

## AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW W PROCESIE AMONIFIKACJI W GLEBIE Z DODATKIEM AZOTOWYCH SUBSTANCJI ORGANICZNYCH

*Małgorzata Dąbek-Szreniawska, Agnieszka Zimon, Andrzej I. Wyczółkowski*

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
e-mail: mdsz@demeter.ipan.lublin.pl

**Streszczenie.** Celem badań było wykazanie wpływu organicznych substancji azotowych na aktywność enzymów biorących udział w mineralizacji substratów azotu organicznego. Gleba użyta w badaniach oznaczona była jako brunatnoziemna, typu gleby płowej (Orthic Luvisol) wytworzonej z utworów pyłowych. Do gleby wprowadzano następujące substancje organiczne: resztki łubinu, grzybnię pofermentacyjną, hydrolizat sojowy. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że aktywność asparaginazy była najwyższa w porównaniu z innymi badanymi enzymami przedstawionymi w doświadczeniu. Wszystkie dodane substancje organiczne działały stymulująco na aktywność tego enzymu. Aktywność ureazy stymulowana była przez cały okres doświadczenia dodatkiem hydrolizatu sojowego do gleby. Natomiast pod wpływem dodania resztek łubinu i grzybni obserwowano stymulację aktywności ureazy tylko w ciągu pierwszych pięciu dni doświadczenia.

**Słowa kluczowe:** aktywność enzymów glebowych, asparaginaza, ureaza, dezaminaza, azotowe substancje organiczne.

### WSTĘP

Niskomolekularne związki azotu organicznego (m.in. aminokwasy) dostające się do gleby z resztkami zwierzęcymi i roślinnymi oraz powstałe na drodze proteolizy złożonych związków organicznych (białek), ulegają dalszemu przekształceniu w procesie amonifikacji. Proces ten to dezaminacja, która przebiega w glebie przeważnie na drodze przemian biochemicznych, przy udziale enzymów pochodzenia mikrobiologicznego.

Proces dezaminacji aminokwasów, prostych heksamin powoduje uwalnianie amoniaku i jego soli, które mogą być pobierane przez rośliny [14].

Mikroorganizmy uwalniają do środowiska wiele enzymów, z których najważniejsze w procesach rozkładu resztek roślinnych są te, które biorą bezpośredni udział w degradacji ligniny i celulozy oraz w mineralizacji organicznych zwią-

ków azotu, fosforu i siarki, co powoduje wprowadzanie w obieg tych pierwiastków w ekosystemie.

Liczni autorzy [3,7,8,10,11,13] uważają, że enzymy glebowe mogą być użyteczne jako „wskaźniki żyzności” gleby. Pozwalają one ocenić dostępność związków pokarmowych w glebie. Proponuje się w tym celu oznaczać aktywność dehydrogenaz i różnych fosfataz oraz dezaminaz np. asparaginazy i ureazy. Aktywność ich jest zależna od zawartości substancji organicznej w glebie. Obecność pewnych związków w glebie będzie stymulować lub hamować syntezę danego enzymu, nie wpływając jednocześnie na całkowitą żywotność mikroorganizmów glebowych. Ponadto, pozakomórkowe enzymy glebowe, w przypadku związania z koloidami mogą być mniej wrażliwe na czynniki zewnętrzne niż żywe komórki mikroorganizmów [18].

Dostarczenie nawozów do gleby może spowodować wzrost aktywności mikrobiologicznej gleby i produktywności roślin a jednocześnie obniżyć aktywność niektórych enzymów, np. podwyższony poziom nieorganicznego fosforu w glebie obniża aktywność fosfataz a aktywność enzymatyczna ureazy i amidaz mogą być ograniczane przez dodanie zwiększonych dawek nawozów zawierających związki amonowe [1,9].

Opierając się na tym, że aktywność enzymatyczna jest wyrazem oddziaływania wielu czynników na glebę, a w szczególności klimatu, uprawy, nawożenia, i właściwości edaficznych opracowano indeks żyzności gleby. Żyzność gleby jest funkcją intensywnego rozwoju różnych grup drobnoustrojów, zawartości materii organicznej i całkowitej pojemności sorpcyjnej gleby [16].

Proces amonifikacji zachodzi w glebie niezależnie od warunków ekologicznych. Spowodowane jest to dużą różnorodnością grup mikroorganizmów zaliczanych do amonifikatorów, wśród których można znaleźć tlenowce i beztlenowce, psychrofile, mezofile i termofile, organizmy przystosowane do rozwoju w środowisku kwaśnym i alkalicznym, w mniejszej i większej wilgotności [4,12,18,15].

W procesie amonifikacji czyli uwalniania amoniaku ze związków: aminokwasów, mocznika, zasad purynowych, kwasów nukleinowych biorą udział enzymy dezaminazy. Do grupy tych enzymów zaliczamy: asparaginazę; EC 3.5.1.1, ureazę; EC 3.5.1.5, dezaminazę cytozynową; EC 3.5.4.1 i inne [17,20].

Celem badań było wykazanie wpływu organicznych substancji azotowych na aktywność wybranych enzymów. Badane enzymy biorą udział w mineralizacji substratów azotu organicznego. Poznanie ukierunkowania aktywności enzymatycznej w warunkach optymalnego nawożenia gleby, pozwoli na maksymalne wykorzystanie azotu i innych pierwiastków biogennych przy produkcji roślinnej.

## MATERIAŁY I METODY

Gleba użyta w badaniach pochodziła z pola produkcyjnego z Zakładu Doświadczalnego Felin należącego do Akademii Rolniczej w Lublinie. Oznaczono ją jako glebę brunatnoziemną, typu gleby płowej (Orthic Luvisol) wytworzoną z utworów pyłowych [6]. Jej charakterystykę gleboznawczo-chemiczną umieszczono w tabeli 1.

**Tabela 1.** Charakterystyka fizyko-chemiczna gleby wg [6]**Table 1.** Physico-chemical characteristic of soil

Horyzont genetyczny Genetic horizon	Skład granulometryczny Granulometric fractions (%)			Substancja org. Organic matter (g·g <sup>-1</sup> )	C ogółem C total	N ogółem N total (g·g <sup>-1</sup> )	pH 1M KCl
Ap	1,0-0,1	0,1-0,02	<0,02	1,69	976	0,08	4,9
	17	49	34				

**Tabela 2.** Charakterystyka substancji wprowadzonych do gleby**Table 2.** Characteristic of substances and their amount added to the soil

Dodatki organiczne. Organic additions N	Popiół Ash % s.m.	Subst. organiczna Organic matter % s.m.	N Ogółem N total % s.m.	N białkowy Protein N % N ogół./ tot.	Ilość substancji w g/100g gleby dla: 0,05g N/100g gleby. Amount added to the soil g/100g soil (0.05g N/100g soil)
Zielone części łubinu – Lupine	13,92	86,1	4,60	20,92	2,1
Grzybnia – Hyphae	25,10	74,70	4,00	79,08	3,2
Hydrolizat sojowy Bacto Soytone	15		9,3	63,2	1,4

Obiekt doświadczalny składał się z 4 kombinacji:

1. Gleba z dodatkiem łubinu,
2. Gleba z dodatkiem grzybni,
3. Gleba z dodatkiem hydrolizatu sojowego,
4. Gleba bez dodatków.

Do gleby wprowadzono następujące substancje zawierające azot organiczny: resztki łubinu – wysuszone i zmielone zielone części nadziemne *Lupinus angustifolius* zebrane przed kwitnieniem; grzybnię pofermentacyjną – suchą masę grzybni pofermentacyjnej z produkcji antybiotyków z Zakładów Tarchomin w Warszawie; hydrolizat sojowy – fabryczny, suchy hydrolizat sojowy Bacto Soytone firmy Difco Detroit. Charakterystykę tych substancji i ilości wprowadzone do gleby podano w tabeli 2.

#### PRZYGOTOWANIE PODŁOŻY GLEBOWYCH

Glebę do doświadczeń po pobraniu z pola przesiano przez sito o oczkach średnicy 3,5 mm. Z gleby tak ujednocionej naważono 1,5 kg próbki, po jednej na każdą kombinację doświadczenia. Próbkę taką rozsypano równą warstwą na dużej tacy. Do każdej naważki gleby dodano tylko jeden rodzaj substratu. Substrat rozsypywano przez sito na powierzchni naważki gleby. Mieszano bardzo dokładnie glebę z odpowiednim dodatkiem. Poszczególne naważki podłoża (gleba z dodatkami) przesypywano porcjami do pojemników szklanych o poj. 3 dm<sup>3</sup>. W czasie przesypywania każdą nasypaną warstwę nawilżono wodą destylowaną za pomocą spryskiwacza, w ilości dającej końcową wilgotność równą 60% w/w. Po wprowadzeniu do pojemnika całej naważki gleby, ponownie mieszano jej zawartość.

Z glebą kontrolną bez dodatków substratu postępowano podobnie, tzn. każdą nasypaną warstwę gleby spryskiwano wodą destylowaną. Inkubację gleby z dodatkami prowadzono w temperaturze pokojowej (ok. 18°C) przez okres 32 dni.

#### OZNACZENIE AKTYWNOŚCI ENZYMU

Oznaczenie aktywności enzymów wykonano wg wybranych metod [20]. Badania przeprowadzono po 1, 5, 7, 14 i 21 dniach od wprowadzenia do gleby dodatków – substancji zawierających azot organiczny. W dniu pobrania próbek do analiz enzymatycznych oznaczono ich suchą masę.

##### **Dezaminaza**

– oznaczano metodą Killham, Rashid:

Naważki 1g gleby z roztworem substratu – 1,2-diamino 4-nitrobenzenu, inkubowano w cieplarni w temp. 30°C przez 24 godz. Po inkubacji próbki ekstrahowano metanolem. Natężenie barwy ekstraktu oznaczono w spektrofotometrze przy długości fali 405 nm. Zawartość 1,2-DANB odczytano z krzywej wzorcowej.

### Ureaza

– oznaczano metodą Hoffmann, Teicher:

Naważki 5 g gleby, po dodaniu roztworu mocznika jako substratu inkubowano w cieplarni w temp. 30°C przez 5 godz. Po inkubacji próbki ekstrahowano wodą destylowaną. Natężenie niebieskawej barwy ekstraktu oznaczono w spektrofotometrze przy długości fali 630 nm. Ilość jonów amonowych odczytywano z krzywej wzorcowej.

### L-asparaginaza

– oznaczano metodą Omura, Sato, Hayano:

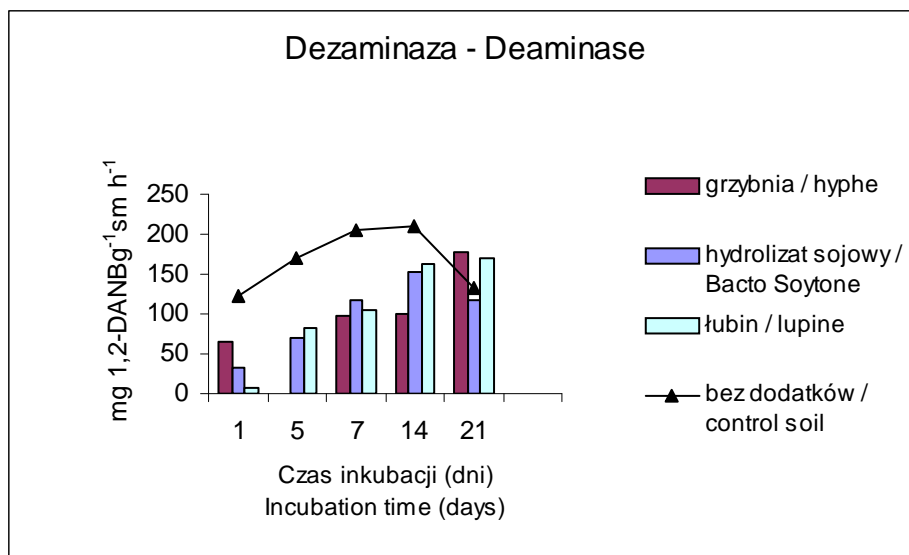
Naważki 1g gleby po dodaniu roztworu L-asparaginy jako substratu, inkubowano w cieplarni w temp. 30°C przez 24 godz. Po inkubacji próbki ekstrahowano roztworem wymywającym. Natężenie zabarwienia ekstraktu oznaczono w spektrofotometrze przy długości fali 436 nm. Ilość jonów amonowych odczytywano z krzywej wzorcowej.

## WYNIKI I DYSKUSJA

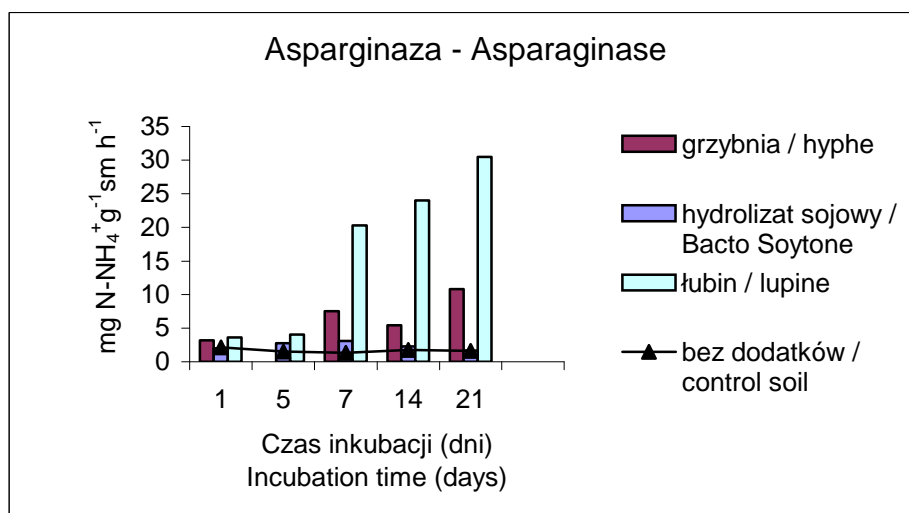
Aktywność badanych enzymów przedstawiono przy pomocy wykresów na rysunkach 1-6.

Aktywność dezaminazy przedstawiono na rysunku 1. Należy zauważyć, że im większa była aktywność tego enzymu tym w glebie mniej pozostało 1,2-DANB [20]. Jak widać z rysunku 1 dodatek resztek łubinu, już po pierwszym dniu inkubacji, wpływał wyraźnie stymulująco na aktywność dezaminazy w porównaniu z glebą bez dodatków. Podobny był wpływ dodania grzybni i hydrolizatu sojowego. Pobudzenie aktywności dezaminazy dzięki wprowadzeniu dodatków azotowej substancji organicznej, ulegało zmniejszeniu wraz z upływem czasu trwania doświadczenia. Po 21 dniach inkubacji aktywność dezaminazy w glebie bez dodatków była większa niż w próbkach gleby z dodatkami.

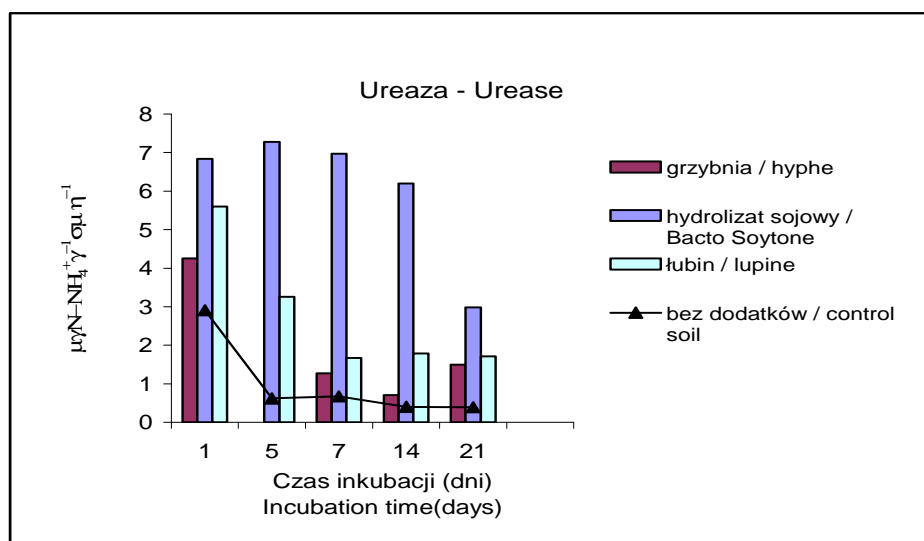
Aktywność asparaginazy w badanych próbkach podłoży glebowych, wyrażona ilością wytworzonego amoniaku, wskazuje na bardzo wyraźny i silny wpływ dodanych do gleby resztek łubinu, co obserwowano przez cały okres inkubacji. Można zauważyć, że aktywność ta wyraźnie wzrosła po siedmiu dniach i przewyższała około trzykrotnie aktywność tego enzymu w glebie bez dodatków, jak również w próbkach gleby z dodatkiem grzybni lub hydrolizatu sojowego. Najniższą aktywność asparaginazy stwierdzono w próbkach z dodatkiem hydrolizatu sojowego.



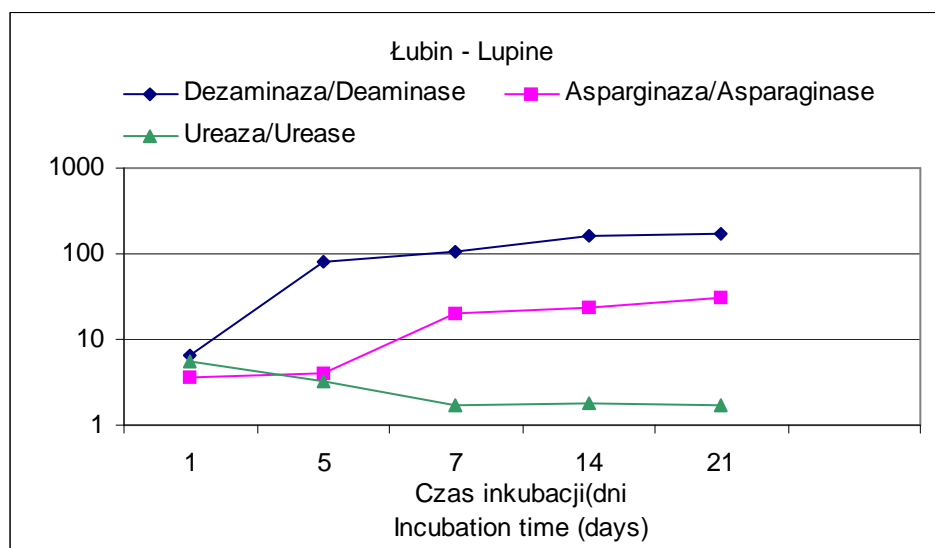
**Rys. 1.** Aktywność dezaminazy w czasie inkubacji  
**Fig. 1.** Deaminase activity during incubation time



**Rys. 2.** Aktywność asparaginazy w czasie inkubacji  
**Fig. 2.** Asparaginase activity during incubation time

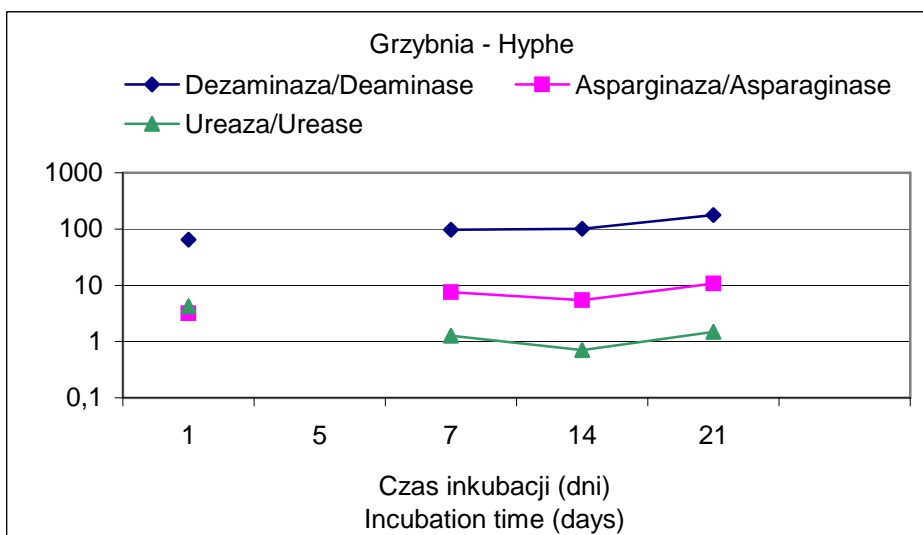


**Rys. 3.** Aktywność ureazy w czasie inkubacji  
**Fig. 3.** Urease activity during incubation time



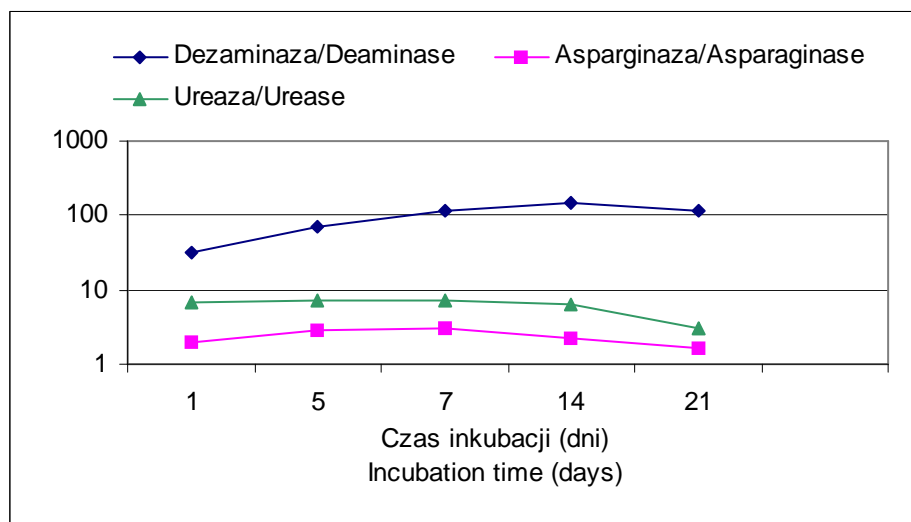
**Rys. 4.** Aktywność enzymów w glebie z łubinem. Aktywność enzymów na osi Y podano w skali logarytmicznej

**Fig. 4.** Enzyme activity in the soil with the addition of lupine. Enzyme activity shown in logarithmic scale



**Rys. 5.** Aktywność enzymów w glebie z łubinem. Aktywność enzymów na osi Y podano w skali logarytmicznej

**Fig. 5.** Enzyme activity in the soil with the addition of hyphae. Enzyme activity shown in logarithmic scale



**Rys. 6.** Aktywność enzymów w glebie z łubinem. Aktywność enzymów na osi Y podano w skali logarytmicznej

**Fig. 6.** Enzyme activity in the soil with the addition of Bacto Soytone. Enzyme activity shown in logarithmic scale



Stwierdzono, że aktywność ureazy ulega zmianom w obecności hydrolizatu sojowego (rys. 3). Wpływ ten obserwowano przez cały czas okres doświadczenia. Pod wpływem dodatku łubinu i grzybni pofermentacyjnej aktywność ureazy była wyższa niż w glebie kontrolnej.

Jak wynika z rysunku 4 oddziaływanie zastosowanych dodatków wskazuje na aktywność wybranych enzymów oraz wyraźny wpływ resztek łubinu na aktywność asparaginazy, przy niewielkim wpływie na aktywność ureazy.

Grzybnia pofermentacyjna wpływała na aktywność dezaminazy przez pierwsze 14 dni inkubacji. Jej wpływ na aktywność badanych enzymów przez cały czas trwania doświadczenia jest niewielki (rys.5).

Dodatek hydrolizatu sojowego zwiększał aktywność ureazy i dezaminazy, natomiast nie miał wpływu na aktywność asparaginazy, co przedstawiono na rysunku 6.

Dodatek do gleby azotowej substancji organicznej w postaci resztek organicznych pobudzał drobnoustroje do wytwarzania enzymów, umożliwiając rozkład złożonej substancji azotowej. Może się to wyrazić zwiększoną ilością komórek drobnoustrojów w próbkach gleby [5,19].

#### WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że aktywność asparaginazy była najwyższa w porównaniu z innymi badanymi enzymami. Po 7 dniach zarówno w glebie z dodatkiem łubinu jak i grzybni, aktywność tego enzymu wyraźnie się zwiększyła. Wpływ azotowej substancji organicznej działał stymulująco na działalność tego enzymu.

2. Aktywność ureazy stymulowana była w glebie obecnością hydrolizatu sojowego przez cały okres doświadczenia. Natomiast pod wpływem dodania resztek łubinu i grzybni obserwowano stymulację aktywności ureazy tylko w ciągu pierwszych pięciu dni.

#### PIŚMIENNICTWO

1. **Bandick A.K., Dick R.P.:** Field management effects on soil enzyme activities *Soil Biol. Biochem.*, 31 1471-1479, 1999.
2. **Barabasz W.:** Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. II Biotransformacja azotu glebowego. *Post. Mikrobiol.*, 31(1), 3-33, 1992
3. **Chaziev F., Ch.:** Počvennye fermenty i ich rol' v plodoradii. *Nauč. Dokl. Wyssey Školy, Biol. Nauk.*, (2), 114-119, 1972.
4. **Chmielewski K.:** The effect of habitat conditions on microbiological activity of peat soils *Pol. Ecol. Stud.* 17, 143-153, 1991.

5. **Dąbek-Szreniawska M., Wyczółkowski A. I.:** Wpływ niektórych odpadów organicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych. *Acta Agrophysica*, 73, 103-110, 2002.
6. **Domżał H., Pranagal J.:** Pedological characteristics of research site for studying climate of the cultivated field. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln.*, 419, 9-14, 1995.
7. **Frankenberg W.T. jr., Dick W.A.:** Relationships between enzyme activities and microbiol growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 945-951, 1983.
8. **Furczak J., Szewczuk C., Flis-Bujak M.:** Badania nad przydatnością niektórych testów mikrobiologicznych i biochemicznych do oceny mikrobiologicznej aktywności gleb w chmielnikach. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, sec. E*, 54, 161-172, 1999.
9. **Gianfreda L., Ballag J. M.:** Influence of natural and anthropogenic factor on enzyme activity in soil. [w] G. Stotzky, J. M. Ballag (eds) *Soil Biochemistry*, vol 9, 123-193, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 1996.
10. **Kieliszewska-Rokicka B.:** Enzymy glebowe i ich znaczenie w badaniach aktywności mikrobiologicznej gleby. [w] *Drobnoustroje środowiska glebowego, aspekty fizjologiczne, biochemiczne, genetyczne*. 37-47. H. Dahm, A. Pokojska-Burdziej (red). Wyd. Adam Marszałek, Toruń. 2001.
11. **Kobus J.:** Biologiczne procesy a kształtowanie żyzności gleby. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 421a, 209-219, 1995.
12. **Kobus J.:** Rola mikroorganizmów w przemianach azotu w glebie. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 440, 151-173, 1996.
13. **Kucharski J.:** Relacje między aktywnością enzymów a żyznością gleb [w] W. Barabasz (red) *Drobnoustroje w środowisku występowanie, aktywność i znaczenie*. 327-347. Akademia Rolnicza Kraków. 1997.
14. **Ladd J.N., Jackson R.B.:** Biochemistry of ammonification. [w] F.J. Stevenson (ed.) *Nitrogen in agricultural soils*. 173-228, Am. Soc. Agron., Madison, 1982.
15. **Mazur T.:** (red.): *Azot w glebach uprawnych*. Państw. Wyd. Naukowe, Warszawa 1991.
16. **Mysków W., Stachyra A., Zięba S., Masiak D.:** Aktywność biologiczna gleby jako wskaźnik jej żyzności i urodzajności. *Roczn. Glebozn.* 47, 89-99. 1996.
17. **Nannipieri P., Kandeler E., Ruggiero P.:** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. [w] R. G. Burns, R. P. Dick (eds) *Enzymes in the environment*. 1-33. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, 2002.
18. **Paul E.A., Clark F.E.:** *Mikrobiologia i biochemia gleb*. Tłumaczenie Wyd. Uniwersytetu Marie-Skłodowskiej, 400, Lublin, 2000.
19. **Wyczółkowski A.I., Dąbek-Szreniawska M.:** Wpływ różniących się rozpuszczalnością substancji organicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych. *Acta Agrophysica*, 73, 349-356, 2002.
20. **Wyczółkowski A.J., Dąbek-Szreniawska M.:** Enzymy biorące udział w mineralizacji azotu organicznego. *Acta Agrophysica* 120, Rozprawy i Monografie, 3, 37-61, 2005.

SOIL ENZYMES ACTIVITY OF AMONIFICATION PROCESS  
IN THE SOIL WITH THE ADDITION OF ORGANIC NITROGEN

*Małgorzata Dąbek-Szreniawska, Agnieszka Zimon, Andrzej I. Wyczółkowski*

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin  
e-mail: mdsz@demeter.ipan.lublin.pl

**Abstract.** The aim of the research was to determine the enzymes activity in soil samples after the addition of organic nitrogen substances. The experiment was carried out on an Orthic Luvisol. The following substances were introduced to the soil: Lupine residues, hyphae residues and Bactosoytone. The activity of deaminase, asparaginase and urease was determined in the soil samples. The highest activity of asparaginase was observed during the experiment.

**Key words:** enzyme activity in soil, asparaginase, urease, desaminase, nitrogen organic substances