 2) zalanych ściekami pobranie tlenu było nawet 2-krotnie wyższe niż w próbkach zalanych wodą. Dotyczyło to jednak tylko materiału pobranego z pól kontrolnych, które nie były zalewane ściekami (A). W przypadku próbek gleb systematycznie nawadnianych ściekami (C), pobór tlenu w obecności ścieków był zbliżony do poziomu obserwowanego w zawiesinie wodnej (rys. 30, dolny wykres).

Próbki ścieków, inkubowane z dodatkiem glukozy ($6 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ ścieków) wykazywały początkowo słabszy metabolizm w porównaniu do próbki gleby zalanej ściekami (patrz rys. 25, prawy wykres), lecz po kilku dniach inkubacji ilość CO_2 wydzielonego przez same ścieki była wyższa o ok. 30% od CO_2 nagromadzonego w próbkach glebowych.

4.3.2.3. Relacje pomiędzy aktywnością dehydrogenaz i oddychaniem

Procesy oddechowe mikroorganizmów obecnych w glebie determinowane są w ogromnym stopniu przez stan jej natlenienia. W glebie o umiarkowanej porowatości powietrznej możliwa jest aktywność nawet beztlenowców obligatoryjnych (zlokalizowana w zamkniętych przestrzeniach lub wewnątrz agregatów glebowych – bakterie chętnie kolonizują pory o średnicy $1,2\text{--}9 \mu\text{m}$), natomiast w glebie długotrwanie zalanej przemiany biochemiczne zachodzące z udziałem tlenu możliwe są tylko na granicy fazy stałej i ciekłej, limitowane ograniczoną dyfuzją O_2 przez warstwę wody [101,120,133,233,271]. Dopóki w glebie dostępny jest tlen, dominują procesy przebiegające z jego udziałem.

Zależność pomiędzy aktywnością respiracyjną i dehydrogenazową mikroorganizmów glebowych nie została jednoznacznie określona w trakcie prowadzonych badań. Szybkość wydzielania CO_2 w funkcji aktualnej wartości DHA w trakcie 4-tygodniowej inkubacji bez dodatkowego substratu, przedstawiono na rysunku 32. Punkty maksymalnej respiracji zaznaczono na rysunku strzałkami. Wykresy dotyczą kolejno wariantów K, W i Śc gleb A i C. Aktywność respiracyjna próbek kontrolnych (A) była istotnie zależna od aktualnej czynności dehydrogenaz w każdym wariacie doświadczenia (AK, AW, AŚc). Natomiast gleba, która na polu stykała się systematycznie ze ściekami (C) nie wykazywała zależności istotnej w wariacie z wodą. Interesujące jest przesunięcie punktu maksymalnej szybkości respiracji i odpowiadającej mu wartości DHA (tab. 13). W każdym układzie (K, W, Śc) gleba zalewana przez 4 lata ściekami (C) wykazywała wyższą maksymalną aktywność respiracyjną niż gleba kontrolna (A) oraz uzyskiwała maksymalną szybkość respiracji przy niższej aktywności dehydrogenaz. Na przykład, w trakcie inkubacji próbek o wilgotności sprzyjającej metabolizmowi tlenowemu (K), respirację maksymalną gleby AK ($\text{Resp}_{\text{max}} = 1,66 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) zaobserwowano przy czynności dehydrogenaz $\text{DHA}_{\text{Resp}} = 0,76 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.



Rys. 32. Szybkość oddychania w funkcji aktywności dehydrogenaz (pojedyncze wyniki z 29-dniowej inkubacji bez glukozy próbek glebowych)

Fig. 32. Respiration rate versus soil dehydrogenase activity (results of 29-day soil samples incubation without glucose)

W takich samych warunkach wodno-powietrznych gleba CK uzyskała szybkość respiracji wyższą o 20% przy aktywności DHA niższej o 20%. Próbkę AŚc wykazywały wyższą maksymalną respirację niż próbki AK przy tym samym poziomie dehydrogenaz ($Resp_{max} = 2,02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $DHA_{Resp} = 0,75 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), a gleba CŚc uzyskała maksymalną szybkość respiracji (wyższą o 30% od próbek AŚc) przy niższym o 40% natężeniu wewnątrzkomórkowych przemian redoks (DHA).

Tabela 13. Maksymalna szybkość respiracji (Resp_{\max}) i odpowiadająca jej aktywność dehydrogenaz (DHA_{Resp}) w trakcie 29-dniowej inkubacji bez glukozy. Wyniki prezentowane na rysunku 32

Tabela 13. Maximal respiration rate (Resp_{\max}) and the actual dehydrogenase activity (DHA_{Resp}). Results of 29-day incubation without glucose. See Fig. 32

Wariant Variant	DHA_{Resp} $\text{nmol TPF} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	Resp_{\max} $\text{mg C-CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
AK	0,76	1,66
CK	0,61	1,96
AW	0,70	1,59
CW	0,52	1,71
AŚc	0,75	2,02
CŚc	0,44	2,61

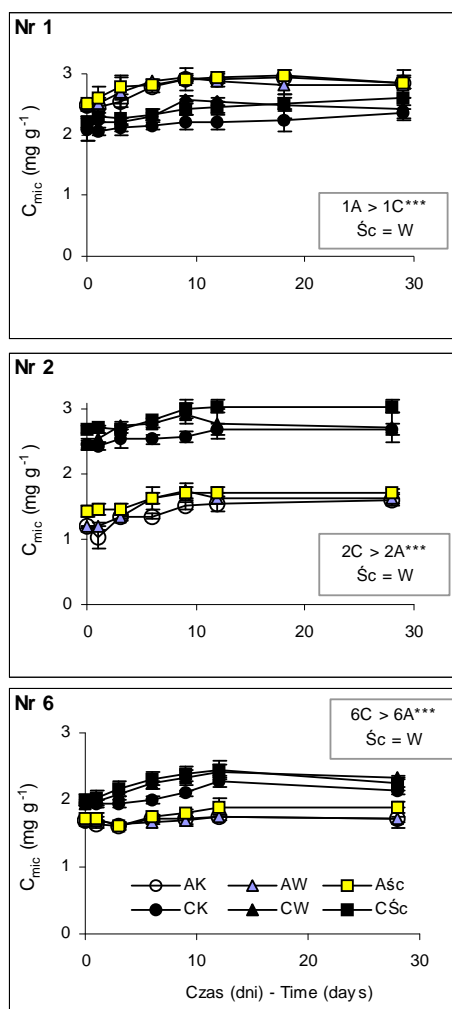
Wszystkie wymienione maksima respiracji stwierdzono w porośniętej topolą glebie zalewanej ściekami (nr 1C), w której czynność dehydrogenaz była obniżona w stosunku do gleby kontrolnej (nr 1A). Wskazaniem wydawało się sprawdzić, czy wzmożone wydzielanie CO_2 i jednocześnie obniżona aktywność dehydrogenaz nie wynikają z osłabienia funkcji życiowych drobnoustrojów, czyli czy nie następuje przesunięcie ‘wydatku’ energii uwalnianej w czasie respiracji z rozwoju (*growth requirement*) na konieczność utrzymania komórek przy życiu (*maintenance*) [6,9,215]. W tym celu poddano analizie dynamikę biomasy drobnoustrojów.

4.3.3. Biomasa drobnoustrojów

Biomasa drobnoustrojów (C_{mic}) stanowi istotny wkład do całkowitej puli glebowej materii organicznej. Odpowiada ona za przekształcenia i utrzymanie składników pokarmowych gleby, stanowi źródło podstawowych pierwiastków biogenych i węgla, jest wrażliwa na zmiany środowiska chemicznego i fizycznego gleby [21,162]. Metoda SIR (tzw. fizjologiczna metoda oznaczania biomasy) pozwala na określenie ilości C_{mic} aktualnie utrzymanej w komórkach aktywnych metabolicznie, ponieważ opiera się na początkowej reakcji komórek aktywnie katabolizujących dodany substrat [6,8].

Ze względu na wyczerpanie dostępnego substratu, zawartość biomasy może obniżyć się w trakcie inkubacji gleby bez wzbogacenia [169]. Jednak drobnoustroje zaadaptowane do wykorzystania natywnej materii organicznej bez większej straty biomasy mogą przetrwać okres niedoboru substratu, gdyż po wyczerpaniu łatwej do rozkładu materii organicznej wykorzystują frakcje trudniej dostępne lub tworzą struktury przetrwalnikowe. W omawianym doświadczeniu obserwowano wzrost biomasy przez ok. 9 dni, następnie prawie stały poziom przez kolejne 3 tygodnie (rys. 33). Gleba porośnięta wierzwą (nr 2) oraz gleba porośnięta trawami (nr 6) wy-

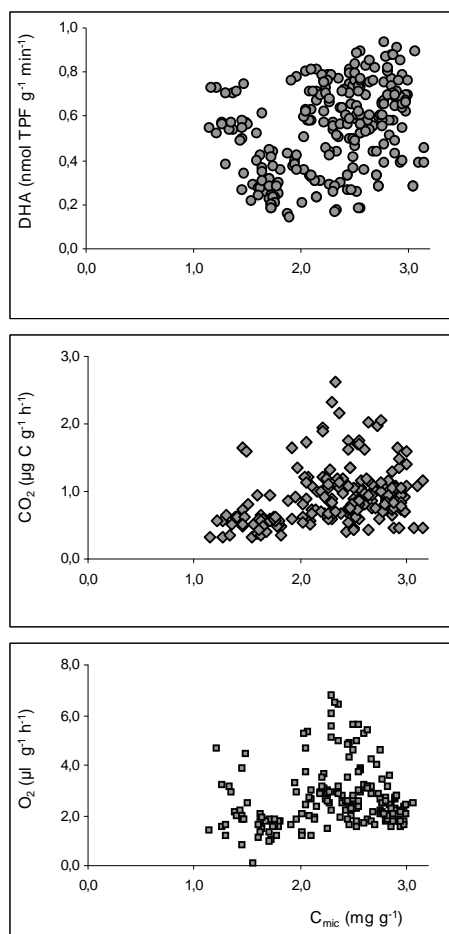
kazywały istotnie wyższe wartości biomasy drobnoustrojów w próbkach pobranych z poletek poddawanych 4-letnim zalewom ściekami (C), natomiast gleba porośnięta topolą (nr 1) – w materiale z pola kontrolnego (A), ($P < 0,001$). Podobną tendencję obserwowano w przypadku omawianej wcześniej aktywności dehydrogenaz. Różnica pomiędzy biomasą drobnoustrojów w obecności ścieków i wody (w kontakcie bezpośrednim w trakcie 12-dniowej inkubacji) była nieistotna.



Rys. 33. Zmiany biomasy drobnoustrojów (C_{mic}) w czasie inkubacji bez glukozy. Objaśnienia – rys. 20
Fig. 33. Changes in microbial biomass (C_{mic}) during incubation without glucose. Explanation – Fig. 20

W początkowym okresie inkubacji we wszystkich próbkach o niższej wilgotności (AK i CK) zanotowano niewielkie, 2-12%, przejściowe obniżenie zawartości C_{mic} , następnie dobowe fluktuacje nie przekraczały $150 \mu\text{g } C_{mic} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dzień}^{-1}$. Zawartość biomasy drobnoustrojów była stosunkowo wysoka ($1-3 \text{ mg } C_{mic} \cdot \text{g}^{-1}$). Podobne wartości, nawet do $11,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ obserwowali również inni autorzy [129,170,174,202,238,260].

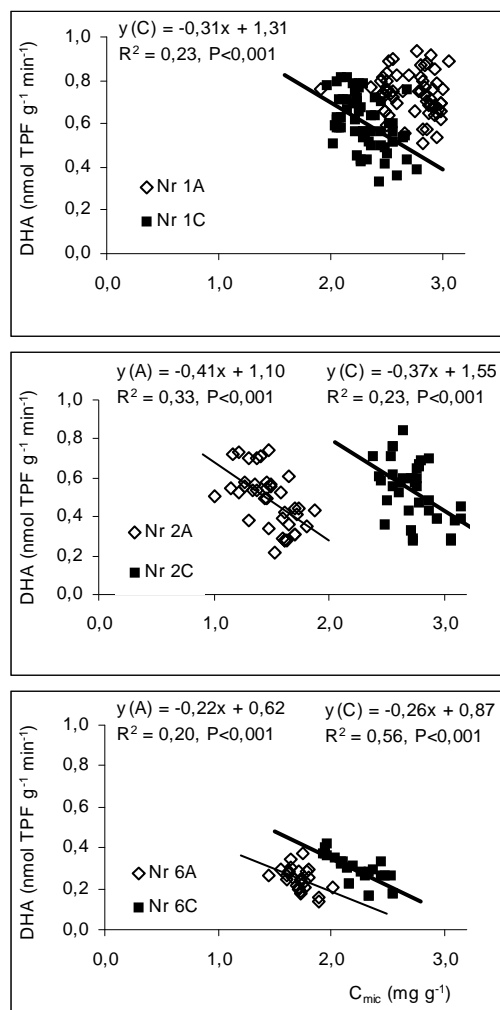
Rysunek 34 przedstawia relacje pomiędzy aktywnością dehydrogenaz i oddychaniem gleby oraz aktualną biomasą drobnoustrojów.



Rys. 34. Relacje pomiędzy aktywnością dehydrogenaz (DHA), szybkością wydzielania CO_2 i poboru O_2 (górny, środkowy i dolny wykres) i aktualną zawartością biomasy (pojedyncze wyniki z 29-dniowej inkubacji bez glukozy)

Fig. 34. Dehydrogenase activity (DHA), CO_2 evolution rate and O_2 uptake rate (upper, middle and lower graph, respectively) versus actual soil biomass during 29-day incubation of soil samples without glucose

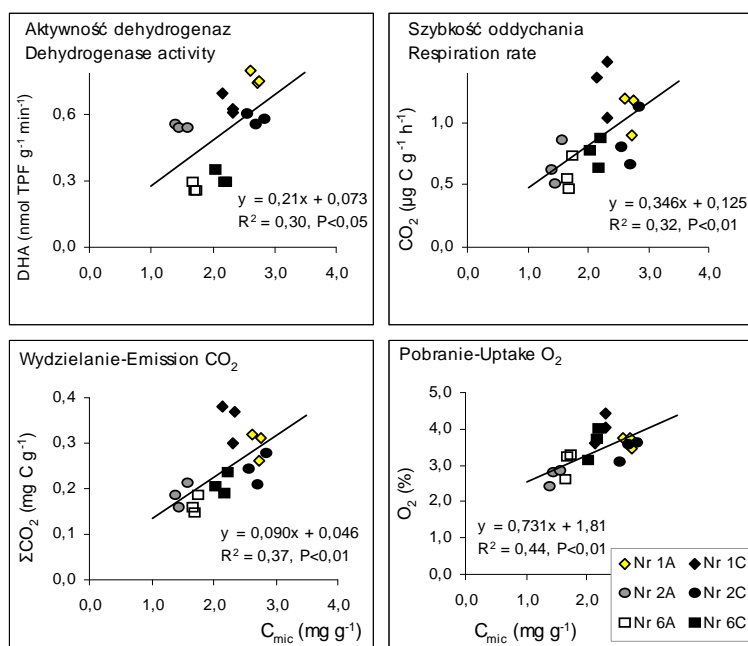
Ze względu na duże różnice w wartościach C_{mic} pomiędzy glebami A i C, szczególnie w glebie porośniętej wierzbą (nr 2), przeprowadzono następnie dokładniejsze analizy tych zależności, osobno dla próbek reprezentujących oba sposoby nawadniania gleb. Zależność aktualnej aktywności dehydrogenaz od aktualnej zawartości biomasy była podobna we wszystkich glebach oprócz gleby kontrolnej porośniętej topolą (nr 1A), (rys. 35).



Rys. 35. Aktywność dehydrogenaz (DHA) w funkcji aktualnej zawartości biomasy podczas 29-dniowej inkubacji bez glukozy

Fig. 35. Dehydrogenase activity (DHA) versus actual soil biomass during 29-day incubation without glucose

Kilkuletnie zabiegi nawadniania ściekami nie zmieniły więc tej relacji w glebie porośniętej wierzwą (nr 2) i trawami (nr 6), choć zmianie uległa zawartość biomasy (istotne podwyższenie pod wpływem ścieków). W przypadku porośniętej topolą gleby zalewanej ściekami (nr 1C), o biomase obniżonej w stosunku do gleby kontrolnej (nr 1A), relacja DHA do aktualnej wartości C_{mic} pozostała analogiczna do relacji w pozostałych glebach. Malejący charakter zależności – rezultat obniżania DHA i przyrostu biomasy w czasie inkubacji – mógł być efektem adaptacji drobnoustrojów do zaistniałych warunków i osiągnięcia swoistej równowagi, pozwalającej na obniżenie tempa procesów katabolicznych (mierzonej aktywności dehydrogenaz) wymaganych dla przyrostu populacji (mierzonej zawartością biomasy). Przedstawienie powyższych zależności względem średnich wartości C_{mic} dla poszczególnych wariantów doświadczalnych wskazuje, że gleba o wyższej biomase prezentowała średnio wyższą aktywność dehydrogenaz, szybkość respiracji, kumulację CO_2 (ΣCO_2) i pobranie O_2 niż gleba o biomase niższej (rys. 36), podobnie jak w innych glebach [12,98].



Rys. 36. Wybrane wskaźniki aktywności biologicznej w funkcji średniej wartości biomasy (C_{mic}). DHA i szybkość respiracji – średnie z 12-dniowej inkubacji bez glukozy; wydzielanie CO_2 i pobór O_2 – wartości dla 12 dnia inkubacji bez glukozy. Równania regresji dotyczą wszystkich danych
Fig. 36. Soil biological activity (without glucose) versus mean soil biomass (C_{mic}). DHA and respiration rate – means for 12-day incubation; CO_2 emission and O_2 uptake – values for 12th day of incubation. Regression for all data

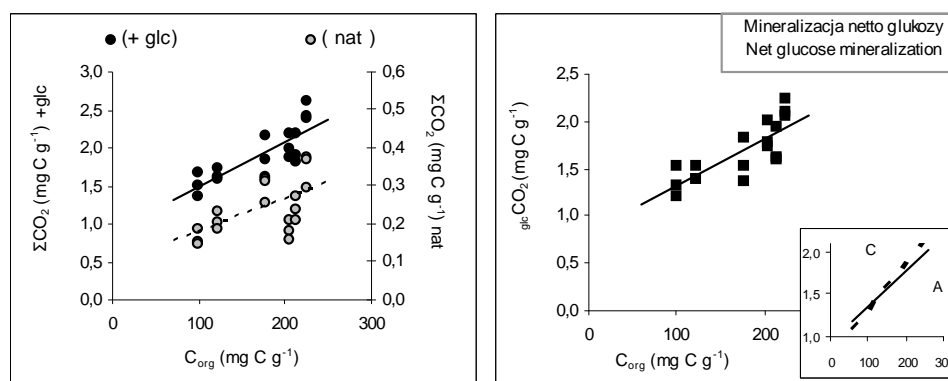
4.3.4. Relacje pomiędzy C_{org} , C_{mic} i innymi właściwościami biologicznymi gleby

Omawiane w poprzednich rozdziałach procesy respiracji, efekt aktywności drobnoustrojów heterotroficznych, w dużej mierze determinowane są obecnością dostępnego źródła węgla. Zmiany ilościowe i jakościowe zachodzące w materii organicznej gleby są powolne, a zabiegi takie jak nawożenie czy sposób uprawy wpływają głównie na frakcje rozkładalne. Zatem biomasa drobnoustrojów oraz stosunek C_{mic}/C_{org} są użytecznymi wskaźnikami pozwalającymi na opisanie zachodzących w glebie przekształceń substancji organicznej. Wzrasta też zainteresowanie tymi parametrami aktywności biologicznej gleby jako wskaźnikami stresu ekologicznego [21,198,294].

Poniżej przedstawiono analizę relacji pomiędzy zawartością węgla organicznego, i węgla biomasy mikroorganizmów oraz innymi właściwościami biologicznymi w glebach kontrolnych i poddawanych 4-letnim zalewom ściekami.

4.3.4.1. Relacje pomiędzy C_{org} i aktywnością biologiczną gleb

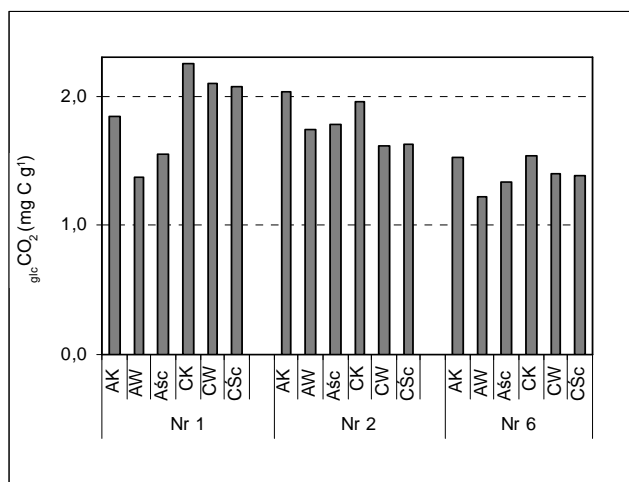
Przedstawienie ilości CO_2 uwolnionego w czasie 12-dniowej inkubacji w funkcji C_{org} dla próbek reprezentujących wszystkie warianty badanych gleb wykazuje, że wydzielanie CO_2 zwiększało się wraz ze wzrostem zawartości węgla natywnego nie tylko podczas inkubacji próbek bez wzbogacenia glukożą, ale też w próbkach z jej dodatkiem (rys. 37, lewy wykres). Ilość węgla organicznego naturalnie występującego w glebie determinowała więc też mineralizację netto glukozy (rys. 37, prawy wykres).



Rys. 37. Wydzielanie CO_2 przez próbki reprezentujące wszystkie warianty badanych gleb w funkcji C_{org} . Lewy wykres – kumulacja CO_2 (ΣCO_2) w czasie 12-dniowej inkubacji z glukożą (● +glc) oraz oparta na metabolizmie węgla natywnego (○ nat). Prawy wykres – mineralizacja netto glukozy ($glicCO_2$), rysunek wstawiony – proste dla gleb A i C. Równania regresji – tabela 14

Fig. 37. CO_2 emission after 12-day incubation of all soil variants versus C_{org} . Left graph – respiration in the presence of glucose (● +glc) and basal respiration (ΣCO_2 , ○ nat). Right graph – net glucose mineralization ($glicCO_2$). Insertion – straight lines for soils A and C. Regression analysis – in Table 14

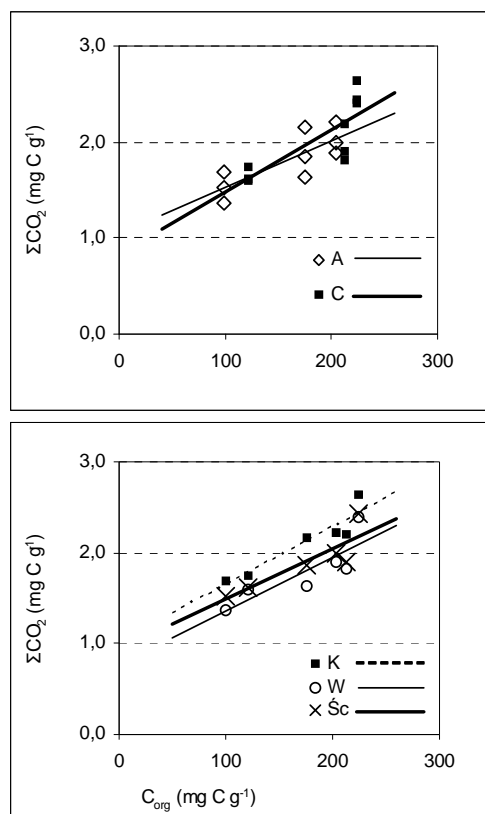
Gleba porośnięta topolą pobrana z pola zalewanego ściekami (nr 1C) o najwyższej zawartości C_{org} ($224 \text{ mg C} \cdot \text{g}^{-1}$) wykorzystywała dodaną glukozę najefektywniej (rys. 38). Warto przypomnieć, że gleba ta wykazywała niższą aktywność dehydrogenaz niż gleba kontrolna ($1A > 1C$). Szczególnie silna stymulacja respiracji po dodaniu łatwego do wykorzystania cukru wskazuje na zachowanie żywotności drobnoustrojów intensywnie metabolizujących w obecności dodanej glukozy.



Rys. 38. Mineralizacja netto glukozy ($g_{glc}CO_2$) w wyniku 12-dniowej inkubacji próbek glebowych
Fig. 38. Net glucose mineralization ($g_{glc}CO_2$) after 12-day soil samples incubation

Przeprowadzone obserwacje mogą również sugerować niską dostępność węgla organicznego zawartego w glebie porośniętej topolą w trakcie zalewów ściekami (nr 1C). Systematyczne zalewy ściekami gleby w układzie ze słabo rosnącą topolą (nr 1C) prowadziło do utrzymywania podwyższonego uwilgotnienia i niższych zakresów Eh (patrz rys. 2 i 7), niż w glebie w układzie z dobrze rozwijającą się i transpirującą wierzbą (nr 2C). Obniżenie aktywności dehydrogenaz w glebie porośniętej topolą i zalewanej ściekami (nr 1C) w porównaniu do gleby kontrolnej (nr 1A) obserwowane już w trakcie doświadczenia polowego, a także utrzymanie tej tendencji w warunkach laboratoryjnych, nie wynikały zatem z bezpośredniego hamowania aktywności enzymów przez ścieki, lecz z osłabienia procesów biologicznych wskutek zmiany dostępności C_{org} zawartego w glebie. W czasie utleniania substratów naturalnie dostępnych biomasa drobnoustrojów była wyższa i bardziej aktywna w porośniętej topolą glebie bez nawodnień ściekami (nr 1A) oraz porośniętej wierzbą glebie zalewanej ściekami (nr 2C). Jednak wprowadzenie glukozy silniej stymulowało aktywność w porośniętej topolą glebie zalewanej ściekami (nr 1C) i w porośniętej wierzbą glebie z pola kontrolnego

(nr 2A), a więc stymulacja substratem węglowym była silniejsza w glebach mniej aktywnych bez dodatku glukozy. Zasada ta dotyczyła biomasy i aktywności dehydrogenaz, lecz nie respiracji podstawowej (*basal respiration*). Oddychanie podstawowe we wszystkich glebach było wyższe po uprzednich nawodnieniach prowadzonych w doświadczeniu polowym (gleby C), (por. rys. 23). Zdolność intensywnego wykorzystania wprowadzonego cukru prostego wskazuje na zachowanie wysokich potencjalnych możliwości do przeprowadzania procesów metabolicznych przez drobnoustroje glebowe, mimo osłabienia tzw. aktywności aktualnej opartej na wykorzystaniu substratu organicznego dostępnego w glebie.



Rys. 39. Wpływ sposobu nawadniania trzech gleb organicznych (A i C, górny wykres) oraz warunków inkubacji (K, W, Śc, dolny wykres) na zależność pomiędzy ilością wydzielonego CO_2 (ΣCO_2) po 12-dniowej inkubacji próbek z glukozą i C_{org} . Równania regresji – tabela 14

Fig. 39. Effect of irrigation system (A and C, upper graph) and incubation conditions (K, W, Śc, lower graph) on CO_2 emission after 12-day incubation with glucose versus soil C_{org} . Regression analysis in the Table 14

Wpływ sposobu nawadniania badanych gleb organicznych oraz warunków 12-dniowej inkubacji z glukozą na relację pomiędzy mineralizacją dostępnego węgla (natywnego plus dodana glukoza) i C_{org} ilustruje rysunek 39. Poprzednio stosowany system nawodnień silniej zmieniał zależność mineralizacji glukozy od zawartości C_{org} , niż warunki inkubacji. Wielkość respiracji indukowanej dodatkiem glukozy w układzie rozróżniającym aktualne warunki inkubacji (warianty K, W, Śc) potwierdza wcześniejsze obserwacje, że warunki wodno-powietrzne silnie determinują aktywność drobnoustrojów (rys. 39, dolny wykres).

Najwięcej CO_2 wydzieliły próbki o niższym uwilgotnieniu odpowiadającym ok. 60% pełnej pojemności wodnej. Najmniej – próbki zalane wodą destylowaną. Wyższa emisja CO_2 w obecności ścieków niż wody (średnio o 6%) oraz prawie równoległe proste dla obydwu wariantów próbek zalanych wodą (W) i ściekami (Śc) wskazują na brak wpływu ścieków na tę relację. Dla każdego zastosowanego wariantu zależność emisji CO_2 od zawartości C_{org} pozostawała istotna. Równania opisujące powyższe relacje zestawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Równania regresji dla zależności pomiędzy ilością wydzielonego CO_2 w ciągu 12-dniowej inkubacji i C_{org} . Wyniki prezentowane na rysunkach 37 i 39

Table 14. Linear regression between cumulative CO_2 evolution (12-day) and C_{org} . See Figs. 37 and 39

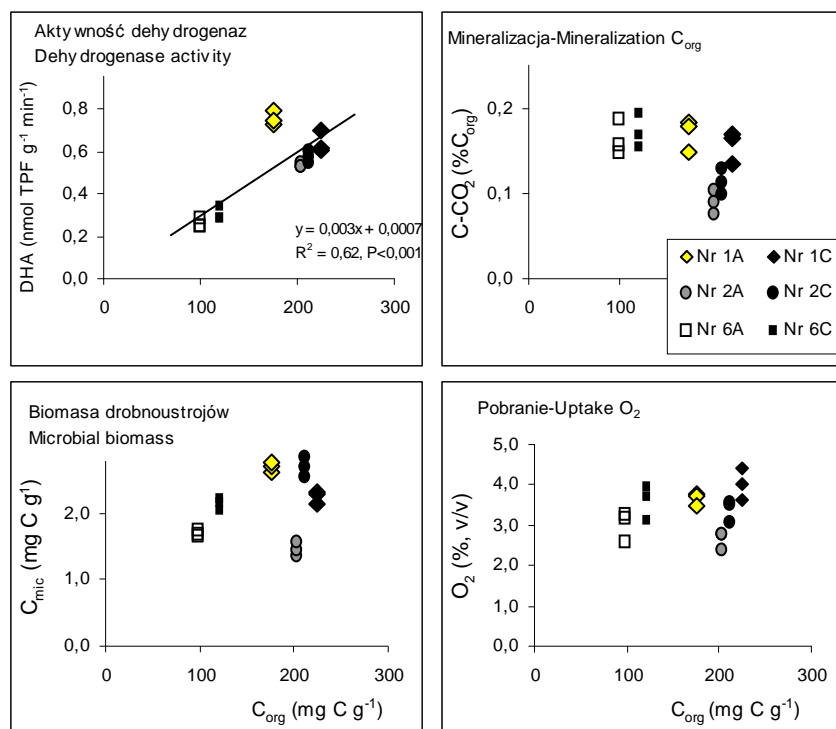
Warunki inkubacji gleby Incubation conditions	Równania Equations	R^2
Inkubacja bez glukozy – Incubation without glucose		
– wszystkie warianty (all variants)	$y=0,001x+0,093$	0,33*
Inkubacja z glukozą – Incubation with glucose		
– wszystkie warianty (all variants)	$y=0,006x+0,091$	0,66***
– A	$y=0,004x+1,04$	0,63**
– C	$y=0,006x+0,848$	0,65**
– K	$y=0,006x+1,01$	0,87**
– W	$y=0,006x+0,779$	0,71*
– Śc	$y=0,006x+0,941$	0,77**
Mineralizacja netto glukozy – Net glucose mineralization		
– wszystkie warianty (all variants)	$y=0,005x+0,819$	0,65***
– A	$y=0,004x+0,91$	0,58*
– C	$y=0,005x+0,76$	0,66**

*, **, *** – istotne przy – significant at $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$

Badając reakcję drobnoustrojów glebowych na stan natlenienia, Picek i in. [228] zmieniali warunki inkubacji z tlenowych na beztlenowe, regulując odpowiednio przepływ powietrza i N_2 w trakcie 48-godzinnej inkubacji trzech gleb

mineralnych (Cambisol, wilgotność odpowiadająca 60% WHC). Autorzy obserwowali średnio o 60% obniżenie ilości utlenionej glukozy oraz 10-krotnie niższe wydzielanie CO₂ niż przy ciągłym natlenieniu. W warunkach prowadzonego przez autorkę doświadczenia, nagromadzenie CO₂ w ciągu 12 dni inkubacji z glukozą było średnio o 15% i 10% niższe w próbkach zalanych, odpowiednio wodą (W) i ściekami (Śc), niż w próbkach o uwilgotnieniu kontrolnym (K). Doświadczenia te potwierdzają silne uzależnienie sposobu wykorzystania łatwo dostępnej glukozy od warunków tlenowych gleby.

Aktywność dehydrogenaz istotnie korelowała z C_{org} (rys. 40), przy czym gleba porośnięta topolą pobrana z pola kontrolnego (nr 1A) o średniej zawartości węgla organicznego wykazywała, w porównaniu do pozostałych gleb, szczególnie wysoką aktywność dehydrogenaz.



Rys. 40. Wybrane wskaźniki aktywności biologicznej w funkcji zawartości węgla organicznego, C_{org} (wartości średnie z 12-dniowej inkubacji bez glukozy dla poszczególnych gleb A i C)

Fig. 40. Soil biological activity versus organic C content (average values for 12-day incubation of soils A and C without glucose)

Zależności pomiędzy biomasą drobnoustrojów (C_{mic}), procentem zmineralizowanego C_{org} i ilością pobranego tlenu od zawartości C_{org} pozostawały nieistotne. W czasie 12-dniowej inkubacji próbek, mineralizacji do CO_2 uległo 0,08-0,19% obecnego C_{org} , przy czym najwięcej w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6). W podobnych warunkach inkubacji gleb mineralnych (Typic Torrifluvents) o zawartości C_{org} od 0,5% do 2,99%, McLain i Martens [194] obserwowali mineralizację węgla natywnego odpowiednio od 4,1 do 0,44%.

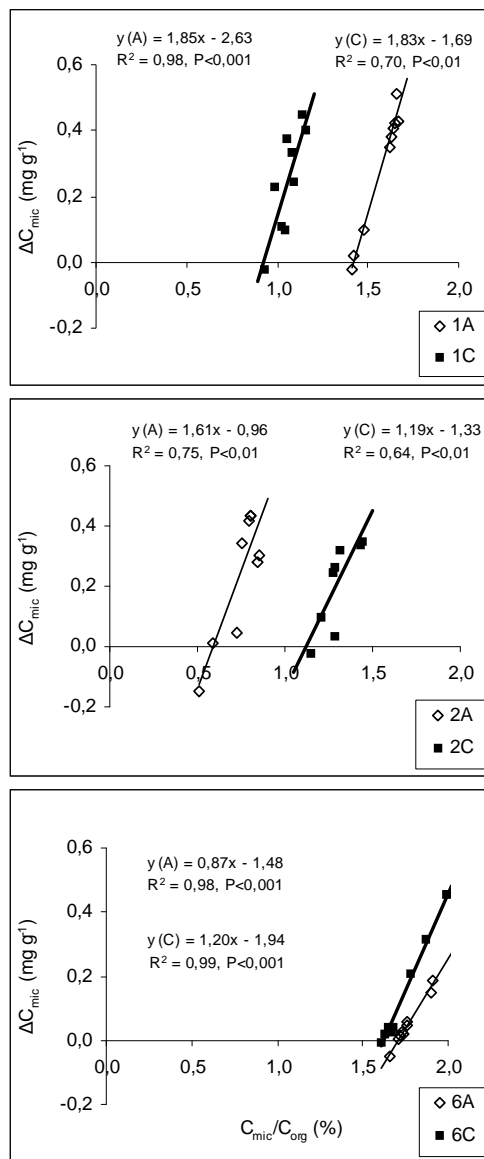
4.3.4.2. Wartości wskaźnika dostępności węgla (C_{mic}/C_{org})

Wskaźnik C_{mic}/C_{org} informuje jaka część węgla organicznego gleby zawarta jest w biomacie mikroorganizmów glebowych. Wielkość ta może być traktowana jako wskaźnik dostępności węgla dla mikroorganizmów. Węgiel biomasy mikroorganizmów reprezentuje od 0,5 do 4% C_{org} [8,129,171,294]. W glebach mineralnych o niższej zawartości materii organicznej, wskaźnik C_{mic}/C_{org} może dochodzić do 8%, choć niektórzy obserwowali wartości niższe, nawet 0,4% [13,96,234]. Czynniki toksyczne, np. długotrwałe zanieczyszczenie metalami i toksycznymi związkami organicznymi może prowadzić do obniżenia wartości tego wskaźnika [87,91].

Przedstawiona na rysunku 41 zależność pomiędzy zmianą w czasie biomasy drobnoustrojów i aktualną wartością C_{mic}/C_{org} wskazuje na zasadnicze różnice występujące pomiędzy poszczególnymi glebami. Na wykresach zgrupowano dane dotyczące przyrostów biomasy pomiędzy wartością wyjściową (określoną w dniu zerowym doświadczenia), a 1, 12 i 29 dniem inkubacji, wobec wskaźnika C_{mic}/C_{org} , obliczonego odpowiednio dla tych danych. Wszystkie ujemne wartości ΔC_{mic} (obniżenie C_{mic} w stosunku do wartości wyjściowej) dotyczą próbek o wilgotności kontrolnej (wariant K) po pierwszym dniu inkubacji. Drobnoustroje rozwijające się w próbkach zalanych wodą lub ściekami nie wymagały takiego okresu adaptacji (patrz rys.33).

Relacje widoczne na rysunku 41 potwierdzają przypuszczenia dotyczące przyczyn różnic obserwowanych pomiędzy poszczególnymi glebami. W glebie porośniętej topolą (nr 1) dehydrogenazy były bardziej aktywne w próbkach pobieranych z poletka kontrolnego (nr 1A), zaś w glebie porośniętej wierzbą (nr 2) – z poletka nawadnianego ściekami (nr 2C). Jak wynika z danych przedstawionych na rysunku 41, w tych bardziej aktywnych glebach substrat organiczny był łatwiej dostępny dla drobnoustrojów, za czym przemawiają wyższe wartości indeksu C_{mic}/C_{org} .

Wartości C_{mic}/C_{org} były wyższe w glebie porośniętej trawami (nr 6, średnia C_{mic}/C_{org} 1,77%), niż w glebach torfowo-murszowych (porośniętej topolą nr 1 i wierzbą nr 2). Obraz przedstawiony na rysunku 41 (dolny wykres) może sugerować, że w przypadku gleby porośniętej trawami (nr 6) zdolność drobnoustrojów do wykorzystania węgla organicznego gleby do wbudowania go w biomasę została w mniejszym stopniu zmieniona, niż w glebach torfowo-murszowych.



Rys. 41. Zmiana biomasy (ΔC_{mic}) w funkcji wskaźnika dostępności węgla (C_{mic}/C_{org}) w glebach organicznych różnie nawadnianych (A i C). Wyniki średnie z 1, 12 i 29 dnia inkubacji bez glukozy
Fig. 41. The change in biomass (ΔC_{mic}) versus index of C availability (C_{mic} -to- C_{org} ratio) in organic soils under different irrigation system (A or C). Results after 1st, 12th, and 29th days of incubations without glucose

Należy jednak zauważyć, że w glebie tej zmiany obserwowane w warunkach doświadczenia polowego były bliższe zmianom widocznym w glebie porośniętej topolą (nr 1, obniżenie aktywności dehydrogenaz w glebie nawadnianej ściekami), zaś w warunkach laboratoryjnych – bliższe zmianom obserwowanym w glebie porośniętej wierzbą (nr 2, podwyższenie aktywności dehydrogenaz w glebie nawadnianej ściekami). Trzyletni okres trwający po zaprzestaniu nawodnień przyczynił się więc do korzystnych zmian układu glebowego i podwyższenia aktywności biologicznej. Efekt ten widoczny był w doświadczeniu z monolitami (patrz tab. 8 i tab. 9) i w doświadczeniu na próbkach glebowych (patrz rys. 20 i rys. 33). Przekształcenia siedliska drobnoustrojów wynikające z zaprzestania zalewów mogły być więc w glebie mineralno-murszowej (nr 6) bardziej dynamiczne, niż w glebach torfowo-murszowych (nr 1 i nr 2), powodując szybszy „powrót” gleby porośniętej trawami (nr 6C) do sytuacji charakteryzującej glebę kontrolną (nr 6A).

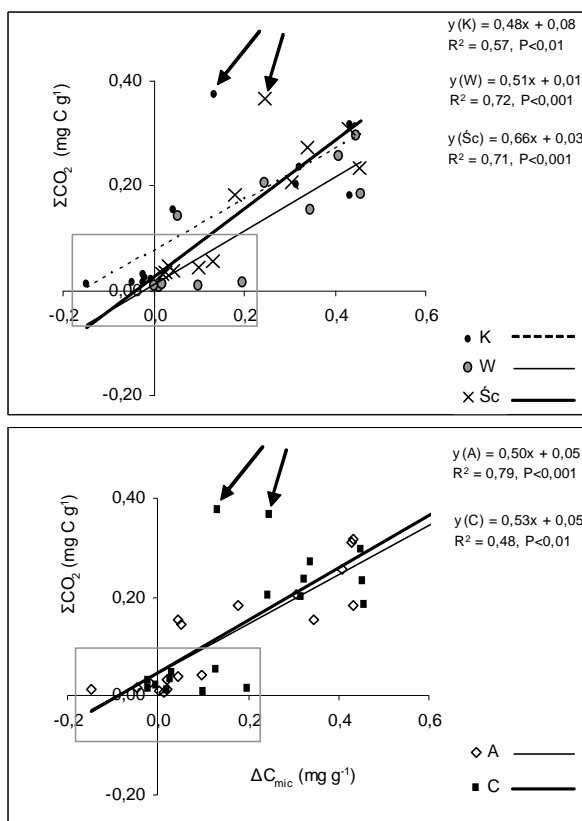
4.3.4.3. Relacje pomiędzy C_{mic} i wydzielaniem CO_2

Namnażanie drobnoustrojów w glebie wiąże się z wydatkiem energii. Komórki heterotroficzne uzyskują energię utleniając związki organiczne – ilość wydzielonego CO_2 jest ogólnie przyjętą miarą natężenia procesów respiracyjnych (wyższa respiracja to informacja o wyższej aktywności biologicznej gleby). Z drugiej strony, coraz częściej rozważane jest zagadnienie kosztów, jakie muszą ponieść komórki drobnoustrojów dla utrzymania i rozwoju populacji.

Rysunek 42 przedstawia wydzielanie CO_2 (ilość kumulatywną, ΣCO_2) w relacji do obserwowanej zmiany biomasy po 1 dniu i po 12 dniach inkubacji bez dodatku glukozy.

Niskie wartości z początkowego okresu inkubacji (po 1 dniu) zostały otoczone ramką, a punkty poza ramką dotyczą 12 dnia inkubacji. Te same dane przedstawiono w układach pozwalających na porównanie relacji w różnych warunkach inkubacji (górny wykres) i przy różnym sposobie użytkowania – nawadniania gleby (dolny wykres). W przybliżeniu można przyjąć, że wykresy przedstawiają koszt (określony przez kumulację CO_2) przyrostu biomasy, jaki poniosły rozwijające się drobnoustroje po 1 dniu i po 12 dniach inkubacji.

Przyjmując, że ilość wydzielonego CO_2 dostarcza informacji o wydatku poniesionym na rozwój populacji (tutaj w czasie 1 dnia i 12 dni inkubacji) należy zauważyć, że próbki zalane ściekami wymagały większego udziału procesów oddechowych niż próbki zalane czystą wodą (górny rysunek). Prawdopodobne jest również, że zwiększona ilość wydzielonego CO_2 wynikała z rozwoju młodych populacji wskutek dostarczenia wraz ze ściekami składników pokarmowych. Biomasa mikroorganizmów gleby porośniętej wierzbą (nr 2) była istotnie wyższa w wariancie gleby zalanej ściekami (wariant Śc) niż wodą (wariant W), (patrz rys. 33).



Rys. 42. Wydzielanie CO₂ (ΣCO_2) po 1 i 12 dniach inkubacji bez glukozy, potrzebna do zmiany biomasy (ΔC_{mic}). Wpływ sposobu nawadniania trzech gleb organicznych (A i C, górny wykres) oraz aktualnych warunków inkubacji (K, W, Śc, dolny wykres). W ramkach – dane po 1 dniu inkubacji.

Fig. 42. Emission of CO₂ (ΣCO_2) after 1 and 12 days of incubation without glucose versus change in soil biomass (ΔC_{mic}). Effect of irrigation system (A and C, upper graph) and the actual incubation conditions (K, W, Śc, lower graph). In the boxes – 1st day of incubation

Przebieg prostych wyznaczonych dla gleb pobranych z poletek A i C (dolny wykres) był zbliżony, choć można by przypuszczać, że po przedłużeniu inkubacji ujawni się wyższe zapotrzebowanie gleby C na procesy oddechowe (konieczne dla utrzymania przyrostu biomasy, a wyrażone kumulacją CO₂). Punkty zaznaczone strzałkami na rysunku 42 wskazujące na wysoką ilość nagromadzonego CO₂ przy niskim namnożeniu drobnoustrojów, dotyczą gleby porośniętej topolą (nr 1C), w której C_{org} był słabiej dostępny.

4.3.4.4. Wartości współczynnika metabolicznego qCO_2

Przedstawione na rysunku 42 dane dotyczyły ilości CO_2 towarzyszącej wzrostowi biomasy w czasie 1 dnia i 12 dni. Nieco inny wymiar ma wskaźnik qCO_2 – współczynnik metaboliczny – traktowany jako miara kosztów utrzymania i rozwoju drobnoustrojów w glebie [8]. Współczynnik qCO_2 wyznaczany jest jako stosunek ilości CO_2 wydzielonego w jednostce czasu (zazwyczaj w ciągu godziny, $\mu g C-CO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$) do aktualnej zawartości biomasy ($mg C_{mic} \cdot g^{-1}$) i wyrażany w jednostkach $\mu g C-CO_2 \cdot (mg C_{mic})^{-1} \cdot h^{-1}$, lub $mg C-CO_2 \cdot (g C_{mic})^{-1} \cdot h^{-1}$. Wartości qCO_2 zwykle występują w zakresie od 0,3 do 2,7 [129,238].

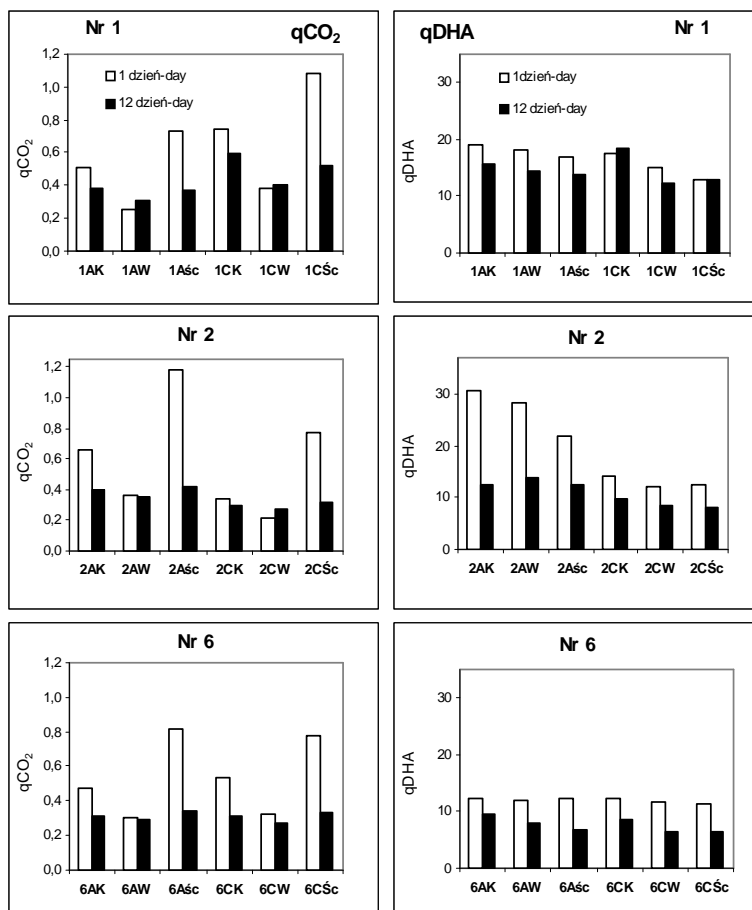
W natlenionych warstwach profili gleb torfowych (przy większej dostępności substratu i wydajności metabolizmu tlenowego) obserwowano niższe wartości qCO_2 , niż w beztlenowych i mniej aktywnych warstwach głębszych. Notowano też obniżanie wartości tego współczynnika wraz ze wzrostem jakości substratu [21,33]. Według Anderson [8] wartość $qCO_2 > 2$ dla gleby o odczynie obojętnym należy traktować jako wartość krytyczną.

Porównanie wartości qCO_2 wyznaczonych dla poszczególnych wariantów doświadczenia ilustruje rysunek 43. W początkowym okresie inkubacji (1 dzień) wyraźnie wyższe qCO_2 stwierdzono dla próbek 1CŚc i 2AŚc (czyli tych, które wykazywały niższe aktywności DHA w doświadczeniu połowym), jednak w żadnym okresie nie przekroczyły wspomnianej wielkości krytycznej. Po 12 dniach wartości uległy znacznemu obniżeniu wskazując na stabilizację układu wraz z upływem czasu inkubacji. Zjawisko takie obserwowali również inni autorzy [6,55,174,239].

Porównując średnie wartości qCO_2 dla próbek gleb porośniętych topolą, wierzbą i trawami różnie nawadnianych obserwowano oczekiwaną tendencję $1A < 1C$; $2A > 2C$; $6A \sim 6C$ (rys. 44, górny wykres), odwrotną niż opisywaną wcześniej dla aktywności dehydrogenaz i biomasy.

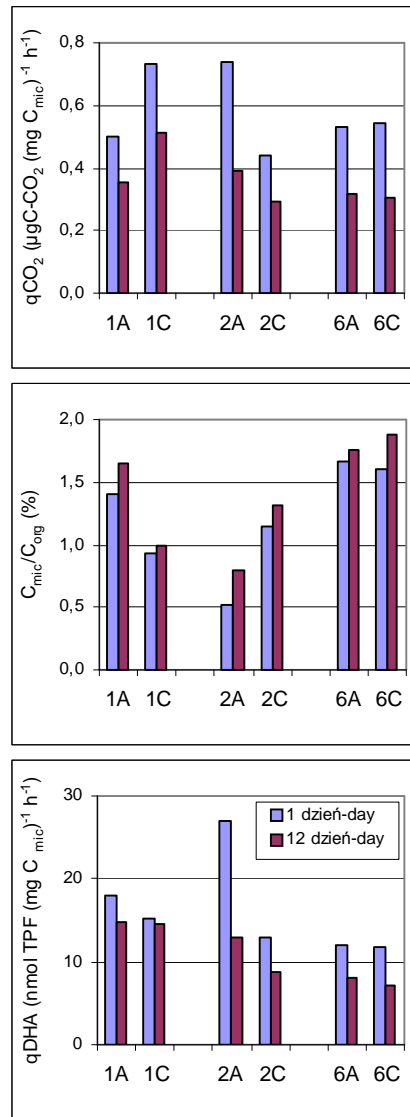
Współczynnik metaboliczny qCO_2 określany jako specyficzna aktywność metaboliczna czy specyficzna respiracja biomasy jest coraz częściej stosowanym tzw. wskaźnikiem eko-fizjologicznym. Podwyższenie qCO_2 informuje o możliwych zakłóceniach i stresie działającym w danym układzie, ponieważ wskazuje na zmniejszenie wydajności funkcjonalnej, tzn. niższej aktywności przy większym zużyciu energii [8,239]. Renella i in. [234] oraz Fließbach i in. [87] obserwowali w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi i związkami organicznymi – np. 2,4,6-trójnitro-toluenem wzrost wartości qCO_2 nawet powyżej 5. Ze względu na rzeczywiste powiązanie oddychania komórek z przemianami energetycznymi [290] często zakłada się, że wskaźnik qCO_2 odzwierciedla zapotrzebowanie energetyczne na przetrwanie populacji (*maintenance*). Natomiast omawiany poprzednio wskaźnik C_{mic}/C_{org} informuje o ilości węgla dostępnego dla wzrostu populacji (*growth*) [6]. Wykazano, że drobnoustroje gleby znajdującej się

w uprawie rotacyjnej są bardziej wydajne energetycznie (wykazują niższe qCO_2 i wyższy ułamek C_{mic}/C_{org}) niż te, które bytują w glebie znajdującej się długotrwałe w monokulturze [21,239].



Rys. 43. Wartości współczynników qCO_2 [$\mu g C-CO_2 \cdot (mg C_{mic})^{-1} \cdot h^{-1}$] i $qDHA$ [$nmol TPF \cdot (mg C_{mic})^{-1} \cdot h^{-1}$] po 1 i 12 dniach inkubacji próbek glebowych bez glukozy

Fig. 43. Metabolic quotient (qCO_2 [$\mu g C-CO_2 (mg C_{mic})^{-1} h^{-1}$]) and biomass specific activity $qDHA$ [$nmol TPF (mg C_{mic})^{-1} h^{-1}$] after 1 and 12 days of incubation of soil samples without glucose



Rys. 44. Współczynnik metaboliczny qCO_2 , wskaźnik aktywności specyficznej $qDHA$ i wskaźnik dostępności węgla C_{mic}/C_{org} (odpowiednio górny, środkowy i dolny wykres) – wartości wyznaczone dla gleb różnie nawadnianych (A i C) po 1 i 12 dniach inkubacji bez glukozy

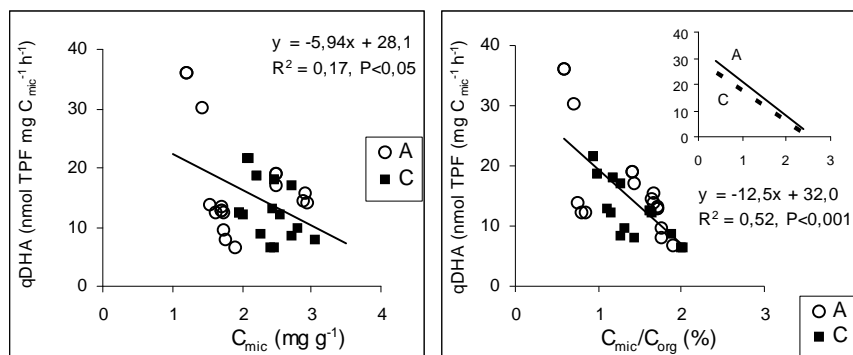
Fig. 44. The metabolic quotient qCO_2 , biomass specific activity $qDHA$ and C_{mic} -to- C_{org} ratio in soils under different irrigation system (A or C) after 1 and 12 days of incubation without glucose

Gleba porośnięta topolą (nr 1) wykazywała wyższe wartości qCO_2 w wariacie nawadnianym ściekami (nr 1C), niż kontrolnym (nr 1A), co wskazuje na trudniejsze warunki siedliskowe dla drobnoustrojów w glebie zalewanej. Natomiast gleba porośnięta wierzwą nawadniana ściekami (nr 2C) wykazywała niższe wartości współczynnika qCO_2 , niż gleba kontrolna (nr 2A), co przemawia za poprawą warunków bytowania drobnoustrojów wskutek zalewów ściekami (rys. 44, górny wykres). Tendencję odwrotną wykazywał wskaźnik C_{mic}/C_{org} . W przypadku pola z udziałem topoli wskaźnik ten przyjmował wyższe wartości w glebie kontrolnej, niż nawadnianej ściekami ($1A > 1C$), lecz w glebie z udziałem wierzby niższe wartości w glebie kontrolnej, niż nawadnianej ściekami ($2A < 2C$), (rys. 44, środkowy wykres). Zatem w glebie porośniętej topolą (nr 1) w wyniku nawodnień nastąpiło obniżenie dostępności substratu w porównaniu do kontroli, zaś w glebie porośniętej wierzwą (nr 2) dostępność substratu zwiększyła się. Jednocześnie wyraźny jest silny wpływ uprawy. Gleby torfowo-murszowe kontrolne (porośnięta topolą nr 1A i porośnięta wierzwą nr 2A) nawadniane tylko opadami atmosferycznymi wykazywały duże różnice nie tylko w wartościach qCO_2 i C_{mic}/C_{org} , ale też w wartościach innych wskaźników biologicznych. Badania prowadzone przez innych autorów również wskazują na to, że wpływ rośliny porastającej glebę nie dotyczy jedynie strefy korzeniowej oraz obejmuje m.in. skład kwasów huminowych i fulwowych, frakcje C_{org} , pH, aktywność biologiczną i inne właściwości [148,289].

4.3.4.5. Wartości specyficznej aktywności biomasy drobnoustrojów qDHA

Analogicznie do qCO_2 , wyznaczono wskaźnik qDHA (*biomass specific activity*) [59]. Podobnie do współczynnika metabolicznego, wartości qDHA malały w czasie inkubacji (rys. 43). Różnica pomiędzy wartościami wskaźnika w materiale kontrolnym (A) i nawadnianym ściekami (C) była najbardziej wyraźna w glebie pod uprawą wierzby (nr 2). Wartość qDHA była znacznie wyższa w porośniętej wierzwą glebie kontrolnej (nr 2A), niż nawadnianej ściekami (nr 2C), szczególnie w początkowej fazie inkubacji (rys. 44 dolny wykres).

Zakładając, że aktywność dehydrogenaz odzwierciedla nasilenie katabolizmu, można wnioskować, że w stałych warunkach inkubacji natężenie wewnątrzkomórkowych procesów związanych z wytwarzaniem energii, a potrzebnych do utrzymania jednostki biomasy ulegało obniżeniu w czasie. Konsekwentnie, wartości qDHA malały przy zwiększaniu biomasy oraz stosunku C_{mic}/C_{org} (rys. 45). Dla drugiej zależności relacja pozostawała istotna i zbliżona dla obydwu kombinacji (kontrolnej A i nawadnianej ściekami C, $P < 0,001$), zwłaszcza w zakresie wysokich ilości substratu organicznego dostępnego dla mikroorganizmów (C_{mic}/C_{org} bliskie 2%).



Rys. 45. Aktywność specyficzna qDHA w funkcji biomasy C_{mic} (lewy wykres) i wskaźnika C_{mic}/C_{org} (prawy wykres). Wartości średnie wyjściowe i po 12 dniach inkubacji bez glukozy, wyznaczone dla gleb różnie nawadnianych (A i C); równania dla wszystkich danych

Fig. 45. The biomass specific activity qDHA versus soil biomass C_{mic} (left) and C_{mic}/C_{org} ratio (right graph). Averages for soils under different irrigation system (A or C) – initial values and after 12-day incubation without glucose; equations for all experimental data

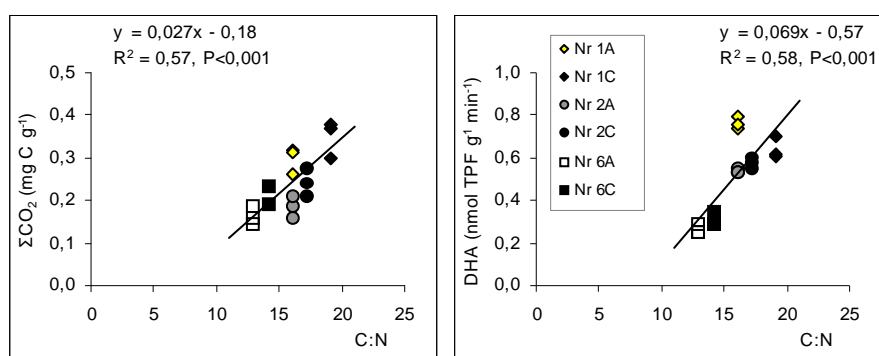
Wyniki te zdają się potwierdzać przypuszczenia, że zmiany obserwowane w glebach nawadnianych ściekami wynikają z procesów związanych z dostępnością substratu, a nie z efektów niekorzystnych, hamujących w sposób bezpośredni aktywność biologiczną nawadnianych gleb.

4.3.4.6. Wartości wskaźnika C:N

Prowadząc badania na przestrzeni 34 lat, Mercik i in. [199] wykazali, że w glebach nawożonych N mineralnym i organicznym wzrasta ilość C_{org} , a jednocześnie nie zmienia się znacząco stosunek C:N, czyli podobne jest tempo mineralizacji organicznych związków N i C. Nawadnianie ściekami może być traktowane jako specyficzny sposób nawożenia ze względu na zawartość biogenów. W omawianych glebach, przy zabiegach stosowanych relatywnie krótko (4 lata), zmiana stosunku C:N silnie zależała od uprawianej rośliny (patrz tab. 2). Najniższe wartości C:N wykazywała gleba mineralno-murszowa porośnięta trawami (nr 6, 12,9 i 14,3, odpowiednio w kontroli nr 6A i glebie zalewanej ściekami nr 6C). Kontrolne gleby torfowo-murszowe charakteryzował podobny stosunek C:N, wynoszący 16,0 i 16,2 odpowiednio pod uprawą topoli (nr 1A) i wierzby (nr 2A). Pod wpływem nawodnień ściekami, wartość wskaźnika uległa silnemu podwyższeniu w glebie porośniętej topolą (nr 1C, do 19,0) oraz relatywnie niewielkiemu podwyższeniu w glebie porośniętej wierzbą (nr 2C, do 17,1). Warto zaznaczyć, że właśnie w glebie porośniętej wierzbą (nr 2), gdzie różnica C:N pomiędzy wariantem kontrolnym (A) i nawadnianym ściekami (C) była niewiel-

ka, zabiegi wpłynęły szczególnie korzystnie na zawartość biomasy drobnoustrojów i aktywność dehydrogenaz, wskazując na intensywny przebieg procesów biochemicznych. Natomiast w glebie torfowo-murszowej obsadzonej topolą, nawadnianie ściekami wywołało znaczne podwyższenie wskaźnika C:N, lecz istotne obniżenie biomasy drobnoustrojów i aktywności dehydrogenaz.

Zależność pomiędzy ilością CO₂ wydzielonego w czasie inkubacji i aktywnością dehydrogenaz a wartościami wskaźnika C:N w glebach kontrolnych i nawadnianych ściekami przedstawia rysunek 46. Wraz ze wzrostem wartości stosunku C:N



Rys. 46. Wydzielanie CO₂ (kumulacja w czasie 12-dniowej inkubacji bez glukozy, lewy wykres) oraz aktywność dehydrogenaz (średnie z 12-dniowej inkubacji, prawy wykres) w funkcji wskaźnika C:N (proste wyznaczone dla wszystkich wariantów badanych gleb)

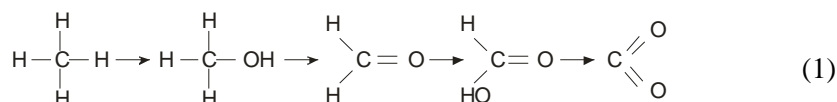
Fig. 46. The CO₂ emission (cumulation during 12-day incubation without glucose, left) and the dehydrogenase activity (mean values for 12-day incubation, right graph) versus C:N ratio (linear functions for all variants of tested soils)

rosła respiracja (we wszystkich glebach wyższa w kombinacjach nawadnianych ściekami) oraz aktywność dehydrogenaz (wyższa w kombinacjach nawadnianych ściekami z wyjątkiem gleby porośniętej topolą nr 1C), $P < 0,001$.

4.3.5. Aktywność metanotroficzna

W ekosystemie gleby występują strefy tlenowe i beztlenowe. Bakterie metanogenne aktywne są w głębszych, beztlenowych warstwach gleby, podczas gdy tlenowe bakterie metanotroficzne często okupują granice tych stref. Miejsca niedotlenienia występują też wewnątrz agregatów glebowych, nawet w materiale wierzchnich warstw. Badania wykazują, że 20-90% produkowanego metanu jest utleniane w glebie zanim osiągnie on atmosferę [130]. Możliwość utlenienia w wierzchnich warstwach metanu produkowanego na podmokłych torfowiskach ma więc duże znaczenie dla ograniczenia emisji CH₄ do atmosfery [121].

Aktywność metanotroficzna gleby wynika z naturalnej zdolności drobnoustrojów do wykorzystywania CH_4 , jako źródła węgla i energii. Proces obejmuje cztery główne etapy katalizowane kolejno przez monooksygenazę metanową, dehydrogenazę metanolową, dehydrogenazę formaldehydową i dehydrogenazę mrówczanową [204]:



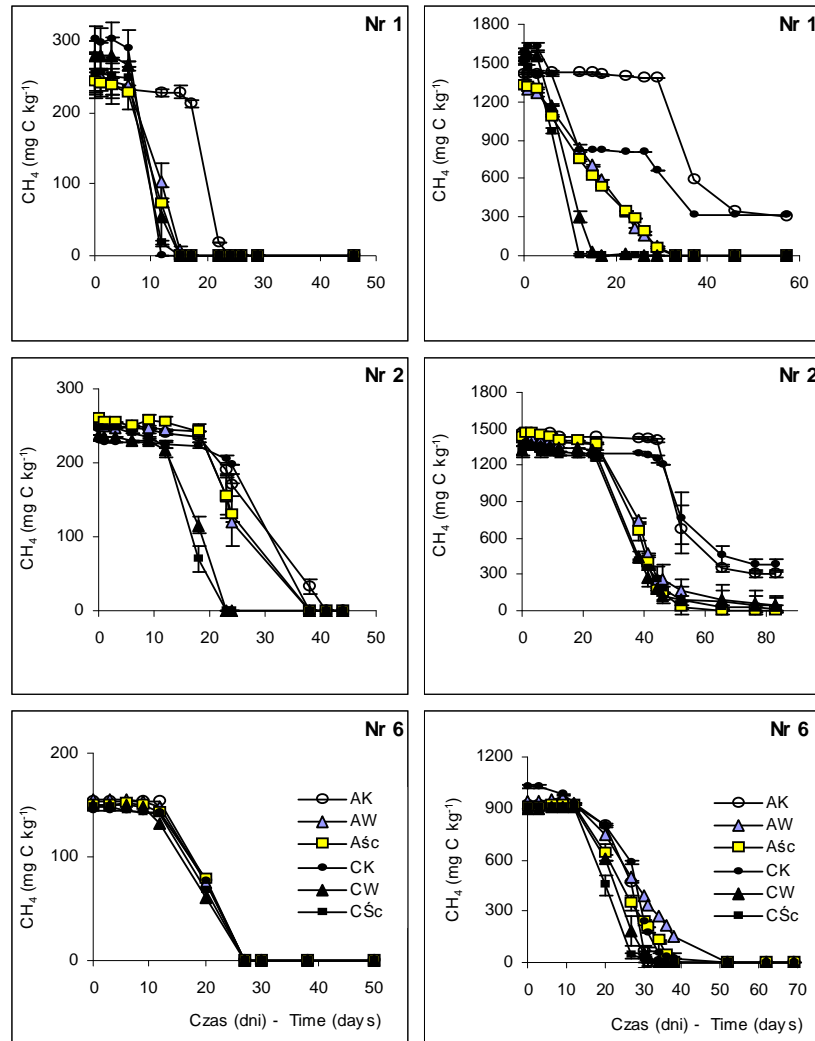
W glebie wyróżnia się dwa typy bakterii metanotroficznych. Populacje wykazujące wysokie powinowactwo do substratu posiadają zdolność do utleniania niewielkich ilości $\text{CH}_4 < 12$ ppm (nawet przy stężeniu bliskim atmosferycznemu). Szacuje się, że te drobnoustroje odpowiedzialne są za utlenienie ok. 10% CH_4 . Populacje metanotrofów obligatoryjnych natomiast wykazują relatywnie niskie powinowactwo do substratu wymagając wyższego stężenia dla zainicjowania procesu. Obecne są one w środowiskach bliskich drobnoustrojom metanogennym [23,172,272].

Kontynuując badania mające na celu określenie wpływu ścieków na procesy biologiczne, uwzględniono oznaczenia pozwalające na określenie ewentualnych zmian aktywności metanotroficznej badanych gleb. Przygotowano dwie serie próbek w zakresie CH_4 dostępnym dla metanotrofów obligatoryjnych, o wyjściowym stężeniu ok. 1,5% i 10% (v/v). Przebieg procesu utleniania metanu w poszczególnych wariantach ilustruje rysunek 47. Utlenianie zachodziło szybciej w glebach poprzednio nawadnianych ściekami (C), wskazując na adaptację metanotrofów do okresowej migracji CH_4 formowanego w niższych partiach profili.

Metan dodany w mniejszej ilości został utleniony całkowicie we wszystkich przypadkach, najszybciej w glebie porośniętej topolą (nr 1). Początkowe opóźnienie procesu prawdopodobnie wynikało z konieczności namnożenia metanotrofów, osłabionych w okresie poprzedzającym kontakt z CH_4 i/lub obecności związków azotu, zwłaszcza NH_4^+ , hamującego proces drogą inhibicji kompetycyjnej [35,115,127]. Najmniejsze różnice w intensywności wykorzystania CH_4 pomiędzy wariantami doświadczalnymi stwierdzono w glebie porośniętej trawami (nr 6). Przy wyższym dodatku metanu w niektórych przypadkach utlenienie CH_4 pozostało niepełne. Przedłużenie inkubacji spowodowało wykorzystanie O_2 do utlenienia CH_4 oraz do innych szlaków oddechowych, prawdopodobnie utrudniając dalszy proces. W próbkach gleby porośniętej topolą (nr 1) i wierzbą (nr 2) przy uwilgotnieniu kontrolnym po 45 dniach pozostało tylko 1,9-2,9% O_2 v/v, a w kombinacjach zalanych nawet poniżej 1,7% v/v.

Zjawisko utleniania CH_4 znane jest przede wszystkim jako proces tlenowy. W warunkach beztlenowych zachodzi m.in. w morskich osadach dennych i glebach wysoce zasiarczonych [58,65,189]. Zahamowanie utleniania CH_4 w późniejszych etapach inkubacji gleb wynikało prawdopodobnie z niedoboru tlenu. Bra-

kiem O_2 nie można natomiast wyjaśnić wyraźnego opóźnienia rozpoczęcia procesu w niektórych próbkach o kontrolnym uwilgotnieniu.

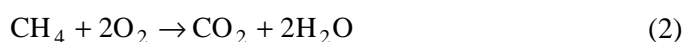


Rys. 47. Przebieg procesu utleniania metanu w próbkach reprezentujących zastosowane warianty doświadczalne badanych gleb. Wyjściowe stężenie dodanego CH_4 : ok. 1,5% (v/v) – lewa strona, oraz 10% (v/v) – prawa strona. Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 47. Methane oxidation in soil samples representing experimental variants of tested soils. The initial CH_4 concentration in soil headspace: about 1.5% (v/v) – left and 10% (v/v) – right graphs. Explanation as in Fig. 20

Utrudniona dyfuzja gazów wskutek zalania gleby była mniejszą barierą dla przebiegu utleniania CH_4 niż pewne ograniczenia procesu w próbkach zawierających pory wypełnione powietrzem (ok. 60% WHC). Niektóre badania wskazują na duże znaczenie uwilgotnienia gleby – mimo tlenowego charakteru procesu (wbudowanie tlenu przez monooksygenazę metanową), dla różnych gleb mineralnych i organicznych obserwowano wyraźne maksima aktywności przy wilgotności od 20% nawet do 90% WHC [32,130,196].

Proces utlenienia metanu opisywany jest prostym równaniem:



Zgodnie z nim stosunek molowy $\text{CH}_4:\text{O}_2:\text{CO}_2$ wynosi 1:2:1. W rzeczywistości układ taki jest jednak rzadko obserwowany głównie dlatego, że produkty pośrednie szlaku ulegają asymilacji przez drobnoustroje [168]. Dostępne w literaturze informacje wskazują na dosyć duże zróżnicowanie ilości moli pobranego O_2 i wydzielonego CO_2 , przypadających na mol utlenionego CH_4 . W różnych glebach relacja $\text{CH}_4:\text{O}_2:\text{CO}_2$ mieści się w zakresach 1:(0,2-1,8):(0,2-0,9) [50,123,272,302].

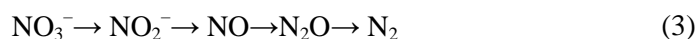
W omawianym doświadczeniu nie zaobserwowano jednoznacznej zmiany stosunku molowego wymienianych gazów spowodowanej warunkami inkubacji. Porównując ilość tlenu wykorzystanego w glebie porośniętej trawami (nr 6, gdzie obserwowano całkowite utlenienie przy obydwu dawkach CH_4) można przyjąć, że przebieg procesu był korzystniejszy przy wyższych stężeniach utlenianego metanu. Utlenienie przebiegało wówczas w stosunku molowym $\text{CH}_4:\text{O}_2:\text{CO}_2$ jak 1:(0,72-1,28):(0,03-0,63). Przy niższym dodatku metanu, na 1 mol utlenionego CH_4 , pobranie O_2 i wydzielanie CO_2 mieściło się w zakresach jak 1:(0,94-1,62):(0,58-1,06).

4.3.6. Emisja i sorpcja N_2O

Podtlenek azotu (tlenek azotu(I), N_2O) powstaje w wyniku mikrobiologicznych przekształceń związków azotu, głównie denitryfikacji i nitryfikacji. Formowany z działem heterotroficznych denitryfikatorów, N_2O jest produktem pośrednim w szlaku oddychania azotanowego, związanego z wydzielaniem energii podczas redukcji NO_3^- przy obniżonej dostępności O_2 . N_2O wydzielany jest też przez autotroficzne nitryfikatory jako produkt uboczny utleniania NH_4^+ . Innymi procesami związanymi z wydzielaniem N_2O są nitryfikacja heterotroficzna (przeprowadzana głównie przez grzyby przy niskim pH), biologiczne wiązanie N_2 i chemodenitryfikacja [16,140,194,197,305,308].

Heterotroficzna denitryfikacja jest procesem silnie zależnym od dostępu substratu organicznego, warunków oksydoredukcyjnych, odczynu, stężenia azotanów(V) i obecności bakterii denitryfikacyjnych [15,16,72,90,126,197,249,300,301]. Obej-

muje ona kilka etapów, katalizowanych przez odpowiednie reduktazy i jest przeprowadzana przez różne gatunki bakterii, głównie beztlenowce fakultatywne:



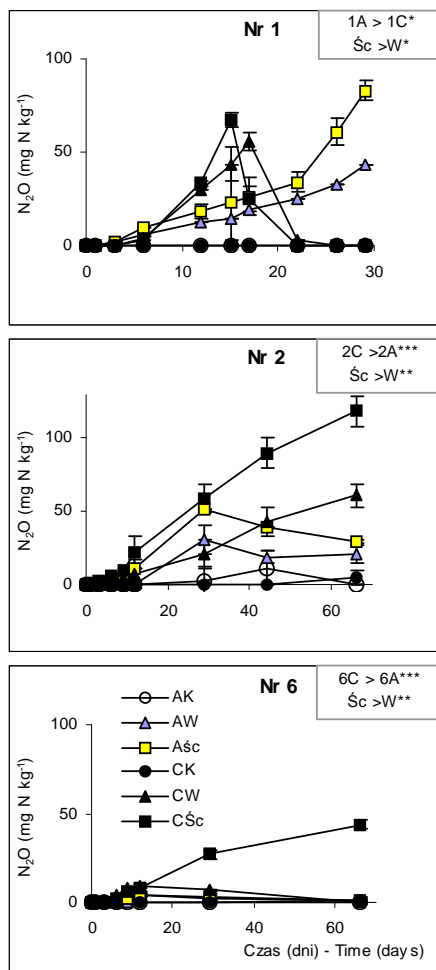
Przy niskich stężeniach tlenu stosunek $\text{N}_2/\text{N}_2\text{O}$ wzrasta, ponieważ O_2 najsilniej hamuje aktywność reduktazy N_2O . W obecności wyższych stężeń tlenu fakultatywne denitryfikatory wykorzystują korzystniejszy energetycznie tlen i denitryfikacja ustaje. Niektóre drobnoustroje mogą prawdopodobnie jednocześnie wykorzystywać tlen, azotany(V) i azotany(III), biorąc udział w tzw. „denitryfikacji tlenowej” nawet przy stosunkowo wysokiej zawartości tlenu [73,297].

Biorąc pod uwagę znaczną obecność azotanów w ściekach stosowanych do nawodnień, możliwość eliminacji ich nadmiaru przed przesiąknięciem do wód gruntowych jest bardzo istotna [19,152,268]. W warunkach siedliska naturalnego badane gleby organiczne nawadniane ściekami emitowały podtlenek azotu, osiągając maksymalną emisję ok. $60 \text{ mg N-N}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ [212]. Stężenie N_2O w powietrzu glebowym wzrastało wraz z głębokością profilu, dochodząc po nawodnieniu podwójną dawką ścieków do 208 ppm na głębokości 70 cm. Stężenie N_2O w poletkach kontrolnych nawadnianych tylko opadami atmosferycznymi na głębokości 10 cm nie przekraczało 0,5 ppm, a na poletkach zalewanych podwójną dawką ścieków dochodziło od 17,5 do 196 ppm [269].

W warunkach omawianego doświadczenia modelowego, w trakcie inkubacji bez acetyleny (będącego inhibitorem ostatniego etapu denitryfikacji, czyli redukcji N_2O do N_2), niewielkie ilości N_2O , rzędu $5\text{-}10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, zarejestrowano dopiero po 40 dniach w glebie porośniętej wierzbą, i to tylko w wariantcie zalewanym ściekami (nr 2C, dane nie zostały przedstawione graficznie). Natomiast w czasie inkubacji z 2% (v/v) acetylenem, N_2O pojawiał się we wszystkich wariantach próbek zalanych (wodą i ściekami), a w glebie porośniętej wierzbą (nr 2) – niewielkie ilości również przy kontrolnym uwilgotnieniu próbek, po 60 dniach inkubacji (rys. 48). Zatem bez wprowadzenia acetyleny powstający N_2O był redukowany bezpośrednio do N_2 , co jest bardzo korzystne ze względów środowiskowych szczególnie w glebach nawadnianych ściekami.

Wyższe ilości N_2O emitowane były w obecności ścieków, niż wody destylowanej ($\text{Śc} > \text{W}$). Bieżące warunki inkubacji oraz poprzednie użytkowanie gleby miały istotne znaczenie dla tworzenia N_2O . Obserwowano również różnicę pomiędzy testowanymi glebami. W porośniętej topolą glebie kontrolnej (nr 1A), która przejawiała wyższą aktywność dehydrogenaz (aktywność biochemiczną silnie związaną z denitryfikacją [301,305]), jak również wyższą biomasę drobnoustrojów i wskaźnik $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$, niż w glebie poprzednio nawadnianej ściekami, również emisja N_2O osiągała wyższe wartości ($1\text{A} > 1\text{C}$, $P < 0,05$). Ilość N_2O początkowo wzrastała

w podobny sposób w wariantach z wodą i ściekami, osiągając po 29 dniach w obecności ścieków wartość $83 \text{ mg N-N}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$. W glebie porośniętej topolą poprzednio systematycznie zalewanej ściekami (nr 1C), największe ilości N_2O stwierdzono w 15 i 17 dniu inkubacji ($< 70 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).



Rys. 48. Emisja i sorpcja N_2O – krzywe kumulatywne. Inkubacja w obecności C_2H_2 (2% v/v), bez dodatku glukozy. Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 48. N_2O emission and sorption – cumulative curves. Incubation with C_2H_2 (2% v/v), without glucose. Explanation as in Fig. 20

W czasie inkubacji obserwowano zanikanie acetyleny, pełniącego prawdopodobnie rolę źródła węgla i energii drobnoustrojów. W glebie porośniętej topolą i nawadnianej ściekami (nr 1C), C_2H_2 był uzupełniany w naczyniach począwszy od 12 dnia inkubacji aż do jej zakończenia. Natomiast w kontrolnych próbkach gleby porośniętej topolą (nr 1A) konieczność ponownego wprowadzenia C_2H_2 wystąpiła później, dopiero 26 dnia inkubacji. Sorpcja biologiczna C_2H_2 notowana też była przez innych autorów w glebie leśnej (C_{org} 11%) [141]. Wyniki prezentowane na rysunku 48 (górny wykres) przemawiają za tym, że w porośniętej topolą glebie kontrolnej (nr 1A) proces denitryfikacji postępował przez 3 tygodnie kosztem substratu organicznego obecnego w glebie, a acetylen zaczął pełnić rolę źródła elektronów do tworzenia N_2O dopiero po odpowiednim namnożeniu denitryfikatorów i wystąpieniu deficytu substratów węglowych łatwiej dostępnych.

Wielkość emisji N_2O w pozostałych glebach (porośniętej wierzby nr 2 i trawami nr 6) zdaje się potwierdzać przypuszczenie większej dostępności węgla w materiale gleb systematycznie nawadnianych ściekami (C). W porośniętej wierzby glebie kontrolnej (nr 2A) najwyższe stężenie podtlenku azotu stwierdzono 29 dnia inkubacji i następnie jego zanikanie, zaś w glebie porośniętej wierzby, lecz zalewanej ściekami (nr 2C) denitryfikacja była kontynuowana do 66 dnia. Przy takiej samej ilości dostarczonych azotanów(V) wraz ze ściekami, fakt ten może wskazywać na większą dostępność substratu węglowego dla denitryfikacji w porośniętej wierzby glebie zalewanej ściekami (nr 2C).

W glebach porośniętych wierzby (nr 2) i trawami (nr 6) ilość wytworzonego N_2O była istotnie wyższa w próbkach pobranych z pól nawadnianych ściekami ($C > A$, $P < 0,001$). Zwraca uwagę znacznie niższa aktywność denitryfikacyjna gleby porośniętej trawami (nr 6). Odnosząc maksymalną ilość azotu przekształconego w N_2O ($N-N_2O$) do wyjściowej zawartości azotanów(V) ($N-NO_3^-$) można zauważyć, że gleby zalewane ściekami pod uprawą wierzby (nr 2C) i traw (nr 6C) wykorzystały azotany odpowiednio w 53% i 36%, czyli w nieco wyższym stopniu niż gleby kontrolne pod uprawą wierzby (nr 2A) i traw (nr 6A), odpowiednio 49% i 30%. Odwrotna sytuacja wystąpiła w glebie porośniętej topolą (nr 1), gdzie większa część azotanów uległa redukcji do N_2O w materiale kontrolnym (nr 1A), niż zalewanym ściekami (nr 1C), odpowiednio 96% i 87%. Wyczerpania te dotyczą próbek inkubowanych w zawiesinie z wodą destylowaną, informują więc o denitryfikacji opartej na redukcji natywnych azotanów oraz inkubacji w obecności inhibitora reduktazy N_2O .

Zmiany aktywności denitryfikacyjnej w obecności glukozy dyskutowane będą w rozdziale 4.3.10.1.

4.3.7. Potencjał redoks i odczyn gleby

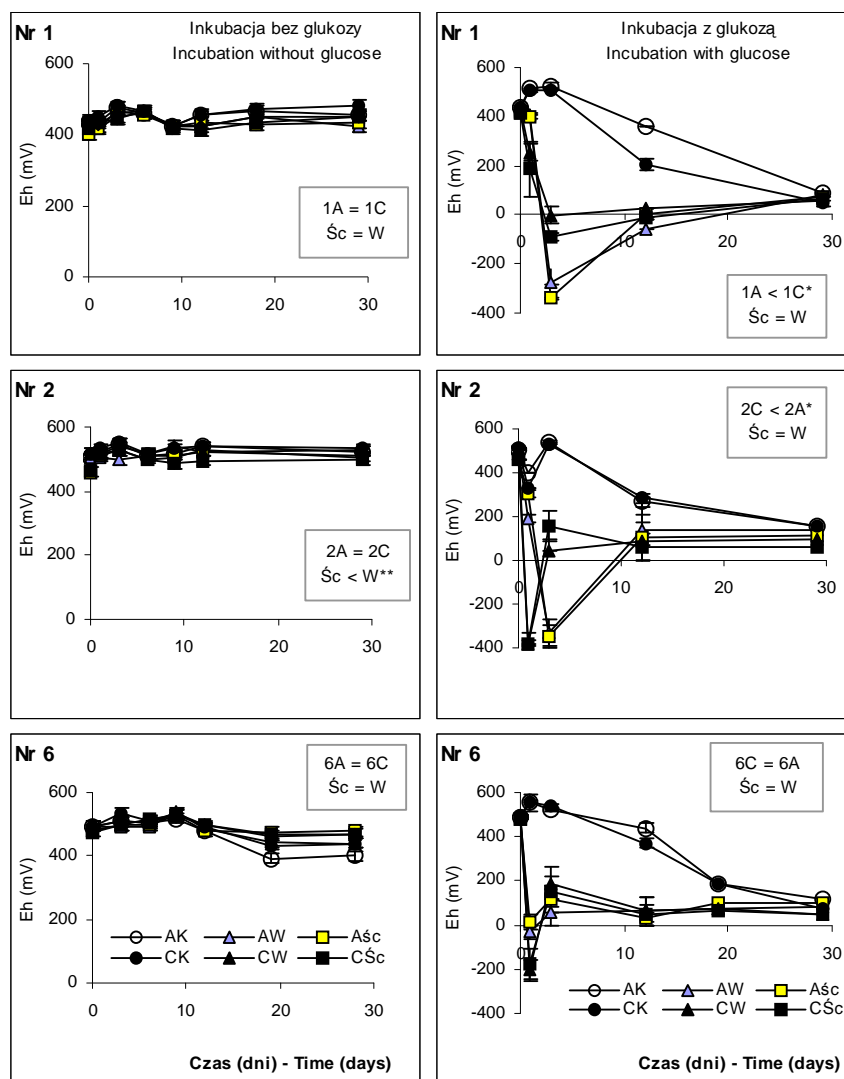
Kontrola stanu oksydoredukcyjnego gleby w warunkach nawadniania ściekami jest istotna, ponieważ przekształcenia niektórych zanieczyszczeń (np. nadmiaru azotanów, metali ciężkich, związków organicznych) regulowane są poziomem potencjału redoks [69].

Potencjał redoks Eh, wskaźnik stanu natlenienia gleby i intensywności procesów oksydoredukcyjnych zachodzących w układzie, odzwierciedla skład chemiczny roztworu glebowego a zatem związany jest z przekształceniami materiału glebowego katalizowanymi drogą biochemiczną [106,142,271,273].

4.3.7.1. Eh i pH gleby inkubowanej bez dodatku glukozy

Warianty gleby zalanej wodą i ściekami przygotowane zostały w celu symulacji nawodnień ściekami w polu z zamiarem obserwacji przemian biochemicznych w warunkach beztlenowych przy zachowaniu możliwości odniesienia tych zmian do warunków tlenowych (wariant kontrolny, wilgotność 60% WHC). Jednak w czasie inkubacji próbek glebowych bez dodanej glukozy procesy oksydoredukcyjne przebiegały bardzo spokojnie (rys. 49, lewa strona). Różnica pomiędzy wartościami początkowymi i końcowymi w poszczególnych wariantach w ciągu 12 dni inkubacji nie przekraczała 60 mV. Najsilniejsze obniżenie wartości Eh, jedynie o 11 mV, stwierdzono w glebie porośniętej trawami pobranej z pola kontrolnego (nr 6A). W kilku przypadkach obserwowano podwyższenie wartości Eh, nawet o 59 mV. Przedłużenie czasu zalania próbek nie zmieniło w sposób zdecydowany stanu redoks gleby. Po 29 dniach wartość Eh wzrosła w glebach torfowo-murszowych średnio o 77 i 21 mV (odpowiednio w glebie porośniętej topolą nr 1 i wierzbą nr 2) oraz obniżyła się o 38 mV w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6). W żadnym przypadku potencjał Eh nie był niższy od +400 mV. W odniesieniu do próbek o uwilgotnieniu kontrolnym, odpowiadającym 60% WHC, zalanie próbek wodą lub ściekami spowodowało tylko nieznaczne obniżenie Eh (tab. 15).

Z uwagi na fakt, iż potencjalna redukcja gleby możliwa do zarejestrowania w wyniku zalania związana jest ze spadkiem Eh do wartości silnie ujemnych (poniżej -200 mV), maksymalne obniżenie potencjału o 35 mV obserwowane w odniesieniu do wariantu kontrolnego oraz do stanu wyjściowego gleby było bardzo niewielkie.



Rys. 49. Zmiany potencjału redoks (Eh) w próbkach glebowych inkubowanych bez dodatku glukozy (lewa strona) oraz z dodatkiem glukozy (prawa strona). Objaśnienia jak na rysunku 20
Fig. 49. Dynamics of redox potential (Eh) in soil samples incubated without glucose (left) or with glucose amendment (right). Explanation as in Fig. 20

Tabela 15. Wartości potencjału redoks (Eh) po 12 dniach inkubacji próbek glebowych bez glukozy (w nawiasach odchylenie standardowe)

Table 15. Redox potential (Eh) after 12-day soil samples incubation without glucose (in brackets standard deviations)

Wariant doświadczenia Soil treatment	Eh(t_{12}), (mV)		
	Nr 1	Nr 2	Nr 6
AK	453 (2)	538 (4)	481 (4)
AW	421 (2)	524 (1)	489 (9)
AŚc	433 (1)	526 (2)	479 (7)
CK	456 (2)	539 (3)	489 (3)
CW	422 (10)	524 (11)	498 (5)
CŚc	412 (2)	495 (8)	496 (4)

Badane utwory glebowe charakteryzowały się więc wysoką odpornością na redukcję. Odporność na redukcję jest biofizycznym (bio-fizykochemicznym) wskaźnikiem zdolności buforującej gleby w odniesieniu do przemian redoks [271].

Wskaźnik t_{300} (czas obniżenia Eh do 300 mV w glebach zalanych wodą w temperaturze 20°C) określany w próbkach wierzchnich warstw wielu gleb mineralnych mieścił się w zakresie od 0,6 do 5,3 dnia [107,264,273]. Tendencja długiego (ponad 7 dni) utrzymywania wysokich (> 300 mV) wartości Eh obserwowana była w niższych poziomach genetycznych gleb mineralnych zawierających znikome ilości dostępnej materii organicznej. W utworach takich notowano też bardzo niską aktywność biologiczną mierzoną m.in. aktywnością dehydrogenaz i wydzielaniem CO₂ [106]. Ograniczenie takie nie dotyczy przypadku omawianych gleb organicznych wykazujących aktywne dehydrogenazy i umiarkowaną respirację. Zatem w badanych glebach działają inne czynniki zapobiegające redukcji gleby w warunkach jej zalania.

Odczyn gleby reguluje procesy uruchamiania metali ciężkich w glebie, w warunkach nawadniania gleb ściekami obserwowano silne powiązanie kwasowości, powierzchni właściwej, pojemności kationowymiennej i zawartości dostępnego węgla organicznego z mechanizmami unieruchamiania metali [124,125,134,262].

Badane gleby wykazywały odczyn obojętny (tab. 16). Różnica pomiędzy średnimi wartościami pH, charakteryzującymi materiał pobrany z poletek kontrolnych (A) i zalewanych ściekami (C) miała cechy istotności jedynie w glebie porośniętej wierzwą (nr 2, $P < 0,01$). Wartości początkowe pH mieściły się w wąskim zakresie od 7,65 do 7,95. W czasie inkubacji obserwowano obniżenie pH we wszystkich zastosowanych wariantach do wartości od 6,61 do 7,34, średnio o 1,03, 0,65 i 0,86, odpowiednio w glebach porośniętych topolą (nr 1), wierzwą (nr 2) i trawami (nr 6). Obniżenie pH gleb organicznych w wyniku ich nawadniania ściekami obserwowali również Biernacka i in. [29].

Tabela 16. Wartości średnie pH w czasie 12-dniowej inkubacji bez dodatku glukozy (w nawiasach odchylenie standardowe)

Table 16. The pH mean values for 12-day incubation without glucose (in brackets standard deviations)

Wariant doświadczenia Soil treatment	pH		
	Nr 1	Nr 2	Nr 6
AK	7,48 (0,33)	7,63 (0,22)	7,38 (0,21)
AW	7,69 (0,33)	7,61 (0,22)	7,35 (0,21)
AŚc	7,44 (0,32)	7,43 (0,23)	7,39 (0,21)
CK	7,39 (0,29)	7,35 (0,23)	7,34 (0,22)
CW	7,56 (0,29)	7,36 (0,23)	7,39 (0,21)
CŚc	7,46 (0,29)	7,26 (0,24)	7,30 (0,21)

W warunkach zalania gleb następuje zmiana pH gleby w kierunku odczynu obojętnego, stabilizacja następuje przy pH 6,0-7,5. W przypadku zalania gleb alkalicznych, obserwowane jest obniżanie się wartości pH, związane z akumulacją CO₂ [106,229]. W omawianym doświadczeniu rejestrowane obniżenie pH zachodziło bez większych zmian wartości Eh.

4.3.7.2. Eh i pH gleby inkubowanej z dodatkiem glukozy

Zwiększenie intensywności procesów biochemicznych w wyniku wprowadzenia wysokiego dodatku glukozy, zredukowanego substratu oddechowego, spowodowało dynamiczne zmiany potencjału redoks (rys. 49, prawa strona). W początkowym okresie inkubacji wartości Eh gwałtownie obniżyły się we wszystkich próbkach zalanych wodą lub ściekami, w sposób charakterystyczny dla gleb wzbogaconych glukozą [22]. Najszybsze obniżenie Eh, choć relatywnie słabe, do wartości –30 mV, zanotowano w glebie porośniętej trawami – kontrolnej (nr 6A). Gleba pobrana z pola obsadzonego topolą zalewanego ściekami (nr 1C) wykazywała najlepsze właściwości buforujące, ponieważ potencjał redoks osiągnął wartości ujemne dopiero po trzech dniach inkubacji oraz nie przekroczył wartości –88 mV. Obniżenie Eh stymulowane było wprowadzeniem glukozy, lecz jego intensywność determinowana była statusem drobnoustrojów, gdyż gleba porośnięta topolą nawadnianą ściekami (nr 1C) wykazywała bez wzbogacenia niższą biomasę i aktywność biochemiczną, niż gleba porośnięta topolą kontrolna (nr 1A).

Najniższą wartość potencjału (–380 mV) zarejestrowano już po 24 godzinach w porośniętej wierzwą glebie zalewanej ściekami (nr 2C), w której nawadnianie stymulowało aktywność biologiczną oraz, z pewnym przesunięciem w czasie, w porośniętej wierzwą glebie kontrolnej, zarówno w zawiesinie z wodą (nr 2AW), jak też ze ściekami (nr 2AŚc). Silne obniżenie wartości Eh było nietrwałe, po 12 dniach inkubacji potencjał był już dodatni lub lekko ujemny (> –60 mV).

Postępujące procesy redukcji dotyczyły też próbek o kontrolnej wilgotności, zmiany były tam jednak mniej gwałtowne. Po 4-tygodniowej inkubacji z glukozą

wartości Eh były w miarę wyrównane we wszystkich wariantach doświadczenia, w przedziale od +30 do +160 mV.

Zmiany odczynu w obecności „łatwego” do utlenienia cukru prostego były większe niż w czasie inkubacji bez wzbogacenia. W stosunku do wartości wyjściowych ($\text{pH} > 7$), pH uległo obniżeniu w ciągu 12 dni o 1,45, 1,22 i 1,47 jednostki, odpowiednio w glebach porośniętych topolą (nr 1), wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6). Wartości średnie z tego okresu wyznaczone dla poszczególnych wariantów doświadczenia przedstawia tabela 17. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy odczynem gleby kontrolnej (A) i zalewanej ściekami (C).

Tabela 17. Wartości średnie pH gleby z 12-dniowej inkubacji próbek z glukozą (w nawiasach odchylenie standardowe)

Table 17. The pH mean values for 12-day incubation with glucose (in brackets standard deviations)

Wariant doświadczenia Soil treatment	pH _{glc}		
	Nr 1	Nr 2	Nr 6
AK	7,00 (0,23)	7,12 (0,29)	6,93 (0,26)
AW	6,94 (0,35)	7,01 (0,38)	6,80 (0,24)
AŚc	7,01 (0,37)	6,94 (0,43)	6,94 (0,26)
CK	7,00 (0,31)	7,00 (0,21)	6,89 (0,22)
CW	7,06 (0,33)	6,87 (0,23)	6,82 (0,27)
CŚc	6,91 (0,31)	6,90 (0,27)	6,90 (0,27)

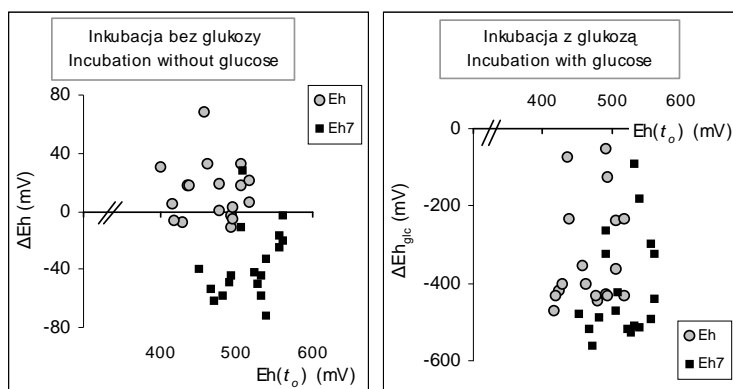
Jednym ze sposobów oceny procesów oksydoredukcyjnych w glebie, proponowanym przede wszystkim dla celów porównawczych, jest wyznaczenie tzw. wartości Eh₇ (odniesionej do pH 7), oparte na założeniu, że zmiana potencjału przypadająca na jednostkę pH wynosi 59 mV [106]:

$$\text{Eh}_7 = \text{Eh} - 0,059 \cdot (7 - \text{pH}) \quad (4)$$

Porównanie zmian wartości Eh i Eh₇, odzwierciedlających nasilenie procesów redoks w czasie 12-dniowych inkubacji z dodatkiem i bez dodatku glukozy, wobec wartości początkowych potencjału redoks (Eh(t_0) lub Eh₇(t_0)), zestawiono na rysunku 50.

Jak podkreślano wcześniej, przy wykorzystaniu przez drobnoustroje tylko naturalnych substratów organicznych nie dochodziło do wyraźnej redukcji układu, nawet po dłuższym czasie zalania. Wskazują na to dodatnie wartości ΔEh po 12 dniach inkubacji ($\Delta\text{Eh} = \text{Eh}(t_{12}) - \text{Eh}(t_0)$). Przy dostępności naturalnego dla danej gleby poziomu substancji organicznej, potencjał redoks po zalaniu pozostawał wysoki, pomimo przebiegu metabolizmu oddechowego, wzrostu biomasy i utrzymywania stosunkowo wysokiego poziomu aktywności dehydrogenaz silnie związanych z procesami redoks. Uwzględnienie wartości pH wyraźnie zmieniło

sytuację. Wyznaczone wartości ΔEh_7 były w przeważającej większości niższe od zera (rys. 50, lewy wykres).



Rys. 50. Zmiana wartości Eh w wyniku 12-dniowej inkubacji próbek glebowych bez dodatku glukozy (ΔEh , lewy wykres) oraz z dodatkiem glukozy (ΔEh_{glc} , prawy wykres) wobec wartości początkowych, $Eh(t_0)$. \circ –Eh – wartości mierzone; \blacksquare –Eh₇ – wartości korygowane do pH 7

Fig. 50. Changes in Eh after 12-day incubation of all soil variants without glucose (ΔEh , left) or with glucose (ΔEh_{glc} , right) versus the initial value $Eh(t_0)$. \circ –Eh – measured values; \blacksquare –Eh₇ – values corrected to pH 7

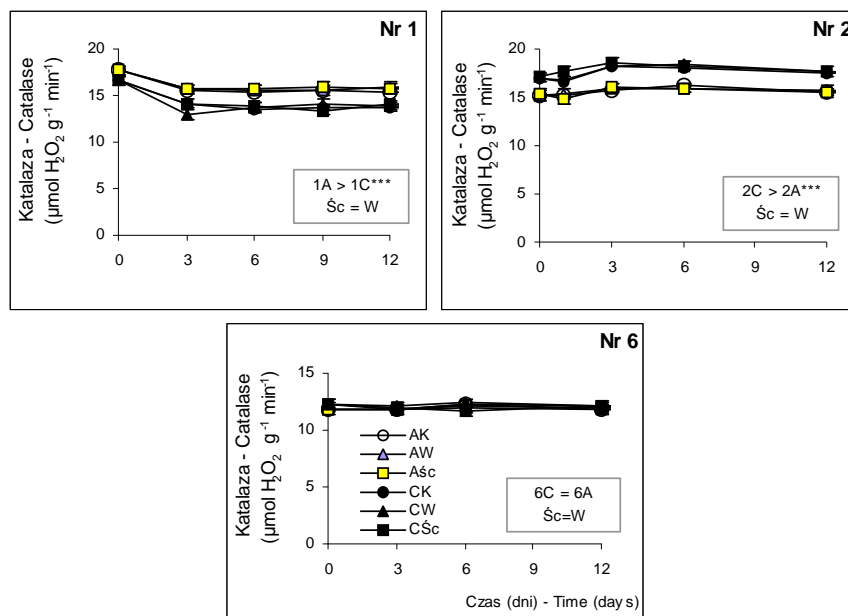
W efekcie dodania glukozy redukcja gleby była bardzo silna. Obniżenie potencjału redoks, wywołane 12-dniową inkubacją w warunkach intensywnego, indukowanego metabolizmu przekraczało nawet 400 mV (ΔEh wynosiła od -52 do -473 mV), (rys. 50, prawy wykres).

4.3.8. Aktywność katalazy

Wysokie wartości Eh próbek gleby bez wprowadzenia dodatku glukozy uzasadniają prawie niezmienną aktywność katalazy, nawet w próbkach zalanych wodą lub ściekami (rys. 51).

Gleby torfowo-murszowe wykazywały istotnie różną aktywność katalazy w próbkach pobranych z poletek kontrolnych (A) i zalewanych ściekami (C), zachowując tę samą tendencję, jaką obserwowano w przypadku biomasy drobnoustrojów i aktywności dehydrogenaz. Różnica pomiędzy zmianami wywołanymi przez ścieki i przez wodę była we wszystkich glebach nie tylko nieistotna, ale prawie znikoma. Wysoka aktywność enzymów katalizujących rozkład H_2O_2 (produktu metabolizmu tlenowego) jest potwierdzeniem utrzymywania niezmiennych warunków natlenienia w czasie całej inkubacji.

Wysoka aktywność katalazy obserwowana była w innych glebach torfowo-murszowych również przez innych autorów [95,160].



Rys. 51. Dynamika aktywności katalazy w próbkach badanych gleb. Inkubacja bez dodatku glukozy. Objasnienia jak na rysunku 20

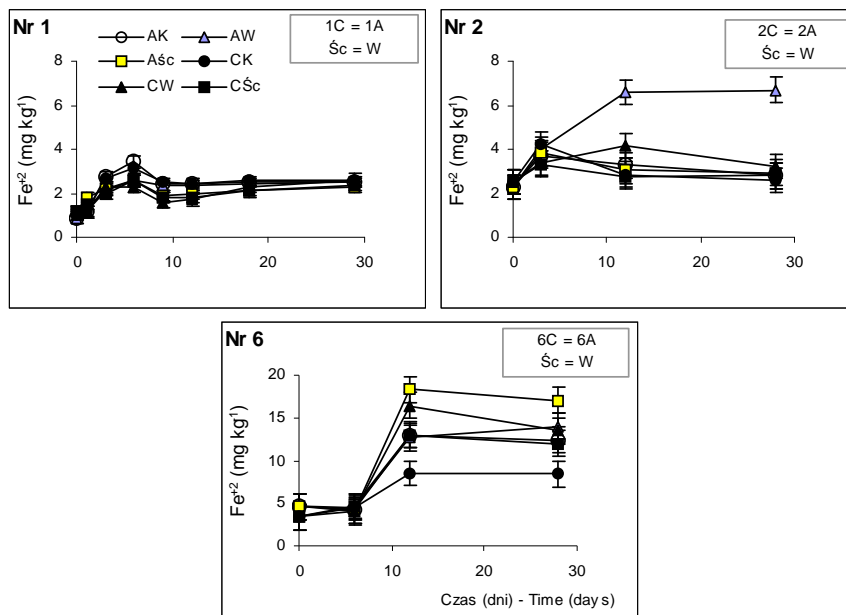
Fig. 51. Soil catalase activity over time (incubation without glucose). Explanation as in Fig. 20

4.3.9. Redukcja żelaza

4.3.9.1. Zawartość Fe^{+2} w glebie inkubowanej bez dodatku glukozy

Wyjątkową zdolność badanych gleb do przeciwdziałania redukcji podkreślała niewielka ilość żelaza zredukowanego. Zawartość Fe^{+2} (frakcja ekstrahowana $0,05\text{MH}_2\text{SO}_4$) w próbkach inkubowanych bez dodatku glukozy nie przekraczała 8 i $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (odpowiednio w glebach torfowo-murszowych i mineralno-murszowej) nawet w czasie 4-tygodniowego zalania wodą lub ściekami (rys. 52).

Skala tego procesu była więc tu niewielka, porównując do innych gleb zalanych wodą, gdzie ilość zredukowanego żelaza może osiągać $1000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [44,47,48,103,142]. W próbkach inkubowanych bez dodatkowego źródła węgla nie zaobserwowano też zależności pomiędzy zawartością zredukowanej formy Fe i wartościami Eh. Ujemna korelacja pomiędzy tymi cechami jest typowa dla aktywnych biologicznie gleb mineralnych inkubowanych w warunkach zalania [106,108].



Rys. 52. Zmiany zawartości Fe^{+2} (frakcja ekstrahowana $0,05 \text{MH}_2\text{SO}_4$) w czasie inkubacji próbek glebowych bez dodatku glukozy. Objaśnienia jak na rysunku 20

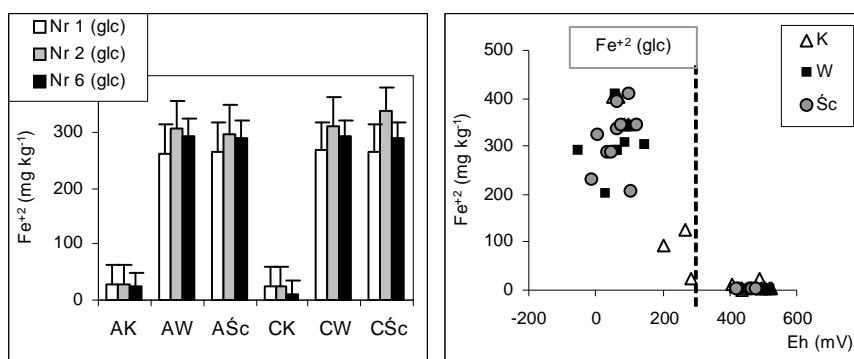
Fig. 52. Fe^{+2} content (fraction extracted with $0.05 \text{MH}_2\text{SO}_4$) during soil samples incubation without glucose. Explanation as in Fig. 20

Zawartość Fe^{+2} nie różniła się istotnie pomiędzy próbkami reprezentującymi gleby różnie nawadniane (A i C). Najwyższą ilość Fe^{+2} obserwowano w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6). Przedłużenie inkubacji do 4 tygodni nie powodowało przyspieszenia procesu redukcji Fe.

Żelazo redukowane jest przez liczne bakterie heterotroficzne (m.in. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Kliebsiella*), utleniane zaś w obecności O_2 przez np. *Thiobacillus ferrooxidans* (przy niskim pH) czy *Gallionella ferruginea* (przy odczynie obojętnym) [24,116]. Wartość potencjału redoks gleby przy jakiej zachodzi redukcja żelaza zależy w znacznym stopniu od formy Fe i odczynu gleby [11,164]. Gao i in. [94] podają bardzo szeroki jego zakres od -50 mV do $+600 \text{ mV}$. Mimo słabej rozpuszczalności tlenków i wodorotlenków żelaza, Fe(III) jest jednym z ważniejszych akceptorów elektronów dla mikroorganizmów glebowych – beztlenowców fakultatywnych i obligatoryjnych [122,277].

4.3.9.2. Zawartość Fe^{+2} w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy

Przyspieszenie procesów redoks wywołane obecnością łatwo dostępnego substratu oddechowego uruchomiło szlaki oddychania beztlenowego wykorzystującego redukcję Fe. Po 12-dniowej inkubacji z glukozą zawartość Fe^{+2} w próbkach zalanych wodą lub ściekami dochodziła do $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (rys. 53), przewyższając wielokrotnie ilość Fe zredukowanego w próbkach o niższej wilgotności (AK i CK).



Rys. 53. Redukcja Fe w obecności glukozy (frakcja ekstrahowana $0,05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$). Zawartość Fe^{+2} po 12 dniach inkubacji próbek z dodatkiem glukozy (lewy wykres); zależność Fe^{+2} od Eh (prawy wykres)

Fig. 53. Glucose-induced Fe reduction (extraction with $0.05 \text{ M H}_2\text{SO}_4$). The Fe^{+2} content after 12-day incubation with glucose (left); Fe^{+2} versus Eh (right)

Różnice pomiędzy zawartością Fe^{+2} w próbkach reprezentujących gleby nawadniane jedynie opadami atmosferycznymi (A) i gleby zalewane ściekami (C) nie były istotne, podobnie do sytuacji, gdy inkubacja przebiegała bez wzbogacenia (patrz rys. 52). Możliwość wykorzystania Fe jako akceptora elektronów nie została więc zmieniona przez systematyczne nawadnianie ściekami. Redukcja Fe była też zbliżona w próbkach zalanych wodą (W) i zalanych ściekami (Śc).

Przedstawienie ilości uruchomionego Fe względem potencjału redoks wskazuje na redukcję żelaza przy $\text{Eh} < 300 \text{ mV}$. Taka graniczna wartość Eh dla redukcji Fe jest często obserwowana w glebach podmokłych i zalanych wodą [102,264,271]. Punkty leżące po prawej stronie tej umownej bariery redoks reprezentują stan wyjściowy układu – wysoki potencjał redoks, $[\text{Fe}^{+2}] < 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (rys. 53, prawy wykres).

4.3.10. Przemiany gazowe związane z obniżeniem Eh gleby

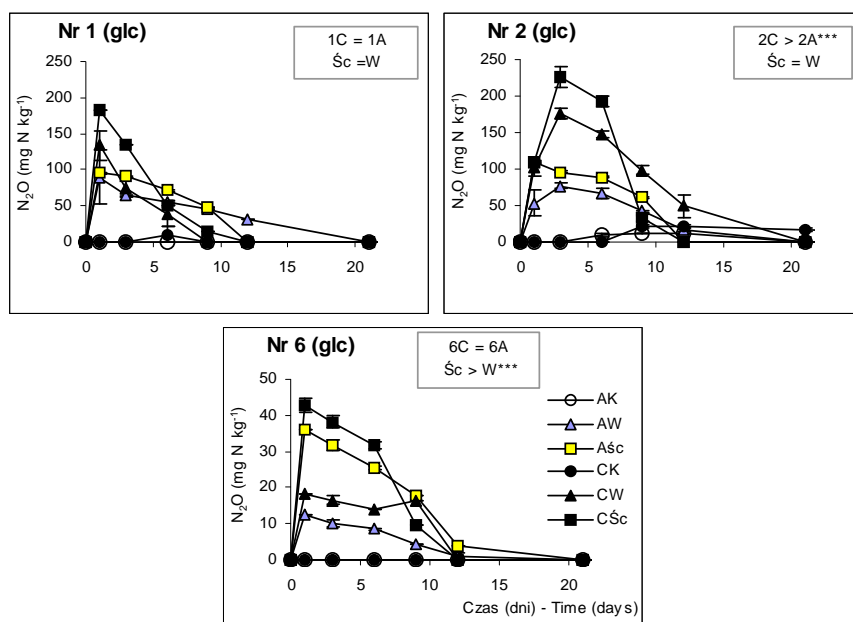
Przebieg procesów biogeochemicznych w glebie zalanej wodą zależy od zawartości substancji organicznej. Przeprowadzone doświadczenia potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że intensywność tych przemian determinowana jest głównie przez związki organiczne łatwo dostępne dla drobnoustrojów. Dlatego

wzbogacenie glukożą nawet zasobnych gleb organicznych przyspiesza procesy, będące konsekwencją ograniczenia dostępu tlenu [103,106,116,142].

Śledzenie zmian jakościowych i ilościowych w powietrzu glebowym dostarcza cennych informacji o stanie oksydoredukcyjnym gleby. O ile proces denitryfikacji przeprowadzany jest przez beztlenowce fakultatywne i emisja N_2O możliwa jest również w glebach natlenionych (aktywność denitryfikatorów przebiega np. wewnątrz agregatów glebowych), to proces metanogenezy jest wynikiem metabolizmu beztlenowców obligatoryjnych i zachodzi tylko przy pełnej anoksji. W następnych rozdziałach przedstawiono porównanie zmian stężenia gazów, charakterystycznych dla gleb zredukowanych, w próbkach gleb poddawanych systematycznym zalewom (C) i gleb kontrolnych (A).

4.3.10.1. Emisja i sorpcja N_2O w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy

Znaczne zwiększenie poboru tlenu przez drobnoustroje w związku z dodatkiem glukozy prowadziło do dynamicznych zmian składu powietrza glebowego już w pierwszej fazie inkubacji. Obecność podtlenu azotu stwierdzono po 24 godzinach we wszystkich próbkach zalanych wodą oraz ściekami (rys. 54).



Rys. 54. Emisja i sorpcja N_2O w wariantach doświadczalnych badanych gleb – krzywe kumulatywne. Inkubacja w obecności acetyleny (2% v/v) i glukozy ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 54. N_2O emission and sorption – cumulative curves. Incubation with acetylene (2% v/v) and glucose ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Explanation as in Fig. 20

Ograniczenie dyfuzji O_2 przez warstwę roztworu spowodowało wykorzystanie obecnych w glebie azotanów(V) jako akceptora elektronów pochodzących z utlenianej glukozy, mimo, że w powietrzu nad glebą stężenie tlenu było wówczas wysokie (wyższe od 19% v/v). W związku z niskim potencjałem redoks towarzyszącym emisji N_2O w obecności glukozy przyjęto, że w całości powstawał on w wyniku denitryfikacji heterotroficznej. Wyprodukowany N_2O ulegał następnie sorpcji, prawdopodobnie redukcji do N_2 . Sorpcja podtlenu przebiegała pomimo obecności acetyleny.

Pojawienie się niewielkich ilości N_2O w warunkach swobodnej dyfuzji tlenu do porów glebowych (warianty z wilgotnością kontrolną), stwierdzono w glebie torfowo-murszowej dopiero przy stężeniu $O_2 < 2\%$ v/v, po 6 dniach inkubacji.

Denitryfikacja mierzona ilością wydzielonego N_2O w obecności acetyleny i glukozy, była we wszystkich przypadkach wyższa w próbkach gleby pobranej z pola zalewanego ściekami (C), (istotne w glebie porośniętej wierzba nr 2, $P < 0,001$). Wyższa była również w próbkach inkubowanych w obecności ścieków (istotne w glebie porośniętej trawami nr 6, $P < 0,001$), najprawdopodobniej w rezultacie wprowadzenia m.in. dodatkowej porcji azotanów(V) i azotanów(III) (średnio $14,6 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{cm}^{-3}$ i $0,115 \text{ mg N-NO}_2^- \cdot \text{cm}^{-3}$ ścieków). Należy też zauważyć, że wydzielanie N_2O przez próbki gleb z „historią” nawodnień ściekami (C) pozostawało silniejsze niż przez próbki gleb kontrolnych (A) nawet bez uzupełnienia azotanów, tzn. w obecności wody destylowanej – o 50% w przypadku gleb porośniętych topolą (nr 1) i trawami (nr 6), oraz dwukrotnie w glebie porośniętej wierzba (nr 2). Podobnie, wyższą aktywność denitryfikacyjną w glebie piaszczystej poprzednio nawadnianej ściekami w porównaniu do gleby „bez historii nawodnień” obserwowali Barton i in. [19].

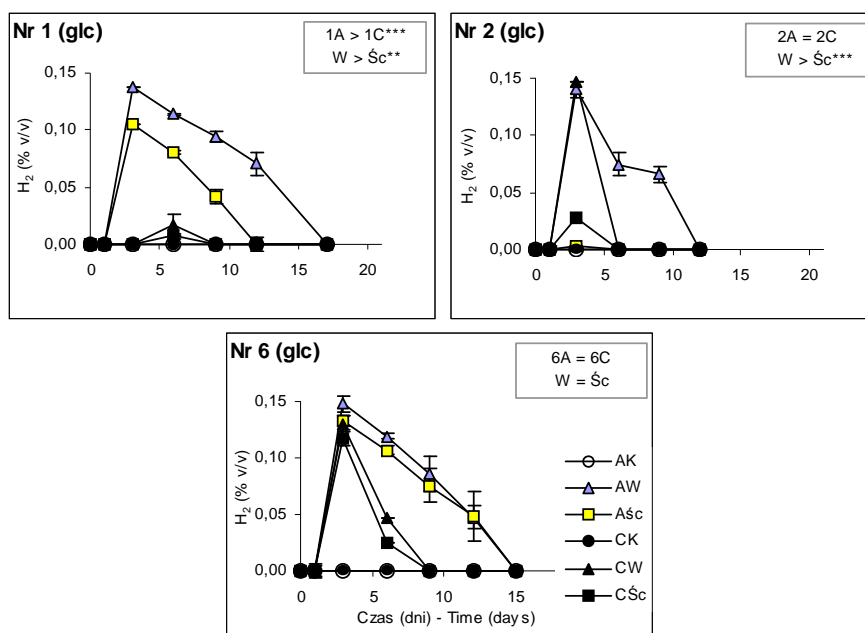
Inną możliwością przekształcenia azotanów(V) jest dysymilacyjna redukcja do formy amonowej (NH_4^+), proces zachodzący w glebach silnie zredukowanych, o wysokim stosunku C:N [52]. W warunkach przeprowadzonego doświadczenia próbki uzupełnione glukozą wykazywały 3-krotnie wyższą zawartość formy amonowej po 29 dniach inkubacji (ok. 130 mg N-NH_4^+) niż próbki inkubowane bez glukozy (ok. 40 mg N-NH_4^+).

4.3.10.2. Emisja i sorpcja H_2 w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy

Wodór cząsteczkowy jest gazem śladowym wytwarzanym w glebie w specyficznych warunkach przez drobnoustroje fermentujące i chemolitoautotroficzne. Conrad [65] wyróżnił dwie sytuacje związane z obecnością H_2 w glebie. W siedliskach beztlenowych z wysoką aktywnością bakterii metanogennych produkcja i pobranie H_2 występują prawdopodobnie w swoistej równowadze. Czas przekształcenia powstałego H_2 jest krótki (rzędu minut) a stężenia rzędu nanomoli. Zatem gleby emitujące CH_4 przyczyniają się tylko w niewielkim stopniu do wy-

dzielania H_2 do atmosfery. Natomiast po zalaniu gleby 'natlenionej' faza produkcji wodoru poprzedza fazę metanogenezy doprowadzając do stanu przejściowego charakteryzującego się stosunkowo wysokim stężeniem H_2 w powietrzu glebowym (rzędu procentów) [64]. W warunkach braku dostępnych akceptorów elektronów (np. w pierwszych dniach inkubacji przy bardzo intensywnym wykorzystaniu glukozy) następuje przeniesienie elektronów z substancji organicznych na protony i wydzielanie H_2 . Drobnoustrojami wykorzystującymi wodór cząsteczkowy są bakterie metanogenne, beztlenowce redukujące azotany(V) do formy amonowej oraz siarczany do siarczków [68,143]. Hydrogenazy obejmują dużą grupę enzymów katalizujących zarówno produkcję jak i utlenianie H_2 .

W omawianym doświadczeniu z wysokim dodatkiem glukozy, pojawienie się H_2 w powietrzu nad glebą zaobserwowano w trzecim dniu inkubacji, czyli później niż N_2O (który powstaje w wyniku korzystnej energetycznie redukcji rozpuszczalnych azotanów), jednak przy niepełnej jeszcze redukcji N_2O do N_2 (rys. 55).



Rys. 55. Zmiany stężenia H_2 nad powierzchnią próbek glebowych inkubowanych w obecności glukozy ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Objasnienia jak na rysunku 20

Fig. 55. Changes in H_2 concentration in soil headspace during the incubation of soil samples with glucose ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Explanations as in Fig. 20

W glebie porośniętej topolą (nr 1) stężenie wodoru cząsteczkowego było istotnie wyższe w aktywniejszych biochemicznie próbkach z pola kontrolnego,

które nie było zalewane ściekami ($P < 0,001$). Maksymalne stężenie H_2 w powietrzu nad glebą nie przekraczało ok. 0,15% v/v, co odpowiadało $< 3 \text{ mg H}_2 \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby. Sorpcja wydzielonego wodoru przebiegała we wszystkich przypadkach bardziej intensywnie w próbkach gleb z poletek nawadnianych ściekami (C).

Niewielka ilość H_2 pojawiła się w drugim tygodniu inkubacji w próbkach ścieków (bez gleby) inkubowanych z dodatkiem glukozy (0,06% v/v).

4.3.10.3. Emisja CH_4 w glebie inkubowanej z dodatkiem glukozy

Metanogeneza jest drogą mineralizacji węgla organicznego w warunkach beztlenowych, zachodzi po wyczerpaniu akceptorów elektronów takich jak azotany, Fe(III) czy siarczany [64,106,142]:



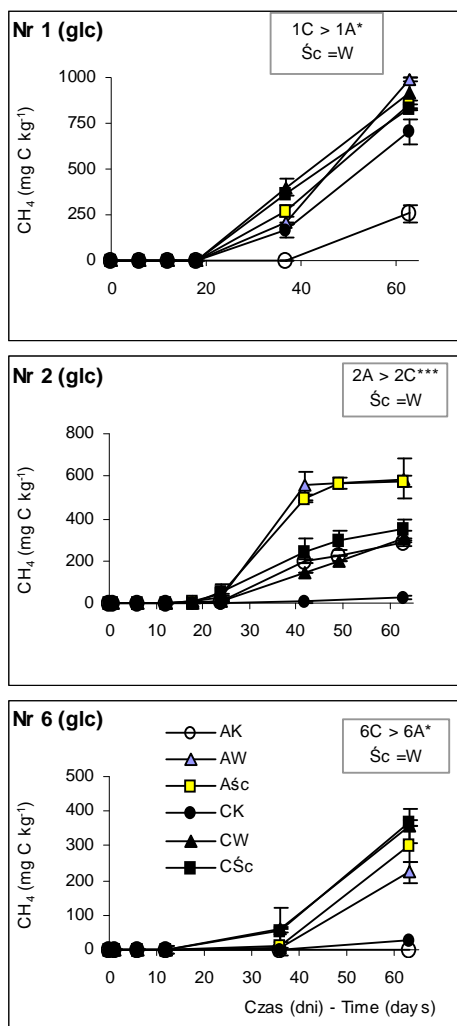
Przekształcenie złożonych związków organicznych, np. celulozy do metanu wymaga początkowo obecności innych drobnoustrojów (w tym tlenowych i fakultatywnych). Drobnoustroje metanogenne wykorzystują – jako ostateczne akceptory elektronów w metabolizmie oddechowym – głównie CO_2 i octan, ulegające przy tym redukcji do CH_4 [172].

Adamson i in. [1] zidentyfikowali co najmniej 20 gazowych związków organicznych wydzielanych w wyniku beztlenowej inkubacji gleb z dodatkiem glukozy (aldehydy, węglowodory, ketony, alkohole, kwasy, estry). Metan jest szczególnie silnie związany ze środowiskiem gleb torfowych, zwłaszcza podmokłych. Proces biologicznego wytwarzania CH_4 zachodzi przy niskich wartościach Eh, a drobnoustroje metanogenne charakteryzują się na ogół dużą wrażliwością na tlen. Wyizolowanie szczepów *Desulfovibrio vulgaris*, wykazujących aktywność katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i tzw. białka Rbr zawierającego niehemowe Fe (czyli enzymów tzw. stresu tlenowego) przemawia jednak za możliwościami przystosowawczymi tych beztlenowców do pewnej aktywności w strefach obniżonego natlenienia gleby [163].

Ponieważ w czasie inkubacji testowanych gleb bez dodatku glukozy ubytek tlenu nie był wystarczający do wytworzenia warunków beztlenowych, nie obserwowano też emisji metanu nawet przy przedłużeniu inkubacji do 120 dni. Niewielką aktywność metanogenną w czasie zalewania ściekami badanych gleb w warunkach naturalnych (maksymalna emisja CH_4 z powierzchni gleby $0,012 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) obserwowały Nosalewicz i Stępniewska [213].

Wprowadzenie wysokiego dodatku glukozy efektywnie przyspieszyło metabolizm heterotrofów i przepływ elektronów w układzie, a w konsekwencji przyczyniło się do wytworzenia warunków korzystnych dla rozwoju mikroorgani-

zmów metanogennych. Pojawienie się metanu zarejestrowano dopiero po 3 tygodniach inkubacji (rys. 56), przy stężeniu $O_2 < 2,4\%$ v/v (ok. $60 \mu\text{mol } O_2$). Przyspieszenie szybkości emisji metanu przy stężeniu $O_2 < 2,5\%$ nad powierzchnią gleby obserwowali m.in. Wagner i in. [291].



Rys. 56. Emisja CH_4 (krzywe kumulatywne) w czasie inkubacji próbek badanych gleb z dodatkiem glukozy ($6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Objaśnienia jak na rysunku 20

Fig. 56. Cumulative CH_4 emission during incubation of soil samples with glucose ($6 \text{ mg } g^{-1}$). Explanation as in Fig. 20

Najbardziej aktywne metanogennie były próbki gleby porośniętej topolą (nr 1). Ilość CH_4 wydzielonego po 60 dniach inkubacji wynosiła ok. $900 \text{ mg C-CH}_4\cdot\text{kg}^{-1}$. Najmniej aktywne pozostawały próbki gleby porośniętej trawami (nr 6, $< 400 \text{ mg C-CH}_4\cdot\text{kg}^{-1}$). W przypadku gleby porośniętej topolą (nr 1) metan pojawił się we wszystkich wariantach doświadczenia, nawet przy zachowaniu porów glebowych wypełnionych powietrzem (wilgotność 60% WHC, wariant K). W przypadku gleb porośniętych topolą (nr 1) i trawami (nr 6) zaobserwowano istotnie więcej CH_4 w próbkach pobranych z poletek nawadnianych ściekami (C, $P < 0,05$), natomiast w glebie porośniętej wierzbą (nr 2) – istotnie wyższą aktywność wykazywały próbki gleby z poletka kontrolnego (A, $P < 0,001$).

Podobnie do sytuacji opisywanej przy omawianiu aktywności metanotroficznej, działanie ścieków i wody nie było istotnie różne również w przypadku aktywności metanogennej. Metan, tak jak N_2O , nie został zarejestrowany w próbkach samych ścieków (inkubowanych bez gleby).

4.3.10.4. Relacje pomiędzy potencjałem redoks i wskaźnikami aktywności biologicznej gleby

Relacje pomiędzy N_2O w obecności acetylenu, H_2 i CH_4 a potencjałem redoks w trakcie inkubacji próbek z glukozą ilustruje rysunek 57. Zakres Eh był bardzo szeroki, od +600 do -400 mV. Podtlenek azotu obecny był przy $\text{Eh} < +400 \text{ mV}$. Ten przejściowy produkt denitryfikacji pojawiał się w danych warunkach jako pierwszy z wymienionych gazów (patrz rys. 54). Po 24 godz. inkubacji z glukozą N_2O wydzielany był również w atmosferze bez acetylenu (dane nie zostały przedstawione graficznie). Były to niewielkie i szybko zanikające ilości N_2O , niższe niż $16 \text{ mg N}\cdot\text{kg}^{-1}$, obserwowane w próbkach zalanych ściekami (gwałtowne wyczerpanie tlenu rozpuszczonego w roztworze, azotany dodane ze ściekami). Z różnicy pomiędzy N_2O oznaczanym w wariantach z C_2H_2 i bez C_2H_2 (inhibitorem reduktazy N_2O) wynika zatem, że większość wydzielanego podtlenku w badanych glebach może być zredukowana do N_2 również w obecności nadmiaru substratu organicznego.

Maksimum emisji N_2O zaobserwowano przy Eh ok. +200 mV (1-3 dzień inkubacji próbek zalanych), a poniżej tej wartości następowała sorpcja N_2O prawdopodobnie drogą redukcji do N_2 (rys. 57). Podobne warunki redoks sprzyjające emisji i sorpcji tego gazu notowano dla gleb mineralnych różnego pochodzenia [207,297,304,306,311].

Wodór cząsteczkowy, wydzielony w początkowych fazach inkubacji, ulegał następnie stosunkowo powolnej sorpcji (patrz. rys. 55). Obserwowany był on przy wartościach $\text{Eh} < +200 \text{ mV}$. Mimo, że wykorzystanie H_2 przez bakterie beztlenowe i tlenowe jest dosyć szeroko rozpowszechnione, jest on stosunkowo rzadko badany,

ponieważ bezpośrednio nie przyczynia się do powstawania efektu szklarniowego. W glebach beztlenowych jest jednak prekursorem metanu i przyczynia się do powstawania 10-50% wydzielanego CH_4 [65].

Emisja metanu rozpoczęła się dopiero po obniżeniu Eh poniżej -50 mV i wyczerpaniu akceptorów korzystniejszych energetycznie. Doświadczenia innych autorów wskazują, że emisja CH_4 w glebie zalanej zachodzi przy wartościach Eh niższych od -150 mV, chociaż proces ten obserwowano nawet w zakresie od $+70$ do 0 mV [192,227,311].

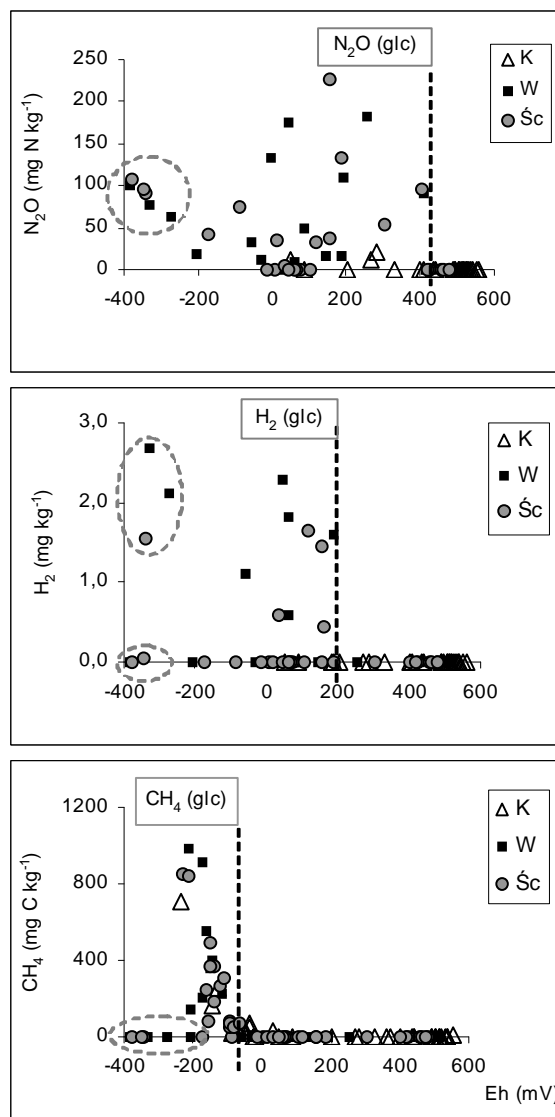
Spora zbieżność omawianych wielkości granicznych Eh dla obecności analizowanych gazów nad powierzchnią gleby z danymi literaturowymi dowodzi, że bez względu na warunki zastosowanej inkubacji i znaczną heterogenność układu glebowego, opisane relacje mają charakter uniwersalny determinowany względami energetycznymi dominującej reakcji redoks. Zgodność taką obserwowano też w przypadku Fe, zredukowanego przy potencjale redoks niższym od $+300$ mV (patrz rys. 53).

Punkty w zakresie Eh od -300 do -400 mV, otoczone liniami na rysunku 57 odpowiadają wynikom początkowego okresu inkubacji. Położenie punktów sugeruje, że o wartości mierzonego potencjału decydowały wówczas pary redoks inne od oznaczanych. Sytuacja ta wydaje się być oczywista biorąc pod uwagę intensywność procesów biochemicznych w glebie wzbogaconej glukozą. Wartości potencjałów standardowych wybranych układów redoks istotnych dla procesów biologicznych zachodzących w glebie ilustruje tabela 18.

Tabela 18. Potencjały standardowe niektórych układów biogeochemicznych (wartości korygowane do pH 7, w 25°C) [106,122,241,277,278,279]

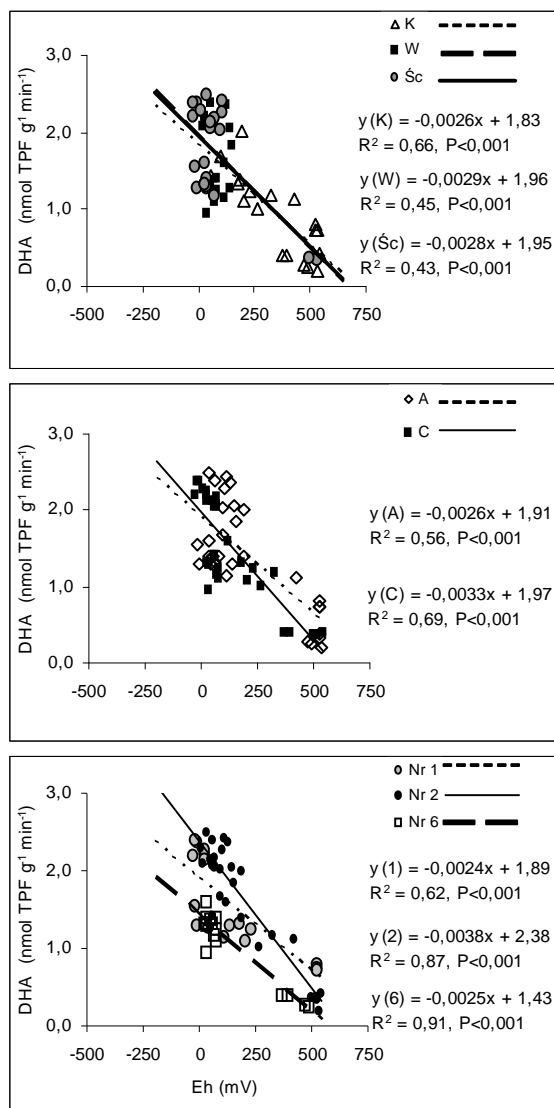
Table 18. Standard potential of selected redox systems important for biogeochemical transformations in soil (corrected to pH 7 at 25°C) [106,122,241,277,278,279]

Układ – System	E_0' (V)
Bursztynian / α -ketoglutaran – Succinate / α -ketoglutarate	$-0,67$
Octan /aldehyd octowy – Acetate /acetic aldehyde	$-0,60$
$2\text{H}^+ / \text{H}_2$	$-0,42$
$\text{NAD}^+ / \text{NADH} + \text{H}^+$	$-0,32$
$\text{NADP}^+ / \text{NADPH} + \text{H}^+$	$-0,32$
Fe(III) / Fe(II)	$-0,31$ do $+0,43$
$\text{CO}_2 / \text{CH}_4$	$-0,25$
Substancje humusowe – Humic substances	$-0,20$ do $+0,30$
Aldehyd octowy /etanol – Acetic aldehyde /ethanol	$-0,20$
Pirogronian /mleczan – Pyruvate /lactate	$-0,19$
Cytochromy – Cytochromes	$+0,12$ do $+0,29$
Chinon /hydrochinon – Chinone /hydroquinone	$+0,28$
$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	$+0,42$
$\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O}$	$+0,82$



Rys. 57. Równowagowa ilość N_2O (w obecności acetylenu), H_2 i CH_4 w powietrzu nad glebą w funkcji Eh (próbki wzbogacone glukozą, $6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). Wpływ aktualnych warunków inkubacji (K, W, Śc). Liniami otoczono dane z 1 i 3 dnia inkubacji

Fig. 57. Equilibrium content of N_2O (in the presence of acetylene), H_2 and CH_4 in soil headspace versus Eh of soil samples amended with glucose (6 mg g^{-1}). Effect of the incubation conditions (K, W, Śc). Results from 1st and 3rd day of incubation, encircled



Rys. 58. Aktywność dehydrogenaz w funkcji Eh w próbkach wzbogaconych glukozą. Wpływ warunków inkubacji, systemu nawodnień oraz właściwości gleby (odpowiednio górny, środkowy i dolny wykres)

Fig. 58. Dehydrogenase activity versus Eh in glucose-amended soil samples. Effect of incubation conditions, irrigation system and soil properties (upper, middle and lower graph, respectively)

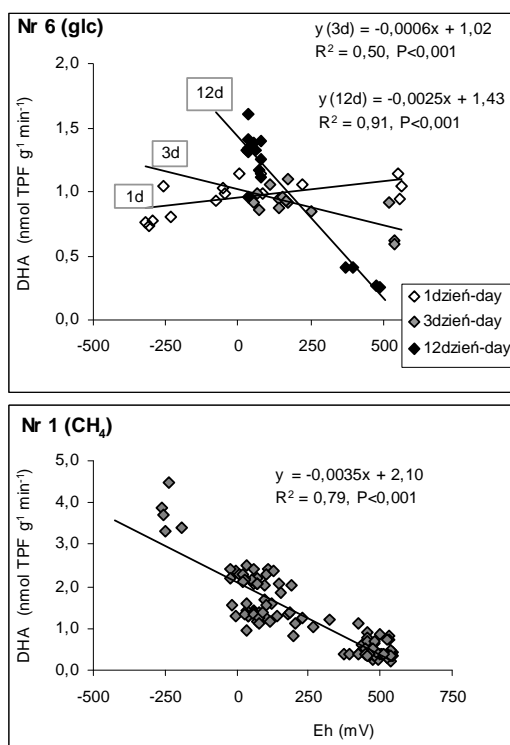
Zróznicowanie warunków redoks wskutek wprowadzenia glukozy umożliwiło zaobserwowanie istotnej zależności aktywności dehydrogenaz od Eh gleby (rys. 58). Poprzednio wspomniano, że podobna zależność jest typowa dla aktywnych biolo-

gicznie gleb w warunkach niedotlenienia. W przypadku doświadczenia bez udziału czynnika silnie modyfikującego metabolizm, intensywność procesów redukcji była niewystarczająca dla wymaganego obniżenia Eh. Dodanie 'łatwego' źródła energii spowodowało aktywację dehydrogenaz wraz z postępującą redukcją gleby.

Rysunek 58 przedstawia relacje pomiędzy aktywnością dehydrogenaz i potencjałem redoks, jakie wynikały z wprowadzenia glukozy do gleby. Pominięte zostały dane dotyczące pierwszego i trzeciego dnia inkubacji, ponieważ – podobnie jak w przypadku omawianych wyżej relacji dotyczących gazów – gwałtowne obniżenie Eh charakteryzujące stan przejściowy nie znajdowało odzwierciedlenia w reakcji dehydrogenaz. Te same wyniki przedstawione zostały w trzech układach. Górny wykres porównuje relację DHA i Eh w różnych warunkach inkubacji próbek: wilgotność 60% WHC (K), próbka zalana wodą (W), próbka zalana ściekami (Śc). Wykres środkowy przedstawia te zależności w glebach różnie nawadnianych: kontrolnej (A) i zalewane ściekami (C), a dolny wykres: w glebach pobranych z pól porośniętych topolą (nr 1), wierzwą (nr 2) i trawami (nr 6). Aktywność enzymów silnie korelowała z potencjałem redoks w każdym układzie, a zależności były istotne dla wszystkich wariantów doświadczenia ($P < 0,001$). Relacja była nieco słabiej różnicowana przez warunki inkubacji (proste dla wariantów W i Śc niemal pokrywające się), nieco silniej przez sposób nawadniania gleby, a najsilniej przez właściwości samego utworu glebowego. Kierunek zmian poziomu aktywności biologicznej pod wpływem kilkuletnich nawodnień ściekami nie zakłócał zatem obserwowanej relacji.

Przy takim samym stanie zredukowania gleby (< 100 mV), gleby torfowo-murszowe porośnięte topolą (nr 1) i wierzwą (nr 2) osiągały nawet o 50% wyższe wartości DHA, niż gleba mineralno-murszowa porośnięta trawami (nr 6). Aktywność maksymalna towarzyszyła niskim wartościom Eh w próbkach zalanych wodą lub ściekami. W trakcie 12-dniowej inkubacji z glukozą potencjał redoks pozostawał pomiędzy +550 mV i -50 mV. W tych warunkach próbki o niższej wilgotności odpowiadającej 60% WHC, przy $Eh > 300$ mV wykazywały względnie niską aktywność, zaś próbki zalane wodą i ściekami charakteryzowały się najwyższą aktywnością DHA, towarzyszącą niskim wartościom Eh.

Relacje DHA i Eh zmieniały się w czasie inkubacji z glukożą, odzwierciedlając przemiany zachodzące w układzie glebowym (rys. 59, górny wykres). Wyodrębnione grupy odpowiadają wybranym okresom inkubacji (1, 3, 12 dzień). W fazie początkowej czynność dehydrogenaz nie odzwierciedlała jeszcze gwałtownego obniżenia potencjału w próbkach zalanych. Prosta, wyznaczająca zależność DHA od Eh po jednym dniu, wykazuje lekką tendencję rosnącą (zależność nieistotna, prosta zaznaczana dla zilustrowania zmian). Po trzech dniach aktywność dehydrogenaz wzrastała lekko, lecz istotnie przy niższych wartościach Eh, a po 12 dniach adaptacja drobnoustrojów do zróżnicowanych warunków znalazła odzwierciedlenie w silnej ujemnej korelacji pomiędzy aktywnością dehydrogenaz i Eh ($P < 0,001$).



Rys. 59. Aktywność dehydrogenaz w funkcji Eh. Zmiana relacji w czasie inkubacji gleby z dodatkiem glukozy (górny wykres) oraz zależność obserwowana w warunkach hypoksji wywołanej utlenieniem dodanego CH₄ (dolny wykres)

Fig. 59. Soil dehydrogenase activity versus Eh. The shift in the relation with time in soil amended with glucose (upper graph), and the relation under soil hypoxia induced by CH₄ oxidation (lower graph)

Obniżenie potencjału redoks i ujawnienie wzrostu czynności dehydrogenaz w warunkach hypoksji i anoksji obserwowano również w glebie inkubowanej z dodanym metanem. Utlenienie CH₄, wiążące się z wykorzystaniem tlenu przez metanotrofy prowadziło pod koniec inkubacji do obniżenia Eh nawet do – 200 mV. Wraz z obniżaniem potencjału redoks gleby następowała stymulacja dehydrogenaz (rys. 59, dolny wykres).

Wzbogacenie gleby niewielką ilością glukozy (1 mg·g⁻¹) wywołało jedynie krótkotrwałe nasilenie metabolizmu (patrz rys. 21). Przy relatywnie wysokiej wyjściowej biomase badanych gleb (C_{mic} ok. 3 mg·g⁻¹), drobnoustroje stosunkowo szybko wyczerpały wprowadzony substrat. Dehydrogenazy uległy początkowemu wzrostowi, lecz wkrótce powróciły do wartości kontrolnych. Potencjał redoks po 12 dniach inkubacji niewiele przy tym różnił się od wartości w próbkach bez wzbog-

gacenia (odpowiednio 526 mV i 533 mV). Dopiero silny bodziec – wysokie stężenie glukozy – prowadził do dynamicznych przemian angażujących te szlaki kataboliczne, które nie zostały uruchomione podczas utleniania natywnych substratów oraz wywołał szereg procesów związanych z redukcją gleby. Intensywne utlenianie wprowadzonego substratu wymagało akceptorów dla uwolnionych jonów wodorowych i elektronów, obserwowano więc nie tylko silny wzrost biomasy mikroorganizmów (nawet 5-krotny), ale też stymulację respiracji, dehydrogenaz, redukcję Fe, jonów wodorowych, azotu, CO₂ i prawdopodobnie innych aktywnych oksydująco-redukcyjnie form organicznych i nieorganicznych. W rezultacie potencjał redoks osiągał niskie, ujemne wartości.

Pod wpływem wysokiego stężenia glukozy nastąpiło przełamanie tych barier, które w warunkach katabolizmu drobnoustrojów opartego na wykorzystaniu natywnych substratów oddechowych pozwalały na przeciwdziałanie redukcji układu. W glebie bez wzbogacenia, przy specyficznym dla danego utworu poziomie aktywności wytworzonym w wyniku przystosowania do panujących warunków troficznych obserwowano bardzo wysoką odporność na redukcję. Stan natleniony charakteryzowany przez $E_h > 400$ mV, niską redukcję Fe, wysoką aktywność katalazy i przemiany fazy gazowej typowe dla gleb natlenionych, utrzymywał się nawet w próbkach zalanych wodą lub ściekami przez okres dłuższy niż 4 tygodnie. Stosunkowo wysokie wartości E_h w zalanych wodą glebach organicznych notowali też Morris i in. [202] oraz Snyder i in. [255].

Należy zaznaczyć, że diskutowane zjawisko utrzymywania wysokiego potencjału redoks w warunkach zalania (obserwowane zarówno w glebach, które nigdy nie miały kontaktu ze ściekami, jak też w glebach systematycznie zalewanych ściekami) dotyczyło doświadczenia laboratoryjnego, przeprowadzonego po trzyletniej przerwie w zalewach. W warunkach zalewów prowadzonych w doświadczeniu polowym, w naturalnych profilach, potencjał redoks na głębokości 0-10 cm pozostawał średnio wyższy od 300 mV w glebie porośniętej wierzwą (nr 2), natomiast w glebach porośniętych topolą (nr 1) oraz trawami (nr 6) zalewanych podwójną dawką ścieków przyjmował wartość średnią niższą od +200 mV (patrz rys. 7).

Ponieważ intensywność przemian redoks wzrasta w glebach, które przed zalaniem były powietrznie suche, zostały wykonane dodatkowe testy na materiale poddanym suszeniu powietrznemu przed doświadczeniem. Testy wykazały, że czas obniżenia E_h do 300 mV – wartości przyjmowanej za graniczną dla warunków tlenowych i beztlenowych – został skrócony do 6 dni, ale tylko w glebie mineralno-murszowej, natomiast w glebie torfowo-murszowej potencjał redoks > 300 mV utrzymywał się przez ponad 35 dni. W literaturze niewiele jest danych szczegółowych dotyczących relacji pomiędzy właściwościami fizyko-chemicznymi utworów murszowych i ich aktywnością biologiczną. Dotychczasowe badania wyraźnie wskazują, że proces murszenia, którego przebieg istotnie zależy od warunków fizycznych, zmienia m.in.

właściwości powierzchniowe i fizykochemiczne gleby, co silnie modyfikuje warunki siedliskowe drobnoustrojów i wpływa na ich liczebność [62,160,193,257,309,310].

Można przyjąć, że warunki zredukowane nie wystąpią w takiej 'żyjącej' glebie zalanej, która: a) nie zawiera rozkładalnej materii organicznej; b) posiada znaczną zawartość związków o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym możliwych do wykorzystania przez drobnoustroje; i/lub c) zawiera czynniki hamujące aktywność oksydoredukcyjną mikroorganizmów. Ponieważ wzbogacenie glukożą jednoznacznie stymulowało przemiany redoks, obecność inhibitorów procesów redukcyjnych można tu zaniedbać, a rozważyć niedostateczną ilość substratów organicznych będących donorami elektronów oraz wysoką ilość akceptorów elektronów utrzymujących wysokie wartości Eh.

Badane gleby wykazywały wysoki poziom aktywności biologicznej zależnej od obecności naturalnego (natywnego) substratu organicznego i wyrażonej wskaźnikami takimi jak biomasa drobnoustrojów, aktywność dehydrogenaz i aktywność katalazy. Wydzielanie CO₂ i szybkość poboru O₂ były natomiast umiarkowane. Drobnoustroje autochtoniczne z powodzeniem rozwijały się kosztem dostępnych, obecnych w glebie związków węglowych wykazując nawet w trakcie inkubacji przyrost biomasy. W sposób charakterystyczny dla populacji większości gleb, preferowały dodany cukier prosty (glukozę), wykorzystywały też – po pewnym okresie adaptacji – również metan, a nawet acetylen. Warunki troficzne panujące w testowanych glebach umożliwiały zatem rozwój populacji drobnoustrojów heterotroficznych potencjalnie odpowiedzialnych za procesy redukcji oraz za przebieg wewnątrzkomórkowych procesów utleniania biologicznego (widoczny w wysokiej aktywności oksydoreduktaz), lecz nie miało to przełożenia na przepływ elektronów w roztworze glebowym, czyli szybki pobór tlenu i obniżenie wartości Eh. Przyjmuje się, że związkami utrzymującymi w glebie potencjał redoks na poziomie ok. 400 mV są azotany(V), zaś ok. 300 mV – utlenione formy żelaza, zabezpieczające (*buforujące*) glebę przed gwałtowną redukcją [106,207,229,264,271]. Zawartość NO₃⁻ w zakresie od 12 do 114 mg N·kg⁻¹ (patrz tab. 2) nie była jednak na tyle wysoka, żeby przy obserwowanym poziomie aktywności biologicznej zapobiegać obniżeniu Eh w czasie 4-tygodniowego zalania. W czasie inkubacji próbek bez wzbogacenia glukożą nie obserwowano szybkiego wyczerpania tlenu, wyraźnego ubytku azotanów (dane nie zostały przedstawione graficznie), ani też stałego przyrostu Fe⁺².

Wysoka aktywność dehydrogenaz zazwyczaj istotnie koreluje z zawartością substratu organicznego i informuje o wzmożonej aktywności redoks drobnoustrojów heterotroficznych prowadzącej do wyczerpania tlenu i obniżenia Eh wskutek uruchamiania kolejnych par redoks. W przypadku omawianych gleb wskazuje raczej na złożoność metabolizowanego substratu oddechowego i jego wydajność energetyczną. Zjawisko to dotyczyło zarówno gleb pobranych z pól kontrolnych, jak też zalewanych ściekami. Biorąc jednak pod uwagę znaczenie wewnątrzkomór-

kowych procesów redoks dla funkcjonowania komórki wydaje się, że bardziej dokładne rozpoznanie tego zagadnienia może być ciekawe. Drobnoustroje heterotroficzne wymagają w równym stopniu źródła energii (zredukowanego związku organicznego) jak też ostatecznego, zewnętrznego akceptora protonów i elektronów uwolnionych w trakcie utleniania. W sytuacji braku odpowiedniego akceptora następuje bowiem nadmierne nagromadzenie form zredukowanych w komórce (takich jak NADH, NADPH), prowadzące do jej zatrucia i śmierci. W metodzie pozwalającej na oznaczenie aktywności dehydrogenaz glebowych rolę takiego akceptora pełni związek chemiczny wprowadzony w formie utlenionej (TTC). Jego intensywne redukcja do barwnego formazanu (TPF) w przypadku badanych gleb świadczy o tym, że ilość uwalnianych protonów i elektronów była znaczna. Mimo to potencjał redoks pozostawał relatywnie wysoki. Ponieważ poziom aktywności dehydrogenaz gleb mineralnych zazwyczaj jest kilkukrotnie niższy, a tempo zmian Eh bardziej intensywne, niż tutaj obserwowane, można rozważyć możliwość przekazywania uwalnianych elektronów na akceptory inne, niż O_2 , NO_3^- i Fe(III). Prawdopodobne wydaje się, że w obszarach wykazujących niedotlenienie funkcje takie mogą pełnić pewne związki humusowe, zawierające w cząsteczkach ugrupowania możliwe do zredukowania, np. chinonowe i ketonowe.

Substancje humusowe tworzą mieszaninę związków organicznych o różnym stopniu przekształcenia. Wielkością opisującą charakter tych związków, ich pochodzenie i warunki humifikacji może być stopień utlenienia wewnętrznego, wyznaczany na podstawie zawartości atomów O, N, H i C w cząsteczkach. Dla kwasów izolowanych z gleb, wermikompostów i osadów wskaźnik ten przybierał wartości od $-0,097$ do $+0,327$, co podkreśla ogromne zróżnicowanie substancji humusowych [109,135,138,193,217]. Odmienne kierunki zmian właściwości kwasów humusowych (zawartość C, N, O, H, kwasów huminowych i fulwowych, udział struktur aromatycznych i alifatycznych w cząsteczkach) obserwowano w glebie płowej nawadnianej ściekami krochmalniczymi zależnie od sposobu użytkowania gleby i stosowanej dawki ścieków [110]. Rola związków humusowych w określaniu potencjału redoks nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Substancje te są aktywne oksydoredukcyjnie, wykazując przy swym silnym zróżnicowaniu bardzo szeroki zakres standardowego potencjału redoks w pH 7 od $-0,20$ V do $+0,30$ V [277]. Struyk i Sposito [278] analizowali właściwości redoks kwasów humusowych (HA) izolowanych z gleby, torfu i wody rzecznej. Formalny potencjał redoks kwasów w pH 5 wynosił $0,778$ V, a właściwości utleniające wzrastały według kolejności: glebowy-HA < torfowy-HA < rzeczny-HA. Gu i Chen [114] podają dla związków humusowych zakres potencjału redoks od $-0,90$ do $+0,80$ V.

Substancje humusowe pełnią rolę zarówno donorów jak i akceptorów elektronów w metabolizmie drobnoustrojów [139,178]. Niewielkie cząsteczki stanowią tzw. zewnątrzkomórkowe przenośniki elektronów (*electron shuttles*), wykazujące

możliwość wielokrotnego przechodzenia cykli redoks dzięki regeneracji wskutek mikrobiologicznego lub abiotycznego utlenienia z udziałem O_2 , Fe(III), azotanu(V), fumaranu, arsenianianu lub selenianu. Zauważa się opinię, że stosunkowo odporne na rozkład biologiczny frakcje substancji humusowych biorą w ten sposób udział w przemianach energetycznych drobnoustrojów [25,57,122,138,179,244]. Nie jest jeszcze znana skala i znaczenie tych procesów w środowisku glebowym, przypuszczalnie zewnątrzkomórkowe przenośniki elektronów mogą pełnić istotną rolę na przykład wewnątrz bogatych w substancję organiczną agregatów posiadających typową strefę beztlenową wewnątrz i natlenioną strefę zewnętrzną. Związki zredukowane we wnętrzu agregatu glebowego dyfundują ku jego stronie zewnętrznej, gdzie pełnią rolę donora elektronów dla procesów takich jak denitryfikacja. Redukcja substancji humusowych i chinonów może okazać się istotną formą metabolizmu mikroorganizmów w środowiskach bogatych w substancję organiczną, szczególnie w warunkach beztlenowych [177,178,225]. Większość tych badań to doświadczenia *in vitro* z substancjami humusowymi modelowymi oraz izolowanymi z wód i gleb. Natomiast niewiele jeszcze wiadomo o wpływie tych związków na właściwości oksydoredukcyjne w środowisku gleby.

4.3.11. Podsumowanie wyników doświadczenia na próbkach glebowych

Przeprowadzenie badań modelowych na próbkach glebowych wydawało się konieczne, ponieważ badania polowe i doświadczenie na monolitach wielu kwestii nie wyjaśniły. Dopiero szczegółowe badania modelowe na materiale glebowym z rozszerzonym zakresem oznaczanych wskaźników pozwoliły na wyjaśnienie rozbieżności i wskazanie przyczyny niejednakowych zmian w aktywności enzymów glebowych, jakie obserwowano w doświadczeniu polowym pod różnymi roślinami, a także nietypowych relacji pomiędzy aktywnością oksydoreduktaz i potencjałem redoks. Hipoteza postawiona we wstępie pracy, mówiąca o trudności precyzyjnego określenia relacji pomiędzy aktywnością biologiczną a czynnikami na nią wpływającymi w warunkach polowych została potwierdzona.

W doświadczeniu na próbkach glebowych wykorzystano materiał z wierzchnich warstw gleb organicznych, pobrany po upływie trzech lat od zaprzestania nawodnień ściekami z tych samych miejsc, które uwzględniono w badaniach polowych i monolitowych.

Szczegółowa analiza materiału glebowego ujawniła silne przekształcenia w siedlisku drobnoustrojów powstałe w wyniku czteroletnich nawodnień wysoką dawką ścieków (120 cm rocznie). Zaznaczone niżej zmiany, odniesione do gleb kontrolnych, zauważalne były po trzyletniej przerwie w nawodnieniach.

W wierzchniej warstwie gleby torfowo-murszowej porośniętej topolą (nr 1) nawadnianie ściekami spowodowało pogorszenie warunków bytowania drobnoustrojów:

- osłabienie aktywności opartej na wykorzystaniu natywnych substratów organicznych, mierzone obniżeniem:
 - biomasy drobnoustrojów heterotroficznych o 19%,
 - wskaźnika C_{mic}/C_{org} o 35%,
 - aktywności dehydrogenaz o 16%,
 - aktywności katalazy o 12%,
 - wydzielania N_2O w obecności acetyleny o 19%;
- podwyższenie współczynnika metabolicznego qCO_2 o 44% (bez przekroczenia jego wartości krytycznej);
- wyższą w stosunku do kontroli aktywność potencjalną (indukowane glukozą dehydrogenazy, metanogeneza, mineralizacja netto glukozy).

W wierzchniej warstwie gleby torfowo-murszowej porośniętej wierzbą (nr 2) nawadnianie ściekami spowodowało poprawę warunków rozwoju drobnoustrojów:

- podwyższenie aktywności opartej na wykorzystaniu substratów natywnych:
 - biomasy drobnoustrojów heterotroficznych o 84%,
 - wskaźnika C_{mic}/C_{org} o 67%,
 - aktywności dehydrogenaz o 7%,
 - aktywności katalazy o 13%,
 - wydzielania N_2O w obecności acetyleny o 132%;
- obniżenie wskaźnika qCO_2 o 25%;
- niższą w stosunku do kontroli aktywność potencjalną (indukowane glukozą dehydrogenazy, metanogeneza, mineralizacja netto glukozy).

Wierzchnia warstwa gleby mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6) nawadnianej ściekami, wykazywała po trzyletniej przerwie w nawadnianiu zmiany korzystne:

- podwyższenie aktywności opartej na wykorzystaniu substratów natywnych:
 - biomasy drobnoustrojów heterotroficznych o 26%,
 - aktywności dehydrogenaz o 18%,
 - wydzielania N_2O (9-krotne);
- utrzymanie wartości wskaźników C_{mic}/C_{org} , qCO_2 , aktywności katalazy oraz aktywności potencjalnej (z wyjątkiem wydzielania metanu pod wpływem glukozy) na poziomie obserwowanym w glebie kontrolnej.

Tabela 19 systematyzuje wyniki z doświadczenia na próbkach glebowych oraz podkreśla spójność informacji otrzymanych z przeprowadzonych oznaczeń. Właściwości uporządkowano według 'układu' wskaźników w glebach różnie nawadnianych

– kontrolnych (A) i nawadnianych ściekami (C). Dla każdej gleby wskazano ten wariant nawadniania, w którym dany wskaźnik był istotnie wyższy.

Tabela 19. Porównanie wskaźników aktywności biologicznej w wierzchnich warstwach gleb kontrolnych (A) i nawadnianych ściekami (C). Dla gleb porośniętych topolą (nr 1), wierzbą (nr 2) i trawami (nr 6) wskazano ten wariant nawadniania (A lub C), w którym dany wskaźnik był istotnie wyższy; = oznacza brak istotnej różnicy pomiędzy wariantami A i C; szarym kolorem zaznaczono wskaźniki oznaczane w obecności glukozy

Table 19. The comparison of soil biological indices in surface layers of control soils (A) and soils irrigated with wastewater (C). For soils planted with poplar (No.1), willow (No.2) or grasses (No.6), that variant of soil irrigation (A or C) was denoted, which showed significantly higher value of the index; = means no significant difference between variants A and C; in grey – results in the presence of glucose

Grupa	Wskaźnik – Index	Gleba – Soil		
		Torfowo-murszowa Peat-muck		Mineralno- murszowa Mineral-muck
		Nr 1	Nr 2	Nr 6
1)	DHA	1A	2C	6C
	Biomasa drobnoustrojów – Microbial biomass	1A	2C	6C
	Katalaza – Catalase	1A	2C	=
	C_{mic}/C_{org}	1A	2C	=
	Emisja N_2O – Emission N_2O (Ac) ^a	1A	2C	6C
	Redukcja gleby – Soil reduction (glc)	1A	2C	6C
	Emisja H_2 – Emission H_2 (glc)	1A	2C	=
	$\Delta C_{mic} = \% C_{org}$	1A	=	6C
2)	qCO_2	1C	2A	=
	Emisja CH_4 – Emission CH_4 (glc)	1C	2A	6C
	DHA (glc)	1C	2A	=
	Mineralizacja netto glukozy – Net glucose mineralization	1C	2A	=
3)	ΣCO_2 mg C·kg ⁻¹ (12 d) ^b	1C	2C	6C
	Pobór O_2 – Uptake O_2 (12 d) ^b	1C	2C	6C
	Utlenczenie CH_4 – Oxidation CH_4 (tempo-rate)	1C	2C	6C
	Pobór O_2 – Uptake O_2 (glc)	1C	2C	6C
	Sorpcja H_2 – Sorption H_2 (glc)	1C	2C	6C
	Emisja N_2O – Emission N_2O (glc)	1C	2C	=
	Sorpcja N_2O – Sorption N_2O (glc)	1C	2C	=
	ΣCO_2 mg C·kg ⁻¹ (glc)	1C	=	6C
	C:N	1C	2C	6C
	RQ	=	2C	6C
	$Fe^{+2.c}$	=	=	=
	Fe^{+2} (glc) ^c	=	=	=
Odporność na redukcję – Redox resistance	=	=	=	

^a(Ac) – w obecności – in the presence of C_2H_2 ; ^b(12 d) – wartość dotycząca 12 dnia inkubacji – for 12th day of incubation; ^c– frakcja ekstrahowana – fraction extracted with 0.05 M H_2SO_4

W pierwszej grupie umieszczone zostały wielkości, które pod wpływem ścieków uległy obniżeniu w glebie pod topolą ($1A > 1C$), a podwyższeniu w glebie z uprawą wierzby ($2C > 2A$) i mieszanki traw ($6C > 6A$ lub $6C = 6A$). Grupa ta objęła uniwersalne wskaźniki aktywności drobnoustrojów glebowych: czynność dehydrogenaz i katalazy, biomasę drobnoustrojów, wskaźnik dostępności węgla C_{mic}/C_{org} , a także wydzielanie N_2O oraz intensywność procesów redukcji mierzoną obniżeniem Eh i wydzielaniem H_2 w obecności glukozy.

W drugiej grupie znalazły się współczynnik metaboliczny qCO_2 , aktywność potencjalna dehydrogenaz, metanogeneza i mineralizacja netto glukozy. Wskaźniki te przyjmowały wartości wyższe w glebie o odmiennym sposobie nawadniania (w stosunku do poprzednio wskazanego w pierwszej grupie).

Do trzeciej grupy zostały zakwalifikowane wielkości osiągające wyższe wartości we wszystkich glebach systematycznie zalewanych ściekami (C) oraz te, które nie uległy istotnej zmianie we wszystkich glebach ($A = C$). Grupa trzecia objęła aktywność respiracyjną (wydzielanie CO_2 i pobór O_2 bez dodatku glukozy jak również w jej obecności), współczynnik oddechowy RQ, aktywność metanotroficzną, denitryfikację indukowaną glukozą oraz wskaźniki, które w kombinacjach ze wszystkimi roślinami nie wykazały istotnych zmian po nawodnieniach: odporność na redukcję przy metabolizmie opartym na utlenianiu substratu natywnego i redukcję Fe. Wskaźniki te były mniej wrażliwe na nawadnianie ściekami, niż aktywność oksydoreduktaz, biomas mikroorganizmów i powstawanie N_2O w obecności naturalnego substratu.

Udział rośliny porastającej zalewaną glebę był znaczący w określaniu zmian statusu biologicznego gleby. Dobrze adaptująca się do nadmiernego uwilgotnienia wierzba sprzyjała utrzymaniu w warunkach polowych niższej wilgotności (średnia dla wierzchniej warstwy gleby zalewanej ściekami w doświadczeniu polowym 130% w/w), a obniżenie potencjału redoks o 55 mV w stosunku do kontroli było niewielkie (z 379 mV tylko do 324 mV).

Natomiast w obecności słabiej rosnącej topoli odprowadzanie nadmiaru ścieków było mniejsze, średnia wilgotność warstwy wierzchniej sięgała 190% (w/w), a obniżenie Eh w stosunku do kontroli wynosiło 234 mV, było więc silniejsze (z 435 mV do 201 mV), choć – jak na glebę systematycznie zalewaną – relatywnie niewielkie. Utrzymujące się niejednakowe warunki wodno-powietrzne w obu tych układach przyczyniły się do zróżnicowania przemian związanych z przeobrażeniem masy organicznej. Obecność wierzby zapewniała warunki wystarczające do przebiegu zmian prowadzących do udostępniania drobnoustrojom substancji organicznych – nawet w trakcie prowadzonych nawodnień. Następowwała stymulacja aktywności dehydrogenaz obserwowana już w warunkach naturalnych (o 27% – prawie czterokrotnie wyższa, niż oznaczana po trzyletniej przerwie w warunkach modelowych, o 7%). Natomiast materia organiczna zawarta w glebie porośniętej topolą podlegała przekształceniom prowadzącym do zmniejszenia dostępności węgla.

Aktywność dehydrogenaz była w tym układzie hamowana nie tylko w trakcie nawodnień (obniżenie o 57%), lecz również po trzyletnim okresie przerwy (obniżenie o 16%). Należy tu zaznaczyć, że w warunkach polowych oddziaływanie zalewów czystą wodą było znacznie słabsze niż oddziaływanie ścieków, zatem substancje dostarczane ze ściekami wywierały wpływ na przebieg procesów. Wprowadzone ze ściekami związki biogenne początkowo prawdopodobnie stymulowały czynności życiowe drobnoustrojów we wszystkich układach. W glebie pod uprawą wierzby następowała adaptacja mikroorganizmów do danych warunków troficznych i dalszy ich rozwój przy korzystnym stanie wodno-powietrznym, wystarczającym dla przeobrażenia substancji organicznej. W pozostałych glebach nastąpiło wyczerpanie łatwiej dostępnego węgla oraz, przy niekorzystnych warunkach wodno-powietrznych, utrudnienia dalszego jego uruchomienia. Dokładne określenie zmian substancji organicznej wymaga przeprowadzenia szeregu dodatkowych analiz chemicznych, dotyczących m.in. charakterystyki związków humusowych i zawartości rozpuszczalnych związków organicznych (*dissolved organic carbon*) w glebach kontrolnych, zalewanych wodą i zalewanych ściekami.

Wysoki poziom potencjalnej aktywności biochemicznej wykazany w obecności glukozy przez próbki gleby pobranej z pola obsadzonego topolą i zalewanego ściekami (nr 1C) przemawia za tym, że obniżenie biomasy drobnoustrojów i aktywności opartej na wykorzystaniu substratów naturalnych nastąpiło w tej glebie wyniku zmniejszenia dostępności związków organicznych, a nie trwałego uszkodzenia mikroflory. Możliwość taka była jednak początkowo brana pod uwagę, ponieważ test dehydrogenaz, traktowany jako czuły wskaźnik zanieczyszczenia gleby, jest często stosowany do określenia negatywnego wpływu czynników toksycznych na glebową mikroflorę w warunkach polowych i laboratoryjnych. Doświadczenia wskazują, że gleba torfowo-murszowa z uprawą topoli nie spełnia warunków, potrzebnych do pełnienia funkcji bio-filtru dla ścieków miejskich.

W trakcie prowadzonych nawodnień w doświadczeniu polowym, hamowanie aktywności dehydrogenaz pod wpływem ścieków (o 26%) obserwowano również w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6C). Jednak ze względu na inne właściwości tej gleby (np. niższą retencję wody, domieszkę frakcji mineralnych), niż właściwości gleby torfowo-murszowej z uprawą topoli, w okresie następującym po zaprzestaniu zalewów miała miejsce silna poprawa warunków wodno-powietrznych. Prawdopodobnie nastąpiła mobilizacja procesów prowadzących do udostępnienia drobnoustrojom glebowej materii organicznej. Gleba łąkowa, poprzednio zalewana ściekami, po trzyletniej przerwie w stosowaniu nawodnień wykazywała wyższą czynność dehydrogenaz, niż gleba kontrolna (o 18%).

Dane zamieszczone w tabeli 19 wskazują, że kierunek zmian aktywności dehydrogenaz przyjmował kierunek taki sam jak biomasa drobnoustrojów oraz – w glebach torfowo-murszowych – wskaźnik C_{mic}/C_{org} . Aktywność dehydrogenaz,

traktowana powszechnie jako ogólny wskaźnik aktywności oddechowej, żywotności drobnoustrojów, wrażliwości na zanieczyszczenia, okazała się być również czułym wskaźnikiem zmian nie tylko zawartości C_{org} ale też jego dostępności dla drobnoustrojów heterotroficznych.

W wyniku czteroletnich nawodnień oczyszczonymi ściekami wartość wskaźnika C:N uległa podwyższeniu w każdym układzie, lecz w glebie porośniętej topolą zmiana ta była trzykrotnie wyższa, niż w pozostałych glebach. W odniesieniu do gleb kontrolnych, w glebach zalewanych ściekami wartość C:N uległa podwyższeniu: z 16:1 do 19:1 w glebie porośniętej topolą (nr 1C), z 16:1 do 17:1 w glebie porośniętej wierzbą (nr 2C) oraz z 13:1 do 14:1 w glebie porośniętej trawami (nr 6C). Zasięg zmiany wskaźnika C:N odzwierciedlał przekształcenia zachodzące wskutek nawadniania ściekami. W przypadku gleby torfowo-murszowej z udziałem topoli, silnemu podwyższeniu wartości C:N w stosunku do kontroli towarzyszyło obniżenie tempa procesów biologicznych i inna dystrybucja węgla organicznego, niż w przypadku gleby zalewanej w uprawie wierzby.

Na szczególną uwagę zasługuje współczynnik metaboliczny qCO_2 . Wskaźnik ten zyskuje coraz większą popularność, ponieważ łącząc informacje o wielkości biomasy drobnoustrojów i aktywności oddechowej gleby, pozwala na porównanie badanych ekosystemów pod względem ich wydajności energetycznej. Wskaźnik ten wykorzystywany jest zwłaszcza w warunkach silnego zanieczyszczenia i zakwaszenia gleby, przyjmuje przy tym wartości wyższe w środowisku mniej korzystnym dla drobnoustrojów. W glebie pod topolą zalewanej ściekami wartości qCO_2 uległy podwyższeniu w stosunku do kontroli ($1C > 1A$), jednak jego wartość krytyczna, wynosząca ok. $2 \mu g C-CO_2 \cdot (mg C_{mic})^{-1} \cdot h^{-1}$, nie została przekroczona. Natomiast w glebie z uprawą wierzby wskaźnik qCO_2 uległ obniżeniu ($2C < 2A$). Wyniki te podkreślają trafność interpretacji zmian statusu biologicznego dokonanej na podstawie innych wskaźników. Zmiana ta była niekorzystna w glebie torfowo-murszowej w układzie ze słabo rosnącą topolą (przekształcenia implikujące konieczność zwiększenia natężenia procesów katabolicznych dla uzyskania energii potrzebnej do utrzymania funkcji życiowych drobnoustrojów) oraz korzystna w układzie z wierzbą (transformacje umożliwiające obniżenie aktywności oddechowej dla rozwoju populacji, czyli większą efektywność kataboliczną substratów). Różnica pomiędzy qCO_2 materiału kontrolnego i nawadnianego ściekami gleby mineralno-murszowej porośniętej trawami (nr 6) była nieistotna. Jak można przypuszczać, w glebie porośniętej trawami poprzednio zalewanej ściekami (nr 6C), w czasie trzyletniej przerwy w zalewach nastąpiły transformacje prowadzące do zbliżenia warunków siedliskowych do stanu obserwowanego w kontroli (nr 6A). Doświadczenia wykazały, że coraz częściej stosowane wskaźniki eko-fizjologiczne qCO_2 i C_{mic}/C_{org} mogą mieć zastosowanie do opisu zmian zachodzących w środowisku gleb organicznych nawadnianych ściekami.

Tendencja obniżenia różnic pomiędzy glebami kontrolnymi i zalewanymi ściekami, widoczna w aktywności dehydrogenaz we wszystkich glebach po przerwaniu zalewów (w porównaniu do różnic obserwowanych w doświadczeniu polowym), a także zmniejszenie różnic w innych wskaźnikach w przypadku gleby mineralno-murszowej (bardziej podatnej na transformacje z uwagi na obecność frakcji mineralnych) sugerują, że proces zmian właściwości biofizycznych i biochemicznych jakie nastąpiły wskutek zaprzestania nawodnień, prawdopodobnie nie został ukończony, zatem charakterystyka tych gleb po upływie następnych lat mogłaby ulec zmianie.

Powyższe rozważania dotyczyły długotrwałego wpływu 4-letnich nawodnień ściekami na aktywność biologiczną, zauważalnego jeszcze po upływie trzech lat od zaprzestania stosowania zabiegów. W krótkotrwałym, bezpośrednim kontakcie ze ściekami, podobnie jak w doświadczeniu z monolitami glebowymi, aktywność drobnoustrojów nie była hamowana. Poziom ich aktywności był taki sam lub wyższy, niż w obecności wody destylowanej – również w glebie porośniętej topolą (nr 1). Zatem właściwości gleby modyfikowane były przez długotrwałe działanie ścieków – dopiero systematyczne zalewy uwidaczniały zmiany niekorzystne. W tabeli 20 zamieszczone zostały tylko te wskaźniki, które istotnie różniły się pomiędzy wariantami gleby (próbka zalana wodą – W, próbka zalana ściekami – Śc), pozostałe wielkości pominięto.

Tabela 20. Porównanie wskaźników aktywności biologicznej w glebach organicznych inkubowanych w obecności wody (W) i ścieków (Śc). Znak równości oznacza brak istotnych różnic. Szarym kolorem zaznaczono wskaźniki oznaczane w obecności glukozy. W tabeli pominięto te wskaźniki, które we wszystkich glebach wykazywały różnice nieistotne (W = Śc)

Table 20. The comparison of soil biological indices characterizing organic soils flooded with distilled water (W) or wastewater (Śc). In grey – results in the presence of glucose. The indices not different in all soils (W = Śc) were omitted

Wskaźnik – Index	Gleba – Soil		
	Nr 1	Nr 2	Nr 6
ΣCO_2 mg C kg ⁻¹ (12 d) ^a	1Śc	2Śc	6Śc
Emisja N ₂ O – Emission N ₂ O	1Śc	2Śc	6Śc
RQ	1Śc	2Śc	6Śc
Sorpcja N ₂ O – Sorption N ₂ O (glc)	1Śc	2Śc	6Śc
Emisja N ₂ O – Emission N ₂ O (glc)	=	=	6Śc
ΣCO_2 mg C kg ⁻¹ (glc)	=	2Śc	=
Emisja H ₂ – Emission H ₂ (glc)	1W	2W	=

^awielkość dotycząca 12 dnia inkubacji – for 12th day of incubation

W próbkach zalanych ściekami obniżone było jedynie wydzielanie H₂, lecz ten aspekt aktywności, związany z gwałtownym spadkiem Eh w początkowej fazie inkubacji z glukozą, wskazuje raczej na uruchamianie innych szlaków metabolicznych, niż na hamowanie przez ścieki. Wskazane warianty doświadczalne (W, Śc)

zostały zastosowane dla oceny krótkotrwałego, bezpośredniego działania ścieków. Przedstawione w tabeli dane sugerują, że różnice obserwowane we wskaźnikach biologicznych pomiędzy tymi wariantami wynikają przede wszystkim ze stymulacji procesów produkcji i sorpcji N_2O przez azotany(V) obecne w ściekach i towarzyszące im wydzielanie CO_2 .

Początek inkubacji próbek glebowych charakteryzował się wzmożoną aktywnością dehydrogenaz i respiracją, a w próbkach o niższym uwilgotnieniu (60% WHC) także niewielkim, przejściowym obniżeniem biomasy. Zjawiska te były wynikiem naturalnej adaptacji drobnoustrojów do nowych warunków powstałych wskutek naruszenia struktury gleby w trakcie przygotowania materiału. Następnie wartości qCO_2 i $qDHA$ ulegały obniżeniu, a procesy oddechowe osiągały wartości stałe, co przy jednoczesnym przyroście biomasy drobnoustrojów wskazywało na generalnie korzystne warunki siedliskowe w badanych glebach oraz dobrą adaptację drobnoustrojów. Przyrost biomasy drobnoustrojów i obniżenie współczynników qCO_2 i $qDHA$ w czasie inkubacji obserwowano nawet w układzie z topolą (nr 1C), czyli glebie charakteryzującej się niższym poziomem aktywności biologicznej w porównaniu do gleby pobranej z pola kontrolnego.

Typ gleby oraz uprawiana roślina istotnie różnicowały wskaźniki biologiczne gleb kontrolnych, bez poprzednich zalewów ściekami – zawartość biomasy, aktywność enzymatyczną i oddechową oraz inne procesy życiowe drobnoustrojów. Niezależnie od sposobu nawadniania, gleba o wyższej biomasy drobnoustrojów prezentowała średnio wyższą aktywność dehydrogenaz, szybkość respiracji, kumulację CO_2 i pobranie O_2 , niż gleba o biomasy niższej. Proste wyznaczone dla zależności pomiędzy wskaźnikami miały podobny przebieg w glebach pobranych z poletek kontrolnych (A) i nawadnianych ściekami (C). Zatem mechanizmy regulujące metabolizm drobnoustrojów w glebach o różnej zawartości ich biomasy nie zostały istotnie zmienione. Wyraźną różnicę obserwowano tylko w zależności mineralizacji glukozy od C_{org} gleby (wydzielanie CO_2 było bardziej dynamicznie w glebach nawadnianych ściekami). Wzajemne korelacje pomiędzy oznaczanymi wskaźnikami aktywności biologicznej potwierdziły ich uniwersalny charakter dla opisu procesów biogeochemicznych zachodzących w glebie. W czasie 12-dniowej inkubacji próbek glebowych mineralizacji do CO_2 uległo 0,08-0,19% C_{org} . Zawartość C_{org} gleby determinowała nie tylko oddychanie podstawowe, ale też mineralizację glukozy.

Badane gleby charakteryzowała wysoka odporność na redukcję. Właściwość ta odpowiadała prawdopodobnie za brak typowej reakcji drobnoustrojów na pełne zalanie oraz charakterystycznej zależności pomiędzy naturalną aktywnością oksydoreduktaz i Eh na wszystkich etapach badań. Silne zwiększenie intensywności metabolizmu drobnoustrojów spowodowane wysokim dodatkiem cukru prostego wywołało przemiany specyficzne dla gleby zredukowanej, takie jak ujemne wartości Eh, uruchamianie Fe^{+2} (do $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), emisja H_2 i ostatecznie wydzielanie metanu. Obec-

ność N_2O , Fe^{+2} , H_2 i CH_4 rejestrowano przy wartościach Eh odpowiednio < 400 mV, < 300 mV, < 200 mV i < -50 mV. Graniczne wartości Eh, przy których następowało uruchamianie kolejnych układów redoks wykazywały sporą zbieżność z danymi literaturowymi dotyczącymi gleb mineralnych. Zatem bez względu na warunki zastosowanej inkubacji i znaczną heterogenność układu glebowego, opisane relacje mają charakter uniwersalny, determinowany względami energetycznymi dominującej reakcji redoks. Wraz z obniżaniem wartości Eh w czasie inkubacji gleby z wysokim dodatkiem glukozy (a także metanu), aktywność dehydrogenaz istotnie wzrastała. Brak takiej korelacji w glebach bez wzbogacenia w dodatkowe źródło energii wynikał ze specyficznych właściwości badanych gleb, pozwalających na utrzymanie wysokiego potencjału redoks w trakcie kilkutygodniowego zalania pomimo wysokiej aktywności oksydoreduktaz i wykorzystania utlenianego substratu organicznego do rozwoju populacji (zwiększanie biomasy drobnoustrojów, C_{mic}).

Materiał wierzchnich warstw badanych gleb organicznych wykazywał stosunkowo wysoki poziom biomasy drobnoustrojów i aktywności oksydoreduktaz oraz umiarkowaną aktywność oddechową. Ponadto wszystkie gleby nawadniane ściekami utrzymały cechy istotne przy systematycznym stosowaniu nawodnień, takie jak aktywność metanotroficzna, zdolność przeprowadzania całkowitej denitryfikacji do N_2 oraz odporność na redukcję. Cechy te wskazują na przydatność badanych gleb do nawodnień ściekami pod warunkiem utrzymania odpowiednich stosunków wodno-powietrznych gleby i niskiej zawartości substancji organicznej w ściekach. Zastrzeżenie budzi niekorzystne dla środowiska podwyższenie emisji CO_2 utrzymujące się po zaprzestaniu nawodnień we wszystkich glebach.

Przeprowadzone doświadczenia polowe i modelowe wykazały konieczność kontynuacji badań w celu wyjaśnienia następujących problemów:

- roli związków humusowych oraz połączeń mineralno-organicznych w kształtowaniu właściwości redoks gleby;
- braku odzwierciedlenia intensywnego transportu elektronów w komórkach drobnoustrojów (wysoka aktywność oksydoreduktaz) w przepływie elektronów w roztworze glebowym (utrzymywanie stałego poziomu Eh);
- oddziaływania ścieków na właściwości wodne gleby (wilgotność gleby nawadnianej ściekami niekiedy wyższa od wilgotności gleby nawadnianej opadami atmosferycznymi);
- odniesienia badanych właściwości biologicznych do cech fizyko-chemicznych charakteryzujących gleby organiczne o różnym stopniu zmurszenia, takich jak zawartość oraz skład kwasów humusowych, rozpuszczalnych związków organicznych (DOC) i frakcji C_{org} o różnej podatności na utlenianie, w kontekście zmian wywołanych nawadnianiem ściekami.

5. WNIOSKI

Do oceny złożonych procesów biologicznych w glebach organicznych nawadnianych oczyszczonymi ściekami miejskimi zastosowano oryginalne kompleksowe podejście metodyczne. Dla wyjaśnienia mechanizmu zmian w glebie obserwowanych na etapie badań polowych, które zgodnie z przewidywaniami były trudne do interpretacji, przeprowadzono doświadczenia modelowe w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych na materiale glebowym w monolitach i próbkach z wierzchnich warstw. Sformułowano następujące wnioski:

1. Systematyczne czteroletnie nawadnianie gleb organicznych oczyszczonymi ściekami miejskimi istotnie wpływało na aktywność biologiczną gleby. Reakcja drobnoustrojów na nawadnianie oraz trwałość zmian po zaprzestaniu zalewów w sposób znaczący zależała od typu gleby, warstwy w profilu, dawki ścieków i uprawianej rośliny.
2. Właściwości materiału glebowego były w warunkach naturalnych i laboratoryjnych modyfikowane przez długotrwałe działanie ścieków. Działanie krótkotrwałe (bezpośrednie) ścieków niewiele różniło się od oddziaływania wody, w warunkach laboratoryjnych dotyczyło głównie stymulacji procesu denitryfikacji.
3. Analiza uzyskanych wyników z badań laboratoryjnych ujawniła silne przekształcenia materiału glebowego pobranego z wierzchnich warstw, prowadzące do zmian dostępności węgla organicznego oraz modyfikacji zawartości biomasy drobnoustrojów i ich aktywności biochemicznej. Zmiany statusu biologicznego determinowane były warunkami wodno-powietrznymi gleby w trakcie nawodnień oraz były trwałe w glebie torfowo-murszowej (korzystne w uprawie wierzby, niekorzystne w obecności topoli) i nietrwałe w glebie mineralno-murszowej porośniętej trawami (poprawa warunków ekosystemu następująca po trzyletniej przerwie w zalewach).
4. Oznaczenia laboratoryjne aktywności potencjalnej (indukowanej glukoza) wykazały, że obniżenie aktywności biologicznej materiału glebowego w wyniku stosowania nawodnień nie wynikało z toksycznego działania ścieków, lecz było efektem zmian dostępności substratu węglowego dla drobnoustrojów heterotroficznych. Jednocześnie relacje pomiędzy wskaźnikami wyznaczone dla gleb kontrolnych i gleb nawadnianych ściekami przebiegały w podobny sposób z wyjątkiem indukowanego przez glukozę wydzielania CO_2 zmienianego przez obecny C_{org} bardziej dynamicznie w glebach nawadnianych, niż kontrolnych.

5. Nawadnianie gleb ściekami spowodowało wzrost zawartości C_{org} , NH_4^+ , NO_3^- i wskaźnika C:N oraz obniżenie pH materiału z wierzchnich warstw gleb niezależnie od rośliny uwzględnionej w doświadczeniu.
6. Materiał z wierzchnich warstw badanych gleb organicznych charakteryzował się wyjątkowo wysoką odpornością na redukcję niezależnie od zmian statusu biologicznego wywołanych nawodnieniami. Pomimo wysokiego poziomu aktywności oksydoreduktaz, procesy biochemiczne oparte na utlenianiu natywnych substratów organicznych w czasie zalania wodą lub ściekami nie powodowały zmian w kierunku redukcji.
7. Przemiany redoks typowe dla próbek pobranych z aktywnych biologicznie gleb zalanych, w warunkach laboratoryjnych zachodziły pod wpływem wysokiego dodatku glukozy lub metanu. Wraz z obniżaniem Eh istotnie wzrastała aktywność dehydrogenaz, relacja ta obserwowana była niezależnie od kierunku zmiany zawartości biomasy drobnoustrojów i jej aktywności w wyniku stosowania nawodnień ściekami.
8. Ocena wskaźników aktywności biologicznej gleby wykazała, że informacje dostarczane przez te wskaźniki są spójne, uzupełniają się i dobrze opisują zmiany w ekosystemie gleby. Badania laboratoryjne wykazały, że współczynnik oddechowy qCO_2 może, obok wskaźnika C_{mic}/C_{org} , być użyteczny dla określenia zmian dostępności węgla w glebach nawadnianych ściekami. Funkcję taką może też pełnić test aktywności dehydrogenaz, traktowany dotąd głównie jako wskaźnik ogólnej aktywności biologicznej gleby, aktywności oksydatywnej i wrażliwości drobnoustrojów na zanieczyszczenie środowiska.
9. Materiał z wierzchnich warstw wszystkich gleb nawadnianych ściekami (niezależnie od zmiany biomasy drobnoustrojów i aktywności oksydoreduktaz), w warunkach laboratoryjnych wykazywał wyższą aktywność metanotroficzną, niż materiał gleb kontrolnych oraz utrzymywał zdolność przeprowadzania pełnej denitryfikacji do N_2 i wysoką odporność na redukcję. Zaprzestanie nawodnień spowodowało niekorzystne dla środowiska podwyższenie aktywności oddechowej (emisji CO_2) materiału glebowego.
10. Uzyskane wyniki badań właściwości biologicznych gleb organicznych nawadnianych oczyszczonymi ściekami miejskimi wskazują na ich przydatność do nawodnień ściekami – pod warunkiem utrzymania odpowiednich stosunków wodno-powietrznych gleby i niskiej zawartości substancji organicznej w ściekach. Korzystne efekty uzyskano na glebie z plantacją wierzby w porównaniu do innych upraw (topoli i trawy).

6. PIŚMIENNICTWO

1. **Adamson J.A., Francis A.J., Duxbury J.M., Alexander M.:** Formation of volatile organic products in soils under anaerobiosis. I. Metabolism of glucose. *Soil Biol. Biochem.*, 7, 45-50, 1975.
2. **Alef K.:** Dehydrogenase activity. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (Eds K. Alef, P. Nannipieri). Academic Press, London, 228-231, 1995.
3. **Alef K.:** Soil respiration. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (Eds K. Alef, P. Nannipieri). Academic Press, London, 214-215, 1995.
4. **Alef, K., Nannipieri, P.:** Catalase activity. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (Eds K. Alef, P. Nannipieri). Academic Press, London, 362-363, 1995.
5. **Aleksandrova L.J., Naidenova O.A.:** *Laboratory Measurements in Soil Science*. Kolos, Leningrad, 118-129, 1967.
6. **Anderson J.P.E., Domsch K.H.:** A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.*, 10, 215-221, 1978.
7. **Anderson J.P.E., Joergensen R.G.:** Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass in deciduous forest soils at different pH. *Soil Biol. Biochem.*, 29, 1033-1042, 1997.
8. **Anderson T.H.:** Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agricult. Ecosys. Environ.*, 98, 285-293, 2003.
9. **Anderson T.H., Domsch K.H.:** The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 393-395, 1993.
10. **Angelakis A.N., Marecos Do Monte M.H.F., Bontoux L, Asano T.:** The status of wastewater reuse practice in the Mediterranean basin: need for guidelines. *Wat. Res.*, 33, 2201-2217, 1999.
11. **Ann Y., Reddy K.R., Delfino J.J.:** Influence of redox potential on phosphorus solubility in chemically amended wetland organic soils. *Ecol. Engin.*, 14, 169-180, 2000.
12. **Aon M.A., Cabello M.N., Sarena D.E., Colaneri A.C., Franco M.G., Burgos J.L., Cortassa S.:** I. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. *Appl. Soil Ecol.*, 18, 239-254, 2001.
13. **Aoyama M., Angers D.A., N'Dayegamiye A.N., Bissonnette N.:** Metabolism of ¹³C-labeled glucose in aggregates from soils with manure application. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 295-300, 2000.
14. **Aronsson P., Heinsoo K., Perttu K., Hasselgren K.:** Spatial variation in above-ground growth in unevenly wastewater-irrigated willow *Salix viminalis* plantations. *Ecol. Engineer.*, 19, 281-287, 2002.
15. **Barabasz W.:** Denitryfikacja w świetle współczesnych badań mikrobiologicznych i ekologicznych. *Post. Mikrobiol.*, 1/2, 83-101, 1985.
16. **Barabasz W.:** Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. II Biotransformacja azotu glebowego. *Post. Mikrobiol.*, 31, 3-33, 1992.
17. **Baran S., Bielińska J.E., Oleszczuk P.:** Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma*, 118, 221-232, 2004.
18. **Baran S., Turski R.:** *Wybrane zagadnienia z utylizacji i unieszkodliwiania odpadów*. Wydawnictwo AR, Lublin, 1999.
19. **Barton L., Schipper L.A., Smith C.T., AcLay C.D.A.:** Denitrification enzyme activity is limited by soil aeration in a wastewater-irrigated forest soil. *Biol. Fertil. Soils*, 32, 385-389, 2000.
20. **Bartosz G.:** *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 135-199, 1995.
21. **Bauhus J., Pare D., Côté L.:** Effects of tree species, stand age and soil type on soil microbial biomass and its activity in a southern boreal forest. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1077-1089, 1998.
22. **Bell R.G.:** Studies on the decomposition of organic matter in flooded soil. *Soil Biol. Biochem.*, 1, 105-116, 1969.

23. **Bender M., Conrad R.:** Kinetics of methane oxidation in oxic soils. *Chemosphere*, 26, 687-696, 1993.
24. **Benz M., Brune A., Schink B.:** Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate reducing bacteria. *Arch. Microbiol.*, 169, 159-165, 1998.
25. **Benz M., Schink B., Brune A.:** Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermenting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4507-4512, 1998.
26. **Bernal M.P., Sánchez-Monedero M.A., Paredes C., Roig A.:** Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation in soil. *Agricult. Ecosys. Environ.*, 69, 175-189, 1998.
27. **Bielińska E.J.:** Wpływ stosowania ściółek w rzędach drzew na aktywność enzymatyczną gleby w młodym sadzie jabłoniowym. *Acta Agrophysica*, 48, 17-27, 2001.
28. **Biernacka E.:** Niekonwencjonalne metody oczyszczania ścieków. W: *Ochrona i zrównoważony rozwój środowiska wiejskiego* (Red. T. Brandyk, P. Hewełke). Wyd. SGGW, Warszawa, 247-252, 1996.
29. **Biernacka E., Jankowski K., Liwski S., Maciak F.:** Wpływ wód ściekowych przemysłu rolno-spożywczego na właściwości chemiczne i biochemiczne gleb murszowo-torfowych. *Torf Biuletyn*, 1/2, 23-36, 1993.
30. **Biernacka E., Obarska-Pempkowiak H.:** Hydrofitowe oczyszczalnie ścieków. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 477, 287-297, 2001.
31. **Bolton H. Jr., Smith J.L., Link S.O.:** Soil microbial biomass and activity of a disturbed and undisturbed shrub-steppe ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 545-552, 1993.
32. **Bowden R.D., Newkirk K.M., Rullo G.M.:** Carbon dioxide and methane fluxes by a forest soil under laboratory-controlled moisture and temperature conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1591-1597, 1998.
33. **Brake M., Höper H., Joergensen R.G.:** Land use-induced changes in activity and biomass of microorganisms in raised bog peats at different depths. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 1489-1497, 1999.
34. **Brandyk T.:** Oczyszczanie i wykorzystanie rolnicze ścieków i osadów cukrowni. Rozprawa habilitacyjna. IMUZ Falenty, 1987.
35. **Bronson K.F., Mosier A.R.:** Suppression of methane oxidation in aerobic soil by nitrogen fertilizers, nitrification inhibitors, and urease inhibitors. *Biol. Fertil. Soils*, 17, 263-268, 1994.
36. **Bryła J.:** Regulacja metabolizmu komórki. PWN, Warszawa, 1983.
37. **Brzezińska M.:** Aeration status of soil and enzyme activity. In: *Soil-Plant-Atmosphere Aeration and Environmental Problems* (Eds J. Gliński, G. Józefaciuk, K. Stahr). IA PAS, Lublin, 55-60, 2004.
38. **Brzezińska M.:** Aktywność katalazowa gleby torfowo-murszowej irygowanej wodami ściekowymi. *Acta Agrophysica*, 57, 5-14, 2001.
39. **Brzezińska M.:** Sprawozdanie merytoryczne z realizacji projektu badawczego nr 5 P06H 035 16 pt. "Aktywność biologiczna jako wskaźnik żywotności filtru glebowego podczas sorbowania biogenów ze ścieków komunalnych", 2001.
40. **Brzezińska M.:** Significance of soil enzymes in nutrient transformations. *Acta Agrophysica*, 63, 5-23, 2002.
41. **Brzezińska M.:** Wpływ wybranych czynników fizycznych na aktywność dehydrogenaz w glebach wytworzonych z lessu. Praca doktorska, IA PAN, Lublin, 1994.
42. **Brzezińska M., Kuzyakov Y., Włodarczyk T., Stahr K., Stępniewski W.:** Oxidation of methane and dehydrogenase activity in a Mollic Gleysol. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 161, 697-698, 1998.
43. **Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W.:** Dehydrogenase and catalase activity of soil irrigated with municipal wastewater. *Polish J. Environ. Studies*, 10, 307-311, 2001.
44. **Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W.:** Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1783-1790, 1998.

45. **Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., Pasztelan M.:** Dehydrogenase and catalase activity in Eutric Histosol as affected by soil temperature and water content. *Acta Agrophysica*, 35, 31-40, 2000.
46. **Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., Włodarczyk T.:** Soil dehydrogenase activity as influenced by some physical factors. In: *Monitoring and Modelling the Properties of Soil as Porous Medium* (Eds W. Skierucha, R.T. Walczak). IA PAS, Lublin, 15-22, 2005.
47. **Brzezińska M., Stępniewski W., Stępniewska Z., Przywara G., Włodarczyk T.:** Effect of oxygen deficiency on soil dehydrogenase activity (pot experiment with barley). *Int. Agrophysics*, 15, 3-7, 2001.
48. **Brzezińska M., Stępniewski W., Stępniewska Z., Przywara G., Włodarczyk T.:** Effect of oxygen deficiency on soil dehydrogenase activity in a pot experiment with triticale cv. Jago vegetation. *Int. Agrophysics*, 15, 145-149, 2001.
49. **Brzezińska M., Włodarczyk T.:** Enzymy wewnątrzkomórkowych przemian redoks (Oksydoreduktazy). W: *Metody oznaczania aktywności enzymów w glebie* (Red. S. Russel, A. Wyczółkowski). *Acta Agrophysica*, 120, Rozprawy i Monografie, 3, 11-26, 2005.
50. **Brzezińska M., Włodarczyk T., Gliński J.:** Effect of methane on soil dehydrogenase activity. *Int. Agrophysics*, 18, 213-216, 2004.
51. **Brzezińska M., Włodarczyk T., Stępniewski W., Przywara G.:** Soil aeration status and catalase activity. *Acta Agrophysica*, 117, 5 (3) 555-565, 2005.
52. **Buresh R.J., Patrick W.H.Jr.:** Nitrate reduction to ammonium in anaerobic soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41, 913-918, 1978.
53. **Burns R.G.:** *Soil Enzymes*. Academic Press, New York, 1978.
54. **Calamai L., Lozzi I., Stotzky G., Fusi P., Ristori G.G.:** Interaction of catalase with montmorillonite homoionic to cations with different hydrophobicity: effect on enzyme activity and microbial utilization. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 815-823, 2000.
55. **Caravaca F., Roldán A.:** Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. *Geoderma*, 117, 53-61, 2003.
56. **Casida L.E.Jr., Klein D.A., Santoro T.:** Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, 98, 371-376, 1964.
57. **Cervantes F.J., van der Velde S., Lettinga G., Field J.A.:** Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 34, 161-171, 2000.
58. **Chan A.S.K., Parkin T.B.:** Methane oxidation and production activity in soils from natural and agricultural ecosystems. *J. Environ. Qual.*, 30, 1896-1903, 2001.
59. **Chander K., Brookes P.C., Harding S.A.:** Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 1409-1421, 1995.
60. **Chen S.K., Subler S., Edwards C.A.:** Effects of agricultural biostimulants on soil microbial activity and nitrogen dynamics. *Appl. Soil Ecol.*, 19, 249-254, 2002.
61. **Chendrayan K., Adhya T.K., Sethunathan N.:** Dehydrogenase and invertase activities of flooded soils. *Soil Biol. Biochem.*, 12, 271-273, 1980.
62. **Chmielewski K.:** The effect of habitat conditions on microbiological activity of peat soils. *Pol. Ecol. Stud.*, 17, 143-153, 1991.
63. **Cieśliński Z., Miatkowski Z., Turbiak J.:** Zmiany aktywności biologicznej w glebach mineralno-murszowych i torfowo-murszowych płytkich po wykonaniu orki agromelioracyjnej w warunkach braku wód gruntowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 460, 177-189, 1998.
64. **Conrad R.:** Soil microbial processes involved in production and consumption of atmospheric trace gases. *Adv. Microb. Ecol.*, 14, 207-250, 1995.
65. **Conrad R.:** Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, N₂O, and NO). *Microbiol. Reviews*, 60, 609-640, 1996.
66. **Cook F.J., Kelliher F.M., McMahon S.D.:** Changes in infiltration and drainage during wastewater irrigation of a highly permeable soil. *J. Environ. Qual.*, 23, 467-482, 1994.

67. **Cooke J.G., Cooper A.B., Clunie N.M.U.:** Changes in the water, soil, and vegetation of a wetland after a decade of receiving a sewage effluent. *N. Zealand J. Ecol.*, 14, 37-47, 1990.
68. **Cord-Ruwisch R., Lovley D.R., Schink B.:** Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2232-2236, 1998.
69. **D'Angelo E. M., Reddy K.R.:** Regulators of heterotrophic microbial potentials in wetland soils. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 815-830, 1999.
70. **Dassonville F., Renault P., Vallès V.:** A model describing the interactions between anaerobic microbiology and geochemistry in a soil amended with glucose and nitrate. *Eur. J. Soil Sci.*, 55, 29-45, 2004.
71. **Dąbek-Szreniawska M.:** Charakterystyka mikrobiologiczna gleb torfowo-murszowych poddanych osuszeniu i nawilżaniu. *Acta Agrophysica*, 68, 21-28, 2002.
72. **Dendooven L., Anderson J.M.:** Dynamics of reduction enzymes involved in the denitrification process in pasture soil. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 1501-1506, 1994.
73. **Dendooven L., Splatt P., Anderson J.M., Scholefield D.:** Kinetics of the denitrification process in a soil under permanent pasture. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 361-370, 1994.
74. **De Nobili M., Contin M., Mondini C., Brookes P.C.:** Soil microbial biomass is triggered into activity by trace amounts of substrate. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 1163-1170, 2001.
75. **Dick W.A., Tabatabai M.A.:** Significance and potential uses of soil enzymes. In: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management* (Eds F.B.Metting Jr). Marcel Dekker Inc., New York, 93-127, 1993.
76. **Dilly O.:** Microbial respiratory quotient during basal metabolism and after glucose amendment in soils and litter. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 117-127, 2001.
77. **Dilly O.:** Regulation of the respiratory quotient of soil microbiota by availability of nutrients. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 43, 375-381, 2003
78. **Dinesh R., Chamdhuri S.G., Sheeja T.E.:** Soil biochemical and microbial indices in wet tropical forests: Effect of deforestation and cultivation. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 167, 24-32, 2004.
79. **Elowson S.:** Willow as a vegetation filter for cleaning of polluted drainage water from agricultural land. *Biomass Bioenergy*, 16, 281-290, 1999.
80. **Falińska K.:** *Ekologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004.
81. **Felis E., Miśch K., Surmacz-Górska J., Ternes T.:** Presence of pharmaceuticals in wastewater from waste water treatment plant „Zabrze-Śródmieście” in Poland. *Arch. Ochr. Środow.*, 31, 49-58, 2005.
82. **Fiedurek J., Szczodrak J.:** Katalaza – właściwości, rola fizjologiczna i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.*, XXXVI, 71-84, 1997.
83. **Filip Z.:** International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. *Agricult. Ecosys. Environ.*, 88, 169-174, 2002.
84. **Filip Z., Kazanawa S., Berthelin J.:** Characterization of effects of long-term wastewater irrigation on soil quality by microbiological and biochemical parameters. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 162, 409-413, 1999.
85. **Filip Z., Kazanawa S., Berthelin J.:** Distribution of microorganisms, biomass ATP, and enzyme activities in organic and mineral particles of a long-term wastewater irrigated soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 163, 143-150, 2000.
86. **Filipek T. (Red.):** Opracowanie zintegrowanego systemu oczyszczania ścieków miejskich połączonego z nawadnianiem upraw przemysłowych. Raport końcowy PBZ-31-03, Lublin, 1998.
87. **Fliessbach A., Martens R., Reber H.H.:** Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 1201-1205, 1994.
88. **Fontaine S., Mariotti A., Abbadie L.:** The priming effect of organic matter: a question of microbial competition. *Soil Biol. Biochem.*, 35, 837-843, 2003.

89. **Frankenberger, W.T.Jr., Dick W.A.:** Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 945-951, 1983.
90. **Friedel K.J., Langer T., Rommel J., Siebe C., Kaupenjohann M.:** Increase in denitrification capacity of soils due to addition of alkylbenzene sulfonates. *Biol. Fertil. Soils*, 28, 397-402, 1999.
91. **Frösche T., Höper H.:** Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for *in situ* bioremediation of TNT-contaminated soils. *Chemosphere*, 50, 415-427, 2003.
92. **Furczak J.:** Wpływ minerałów ilastych i kwasu huminowego na adsorpcję i aktywność celulaz *Aspergillus niger*. *Annales UMCS, Sec. E, XLIV*, 141-150, 1989.
93. **Furczak J., Gostkowska K., Szwed A.:** Biochemical activity of the soil degraded due to long-term orchard performance and amended with organic wastes. *Polish J. Soil Sci.*, XXXIII/1, 77-86, 2000.
94. **Gao S., Tanji K.K., Scardaci S.C., Chow A.T.:** Comparison of redox indicators in a paddy soil during rice-growing season. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 66, 805-817, 2002.
95. **Garcia C., Hernandez T.:** Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biol. Biochem.*, 29, 171-177, 1997.
96. **Garcia C., Hernandez T., Costa F.:** Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 1185-1191, 1994.
97. **Garcia-Gil J.C., Plaza C., Sensie N., Brunetti G., Polo A.:** Effects of sewage sludge amendment on humin acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biol. Fertil. Soils*, 39, 320-328, 2004.
98. **Garcia-Gil J.C., Plaza C., Soler-Rovira P., Polo A.:** Long-term effects of municipal soil waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1907-1913, 2000.
99. **Ghinogeanu J., Stefanic G., Jonescu-Sisesti V.:** Influence of wastewater and composted swine-sludge on the biological properties of a reddish-brown forest soil. In: Fifth Symp. Biol. Iasi 1981, Roman Nat. Soc. Soil Sci. Bucharest, 101-106, 1984.
100. **Giller K.E., Witter E., McGrath S.:** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1389-1414, 1998.
101. **Gliński J., Brzezińska M., Włodarczyk T.:** Microbial ecology of soil porous medium. In: Soil-Plant-Atmosphere Aeration and Environmental problems (Eds J. Gliński, G., Józefaciuk, K. Stahr). IA PAS, Lublin-Stuttgart, 65-71, 2004.
102. **Gliński J., Stahr K., Stępniewska Z., Brzezińska M.:** Changes of redox and pH conditions in a flooded soil amended with glucose and nitrate under laboratory conditions. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 155, 13-17, 1992.
103. **Gliński J., Stahr K., Stępniewska Z., Brzezińska M.:** Changes of redox and pH conditions in a flooded soil amended with glucose and manganese oxide or iron oxide under laboratory conditions. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, 159, 297-304, 1996.
104. **Gliński J., Stępniewska Z., Brzezińska M.:** Characterization of the dehydrogenase and catalase activity of the soils of two natural sites with respect to the soil oxygenation status. *Polish J. Soil Sci.*, 19, 47-52, 1986.
105. **Gliński J., Stępniewska Z., Kasiak A.:** Zmiany aktywności enzymatycznej gleb w warunkach zróżnicowanej zawartości tlenu i wilgotności. *Roczn. Glebozn.*, 34, 53-59, 1983.
106. **Gliński J., Stępniewski W.:** Soil Aeration and its Role for Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
107. **Gliński J., Stępniewski W., Stępniewska Z., Ostrowski J., Włodarczyk T., Brzezińska M.:** Agroekologiczne aspekty warunków tlenowych gleb ornych. *Acta Agrophysica*, 32, 2000.
108. **Gliński J., Stępniewski W., Stępniewska Z., Włodarczyk T., Brzezińska M.:** Characteristics of aeration properties of selected soil profiles from Central Europe. *Int. Agrophysics*, 14, 17-31, 2000.
109. **Gonet S.S., Cieślewicz J.:** Differential thermal analysis of sedimentary humic acids in the light of their origin. *Environ. International*, 24, 629-636, 1998.

110. **Gonet S.S., Zawalska Z.:** Wpływ nawożenia ściekami krochmalniczymi na właściwości kwasów huminowych. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 411, 259-268, 1993.
111. **Gostkowska K., Furczak J., Domżał H., Bielińska E.J.:** Suitability of some biochemical and microbiological tests for the evaluation of the degradation degree of podzolic soil on the background of its differentiated usage. Polish J. Soil Sci., XXXI/2, 68-78, 1998.
112. **Goyal S., Chander K., Kapoor K.K.:** Effect of distillery wastewater application on soil microbiological properties and plant growth. Environ. Ecol., 13, 89-93, 1995.
113. **Grego S., Moscatelli C., Di Paolo F., Marinari S.:** Enzymatic activities and microbial biomass in Italian forest soils: tree species influence. In: Enzymes in the Environment: Activity, Application, Ecology (Ed. R.P. Dick). Oregon State University, USA, 46, 1999.
114. **Gu B., Chen J.:** Enhanced microbial reduction of Cr(VI) and U(VI) by different natural organic matter fractions. Geochim. Cosmochim. Acta, 67, 3575-3582, 2003.
115. **Gulledge J., Schimel J.P.:** Moisture control over atmospheric CH₄ consumption and CO₂ production in diverse Alaskan soils. Soil Biol. Biochem., 30, 1127-1132, 1998.
116. **Gunnison D., Engler R.M., Patrick W.H.Jr.:** Chemistry and microbiology of newly flooded soils: relationship to reservoir-water quality. Microbial Processes in Reservoirs, 3, 39-57, 1985.
117. **Guwy A.J., Martin S.R., Hawkes F.R., Hawkes D.L.:** Catalase activity measurements in suspended aerobic biomass and soil samples. Enzyme Microb. Technol., 25, 669-676, 1999.
118. **Hajnos M.:** Zastosowanie porozymetrii rtęciowej do badania struktury porowatej murszów. Acta Agrophysica, 68, 45-50, 2002.
119. **Hajnos M.:** Energia powierzchniowa i wielkości jej składowych jako parametry określające zwilżalność i stan agregacyjny wybranych minerałów ilastych i gleb. Acta Agrophysica, 17, 1999.
120. **Håkansson I., Lipiec J.:** A review of the usefulness of relative bulk density values in studies of soil structure and compaction. Soil Tillage Res., 53, 71-85, 2000.
121. **Hatano R., Lipiec J.:** Effects of land use and cultural practices on greenhouse gas fluxes in soil. Acta Agrophysica, 109, Rozprawy i Monografie, 6, 2004.
122. **Hernandez M.E., Newman D.K.:** Extracellular electron transfer. CMLS Cell. Mol. Life Sci., 58, 1562-1571, 2001.
123. **Hoeks J.U.:** Effect of leaking natural gas on soil and vegetation in urban areas. Agricultural Research Reports, 778, Wageningen, Netherlands, 27-59, 1972.
124. **Hoffmann C., Renger M., Hajnos M., Sokołowska Z., Józefaciuk G., Marschner B.:** Reactions of sewage farm soils to different irrigation solutions in a column experiment. 1. Solid phase physicochemical properties. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 162, 653-659, 1999.
125. **Hoffmann C., Savric I., Józefaciuk G., Hajnos M., Sokołowska Z., Renger M., Marschner B.:** Reaction of sewage farm soils to different irrigation solutions in a column experiment. 2. Heavy metals and their leaching. J. Plant Nutr. Soil Sci., 165, 1, 67-71, 2002.
126. **Hopkins D.W., Dundee L., Webster E.A., Šimek M.:** Biological production and consumption of nitrous oxide in soils. Eur. J. Soil Biol., 33, 145-151, 1997.
127. **Hütsch B.W.:** Methane oxidation in arable soil as inhibited by ammonium, nitrite, and organic manure with respect to soil pH. Biol. Fertil. Soils, 28, 27-35, 1998.
128. **Ilnicki P.:** Torfowiska i torf. Wyd. AR im. A Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań 2002.
129. **Insam H., Hutchinson T.C., Reber H.H.:** Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. Soil Biol. Biochem., 28, 691-694, 1996.
130. **Jäckel U., Schnell S., Conrad R.:** Effect of moisture, texture and aggregate size of paddy soil on production and consumption of CH₄. Soil Biol. Biochem., 33, 965-971, 2001.
131. **Januszek K.:** Aktywność enzymatyczna wybranych gleb leśnych Polski południowej w świetle badań polowych i laboratoryjnych. Zeszyty Naukowe AR w Krakowie, Rozprawy, 250, Kraków, 1999.
132. **Johnson J.I., Temple K.L.:** Some variables affecting the measurements of catalase activity in soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 28, 207-216, 1964.

133. **Józefaciuk G., Muranyi A., Arsova A.:** Effect of bacterial-fungi inoculation on changes in soil pore structure. *Soil Sci. Agrochem. Ecol.* XXXVII, 150-152, 2002.
134. **Józefaciuk G., Stawiński J., Świeboda R., Gliński J., Filipek T., Dechnik I.:** Decontamination of waste waters and soils from heavy metals using artificial aluminosilicate sorbents. *Quaderni*, 96, 41-46, 1994.
135. **Kalembasa S., Kalembasa D., Makowiecki K., Godlewska A.:** Elemental composition and spectrophotometric characteristics of humic acids extracted from vermicomposts. *Polish J. Soil Sci.*, XXVII, 93-101, 1994.
136. **Kandeler E., Kampichler C., Horak O.:** Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biol. Fertil. Soils*, 23, 299-306, 1996.
137. **Kandeler E., Tschirko D., Wessolek G.:** Reaktion der Bodenmikroorganismen auf Kontamination im Boden. In: *Bodenökologie und Bodengeneese*, TU Berlin, 26, 100-107, 1998.
138. **Kappler A., Benz M., Schink B., Brune A.:** Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47, 85-92, 2004.
139. **Kappler A., Haderlein S.B.:** Natural organic matter as reductant for chlorinated aliphatic pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 2714-2719, 2003.
140. **Kester R.A., Meijer M.E., Libochant J.A., De Boer W., Laambroek H.J.:** Contribution of nitrification and denitrification to the NO and N₂O emission of an acid forest soil, a river sediment and a fertilized grassland soil. *Soil Biol. Biochem.*, 29, 1655-1664, 1997.
141. **Kim D. Y., Burger J.A.:** Nitrogen transformations and soil processes in a wastewater-irrigated, mature Appalachian hardwood forest. *Forest Ecol. Management*, 90, 1-11, 1997.
142. **Kirk G.:** *The Biogeochemistry of Submerged Soils*. John Willey and Sons, Ltd, 2004.
143. **Klüber H.D., Lechner S., Conrad R.:** Characterization of populations of aerobic hydrogen-oxidizing soil bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 16, 167-176, 1995.
144. **Konecka-Betley K. i Czepińska-Kamińska D.:** Differentiation in the content of organic matter in hydrogenic soils of various degrees of transformation. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 406, 95-104, 1993.
145. **Koper J., Piotrowska A.:** Aktywność enzymatyczna gleby jako parametr jej żyzności wywołany systemem uprawy. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 467, 127-134, 1999.
146. **Koper J., Piotrowska A.:** Aktywność enzymatyczna gleby płowej w zależności od uprawy roślin w zmianowaniu i monokulturze. *Roczn. Glebozn.*, XLVII, 89-100, 1996.
147. **Koper J., Piotrowska A.:** Application of biochemical index to define soil fertility depending on varied organic and mineral fertilization. <http://www.ejpau.media.pl/series/volume6/issue1/agronomy/art-06.html>, EJPAU, *Agronomy* 6, 2003.
148. **Koper J., Piotrowska A., Siwik A.:** The index of soil fertility in a long-term experiment with crop-rotation and monoculture. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 465, 461-470, 1999.
149. **Koper J., Piotrowska A., Siwik-Ziomek A.:** Wartość enzymatycznego wskaźnika żyzności w zależności od zróżnicowanego zmianowania i nawożenia gleby. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 501, 219-225, 2004.
150. **Koper J., Siwik-Ziomek A.:** Zmiany zawartości siarki oraz aktywność dehydrogenaz glebowych w rejonie Zakładów Azotowych we Włocławku. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 476, 425-431, 2001.
151. **Kościk B.:** *Rośliny energetyczne*. Wydawnictwo AR w Lublinie, Lublin 2003.
152. **Kotowska U., Włodarczyk T.:** Przemiany mineralnych form azotu w glebie nawadnianej oczyszczonymi ściekami. *Acta Agrophysica*, 119, *Rozprawy i Monografie*, 2, 2005.
153. **Kotowski M., Stępniewska Z., Sączuk M., Kotowska U., Pasztelan M.:** Wpływ nawadniania upraw przemysłowych ściekami miejskimi na zmiany stężeń pierwiastków biogenych w wodach glebowych i drenarskich. *Acta Agrophysica*, 22, 93-113, 1999.
154. **Kowalczyk Z.:** Badanie procesów rozkładu substancji węglowych gleb torfowych o różnym stopniu zmurszenia. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 146, 139-162, 1973.

155. **Kucharski J.:** Relacje pomiędzy aktywnością enzymów a żyznością gleby. W: *Drobnoustrój w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie* (Red. W. Barabasz). AR Kraków, 327-347, 1997.
156. **Kucharski J., Jastrzębska E., Wyszowska J., Hłasko A.:** Wpływ zanieczyszczenia gleby olejem napędowym i benzyną ołowiową na jej aktywność enzymatyczną. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 472, 457-464, 2000.
157. **Kucharski J., Niewolak T.:** Wpływ systemu uprawy roślin zbożowych na aktywność enzymów glebowych. W: *Drobnoustrój w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie* (Red. W. Barabasz). AR Kraków, 349-356, 1997.
158. **Kucharski J., Wyszowska J.:** Microbiological properties of soil contaminated with diesel oil. *Acta Agrophysica*, 54, 113-120, 2001.
159. **Kuczewski K., Nowak I.:** Zanieczyszczenie mikrobiologiczne gleby na terenie roślinnoglebowej oczyszczalni ścieków. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 475, 147-154, 2001.
160. **Kulińska D., Jaśkowska H.:** Microbiological activity in hydrogenic soils of various degrees of transformation. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 406, 105-110, 1993.
161. **Kümmerer K., Al-Ahmad A., Mersch-Sundermann V.:** Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. *Chemosphere*, 40, 701-710, 2000.
162. **Kuono K., Wu J., Brookes P.C.:** Turnover of biomass C and P in soil following incorporation of glucose or ryegrass. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 617-622, 2002.
163. **Kurtz D.M.Jr., Coulter W.D.L.:** Bacterial non-heme iron proteins and oxidative stress. *Chemtracts-Inorg. Chemistry*, 14, 407-435, 2001.
164. **Küsel K., Wagner C., Trinkwalte T., Gößner A.S., Bäumler R., Drake H.L.:** Microbial reduction of Fe(III) and turnover of acetate in Hawaiian soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 40, 73-81, 2002.
165. **Kutera J.:** Wykorzystanie ścieków w rolnictwie. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1988.
166. **Kuzyakov Y., Friedel J.K., Stahr K.:** Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1485-1498, 2000.
167. **Ladd J.N.:** Origin and range of enzymes in soil. In: *Soil Enzymes* (Ed. R.G. Burns). Academic Press, New York, 51-96, 1978
168. **Large P.J.:** Methylophony and Methanogenesis. *Aspects of Microbiology*, 8. American Society for Microbiology. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., 1983.
169. **Lavahun M.F.E., Joergensen R.G., Meyer B.:** Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. *Biol. Fertil. Soils*, 23, 38-42, 1996.
170. **Leirós M.C., Trasar-Cepeda C., Seoane S., Gil-Sotres F.:** Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): general parameters. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 733-745, 2000.
171. **Leita L., Nobili M.De., Mondini C., Muhlbachova G., Marchiol L., Bragato G., Contin M.:** Influence of inorganic and organic fertilization on soil microbial biomass, metabolic quotient and heavy metal bioavailability. *Biol. Fertil. Soils*, 28, 371-376, 1999.
172. **Le Mer J., Roger P.:** Production, oxidation, emission and consumption of methane in soils: A review. *Eur. J. Soil Biol.*, 37, 25-50, 2001.
173. **Lin Q., Brookes P.C.:** An evaluation of the substrate-induced respiration method. *Soil Biol. Biochem.*, 31, 1969-1983, 1999.
174. **Lin Q., Brookes P.C.:** Comparison of methods to measure microbial biomass in unamended, ryegrass-amended and fumigated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 7, 933-939, 1996.
175. **Lipiec J., Hatano R.:** Quantification of compaction effects on soil physical properties and crop growth. *Geoderma*, 1992, 1-30, 2003.

176. **Lipiec J., Stępniewski W.:** Effect of soil compaction and tillage systems on uptake and losses of nutrients. *Soil Tillage Res.*, 35, 37-52, 1995.
177. **Lovley D.R.:** Reduction of iron and humics in subsurface environments. In: *Subsurface Microbiology and Biogeochemistry* (Eds J.K. Fredrickson, M. Fletcher). Wiley Liss, Inc. 193-217, 2001.
178. **Lovley D.R., Coates J.D., Blunt E.L., Phillips E.J.P., Woodward J.C.:** Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382, 445-448, 1996.
179. **Lovley D.R., Fraga J.L., Coates J.D., Blunt-Harris E.L.:** Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.*, 1, 89-98, 1999.
180. **Luna-Guido M.L., Beltrán-Hernández, Dendooven L.:** Dynamic of ¹⁴C-labelled glucose in alkaline saline soil. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 707-719, 2001.
181. **Lomotowski J., Szpindor A.:** Nowoczesne systemy oczyszczania ścieków. Arkady, Warszawa, 1999.
182. **Magesan G.N.:** Changes in soil physical properties after irrigation of two forested soils with municipal wastewater. *New Zealand J. Forest. Sci.*, 31, 188-195, 2001.
183. **Magesan G.N., Dalgety J., Lee R., Luo J., van Oostrom A.J.:** Preferential flow and water quality in two New Zealand soils previously irrigated with wastewater. *J. Environ. Qual.*, 28, 1528-1532, 1999.
184. **Magesan G.N., Williamson J.C., Yeates G.W., Lloyd-Jones A.Rh.:** Wastewater C:N ratio effects on soil hydraulic conductivity and potential mechanisms for recovery. *Bioresource Technol.*, 71, 21-27, 2000.
185. **Malicki J., Montusiewicz A., Stelmach K.:** Stan sanitarny ścieków i wód. W: *Opracowanie zintegrowanego systemu oczyszczania ścieków miejskich połączonego z nawadnianiem upraw przemysłowych* (Red. T. Filipek). Raport końcowy PBZ-31-03, Lublin, 81-135, 1998.
186. **Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B.:** Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environ. International*, 28, 719-728, 2003.
187. **Małachowska-Jutcz A., Miksch K., Przysiał W.:** Wpływ ryzosfery rośliny motylkowej i niemotylkowej na zmiany aktywności enzymatycznej w glebie narażonej na długotrwałe działanie substancji ropopochodnych. *Inż. Ochr. Środow.*, 4, 117-130, 2001.
188. **Mamilov A.Sh., Dilly O.M.:** Soil microbial eco-physiology as affected by short-term variations in environmental conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 1283-1290, 2002.
189. **Mancinelli R.L.:** The regulation of methane oxidation in soil. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 581-605, 1995.
190. **Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F.:** Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40, 339-346, 2000.
191. **Martyniuk S., Zięba S., Maćkowiak C.:** Zależności pomiędzy aktywnością enzymatyczną gleby a plonami jęczmienia jarego w wieloletnim doświadczeniu polowym. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Konferencje, XVIII*, 332, 31-38, 1998.
192. **Masscheleyn P.H., DeLaune R.D., Patrick W.H.Jr.:** Methane and nitrous oxide emission from laboratory measurements of rice soil suspension: Effect of soil oxidation-reduction status. *Chemosphere*, 26, 251-260, 1993.
193. **Matyka-Sarzyńska D., Sokołowska Z.:** Właściwości fizykochemiczne utworów murszowych o różnym stopniu wtórnego przeobrażenia. *Acta Agrophysica*, 123, *Rozprawy i Monografie*, 6, 2005.
194. **McLain J.E.T., Martens D.A.:** Nitrous oxide flux from soil amino acid mineralization. *Soil Biol. Biochem.*, 37, 289-299, 2005.
195. **Meli S., Porto M., Belligno A., Bufo S.A., Mazzatura A., Scopa A.:** Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameters in a citrus orchard under Mediterranean conditions. *Sci. Total Environ.*, 285, 69-77, 2002.

196. **Menyailo O.V., Hungate B.A.:** Interactive effects of tree species and soil moisture on methane consumption. *Soil Biol. Biochem.*, 35, 625-628, 2003.
197. **Mercik S., Moskal S., Stępień W.:** Emisja do atmosfery podtlenku azotu (N_2O) z użytków rolnych w Polsce w aspekcie efektu cieplarnianego. *Roczn. Glebozn.*, XLVI, 135-148, 1995.
198. **Mercik S., Rumpel J., Stępień W.:** Zawartości oraz dynamika rozkładu organicznych związków węgla i azotu w zależności od wieloletniego nawożenia mineralnego i organicznego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 467, 159-167, 1999.
199. **Mercik S., Stępień W., Figat E.:** Dynamika zmian zawartości węgla i azotu w glebie oraz losy N z nawozów mineralnych i organicznych w statycznych doświadczeniach nawozowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 421, 277-283, 1995.
200. **Miksch K.:** Homeostaza heterogennych populacji mikroorganizmów czynnych w procesach oczyszczania ścieków. *Arch. Ochr. Środow.*, 3-4, 27-37, 1989.
201. **Monnett G.T., Reneau R.B Jr., Hagedorn C.:** Effect of domestic spray irrigation on denitrification rates. *J. Environ. Qual.*, 24, 940-946, 1995.
202. **Morris D.R., Gilbert R.A., Reicosky D.C., Gesch R.W.:** Oxidation potential of soil organic matter in Histosols under different tillage methods. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 68, 817-826, 2004.
203. **Muranyi A., Józefaciuk G.:** Effective microorganisms and the long-term soil quality. XXXVIII Międzynarodowe Sympozjum Mikrobiologiczne: Efektywne Mikroorganizmy (EM) w rolnictwie zrównoważonym i ochronie środowiska, Rogów k/Łodzi '2003. *Wyd. SGGW*, 85-86, 2003.
204. **Murell J.C.:** Genetics and molecular biology of methanotrophs. *FEMS Microbiology Reviews*, 88, 233-248, 1992.
205. **Myśków W.:** Wpływ głębokiej uprawy i zmianowania roślin na właściwości biologiczne gleby. *Pam. Puł.*, 90, 7-26, 1987.
206. **Nannipieri P., Sastre I., Landi L., Lobo M.C., Pietramellara G.:** Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 107-112, 1996.
207. **Neue H.U., Gaunt J.L., Wang Z.P., Becker-Heidmann P., Quijano C.:** Carbon in tropical wetlands. *Geoderma*, 79, 163-185, 1997.
208. **Niewolak S., Tucholski S.:** The effect of meadow irrigation with biologically treated sewage on the occurrence of microorganisms indicatory of pollution and sanitary pathogenic bacteria in the grass. *Polish J. Environ. Studies*, 8, 39-46, 1999.
209. **Niewolak S., Tucholski S., Piechota M., Przedziak M.:** Badania mikrobiologiczne gleb łąkowych nawadnianych biologicznie oczyszczonymi ściekami. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 477, 431-442, 2001.
210. **Niewolak S., Tucholski S., Piechota M., Przedziak M.:** Drobnoustroje czynne w obiegu azotu w glebach łąkowych nawadnianych odpływami z mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 475, 33-48, 2001.
211. **Niewolak S., Tucholski S., Radziejewska E.:** Sanitary-bacteriological evaluation of meadow soils irrigated with biologically treated sewage. *Polish J. Environ. Studies*, 11, 141-149, 2002.
212. **Nosalewicz M.:** Emisja N_2O z pól irygowanych ściekami miejskimi po II stopniu oczyszczenia. *Praca doktorska*, IA PAN, Lublin, 2003.
213. **Nosalewicz M., Stępniewska Z.:** Evolution of gases from soil irrigated with purified wastewater. In: *Monitoring and Modelling the Properties of Soil as Porous Medium*. (Eds W. Skierucha, R.T. Walczak). IA PAS, Lublin, 101-108, 2005.
214. **Obarska-Pempkowiak H., Kowalik P., Gajewska M.:** Naturalne metody oczyszczania ścieków. *Referaty problemowe, Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN*, 12, 247-263, 2002.
215. **Odum E.P.:** Trends expressed in stressed ecosystems. *Bioscience*, 35, 419-422, 1983.
216. **Okazaki M., Hirata E., Tensho K.:** TTC reduction in submerged soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 29, 489-497, 1983.

217. **Okruszko H., Kozakiewicz A.:** Humifikacja i mineralizacja jako elementy składowe procesu murszenia gleb torfowych. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 146, 63-76, 1973.
218. **Okruszko H.:** Transformation of fen-peat soils under the impact of draining. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 406, 3-73, 1993.
219. **Oron G.:** Soil as a complementary treatment component for simultaneous wastewater disposal and reuse. Wat. Sci. Technol., 34, 243-252, 1996.
220. **Pancholy S.K., Rice E.L.:** Soil enzymes in relation to old field succession: amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase and urease. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 37, 47-50, 1973.
221. **Patrick W.H.Jr.:** The role of inorganic redox systems in controlling reduction in paddy soils. Proc. Symp. Paddy Soil, Nanjing, China, 1980, Institute Soil Sci., Acad. Sinica ed., 107-117, 1981.
222. **Pawluczuk J.:** Mineralizacja związków azotu w glebach torfowych na tle zróżnicowanych warunków siedliskowych obszarów młodoglacjalnych. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 476, 243-250, 2001.
223. **Pawluczuk Z.:** Zmiany aktywności enzymatycznej gleby pod wpływem roślin uprawianych w monokulturze. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 386, 47-53, 1990.
224. **Pedrazzini F.R., McKee K.L.:** Effect of flooding on activities of soil dehydrogenase activity in rice (*Oryza sativa* L.) roots. Soil Sci. Plant Nutr., 30, 359-366, 1984.
225. **Perminova I.V., Hatfield K.:** Remediation chemistry of humic substances: theory and implications for technology. In: Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice (Ed. L.V. Perminova). Springer, Netherland, 3-36, 2005.
226. **Perttu K.L., Kowalik P.J.:** *Salix* vegetation filters for purification of waters and soils. Biomass Bioenergy, 12, 9-19, 1997.
227. **Peters V., Conrad R.:** Sequential reduction processes and initiation of CH₄ production upon flooding of oxic upland soils. Soil Biol. Biochem., 28, 371-382, 1996.
228. **Picek T., Šimek M., Šantrůčková H.:** Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. Biol. Fertil. Soils, 31, 315-322, 2000.
229. **Ponnamperuma F.N.:** The chemistry of submerged soils. Adv. Agron., 24, 29-33, 1972.
230. **Praveen-Kumar, Tarafdar J.C.:** 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. Biol. Fertil. Soils, 38, 186-189, 2003.
231. **Przystaś W., Miksch K., Małachowska-Jutś A.:** Zmiany aktywności enzymatycznej gleby w procesie biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych przy zastosowaniu biopreparatów. Arch. Ochr. Środow., 26, 59-70, 2000.
232. **Ramirez-Fuentes E., Lucho-Constantino C., Escamilla-Silva E., Dendooven L.:** Characteristics, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. Bioresource Technol., 85, 179-187, 2002.
233. **Ranjard L., Richaume A.:** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbiol., 152, 707-716, 2001.
234. **Renella G., Mench M., van der Lelie D., Pieramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Nannipieri P.:** Hydrolase activity, microbial biomass and community structure in long-term Cd-contaminated soils. Soil Biol. Biochem., 36, 443-451, 2004.
235. **Riffaldi R., Saviozzi A., Levi-Minzi R., Cardelli R.:** Biochemical properties of a Mediterranean soil as affected by long-term crop management systems. Soil Tillage Res., 67, 109-114, 2002.
236. **Ross D.J.:** Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. Soil Biol. Biochem., 3, 97-110, 1971.
237. **Ross D.J., Cairns A., Speir T.W.:** Effect of irrigation with municipal water or sewage effluent on the biology of soil cores. N. Zealand J. Agricult. Res., 21, 411-417, 1978.
238. **Ross D.J., Tate K.R., Newton P.C.D., Wilde R.H., Clark H.:** Carbon and nitrogen pools and mineralization in a grassland organic soil at a New Zealand carbon dioxide spring. Soil Biol. Biochem., 33, 849-852, 2001.

239. **Saviozzi A., Levi-Minzi R., Cardelli R., Riffaldi R.:** A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant Soil*, 233, 251-259, 2001.
240. **Schipper LA., Wiliamson J.C., Kettles H.A., Speir T.W.:** Impact of land applied tertiary treated effluent on soil biochemical properties. *J. Environ. Qual.*, 25, 1073-1077, 1996.
241. **Schlesinger W.H.:** Biogeochemistry. An Analysis of Global Change. Academic Press, San Diego, London, 1997.
242. **Schuster E., Schröder D.:** Side-effects of sequentially-applied pesticides on non-target soil microorganisms: field experiments. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 367-373, 1990.
243. **Schuster E., Schröder D.:** Side-effects of sequentially- and simultaneously-applied pesticides on non-target soil microorganisms: laboratory experiments. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 375-383, 1990.
244. **Scott D.T., McKnight D.M., Blunt-Harris E.L., Kolesar S., Lovley D.R.:** Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humic-reducing microorganisms. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 2984-2989, 1998.
245. **Serban A., Nissenbaum A.:** Humic acid association with peroxidase and catalase. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 41-44, 1986.
246. **Shackle V.J. Freeman C. Reynolds B.:** Carbon supply and the regulation of enzyme activity in constructed wetlands. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 1935-1940, 2000.
247. **Shapir N., Mandelbaum R.T., Fine P.:** Atrazine mineralization by indigenous and introduced *Pseudomonas* sp. strain ADP in sand irrigated with municipal wastewater and amended with composted sludge. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 887-897, 2000.
248. **Shen J., Bartha R.:** Priming effect of substrate addition in soil-based biodegradation test. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1428-1430, 1996.
249. **Šimek M., Cooper J.E. Picek T., Šantrůčková H.:** Denitrification in arable soils in relation to their physico-chemical properties and fertilization practice. *Soil Biol. Biochem.*, 32, 101-110, 2000.
250. **Šimek M., Kalčík J.:** Carbon utilization in soils: the effect of long-term fertilization on potential denitrification. *Geoderma*, 83, 269-280, 1998.
251. **Skladany G.J., Metting F.B.Jr:** Bioremediation of contaminated soil. In: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management* (Ed. F.B. Metting Jr) Marcel Dekker, Inc. New York, 483-513, 1993.
252. **Słowińska-Jurkiewicz A., Pranagal J., Zawisłak-Pranagal M.:** Właściwości retencyjne gleby pola przeznaczonego do zalewania ściekami miejskimi. *Acta Agrophysica*, 53, 135-145, 2001.
253. **Słowińska-Jurkiewicz A., Pranagal J., Zawisłak-Pranagal M., Bryk M.:** Zmiany zdolności filtracyjnych gleby obiektu doświadczalnego przeznaczonego do nawadniania wodami ściekowymi. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 475, 61-71, 2001.
254. **Smreczak B., Maliszewska-Kordybach B., Martyniuk S.:** Effect of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. In: *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment*. (Eds Ph. Baveye). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 377-380, 1999.
255. **Snyder G.H., Reddy K.R., Lindau C.W.:** Methane evolution from Histosol-grown rice. Paper 293. In: 17-th World Congress Soil Sci., Bangkok, Thailand (CD-ROM) Symp., 07, 293, 2002.
256. **Sokołowska Z., Matyka-Sarzyńska D.:** Metodyczne aspekty wyznaczenia powierzchni właściwej utworów murszowych z izoterm sorpcji pary wodnej. *Acta Agrophysica*, 68, 205-214, 2002.
257. **Sokołowska Z., Matyka-Sarzyńska D., Dąbek-Szreniawska M., Wyczółkowski A.:** Zależność pomiędzy niektórymi niektórymi właściwościami powierzchniowymi i fizyko-chemicznymi utworów murszowych a procesami oddechowymi drobnoustrojów glebowych. *Acta Agrophysica*, 106, 593-601, 2004.
258. **Sokołowska Z., Szajdak L., Matyka -Sarżyńska D.:** Impact of the degree of secondary transformation on acid-base properties of organic compounds in mucks. *Geoderma*, 127, 80-90, 2005.
259. **Sparling G.P.:** The substrate induced respiration. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (Eds K. Alef, P. Nannipieri). Academic Press, London, 397-404, 1995.

260. **Sparling G.P., Feltham C.W., Reynolds J., West A.W., Singleton P.:** Estimation of soil microbial C by a fumigation-extraction methods: use on soils of high organic matter content, and a reassessment of the k_{EC} -factor. *Soil Biol. Biochem.*, 22, 301-307, 1990.
261. **Speir T.W.:** Soil biochemical properties as indices of performance and sustainability of effluent irrigation systems in New Zealand – a review. *J. Royal Sci. New Zealand*, 32, 535-553, 2002.
262. **Stawiński J., Rodriguez- Pascual C., Wierzchoś J., Józefaciuk G.:** Effect of pH on the content of K, Al, Fe, Si, Ca and Mg in soil solution. *Polish J. Soil Sci.*, XX/1, 33-39, 1987.
263. **Stenger R., Barkle G.F., Burgess C.P.:** Mineralization and immobilization of C and N from dairy farm effluent (DFE) and glucose plus ammonium chloride solution in three grassland topsoils. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 1037-1048, 2001.
264. **Stępniewska Z.:** Właściwości oksydoredukcyjne mineralnych gleb Polski. *Problemy Agrofizyki*, 56, 1988.
265. **Stępniewska Z., Brzezińska M., Gliński J., Stępniewski W., Włodarczyk T., Čurlik J., Houšková B.:** Aeration status of some Slovakian soils. *Int. Agrophysics*, 14, 327-339, 2000.
266. **Stępniewska Z., Gliński J., Włodarczyk T., Brzezińska M., Blum W.E.H., Rampazzo N. and Wimmer B.:** Soil aeration status of some Austrian soils. *Int. Agrophysics*, 11, 199-206, 1997.
267. **Stępniewska Z., Kosiorowska I., Nowak D.:** Changes of wettability of Eutric Histosol irrigated with municipal waste water. *Materiały konf. Eurosoil '2004. Abstracts, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Germany*, 269, 2004
268. **Stępniewska Z., Kotowska U.:** Detoxification of pollutants from municipal wastewater using organic soil as a biofilter. In: *New Horizons in Biotechnology* (Eds S. Roussos, C.R. Soccol, A. Pandey, C. Augur). Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London, 267-270, 2003.
269. **Stępniewska Z., Pasztelan M., Stępniewski W., Brzezińska M.:** Wpływ uwilgotnienia gleby torfowo-murszowej irygowanej ściekami miejskimi na emisję N_2O i CO_2 . *Acta Agrophysica*, 53, 165-170, 2001.
270. **Stępniewska Z., Żuchowski J., Kotowska U.:** Dynamika potencjału oksydoredukcyjnego na polu doświadczalnym irygowanym ściekami miejskimi po II stopniu oczyszczania. *Acta Agrophysica*, 53, 171-176, 2001.
271. **Stępniewski W., Horn R., Martyniuk S.:** Managing soil biophysical properties for environmental protection. *Agric. Ecosys. Environ.*, 88, 175-181, 2002.
272. **Stępniewski W., Pawłowska M.:** A possibility to reduce methane emission from landfills by its oxidation in the soil cover. In: *Chemistry for the Protection of the Environment*, 2 (Eds L. Pawłowski, W.J. Lacy, Ch.G. Uchrin, M.R. Dudzińska). Plenum Press, New York, 75-92, 1996.
273. **Stępniewski W., Stępniewska Z.:** Oxygenology as a new discipline in the environmental sciences (a proposal for discussion). *Int. Agrophysics*, 12, 53-56, 1998.
274. **Stępniewski W., Stępniewska Z., Gliński J., Brzezińska M., Włodarczyk T., Przywara G., Várallyay G., Rajkai K.:** Dehydrogenase activity of some Hungarian soils as related to their water and aeration status. *Int. Agrophysics*, 14, 341-354, 2000.
275. **Stępniewski W., Stępniewska Z., Włodarczyk T., Dąbek-Szreniawska M., Brzezińska M., Słowińska-Jurkiewicz A., Przywara G.:** Aeration related properties and their influence on soil biological parameters. *Int. Agrophysics*, 7, 163-173, 1993.
276. **Stottmeister U., Wiessner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kästner M., Bederski O., Müller, R.A., Moormann H.:** Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnol Adv.* 22, 93-117, 2003.
277. **Straub K.L., Benz M., Schink B.:** Iron metabolism in anoxic environments at neutral pH. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 34, 181-186, 2001.
278. **Struyk Z., Sposito G.:** Redox properties of standard humic acids. *Geoderma* 102, 329-346, 2001.
279. **Stryer L.:** *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 1997.

280. **Sugier D., Szewczuk C., Studzińska-Jaksim P.:** Wpływ zróżnicowanych dawek ścieków miejskich na rozwój systemu korzeniowego wierzb krzewiastych (*Salix* sp.) Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 475, 81-86, 2001.
281. **Szajdak L.:** Właściwości chemiczne torfu. W: Torfowiska i torf (Red. P. Ilnicki). Wydawnictwo AR im. A Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań, 2002.
282. **Szewczuk C., Sugier D.:** Wpływ stosowania ścieków miejskich na przebieg wzrostu i plonowanie wierzb krzewiastej (*Salix americana* L.) Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 475, 73-79, 2001.
283. **Tam N.F.Y.:** Effects of wastewater discharge on microbial populations and enzyme activities in mangrove soils. Environ. Pollution, 102, 233-242, 1998.
284. **Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G.:** Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biol. Biochem., 34, 387-401, 2002.
285. **Tiwari M.B., Tiwari B.K., Mishra R.R.:** Enzyme activity and carbon dioxide evolution from upland and wetland rice soils under three agricultural practices in hilly regions. Biol. Fertil. Soils, 7, 359-364, 1989.
286. **Turski R., Słowińska-Jurkiewicz A.:** Przewodnik do ćwiczeń z gleboznawstwa. Wydawnictwo AR w Lublinie, Lublin, 1998.
287. **van Hees P.A.W., Jones D.L., Finlay R., Godbold D.L., Lundström U.S.:** The carbon we do not see – the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. Soil Biol. Biochem., 37, 1-13, 2005.
288. **van Spanning R.J.M., de Vries S., Harms N.:** Coping with formaldehyde during C1 metabolism of *Paracoccus denitrificans*. J. Mol. Catalysis. B: Enzymatic, 8, 37-50, 2000.
289. **Violante A., Huang P.M., Bollag J.M., Gianfreda L.:** Soil Mineral-Organic Matter-Microorganisms Interactions and Ecosystem Health. Developments in Soil Science, 28B, Elsevier, 2002.
290. **Vor T., Dyckmans J., Flessa H., Beese F.:** Use of microcalorimetry to study microbial activity during the transition from oxic to anoxic conditions. Biol. Fertil. Soils, 36, 66-71, 2002.
291. **Wagner D., Pfeiffer E.M., Bock E.:** Methane production in aerated marshland and model soils: effects of microflora and soil texture. Soil Biol. Biochem., 31, 999-1006, 1999.
292. **Walczak R., Rovdan E., Witkowska-Walczak B.:** Water retention characteristics of peat and sand mixtures. Int. Agrophysics, 16, 161-165, 2002.
293. **Walczak R., Sławiński C., Witkowska-Walczak B.:** Retencja i przewodnictwo wodne gleb murszowych i murszowatych Polski. Acta Agrophysica, 53, 201-209, 2001.
294. **Weigel A., Russel S., Mercik S., Körschens M., Kubát J., Powlson D.S.:** Biomass and its biological activity in relation to the soil organic carbon content in long-term fertilization experiments from four European countries. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 465, 505-516, 1999.
295. **Wheatley R.E., Ritz K., Crabb D., Caul S.:** Temporal variations in potential nitrification dynamics in soil related to differences in rates and types of carbon and nitrogen inputs. Soil Biol. Biochem., 33, 2135-2144, 2001.
296. **Witkowska-Walczak B., Bieganowski A., Rovdan E.:** Water-air properties in peat, sand and their mixtures. Int. Agrophysics, 16, 313-318, 2002.
297. **Włodarczyk T.:** Emisja i absorpcja N₂O na tle emisji CO₂ w glebach brunatnych w zróżnicowanych warunkach oksydoredukcyjnych. Monografia. Acta Agrophysica, 28, 2000.
298. **Włodarczyk T.:** Some aspects of dehydrogenase activity in soils. Int. Agrophysics, 14, 365-376, 2000.
299. **Włodarczyk T., Gliński J., Stępniewski W., Stępniewska Z., Brzezińska M., Kuráž V.:** Aeration properties and enzyme activity on the example of Arenic Chernozem (Tišice). Int. Agrophysics, 15, 131-138, 2001.
300. **Włodarczyk T., Stępniewska Z., Brzezińska M.:** Denitrification, organic matter and redox potential transformations in Cambisols. Int. Agrophysics, 17, 219-227, 2003.

301. **Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M.:** Dehydrogenase activity, redox potential, and emission of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions. *Biol. Fertil. Soils*, 36, 200-206, 2002.
302. **Włodarczyk T., Stępniewska Z., Brzezińska M., Pindelska E., Przywara G.:** Influence of methane concentration on methanotrophic activity of Mollic Gleysol and Haplic Podzol. *Int. Agrophysics*, 18, 375-379, 2004.
303. **Włodarczyk T., Stępniewska Z., Brzezińska M., Stępniewski W.:** Conditions favorable to sorption of N₂O in the soil. *Mittel. Deutsch. Bodenkundl. Gesellschaft*, 103, 113-114, 2004.
304. **Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M.:** Nitrous oxide production and consumption in Calcaric Regosols as related to soil redox and texture. *Int. Agrophysics*, 19, 263-271, 2005.
305. **Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M., Kotowska U.:** N₂O emission and sorption in relation to soil dehydrogenase activity and redox potential. *Int. Agrophysics*, 16, 249-252, 2002.
306. **Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M., Stępniewska Z.:** Nitrate stability in loess soils under anaerobic conditions – laboratory studies. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 167, 693-700, 2004.
307. **Wood N.J., Sørensen J.:** Catalase and superoxide dismutase activity in ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38, 53-58, 2001.
308. **Wrage N., Velthof G.L., Laanbroek H.J., Oenema O.:** Nitrous oxide production in grassland soils: assessing contribution of nitrifier denitrification. *Soil Biol. Biochem.*, 36, 229-236, 2004.
309. **Wyczółkowski A.J., Bieganski A., Malicki J.:** Określenie liczebności mikroorganizmów w glebie torfowo-murszowej o różnym stopniu zmurszenia. *Annales UMCS, Sec. E*, 93-98, 2002.
310. **Wyczółkowski A.J., Bieganski A., Malicki J., Dąbek-Szreniawska M.:** Liczebność i współwystępowanie mikroorganizmów w murszejącej glebie. W: *Fizyczna degradacja gleb. Prognozowanie, metody ochrony i rekultywacji* (Red. J. Lipiec, J. Rejman), 137-140, 1999.
311. **Yu K.W., Wang Z.P., Vermoesen A., Patrick W.H.Jr, van Cleemput O.:** Nitrous oxide and methane emissions from different soil suspensions: effect of soil redox status. *Biol. Fertil. Soils*, 34, 25-30, 2001.

7. STRESZCZENIE

Praca przedstawia wyniki badań dotyczących wpływu nawadniania gleb organicznych oczyszczonymi ściekami miejskimi na ich aktywność biologiczną na tle wybranych właściwości i procesów fizyko-chemicznych istotnych z punktu widzenia nadmiernego uwilgotnienia gleby. Badania oparto na doświadczeniu polowym oraz doświadczeniach laboratoryjnych na monolitach glebowych i na próbkach wierzchniej warstwy gleb, przeprowadzonych bez udziału roślin po trzyletniej przerwie w nawodnieniach. Uzyskane wyniki wykazały, że systematyczne nawadnianie gleb organicznych ściekami istotnie wpływało na status biologiczny gleby, a intensywność i kierunek zmian aktywności znacząco zależały od typu gleby, warstwy w profilu, uprawianej rośliny i dawki ścieków. W trakcie prowadzonych nawodnień aktywności dehydrogenaz i katalazy były hamowane w profilach gleby torfowo-murszowej porośniętej topolą (*Populus nigra* i *Populus alba*) oraz mineralno-murszowej porośniętej trawami (z dominacją *Alopecurus pratensis*, *Phalaris arundinacea* i *Festuca pratensis*), natomiast stymulowane w glebie torfowo-murszowej z uprawą wierzby (*Salix americana* i *Salix viminalis*). Po zaprzestaniu nawodnień zmiany te pozostały utrzymane w glebie z udziałem topoli. W glebie mineralno-murszowej łąkowej zaniechanie zalewów spowodowało podwyższenie aktywności oksydoreduktaz, natomiast w glebie z uprawą wierzby stymulacja pozostała w wierzchniej warstwie. Właściwości gleby były modyfikowane przez długotrwałe działanie ścieków. Bezpośrednie działanie ścieków niewiele różniło się od oddziaływania czystej wody, w warunkach laboratoryjnych dotyczyło głównie stymulacji procesu denitryfikacji.

Analiza uzyskanych wyników z badań laboratoryjnych przeprowadzonych po upływie trzech lat od zaprzestania nawodnień ujawniła silne przekształcenia materiału glebowego z wierzchnich warstw, prowadzące do zmian dostępności węgla organicznego oraz modyfikacji zawartości biomasy drobnoustrojów i ich aktywności biochemicznej. W wierzchniej warstwie (0-10 cm) gleby obsadzonej topolą czteroletnie systematyczne nawadnianie ściekami (120 cm rocznie) spowodowało pogorszenie warunków bytowania drobnoustrojów. W porównaniu do gleby kontrolnej nastąpiło obniżenie biomasy drobnoustrojów, wskaźnika C_{mic}/C_{org} oraz aktywności biologicznej opartej na wykorzystaniu natywnych substratów organicznych (aktywność dehydrogenaz i katalazy, emisji N_2O), natomiast podwyższenie współczynnika metabolicznego qCO_2 . Intensywna mineralizacja wprowadzonej glukozy oraz wysoka aktywność potencjalna (indukowane glukozą dehydrogenazy, wydzielanie metanu) wskazują jednak, że obniżenie biomasy drobnoustrojów i ich aktywności nie wynikało z uszkodzenia populacji, lecz zmniejszenia dostępności substratu organicznego.

W wierzchniej warstwie gleby porośniętej wierzbą zabiegi spowodowały poprawę warunków rozwoju drobnoustrojów. Aktywność aktualna uległa podwyższe-

niu (biomasa drobnoustrojów, wskaźnik C_{mic}/C_{org} , aktywność dehydrogenaz i katalazy, emisja N_2O), a wskaźnik qCO_2 obniżeniu, natomiast funkcje aktywności potencjalnej (indukowane glukozą dehydrogenazy, metanogeneza, mineralizacja glukozy) pozostały wyższe w glebie kontrolnej.

Zaprzestanie zabiegów przeprowadzonych na glebie porośniętej trawami spowodowało zmiany korzystne w odniesieniu do materiału kontrolnego. Podwyższeniu uległa biomasa drobnoustrojów, aktywność dehydrogenaz i wydzielanie N_2O . Wskaźniki C_{mic}/C_{org} , qCO_2 i czynność katalazy, a także aktywność potencjalna wierzchniej warstwy gleby pozostały na poziomie kontrolnym.

Pomimo relatywnie wysokiej aktywności biologicznej, materiał wierzchniej warstwy gleb wykazywał znaczną odporność na redukcję (w warunkach zalania $Eh > 400$ mV, $Fe^{+2} < 20$ mg·kg⁻¹, stały poziom katalazy, brak typowej relacji Eh i oksydoreduktaz) niezależnie od poprzedniego sposobu nawadniania. Przemiany o charakterze redukcji zachodziły dopiero pod wpływem wysokiego dodatku glukozy lub metanu. Obecność N_2O , Fe^{+2} , H_2 i CH_4 rejestrowano, odpowiednio, przy $Eh < 400$ mV, < 300 mV, < 200 mV i < -50 mV. Jednocześnie z obniżaniem wartości Eh następowała silna stymulacja aktywności dehydrogenaz.

Wierzchnie warstwy wszystkich gleb nawadnianych ściekami wykazywały wyższe wartości C_{org} , NH_4^+ , NO_3^- , C:N, nieco niższe pH, a także wyższą aktywność oddechową i metanotroficzną, niż gleby kontrolne. Niezależnie od zabiegów, gleba o wyższej biomase drobnoustrojów prezentowała średnio wyższą aktywność dehydrogenaz, szybkość respiracji, kumulację CO_2 i pobranie O_2 . Zawartość C_{org} istotnie determinowała aktywność dehydrogenaz i oddychanie (podstawowe i indukowane glukozą). Oznaczenie tzw. wskaźników eko-fizjologicznych gleby C_{mic}/C_{org} i qCO_2 może być przydatne dla określenia kierunku zmian statusu biologicznego gleby w wyniku prowadzonych nawodnień. Gleby nawadniane ściekami utrzymały cechy istotne przy systematycznym stosowaniu nawodnień: aktywność metanotroficzną, zdolność przeprowadzania całkowitej denitryfikacji do N_2 i odporność na redukcję. Cechy te wskazują na przydatność badanych gleb do nawodnień ściekami – pod warunkiem utrzymania odpowiednich stosunków wodno-powietrznych gleby i niskiej zawartości substancji organicznej w ściekach. Zastrzeżenie budzi podwyższenie aktywności oddechowej (emisji CO_2) utrzymujące się po zaprzestaniu nawodnień.

Słowa kluczowe: aktywność biologiczna, gleba organiczna, oczyszczone ścieki miejskie, biomasa drobnoustrojów, przemiany redoks

8. SUMMARY

IMPACT OF TREATED WASTEWATER ON BIOLOGICAL ACTIVITY
AND ACCOMPANYING PROCESSES IN ORGANIC SOILS
(Field and model experiments)

The work presents investigations of the impact of wastewater irrigation of organic soils (Terric Histosol and Histi-Mollic Gleysol) on their biological activity at a background of some physico-chemical properties and processes being essential under flooding conditions. The results of field experiments were, in accordance with prevision, difficult for unequivocal interpretation. Therefore, model studies under controlled laboratory conditions with soil monoliths and soil samples were performed.

The results showed that periodic soil irrigation with wastewater significantly affected its biological status, and intensity and a trend of these changes strongly depended on soil type, soil depth, plant cover and wastewater dose. Under field conditions, the activity of soil dehydrogenases and catalase was inhibited in peat-muck soil under poplar (*Populus nigra* and *Populus alba*) and in mineral-muck soil with grass cover (with domination of *Alopecurus pratensis*, *Phalaris arundinacea* and *Festuca pratensis*), whereas it was stimulated in peat-muck soil planted with willow (*Salix americana* and *Salix viminalis*). The persistence of these changes, as determined in the laboratory three years after the irrigation was stopped, depended significantly on the previous soil-plant combination. The inhibition was observed in soil under poplar, and it was unstable in meadow soil where both dehydrogenases and catalase increased down to 50 cm depth. In turn, the stimulation of dehydrogenase activity in soil planted with willow was maintained in surface layer only.

Various indicators used to study the surface soils (0-10 cm) under laboratory conditions revealed a strong transformation in physiological status of microbial community in soils subjected to 4-year irrigation with wastewater (120 cm per year) as compared to the control soils. The deterioration of soil biological properties under poplar was evidenced by a decrease in microbial biomass and biochemical activities which are related to the ability of the native organic matter utilization (dehydrogenase and catalase activities, N₂O formation) and confirmed by an increase of metabolic quotient (qCO₂) and a decrease of C_{mic}-to-C_{org} ratio. However, a high level of potential activity revealed from mineralization of the added glucose, indicated that no detrimental effects in microbial populations of previously irrigated soil took place.

By contrast, the irrigation of soil planted with willow improved its microbial status as measured by an increase of C availability ($C_{\text{mic-to-C}_{\text{org}}}$ ratio), microbial biomass and actual activity (dehydrogenase and catalase activities, N_2O evolution) as well as in a decrease of $q\text{CO}_2$. The potential activity induced by glucose addition remained higher in the control soil.

The brake of wastewater irrigation of meadow soil caused some beneficial transformations in surface layer (increase in microbial biomass, dehydrogenase activity, N_2O formation) with no changes in $C_{\text{mic-to-C}_{\text{org}}}$, $q\text{CO}_2$ index, and activities stimulated by glucose.

Despite of relatively high level of the biochemical activity, the tested soils sampled from both control and irrigated plots showed very high redox resistance. Under prolonged flooding, soil samples showed redox potential $\text{Eh} > 400$ mV, $\text{Fe}^{+2} < 20$ mg kg^{-1} , high activity of catalase (enzyme specific for aerobic metabolism) and no typical relation between Eh and soil oxidoreductases. By contrast, the intensive redox processes were observed in soil samples amended with glucose and N_2O , Fe^{+2} , H_2 and CH_4 were detected at $\text{Eh} < 400$ mV, < 300 mV, < 200 mV and < -50 mV, respectively. A decrease in redox potential under soil hypoxia was followed by significant increase in the dehydrogenase activity.

All soils irrigated with wastewater showed lower pH, higher contents of C_{org} , NH_4^+ , NO_3^- , higher C:N ratios, larger respiration and methanotrophic activities than the control soils. Independently on the irrigation, soils with higher C_{mic} and C_{org} showed higher dehydrogenase and respiration activities. The $q\text{CO}_2$ and $C_{\text{mic-to-C}_{\text{org}}}$ ratio could be useful indexes in the study of the trend of biological activity changes in organic soils irrigated with wastewater.

Despite of some disadvantageous transformations, all soils maintained potential ability for methanotrophic activity, complete denitrification to N_2 , and redox resistance. These properties emphasized the adaptability of tested organic soils to irrigation with wastewater, however supporting proper soil air-water conditions, as well as low organic matter content in wastewater is necessary.

Keywords: biological activity, organic soil, municipal wastewater, microbial biomass, redox processes

Adres autora:

Małgorzata Brzezińska
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27
tel. (081) 744-50-61, fax (081) 744-50-67
e-mail: mbrzez@demeter.ipan.lublin.pl