ACTA AGROPHYSICA

AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZOWA MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH I DOSTĘPNOŚĆ TLENU W PROCESIE REOKSYDACJI WYBRANYCH MINERALNYCH GLEB POLSKI

Agnieszka Wolińska

180

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

**Rozprawy i Monografie
2010 (3)**

Komitet Redakcyjny
Redaktor Naczelny – Józef Horabik
Zastępca Redaktora Naczelnego – Grzegorz Józefaciuk
Sekretarz Redakcji – Wanda Woźniak

Rada Redakcyjna
Dorota Witrowa-Rajchert – przewodnicząca

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

Opiniowała do druku
Doc. dr hab. Małgorzata Brzezińska

Adres redakcji
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Wydawnictwo
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, tel. (0-81) 744-50-61, www.ipan.lublin.pl

Streszczenia i pełne teksty prac dostępne są na stronie internetowej czasopisma
www.acta-agrophysica.org

Czasopismo jest umieszczone w następujących bazach:
Thomson Scientific Master Journal List
Polish Scientific Journals Contents – Life Sci.
Biblioteka Główna i Centrum Informacji Naukowej Akademii Rolniczej w Poznaniu
Instytut Bibliotekoznawstwa i Informacji Naukowej Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach
Lonicera – serwis botaniczny

©Copyright by Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Lublin 2010

Praca współfinansowana w ramach projektu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N 305 009 32/0514 w latach 2007-2009

ISSN 1234-4125

Acta Agrophysica są do nabycia w dziale Wydawnictw Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie. Prenumeratę instytucjonalną można zamawiać w dziale Wydawnictw Instytutu Agrofizyki PAN w Lublinie oraz w oddziałach firmy Kolporter S.A. na terenie całego kraju. Informacje pod numerem infolinii 0801-205-555 lub na stronie internetowej http://www.kolporter-spolka-akcyjna.com.pl/prenumerata.asp

Wydanie I. Nakład 120 egz. Ark. 7,3
Skład komputerowy: Wanda Woźniak, Druk: *ALF-GRAF*, ul. Abramowicka 6, 20-391 Lublin

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY 5

1. WPROWADZENIE 7

2. GLEBA JAKO ŚRODOWISKO ŻYCIA MIKROORGANIZMÓW 8

3. WPŁYW STANU NATLENIENIA NA MIKROORGANIZMY GLEBOWE 12

3.1. Dostępność tlenu 12

3.2. Potencjał oksydoredukcyjny 15

3.3. Wilgotność gleby 17

4. FUNKCJA OKSYDOREDUKTAZ W GLEBIE 21

4.1. Dehydrogenazy glebowe-integralna część żywych mikroorganizmów 21

4.2. Czynniki środowiskowe wpływające aktywująco na *DHA* 23

4.2.1. Wilgotność gleby 23

4.2.2. Zawartość węgla organicznego 24

4.2.3. Temperatura 25

4.2.4. Głębokość profilu glebowego 26

4.2.5. Odczyn gleby 27

4.2.6. Zmienność sezonowa 27

4.3. Czynniki środowiskowe wpływające inhibująco na *DHA* 28

4.3.1. Metale ciężkie 29

4.3.2. Nawożenie gleby i pestycydy 30

5. MATERIAŁY I METODY 31

5.1. Charakterystyka materiału glebowego 31

5.2. Wyznaczenie zdolności retencyjnych gleb 36

5.3. Wyznaczenie mikrodyfuzji tlenu (*ODR*) 36

5.4. Oznaczenia potencjometryczne (*pH*, *Eh*) 37

5.5. Pomiar aktywności dehydrogenazowej (*DHA*) 37

5.6. Określenie liczebności mikroorganizmów glebowych 38

5.6.1. Skład podłoży 38

5.6.2. Oznaczenie ogólnej liczby bakterii 39

5.6.3. Oznaczenie liczby promieniowców 40

5.6.4. Oznaczenie NPL bakterii amonifikacyjnych 40

5.6.5. Oznaczenie NPL bakterii nitryfikacyjnych 40
5.6.6. Oznaczenie liczby grzybów 41
5.7. Analiza statystyczna wyników 41
6. WYNIKI BADAŃ 41
6.1. Charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych badanych gleb 41
6.1.1. Dostępność wody (zdolności retencyjne gleb) 41
6.1.2. Dostępność tlenu (*ODR*) 48
6.1.3. Stan oksydoredukcyjny podłoża (Eh_7) 49
6.2. *DHA* mikroorganizmów glebowych 51
6.3. Zależność liczebności mikroorganizmów od potencjału wody glebowej 56
6.3.1. Ogólna liczebność bakterii glebowych 56
6.3.2. NPL bakterii amonifikacyjnych 57
6.3.3. NPL bakterii nitryfikacyjnych 58
6.3.4. Liczebność promieniowców 59
6.3.5. Liczebność grzybów 60
6.4. Zależność *DHA* od parametrów aeracynych (*pF*, *ODR*, *Eh*) 61
6.5. Zależność liczebności mikroorganizmów od parametrów fizyko-chemicznych gleb 63
7. DYSKUSJA 65
8. WNIOSKI 74
9. PIŚMIENNICTWO 75
10. STRESZCZENIE 86
11. SUMMARY 87

WYKAZ SKRÓTÓW NAJCZĘŚCIEJ STOSOWANYCH W PRACY

AOB – bakterie utleniające amoniak,
DHA – aktywność dehydrogenazowa,
EC – Komisja Enzymatyczna (Międzynarodowej Unii Biochemii),
Eh – potencjał oksydoredukcyjny,
ΔEh – zmiana wartości potencjału oksydoredukcyjnego,
h – wysokość,
NIR – test najmniejszych istotnych różnic przy 95% przedziale ufności,
NPL – najbardziej prawdopodobna liczba bakterii,
ODR – współczynnik mikrodyfuzji tlenu,
pF – potencjał wody glebowej,
R – współczynnik korelacji,
s.m. – sucha masa gleby,
TPF – trifenyloformazan,
TTC – chlorek 2,3,5 trifenyloterazoliowy,
V – objętość.

1. WPROWADZENIE

Mikroorganizmy stanowią główne źródło enzymów glebowych. Powszechnie uważa się, iż adekwatną miarą żywotności gleby jest oznaczenie aktywności dehydrogenaz – enzymów wewnątrzkomórkowych, zlokalizowanych w cytoplazmie żywych, nienaruszonych komórek mikroorganizmów. Pomiar ten dostarcza bowiem informacji o czynności biologicznej i oddechowej całej populacji organizmów glebowych.

Gleba często jest porównywana do *czarnej skrzynki*. Jej biologia stanowi trudny obszar do dokładnych badań ze względu na heterogenność utworu glebowego, ogromną bioróżnorodność bytujących w niej organizmów oraz wiele współdziałających ze sobą procesów fizykochemicznych, zachodzących w tym środowisku. Rozwój poszczególnych grup mikroorganizmów w danym ekosystemie glebowym warunkowany jest dostępnością tlenu, węgla i wody. Dotychczas zidentyfikowano tylko małą część organizmów glebowych (około 12% bakterii i 5% grzybów), a dane literaturowe podają, że około 99% drobnoustrojów nie tworzy kultur na pożywkach.

W Polsce, pod wpływem procesów glebotwórczych i na bazie rodzimej skały macierzystej ukształtowały się gleby, których procentowy udział w powierzchni kraju szereguje się następująco: gleby brunatne i bielicowe stanowią łącznie 82% powierzchni kraju, gleby bagienne hydrogeniczne (9%), mady (5%), czarne ziemie (2%), czarnoziemy oraz rędziny (po 1%). W przedstawionej pracy, opartej na obserwacjach prowadzonych w trakcie osuszania gleb do badań nad aktywnością dehydrogenazową (*DHA*) wykorzystano materiał reprezentujący wszystkie wspomniane powyżej typy gleb.

Złożoność interakcji zachodzących w wymiarze czasowym pomiędzy skałą macierzystą, klimatem glebowym, krajobrazem, użytkowaniem gleby a żywymi organizmami sprawiają, iż rozwój badań nad biologią utworu glebowego, pomimo niewątpliwych postępów, podąża jednak w zwolnionym tempie.

W literaturze światowej, tylko nieliczni autorzy zwracają uwagę na współzależność aktywności enzymatycznej od czynników fizyko-chemicznych gleby. Brak jest natomiast prac analizujących wzajemne interakcje czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych między sobą, które łącznie stanowią o ogólnej *DHA* w środowisku glebowym i warunkują życie mikroorganizmów. Stąd próbę opisania wspomnianych współzależności podjęto w ramach przedstawionej rozprawy. Postawiono także hipotezę, iż *DHA* mikroorganizmów glebowych może być użyta jako swoisty indykator zarówno niedoboru tlenu w glebie, wykazując

wówczas najwyższe wartości, jak również warunków dobrego natlenienia, co przekłada się na spadek *DHA*. Obserwacje zmian zachodzących w glebie podczas jej osusznia prowadzono w zakresie od jej pełnej pojemności wodnej (*pF* 0), do punktu będącego miarą wody łatwo dostępnej i jednocześnie stanowiącym odpowiednik silnego hamowania wzrostu roślin – *pF* 3,2.

Reasumując zatem cel pracy stanowiło wykazanie współzależności między liczebnością mikroorganizmów glebowych i *DHA* a parametrami aeracyjnymi (*pF*, *ODR*, *Eh*), podczas postępującego w środowisku glebowym procesu reoksydacji – poprawy warunków aeracyjnych po różnym okresie zalania gleb wodą.

Praca została wykonana w Katedrze Biochemii i Chemii Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II, na bazie materiału glebowego pobranego z Banku Gleb Mineralnych Polski, znajdującego się w posiadaniu Instytutu Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie.

2. GLEBA JAKO ŚRODOWISKO ŻYCIA MIKROORGANIZMÓW

Jak wynika z licznych badań zrozumienie funkcjonowania gleby jako środowiska życia organizmów, wymaga znajomości jej budowy. Odnosi się to zarówno do wielkości, jak i kształtu jej komponentów oraz ich połączenia w agregaty, stanowiące najważniejszy czynnik, odpowiadający za aktywność mikrobiologiczną (Czyż 2004, Pagliai i in. 2004, Witkowska-Walczak 2006, Acosta-Martinez i in. 2007, Sey i in. 2008). Nannipieri i in. (2003) zauważyli, iż wzajemne interakcje pomiędzy bioróżnorodnością organizmów żywych, a funkcjonowaniem środowisk glebowych są nadal mało poznane i rozumiane. Badacze ci dowodzą, że gleba posiada kilka cech (faza stała, umożliwiająca tworzenie się agregatów, bogate źródło energii oraz dostępność mikro i makroelementów), które stanowią o tym, iż tworzy ona optymalne środowisko do wzrostu i rozwoju, występujących obok siebie zróżnicowanych organizmów glebowych (schemat 1).

Agnelli i in. (2004), Libudzisz i in. (2007) oraz Stępniewski i Stępniewska (2009) zwracają uwagę na fakt, ze gleba stanowi środowisko biologicznie niejednorodne (heterogenne), w którym występują znaczne różnice w składzie i właściwościach, zależnie od miejsca, z którego pochodzi. Charakteryzuje ją struktura gruzełkowata, złożona z granul elementarnych o wymiarach od 0,5 do 5 mm, powstających z cząstek mineralnych, zlepionych przez substancje humusowe oraz śluz. Granule elementarne tworzą zaś większe agregaty, z kanalikami i otworami wypełnionymi roztworem glebowym i fazą gazową (Dexter 2004, Witkowska-Walczak 2006). Nannipieri i in. (2003), Libudzisz i in. (2007), a także Kunicki-

Goldfinger (2008) opisują, że drobnoustroje są adsorbowane na powierzchni agregatów, bytują w substancjach humusowych, kompleksach organiczno-mineralnych i na częściowo rozłożonych cząstkach materii organicznej, tworząc mikrokolonie. Powstawanie agregatów glebowych umożliwia działanie mikroflory i korzeni roślin, wytwarzających włókna i nitki polisacharydowe, które łącząc się z cząstkami ilastymi tworzą kompleksy organiczno-mineralne (Acosta-Martinez i in. 2007). Ponadto stabilność wspomnianych agregatów jest ściśle uzależniona od aktywności mikroorganizmów glebowych (Sey i in. 2008).

Schemat 1. Główne cechy charakterystyczne gleby jako środowiska życia dla organizmów glebowych (wg Nannipieri i in. 2003)

Agregaty glebowe dzielone są na dwie kategorie:

- mikroagregaty; o średnicy mniejszej niż 250 μm,
- makroagregaty; o średnicy większej niż 250 μm.

Według Paula i Clarka (2000) oraz Sey'a i in. (2008) wymiary porów znajdujących się w mikroagregatach wahają się w granicach od 0,2 do 6 μm, zaś w makroagregatach od 25 do 100 μm. W glebie na ogół mikropory (<0,2 μm), wypełnione są wodą, zależnie od potencjału (*pF*), natomiast makropory (0,2-30 μm) powietrzem. Zgodnie z doniesieniami Turskiego i Witkowskiej-Walczak (2004) woda retencjonowana w porach glebowych o średnicach 18,5-0,2 μm jest po-

wszechnie dostępna dla mikroorganizmów i korzeni roślin, podczas gdy woda trudno dostępna, wypełnia pory o średnicy 2-0,2 μm. Misztal (1997) podaje, iż objętość makroporów (>30 μm), na podstawie krzywej sorpcji wody, zawiera się w przedziale *pF* 0-2, objętość mezoporów (od 30 do 0,2 μm) powstaje w zakresie *pF* 2-4,2 podczas gdy mikropory (<0,2 μm), występują przy potencjale glebowym *pF* 4,2 (granicy stanowiącej punkt trwałego więdnięcia roślin).

Dane literaturowe dowodzą, iż najbardziej preferowane przez bakterie są pory o średnicy 0,8-3 μm. Znaleziono ścisłą korelację pomiędzy biomasą bakterii i występowaniem porów o średnicach w przedziale 0,8-1,2 μm oraz pomiędzy liczbą porów o wymiarach 30-90 μm i biomasą nicieni (Paul i Clark 2000). Według Younga i Ritza (2000) pory o średnicy < 6 μm pozytywnie wpływają na rozwój i bytowanie bakterii glebowych, zaś te > 6 μm mają już negatywny efekt i nie są preferowane przez populacje bakteryjne. Grzyby glebowe natomiast nie przenikają do agregatów o średnicy porów < 30 μm (Paul i Clark 2000).

Agnelli i in. (2004), Dexter (2004) oraz Watson i Kelsey (2006), zauważyli, że obecność agregatów glebowych bogatych we frakcję ilastą wpływa na reakcję enzymów z ich substratami. Cząsteczki minerałów ilastych zdolne są bowiem do adsorbowania enzymów, np. ureaz czy proteaz, co chroni je przed hydrolizą enzymatyczną (Gianfreda i Bollag 1996, Pons i in. 2000, Young i Ritz 2000).

Pietramellara i in. (2009) zwracają uwagę na fakt, iż cząstki stałe gleby zdolne są do adsorbowania na swojej powierzchni zewnątrzkomórkowego DNA, uwolnionego podczas lizy komórek, a który to stanowić może doskonałe źródło węgla, azotu czy fosforu, dostępnych dla mikroorganizmów glebowych, szczególnie w środowiskach ubogich w formy biogenne. Dell'Anno i Danovaro (2005) oszacowali, że egzocellularne DNA obecne w glebie jest w stanie pokryć 4,7-47% dziennego zapotrzebowania mikroorganizmów na C, N i P. Pietramellara i in. (2009) zauważyli również, iż obecność frakcji ilastej zwiększa zdolność gleb do wiązania na ich powierzchni uwolnionych z komórek kwasów nukleinowych. Cai i in. (2007a) dowiedli zaś, iż zewnątrzkomórkowe DNA jest efektywniej chronione przed destruktywnym działaniem nukleaz, kiedy pozostaje związane przez frakcję ilastą gleby.

Rozpatrując obecność mikroorganizmów w glebie, dokonano ich podziału na dwie grupy (Libudzisz i in. 2007, Kunicki-Goldfinger 2008):

- mikroorganizmy autochtoniczne – występujące we wszystkich typach gleb, w obfitości zaś w glebach rolniczo niewykorzystywanych,
- mikroorganizmy zymogenne – bytujące w glebie okresowo i rozwijające się po wprowadzeniu do środowiska glebowego substancji organicznej.

Wśród autochtonów występują wszystkie grupy mikroorganizmów (archeony, bakterie, grzyby) oraz glony i pierwotniaki. Przeważnie są to organizmy saprofityczne, bytujące na martwej substancji organicznej, tlenowe, nie fermentujące sacharydów (Libudzisz i in. 2007). Autochtoniczna mikroflora glebowa obejmuje przede wszystkim liczne Gram-dodatnie lub zmienne w reakcji Grama, nieprzetrwalnikujące pałeczki, rozpadające się w czasie rozwoju na formy ziarenkowate (Kunicki-Goldfinger 2008).

Przeciwieństwem mikroflory autochtonicznej są organizmy zymogenne, których rozwój uwarunkowany jest dopływem świeżej, łatwo przyswajalnej materii organicznej. Organizmy te mogą okresowo przebywać w glebie w stanie anabiozy, po czym gwałtownie namnażają się w odpowiednich warunkach (Liesack i in. 2000, Libudzisz i in. 2007, Lee i in. 2008).

Dane literaturowe dowodzą, iż największe zagęszczenie mikroorganizmów w glebie występuje w warstwie uprawnej (powierzchniowej) oraz wokół korzeni roślin – ryzosferze (Nannipieri i in. 2003, Kunicki-Goldfinger 2008, Lee i in. 2008, Xiang i in. 2008). W warstwie powierzchniowej (na ok. 100 m^2) znajduje się średnio 70 kg masy bakterii i 10-15 kg masy grzybowej (Zawadzki 1999). Natomiast w 1 gramie gleby liczebność bakterii waha się w granicach 10^6-10^9 (Atlas i Bartha 1998). Średnią zawartość poszczególnych grup mikroorganizmów w ekosystemie glebowym przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Średnia zawartość mikroorganizmów w glebie uprawnej do głębokości 25 cm (wg Libudzisz i in. 2007)
Table 1. Average content of microorganisms in cultivated soil to the depth of 25 cm (according to Libudzisz *et al.* 2007)

Mikroorganizmy Microorganisms	Liczba mikroorganizmów w 1 g gleby Number of microorganisms in 1g of soil
Ogólna liczba bakterii, w tym: Total number of bacteria, including:	$5 \cdot 10^7$
Promieniowce – Actinomycetes	$2 \cdot 10^6$
Amonifikatory – Ammonia oxidizing bacteria	$4 \cdot 10^6$
Denitryfikatory – Denitrifying bacteria	$1 \cdot 10^5$
Bakterie tlenowe – Aerobic bacteria	$9 \cdot 10^6$
Bakterie beztlenowe – Anaerobic bacteria	$2 \cdot 10^6$
Grzyby – Fungi	$1 \cdot 10^5$

3. WPŁYW STANU NATLENIENIA NA MIKROORGANIZMY GLEBOWE

Życie drobnoustrojów w środowisku glebowym oraz użytkowanie gleb przez człowieka związane są z naprzemiennymi cyklami ich nawilżania i osuszania. Naturalne wahania uwilgotnienia gleb i ich reoksydacja stanowią ważną zmienną środowiskową, wpływającą bezpośrednio na metabolizm żywych mikroorganizmów, ściśle zależny od stanu fizycznego gleby (Young i Ritz 2000, Brzezińska i in. 2005, Song i in. 2008, Finlay i Esteban 2009). Mikroorganizmy reagują bowiem w odmienny sposób na określony czynnik środowiskowy, którego działanie może być zabójcze dla jednych gatunków a korzystne dla wzrostu i rozwoju innych (Pett-Ridge i Firestone 2005, Libudzisz i in. 2007, Dance 2008, Song i in. 2008).

Wilgotność oraz natlenienie gleb stanowią ważne czynniki determinujące występowanie w danym środowisku określonej populacji drobnoustrojów. Wzrastająca w ostatnich czasach, także w Polsce częstotliwość powodzi, okresowych podtopień, czy też przeciągających się okresów suszy, wskazuje i uzasadnia podejmowanie działań mających na celu głębsze poznanie zjawisk zachodzących w tym czasie w środowisku glebowym.

3.1. Dostępność tlenu

Jak wynika z licznych badań, obecność tlenu jest podstawowym czynnikiem decydującym o składzie oraz aktywności mikroflory glebowej. Szereg danych literaturowych potwierdza też fakt, iż największe zmiany w składzie powietrza glebowego zachodzą pod wpływem działalności mikroorganizmów glebowych oraz korzeni roślin wyższych (Picek i in. 2000, Bennicelli 2002, Bohrerova i in. 2004, Xiang i in. 2008).

Podział mikroorganizmów glebowych ze względu na obecność tlenu w środowisku glebowym przedstawiony został w tabeli 2.

Brune i in. (2000) zauważyli, iż dostępność tlenu wywiera olbrzymi wpływ na sytuację energetyczną mikroorganizmów, bytujących w danym ekosystemie glebowym. Sporządzając bilans energetyczny dostępności tlenu dla żywych organizmów oszacowali, że proces utleniania NADH ($E_0' = -320$ mV) w połączeniu z redukcją tlenu do postaci wody ($E_0' = +818$ mV) powoduje zmianę uzyskanej wolnej energii ($\Delta G^{0'}$) o – 220 kJ mol^{-1}, podczas gdy ta sama reakcja w połączeniu z redukcją CO_2 do CH_4 ($E_0' = -244$ mV) przynosi zmianę energetyczną na poziomie jedynie –15 kJ·mol^{-1}.

Gilles-Gonzales i Gonzales (2005), Wilson i Reeder (2008) oraz Finlay i Esteban (2009) określili, iż wrażliwość drobnoustrojów na obecność tlenu związana jest z posiadaniem przez nie specyficznych białek hemowych, tzw. HaemAT, zlokalizowanych w cytoplazmie bądź mitochondriach, które odbierają i przekazują wysyłane im informacje na temat warunków tlenowych, panujących w środowisku.

Dane literaturowe podają, iż minimalna objętość porów wypełnionych powietrzem dostateczna do pokrycia potrzeb tlenowych mikroorganizmów i korzeni roślin powinna wynosić około 10% ogólnej objętości porów (Zawadzki 1999, Witkowska-Walczak 2006).

Tabela 2. Podział mikroorganizmów glebowych według reakcji na tlen (wg Libudzisz i in. 2007)
Table 2. Soil microorganisms classification by oxygen reaction (according to Libudzisz *et al.* 2007)

Tlenowce Aerobes	Beztlenowce fakultatywne Facultative anaerobes	Beztlenowce Anaerobes
Micromycetes, Actinomycetes, Nitrosomonas, Nitrobacter, Thiobacillus, Hydrogenomonas, Ferrobacillus, Carboxydomonas, Azotobacter, Azomonas, Arthrobacter, Derxia, Beijerinckia, Rhizobium, Pseudomonas	*Thiobacillus denitrificans, Paracoccus denitrificans, Saccharomyces*	*Desulfovibrio desulfuricans Rhodospirillaceae, Chromatiaceae, Chlorobiaceae, Clostridium Propionibacterium Fusobacterium Prevotella Porphyromonas Methanobacterium*

Jednakże przy pokryciu powierzchni gleby wodą, jak zdarza się często podczas bardzo obfitych opadów lub powodzi (stres tlenowy-anoksja), dyfuzja tlenu do gleby ulega niemalże całkowitemu zahamowaniu, konsekwencją tego jest spowolnienie aktywności mikrobiologicznej aerobów (Liesack i in. 2000, Horn 2002, Gianfreda i in. 2005).

Stwierdzono, iż zmiana metabolizmu z tlenowego na beztlenowy zachodzi w środowisku glebowym wtedy, gdy stężenie tlenu spadnie poniżej 1% (Brune i in. 2000, Paul i Clark 2000, Carrasco i in. 2006, Finlay i Esteban 2009). Można pokusić się więc o stwierdzenie, iż bakterie tlenowe przygotowują warunki do

rozwoju bakterii beztlenowych, gdyż ich wzrost w mikrosiedlisku powoduje wyczerpywanie zasobów tlenu, co pociąga za sobą w konsekwencji wzmożony rozwój organizmów fakultatywnych i anaerobowych (Brzezińska i in. 2005, Pett-Ridge i Firestone 2005, Włodarczyk i Kotowska 2006, Finlay i Esteban 2009). Mikroorganizmy fakultatywne charakteryzują się zdolnością do wytwarzania energii w warunkach anoksycznych, w przeciwieństwie do obligatoryjnych anaerobów, które giną w środowiskach natlenionych. Organizmy odporne na obecność tlenu zawierają odpowiednie enzymy: dysmutazę bądź katalazę (tab. 3), zdolne do usuwania toksycznych form tlenu (Atlas i Bartha 1998, Paul i Clark 2000).

Tabela 3. Enzymy bakteryjne chroniące komórki przed toksycznymi formami tlenu (wg Atlas i Bartha 1998)
Table 3. Bacterial enzymes protecting their cells against the toxic forms of oxygen (according to Atlas and Bartha 1998)

Mikroorganizmy – Microorganisms	Katalaza Catalase	Dysmutaza ponadtlenkowa Superoxide dismutase
Aeroby – Aerobes	+	+
Fakultatywne anaeroby – Facultative anaerobes	+	+
Mikroaerofile – Microaerophiles	–	+
Obligatoryjne anaeroby – Obligatory anaerobes	–	–

Liczne prace opisują, iż niedotlenienie środowisk glebowych powoduje znaczące zmiany w składzie i metabolizmie oddechowym, bytujących w nich mikroorganizmów (Bohrerova i in. 2004, Pett-Ridge i Firestone 2005, Brzezińska 2006, Włodarczyk i Kotowska 2006, Xiang i in. 2008). Zmiany te w głównej mierze dotyczą fakultatywnych beztlenowców, które w warunkach tlenowych korzystają z obecności tlenu, zaś w stanie stresu tlenowego zdolne są do korzystania z innych, nieorganicznych akceptorów elektronów (Atlas i Bartha 1998, Kottler i in. 2001, Xiang i in. 2008). Organizmy anaerobowe nie posiadają enzymów, takich jak np. katalazy, które spełniałyby funkcje ochronną przed szkodliwym dla nich wpływem tlenu (Kawasaki i in. 2005, Pett-Ridge i Firestone 2005).

Song i in. (2008) oraz Stępniewski i Stępniewska (2009) dowiedli, że w warunkach stresu tlenowego (niedobór tlenu), dostępność mikro- i makroelementów w środowisku glebowym spada 2-4 krotnie w porównaniu do środowisk dobrze

natlenionych. Bytowanie więc w warunkach anoksycznych wymaga od żyjących drobnoustrojów znacznie wyższych wydatków energetycznych. Co więcej, ograniczenie dostępności tlenu skutkuje zmianami w strukturze zbiorowisk mikroorganizmów, objawiającymi się redukcją ich zróżnicowania gatunkowego i spadkiem liczebności (Song i in. 2008). Bezpośredni związek pomiędzy zróżnicowaniem populacji drobnoustrojów glebowych, a ograniczeniem tlenowym przedstawiony jest również w pracach Urukawy i in. (2000) oraz Chuanga i in. (2007). Brune i in. (2000), a także Das i Dangar (2008) podają zaś, iż wiele spośród gatunków fakultatywnych anaerobów dobrze adaptuje się do warunków związanych ze stresem tlenowym i cechuje się zdolnością do utrzymywania życiowych funkcji metabolicznych na wyrównanym poziomie niezależnie od obecności, bądź braku tlenu w środowiskach w których bytują. Większość drobnoustrojów beztlenowych formuje bowiem spory, a te gatunki, które nie posiadają takich możliwości modyfikują swój metabolizm i w ten sposób wytrzymują stany anoksyczne (Atlas i Bartha 1998). Das i Dangar (2008) jako przykład gatunku dobrze znoszącego niedobór tlenu wskazują na bakterię *Bacillus thuringiensis*. Kawasaki i in. (2005) z kolei twierdzą, że takimi organizmami są bakterie z rodzaju *Clostridium*, a w szczególności *Clostridium acetobutylicum, C.butyricum, C. glycolicum* i *C. aminovalericum*. Według badań prowadzonych przez tych badaczy, mikroorganizmy z rodzaju *Clostridium*, do niedawna uważane za drobnoustroje beztlenowe, stanowią specyficzną grupę mikroorganizmów, posiadających system umożliwiający im metabolizowanie tlenu. Kawasaki i in. (2004) określili ponadto, iż w komórkach *Clostridium* znajdują się aktywne NADH-oksydazy, odpowiadające za redukcję tlenu. Enzymy te uaktywniają się szybko, notowany jest bowiem nawet ich 5-krotny wzrost już po 30 minutach od przekroczenia granicy 3% tlenu w środowisku glebowym. Küsel i in. (2001) dowiedli, iż bakterie glebowe *Clostridium glycolicum*, zdolne są do wzrostu w obecności nawet 6% tlenu w środowisku, podczas gdy generalnie drobnoustroje z tego gatunku tolerują maksymalnie 1-3% tlenu w powietrzu glebowym. Kawasaki i in. (2005) unikalne zdolności tych mikroorganizmów, łączyli z posiadaniem przez niektóre ich odmiany, jak: *Clostridium aminovalericum*, specyficznych genów, tzw. nox*A*, odpowiedzialnych za metabolizm tlenu.

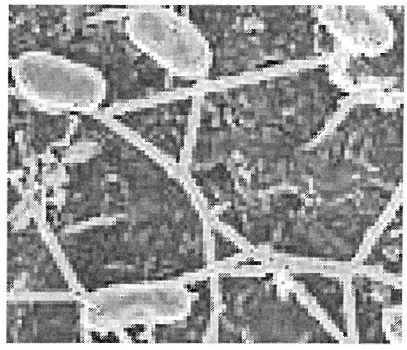
3.2. Potencjał oksydoredukcyjny

Rola potencjału oksydoredukcyjnego (*Eh*), warunkującego dostępność substratów w środowisku glebowym a ponadto spełniającego zasadniczą rolę w regulacji liczebności i zróżnicowaniu gatunkowym mikroorganizmów została przed-

stawiona w opracowaniach Lüdemanna i in. (2000), Pett-Ridge'a i Firestone'a (2005), Hinesa (2006) oraz Songa i in. (2008). Libudzisz i in. (2007) oraz Kunicki-Goldfinger (2008) podają, iż bezwzględne beztlenowce (anaeroby), rosnące wyłącznie w nieobecności tlenu, preferują środowiska o niskim potencjale oksydoredukcyjnym (*Eh*) poniżej 0,2 V podczas gdy względne beztlenowce rosnące zarówno w obecności jak i przy braku tlenu, zdolne są do bytowania zarówno przy obniżonym (wartości ujemne) potencjale oksydoredukcyjnym, jak i przy jego dodatnich wartościach. Aeroby natomiast, rosnące tylko w obecności tlenu, preferują wartości *Eh* w zakresie od 0,2 do 0,4 V.

Wartość potencjału redoks w rozwijającej się hodowli bakteryjnej zależy nie tylko od właściwości buforujących składników podłoża, lecz jest również modyfikowana przez działalność samych drobnoustrojów. Mechanizm ten, prowadzący do obniżenia *Eh* podłoża polega prawdopodobnie na tym, że bakterie wytwarzają w rezultacie procesów niezupełnego utleniania substratu, substancje zredukowane (Kunicki-Goldfinger 2008). Warto zdać sobie sprawę, iż zapas wszystkich substratów w biosferze jest skończony, jednakże dzięki zamkniętym cyklom obiegu pierwiastków, od 2 miliardów lat trwa na Ziemi nieprzerwanie globalny proces redoks (Weiner 2006). Wspomniane reakcje zachodzą przy udziale enzymów (biokatalizatorów), które wydzielane są przez mikroorganizmy glebowe.

Nowym aspektem we współczesnej mikrobiologii staje się obecnie odkrycie Ntarlagiannis i in. (2007), zwracające uwagę na zdolność niektórych bakterii do tworzenia połączeń w formie nanodrutów (fot. 1), układających się w swoistego rodzaju sieci w środowisku glebowym. Sieć taka umożliwia bakteriom uwolnienie się od elektronów, wytwarzanych podczas metabolizmu oraz przetransportowanie ich w niekiedy odległe miejsca, pełniące rolę „składowisk elektronów" (Ball 2007).



Fot. 1. Obraz komórek bakteryjnych z widocznymi połączeniami w formie włókienkowych nanodrutów (wg Balla 2007)
Photo 1. An image showing bacterial cells with visible links in the form of filamentary nanowires (according to Ball 2007)

Najlepiej poznanym i opisanym dotąd gatunkiem pod względem posiadania specyficznych nanodrutów jest bakteria *Shewanella oneidensis*. Ntarlagiannis i in. (2007) wyrażają pogląd, iż mikroorganizmy faktycznie wykorzystują owe nanodruty w celu przetacza-

nia elektronów. Podobne obserwacje prowadzone były przez Finlay'a i Esteban (2009), którzy zauważyli, iż pewne gatunki bakterii aerobowych (*Loxodes magnus*, *L. striatus*, *Spirostomum teres*, *Frontonia leucas*) także mają zdolność tworzenia między sobą połączeń w formie nanodrutów.

Song i in. (2008), prowadząc badania nad zróżnicowaniem mikroorganizmów glebowych pod wpływem zmian potencjału redoks, wzięli pod uwagę trzy skrajne środowiska bytowania drobnoustrojów glebowych, a mianowicie: glebę czarnoziemną (*Meadow-Chernozem*) dobrze natlenioną, sezonowo zalewaną oraz zalaną stale. Badacze ci stwierdzili, iż w warunkach tlenowych dominującą grupą mikroorganizmów były bakterie Gram-ujemne i promieniowce, zaś grzyby mikoryzowe stanowiły 12% liczebności wszystkich organizmów. Także stężenie DNA mikroorganizmów było 4,5 razy wyższe w glebach natlenionych aniżeli w środowiskach anaerobowych. W warunkach zaś beztlenowych najwyższą liczebność (16% wszystkich drobnoustrojów) wykazały bakterie Gram-dodatnie, co wskazuje na ich niewielką wrażliwość na tlen w porównaniu z innymi grupami organizmów. Były bowiem one wykrywane na poziomie >10%, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Ponadto Song i in. (2008) zaobserwowali, iż liczebność bakterii Gram-dodatnich wykazywała tendencję wzrostową (nawet do 33%) wraz ze zwiększaniem się głębokości profilu glebowego i spadkiem potencjału redoks.

Doświadczenia tych badaczy zwracają także uwagę na istnienie podobieństw w strukturze oraz różnorodności gatunkowej mikroorganizmów bytujących w środowiskach o niskim potencjale redoks (anoksja glebowa), bądź zalewanych czasowo. Trudno zaś znaleźć jakiekolwiek podobieństwa wspomnianych grup z organizmami żyjącymi w warunkach aerobowych, czyli przy wysokich wartościach *Eh*. Obserwacje te stanowią zatem ewidentny dowód, iż to dostępność tlenu, a co za tym idzie stan redoks środowiska glebowego stanowi niezwykle ważny czynnik, determinujący występowanie określonej populacji mikroorganizmów.

3.3. Wilgotność gleby

Jak wykazały liczne badania, życie mikroorganizmów jest możliwe tylko przy dostępie wody. Ich funkcje życiowe są uzależnione nie tylko od zawartości wody w środowisku, ale również od stężenia rozpuszczonych związków (Atlas i Bartha 1998, Libudzisz i in. 2007, Kunicki-Goldfinger 2008, Sey i in. 2008, Xiang i in. 2008). Związki te, ulegając hydratacji, zmniejszają zasoby wody, będącej do dyspozycji komórek drobnoustrojów (Holmstrup 2001). Warunki wodno-powietrzne stanowią zatem niezwykle ważny czynnik regulujący aktywność mikroorgani-

zmów, jako że od tego uzależniony jest ich typ metabolizmu oraz szereg przystosowań, jakie muszą wykształcić w odpowiedzi na panujące warunki środowiskowe (Brzezińska i in. 2000, Stępniewski i in. 2000a, Gleeson i in. 2008, Unger i in. 2009). Schimel i in. (2007) zwracają uwagę na fakt, iż dostępność wody wpływa ponadto na stan osmotyczny komórek mikroorganizmów oraz bezpośrednio warunkuje *pH* danego środowiska glebowego, jego temperaturę, dyfuzję gazów jaka w nim zachodzi oraz poziom i dostępność substratów. Okresy suszy i związany z tym stres wodny, a następnie gwałtowne nawodnienie środowiska glebowego znajdują szybkie odbicie w charakterze społeczności mikroorganizmów (Young i Ritz 2000). Według Gleesona i in. (2008) w warunkach nawodnienia gleby, po długim okresie suszy ma miejsce liza komórek mikroorganizmów połączona z uwolnieniem z nich wewnątrzkomórkowych enzymów. Ponadto w takich warunkach dochodzi do wzrostu szybkości mineralizacji zarówno węgla jak i azotu. Badacze ci wysunęli więc koncepcję, iż autotroficzne bakterie utleniające amoniak (AOB), ze względu na ich sporą wrażliwość na naprzemienne warunki osuszania i zalania, mogą stanowić swoisty indykator stresu wodnego w środowisku glebowym. Dowiedli także, iż ta grupa mikroorganizmów wykazuje molekularne zróżnicowanie w zależności od warunków środowiskowych (zalanie, susza). Potwierdzeniem tej hipotezy stało się znalezienie przez Gleesona i in. (2008) istotnej korelacji ($p<0,001$) pomiędzy potencjałem wody glebowej a zróżnicowaniem gatunkowym bakterii, związanych z przemianami azotu w środowisku glebowym.

Atlas i Bartha (1998) oraz Libudzisz i in. (2007) podają, iż do określenia zapotrzebowania drobnoustrojów na wodę stworzono termin aktywności wody w środowisku (a_w). Wartość tego wskaźnika określa stosunek ciśnienia parcjalnego roztworu glebowego do ciśnienia parcjalnego czystej wody (Kunicki-Goldfinger 2008). Przyjęto, że czysta chemicznie woda ma aktywność równą 1; ze wzrostem stężenia związków rozpuszczonych aktywność wody maleje poniżej tej wartości (Atlas i Bartha 1998). Niemniej jednak, nawet bardzo znaczne obniżenie aktywności wody w środowisku nie musi oznaczać śmierci komórek. Niektóre drobnoustroje, zwłaszcza formy przetrwalnikowe, mogą w suchych środowiskach przetrwać przez wiele lat w stanie anabiozy (Libudzisz i in. 2007). Gianfreda i Bollag (1996) wykazali, iż spadek zawartości wody w glebie może również prowadzić do powstania hipertonicznego ciśnienia osmotycznego, powodując w konsekwencji obniżenie aktywności mikrobiologicznej, bądź wysuszenie komórek bakteryjnych. Podobne doświadczenia prowadzone były przez Pascuala i in. (2007).

Minimalne wartości aktywności wody dla różnych drobnoustrojów glebowych przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Minimalna wartość aktywności wody (a_w), niezbędnej dla wzrostu rożnych mikroorganizmów (wg Libudzisz i in. 2007 oraz Kunickiego-Goldfingera 2008)
Table 4. Minimum values of water activity (a_w), indispensable for growth of different microorganisms (according to Libudzisz *et al.* 2007 and Kunicki-Goldfinger 2008)

Minimalna a_w Minimum a_w	Mikroorganizmy – Microorganisms
1,0	*Caluobacter, Spirillum*
0,98	*Pseudomons, Vibrio*
0,95	bakterie Gram-ujemne – Gram-negative bacteria,
0,92	glony morskie – marine algae,
0,91	*Bacillus, Lactobacillus*
0,90	Gram-dodatnie ziarniaki – Gram positive coccus bacteria
0,85	niektóre grzyby strzępkowe – some filamentous fungi,
0,88	*Staphylococcus aureus*
0,80	większość drożdży – most yeasts
0,75	większość grzybów strzępkowych – most filamentous fungi,
0,60	bakterie i glony halofilne – bacteria and halophil algae

Grzyby, w porównaniu z innymi drobnoustrojami, zdolne są do bytowania przy stosunkowo niskich wartościach a_w. Wzrost większości z nich jest bowiem zahamowany przy aktywności wody wynoszącej 0,80 (Libudzisz i in. 2007). Bakterie zaś są bardziej wrażliwe od grzybów na spadek aktywności wody w środowisku glebowym. Dla większości gatunków bakterii optymalna wartość a_w mieści się w zakresie 0,98- 0,99 (Atlas i Bartha 1998). Według danych przedstawionych przez Libudzisz i in. (2007), najniższą aktywnością wody, przy której stwierdzono wzrost bakterii, jest a_w = 0,75 i dotyczy to bakterii halofilnych (*Halomonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paracoccus*). Gleeson i in. (2008) dowiedli, iż lepsza tolerancja grzybów i bakterii Gram-dodatnich na stres wodny wynika z budowy ich ściany komórkowej, która jest dużo grubsza aniżeli u innych grup mikroorganizmów. Podobne wnioski pojawiają się również w pracy Schimela i in. (2007).

Wzrost i bytowanie drobnoustrojów w glebie o niskiej zawartości wody jest możliwe dzięki syntetyzowaniu w komórkach, bądź pobieraniu ze środowiska i akumulacji substancji rozpuszczalnych (np. sacharydów, polihydroksyalkoholi, aminokwasów, chlorków sodu czy potasu). Substancje te działają bowiem stabilizująco na równowagę osmotyczną układu komórka-środowisko. Bakterie glebowe w warunkach stresu osmotycznego syntetyzują głównie aminokwasy, przy

czym bakterie Gram-dodatnie preferują zwykle trimetyloglicynę i prolinę podczas gdy Gram-ujemne – kwas glutaminowy (Libudzisz i in. 2007).

Jedną z wielkości fizycznych, która określa wiązanie wody przez glebę jest potencjał wody glebowej (bądź zwyczajowo-siła ssąca gleby), definiowany jako $pF = \log h$ (cm H_2O). Jest to logarytm dziesiętny z wysokości słupa wody h (cm), którego ciśnienie odpowiada potencjałowi wody glebowej (Walczak i in. 2001a, Stępniewska i in. 2003, Groenevelt i Grant 2004). Bednarek i in. (2005), definiując pF zwracają uwagę na fakt, iż określa on pracę potrzebną do usunięcia jednostki masy wody poza zasięg sił (adhezji i kohezji) utrzymujących tę wodę w glebie. Wspomniane dwie składowe siły regulują również ruch wody w glebie oraz jej pobieranie przez korzenie roślin i mikroorganizmy glebowe (Misztal 1997).

Wartość pF 0 odpowiada pełnej pojemności wodnej (wszystkie pory glebowe wypełnione są wodą), zaś pF równe 2,2 jest miarą polowej pojemności wodnej, określającej maksymalną ilość wody, jaką konkretna gleba może utrzymać bez kontaktu z wodą gruntową (Atlas i Bartha 1998, Bednarek i in. 2005). Natomiast wartość pF wynosząca 4,2 odpowiada punktowi trwałego więdnięcia roślin (Turski i in. 1984). Związek pomiędzy potencjałem wody w glebie, wyrażonym w jednostkach pF, a jej zawartością określoną jako procentowa wilgotność gleby, nazywa się krzywą wiązania wody przez glebę (krzywą sorpcji wody) lub po prostu krzywą pF.

Podział mikroorganizmów glebowych pod względem potencjału wody glebowej przy którym mogą się one rozwijać, uwzględnia 3 grupy drobnoustrojów (Gliński i in.1983, Bednarek i in. 2005):

- organizmy higrofilne, które mogą rozwijać się przy wysokim potencjale wody, ale nie przekraczającym pF 4,85 (np. bakterie, niektóre grzyby),
- organizmy mezohigrofilne, których aktywność zanika dopiero przy potencjale rzędu pF 4,85-5,48 (np. większość grzybów),
- organizmy kserofilne, zdolne do procesów życiowych jeszcze przy potencjałach wody ponad pF 5,48 (np. niektóre pleśnie: *Aspergillus niger*, *A. glaucus*, *Penicilium glaucum*).

Bednarek i in. (2005) wykazali, iż potencjałem granicznym, powyżej którego nie stwierdza się już żadnych procesów mikrobiologicznych jest pF 5,68. Stąd też wartości $pF = 4,2$, identyfikowanej przez wielu autorów z wilgotnością trwałego więdnięcia roślin nie można traktować jako absolutnej granicy biologicznej użyteczności wody glebowej, gdyż aktywność większości mikroorganizmów glebowych, zamiera dopiero przy znacznie większych wartościach pF. Według Glińs-

skiego i in. (1983) maksimum respiracji mikrobiologicznej gleby występuje najczęściej w przedziale potencjału wody odpowiadającemu *pF* 2-4. Stwierdzono również, iż nawilżenie wysuszonej gleby powoduje wzrost liczebności mikroorganizmów glebowych na skutek zwiększonej podatności na rozkład biologiczny substancji organicznej, spowodowany częściowym jej utlenieniem w trakcie suszenia (Gliński i in. 1983, Bennicelli i in. 1999, Pett-Ridge i Firestone 2005).

4. FUNKCJA OKSYDOREDUKTAZ W GLEBIE

Oksydoreduktazy (EC 1.) stanowią klasę enzymów katalizujących reakcje związane z przeniesieniem protonu i elektronu lub samego elektronu z donora na akceptor, którym może być związek organiczny, nieorganiczny, bądź tlen (Włodarczyk 2000, Brzezińska i in. 2005, Kunicki-Goldfinger 2008).
Wiele z tych enzymów znanych jest jako:

- **oksydazy** – katalizujące przenoszenie wodoru na tlen w wyniku czego powstaje woda lub nadtlenek wodoru (oksydazy pierwszego zespołu – produktem jest woda, np. oksydaza cytochromowa, oksydazy drugiego zespołu – produktem jest nadtlenek wodoru, np. oksydaza ksantynowa),
- **peroksydazy** – katalizujące utlenianie nadtlenkiem wodoru różnych substratów (np. peroksydaza glutationowa lub askorbinowa),
- **oksygenazy** – katalizujące proces wbudowywania tlenu w cząsteczkę, wśród nich możemy wyróżnić: dioksygenazy – włączające 2 atomy tlenu do substratu, oraz monoksygenazy – włączające 1 atom tlenu do hydroksylowego substratu, podczas gdy drugi atom tlenu wiązany jest w cząsteczkę wody z udziałem NAD(P)H,
- **hydroksylazy** – katalizujące reakcje z udziałem tlenu,
- **dehydrogenazy** – katalizujące utlenienie substratu w procesach oddechowych.

4.1. Dehydrogenazy glebowe-integralna część żywych mikroorganizmów

Dehydrogenazy są enzymami należącymi do klasy oksydoreduktaz, katalizujących reakcje utleniania i redukcji (Brzezińska i in. 1998, Gianfreda i in. 2005). Jak podają liczne prace, są to enzymy wyłącznie wewnątrzkomórkowe zlokalizowane w cytoplaźmie bądź strukturach cytoplazmatycznych, a odpowiadające za utlenianie substratu w procesach oddechowych (Roldan i in. 2005, Brzezińska 2006, Mijangos i in. 2006, Moreno i in. 2007, Tripathi i in. 2007). Dehydrogena-

zy są wysoce specyficzne. Wobec każdego utlenionego w komórce substratu istnieje właściwa jemu dehydrogenaza (Kunicki-Goldfinger 2008).

Dick i Tabatabai (1992), Brzezińska i in. (2000) oraz Włodarczyk (2000) stwierdzili, że największa ilość dehydrogenaz glebowych występuje w mikroorganizmach anaerobowych, szczególnie w warunkach zalania gleb wodą, co stwarza sprzyjające warunki namnażania się organizmów beztlenowych. Według Włodarczyk (2000), aktywne dehydrogenazy zdolne są do wykorzystywania zarówno O_2 jak i związków Mn i Fe, jako akceptora elektronów. Stąd *DHA* mikroorganizmów glebowych stanowi doskonałe odzwierciedlenie zmian w populacji drobnoustrojów glebowych, analogicznie do *Eh*. Brzezińska i in. (1998 i 2000) znaleźli wysoką korelację pomiędzy *DHA* a *Eh* oraz *ODR*. Badacze ci zasugerowali ponadto, iż zarówno zawartość wody w glebie, jak i temperatura warunkują zmiany w *DHA* poprzez wpływ na jej status oksydoredukcyjny. Podobne rezultaty i obserwacje wynikają z badań przedstawionych przez Stępniewskiego i in. (2000a).

Liczni autorzy wskazują, iż pomiar aktywności dehydrogenaz stanowi wskaźnik funkcji oddechowej, związanej z aktywnością metaboliczną całej populacji bakteryjnej (Brzezińska 2002, Moreno i in. 2007, Koper i in. 2008, Vogeler i in. 2008). Gianfreda i in. (2005) wykazali, że udział dehydrogenaz w przemianach materii organicznej gleby prowadzi do wytworzenia energii i produktów, którymi często są CO_2 i H_2O.

$$\text{materia organiczna gleby} \xrightarrow[\text{ADP + Pi}]{\text{DEHYDROGENAZY}} H^+ + e^- + ATP + \text{produkty}$$

Alef i Nannipieri (1995) opisali, iż reakcje katalizowane przez dehydrogenazy możliwe są dzięki obecności ich specyficznych koenzymów (przede wszystkim NAD), bezpośrednio ulegających redukcji podczas utleniania substratu, a następnie szybko regenerowanych podczas przekazywania protonów i elektronów na kolejny układ redoks. Od utlenianego substratu dehydrogenazy odczepiają dwa atomy wodoru, które to następnie przyłączają do różnych przenośników. Proces dehydrogenacji (odwodorowania) ma miejsce z wykorzystaniem koenzymów pirydynowych lub flawoproteinowych, w zależności od typu dehydrogenazy (Kunicki-Goldfinger 2008).

Najczęściej spotykane są:

- **dehydrogenazy pirydynowe** – jako koenzym wykorzystujące dinukleotydy pirydynowe (NAD lub NADP),

- **dehydrogenazy flawinowe** – kiedy w roli koenzymu występuje FMN bądź FAD.

Szereg badań potwierdził fakt, iż dehydrogenazy glebowe uwolnione z żywych komórek mikroorganizmów w środowisku glebowym są nietrwałe i szybko ulegają dezaktywacji. Stąd też pomiary aktywności tej grupy enzymów utożsamiane są z obecnością i żywotnością całej populacji drobnoustrojów (Włodarczyk 2000, Singh i Kumar 2008). Nannipieri i in. (1996 i 2003) oraz Vogeler i in. (2008) zaobserwowali, że obecność dehydrogenaz skorelowana jest z zawartością oraz dostępnością w środowisku glebowym: wody, tlenu, węgla organicznego i azotu ogólnego. Analizując aktywność dehydrogenaz można stwierdzić zatem, iż enzym ten określa intensywność i kierunek procesów biochemicznych w procesie glebotwórczym.

Dziś aktywność enzymów glebowych jest używana jako wskaźnik ogólnej aktywności biologicznej gleby, jak też jej żyzności bardziej niż inne wskaźniki biologiczne, takie jak intensywność oddychania, czy też określanie liczebności mikroorganizmów (Koper i in. 2004, Roldan i in. 2005, Yang i in. 2005, Jezierska-Tys i Frąc 2008).

4.2. Czynniki środowiskowe wpływające aktywująco na *DHA*

Aktywatorami enzymatycznymi są/mogą być substancje wzmagające lub umożliwiające działanie enzymów. Najczęściej zaliczane są do nich związki niskocząsteczkowe, których obecność w miejscu katalizy enzymatycznej przyspiesza przebieg reakcji. Aktywatorami enzymów mogą być jony metali (np. Mn^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, rzadziej Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}), czy aniony współdziałające z białkami (np. Cl^{-}). Jon metalu może być zlokalizowany w katalitycznym centrum enzymu (bierze wówczas bezpośredni udział w reakcji) lub też w innym fragmencie molekuły (stabilizuje wtedy jej aktywną konformację). Niektóre aktywatory enzymatyczne chronią enzymy przed działaniem czynników chemicznych, inne odszczepiają od nieczynnych proenzymów blokujące je grupy chemiczne. Rolę aktywatorów *DHA* często przejmują również czynniki środowiskowe m.in.: wilgotność, temperatura czy *pH*. Jednakowoż ważny pozostaje również wpływ głębokości oraz pory roku na aktywność dehydrogenaz glebowych.

4.2.1. Wilgotność gleby

Już w latach 70-tych pojawiały się prace, dotyczące zależności aktywności enzymatycznej od panujących warunków środowiskowych, w tym uwilgotnienia podłoża. Wzrost poziomu *DHA* zawsze obserwowany był przy wyższej wilgotno-

ści gleby (Barros i in. 1995, Nayak i in. 2007, Pascual i in. 2007). Notowano nawet 2,5-krotny wzrost aktywności w glebie przy przejściu do wilgotności stanowiącej *pF* 0, natomiast Xiang i in. (2008) stwierdzili 5-krotnie wyższą *DHA* w glebie zalanej, aniżeli w warunkach suchych. Taki kierunek przemian wskazuje na zwiększone znaczenie bakterii anaerobowych, zasiedlających wilgotne środowiska glebowe w tworzeniu *DHA* (Włodarczyk 2000, Pascual i in. 2007). Chendrayan i in. (1980), porównując glebę o wilgotności odpowiadającej 60% pełnej pojemności wodnej z glebą zalaną stwierdzili, iż ma miejsce znaczący wzrost *DHA* w warunkach zalania. Wzrostowi temu towarzyszył jednocześnie spadek wartości *Eh* (Brzezińska i in. 2000), oraz wzrost jonów Fe^{2+} (Chendrayan i in. 1980, Gliński i in. 1986, Stępniewska 1988). Brzezińska i in. (2000) potwierdzili wzrost *DHA* w glebie *Eutric Histosol* przy 100% wilgotności, natomiast zaobserwowali spadek *DHA* kiedy wilgotność gleby przekroczyła 200% w/w. Badania Stępniewskiego i in. (2000a) stanowią doskonałe potwierdzenie korelacji pomiędzy *DHA* i *pF*. Obserwowali oni bowiem spadek *DHA* wraz ze wzrostem wartości *pF* ($p<0.001$). Taki kierunek przemian wskazuje na typową reakcję gleb mineralnych na proces wysycenia wodą, co zostało opisane przez Chendryana i in. (1980), Glińskiego i in. (1986), Brzezińską i in. (1998). Subhani i in. (2001), notowali wysoką, pozytywną korelację (R = 0,87**), między wilgotnością gleb i poziomem *DHA*. Gliński i współautorzy (1983, 1986, 2004) wykazali, iż *DHA* jest nie tylko odbiciem warunków wilgotnościowych ale i tlenowych, pozostając w ścisłej korelacji z dostępnością tlenu dla korzeni roślin. Omawiana aktywność wzrastała do 10 razy przy spadku *ODR* <40 $\mu g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Wzrost czynności dehydrogenaz glebowych w wyniku zalania gleb wodą sygnalizowany był również przez Tiwariego i in. (1989), Brzezińską i in. (2001a), Włodarczyk i in. (2002), Hinojosę i in. (2004) oraz Pascuala i in. (2007).

4.2.2. Zawartość węgla organicznego

Dotychczas przeprowadzone badania, potwierdzają istnienie dodatniej korelacji między *DHA* i zawartością materii organicznej w glebie (De Mora i in. 2005, Tripathi i in. 2007, Koper i in. 2008, Lee i in. 2008, Xiang i in. 2008). Pascual i in. (2000) notowali niski poziom *DHA* w glebach jałowych, w których ubytek materii organicznej utrzymywał się powyżej 10 lat. Spadek aktywności enzymatycznej wraz z upływem czasu może być wynikiem postępującego zjawiska erozji (Pascual i in. 2000, Song i in. 2008). Koper i in. (2008) znaleźli ścisłą zależność pomiędzy zawartością węgla organicznego a *DHA* w glebach bielicoziemnych, opisaną przez nich współczynnikiem korelacji w zakresie R = 0,56-0,98.

Doświadczenie przeprowadzone przez Kumar i współautorów (1992) nie tylko potwierdza istnienie wspomnianej zależności, lecz jednocześnie wskazuje na wyraźny związek pomiędzy omawianą aktywnością, a liczebnością grzybów czy bakterii, bytujących w danym środowisku glebowym. Podobne obserwacje prowadzone były również przez Dąbek-Szreniawską i in. (1996). Badania wykazały, iż rozmieszczenie bakterii w glebie nie jest równomierne, przy czym na ogół ich ilość zwiększa się w miarę wzrostu zawartości rozkładającej się substancji organicznej oraz występujących w glebie korzeni roślin (Aon i in. 2001, Fontaine i in. 2003, Agnelli i in. 2004, Lee i in. 2008). Wraz ze zwiększeniem zawartości węgla organicznego w glebach następował wzrost liczby mikroorganizmów a w następstwie tego wzmożenie *DHA* (Fontaine i in. 2003, Lee i in. 2008).

Bolton i in. (1993) wykazali istnienie ścisłej zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz, fosfataz i sulfataz a zawartością węgla i azotu organicznego. Stąd też zmiany w aktywności enzymów, a co za tym idzie mikroorganizmów, decydują o dostępności mikro i makroelementów dla korzeni roślin, stając się indykatorami decydującymi o jakości gleby (Nannipieri 1994, Ajwa i in. 1999, Aon i in. 2001, Lee i in. 2008, Kumpiene i in. 2009). Doświadczenia zaś Agnellego i in. (2004), Goberny i in. (2006) oraz Songa i in. (2008) stanowią doskonałe potwierdzenie spadku zawartości węgla organicznego wraz ze wzrostem głębokości profilu glebowego, czego konsekwencją jest redukcja biomasy mikroorganizmów w warstwach podpowierzchniowych.

4.2.3. Temperatura

Powszechnie znany jest fakt, iż temperatura inaktywacji enzymów w tak specyficznym i heterogennym środowisku, jakim jest gleba jest zawsze około 10-20°C wyższa, aniżeli w innych układach (Kunicki-Goldfinger 2008). W warunkach naturalnych optimum aktywności enzymatycznej występuje w zakresie temperatur 40-50°C, jednakże w warunkach laboratoryjnych w zupełności wystarcza zastosowanie temperatur niższych (30-37°C), które to gwarantują otrzymanie precyzyjnych wyników (Frankenberger i Dick 1983).

Trasar-Cepeda i in. (2007) badając hiszpańskie gleby łąkowe stwierdzili najwyższą *DHA* w przedziale temperatur 57-70°C, co związane jest z faktem, iż dehydrogenazy jako enzymy wewnątrzkomórkowe, wykazują maksimum aktywności przy temperaturach optymalnych dla wzrostu mikroorganizmów. Trevors (1984) znalazł pozytywną korelację między temperaturą (5-70°C), a *DHA* ($R = 0,99$), określając ponadto 58-krotny wzrost aktywności enzymatycznej przy wzroście

temperatury do 20°C, w porównaniu z aktywnością określoną przy 5°C. Subhani i in. (2001) opisali wspomnianą zależność współczynnikiem korelacji R = 0,82 i wyznaczyli optymalny przedział dla aktywności dehydrogenaz na 25-40°C.

Znane są tylko nieliczne wyjątki wśród enzymów, jak np. rybonukleazy, które są zdolne do przetrwania w stanie aktywnym przez pewien okres w temperaturze około 100°C. Należy zaznaczyć, że w temperaturze niskiej (około 0°C) enzymy działają powoli, ale wykazują dużą trwałość (Kączkowski 1999).

4.2.4. Głębokość profilu glebowego

Eksperymenty laboratoryjne potwierdzają fakt, iż dehydrogenazy glebowe wykazują zróżnicowanie wraz z głębokością profilu glebowego. Ich aktywność osiąga maksymalne wartości w poziomach wierzchnich (Stępniewski i in. 2000a). Wraz ze zwiększaniem się głębokości profilu glebowego, obserwowany jest spadek aktywności tych enzymów (Ros i in. 2003, Yang i in. 2005, Levyk i in. 2007), co niewątpliwie związane jest z rozmieszczeniem przestrzennym mikroorganizmów (Blume i in. 2002, Agnelli i in. 2004, Levyk i in. 2007, Pascual i in. 2007). Badania Paula i Clarka (2000) dowodzą, iż najwyższa liczebność zarówno grzybów, bakterii tlenowych, jak i nitryfikatorów występuje w warstwie 0-7,5 cm, podczas gdy obligatoryjne beztlenowce i denitryfikatory spotykane są w warstwach podpowierzchniowych. Zazwyczaj jednak największe skupiska mikroorganizmów spotykane są na głębokości 5–20 cm (Lavahun i in. 1996). Xiang i in. (2008) wykazali 4-krotnie wyższą *DHA* mikroorganizmów glebowych w warstwie powierzchniowej (0-5 cm), aniżeli w podglebiu (90-100 cm) gleby *Pachic Argiustol* (FAO). W głąb profilu maleje liczebność mikroorganizmów, gdyż zmniejsza się ilość próchnicy oraz wydzielin z korzeni roślin, które to stanowią główne źródło pokarmu dla żyjących w glebie organizmów (Januszek i Lasota 2001, Taylor i in. 2002, Sullivan i in. 2005, Song i in. 2008). Doświadczenia prowadzone przez Levyk i in. (2007) pokazały, iż *DHA* określona w warstwie powierzchniowej (0-4 cm) gleb antropogenicznych jest o około 25-30% wyższa aniżeli w głębszych warstwach profili. Podobne obserwacje notowali również Marinari i in. (2006).

Paul i Clark (2000) stwierdzili ponadto, że bakterie z rodzaju *Bacillus* stanowią na ogół większy procent ogólnej liczby mikroorganizmów w górnej, niż głębszej części profilu glebowego, zaś spośród grzybów proporcjonalnie więcej *Chrysosporium* izolowano z głębokości 30 cm niż 10 cm. Potwierdzili oni także, iż mikroorganizmy liczniej występują w poziomach o przewadze frakcji pylastej lub

pyłowo-ilastej, niż w piaszczystej. Song i in. (2008) wykazali zaś, że wraz ze wzrostem głębokości profilu glebowego rośnie liczba bakterii Gram-dodatnich, co sugeruje, iż ta grupa mikroorganizmów może stanowić swoisty indykator warunków anoksycznych w środowiskach glebowych. Podobne obserwacje prowadzone były również przez Fierera i in. (2003).

4.2.5. Odczyn gleby

Dane literaturowe podają, iż granice *pH* w których dehydrogenazy wykazują stosunkowo wysoką aktywność mieszczą się między pH 5,5-7,8. Włodarczyk i in. (2002) stwierdzili maksimum *DHA* przy pH 7,1. Ros i in. (2003), testując dwie gleby w zakresie *pH* 7,2-8,4, znaleźli optimum w granicach 7,6-7,8. Trevors (1984) na podstawie badań własnych stwierdził, że *DHA* obniża się w miarę spadku *pH* próbek gleby od początkowej wartości 7,7. Według Von Mersi i Schinnera (1991) najwyższa *DHA* występuje przy *pH* 7-7,5. Levyk i in. (2007) zaobserwowali, że zakwaszenie środowiska glebowego (*pH* 1,5-4,5) skutkuje silną inhibicją *DHA* w porównaniu z glebami o odczynie obojętnym. Ponadto konsekwencją zakwaszenia środowiska jest również wzrost dostępności metali ciężkich oraz spadek przyswajalnych form P i K, co wpływa na redukcję *DHA* (Wyłupek i in. 2004).

Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż oznaczona w glebach *DHA* stanowi wypadkową działania i żywotności wszystkich, bytujących w danym środowisku drobnoustrojów. Stąd każdy z enzymów może się charakteryzować swoistym optimum działania, np. dehydrogenaza jabłczanowa, izolowana z *Coccochloris peniocystis* najwyższą aktywność przejawiała przy *pH* 6,5-7,1 (Norman i Colman 1991), podczas gdy dehydrogenaza aldehydowa izolowana z *Pseudomonas aeruginosa* – przy *pH* 9,4.

Generalnie dane literaturowe podają, iż najkorzystniejsze warunki dla *DHA* w glebach zbliżone są do odczynu obojętnego (Brzezińska i in. 1998, Włodarczyk i in. 2002).

4.2.6. Zmienność sezonowa

Dehydrogenazy są enzymami wykazującymi zmienność aktywności wraz z porami roku (Gianfreda i Bollag 1996). Januszek (1993) notował wysoką aktywność enzymatyczną gleb w końcu wiosny, latem i na początku jesieni. Podobne zmiany *DHA* zostały opisane w pracy Wyczółkowskiego i in. (2006). Obserwacje Włodarczyk (2000) wskazują, iż najwyższa *DHA* w glebie *Orthic Luvisol*

wystąpiła wiosną i latem (marzec-wrzesień), zaś najniższe wartości rejestrowane były zimą. Około 4-krotny wzrost *DHA* na początku marca związany jest z wiosennym odrodzeniem się do życia mikroorganizmów glebowych (Włodarczyk 2000, Aon i in. 2001). Skawryło-Bednarz (2008), potwierdziła wzrost liczebności bakterii (o 9,1%) i promieniowców (o 35,7%), w okresie od czerwca do października. Ponadto autorka wykazała korelację pomiędzy ogólną liczbą bakterii i promieniowców a *DHA* w glebie brunatnej (R = 0,99). Furczak (2006) znalazła najwyższą *DHA* w glebie płowej w okresie kwitnienia roślin, co sugerowałoby wzrost występowania aktywnych fizjologicznie drobnoustrojów. Latem zaś, na podwyższenie poziomu aktywności enzymów ma wpływ wysoka temperatura, opady oraz przypadający w tym czasie okres wegetacji roślin (Włodarczyk 1998, Blume i in. 2002, Bastida i in. 2006). Włodarczyk (2000), prowadząc doświadczenia laboratoryjne na glebie *Haplic Phaeozem* określiła, iż *DHA* zanotowana w czerwcu była około dwukrotnie wyższa od wartości otrzymanych w maju i październiku. Gliński i in. (1986), obserwowali redukcję *DHA* w czerwcu, zaś gwałtowny jej wzrost w lipcu, jako wynik naprzemiennych cykli osuszania i nawilżania gleb. Podobne wyniki prezentowane były również w pracy Kandeler i Murera (1993). Ajwa i in. (1999) zaobserwowali, iż *DHA* mierzona w sierpniu była o 30% wyższa od aktywności notowanej w kwietniu bądź czerwcu. Tripathi i in. (2007) potwierdzili maksimum *DHA* w warstwie powierzchniowej (0-20 cm) gleb Indii we wrześniu, oraz redukcję aktywności enzymatycznej w styczniu. Kaimi i in. (2006) znaleźli natomiast pozytywną korelację pomiędzy obecnością młodych korzeni roślin, a wzrostem *DHA*, co świadczy o pozytywnym wpływie roślin na liczebność mikroorganizmów oraz ich metabolizm. Obserwacje Bastidy i in. (2006) dowiodły ponadto, iż *DHA* utrzymuje się na wysokim poziomie nawet w glebach nie uprawianych przez 15 lat.

4.3. Czynniki środowiskowe wpływające inhibująco na *DHA*

Substancje hamujące działanie enzymów to inhibitory reakcji enzymatycznych. Inhibicja enzymu może zachodzić pod wpływem małych cząsteczek lub jonów, zarówno nieodwracalnie jak i odwracalnie. Niespecyficznymi inhibitorami enzymów są jony metali ciężkich (Cu, Pb, Hg, Ag). Wiążą się one łatwo i w sposób nieodwracalny ze wszystkimi białkami, powodując rozległe zmiany ich konformacji, prowadzące do denaturacji, której często towarzyszy wypadanie białka w postaci osadu. Szczególnie podatne na wiązanie jonów metali ciężkich są grupy sulfhydrylowe (-SH); metal może się również wbudować w mostek disiarczkowy.

Wśród wielu prac z ostatniego okresu dominuje problematyka wpływu zanieczyszczenia gleby, najczęściej w wyniku działalności człowieka na *DHA* gleb. Powiązanie zagadnień z zakresu zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi bądź pestycydami z aktywnością właśnie dehydrogenaz, dowodzi słuszności uznania tychże enzymów za doskonałe indykatory skażenia środowiska glebowego.

4.3.1. Metale ciężkie

Liczne prace wskazują, iż zawartość w glebie metali ciężkich, bądź ich związków w znaczący sposób wpływa na aktywność biologiczną gleby, wyrażoną przy pomocy aktywności enzymatycznej (Alef i Nannipieri 1995, Chaperon i Sauve 2007). Metale ciężkie w środowisku glebowym charakteryzują się dużą trwałością, przez co są w stanie przez długi czas oddziaływać na aktywność mikrobiologiczną (Khan i Scullion 2000, Cela i Sumner 2002, De Mora i in. 2005, Khan i in. 2005, Kumpiene i in. 2009). Mają też zdolność do nieodwracalnej kumulacji w komórkach mikroorganizmów, czego konsekwencją jest zaburzenie procesów wewnętrznych oraz trwałe uszkodzenie komórek.

Badania Songa i in. (2008) wskazują, iż aktywność metaboliczna mikroorganizmów hamowana jest przez metale ciężkie, niemniej jednak ich obecność w środowisku glebowym nie wpływa na redukcję biomasy mikroorganizmów. Landi i in. (2000) obserwowali spadek *DHA* w wyniku zanieczyszczenia gleby kadmem. Również Moreno i in. (2001), badając wpływ Cd na *DHA* stwierdzili, że wzrost stężenia tego pierwiastka w glebie już po 3 godzinach od dodania powoduje inhibicję aktywności enzymatycznej. Ponadto wykazali, iż wartość ekologicznej dawki (ED_{50}), wykazuje tendencję wzrostową wraz z czasem ekspozycji na zanieczyszczenie gleby Cd. Welp (1999), testując wpływ Co, As, Hg, Pb, Cd i Cu na *DHA* wykazał, iż wszystkie te metale obniżają aktywność enzymów w glebie, przy czym najsilniejsza inhibicja aktywności powodowana była dodatkiem Hg, Cu i Cd. Z kolei negatywny wpływ Zn i Cu na *DHA* został potwierdzony w badaniach Kasiak i in. (1986), Stuczyńskiego i in. (2003), Kizilkayi i in. (2004), Malley'a i in. (2006). Istotną korelację pomiędzy zawartością Zn, w zakresie 8-23 $mg \cdot kg^{-1}$, a *DHA* stwierdzili również Koper i in. (2004). Kasiak i in. (1986) wykazali ponadto, iż *DHA* gwałtownie maleje w poziomie A gleby lessowej, podczas gdy stężenie form rozpuszczalnych Zn, Pb i Cu osiąga wartości odpowiednio 10, 0,25 i 0,1 $mg \cdot kg^{-1}$ gleby. Natomiast w poziomie B, *DHA* nie zależy już od form rozpuszczalnych Zn, Pb i Cu. Inhibujące działanie Zn, Cd i Pb w dawce odpowiednio 200, 1 i 140 $mg \cdot kg^{-1}$ na *DHA* zostało także potwierdzone w badaniach Mikanowej (2006). Podobny efekt

spowodowany jest obecnością w glebie Ni (Wyszkowska i Wyszkowski 2003), aczkolwiek zaobserwowano również zależność, iż stosowanie nawożenia Mg ogranicza ujemne oddziaływanie Ni na *DHA*.

Spadek *DHA* w glebie może być też konsekwencją obecności Cr (Irha i in. 2003, Stępniewska i Wolińska 2004 i 2005). Jakkolwiek, badania Acevesa i in. (2007) pokazały, iż dodatek Cr(III) stymuluje *DHA* po 120-180 dniach inkubacji nawet o 9-29%, podczas gdy wzbogacenie gleby Cr(VI), pociąga za sobą inhibicję aktywności oksydoreduktaz o 50%, już po 30 dniach inkubacji. Carrasco i in. (2006), badając wpływ metali ciężkich na aktywność enzymów oksydoredukcyjnych stwierdzili negatywną korelację *DHA* nie tylko ze stężeniem Fe i Pb, ale również z wartością przewodnictwa elektrolitycznego oraz zasoleniem środowiska glebowego. Obecność w glebie związków As(III) i As(V) także przyczynia się do obniżenia *DHA* poprzez toksyczny wpływ na żywotność bakterii i blokadę ich metabolizmu, czego potwierdzeniem są badania prowadzone przez Ghosha i in. (2004) oraz Fernandeza i in. (2005).

4.3.2. Nawożenie gleby i pestycydy

Nieracjonalne nawożenie gleby oraz powszechne stosowanie w rolnictwie preparatów chemicznych (pestycydów), stało się poważnym i złożonym problemem mikrobiologii i enzymologii środowiska glebowego.

Dick i Tabatabai (1992) oraz Acosta-Martinez i in. (2007) zauważyli, iż nawożenie organiczne wpływa korzystniej na ogólną aktywność biologiczną niż nawożenie mineralne, które poprawiając właściwości fizykochemiczne gleby, może wywierać ujemny wpływ na jej aktywność enzymatyczną. Piotrowska i Koper (2007), najwyższą *DHA* notowali w glebie płowej pobranej z obiektów nawożonych obornikiem, zaś niższą z obiektów nawożonych nawozami mineralnymi. Z mocznika wprowadzonego do gleby w postaci granulatu, może uwalniać się amoniak w stężeniu zabójczym dla organizmów glebowych (Paul i Clark 2000). Doświadczenia Ajwy i in. (1999), Barabasza i Voriseka (2001), Masto i in. (2006) oraz Mijangos i in. (2006), zwracają uwagę na możliwość inhibicji *DHA* wraz z wprowadzeniem do gleby związków azotu.

Większość autorów udowodniła inhibicję *DHA* w glebach, do których dodawano różne pestycydy (Baran i in. 2004, Menon i in. 2005, Pandey i Singh 2006, Sukul 2006, Stępniewska i in. 2007). Podobnie działają policykliczne węglowodory aromatyczne bądź odpady olejowe (Kaimi i in. 2006).

Krzyśko-Łupicka (2008) podaje, że jednym ze zjawisk zaburzenia metabolizmu bakterii w obecności herbicydów, a tym samym spadku aktywności enzymatycznej gleby jest zakłócenie biologicznego wiązania azotu. Dodatek herbicydów (np. Roundupu) okresowo hamuje rozwój diazotrofów niesymbiotycznych, nawet do 30 dni po jego wprowadzeniu do środowiska glebowego. Paul i Clark (2000) do najbardziej wrażliwych na zanieczyszczenie pestycydami mikroorganizmów zaliczają również bakterie nitryfikacyjne. Według Cai'a i in. (2007b), herbicyd o nazwie acetochlor [2-chloro-N-(etoksymetylo)-N-(2-etylo-6-metylofenylo) acetamid], w ilości od 10 do 100 $mg \cdot kg^{-1}$ nie ma wpływu redukującego na *DHA*, dopiero dawka powyżej 250 $mg \cdot kg^{-1}$ powoduje nawet 60% inhibicję aktywności. Podobnie stosowanie insektycydu o nazwie fenamiphos (izopropyloamidofosforan etylu-3-metylo-4-fenylu), w dawce do 5 $kg \cdot ha^{-1}$ nie wywiera wpływu na *DHA* środowiska glebowego (Megharaj i in. 1999).

Niektórzy badacze stwierdzają nawet wzrost *DHA*, np. w wyniku dodania do gleby herbicydu jakim jest atrazyna (2-chloro-4-etyloamino-6-izopropyloamino-1,3,5-triazyna). Według Moreno i in. (2007) *DHA* osiągała maksymalne wartości w glebach zawierających nawet 1000 $mg \cdot kg^{-1}$ atrazyny. Zastosowanie do gleby insektycydu o nazwie acetamprid w dawce od 0,5 do 50 $mg \cdot kg^{-1}$ również powoduje stymulację *DHA* po 14 dniach od zastosowania (Yao i in. 2006). Analogicznie, Singh i Kumar (2008) stwierdzili stymulację *DHA* o 22% w wyniku wprowadzenia do gleby acetampridu. Podobnie w wyniku stosowania diazinonu [tiofosforan O,O-dietylo-O-(2-izopropylo-6-metylopirymidyn-4-ylu)], zaobserwowano wzrost *DHA* po 30 dniach od dodania, nawet o 44,08% (Singh i Singh 2005). Stymulujący efekt zauważyli też Menon i in. (2005) po zastosowaniu chlorpyrifosu (tiofosforan O,O-dietylo-O-3,5,6-trichloro-2-pyridylu). Według powyższych wyników wprowadzenie do gleby niektórych herbicydów przez długi czas może utrzymywać w niej wysoką aktywność badanych enzymów.

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. Charakterystyka materiału glebowego

Do badań wykorzystano wzorcowy materiał glebowy, pochodzący z Banku Gleb Mineralnych PAN w Lublinie. Stosowano glebę przechowywaną w stanie powietrznie suchym, rozdrobnioną i przesianą przez sita o średnicy oczek 1 mm. Lokalizację pobierania prób glebowych umieszczono w tabeli 5, a podstawową charakterystykę materiału badawczego w tabeli 6.

Tabela 5. Miejsce pobrania badanych gleb (Gliński i in. 1991)
Table 5. Localization of soils used in the experiment (according to Gliński *et al.* 1991)

Typ gleby Soil type (FAO)	Nr Banku Bank number	Miejscowość Place	Gmina Community	Województwo Province	Współrzędne geograficzne Geographical coordinates
Orthic Podzol	18 424 701	Danowo Świeryż Kolnica	Goleniów Łowicz Grodków	Szczecińskie Skierniewickie Opolskie	14° 57', 53° 31' 19° 52', 52° 08' 17° 20', 50° 45'
Eutric Cambisol	308 373 802	Sady Wrzosy Wola Jachowa	Tarnowo Żnin Górno	Poznańskie Bydgoskie Kieleckie	16° 44', 52° 27' 17° 40', 52° 55' 20° 51', 50° 50'
Mollic Gleysol	208 376 442	Tyszki-Łabno Trzaski Rszew	Kolno Inowrocław Konstantynów	Łomżyńskie Bydgoskie Łódzkie	22° 42', 52° 28' 18° 20', 52° 47' 19° 19', 51° 46'
Eutric Fluvisol	87 957 967	Janówka Wolica Zawadka	Stare-Pole Łupanów Brzostek	Elbląskie Tarnowskie Tarnowskie	19° 08', 54° 03' 20° 16', 49° 51' 21° 23', 49° 54'
Rendzina Leptosol	563 727 728	Bezek Wojsławice Rudniki	Siedliszcze Kozie Głowy Włodowice	Chełmskie Częstochowskie Częstochowskie	23° 20', 50° 51' 19° 08', 50° 35' 19° 26', 50° 32'
Eutric Histosol	1 32 170	Rzędziny Grzybowo Zygmunty	Dobre Kołobrzeg Krypno	Szczecińskie Koszalińskie Białostockie	14° 20', 53° 32' 15° 31', 54° 10' 22° 50', 53° 15'
Haplic Phaeozem	687 688 794	Lubna Mochów Złota	Lubna Głogówek Złota	Opolskie Opolskie Kieleckie	17° 38', 50° 20' 16° 15', 51° 31' 20° 34', 50° 23'

Tabela 6. Podstawowe właściwości materiału glebowego (Gliński i in. 1991)
Table 6. The basic properties of soil material (according to Gliński *et al.* 1991)

Typ gleby Soil type	FAO	Nr. Banku Bank Number	Warstwa Layer (cm)	Skład granulometryczny – Granulometric composition (%)							pH (H_2O)	% C org.
				Kamienie i żwir Stone and gravel	1-0,1 (mm)	0,1-0,05 (mm)	0,05-0,02 (mm)	0,02-0,005 (mm)	0,005-0,002 (mm)	<0,002		
BIELICE	*Orthic Podzol*	18	0-30	10	69	13	3	8	2	0	6,08	0,63
			70-80	8	60	13	3	7	8	5	6,66	0,58
			100-110	10	62	11	4	7	8	3	6,54	0,53
		424	0-30	8	68	10	0	10	4	4	6,72	1,47
			40-50	4	58	12	8	7	4	9	7,49	0,58
			80-100	10	54	6	8	11	8	8	7,81	0,56
		701	0-30	4	60	11	5	6	4	12	7,34	1,06
			30-50	2	6	16	30	27	10	10	7,03	0,79
			70-150	10	16	14	30	26	6	3	6,71	0,08
BRUNATNE	*Eutric Cambisol*	308	0-30	8	64	12	8	7	3	0	6,25	0,47
			40-60	24	63	8	7	6	2	2	7,56	0,42
			80-100	8	61	4	7	7	3	14	6,35	0,38
		373	0-20	4	53	18	11	10	4	2	4,87	0,38
			40-50	4	42	14	9	10	4	19	6,00	0,33
			110-120	8	39	17	9	11	8	16	5,79	0,27
		802	0-20	6	56	7	17	15	2	0	5,57	0,85
			30-40	6	52	7	17	11	9	1	6,10	0,77
			100-110	12	64	7	10	8	4	1	5,93	0,71

Tabela 6. cd. Podstawowe właściwości materiału glebowego (Gliński i in. 1991)
Table 6. Cont. The basic properties of soil material (according to Gliński *et al.* 1991)

Typ gleby Soil type	FAO	Nr. banku Bank Number	Warstwa Layer (cm)	Skład granulometryczny – Granulometric composition (%)							pH (H_2O)	% C org.
				Kamienie i żwir Stone and gravel	1-0,1 (mm)	0,1-0,05 (mm)	0,05-0,02 (mm)	0,02-0,005 (mm)	0,005-0,002 (mm)	<0,002		
CZARNE ZIEMIE	*Mollic Gleysol*	208	0-15	4	51	17	10	12	5	3	7,58	1,43
			35-45	14	41	15	7	15	5	10	7,76	0,30
			100-110	10	34	16	10	15	9	11	8,07	0,06
		376	0-20	2	35	11	25	12	4	11	7,89	0,82
			50-60	0	50	31	13	2	1	3	8,13	0,25
			120-130	0	9	13	21	17	14	26	8,21	0,13
		442	0-20	4	54	12	12	10	8	2	7,00	0,89
			40-60	4	52	16	11	6	6	7	7,59	0,11
			80-100	10	55	13	7	10	5	5	7,62	0,08
MADY	*Eutric Fluvisol*	87	0-30	0	10	19	26	14	14	17	6,85	1,27
			50-70	0	15	18	37	14	5	11	7,19	0,28
			90-110	0	5	13	21	33	9	19	7,45	0,56
		957	0-20	0	33	21	29	9	5	3	7,04	8,59
			70-80	0	50	14	21	7	2	6	7,17	8,19
			150-160	0	10	33	28	22	2	5	7,41	8,33
		967	0-20	0	17	14	25	18	14	12	5,98	1,41
			50-65	0	14	16	18	23	18	11	6,77	0,84
			95-105	2	13	14	25	20	15	13	6,71	0,60

RĘDZINY	*Rendzina Leptosol*	563	0-30	6	49	7	18	14	5	4	7,95	0,89
			50-60	6	50	7	16	8	5	11	8,06	0,17
		727	0-20	4	60	1	13	11	8	5	7,54	1,21
			20-40	20	29	6	11	13	6	25	7,77	0,54
		728	0-25	6	64	6	14	7	2	4	8,52	0,85
			25-50	6	52	3	11	9	9	13	8,15	0,29
MURSZOWE	*Eutric Histosol*	1	0-30	2	70	18	3	3	2	3	6,94	3,51
			30-50	2	62	27	2	4	3	1	7,09	0,28
			80-90	2	92	2	1	1	0	3	6,44	0,13
		32	0-20	2	79	12	4	2	0	2	6,07	3,34
			60-65	2	76	18	1	2	1	1	6,99	0,60
			85-90	2	85	10	2	2	0	1	3,52	0,11
		170	10-25	0	75	15	8	2	0	0	6,19	2,26
			35-45	0	85	10	5	0	0	0	5,83	0,82
			70-90	0	91	9	0	0	0	0	5,98	0,70
CZARNOZIEMY	*Haplic Phaeozem*	687	0-30	0	8	12	46	27	7	0	8,47	1,45
			30-65	0	3	13	39	20	8	17	7,58	0,32
			65-150	0	4	13	41	22	4	16	7,11	0,19
		688	0-30	0	0	17	46	24	7	6	6,67	1,15
			35-75	0	1	10	42	22	3	22	7,76	0,18
			75-150	0	0	13	46	19	2	20	7,98	0,16
		794	0-20	0	0	18	50	21	3	8	7,51	9,38
			40-50	0	0	21	38	20	3	18	7,52	9,12
			110-120	0	1	12	50	22	7	8	7,97	8,75

5.2. Wyznaczenie zdolności retencyjnych gleb

Materiał glebowy umieszczano w cylindrach (V = 100 cm^3, h = 5 cm) i poddawano 10 dniowej pre-inkubacji w stanie pełnego wysycenia wodą. Po tym czasie próby glebowe ustawiano na porowatych płytach kaolinowych, pełniących rolę półprzepuszczalnego filtra, o odpowiedniej sile ssącej do momentu uzyskania stanu równowagi w temperaturze pokojowej (Gliński i in. 2002). Wyznaczono następujące wartości *pF*: 0; 1,5; 2,2; 2,7; 3,2. Określony stan energetyczny wody w glebie uzyskiwano dzięki procesowi desorpcji ze stanu pełnego nasycenia do żądanego potencjału wody glebowej.

Czas konieczny na ustalenie się stanu równowagi i osiągnięcie żądanego punktu *pF* wynosił od 19 do 25 dni w przypadku gleb bielicowych, 13-20 dni w glebach brunatnych, czarnych ziemiach i madach rzecznych oraz 13-19 dni w przypadku rędzin, czarnoziemów i gleb murszowych. Po każdorazowym przyroście ciśnienia i ustaleniu się równowagi termodynamicznej, próbki były ważone. Bezpośrednio po zważeniu i ustaleniu się mas przystępowano do pomiarów *ODR* oraz *Eh*.

5.3. Wyznaczenie mikrodyfuzji tlenu (*ODR*)

Pomiaru *ODR* dokonano metodą wprowadzoną przez Lemona i Ericssona (1952), zaś zmodyfikowaną przez Malickiego i Bieganowskiego (1999). Metoda ta wykorzystuje zjawisko elektrochemicznej redukcji tlenu na umieszczonej w glebie katodzie platynowej, przy jej ustalonym względem gleby potencjale (–0,65 mV). Według Lemona i Ericssona (1952) katoda pełniąc rolę analogiczną do korzenia rośliny pobiera tlen, obniżając tym samym jego stężenie w warstwie przykorzeniowej (Bieganowski 2005).

Pomiaru dokonano z użyciem miernika *ODR* (PAN, Lublin), wyposażonego w katodę, elektrodę porównawczą (nasycona elektroda kalomelowa - *NEK*), regulowane źródło napięcia oraz amperomierz. Podczas oznaczeń *ODR* uwzględniono czas polaryzacji elektrody, który wynosi 4 min – po takim czasie natężenie prądu stabilizuje się i osiąga stan quasi-stacjonarny, związany z ustaleniem się gradientu tlenu (Gliński i in. 2002). Każdy odczyt przeprowadzony został w trzech powtórzeniach. Prąd redukcji tlenu cząsteczkowego na katodzie przeliczono na *ODR*, posługując się wzorem:

$$ODR\ (\mu g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}) = MI/nFA \qquad (1)$$

gdzie: M – masa gramocząsteczkowa tlenu (g·mol^{-1}), I – natężenie prądu (A), n – ilość elektronów potrzebnych do redukcji 1 cząsteczki tlenu (wynosi 4), F – stała Faradaya, A – powierzchnia elektrody (m^2).

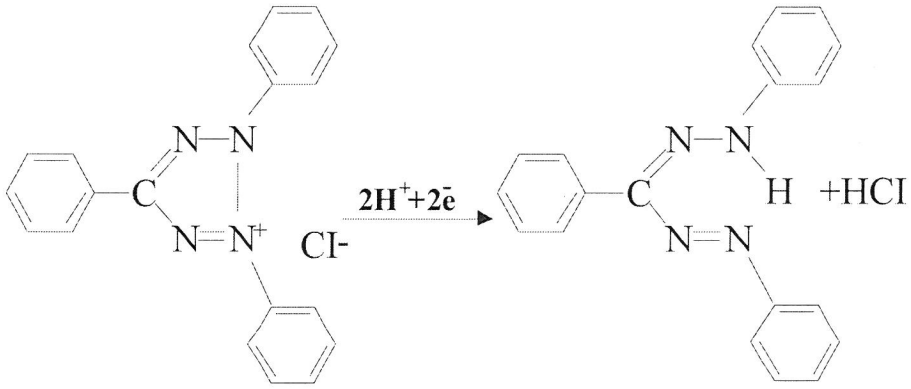
5.4. Oznaczenia potencjometryczne (*pH, Eh*)

Pomiary potencjometryczne zostały przeprowadzone z użyciem miernika wielofunkcyjnego (*pH*/O_2/cond) model pIONeer 65 (Radiometr Analytical S.A.). Oznaczeń *pH* dokonano z wykorzystaniem kombinowanej elektrody szklanej typu Cartrode pHC 5977, podczas gdy potencjał oksydoredukcyjny (*Eh*) oznaczano przy użyciu układu elektroda platynowa – elektroda chlorosrebrowa. Uzyskane wartości *Eh* (V) sprowadzono do postaci Eh_7 zgodnie ze wzorem (Stępniewska i in. 2001):

$$Eh_7 = \text{Eh} - 0{,}059\ (7 - \text{pH}) \qquad (2)$$

5.5. Pomiar aktywności dehydrogenazowej (*DHA*)

Oznaczenie przeprowadzono według metody Casida i in. (1964), wykorzystując do pomiarów spektrofotometr UV-VIS Hitachi 2001 (Japan). Jako substrat zastosowano chlorek 2,3,5 trifenylotetrazoliowy (TTC), który pod wpływem dehydrogenaz ulega przekształceniu do trifenyloformazanu (TPF), związku o czerwonym zabarwieniu, wykazującego maksimum absorbancji światła przy długości fali 485 nm (rys. 1).



2,3,5-trifenylotetrazoliowy chlorek (TTC)

1,3,5-trifenyloformazan (TPF)

Rys. 1. Reakcja redukcji TTC
Fig. 1. Reaction of TTC reduction

Ilość powstałego produktu (TPF) zależna jest od aktywności enzymów (dehydrogenaz), wilgotności i masy gleby użytej do wykonania oznaczenia, masy użytego substratu, temperatury oraz czasu inkubacji. Określenie *DHA* przeprowadzone zostało bezpośrednio po zdjęciu prób z płyt ssących oraz dokonaniu pomiarów *ODR* i *Eh*. Do 6 g gleby o odpowiednim *pF* (0; 1,5; 2,2; 2,7; 3,2) dodano 120 mg węglanu wapnia, 2 ml wody destylowanej, 1 ml 3% TTC i poddano 20 godz. inkubacji w 30°C, po czym dodano 25 ml etanolu i odstawiono w ciemne miejsce na 1 godz. Roztwory przesączono przez sączki o gęstości 84 $g \cdot m^{-2}$ (FILTRAK) i poddano pomiarom spektrofotometrycznym. Każde oznaczenie zostało wykonane w trzech powtórzeniach.

DHA obliczono posługując się następującym wzorem:

$$A = (CV/mt) \cdot f \qquad (3)$$

gdzie: A – aktywność dehydrogenazowa gleby wyrażona w μg TPF na 1 minutę i na 1 g suchej masy gleby (μg $TPF \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$), C – stężenie trifenyloformazanu (TPF) w przesączu ($\mu g \cdot cm^{-3}$), V – objętość roztworów dodanych do gleby podczas oznaczenia (cm^3), m – masa próbki gleby (g), t – czas inkubacji (min), f – współczynnik wilgotności = 1 + $m_{\text{wody w glebie}}$/ $m_{\text{gleby suchej}}$.

5.6. Określenie liczebności mikroorganizmów glebowych

Liczebność mikroorganizmów glebowych wyznaczono w warstwach powierzchniowych w obrębie danego typu gleby, charakteryzującego się najwyższymi wartościami *DHA*, tj. glebie murszowej nr 1, czarnej ziemi nr 208, glebie brunatnej nr 308, rędzinie nr 563, glebie bielicowej nr 701, czarnoziemie nr 794 oraz madzie rzecznej nr 967. Uwzględniono 3 stopnie uwilgotnienia gleby, odpowiadające następującym wartościom potencjału wody glebowej: *pF* 0; 1,5; 3,2.

5.6.1. Skład podłoży

Szczegółowa charakterystyka podłoży na których prowadzono oznaczenia mikrobiologiczne została ujęta w tabeli 7.

Tabela 7. Skład podłoży zastosowanych w bieżącym eksperymencie
Table 7. Composition of culturing media applied in the current experiment

Organizmy glebowe Soil organisms	Rodzaj podłoża Type of medium	Skład Content (g/l)		Źródło Source
Bakterie ogółem Total bacteria	Agar odżywczy Nutritive agar	Białko mięsne – Peptone Ekstrakt mięsny – Beef extract Agar-agar	5,0 3,0 12	Merck
Promieniowce Actinomycetes	Pożywka Pochona Pochon medium	Asparagina - Asparagine Nystatyna - Nystatyne Skrobia rozpuszczalna Amylum soluble Agar Standard soli Winogradskiego Winogradsky standard	0,05 0,1 2,0 15 50	PN-89
Bakterie amonifikacyjne Ammonia oxidizing bacteria	1% woda peptonowa 1% peptone water	Kazeina – Casein NaCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4	10 5,0 1,5 9,0	Merck
Bakterie nitryfikacyjne Nitryfying bacteria	Podłoże Winogradskiego Vinogradsky medium	Woda destylowana Distilled water $(NH_4)_2SO_4$ K_2HPO_4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ NaCl $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0 2,0 1,0 0,5 2,0 0,4	Grabińska- Łoniewska, 1996
Grzyby Fungi	Pożywka Czapka i Doxa Czapek and Dox medium	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ K_2HPO_4 KCl $NaNO_3$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ Sacharoza –Saccharose Agar	0,5 1,0 0,5 3,0 0,01 30 15	PN-89/2

5.6.2. Oznaczenie ogólnej liczby bakterii

Ogólną liczbę bakterii wyznaczono stosując posiew powierzchniowy z zawiesiny gleby w 0,85% roztworze NaCl na podłoże agaru odżywczego (Merck). Na płytki Petriego (Ø 90 mm) z pożywką, wprowadzono 0,2 cm^3 odpowiedniego rozcieńczenia roztworu glebowego (od 10^{-1} do 10^{-6}), który rozprowadzono na całej powierzchni używając sterylnej głaszczki. Inkubację prowadzono przez

14 dni w temperaturze 28°C (Grabińska-Łoniewska 1996). Wynik podano jako ogólną liczbę bakterii w przeliczeniu na 1 g s.m. gleby.

5.6.3. Oznaczenie liczby promieniowców

Liczebność promieniowców wyznaczono metodą płytkową na podłożu wybiórczym Pochona (PN-89). Stosowano posiew powierzchniowy z roztworów glebowych w ilości 0,2 cm^3, rozcieńczonych w 0,85% NaCl, w zakresie 10^{-1}-10^{-5}. Inkubację prowadzono w 25°C przez 14 dni (Polski Komitet Normalizacji, Miar i Jakości, PN-89/Z-04111/02). Po inkubacji zliczano wyrosłe na podłożu kolonie. Wynik ostateczny podano jako ogólną liczbę promieniowców w 1 g s.m. gleby.

5.6.4. Oznaczenie NPL bakterii amonifikacyjnych

Liczebność bakterii amonifikacyjnych wykonano metodą fermentacyjną probówkową. Do podwójnego szeregu probówek, zawierających po 9 cm^3 wody peptonowej (Merck), dodano odpowiednie objętości zawiesin glebowych (w 0,85% NaCl), rozcieńczonych w zakresie od 10^{-1} do 10^{-5}. Próbki inkubowano w temperaturze 26°C, przez okres 7 dni. Po okresie inkubacji, dokonano obserwacji wzrostu bakterii (zmętnienie, obecność kożucha, osad). Obecność amoniaku wykazano przy użyciu odczynnika Nesslera (Grabińska-Łoniewska 1996), na podstawie zmiany barwy hodowli na pomarańczowo.

Wynik oznaczenia podano jako NPL bakterii amonifikacyjnych w 1 g s.m. gleby, odczytaną z tablic na podstawie rachunku prawdopodobieństwa (Polski Komitet Normalizacji i Miar PN-75/C-04615.05).

5.6.5. Oznaczenie NPL bakterii nitryfikacyjnych

Liczebność bakterii nitryfikacyjnych przeprowadzono metodą fermentacyjną probówkową. Do podwójnego szeregu probówek, zawierających po 9 cm^3 podłoża mineralnego Winogradskiego (Grabińska-Łoniewska 1996), wprowadzono odpowiednie objętości zawiesin glebowych (w 0,85% NaCl), rozcieńczonych w zakresie od 10^{-1} do 10^{-4}. Próby inkubowano w temperaturze 26°C, przez okres 14 dni. Obecność bakterii nitryfikacyjnych I fazy przyjęto na podstawie stwierdzenia w hodowli azotanów (III), zaś II fazy – azotanów (V). Oznaczenie azotanów (III) wykonano metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika Griessa. Karminowe zabarwienie hodowli wskazywało na obecność azotanów (III). Analogicznie, w hodowlach bakteryjnych do których uprzednio dodano odrobinę pyłu cynkowego w celu redukcji NO_3^- do NO_2^-, a następnie odczynnika Griessa przeprowadzono oznaczenia azotanów (V). Pojawienie się różowego zabarwienia potwierdzało obecność azotanów w hodowlach.

Wynik przeprowadzonych oznaczeń podano jako NPL bakterii nitryfikacyjnych w 1 g s. m. gleby (wg Polskiego Komitetu Normalizacji i Miar PN-75/C-04615.05).

5.6.6. Oznaczenie liczby grzybów

W celu oznaczenia liczebności grzybów w badanych próbkach glebowych wykonano posiew powierzchniowy roztworów glebowych na wybiórcze podłoże agarowe Czapka i Doxa (BTL). Aby zahamować wzrost bakteryjny do podłoża dodano 30 $mg \cdot dm^{-3}$ streptomycyny. Na płytki Petriego (Ø 90 mm) z agarem wprowadzono po 0,2 cm^3 odpowiedniego rozcieńczenia zawiesiny gleby w 0,85% NaCl, które następnie rozprowadzono po całej powierzchni jałową głaszczką. Posiewy wykonano w trzech równoległych powtórzeniach dla rozcieńczeń 10^{-1}-10^{-5}.

Inkubację prowadzono w 25°C przez 14 dni (Polskie Normy, PN-89/2-04111/03). Wynik ostateczny podano jako ogólną liczbę grzybów w 1 g s.m. gleby.

5.7. Analiza statystyczna wyników

Analiza wyników – test ANOVA oraz prosta regresja, wraz z uwzględnieniem najmniejszych istotnych różnic przy 95% przedziale ufności (NIR) – umieszczonych na wykresach została przeprowadzona z zastosowaniem programów Statgraphics Plus 3.0 oraz Statistica 8.0.

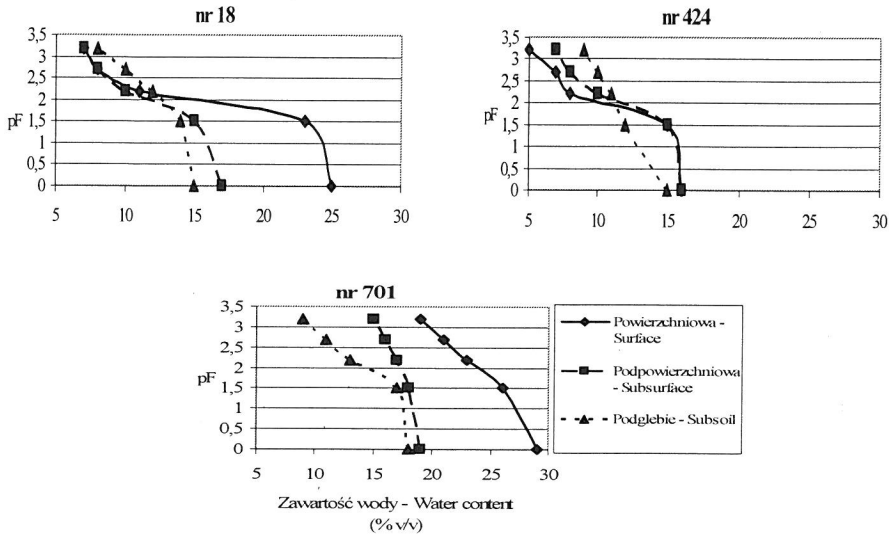
6. WYNIKI BADAŃ

6.1. Charakterystyka właściwości fizyko-chemicznych badanych gleb

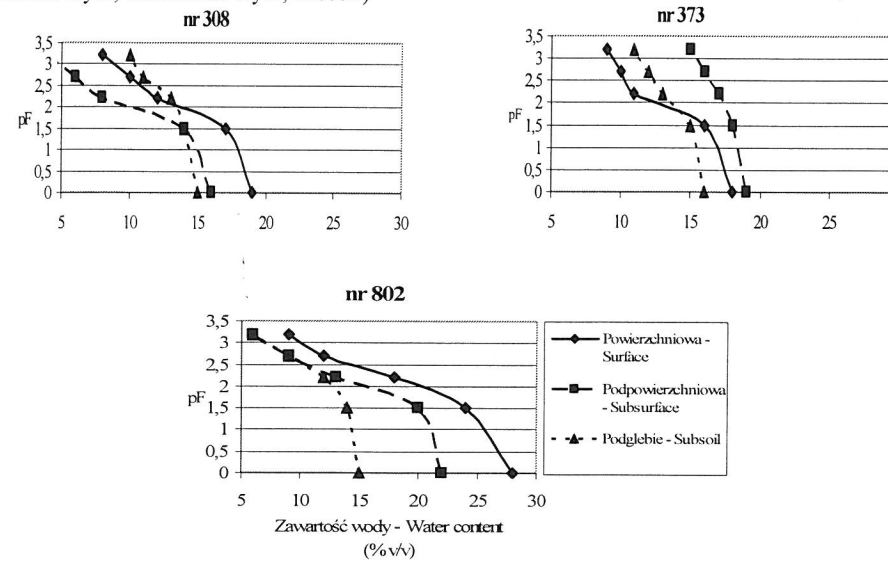
Heterogenne środowisko glebowe wymagało szczegółowego opisu szeregu parametrów fizyko-chemicznych, warunkujących wzrost, rozwój i bytowanie mikroorganizmów w glebach. Wśród nich zasadniczą rolę odgrywają: dostępność wody, mikrodyfuzja tlenu i stan oksydoredukcyjny podłoża.

6.1.1. Dostępność wody (zdolności retencyjne gleb)

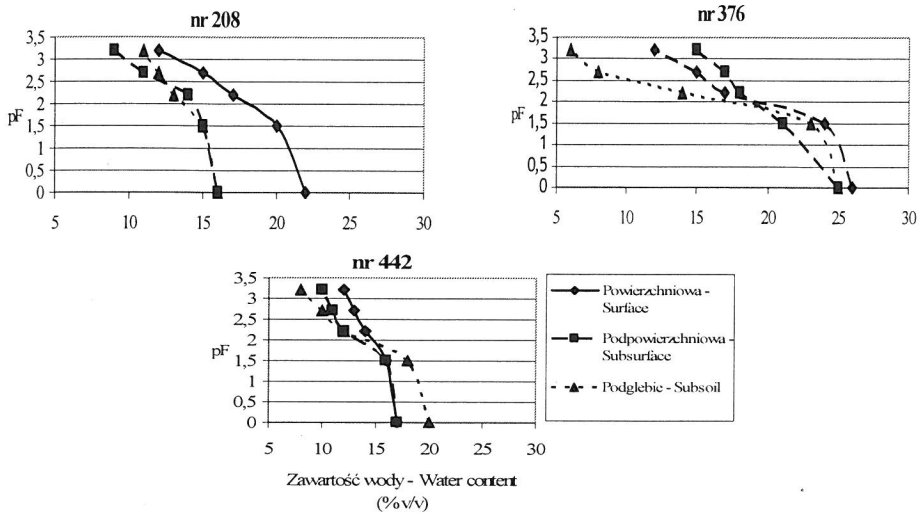
W celu oszacowania zdolności retencjonowania wody w badanym materiale glebowym, sporządzono krzywe retencji, tj. krzywe obrazujące zależność pomiędzy *pF*, a wilgotnością (% v/v). Charakterystyki właściwości wodnych gleb należących do 7 typów gleb mineralnych (bielicowych, brunatnych, czarnych ziem, mad rzecznnych, rędzin, murszowych, czarnoziemów), z uwzględnieniem 3 warstw profili glebowych (powierzchniowej, podpowierzchniowej, podglebia), przedstawiono na rysunkach 2-8.



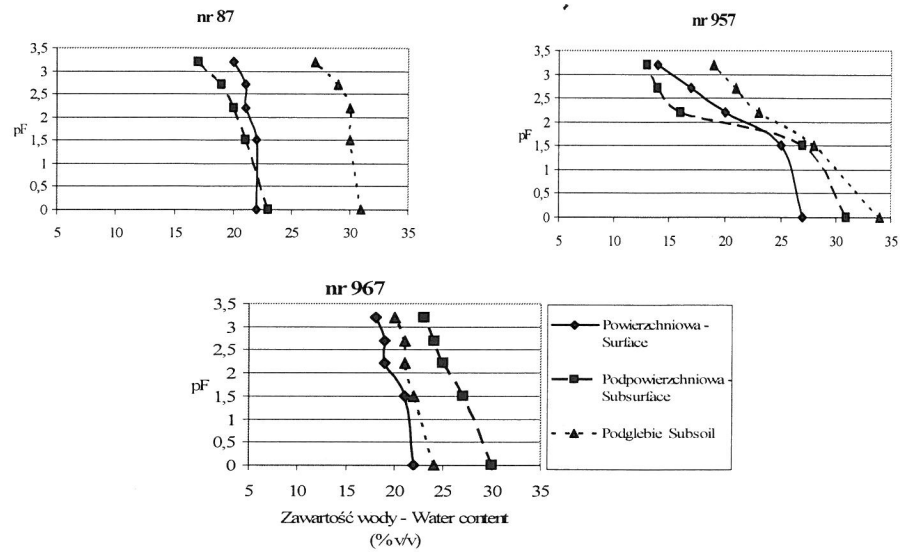
Rys. 2. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w glebach bielicowych *Orthic Podzols* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 2. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Ortic Podzol* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)



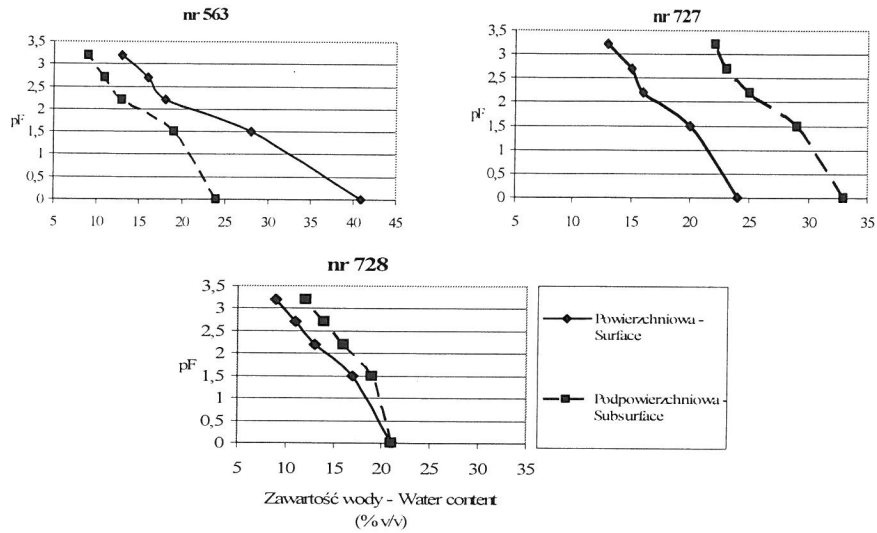
Rys. 3. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w glebach brunatnych *Eutric Cambisols* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 3. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Eutric Cambisol* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)



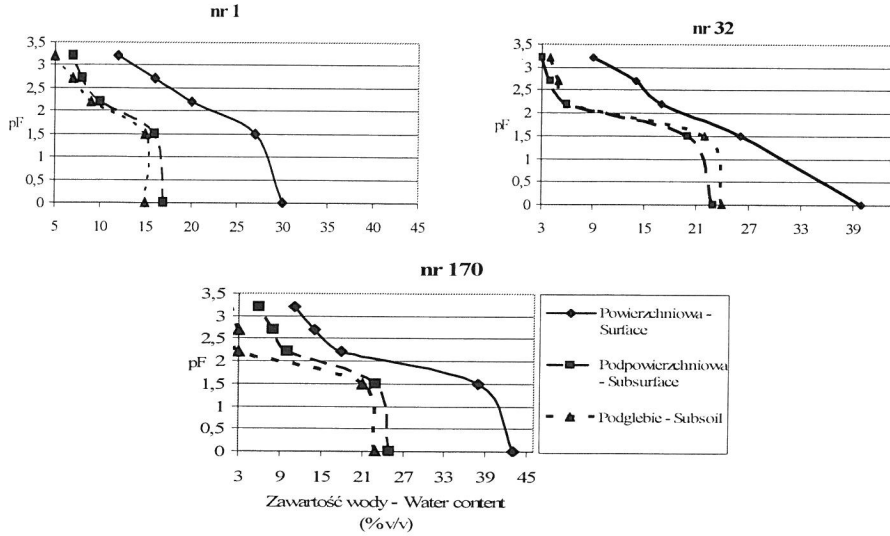
Rys. 4. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w czarnych ziemiach *Mollic Gleysols* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 4. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Mollic Gleysol* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)



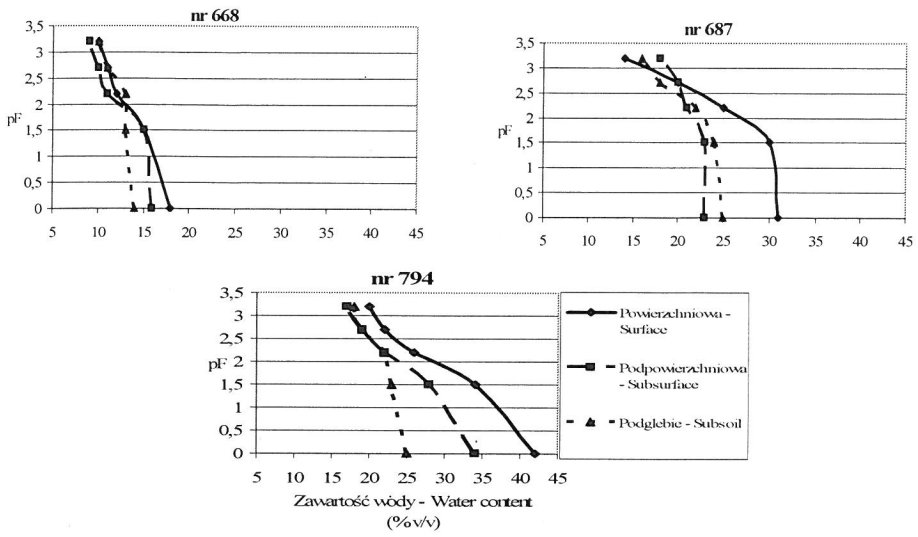
Rys. 5. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w madach rzecznych *Eutric Fluvisols* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 5. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Eutric Fluvisol* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)



Rys. 6. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w rędzinach *Rendzina Leptosols* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 6. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Rendzina Leptosols* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)



Rys. 7. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w glebach murszowych *Eutric Histosols* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 7. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Eutric Histosol* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)



Rys. 8. Charakterystyki potencjału wody glebowej (*pF*), w funkcji wilgotności (% v/v) w czarnoziemach *Haplic Phaeozems* (poziom powierzchniowy, podpowierzchniowy i podglebie)
Fig. 8. Soil water potential characteristics (*pF*) versus moisture (% v/v) in the *Haplic Phaeozem* samples (surface layer, subsurface layer, subsoil)

Analizując układ danych można stwierdzić, iż próby glebowe charakteryzowały się różną zdolnością do zatrzymywania wody. Różnice dostrzegane były również w obrębie tego samego typu gleby, co świadczy o niejednorodności gleb pod względem statycznych właściwości hydrofizycznych.

Charakter przebiegu krzywych retencji w różnych warstwach profili glebowych *Orthic Podzol* (rys. 2), *Eutric Cambisol* (rys. 3), *Mollic Gleysol* (rys. 4) oraz *Haplic Phaeozem* (rys. 8), jest podobny w zakresie potencjałów *pF* 0-1,5 gdzie można obserwować minimalne spadki wilgotności. Po przekroczeniu wartości *pF* 1,5, wilgotność najbardziej gwałtownie obniża się w glebach *Orthic Podzol* oraz *Mollic Gleysol* (o 7% v/v). Silny spadek wilgotności powyżej *pF* 1,5 (z 24 do 9% v/v), notowany był także w przypadku *Eutric Cambisol* nr 802. Krzywe *pF* sporządzone dla czarnoziemów (*Haplic Phaeozem*) w zakresie *pF* 2,2-3,2 wykazują łagodny spadek, świadczący o niewielkiej różnicy w zawartości wody (rys. 8). Największe zróżnicowanie wykazał czarnoziem nr 794, charakteryzujący się najwyższymi zdolnościami retencyjnymi. W tym przypadku spadek nachylenia krzywej *pF* jest wyraźny już przy *pF* 1,5 gdzie w stosunku do pełnego wysycenia gleby wodą (*pF* 0) wystąpiły różnice w wilgotności dochodzące do 8% v/v. Po-

wyżej wartości *pF* 1,5 wspomniany spadek jest nieco łagodniejszy (do 3% v/v), a wilgotność czarnoziemu zmniejsza się nieznacznie (o 2% v/v).

Specyficzny jest natomiast charakter przebiegu krzywych retencji wyznaczonych dla mad rzecznych (*Eutric Fluvisol*), w porównaniu z innymi typami gleb (rys. 5). Krzywe retencji wyznaczone dla mady nr 87 oraz nr 967 w całym zakresie *pF* 0- 3,2 wykazują minimalne różnice w wilgotności w granicach 1-4% v/v (warstwa powierzchniowa) i 1-7% v/v (warstwa podpowierzchniowa i podglebie). Największą dynamiką zmian wilgotności charakteryzowała się mada nr 957, w której zaobserwowano minimalny spadek wilgotności w zakresie *pF* 0-1,5 (do 1% v/v), zaś powyżej wartości *pF* 2,2 wilgotność malała w granicach 4-7% v/v.

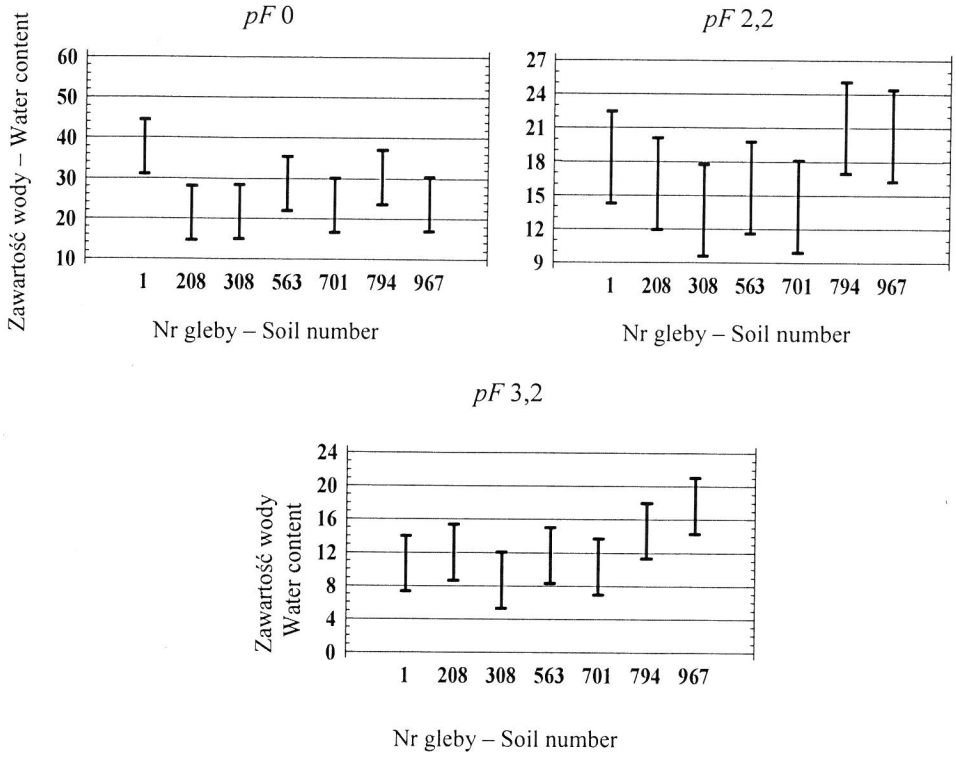
Krzywe retencji otrzymane dla rędzin (*Rendzina Leptosol*) mają łagodny przebieg, świadczący o różnicy wilgotności (maksymalnie do 9% v/v), w całym badanym zakresie potencjału wody (*pF* 0-3,2), dla rędzin nr 727 i nr 728 (rys. 6). Największe różnice w zatrzymywaniu wody wystąpiły w rędzinie nr 563, gdzie dość gwałtowny spadek wilgotności odnotowano już przy *pF* 1,5, natomiast w kolejnych analizowanych punktach *pF* obserwowano stopniowe obniżanie się wilgotności do 11-9% v/v (*pF* 3,2).

Dynamiczny i zróżnicowany przebieg wykazują krzywe retencji, opracowane dla gleb murszowych (*Eutric Histosol*) – rysunek 7. Wraz ze wzrostem *pF*, obserwowano duże różnice w zmniejszaniu się wilgotności (w zakresie pF 0-3,2), dochodzące nawet do 32% v/v w warstwie powierzchniowej, 20% v/v w warstwie podpowierzchniowej i 21% v/v w podglebiu. Z analizy otrzymanych danych wynika fakt, iż gleby murszowe największe ilości wody retencjonują w warstwie powierzchniowej i są one wyższe niż w warstwie podpowierzchniowej oraz podglebiu o 16-20% v/v.

Różnice w wilgotności przy wybranych wartościach potencjału glebowego przekroczyły 10% w przypadku gleb bielicowych (warstwa powierzchniowa), murszowych, czarnoziemów oraz rędzin, co świadczy o dużej niejednorodności wspomnianych typów gleb pod względem statycznych charakterystyk wodnych. Natomiast gleby brunatne, czarne ziemie, mady rzeczne oraz bielicowe (warstwa podpowierzchniowa i podglebie), okazały się być homogeniczne pod względem statycznych charakterystyk hydrofizycznych, biorąc pod uwagę różnice w wilgotnościach, nie przekraczające 10%.

Największą ilość wody w warstwach powierzchniowych przy *pF* 0 retencjonowały gleby murszowe (41-30%), rędziny (41-21%) oraz czarnoziemy (42-18%). W pozostałych typach gleb ilość zatrzymanej wody (*pF* 0), wahała się w graniach (29-16%). Wyniki analizy statystycznej, uwzględniającej różną zdol-

ność gleb do zatrzymywania wody, zostały przedstawione na rysunku 9. Wspomniane różnice nie miały charakteru zmian statystycznie istotnych ($p>0,05$).



Rys. 9. Zawartość wody łatwo dostępnej (% v/v) w warstwie powierzchniowej gleb reprezentujących poszczególne ich typy (nr 1-murszowa, nr 208 – czarna ziemia, nr 308 – brunatna, nr 563 – rędzina, nr 701 – bielica, nr 794 – czarnoziem, nr 967 – mada), przy wybranych wartościach *pF*, (n = 21, $p>0,05$). Wartości średnie z 3 powtórzeń

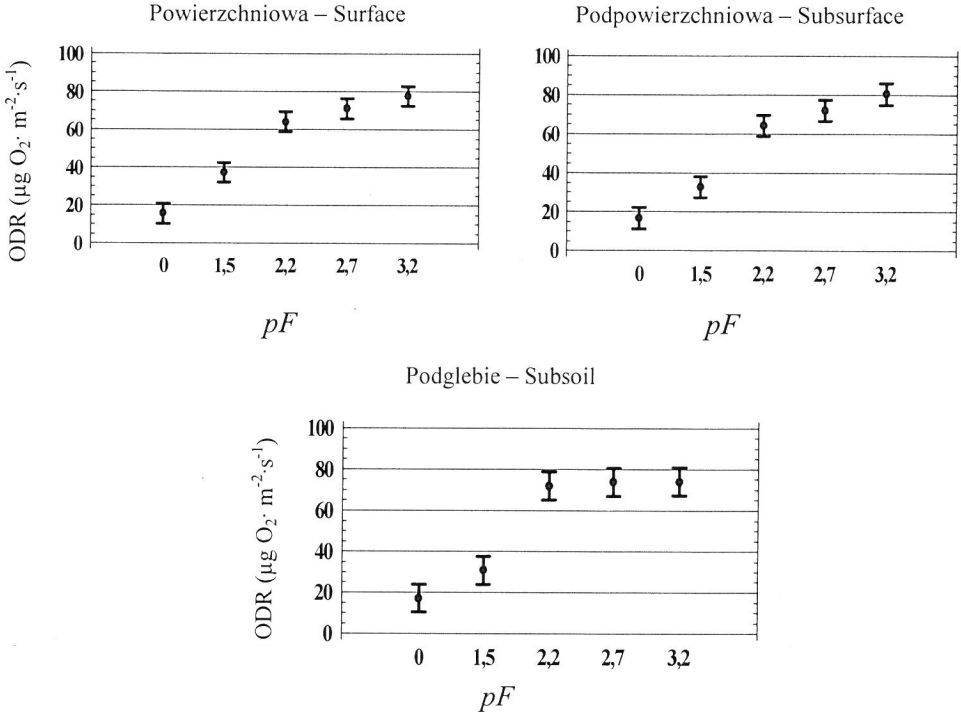
Fig. 9. Easily available water content (% v/v) in the surface layer of the following soil types (No. 1 – *Eutric Hostosol*, No. 208 – *Mollic Gleysol*, No. 308 – *Eutric Cambisol*, No. 563 – *Rendzina Leptosol*, No. 701 – *Orthic Podzol*, No. 794 – *Haplic Phaeozem*, No. 967 – *Eutric Fluvisol*), at selected values of *pF*, (n = 21, $p>0.05$). Average values form 3 replicates

W punkcie *pF* 3,2 stanowiącym granicę wody łatwo dostępnej dla mikroorganizmów i korzeni roślin, jej ilość utrzymywała się w zakresie 13- 8% v/v, wyjątek stanowiły mady i czarnoziemy, które przy *pF* 3,2 zdolne były do zatrzymania 20% v/v wody. Głębsze warstwy profili glebowych, charakteryzowała mniejsza zdolność retencyjna w porównaniu z warstwą powierzchniową, aczkolwiek w przypadku mad rzecznych oraz dwóch rędzin (nr 727, nr 728), zaobserwowano

tendencję odwrotną i to właśnie warstwy podpowierzchniowe oraz podglebie zatrzymywały o ok. 10% v/v wody więcej, aniżeli warstwa powierzchniowa.

6.1.2. Dostępność tlenu (*ODR*)

Zdolności retencyjne badanego materiału glebowego wpłynęły na różnicowanie się kolejnego parametru – dostępności tlenu dla mikroorganizmów i korzeni roślin (*ODR*). Wyznaczone współzależności między *ODR* a *pF* z uwzględnieniem wszystkich badanych gleb (n = 315), przedstawiono na rysunku 10.



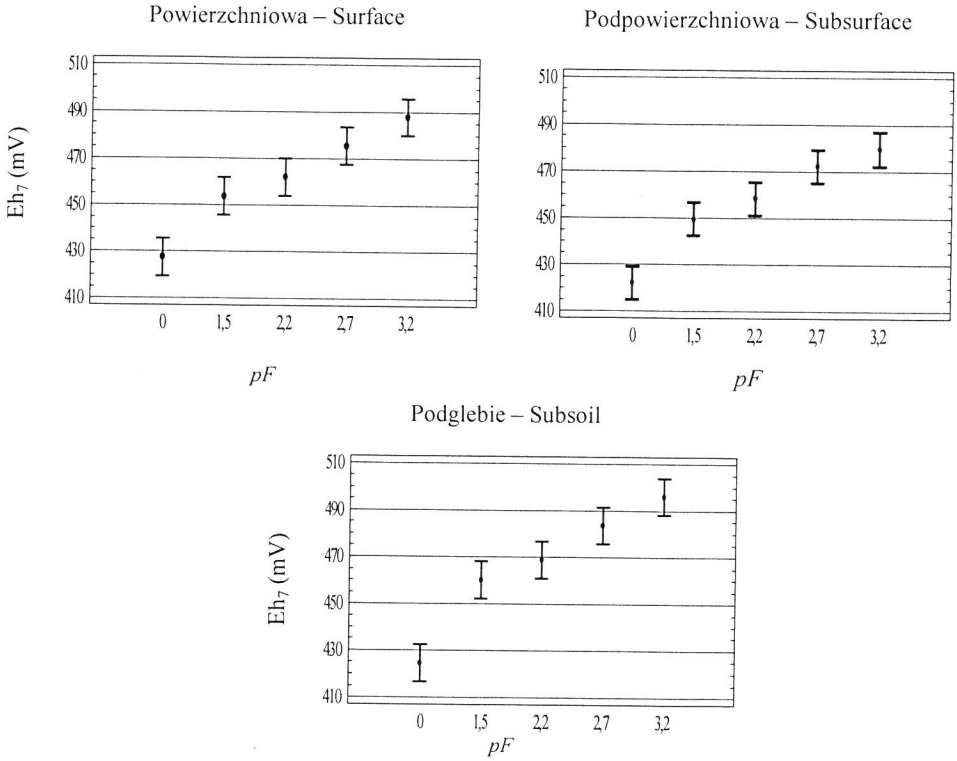
Rys. 10. Zależność współczynnika mikrodyfuzji tlenu (*ODR*) od potencjału wody glebowej (*pF*) w całym zbiorze badanych gleb podczas procesu reoksydacji (n =3 15, $p<0,001$)
Fig. 10. Dependence of oxygen microdiffussion coefficient (*ODR*) on water potential (*pF*) in the investigated soils during the reoxidation process (n = 315, $p<0.001$)

Na podstawie wykonanych pomiarów wykazano, że *pF* określający zdolność gleby do zatrzymywania wody w środowisku glebowym stanowi istotny czynnik determinujący dostępność tlenu dla mikroorganizmów i korzeni roślin ($p<0,001$). Analizując otrzymane zależności można stwierdzić, iż wszystkie badane gleby stanowiły homogenne środowisko dla drobnoustrojów glebowych, biorąc pod uwagę parametr *ODR*, opisujący dostępność tlenu dla mikroorganizmów i korzeni

roślin. W każdym z uwzględnionych poziomów profili glebowych różnice w wartościach *ODR* warunkowane potencjałem wody glebowej były statystycznie istotne. Najniższe wartości *ODR* wystąpiły przy *pF* 0, gdzie kształtowały się w zakresie 3-12 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Stan maksymalnego wysycenia gleb wodą nie zapewnia zatem korzystnych warunków do wzrostu i rozwoju korzeni roślin, biorąc pod uwagę fakt, iż krytyczne wartości *ODR* poniżej których utrudniony jest ich optymalny wzrost szacuje się na 35 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

6.1.3. Stan oksydoredukcyjny podłoża (Eh_7)

Zależność obrazującą wzajemne powiązanie pomiędzy potencjałem redoks a potencjałem wody glebowej, wyznaczoną w obrębie trzech poziomów wszystkich badanych gleb przedstawiono na rysunku 11.



Rys. 11. Zależność potencjału redoks (Eh_7) od potencjału wody glebowej (*pF*) w całym zbiorze badanych gleb, podczas procesu reoksydacji (n = 315, $p<0{,}001$)

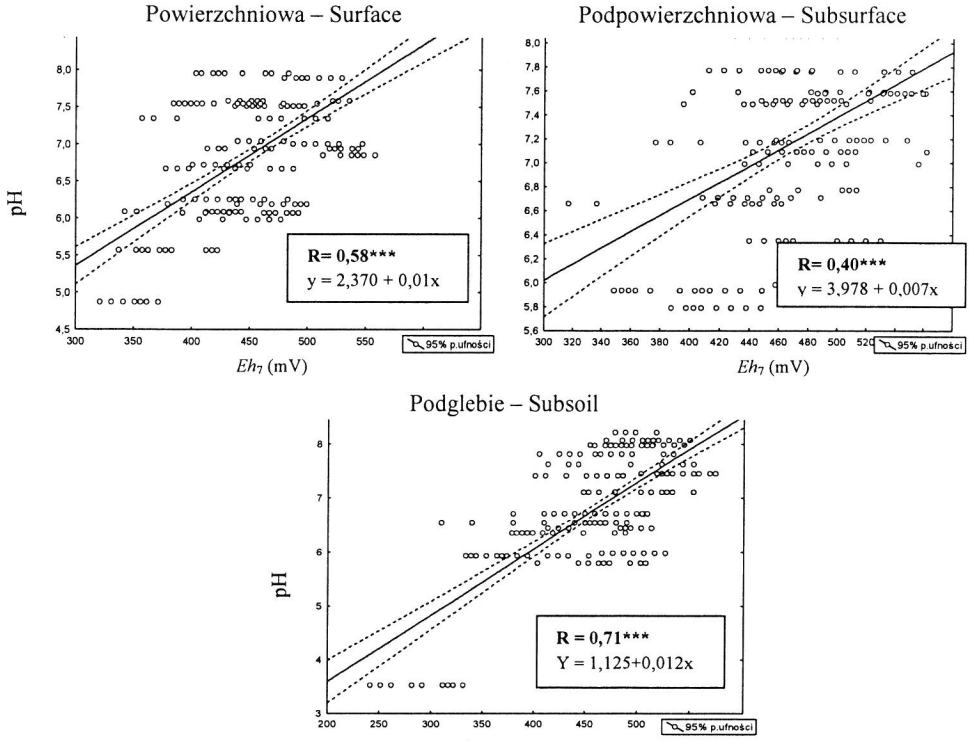
Fig. 11. Dependence of redox potential (Eh_7) on water potential (*pF*) in the investigated soils during the reoxidation process (n = 315, $p<0.001$)

W warstwach powierzchniowych oraz podpowierzchniowych wartości potencjału redoks nie przekraczały 485 mV, zaś dochodziły do 495 mV w podglebiu, przy *pF* 3,2.

Zmiany potencjału oksydoredukcyjnego (ΔEh_7), wyznaczone w każdej z analizowanych gleb na podstawie różnicy pomiędzy *pF* 0 i 3,2 stanowiącym granicę dostępności wody dla korzeni roślin i mikroorganizmów glebowych nie przekraczały 130 mV.

Rozkład wartości Eh_7 jest związany z odczynem badanych gleb. Wyznaczone średnie wartości odczynu gleb oscylowały w granicach *pH* obojętnego (6,8-7,3). Wyjątek stanowiły gleby brunatne, gdzie w podglebiu notowano *pH* w granicach 4,87-5,93 oraz gleby murszowe z odczynem zdecydowanie kwaśnym w zakresie 3,52-5,98 (tab. 6).

Zależność pomiędzy odczynem badanych gleb a *Eh* podłoża, sporządzoną w całym analizowanym zbiorze ujęto na rysunku 12. W każdym z trzech poziomów profili glebowych wykazano liniową korelację ($p<0,001$) między potencjałem redoks a odczynem gleb.



Rys. 12. Współzależność potencjału oksydoredukcyjnego (Eh_7) od odczynu (*pH*) badanych gleb (n = 315, $p<0,001$)

Fig. 12. Correlation of redox potential (Eh_7) and reaction (*pH*) of the investigated soils (n = 315, $p<0.001$)

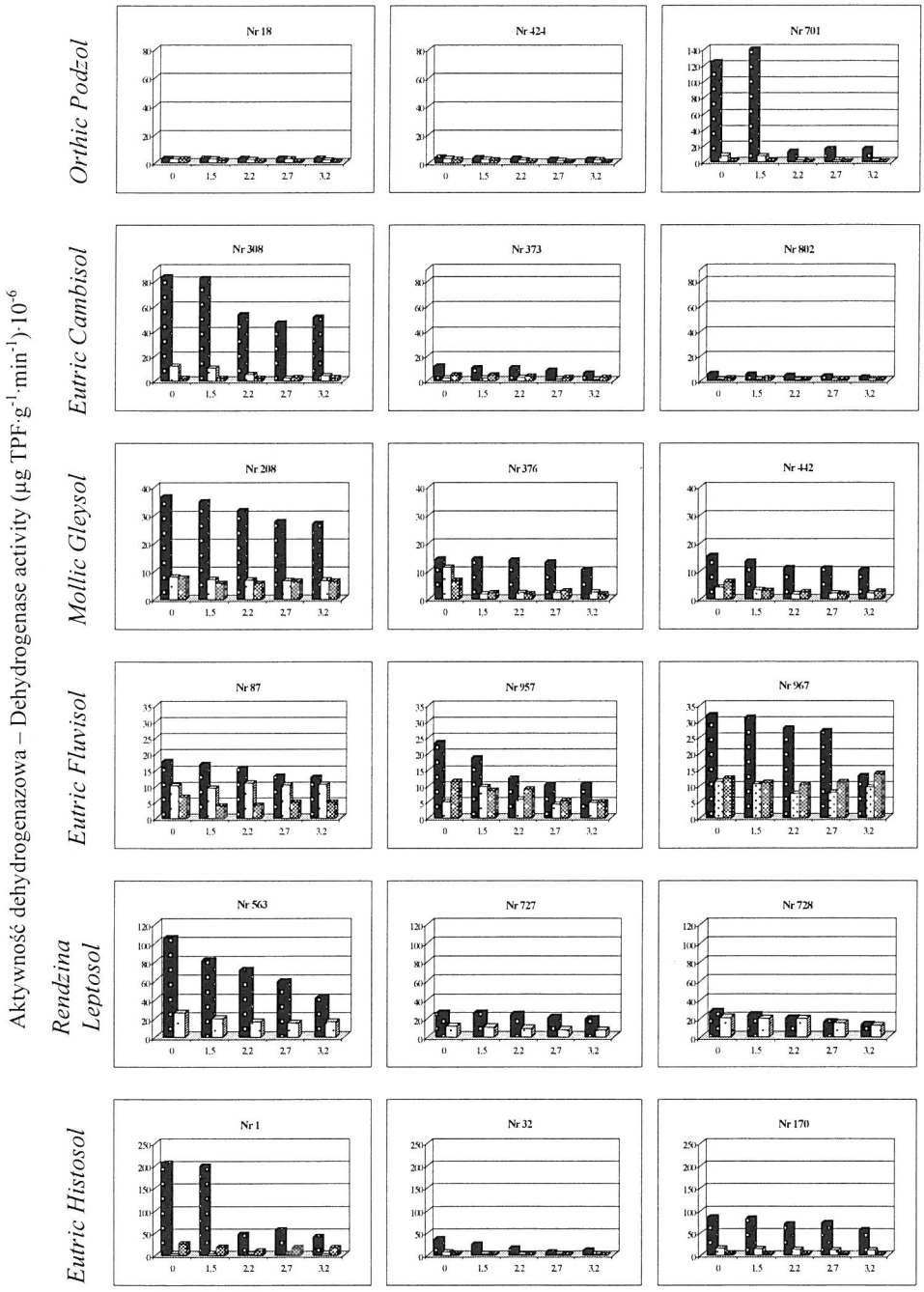
6.2. *DHA* mikroorganizmów glebowych

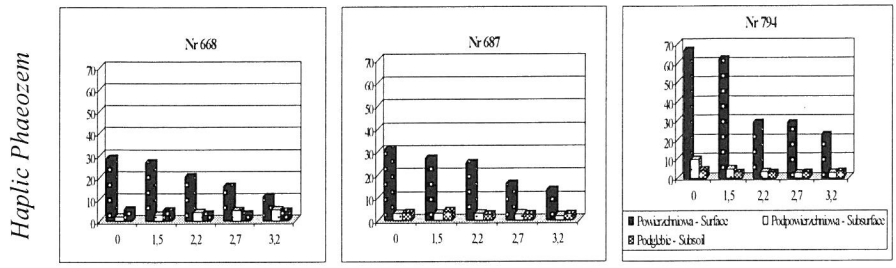
Wraz z procesem osuszania gleb od ich pełnej pojemności wodnej (*pF* 0) do granicy wody dostępnej i użytecznej dla mikroorganizmów i korzeni roślin (*pF* 3,2) obserwowano obniżanie się aktywności enzymatycznej. Im wyższe były wartości *pF*, a więc analogicznie im gleba stawała się bardziej sucha i lepiej natleniona tym notowany poziom *DHA* był niższy. Stąd maksymalne wartości *DHA* występowały przy całkowitym wysyceniu gleb wodą (*pF* 0), bądź *pF* 1,5. Wysokie wartości *DHA* notowane w środowiskach wilgotnych, z małą dostępnością tlenu sugerują, iż mikroorganizmy glebowe tworzące tę aktywność należą do grupy organizmów higrofilnych i anaerobowych, preferujących wilgotne środowiska o ograniczonej dostępności tlenu. Zmiany w *DHA*, zachodzące w trzech warstwach profilu glebowego: powierzchniowej, podpowierzchniowej i podglebiu badanych gleb determinowane zróżnicowanymi wartościami *pF* zostały przedstawione na rysunku 13.

Dodatkowo przeprowadzono test dehydrogenaz na próbkach kontrolnych (autoklawowanych). Nie stwierdzono redukcji TTC.

Dysponując wiedzą na temat *DHA* w poszczególnych typach gleb (rys. 13) do bardziej szczegółowych badań (liczebność mikroorganizmów) wyodrębniono po jednym przedstawicielu z każdego typu gleby. Skoncentrowano się na tych glebach, które posiadały najwyższą *DHA*, a mianowicie: *Eutric Histosol* nr 1, *Eutric Fluvisol* nr 967, *Orthic Podzol* nr 701, *Haplic Phaeozem* nr 794, *Mollic Gleysol* nr 208, *Rendzina Leptosol* nr 563 i *Eutric Cambisol* nr 308. Zestawienie najbardziej aktywnych gleb, reprezentujących poszczególne typy w obrębie ich warstw powierzchniowych, przedstawiono na rysunku 14. Zastosowanie jednej skali wartości *DHA* ułatwia porównanie poziomu badanej aktywności enzymatycznej w zależności od typu gleby

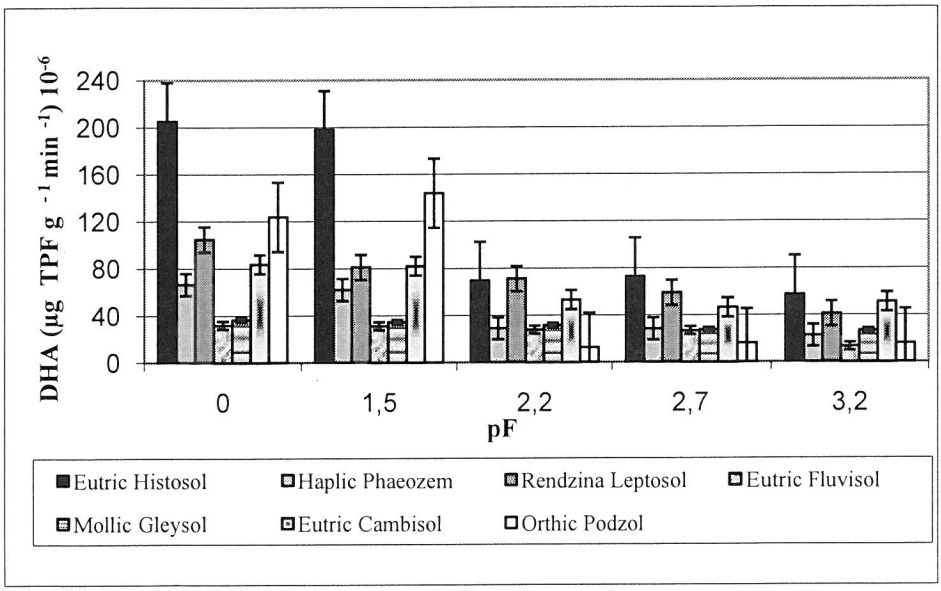
Równania regresji wyznaczone dla najaktywniejszych enzymatyczne przedstawicieli badanych typów gleb tj: *Eutric Histosol* nr 1, *Eutric Fluvisol* nr 967, *Orthic Podzol* nr 701, *Haplic Phaeozem* nr 794, *Mollic Gleysol* nr 208, *Rendzina Leptosol* nr 563 i *Eutric Cambisol* nr 308, w obrębie warstw powierzchniowych zestawiono w tabeli 8.


Aktywność dehydrogenazowa – Dehydrogenase activity (μg TPF·g⁻¹·min⁻¹)·10⁻⁶
Orthic Podzol
Nr 18
Nr 424
Nr 701
Eutric Cambisol
Nr 308
Nr 373
Nr 802
Mollic Gleysol
Nr 208
Nr 376
Nr 442
Eutric Fluvisol
Nr 87
Nr 957
Nr 967
Rendzina Leptosol
Nr 563
Nr 727
Nr 728
Eutric Histosol
Nr 1
Nr 32
Nr 170
0
1.5
2.2
2.7
3.2



Potencjał wody glebowej – Soil water potential

Rys. 13. Średnie wartości *DHA* w warstwach powierzchniowych, podpowierzchniowych i podglebiu badanych gleb
Fig. 13. Averages values of *DHA* in surface, subsurface and subsoil horizons of the investigated soils



Rys. 14. *DHA* w funkcji potencjału wody glebowej (*pF*) w warstwach powierzchniowych najaktywniejszych enzymatycznie gleb, podczas procesu reoksydacji. Na rysunku podano wartości średnie wraz odchyleniami standardowymi
Fig. 14. *DHA* versus soil water potential (*pF*) in the surface layers of the most enzymatic-active soils, during the reoxidation process. The Figure presents the mean values with standard deviations

Biorąc pod uwagę warunki optymalne dla bytowania mikroorganizmów odpowiedzialnych za tworzenie *DHA* (*pF* 0 i *pF* 1,5), najbardziej aktywna okazała się gleba murszowa nr 1 z wartościami *DHA* w granicach 205-198 µg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6} oraz gleba bielicowa nr 701 z aktywnością na poziomie 124-144 µg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6}.

Wysoką *DHA* w zakresie 105-81,2 μg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6} wykazała też rędzina nr 563. Pozostałe typy gleb charakteryzowała aktywność poniżej 100 μg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6}.

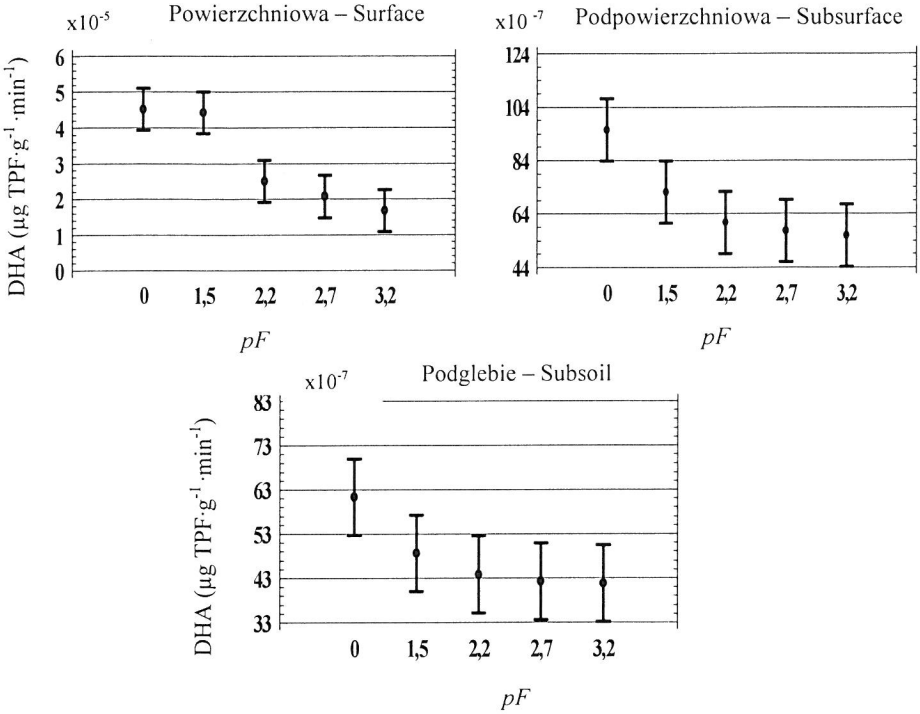
Tabela 8. Równania regresji i współczynniki korelacji, przypisane zależnościom *DHA* od *pF* w warstwach powierzchniowych najaktywniejszych gleb (n = 15)
Table 8. Linear regression and correlation coeficients describing the dependence of *DHA* versus *pF* in the surface layers of the most active soils (n = 15)

Typ gleby – Soil type	Równania – Equations	R
Eutric Histosol	$y = 8{,}221x^2 - 91{,}37x + 304{,}2$	0,92
Haplic Phaeozem	$y = -12{,}17x + 7{,}27$	0,92
Rendzina Leptosol	$y = -14{,}99x + 116{,}5$	0,99
Eutric Fluvisol	$y = -1{,}664x^2 + 5{,}795x + 27{,}14$	0,96
Mollic Gleysol	$y = -2{,}63x + 39{,}37$	0,98
Eutric Cambisol	$y = 2{,}478x^2 - 24{,}92x + 110{,}8$	0,92
Orthic Podzol	$y = 6{,}75x^2 - 74{,}91x + 213$	0,85

Wartości w zakresie 83,7-81,2 μg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6} zarejestrowano w glebie brunatnej nr 308. Aktywność czarnoziemu nr 794 plasowała się na poziomie 66,6-2,1 μg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6}, zaś w czarnej ziemi nr 208 odnotowano *DHA* w zakresie 36,6-34,6 μg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6}. Najniższa *DHA* w granicach 32-31,2 μg TPF·g^{-1}·min^{-1}·10^{-6} wystąpiła w madzie rzecznej nr 967.

Test ANOVA przeprowadzony na całym zbiorze badanych gleb (n = 315), wykazał istotne różnice w *DHA* w warstwach powierzchniowych ($p<0{,}001$) oraz podpowierzchniowych ($p<0{,}01$), podczas gdy w podglebiu zmiany *DHA*, wraz z postępującym procesem reoksydacji nie były statystycznie istotne ($p>0{,}05$) – rysunek 15. Wartości *DHA* określone w warstwach powierzchniowych obniżyły się 3-krotnie, biorąc pod uwagę różnicę pomiędzy *pF* 0 a *pF* 3,2. Dwukrotny spadek notowano w warstwach podpowierzchniowych, zaś 1,5 raza wspomniane wartości różniły się w podglebiu.

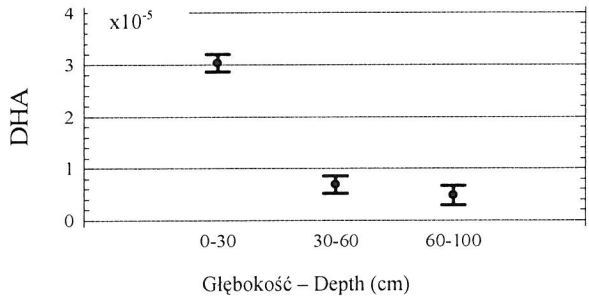
Warto również zwrócić uwagę na fakt, iż *DHA* w warstwach podpowierzchniowych była niższa o 73% zaś w podglebiu o 84% w porównaniu do wartości notowanych w poziomach powierzchniowych.



Rys. 15. Zależność *DHA* (µg TPF·g^{-1}·min^{-1}) od potencjału wody glebowej (pF) w badanych glebach podczas procesu reoksydacji (n = 315, p<0,001 w warstwie powierzchniowej, p<0,01 w warstwie podpowierzchniowej, p>0,05 w podglebiu)

Fig. 15. Dependence of *DHA* (µg TPF g^{-1} min^{-1}) on the soil water potential (*pF*) in the investigated soil types during reoxidation process (n = 315, p<0.001 in surface layer, p<0.01 in subsurface layer, p>0.05 in subsoil)

W ramach niniejszej pracy potwierdzono istotny wpływ głębokości profilu glebowego na wartość *DHA*, co obrazuje rysunek 16.



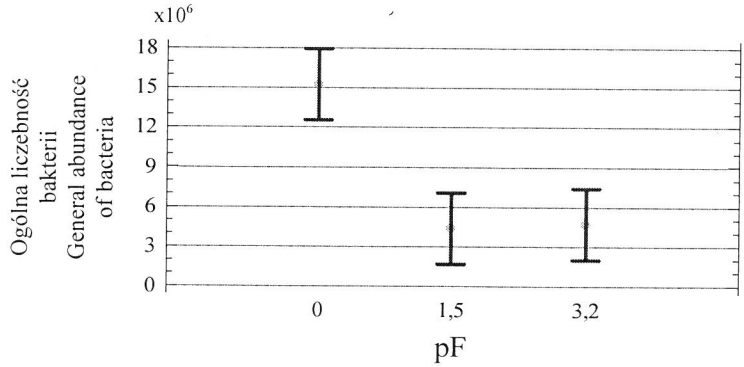
Rys. 16. *DHA* (µg TPF·g^{-1}·min^{-1}) na różnych głębokościach profilu glebowego (n = 900, p<0,001)

Fig. 16. *DHA* (µg TPF g^{-1} min^{-1}) at different depths of soil profile (n = 900, p<0.001)

6.3. Zależność liczebności mikroorganizmów od potencjału wody glebowej

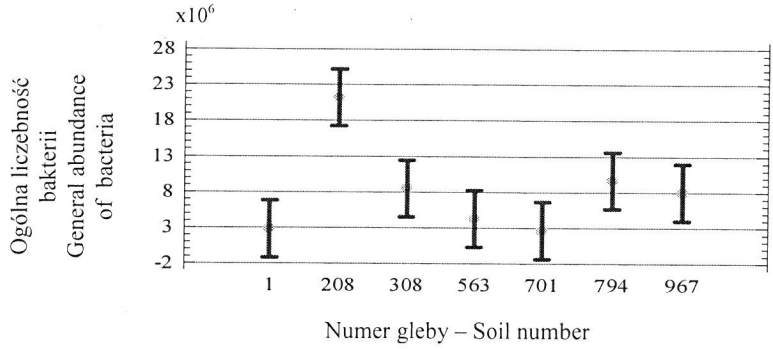
6.3.1. Ogólna liczebność bakterii glebowych

Testowane grupy drobnoustrojów glebowych preferowały dość wilgotne podłoża, stąd przy pełnym wysyceniu gleb wodą (*pF* 0) wystąpiły maksymalne wartości ich liczebności. Wraz z osuszaniem się podłoża, a więc ze wzrostem potencjału wody glebowej, następował stopniowy spadek liczebności badanych grup mikroorganizmów. Analiza statystyczna uzyskanych wyników potwierdza istotny ($p<0{,}001$) wpływ *pF* na ogólną liczebność mikroorganizmów (rys. 17).



Rys. 17. Ogólna liczba bakterii ($\cdot 10^6$) występująca w 1 g gleby przy *pF* 0; 1,5; 3,2 (n = 63, $p<0{,}001$)
Fig. 17. Total number of bacteria ($\cdot 10^6$) occurring in 1 g of soil at *pF* 0; 1.5; 3.2 (n = 63, $p<0.001$)

Zróżnicowanie liczebności bakterii glebowych w glebach należących do różnych typów przedstawiono na rysunku 18.



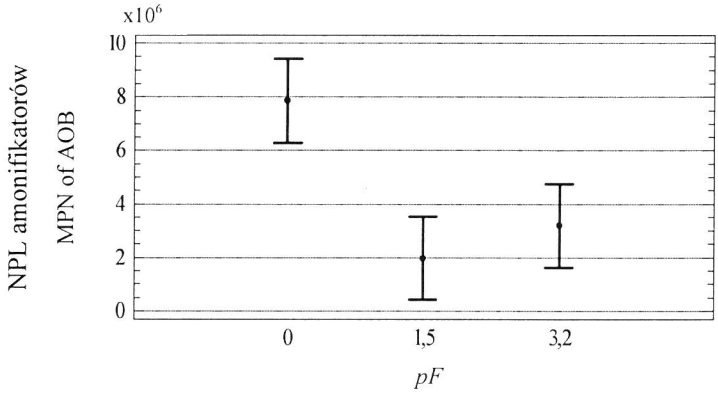
Rys. 18. Ogólna liczba bakterii ($\cdot 10^6$) przy *pF* 0 w glebach reprezentujących poszczególne typy gleb. Objaśnienia jak na rysunku 9
Fig. 18. Total numbers of bacteria ($\cdot 10^6$) at *pF* 0 in the soils representing individual soil types. Explanations as in Figure 9

Ogólna liczba bakterii glebowych była najwyższa w czarnej ziemi nr 208 przy *pF* 0, gdzie w 1g gleby stwierdzono obecność $21 \cdot 10^6$ bakterii. Wysoką liczebnością mikroorganizmów cechował się także czarnoziem nr 794, kiedy ogólna liczba bakterii wyniosła $11 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ gleby. W glebie brunatnej nr 308 oraz madzie rzecznej nr 967 w warunkach pełnego wysycenia wodą liczba bakterii glebowych wyniosła $8 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ gleby. W pozostałych analizowanych glebach, liczba mikroorganizmów nie przekroczyła wartości $5 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$. W glebie murszowej nr 1 przy *pF* 0, oszacowano ich liczbę na $3 \cdot 10^6$, w rędzinie nr 563 na $4 \cdot 10^6$ zaś w bielicy nr 701 na $2{,}8 \cdot g^{-1}$ gleby.

Reasumując, spośród wszystkich analizowanych typów gleb znaczącą różnicę w liczebności mikroorganizmów wykazała czarna ziemia nr 208. Pozostałe gleby stanowiły homogenną grupę, pozbawioną statystycznie istotnych różnic pod względem ogólnej liczby bakterii.

6.3.2. NPL bakterii amonifikacyjnych

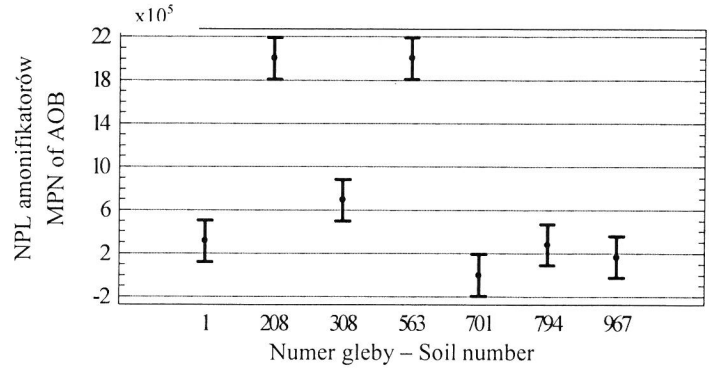
Bakterie amonifikacyjne preferowały wilgotne środowiska (*pF* 0), odpowiadające pełnemu wysyceniu gleb wodą (rys. 19).



Rys. 19. NPL amonifikatorów ($\cdot 10^6$) występująca w 1 g gleby przy *pF* 0; 1,5; 3,2 (n = 63, $p<0{,}001$)
Fig. 19. MPN of AOB ($\cdot 10^6$) occurring in 1 g of soil at *pF* 0; 1.5; 3.2 (n = 63, $p<0.001$)

Zróżnicowanie NPL amonifikatorów w glebach należących do różnych typów przedstawiono na rysunku 20. Spośród badanych typów gleb jedynie rędzina nr 563 oraz gleba brunatna nr 308 różniły się istotnie ($p>0{,}05$) od pozostałych pod względem liczebności bakterii amonifikacyjnych. Ich liczba dochodziła do $11 \cdot 10^5 \cdot g^{-1}$ w rędzinie nr 563 oraz $7 \cdot 10^5 \cdot g^{-1}$ glebie brunatnej nr 308, zaś w pozostałych glebach

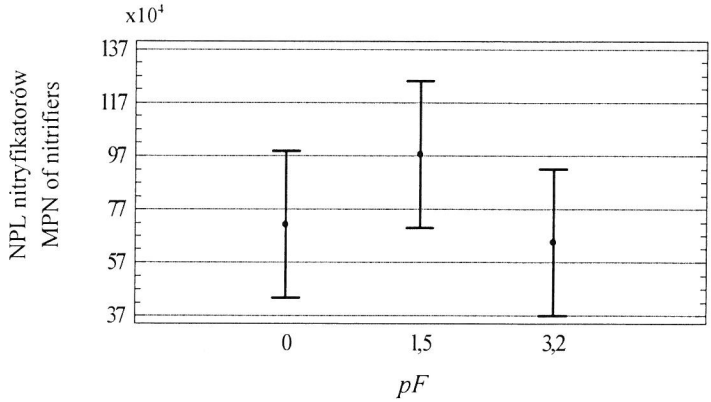
utrzymywała się na poziomie 1,8-2·10^5·g^{-1} gleby. Stąd gleba murszowa nr 1, czarna ziemia nr 208, czarnoziem nr 794, gleba bielicowa nr 701 i mada rzeczna nr 967 zostały uznane za jednorodną grupę gleb, cechującą się podobnym poziomem liczebności amonifikatorów.



Rys. 20. NPL bakterii amonifikacyjnych (·10^5) w glebach reprezentujących poszczególne typy gleb. Objaśnienia jak na rysunku 9
Fig. 20. MPN of AOB (·10^5) in the soils representing individual soil types. Explanations as in Figure 9

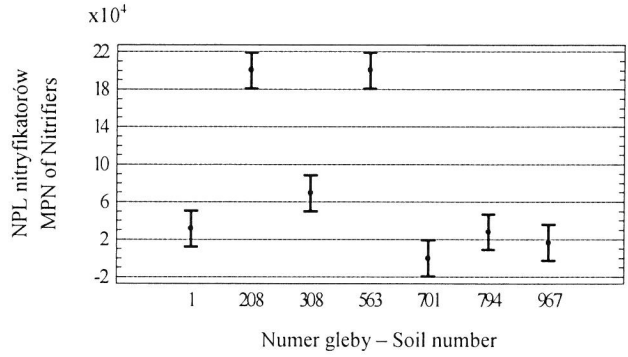
6.3.3. NPL bakterii nitryfikacyjnych

W całościowym ujęciu wyników (n = 63) NPL nitryfikatorów wzrastała w zakresie *pF* 0-*pF* 1,5. Natomiast w granicach *pF* 1,5-*pF* 3,2 notowano spadek, nie wykazując jednak statystycznie istotnych różnic w ich liczebności (rys. 21).



Rys. 21. NPL nitryfikatorów (·10^4) występująca w 1 g gleby przy *pF* 0; 1,5; 3,2 (n = 63, p>0,05)
Fig. 21. MPN of nitrifiers (·10^4) occurring in 1 g of soil at *pF* 0; 1.5; 3.2 (n = 63, p>0.05)

Przedstawiony przebieg zależności wskazuje zatem na niewielki wpływ stanu aeracji na populację nitryfikatorów wraz z początkiem redukcji ich liczebności w warunkach ograniczonej dostępności wody (*pF* 3,2). Zróżnicowanie NPL bakterii nitryfikacyjnych w glebach należących do różnych typów przedstawiono na rysunku 22.

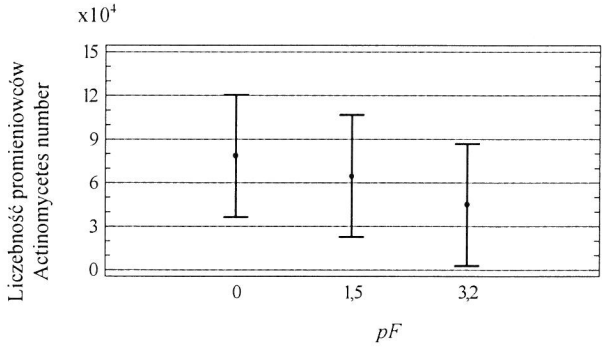


Rys. 22. NPL bakterii nitryfikacyjnych ($\cdot 10^4$) w glebach reprezentujących poszczególne typy gleb. Objaśnienia jak na rysunku 9
Fig. 22. MPN of nitrifiers ($\cdot 10^4$) in the soils representing individual soil types. Explanations as in Figure 9

Bakterie nitryfikacyjne reprezentowały populację o liczebności $20 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ gleby jedynie w rędzinie nr 563 oraz czarnej ziemi nr 208, zaś w pozostałych glebach wahającą się w znacznie mniejszym zakresie od 1,3 do $7 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$.

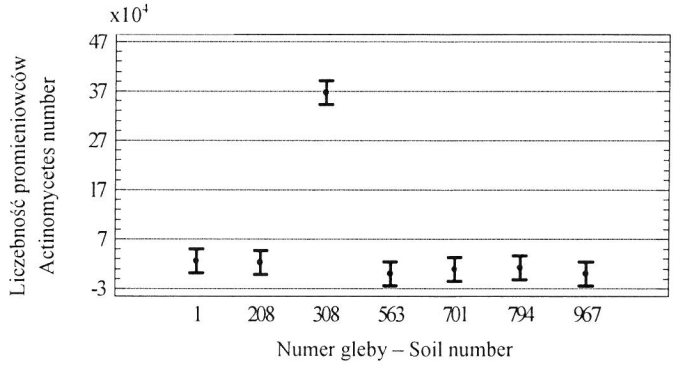
6.3.4. Liczebność promieniowców

Zróżnicowanie warunków wilgotnościowych w procesie reoksydacji, powodowało obniżenie liczebności promieniowców ($p>0,05$) co zostało przedstawione na rysunku 23.



Rys. 23. Liczebność promieniowców ($\cdot 10^4$) występująca w 1 g gleby przy *pF* 0; 1,5; 3,2 (n = 63, $p>0,05$)
Fig. 23. *Actinomycetes* abundance ($\cdot 10^4$) occurring in 1 g of soil at *pF* 0; 1.5; 3.2 (n = 63, $p>0.05$)

Zróżnicowanie liczebności promieniowców w zależności od gleby reprezentującej poszczególne ich typy przedstawiono na rysunku 24.



Rys. 24. Liczebność promieniowców ($\cdot 10^4$) w glebach reprezentujących poszczególne typy gleb. Objaśnienia jak na rysunku 9
Fig. 24. *Actinomycetes* abundance ($\cdot 10^4$) in the soils representing individual soil types. Explanations as in Figure 9

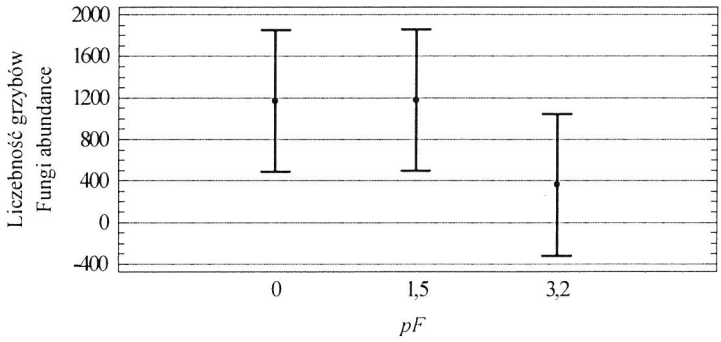
Jak widać z prezentowanego układu danych gleba brunatna nr 308 wykazywała znaczące statystycznie różnice pod względem liczebności promieniowców, w porównaniu z pozostałymi typami badanych gleb. W glebie brunatnej nr 308 przy jej pełnej pojemności wodnej (*pF* 0) notowano liczebność promieniowców na poziomie $37 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ gleby. W pozostałych typach gleb liczba promieniowców nie przekraczała $5 \cdot 10^4 \cdot g^{-1}$ gleby.

6.3.5. Liczebność grzybów

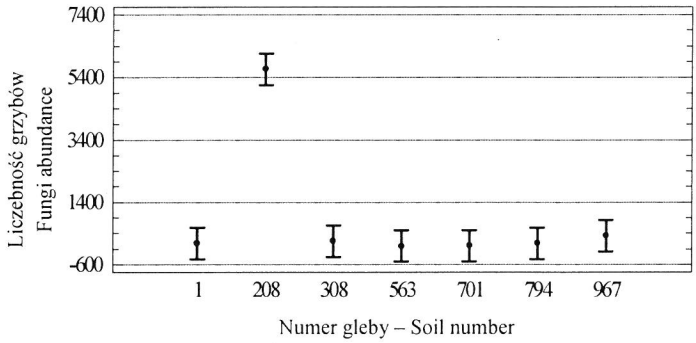
Grzyby stanowiły najmniej liczną populację organizmów glebowych, spośród wszystkich drobnoustrojów, oznaczanych w ramach niniejszej pracy. Wpływ potencjału wody glebowej na liczbę grzybów przedstawiono na rysunku 25.

Obserwowano brak zmienności liczebności grzybów w zakresie *pF* 0-1,5 podczas gdy wzrost potencjału wody glebowej do *pF* 3,2 spowodował wyraźne obniżenie ich liczebności, nie były to jednakże różnice istotne statystycznie ($p>0,05$).

Zróżnicowanie liczebności grzybów w glebach należących do różnych typów przedstawiono na rysunku 26. Najliczniejsza ich grupa wystąpiła w czarnej ziemi nr 208, gdzie w 1g gleby stwierdzono $5,5 \cdot 10^3$ (przy *pF* 0). W pozostałych typach gleb nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ich liczebności, która wahała się w granicach $0,1\text{-}1,2 \cdot 10^3$ g^{-1} gleby.



Rys. 25. Liczebność grzybów występująca w 1 g gleby przy *pF* 0; 1,5; 3,2 (n = 63, $p>0,05$)
Fig. 25. Abundance of fungi occurring in 1 g of soil at *pF* 0; 1.5; 3.2 (n = 63, $p>0.05$)



Rys. 26. Liczebność grzybów w glebach reprezentujących poszczególne typy gleb. Objaśnienia jak na rysunku 9
Fig. 26. Fungi abundance in the soils representing individual soil types. Explanations as in Figure 9

6.4. Zależność *DHA* od parametrów aeracyjnych (*pF*, *ODR*, *Eh*)

Przeanalizowano wzajemne korelacje pomiędzy *DHA* a parametrami aeracyjnymi, determinującymi aktywność enzymatyczną w badanych typach gleb. Wyniki analizy statystycznej, wraz z wyznaczonymi współczynnikami R przedstawiono w tabeli 9.

W przypadku warstw powierzchniowych gleb *Orthic Podzol*, widoczny jest znaczący wpływ jedynie *ODR* na poziom *DHA*. W warstwie podpowierzchniowej zaś, to *pF* stanowi główny czynnik determinujący *DHA*, podczas gdy w podglebiu, przy niskiej aktywności enzymatycznej, nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności od któregokolwiek z analizowanych parametrów.

W glebach *Eutric Cambisol* potwierdzono natomiast znaczący wpływ *pF* na *DHA* w warstwie powierzchniowej. Wykazano negatywne korelacje z *pF* i Eh_7 w warstwie podpowierzchniowej oraz podglebiu.

Tabela 9. Różnice istotne statystycznie pomiędzy *DHA* i parametrami fizycznymi (*pF*, *ODR*, Eh_7), opisane przez współczynniki korelacji (R) w badanych poziomach profili glebowych (n = 45)
Table 9. Statistical significance of differences between *DHA* and physical parameters (*pF*, *ODR*, Eh_7), described by correlation coefficient (R) in the investigated soils layers (n = 45)

DHA	Warstwa – Layer	*pF*	*ODR*	Eh_7
Orthic Podzol	Powierzchniowa – Surface	–	–0,37*	–
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–0,34*	–	–
	Podglebie – Subsoil	–	–	–
Eutric Cambisol	Powierzchniowa – Surface	–0,40**	–	–
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–0,38**	–	–0,41**
	Podglebie – Subsoil	–0,35*	–	–0,54***
Mollic Gleysol	Powierzchniowa – Surface	–	–	–0,78***
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–0,51***	–0,33*	–
	Podglebie – Subsoil	–0,51***	–0,41**	–
Eutric Fluvisol	Powierzchniowa – Surface	–0,55***	–	–0,43*
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–	–	–0,56***
	Podglebie – Subsoil	–	–	–0,41**
Rendzina Leptosol	Powierzchniowa – Surface	–0,35*	–0,40**	–0,47**
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–0,51***	–	–
Eutric Histosol	Powierzchniowa – Surface	–0,49***	–0,71***	–
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–	–	–0,31*
	Podglebie – Subsoil	–	–	–
Haplic Phaeozem	Powierzchniowa – Surface	–0,64***	–0,62***	–0,48**
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–	–	–
	Podglebie – Subsoil	–0,51***	–0,35*	–
Zestawienie łączne (n = 315) Total combination (n = 315)	Powierzchniowa – Surface			
	Podpowierzchniowa – Subsurface	–0,31***	–0,31****	–
	Podglebie – Subsoil	–0,21***	–0,17**	–
		–0,16*	–	–

– brak istotnych różnic – non-significant differences, * – współczynnik R wraz z istotnymi różnicami przy $p<0,05$, **$p<0,01$, ***$p<0,001$ – *R coefficient with significant differences at $p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

W warstwie powierzchniowej *Mollic Glyesol* stwierdzono istotny wpływ Eh_7 na *DHA*. W poziomie podpowierzchniowym *DHA* zależała głównie od *pF* oraz w niewiele mniejszym stopniu od *ODR*. Równie silny efekt *pF* znalazł odzwierciedlenie w poziomie *DHA* notowanym w podglebiu, podczas gdy *ODR* w nieco mniejszym, lecz istotnym stopniu kształtował analizowaną aktywność w tej części profilu glebowego ($p<0,01$).

W wszystkich trzech warstwach warstwach profilu glebowego *Eutric Fluvisol* *DHA* pozostawała w ujemnej korelacji z *pF* i Eh_7.

DHA w warstwach powierzchniowych gleb *Rendzina Leptosol* w największym stopniu zależna była odpowiednio od Eh_7, *ODR* oraz *pF*. W warstwach podpowierzchniowych, zdecydowanie to *pF* znacząco warunkował *DHA* ($p<0,001$) w tym typie gleb.

W poziomach powierzchniowych gleb *Eutric Histosol* *DHA* wykazała statystycznie istotną zależność od większości omawianych parametrów aeracyjnych (poza Eh_7). Niemniej jednak, spośród nich dał się zauważyć największy wpływ *ODR*. Również statystycznie istotny, okazał się wpływ potencjału wody glebowej.

Silny wpływ *pF* i *ODR* na wartości *DHA*, został statystycznie potwierdzony w warstwach powierzchniowych oraz podglebiu *Haplic Phaeozem*.

6.5. Zależność liczebności mikroorganizmów od parametrów fizyko-chemicznych gleb

Przeanalizowano wpływ czynników aeracyjnych, warunkujących bytowanie drobnoustrojów w danym środowisku glebowym, na ich liczebność. Prezentowane wyniki dotyczą całego zakresu bieżącego doświadczenia, a więc *pF* 0-3,2 (n = 63). Otrzymane rezultaty umieszczono w tabeli 10.

Istnienie znaczącej współzależności ($p<0,05$) dodatniej zaznaczono za pomocą „+", ujemnej „– ', zaś nieistotny statystycznie wpływ oznaczono jako „ns". Umieszczenie wartości *pF* przy znaku „+" lub „–" wskazuje na występowanie wspomnianych korelacji tylko przy konkretnej wartości potencjału wody glebowej. Wykazano, iż każdy z omawianych parametrów wpływa na liczebność mikroorganizmów glebowych.

Mikrodyfuzja tlenu (*ODR*) warunkowała ogólną liczebność bakterii i promieniowców w całym zakresie *pF*, zaś w przypadku bakterii nitryfikacyjnych i grzybów jej wpływ uwidocznił się przy najwyższych wartościach potencjału wody glebowej – *pF* 3,2. Nie obserwowano natomiast istotnej współzależności między *ODR* a NPL bakterii amonifikacyjnych.

Stan natlenienie podłoża, wyrażony poprzez Eh_7 znacząco warunkował liczebność bakterii amonifikacyjnych, wpływał na rozwój nitryfikatorów i promieniowców (przy *pF* 1,5), podczas gdy nie wywierał istotnego efektu na ogólną liczebność bakterii oraz grzybów.

Potencjał wody glebowej (*pF*) znacząco modyfikował rozwój jedynie ogólnej liczby drobnoustrojów i populacji bakterii amonifikacyjnych.

Tabela 10. Różnice istotne statystycznie pomiędzy liczebnością ogólną bakterii, amonifikatorów, nitryfikatorów, promieniowców i grzybów a parametrami fizykochemicznymi i biologicznymi (n = 63 lub n = 21– tylko przy określonym *pF*)
Table 10. Statistical significance of differences between total numbers of bacteria, AOB, nitrifiers bacteria, *Actinomycetes* and fungi abundance and physicochemical and biological paremeters (n = 63 or n = 21 at a proper *pF* only)

Liczebność mikroorganizmów – Abundance of microorganisms	*pF*	*ODR*	Eh_7	*DHA*	*%C*
Ogólna liczba bakterii – Total number of bacteria	–	+	n.s.	– (pF 1,5)	– (pF0, 1,5)
Amonifikatory – AOB	–	n.s.	– (pF 0, 1,5)	+ (pF 3,2)	– (pF 0)
Nitryfikatory Nitrifying bacteria	n.s.	+ (pF 3,2)	– (pF 1,5)	+ (pF 1,5)	– (pF 1,5)
Promieniowce *Actinomycetes*	n.s.	+ (pF 0, 1,5) – (pF 3,2)	– (pF 0, 1,5)	– (pF 3,2)	– (pF 0, 1,5)
Grzyby Fungi	n.s.	+ (pF 3,2)	n.s.	n.s.	n.s.

– korelacja ujemna – nagative correlation,
+ korelacja dodatnia ujemna – positive correlation,
n.s. różnice nieistotne statystycznie – n.s. non-significant differences.

Ponadto wykazano współzależność *DHA* z liczebnością grup mikroorganizmów glebowych (poza grzybami) przy potencjale wody *pF* 1,5 oraz 3,2. Korelacji nie

obserwowano przy maksymalnym wysyceniu gleb wodą (*pF* 0). W przypadku NPL bakterii amonifikacyjnych najsilniejsza pozytywna korelacja (R = 0,94*) z *DHA* wystąpiła przy *pF* 3,2 (n = 21, $p<0,05$). Podobną zależność zanotowano pomiędzy NPL nitryfikatorów (R = 0,55*, $p<0,05$), zaś promieniowce w warunkach *pF* 3,2 wykazały negatywną korelację z *DHA* (R = –0,51*, $p<0,05$).

Materia organiczna (% C) pozostawała na niskim poziomie w każdej z gleb w których oznaczano liczebność drobnoustrojów (tab. 6), stąd nie wywierała znaczącego wpływu na populację grzybów, zaś w przypadku NPL bakterii amonifikacyjnych istotna, ujemna zależność została zanotowana w warunkach pełnej pojemności gleb (*pF* 0), a także w warunkach *pF* 1,5.

7. DYSKUSJA

Liczne prace z ostatnich lat wskazują na zainteresowanie zmianami *DHA* w środowisku glebowym, związanymi z zanieczyszczeniem gleb metalami ciężkimi (Stuczyński i in. 2003, Stępniewska i Wolińska 2004 i 2005, Malley i in. 2006, Chaperon i Sauve 2007), pestycydami (Pandey i Singh 2006, Cai i in. 2007b, Moreno i in. 2007, Stępniewska i in. 2007), czy policyklicznymi węglowodorami aromatycznymi (Benitez i in. 2004, Kaimi i in. 2006, Achuba i Peretiemo-Clarke 2008).

Dehydrogenazy postrzegane są jako indykator odzwierciedlający stopień zanieczyszczenia środowiska glebowego (Alef i Nannipieri 1995, Paul i Clark, 2000, Shen i in. 2005, Achuba i Peretiemo-Clarke 2008), bądź wskaźnik świadczący o jego żyzności (Nannipieri i in. 1996, Koper i in. 2004).

Przede wszystkim jednak dehydrogenazy, będące enzymami wyłącznie wewnątrzkomórkowymi świadczą o intensywności metabolizmu oddechowego populacji drobnoustrojów (Praveen-Kumar i Tarafdar 2003), co sprawia, że są traktowane jako swoisty indykator, określający całkowitą aktywność mikrobiologiczną gleby (Nannipieri i in. 2003, Praven-Kumar i Tarafdar 2003, Brzezińska 2006, Moreno i in. 2007, Piotrowska-Cyplik i in. 2007).

Retencjonowanie wody

Głównym czynnikiem determinującym różnicowanie się pozostałych parametrów aeracyjnych w bieżącym eksperymencie był *pF*. Badane gleby różniła zdolność do zatrzymywania wody, stąd pełna pojemność wodna (*pF* 0), oscylowała w szerokim zakresie zawartości wody od 42% do 16% v/v, zaś punkt *pF* 3,2 uznawany jako granica wody łatwo dostępnej, odpowiadał ilości retencjonowanej wody na poziomie 15-4% v/v (wyjątek stanowiły mady rzeczne, zdolne do zatrzymania

nawet 20% v/v wody przy *pF* 3,2). Stwierdzono, że największą zdolność spośród wszystkich analizowanych typów gleb (rys. 9) do zatrzymywania wody, wykazywały gleby murszowe (43-11% v/v), rędziny (43-13% v/v) i czarnoziemy (42-20% v/v), zaś najmniejszą gleby brunatne (18-9% v/v) oraz bielicowe (16-5% v/v).

Wysoką zdolność retencyjną gleb murszowych (46-5% v/v), obserwowali też Walczak i in. (2001a), którzy łączyli ten fakt z posiadaniem przez ten typ gleby wystarczającej ilości porów średnich, w których to retencjonowana jest woda użyteczna dla roślin i drobnoustrojów glebowych. Ponadto Walczak i in. (2001b) obserwowali równie dużą zdolność retencyjną w czarnych ziemiach, wahającą się w granicach 44-13% v/v (*pF* 0-4,2). Włodarczyk i Witkowska-Walczak (2006) opisały wysoką efektywność w utrzymywaniu wody (52-45% v/v) przez gleby murszaste przy *pF* 0, stwierdzając jednocześnie, iż względnie dobre warunki wodne dla wzrostu i rozwoju roślin występują jedynie w warstwie powierzchniowej tych gleb, gdzie ilość wody łatwo dostępnej dla roślin i mikroorganizmów wynosi 10-15% v/v.

Mikrodyfuzja tlenu

ODR istotnie korelował z *pF* w każdej z trzech analizowanych głębokości (rys. 10). Dostępność tlenu w zakresie *pF* 0-3,2 wahała się w granicach 3-120 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Najniższe wartości *ODR* stwierdzono przy pełnym wysyceniu gleb wodą (*pF* 0), zaś maksimum jego dostępności występowało wraz z poprawą warunków aeracyjnych gleb przy *pF* 3,2.

Podobną tendencję wzrostu mikrodyfuzji tlenu wraz ze zwiększaniem się wartości *pF* notowali Stępniewski i in. (2000b) oraz Feng i in. (2002). Brzezińska i in. (1998) obserwowali dostępność tlenu w glebach, wahającą się w przedziale 0,5-80 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, podczas gdy badania Stępniewskiego i in. (2000b) określają zakres *ODR* zmierzony w glebach węgierskich (*Fluvic Gleysol*, *Vertic Gleysol*, *Orthic Solonetz*) na 0,5-64 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. Stępniewska i in. (2004) prowadząc doświadczenia w zróżnicowanych warunkach ciśnienia ssącego gleb zaobserwowali, iż wartości *ODR* mogą zawierać się w przedziale od 0 do nawet 200 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Dane literaturowe podają, że poziom *ODR*, poniżej którego utrudniony jest optymalny wzrost korzeni roślin wynosi 35 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (Gliński i Stępniewski 1985, Stępniewski i in. 2002, Włodarczyk i in. 2008). Feng i in. (2002) określili ten poziom o wiele niżej na 20 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

Krytyczne wartości *ODR* < 35 μg $O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, wyznaczone w ramach bieżącego doświadczenia mieszczą się zatem w zakresie *pF* 0-1,5.

Potencjał oksydoredukcyjny

Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że gleba o prawidłowych stosunkach wodno-powietrznych wykazuje wartości potencjału oksydoredukcyjnego powyżej 300 mV (Stępniewski i in. 2000b, Mazurkiewicz 2002, Stępniewska i in. 2004, Brzezińska 2006). Oznaczane wartości *Eh* w glebie stanowią bowiem wypadkową wszystkich par redoks, występujących w ośrodku glebowym, tworząc tzw. potencjał mieszany (Stępniewska i in. 2001). Wartość tego wskaźnika zależy zatem w decydujący sposób od dostępności akceptorów elektronów (tlenu cząsteczkowego, azotanów, tlenków Mn i Fe), znajdującego się na szlaku przemian materii organicznej stanowiącej źródło elektronów. Istotnym warunkiem wspomnianych przemian jest żywotność mikroorganizmów, katalizujących na drodze enzymatycznej szeregu procesów utleniania i redukcji (Stępniewska i in. 2001).

Oznaczone w przedstawionej pracy wartości *Eh* ze względu na zmienność *pH*, skorygowano do Eh_7. W analizowanym zakresie wilgotności gleb (*pF* 0-3,2) kształtowały się one w przedziale 420-480 mV. Wykazano istnienie znaczącej korelacji między Eh_7 i *pF* (rys. 12). Zależność ta znalazła potwierdzenie w każdym z trzech analizowanych poziomów. Zmiany potencjału redoks w warstwie powierzchniowej całego zbioru analizowanych gleb dochodziły do 60 mV, co spowodowane było przejściem od pełnego wysyceniem gleb wodą (*pF* 0) do wartości *pF* 3,2.

Drew (1990) w swoich badaniach stwierdził, iż korzystne warunki dla rozwoju roślin zachodzą w zakresie *Eh* 200-750 mV. Obserwacje zaś Stępniewskiej i in. (2004) potwierdziły, iż potencjał redoks w dobrze natlenionych glebach mineralnych Polski zawiera się w przedziale 400-600 mV.

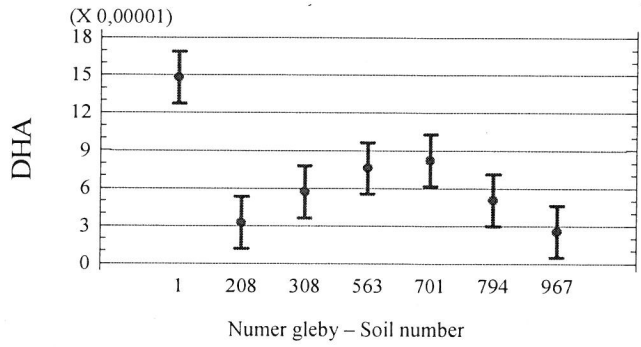
W badaniach Stępniewskiego i in. (2000b) wartości średnie *Eh* we wszystkich częściach profili gleb węgierskich pozostawały w zakresie 377-458 mV, przejawiając tendencję wzrostową przy wyższych wartościach *pF*, analogicznie jak obserwowano w niniejszym doświadczeniu. Doświadczenia Włodarczyk i Witkowskiej-Walczak (2006) wykazały, iż przedział *Eh*, występujący w glebach murszastych w zakresie *pF* 0-3,2, mieści się granicach 478-574 mV. Wyczerpywanie się akceptorów elektronów w wyniku niedostatku tlenu cząsteczkowego przy *Eh* około 400 mV powoduje redukcję azotanów (V), których zawartość w glebie wynosi na ogół od kilku do kilkudziesięciu $mg \cdot kg^{-1}$, zależnie od nawożenia mineralnego (Tiwari i in. 2002, Stępniewska i in. 2004). Wartość *Eh* pozostająca na poziomie 380 mV powoduje redukcję tlenków manganu do Mn^{+2}, zaś poniżej 300 mV ma miejsce redukcja tlenków żelaza (Stępniewska 1988, Mazurkiewicz 2002).

Należy zaznaczyć, że w żadnym z analizowanych w bieżącej pracy profili glebowych *Eh* nie spadło poniżej wartości 300 mV w trakcie inkubacji trwających

do momentu ustalenia się stanu równowagi przy *pF* 3,2 (20-25 dni), co stanowiłoby początek redukcji żelaza.

Aktywność dehydrogenazowa (*DHA*)

Pod względem *DHA* (rys. 27) gleba murszowa nr 1 różniła się istotnie od pozostałych gleb, wykazując najwyższą spośród nich aktywność enzymatyczną ($p<0,001$). Ponadto odnotowano znaczące różnice pomiędzy glebą bielicową nr 701, a czarną ziemią nr 208 i madą rzeczną nr 967. Różnice w *DHA* pomiędzy innymi przedstawicielami gleb nie były już znaczące ($p<0,05$).



Rys. 27. *DHA* (μg TPF·g^{-1}·min^{-1}) w warstwie powierzchniowej gleb reprezentujących poszczególne typy (n = 63). Objaśnienia jak na rysunku 9
Fig. 27. *DHA* (μg TPF g^{-1} min^{-1}) in surface layer of soils representing individual types (n = 63). Explanations as in Figure 9

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że *DHA* w ośrodku glebowym warunkowana jest poprzez szereg parametrów fizycznych (wilgotność, dostępność O_2, potencjał oksydoredukcyjny, głębokość profilu glebowego), a także biologicznych (liczebność mikroorganizmów glebowych). Wszystkie te komponenty wpływają na różnicowanie się aktywności enzymatycznej, stąd w ramach przedstawionej rozprawy uwzględniono wzajemne powiązania i interakcje jakie nieustannie zachodzą między nimi w środowisku glebowym.

***DHA* a głębokość w profilu glebowym**

Poziom *DHA* określony w powierzchniowych warstwach gleb istotnie przewyższał wartości notowane w warstwach głębszych ($p<0,001$), co niewątpliwie związane jest ze spadkiem aktywności drobnoustrojów glebowych i ich rozmieszczeniem przestrzennym w profilu glebowym. Wyniki uzyskane w ramach oma-

wianego eksperymentu potwierdzają spadek aktywności enzymatycznej nawet o 75% w warstwach podpowierzchniowych oraz o 83% w podglebiu.

Gliński i in. (2000) obserwowali wyższą o 70% *DHA* w warstwach powierzchniowych gleb węgierskich, aniżeli w głębszych poziomach profili glebowych. Brzezińska (2006) stwierdziła nawet 9-krotny wzrost *DHA* w materiale pobranym z powierzchniowych warstw gleb, aniżeli w warstwach podpowierzchniowych i aż 25-krotnie wyższą aktywność na powierzchni niż w podglebiu. Podobne zależności opisali Gliński i in. (2000), Stępniewski i in. (2000a), Taylor i in. (2002), Yang i in. (2005), Skawryło-Bednarz (2008).

Liczebność mikroorganizmów

Liczebność mikroorganizmów glebowych determinowana była głównie potencjałem wody glebowej. Większą liczbę drobnoustrojów stwierdzono przy pełnym wysyceniu gleb wodą (*pF* 0), po czym notowano sukcesywny spadek liczebności wraz ze wzrostem *pF*, gdy zachodził proces osuszania gleby. Badania Dąbek-Szreniawskiej i in. (2004), Rigobelo i Nahasa (2004), Furczak i Joniec (2007), Schimela i in. (2007) oraz Finlay'a i Esteban (2009) wskazywały na to, iż metabolizm drobnoustrojów glebowych jest ściśle uzależniony od stosunków wodno-powietrznych.

W bieżącej pracy najliczniejszą populację drobnoustrojów stwierdzono w czarnej ziemi nr 208, gdzie dochodziła ona do $21 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ s.m. gleby (*pF* 0). O połowę mniejszą liczebność obserwowano w czarnoziemie nr 794 ($11 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$), zaś w glebie brunatnej nr 308 dochodziła ona do $8 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$ s.m. W pozostałych glebach ogólna liczba mikroorganizmów nie przekraczała poziomu $5 \cdot 10^6 \cdot g^{-1}$. Uzyskane wyniki potwierdziły wysoką aktywność biologiczną analizowanych gleb, pomimo stosunkowo długiego okresu ich przechowywania w zasobach Banku. 10-dniowa preinkubacja z nieograniczonym dostępem wody wystarczyła do odrodzenia się życia biologicznego w próbach glebowych. Notowane wartości liczebności mikroorganizmów pozostają na poziomie liczebności drobnoustrojów stwierdzanym przez innych badaczy w materiale świeżo pobranym z terenu, a niejednokrotnie nawet przewyższającym ten poziom. Song i in. (2008) oraz Gleeson i in. (2008) dowiedli, iż populacja drobnoustrojów utleniających amoniak (AOB) dobrze adaptuje się do stresów zarówno wodnych jak i tlenowych i jest w stanie namnażać się w ciągu kilku minut po zalaniu gleb wodą. Może to stanowić wytłumaczenie tak dużej liczebności i aktywności tych mikroorganizmów w analizowanym materiale glebowym, który przechowywany był w stanie powietrznie suchym, a mimo to wykazywał znaczącą *DHA*. Szybka adaptacja bakterii szlaku azotowego w warunkach za-

lania gleb podkreślona została w pracach Dąbek-Szreniawskiej i in. (2004), Martyniuka i in. (2007) oraz Piotrowskiej-Cyplik i in. (2007). Dąbek-Szreniawska i in. (1996) oznaczyła liczebność drobnoustrojów w nienawożonych rędzinach i glebach brunatnych (34,7-19,2·10^6·g^{-1}). Jezierska-Tys (2004) notowała poziom liczebności bakterii na poziomie 60·10^6·g^{-1} w glebie płowej, zaś Wyczółkowski i in. (2006) określili ogólną liczebność mikroorganizmów w tym samym typie gleby na 5-30·10^6·g^{-1}. Taok i in. (2007) w glebach kompostowych szacowali ogólną liczebność mikroorganizmów na około 580·10^3 g^{-1} gleby.

Bakterie amonifikacyjne, analogicznie jak pozostałe bakterie glebowe, preferowały wilgotne środowiska, stąd maksimum liczebności występowało przy *pF* 0, zaś ich istotny spadek notowano przy *pF* 1,5 i *pF* 3,2. Największą liczbę bakterii amonifikacyjnych wykazano w rędzinie nr 563, gdzie dochodziła ona do 11·10^5·g^{-1}. Dąbek-Szreniawska i in. (1996) określili również w rędzinie występowanie NPL amonifikatorów na 30·10^6·g^{-1}, co było o ponad 270% większym wynikiem, aniżeli liczebność bakterii amonifikacyjnych przedstawiona w omawianej pracy. Ta sama autorka (Dąbek-Szreniawska, 2004) wyznaczyła ich ilość w glebie płowej na 214·10^3·g^{-1}. Martyniuk i in. (2007) w glebie pod uprawą pszenicy ozimej obserwowali liczebność bakterii amonifikacyjnych obejmujący zakres 7,8·10^6·g^{-1}-480·10^3·g^{-1}, w zależności od terminu pobrania (czerwiec-wrzesień).

Oznaczana w ramach bieżącej pracy liczebność bakterii nitryfikacyjnych w porównaniu z bakteriami amonifikacyjnymi pozostawała na wysokim poziomie 20·10^4·g^{-1} jedynie w rędzinie nr 563 oraz czarnej ziemi nr 208, zaś w pozostałych typach gleb dochodziła do wartości 7·10^4·g^{-1} gleby. Szostak i in. (2005) podkreślili, iż niższa liczebność nitryfikatorów w stosunku do bakterii amonifikacyjnych jest korzystna ze względów środowiskowych. Powstały bowiem w procesie nitryfikacji azot azotanowy jest składnikiem mniej stabilnym aniżeli azot amonowy. Nadmiar zaś azotanów w glebie prowadzi do nadmiernego gromadzenia NO_3^- w roślinach, co stanowi niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzi i zwierząt (Kobus 1996).

Grzyby i promieniowce również nie wykazywały istotnych zmian w liczebności w badanym zakresie potencjału wody glebowej. Stanowiły ponadto najmniej liczebną populację spośród oznaczanych w pracy mikroorganizmów. Promieniowce występowały najliczniej w glebie brunatnej nr 308 (37·10^4·g^{-1}), podczas gdy w innych typach gleb nie przekraczały liczby 5·10^4·g^{-1} (rys. 24). Liczebność grzybów dochodziła do 5,5·10^3·g^{-1} jedynie w czarnej ziemi nr 208, zaś w pozostałych glebach zawartość ich oscylowała w granicach 0,1-1,2·10^3·g^{-1} (rys. 26). Niska liczebność grzybów w stosunku do bakterii wg Kobusa (1996) jest zjawiskiem korzystnym, ponieważ grzyby powodują wydzielanie związków toksycznych, szko-

dliwych dla środowiska. McLean i Huhta (2000) wykazali wzrost zróżnicowania gatunkowego i ilościowego populacji grzybów wraz z postępującym osuszaniem środowiska glebowego. Podobne badania prowadzone były przez Wilkinsona i in. (2002), oraz Schimela i in. (2007). Gleba brunatna nr 308, czarna ziemia nr 208 oraz rędzina nr 563, różniły się znacząco ($p<0,05$) od innych gleb, biorąc pod uwagę oznaczaną liczebność mikroorganizmów glebowych. W tabeli 11 przedstawiono różnice, jakie stwierdzono we wspomnianych typach gleb.

Tabela 11. Statystycznie istotne różnice w liczebności mikroorganizmów glebowych pomiędzy glebą brunatną (nr 308), czarną ziemią (nr 208) i rędziną (nr 563), n = 21, $p<0,05$
Table 11. Statistically significant differences in microorganisms abundance between *Eutric Cambsol* (No. 308), *Mollic Gleysol* (No. 208) and *Rendzina Leptosol* (No. 563), n = 21, $p<0.05$

Typ gleby Soil type	Ogólna liczba bakterii Total number of bacteria	NPL Amonifikatorów MPN of AOB	NPL Nitryfikatorów MPN of nitrifiers	Liczebność Grzybów Fungi abundance	Liczebność promieniowców *Actinomycetes* abundance
Brunatna 308 – *Eutric Cambisol* 308		+	+		+
Czarna ziemia 208 *Mollic Gleysol* 208	+		+	+	
Rędzina 563 *Rendzina Leptosol* 563		+	+		

Znak „+" oznacza, że dana gleba istotnie różni się od pozostałych typów gleb pod względem liczebności konkretnej grupy mikroorganizmów. Inne gleby (bielica nr 701, mada rzeczna nr 967, czarnoziem nr 794, murszowa nr 1) stanowiły jednorodną grupę, biorąc pod uwagę liczebność drobnoustrojów glebowych określoną przy wartościach *pF* (0; 1,5; 3,2).

Wpływ parametrów aeracyjnych (*pF*, *ODR*, *Eh*) na *DHA*

W przeprowadzonych badaniach szczególną uwagę poświęcono *DHA*, jako że stanowi ona odzwierciedlenie aktywności mikroflory glebowej. Stwierdzono, iż dehydrogenazy glebowe wykazują silną zależność ($p<0,05$) od wilgotności środowiska glebowego. Notowano bowiem wyższą *DHA* przy *pF* 0, a następnie wraz z postępującym procesem osuszania gleb aktywność enzymatyczna ulegała stopniowemu obniżeniu, stąd przy *pF* 3,2 oznaczano już niższy średnio o 40-85% poziom *DHA*.

Brzezińska i in. (1998) oraz Gliński i in. (2000) obserwowali analogiczną tendencję zmian *DHA*, wykazującą wyższy poziom przy pełnym wysyceniu gleb wodą, a następnie ulegającą stopniowemu spadkowi wraz ze wzrostem potencjału wody glebowej. Podobne obserwacje notował też Stępniewski i in. (2000a), badając szereg profili gleb środkowej Europy. Brzezińska i in. (2001a b) oraz Lee i in. (2002), obserwowali średnio 5-6 razy wyższą *DHA* w warunkach pełnego zalania gleb wodą, aniżeli w środowiskach suchszych.

Uzyskane wyniki wykazują również, iż istnieje znacząca ujemna korelacja *DHA* - *ODR* w warstwie powierzchniowej badanych profili glebowych (n = 315). Stępniewski i in. (2000a) podobną zależność w 6 typach gleb węgierskich opisali współczynnikiem R = –0,27***, natomiast Brzezińska i in. (2001a) wyznaczyli R = –0,63* w glebach *Orthic Luvisols*.

Wyższe wartości *DHA* notowano przy niskim poziomie dostępności tlenu dla mikroorganizmów glebowych (3-25 $\mu g\ O_2 \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$), który odpowiadał zakresowi *pF* 0-1,5, a więc wilgotnościom poniżej których stwierdzono krytyczną wartość *ODR*. Gliński i in. (1986), Brzezińska i in. (1998) oraz Stępniewski i in. (2005) obserwowali wzrost *DHA* poniżej wartości *ODR* 15 $\mu g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.

W omawianej pracy nie wykazano istnienia bezpośredniej zależności Eh_7 – *DHA* analizując dane z całego zbioru gleb (n = 315). Przeprowadzono zatem analizy statystyczne dla poszczególnych typów gleb, w wyniku których stwierdzono istotną ujemną zależność *DHA* od Eh_7 w warstwie powierzchniowej (n = 45) czarnych ziem, mad rzecznych, rędzin oraz czarnoziemów, gdzie współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio: R = –0,78***, –0,43*, –0,47** i –0,48.

Ujemne korelacje między *Eh* i *DHA* opisywane były również w pracach Brzezińskiej i in. (1998) – R = –0,75***; –0,83***, –0,87*** (odpowiednio dla temperatury 10, 20 i 30°C), Stępniewskiego i in. (2000a),Włodarczyk i in. (2002) oraz Nayak i in. (2007). Brzezińska i in. (1998) dowiedli ponadto, iż głównym czynnikiem determinującym poziom *DHA* jest stan aeracyjny gleby, a w szcze-

gólności jej potencjał oksydoredukcyjny. Podobne wnioski pojawiły się też w pracy Włodarczyk i in. (2001) oraz Menona i in. (2005).

Zależność *DHA* od liczebności mikroorganizmów

W przeprowadzonym doświadczeniu trudno było stwierdzić bezpośrednią i istotną korelację między *DHA* a liczebnością drobnoustrojów glebowych, rozpatrując cały zbiór gleb (n = 63). Bieżące badania pokazały, iż gleby wykazujące najwyższy poziom *DHA* (murszowa nr 1, bielicowa nr 701, rędzina 563) pod względem liczebności mikroorganizmów zaliczone zostały do najmniej licznych, zaś charakteryzująca się najwyższą liczebnością bakterii – czarna ziemia nr 208 należała do gleb mało aktywnych enzymatycznie. Wykazaną negatywną korelację *DHA* - ogólna liczba bakterii, można tłumaczyć różnorodnością gatunkową mikroorganizmów zdolnych do wzrostu na podłożu agaru ogólnego, które niekoniecznie preferują TTC jako akceptor elektronów, stąd nie wykazują wpływu na *DHA*, a ponadto ich kolonie w momencie oznaczenia mogą znajdować się w stadium nieaktywnym (Praveen-Kumar i Tarafdar 2003).

Brak istotnej zależności pomiędzy liczebnością mikroorganizmów występujących w glebach a *DHA* notowany był również przez Kamaludeena i in. (2003), Rigobelo i Nahasa (2004) oraz Piotrowską-Cyplik i in. (2007). Piotrowska-Cyplik i Cyplik (2008) nie znajdując jakiejkolwiek korelacji pomiędzy oznaczeniem ogólnej liczby mikroorganizmów metodą tradycyjną – płytkową a pomiarem *DHA* wnioskowali, że określenie ogólnej liczby mikroorganizmów nie daje pełnej informacji na temat stanu fizjologicznego flory gleby, podobnie jak oznaczenie *DHA* nie prezentuje pełnego obrazu aktywności mikrobiologicznej.

Otrzymane wyniki są trudne w interpretacji a dane literaturowe nie są jednoznaczne. Garcia-Gil i in. (2000) zauważyli korelację między biomasą mikroorganizmów a *DHA* ($R^2 = 0,88$*), natomiast w pracy Nayak i in. (2007) podobna współzależność opisana została jako R = 0,45*. Baskar i in. (2003) oraz Praveen-Kumar i Tarafdar (2003) obserwowali wyższą *DHA* w glebach o dużej liczebności bakterii, jednakże nie opisali tej współzależności matematycznie. Furczak i Joniec (2007) notowały pozytywne korelacje (od 0,69* do 0,75***), między liczebnością bakterii oligotroficznych, makrotroficznych, celulolitycznych a *DHA*.

8. WNIOSKI

Przeprowadzone badania dotyczące *DHA* mikroorganizmów glebowych, wyznaczanej podczas procesu osuszania gleb i związanych z tym zmian stanu aeracji środowiska glebowego pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. *DHA* traktowana zwykle jako test żywotności gleby warunkowana jest w sposób istotny statystycznie przez:
   - *pF* ($p<0,05$),
   - *ODR* (R = –0,31*),
   - *Eh* (R = –0,43*do –0,78***),

wykazując ujemne korelacje z każdym z wymienionych parametrów aeracyjnych.

2. Liczebność mikroorganizmów glebowych podczas procesu reoksydacji zależy w sposób statystycznie istotny od:
   - *pF* ($p<0,05$ dot. ogólnej liczby bakterii oraz NPL bakterii amonifikacyjnych),
   - *ODR* (R = 0,51* do 0,86***) za wyjątkiem NPL bakterii amonifikacyjnych,
   - *Eh* (R = –0,48* do 0,77***) za wyjątkiem populacji grzybów,

wykazując ujemne współzależności z *pF* oraz *Eh*, zaś dodatnią z *ODR*.

3. Bezpośrednia istotna korelacja liczebności mikroorganizmów glebowych z *DHA* wystąpiła w warunkach wilgotności odpowiadajacej silnemu hamowaniu wzrostu roślin (*pF* 3,2) i dotyczyła:
   - bakterii amonifikacyjnych (R = 0,94***),
   - bakterii nitryfikacyjnych (R = 0,55*),
   - promieniowców (R = –0,51*)

Wspomniana zależność była dodatnia w przypadku NPL bakterii amonifikacyjnych i nitryfikacyjnych, zaś ujemna w przypadku liczebności promieniowców, na co wskazują przypisane współczynniki korelacji (R).

4. Zrealizowane badania potwierdziły postawioną hipotezę odnośnie *DHA* jako indykatora stanu natlenienia gleb w całym analizowanym zakresie potencjału wody glebowej (*pF* 0-*pF* 3,2). *DHA* osiągała bowiem najwyższe wartości przy pełnej pojemności gleb (*pF* 0) zaś wraz z osuszaniem środowiska glebowego do *pF* 3,2 poziom jej aktywności sukcesywnie ulegał obniżeniu.

9. PIŚMIENNICTWO

Aceves M.B., Velasquez R.O., Vazquez R.R., 2007. Effect of Cr^{3+}, Cr^{6+} and tannery sludge on C and N mineralization and microbial activity in semi-arid soils. J. Hazard. Mater., 143, 522-531.

Achuba F.I., Peretiemo-Clarke B.O., 2008. Effect of spent engine oil on soil catalase and dehydrogenase activities. Int. Agrophysics, 22, 1-4.

Acosta-Martinez V., Mikha M.M., Vigil M.F., 2007. Microbial communities and enzyme activities in soils dunder alternative crop rotations compared to wheat-fallow for the Central Great Plains. Appl. Soil Ecol., 37, 41-52.

Agnelli A., Ascher J., Corti G., Ceccherini M.T., Nannipieri P., Pietramellara G., 2004. Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. Soil Biol. Biochem., 36, 859-868.

Ajwa H.A., Dell C.J., Rice C.W., 1999. Changes in enzyme activities and microbial biomass of tallgrass praire soil as related to burning and nitrogen fertilization. Soil Biol. Biochem., 31, 769-777.

Alef K., Nannipieri P., 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London.

Aon M.A., Cabello M.N., Sarena D.E., Colaneri A.C., Franco M.G., Burgos J.L., Cortassa S., 2001. Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. Appl. Soil Ecol., 18, 239-254.

Atlas R.M., Bartha R., 1998. Microbial Ecology, fundamentals and applications. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., USA.

Ball P., 2007. Bacteria may be wiring up the soil. Nature, 449, 388.

Baran S., Bielińska J.E., Oleszczuk P., 2004. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. Geoderma, 118, 221-232.

Barabasz W., Voriseck K., 2001., Wpływ mineralnego nawożenia N na aktywność mikrobiologiczną gleb górskich ekosystemów trawiastych. Drobnoustroje środowiska glebowego. Wydawnictwo Adam Marszalek, Toruń, Poland.

Barros N., Gomez-Orellana I., Feijoo S., Balsa R. 1995., The effect of soil moisture on soil microbial activity studied by microcalorimetry. Thermochim. Acta, 249, 161-168.

Baskar S., Baskar R., Kaushik A., 2003. Role of micro-organisms in weathering of the Konkan-Goa laterite formations. Curr. Sci., 85 (8), 1129-1134.

Bastida F., Moreno J.L., Hernandez T., Garcia C., 2006. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. Soil Biol. Biochem., 38, 2503-2507.

Bednarek R., Dziadowiec H., Pokojska U., Prusinkiewicz Z., 2005. Badania ekologiczno-gleboznawcze. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poland.

Bennicelli R.P., 2002. Indukcja systemu obronnego u pszenicy i pszenżyta w warunkach stresu tlenowego.Acta Agrophysica, 75.

Bennicelli R.P., Stępniewska Z., Balakhina T.I., Stępniewski W., Żuchowski J., 1999. Effect of soil reoxidation on wheat (*Triticum aestivum L.*) defense system. Int. Agrophysics, 13, 309-314.

Benitez E., Melgar R., Nogales R., 2004. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. Soil Biol. Biochem., 36, 1615-1623.

Bieganowski A., 2005. Metrologiczne aspekty wyznaczania potencjalnej gęstości strumienia tlenu w glebie. Acta Agrophysica, 118.

Blume E., Bischoff M., Reichert J.M., Moorman T., Konopka A., Turco R.F,. 2002. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. Appl. Soil Ecol., 20, 171-181.

Bohrerova Z., StralkovaR., Podesvova J., Bohrer G., Pokorny E., 2004. The relationship between redox potential and nitrification under different sequences of crop rotations. Soil Tillage Res., 77, 25-33.

Bolton H., Jr., Smith J.L., Link S.O., 1993. Soil microbial biomass and activity of a disturbed and undisturbed shrub-steppe ecosystem. Soil Biol. Biochem., 25 (5), 545-552.

Brune A., Frenzel P.. Cypionka H., 2000. Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. FEMS Microbiol. Rev., 24, 691-710.

Brzezińska M., 2002. Significance of soil enzymes in nutrient transformations. Acta Agrophysica, 63, 5-23.

Brzezińska M., 2006. Aktywność biologiczna oraz procesy jej towarzyszące w glebach organicznych nawadnianych oczyszczonymi ściekami miejskimi. Acta Agrophysica, 131.

Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., Pasztelan M., 2000. Dehydrogenase and catalase activity in *Eutric Histosol* as affected by soil temperature and water content. Acta Agrophysica, 35, 31-40.

Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., 1998. Soil oxygen status and dehydrogenase activity. Soil Biol. Biochem., 30 (13), 1783-1790.

Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., 2001a. Dehydrogenase and catalase activity of soil irrigated with municipal wastewater. Pol. J. Environ. Stud., 10 (5), 307-311.

Brzezińska M., Stępniewska Z., Stępniewski W., WłodarczykK T., Przywara G., Bennicelli R., 2001b. Effect of oxygen defficiency on soil dehydrogenase activity (pot experiment with barley). Int. Agrophysics, 15, 3-7.

Brzezińska M., Włodarczyk T., Stępniewski W., Przywara G., 2005. Soil oxygen status and catalase activity. Acta Agrophysica, 5 (3), 555-565.

Cai P., Huang Q., Chen W., Zhang D., Wang K., Jiang D., Liang W., 2007a. Soil colloids bound plasmid DNA: effect on transformation of *E. coli* and resistance to DNase degradation. Soil Biol. Biochem., 39, 1007-1013.

Cai X., Sheng G., Liu W., 2007b. Degradation and detoxification of acetochlor in soils treated by organic and thiosulfate amendments. Chemosphere, 66, 286-292.

Carrasco L., Caravaca F., Alvarez-Rogel J., Roldan A., 2006. Microbial processes in the rhizosphere soil of a heavy metals-contaminated Mediterranean salt marsh: A facilitating role of AM fungi. Chemosphere, 64, 104-111.

Casida L.E., Klein D.A., Santoro T. 1964. Soil dehydrogenase activity. Soil Science, 98, 371-376.,

Cela S., Sumner M.E., 2002. Critical concentrations of copper, nickel, lead, and cadmium in soils based on nitrification. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 33, 19-30.

Chaperon S., Sauve S., 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. Soil Biol. Biochem., 39, 2329-2338.

Chendryan K., Adhya T.K., Sethutnathan N., 1980. Dehydrogenase and invertase activities of flooded soils. Soil Biol. Biochem.,12, 271-275.

Chuang H.P., Imachi H., Tandukar M., Kawakami S., Harada H., Ohashi A., 2007. Microbial community that catalyzes partial nitrification at low oxygen atmosphere as revealed by 16S rRNA and *amo*A genes. J. Biosci. Bioeng., 104 (6), 525-528.

Czyż E., 2004. Effects of traffic on soil aeration, bulk density and growth of spring barley. Soil Tillage Res., 79, 153-166.

Dance A., 2008. What lies beneath. Nature, 455 (9), 724-725.

Das J., Dangar T.K., 2008. Microbial population dynamics, especially stress tolerant *Bacillus thuringiensis*, in partially anaerobic rice field soils during post-harvest period of the Himalayan, island, brackish water and coastal habitats of India. World J. Microbiol. Biotechnol., 24, 1403-1410.

Dąbek-Szreniawska M., Kozak M.A., Pudło A.A., 2004. Liczebność bakterii i aktywność biochemiczna gleby torfowej i murszowej. Annales UMCS, Sec. E., 59 (4), 2023-2032.

Dąbek-Szreniawska M., Wyczółkowski A., Józefaciuk B., Księżpolska A., Szymona J., Stawiński J., 1996. Relations between soil structure, number of selected groups of soil microorganisms, organic matter content and cultivation system. Int. Agrophysics, 10, 31-35.

Dell'Anno A., Danovaro R., 2005. Extracellular DNA plays a key role in deep sea ecosystem functioning. Science, 139, 2179-2185.

De Mora A.P., Ortega-Calvo J.J., Cabrera F., Madejon E., 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after "in situ" remediation of a heavy metal –contaminated soil. Appl. Soil Ecology, 28, 125-137.

Dexter A.R., 2004. Soil physical quality. Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. Geoderma, 120, 201-214.

Dick W.A., Tabatabai M.A., 1992. Significance and potential use of soils enzymes. In: Application and Environmental Management. Marcel Dekker, New York, 99-110.

Drew C., 1990. Sensing soil oxygen. Plant Cell Environ., 13, 681-693.

Engelaar W.M.H.G., Yoneyama T., 2000. Combined effects of soil waterlogging and compaction on rice (*Oryza sativa* L.) growth, soil aeration, soil N transformation and N discrimination. Biol. Fertil. Soils, 32, 484-493.

Feng G., Wu L., Letey J., 2002. Evaluating aeration criteria by simultaneous measurement of oxygen diffusion rate and soil-water regime. Soil Science, 167 (8), 495-503.

Fernandez P., Sommer I., Cram S., Rosas I., Guteirrez M., 2005.The influence of water-soluble As(III) and As(V) on dehydrogenase activity in soils affected by mine tilings. Sci. Total Environ., 348, 231-243.

Fierer N., Schimel J.P., Holden P.A., 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biol. Biochem., 35, 167-176.

Finlay B.J., Esteban G.F., 2009. Oxygen sensing drives predictable migrations on a microbial community. Environ. Microbiol., 11 (1), 81-85.

Fontaine S., Mariotti A., Abbadie L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition. Soil Biol. Biochem., 35, 837-843.

Frankenberger W.T., Dick W.A., 1983. Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. Soil Sci. Soc. Am. J., 47, 945-951.

Furczak J., 2006. Aktywność biochemiczna gleby płowej pod soją uprawianą w różnych systemach. Acta Agrophysica, 8(4), 815-824.

Furczak J., Joniec J., 2007. Preliminary study of sludge effect on soil microbial activity of a podzolic soil under willow culture. Int. Agrophysics, 21, 39-48.

Garcia-Gil J.C., Plaza C., Soler-Rovira P., Polo A., 2000. Long-term effects of municipal soil waste compost application on soil enzymes activities and microbial biomass. Soil Biol. Biochem., 32, 1907-1913.

Ghosh A.K., Bhattacharyya P., Pal R., 2004. Effect of arsenic contamination on microbial biomass and its activities in arsenic contaminated soils of Gangetic West Bengal, India. Environ. Int., 30, 491-499.

Gianfreda L., Bollag J.M., 1996. Enzyme activity in soil. Soil Biol. Biochem., 8, 123-192.

Gianfreda L., Rao M.A., Piotrowska A., Palumbo G., Colombo C., 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. Sci. Total Environ., 341, 265-279.

Gilles–Gonzalez M.A., Gonzalez G., 2005. Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. J Inorg. Biochem., 99, 1-22.

Gleeson D.B., Herrmann A.M., Livesley S.J, Murphy D.V., 2008. Influence of water potential on nitrification and structure of nitrifying bacterial communities in semiarid soils. Appl. Soil Ecol., 40, 189-194.

Gliński J., Józefaciuk G., Stahr K., 2004. Soil-Plant-Atmosphere Aeration and Environmental Problems. Institute of Agrophysics PAS, Lublin-Stuttgart.

Gliński J., Ostrowski J., Stępniewska Z., Stępniewski W., 1991. Bank Próbek Reprezentujących Gleby Mineralne Polski. Problemy Agrofizyki, 66.

Gliński J., Stępniewska Z., Brzezińska M., 1986. Characterization of the dehydrogenase and catalase activity of the soils of two natural sites with respect of the soil oxygenation status. Pol. J. Soil Sci., XIX/1-2, 47-52.

Gliński J., Stępniewska Z., Turski R., Bennicelli R., Wolińska A., Szafranek A., Charytoniuk P., 2002. Wybrane metody badań gleboznawczych. EKOKUL, Lublin.

Gliński J., Stępniewski W., 1985. Soil Aeration and Its Role for Plants. CRC, Bocca Raton.

Gliński J., Stępniewski W., Łabuda S., 1983. Pobieranie tlenu i wydzielanie dwutlenku węgla w środowisku glebowym. Problemy Agrofizyki, 44, 3-39.

Gliński J., Stępniewski W., Stępniewska Z., Włodarczyk T., Brzezińska M., 2000. Characteristics of aeration properties of selected soil profiles from Central Europe. Int. Agrophysics, 14, 17-31.

Goberna M., Sanchez J., Pascual J.A., Garcia C., 2006. Surface and subsurface organic carbon, microbial biomass and activity in a forest soil sequence. Soil Biol. Biochem., 38, 2233-2243.

Grabińska-Łoniewska A., 1996. Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, Poland.

Groenevelt P.H., Grant C.D., 2004. A new model for the soil-water retention curve that solves the problem of residual water contents? Eur. J. Soil Sci., 55, 479-485.

Hines M.E., 2006. Microbially mediated redox cycling at the oxic-anoxic boundary in sediments: comparison of animal and plants habitats. Water Air Soil Pollut., 6, 523-536.

Hinojosa M.B., Carreira J.A., Garcia-Ruiz R., Dick R.P., 2004. Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. Soil Biol. Biochem., 36, 1559-1568.

Holmstrup M., 2001. Sensitivity of life history parameters in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to small changes in soil water potential. Soil Biol. Biochem., 33, 1217-1223.

Horn R., 2002. Stress strain effects in structured unsaturated soils on coupled mechanical and hydraulical properties. Environ. Mech., Monte Verita, 59-68.

Irha N., Slet J., Petersell V., 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil accessed via dehydrogenase assay. Environ. Int., 28, 779-782.

Januszek K., 1993. Seasonal changes of enzyme activity in mor, moder and mull humus of selected forest soils in the Western Beskid Mountains. Folia Forest. Polonica, 35: 59-75.

Januszek K., Lasota J., 2001. Aktywność enzymatyczna gleb wybranych szkółek leśnych w Polsce południowej. Drobnoustroje środowiska glebowego. Wydawnictwo Adam Marszalek, Toruń, Poland.

Jezierska-Tys S., 2004. Aktywność respiracyjna i dehydrogenazowa oraz liczebność mikroorganizmów proteolitycznych w glebie zanieczyszczonej siarką i wzbogaconej osadem ścieków komunalnych. Acta Agrophysica, 3 (3).

Jezierska-Tys S., Frąc M., 2008. Microbiological indices of soil quality fertilized with dairy sewage sludge. Int. Agrophysics, 22, 215-219.

Kaimi E., Mukaidani T., Miyoshi S., Tamaki M., 2006. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. Environ. Exp. Bot., 55, 110-119.

Kamaludeen S.P.B., Megharaj M., Naidu R., Singleton I., Juhasz A.L., Hawke B.G., Sethuanathan N., 2003. Microbial activity and phospholid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil. Ecotoxicol. Environ. Saf., 56 (2), 302-310.

Kandeler E., Murer E., 1993. Aggregate stability and soil microbial processes in a soil with different cultivation. Geoderma, 56, 503-513.

Kasiak A., Kukier U., Stępniewska Z., 1986. Wpływ cynku, ołowiu i miedzi na aktywność dehydrogenazy i katalazy w glebie lessowej. Zeszyty Prob. Post. Nauk Rolniczych, 315, 95-103.

Kawasaki S., Ishikura J., Chiba D., Nishino T., NiimuraA Y., 2004. Purification and characterization of an H_2O-forming NADH oxidase from *Clostridium aminovalericum*: existence of an oxygen-detoxifying enzyme in an obligate anaerobic bacteria. Arch. Microbiol., 181, 324-330.

Kawasaki S., Watamura Y., Ono M., Watanabe T., TakedaK., Niimura Y., 2005. Adaptive response to oxygen stress in obligatory anaerobes *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium aminovalericum*. Appl. Environ. Microbiol., 71 (12), 8442-8450.

Kączkowski J., 1999. Podstawy biochemii. WNT Warszawa, Poland, 78-114.

Khan M.A.R., Bolan N.S., Mackay A.D., 2005. Soil test to predict the copper availability in pasture soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 36, 2601-2624.

Khan M., Scullion J., 2000. Effect of soil microbial responses to metal contamination. Environ. Pollut., 110, 115-125.

Kizilkaya R., Askin T., Bayrakli B., Saglam M., 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. Eur. J. Soil Biol., 40, 95-102.

Kobus J., 1996. Rola mikroorganizmów w przemianach azotu w glebie. Zeszyty Probl. Post. Nauk Rolniczych, 440, 151-173.

Koper J., Piotrowska A., Siwik-Ziomek A. 2004. Wartość enzymatycznego wskaźnika żyzności w zależności od zróżnicowanego zmianowania i nawożenia gleby. Zeszyty Prob. Post. nauk Rolniczych, 501, 219-225.

Koper J., PIiotrowska A., Siwik-Ziomek A., 2008. Aktywność dehydrogenaz i inwertazy w glebie rdzawej leśnej w okolicy zakładów azotowych Anwill we Włocławku. In: Proceedings of ECOpole, 2 (1), 197-202. Wydawnictwo Anwill Włocławek, Poland.

Kottler B.D.K., White J.C., Kelsey J.W., 2001. Influence of soil moisture on the sequestration of organic compounds in soil. Chemosphere, 42, 893-898.

Krzyśko-Łupicka T., 2008. Ekologiczne skutki działania herbicydu fosfoorganicznego na diazotrofy glebowe w okresie wiosennym. In: Proceedings of ECOpole, 2 (1), 209-213. Wydawnictwo Anwill Włocławek, Poland.

Kumar J.G., Sharma G.D., Mishra R.R., 1992. Soil microbial population number and enzyme activities in relation to altitude and forest degradation. Soil Biol. Biochem., 24, 761-767.

Kumpiene J., Guerri G., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G., 2009. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb and Cu-contaminated soil. Ecotoxicol. Environ. Saf., 72, 115-119.

Kunicki-Goldfinger W.J.H., 2008. Życie bakterii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poland.

Küsel K., Karnholz A., Trinkwalter T., Devereux R., Acker G., Drake H.L., 2001. Physiological ecology of *Clostridium glycolicum* RD-1, an aerotolerantacetogen isolated from sea grass roots. Appl. Environ. Microbiol., 67, 4734-4741.

Landi L., Renella G., Moreno J.L., Falchini L., Nannipieri P., 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, l-:d-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. Biol. Fertil. Soils, 32 (1), 8-16.

Lavahun M.F.E., Joergensen R.G., MeyerR B., 1996. Activity and biomass of soil microorganisms at different depths. Biol. Fertil. Soils, 23, 38-42.

Lee I.S., Kim O.K., Chang Y.Y., Bae B., Kim H.H., Baek K.H., 2002. Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from contaminated Korean shooting range. J. Biosci. Bioeng., 94 (5), 406-411.

Lee S.H., Oh B.I., Kim J., 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. Bioresour. Technol., 99, 2578-2587.

Lemon E.R., Erickson A.E., 1952. The measurement of oxygen diffusion in the soil with platinum microelectrode. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 16, 160-163.

Levyk V., Maryskevych O., Brzezińska M., Włodarczyk T., 2007. Dehydrogenase activity of technogenic soils of former sulphur mines (Yavoriv and Nemyriv, Ukraine). Int. Agrophysics, 21, 255-260.

Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2007. Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Tom 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poland.

Liesack W., Schnell S., Resbech N.P., 2000. Microbiology of flooded rice paddies. FEMS Microbiol. Rev., 24, 625-645.

Lüdemann H., Arth I., Liesack W. 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soils cores. Appl. Environ. Microbiol., 66, 754-762.

Malley C., Nair J., Ho G., 2006. Impact of heavy metals on enzymatic activity of substrate and on composting worms *Eisenia fetida*. Bioresour. Technol., 97, 1498-1502.

Marinari S., Mencinelli R., Campiglia E., Grego S., 2006. Chemical and biochemical indicators of soil quality in organic and conventional farming systems in Italy. Ecol. Indic., 6, 701-711.

Martyniuk S., Księżniak A., Jończyk K., Kuś J., 2007. Charakterystyka mikrobiologiczna gleby pod pszenicą ozimą uprawianą w systemie ekologicznym. J. Res. Appl. Agric. Eng., 52 (3), 113-116.

Masto R.E., Chonkar P.K., Singh D., Patra A.K., 2006. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. Soil Biol. Biochem., 38, 1577-1582.

Mazurkiewicz I., 2002. Potencjał redoks w glebie jako wskaźnik chemiczno-rolniczy w badaniach agrosystemu. Annales UMCS, Sec. E, 57, 17-24.

McLean M.A., Huhta V., 2000. Temporal and spatial fluctuations in moisture affect humus microfungal community structure in microcosms. Biol. Fertil. Soils, 32, 114-119.

Megharaj M., Singleton I., Kookana R., Naidu R., 1999. Persistence and effects of fenamiphos on native algal populations and enzymatic activities in soil. Soil Biol. Biochem., 31, 1549-1553.

Menon P., Gopal M., Parsad R., 2005. Effects of chlorpyrifos and quinalphos on dehydrogenase activities and reduction of Fe^{3+} in the soils of two semi-arid fields of tropical India. Agric. Ecosyst. Environ., 108, 73-83.

Mijangos I., Perez R., Albizu I., Garbisu C., 2006. Effect of fertilization and tillage on soil biological parameters. Enzyme Microb. Technol., 40, 100-106.

Mikanova O., 2006. Effect of heavy metals on some soil biological parameters. J. Geochem. Explor., 88, 220-223.

Misztal M., 1997. Litosfera i jej ochrona. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Lublin, Poland.

Moreno J.L., Aliaga A., Navarro S., Hernendez T., Gracia C., 2007. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. Appl. Soil Ecol., 35, 120-127.

Moreno J.L., Garcia C., Landi L., Falchini L., Pietramellara G., Nannipieri P., 2001. The ecological dose value (ED_{50}) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. Soil Biol. Biochem., 33, 483-489.

Nannipieri P., 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Soil Biota, Management in Sustainable Farming Systems (Eds. C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta and P.R. Grace), CSIRO, Australia, 238–244.

Nannipieri P., Ascher J., Ceccerchini M.T., Landi L., Pietramellara G, Renella G., 2003. Microbial diversity and soil functions. Eur. J. Soil Sci., 54, 655-670.

Nannipieri P., Sastre I., Landi L., Lobo M.C., Pietramellara G., 1996. Determination of extracellular neutral phosphomonoesterase activity in soil. Soil Biol. Biochem., 28(1), 107-112.

Nayak D.R., Babu J., Adhya T.K., 2007. Long-term application of compost influences microbial biomass and enzyme activities in a tropical Aeric Endoaquept planted to rice under flooded condition. Soil Biol. Biochem., 39, 1897-1906.

Norman E.G., Colman B., 1991. Characterization of a malate dehydrogenase in the cyanobacterium *Coccochloris peniocystis*. Arch. Microbiol., 156, 28-33.

Ntarlagiannis D., Atekwana E.A., Hill E.A., Gorby Y., 2007. Microbial nanowires: Is the subsurface "hardwired"? Geophys. Res. Lett., 34, 1-5.

Pagliai M., Vignozzi N., Pellegrini S., 2004. Soil structure and the effect of management practices. Soil Tillage Res., 79, 131-143.

Pandey S., Singh D.K., 2006. Soil dehydrogenase, phosphomonoesterase and arginine deaminase activities in an insecticide treated groundnut (*Archis hypogea* L.) field. Chemosphere, 63, 869-880.

Pascual I., Antolin M.C., Garcia C., Polo A., Sanchez-Diaz M., 2007. Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. Bioresour. Technol., 98, 29-37.

Pascual J.A., Garcia C., Hernandez T., Moreno J.L., Ros M., 2000. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. Soil Biol. Biochem., 32, 1877-1883.

Paul E.A., Clark F.E., 2000. Mikrobiologia i biochemia gleb. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, Poland.

Pett-Ridge J., Firestone M.K., 2005. Redox fluctuation structures microbial communities in a wet-tropical soil. Appl. Environ. Microbiol., 71 (11), 6998-7007.

Picek T., Simek M., Santruckova H., 2000. Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. Biol. Fertil. Soils, 31, 315-322.

Pietramellara G., Ascher J., Borgogni F., Ceccherini M.T., Guerri G., Nannipieri P., 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. Biol. Fertil. Soils, 45, 219-235.

Piotrowska A., Koper J., 2007. Wpływ wieloletniego nawożenia organicznego i mineralnego na aktywność enzymów oksydoredukcyjnych i hydrolitycznych w glebie spod pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). Zeszyty Probl. Post. Nauk Rolniczych, 520, 669-673.

Piotrowska-Cyplik A., Cyplik P., 2008. Estimation of correlation between total microorganism counts and dehydrogenase acivity measurement in compost from anaerobic sewage sludge. Natura Przyroda Technologie, 2 (3),1-9.

Piotrowska-Cyplik A., Cyplik P., Czarnecki Z., 2007. Measurement of dehydrogenase activity and traditional method of microorganisms count estimation as indicators of microorganisms activity in compost from municipal sewage sludge. J. Res. Appl. Agric. Eng., 52 (4), 22-26.

Pons Y., Capillon A., Cheverry C., 2000. Water movement and stability of profiles in drained, clayey and swelling soils; at saturation, the structural stability determines the profile porosity. Eur. J. Agron., 12, 269-279.

Praveen-Kumar B., Tarafdar J.C., 2003. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. Biol. Fertil. Soils, 38, 186-189.

Rigobelo E.C., Nahas E., 2004. Seasonal fluctuations of bacterial population and microbial activity in soils cultivated with eucalyptus and pinus. Sci. Agric. (Brazil), 61 (1), 88-93.

Roldan A., Salinas-Gracia J.R., Alguacil M.M., Diaz E., Caravaca F., 2005. Soil enzymes activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. Geoderma, 129, 178-185.

Ros M., Hernandez M.T., Gracia C., 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. Soil Biol. Biochem., 35, 463-469.

Schimel J., Balser T.C., Wallenstein M., 2007. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. Ecology, 88, 1386-1394.

Sey B.K., Manceur A.M., Whalen J.K., Gregorich E.G., Rochette P., 2008. Small-scale heterogeneity in carbon dioxide, nitrous oxide and methane production from aggregates of a cultivated sandy-loam soil. Soil Biol. Biochem., 40, 2468-2473.

Shen G., Lu Y., Zhou Q., Hong J., 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. Chemosphere, 61, 1175-1182.

Singh D.K., Kumar S., 2008. Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soils (ridges with forest) and in cotton soil after acetamprid treatments. Chemosphere, 71, 412-418.

Singh J., Singh D.K., 2005. Dehydrogenase, and phosphomonoesterase activities in groundnut (*Arachis hypogea* L.) field after diazinon, imidacloprid and lindane treatments. Chemopshere, 60, 35-42.

Skawryło-Bednarz B.. 2008. Ocena właściwości biologicznych gleby pod uprawą szarłatu (*Amaranthus cruentus* L.). Acta Agrophysica, 12(2), 527-534.

Song Y., Deng S.P., Acosta-Martinez V., Katsalirou E., 2008. Characterization of redox-related soil microbial communities along a river floodplain continuum by fatty acid methyl ester (FAME) and 16S rRNA genes. Appl. Soil Ecol., 40, 499-509.

Stępniewska Z., 1988. Właściwości oksydoredukcyjne gleb mineralnych Polski. Probl. Agrofizyki, 56.

Stepniewska Z., Przywara G., Bennicelli R.P., 2004. Reakcja roślin w warunkach anaerobiozy. Acta Agrophysica, 113.

Stępniewska Z., Wolińska A., Bennicelli R.P., 2003. Wpływ potencjału wody glebowej na mikrodyfuzję tlenu na przykładzie gleby bielicowej. Acta Agrophysica, 84, 145-152.

Stępniewska Z., Wolińska A., 2004. Dehydrogenase activity in the soil contaminated by Cr(III) and Cr(VI) compounds. Environ. Prot. Eng., 4, 171-175.

Stępniewska Z., Wolińska A., 2005. Soil dehydrogenase activity in the presence of chromium (III) and (VI). Int. Agrophysics, 19, 79-83.

Stępniewska Z., Wolińska A., Lipińska R., 2007. Effect of fonofos on soil dehydrogenase activity. Int. Agrophysics, 21 (1)., 101-105.

Stępniewska Z., Żuchowski J., Kotowska U., 2001. Dynamika potencjału oksydoredukcyjnego na polu doświadczalnym irygowanym ściekami miejskimi po II stopniu oczyszczania. Acta Agrophysica, 53, 171-176.

Stępniewski W., Horn R., Martyniuk S., 2002. Managing soil biophysical properties for environmental protection. Agric., Ecosyst. Environ., 88, 175-181.

Stępniewski W., Stępniewska Z., 2009. Selected oxygen-dependent process - Response to soil management and tillage. Soil Tillage Res., 102, 193-200.

Stępniewski W., Stępniewska Z., Bennicelli R.P., Gliński J., 2005. Oxygenology in outline. Institute of Agrophysics PAS, Lublin, Poland.

Stępniewski W., Stępniewska Z., Gliński J., Brzezińska M., Włodarczyk T., Przywara G., Varallay G., Rajkai K., 2000a. Dehydrogenase activity of some Hungarian soils as related to their water and aeration status. Int. Agrophysics, 14, 341-354.

Stępniewski W., Stępniewska Z., Przywara G., Brzezińska M., Włodarczyk T., Varallay G., 2000b. Relations between aeration status and physical parameters of some selected Hungarian soils. Int. Agrophysics, 14, 439-447.

Stuczyński T.I., McCarty G.W., Siebielec G., 2003. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead, and zinc salt amendments. J. Environ. Qual., 32, 1346-1355.

Subhani A., Changyong H., Zhengmiao X., Min L., El-Ghamry A.M., 2001. Impact of soil environment and argonomic practices on microbial/dehydrogenase enzyme activity in soil. A review. Pak. J. Biol. Sci., 4 (3), 333-338.

Sukul P., 2006. Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. Soil Biol. Biochem., 38, 320-326.

Sullivan T.S., Stromberger M.E., Paschke M.W., Ippolito J.A., 2005. Long-term impacts of infrequent biosolids applications on chemical and microbial properties of semi-arid rangeland soil. Biol. Fertil. Soils, 42, 258-266.

Szostak B., Jezierska-Tys S., Bekier-Jaworska E., 2005. Intensywność procesu amonifikacji i nitryfikacji w glebie na terenie ferm świń.Acta Agrophysica, 6 (1), 251-260.

Taok M., Cochet N., Pauss A., Schoefs O., 2007. Monitoring of microbial activity in soil using biological oxygen demand measurement and indirect impedancemetry. Eur. J. Soil Biol., 43, 335-340.

Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S., Burns R.G., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. Soil Biol. Biochem., 34, 387-401.

Tiwari B.S., Belenghi B., Levine A., 2002. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. Plant Physiol., 128, 1271-1281.

Tiwari M.B., Tiwari B.K., Mishra R.R., 1989. Enzyme activity and carbon dioxide evolution from upland and wetland rice soils under three agricultural practices in hilly regions. Biol. Fertil. Soils, 8 (2), 178-182.

Trasar-Cepeda C., Gil-Sotres F., Leiros M.C., 2007. Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. Soil Biol. Biochem., 39, 311-319.

Trevors J.T., 1984. Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O_2 concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil. Plant Soil, 77, 285-293.

Tripathi S., Chakraborty A., Chakrabarti K., Bandyopadhyay B.K., 2007. Enzyme activities and microbial biomass in coastal soils of India. Soil Biol. Biochem., 39, 2840-2848.

Turski R., Słowińska-Jurkiewicz A., Hetman J. 1984. Zarys gleboznawstwa. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, Poland.

Turski M., Witkowska-Walczak B., 2004. Fizyczne właściwości gleb płowych wytworzonych z utworów pyłowych różnej genezy. Acta Agrophysica, (1).

Unger I.M., Motavalli P.P., Muzika R.M., 2009. Changes in soil chemical properties with flooding. A field laboratory approach. Agric. Ecosyst. Environ., 131, 105-110.

Urukawa H., Yoshida T., Nishimura M., Ohwada K., 2000. Characterization of depth related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinine profiling. Environ. Microbiol., 2, 542-554.

Vogeller I., Vachey A., Deurer M., Bolan N., 2008. Impact of plants on the micriobal activity in soils with high and low levels of copper. Eur. J. Soil Biol., 44, 92-100.

Von Mersi W., Schinner F., 1991. An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with iodonitrotetrazolium chloride. Biol. Fertil. Soils, 11, 216-220.

Walczak R., Sławiński C., Witkowska-Walczak B., 2001a. Retencja i przewodnictwo wodne gleb murszowych i murszowatych Polski. Acta Agrophysica, 53, 201-209.

Walczak R., Sławiński C., Witkowska-Walczak B., 2001b. Retencja i przewodnictwo wodne czarnych ziem Polski. Acta Agrophysica, 53, 211-223.

Watson G.W., Kelsey P., 2006. The impact of soil compaction on soil aeration and fine root density of *Quercus palustris*. Urb. Forest. Urban Greening, 4, 69-74.

Weiner J., 2006. Życie i ewolucja biosfery. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Poland.

Welp G., 1999. Inhibitory effects of the total and water-soluble concentrations of nine different metals on the dehydrogenase activity of a loess soil. Biol. Fertil. Soils, 30, 132-139.

Wilson M., Reeder B.J., 2008. Oxygen-binding haem proteins. Exp. Physiol., 93, 128-132.

Wilkinson S., Anderson J., Scardelis S., Tisiafouli M., Taylor A., Wolters V., 2002. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. Soil Biol. Biochem., 34, 189-200.

Witkowska-Walczak B., 2006. Hysteresis between wetting and drying processes as affected by soil aggregate size. Int. Agrophysics, 20, 359-365.

Włodarczyk T., 1998. Effect of sampling season and storage period on dehydrogenase and catalase activity of an *Orthic Luvisol*. Pol. J. Soil Sci., XXXI/2, 59-67.

Włodarczyk T., 2000. Some aspects of dehydrogenase activity in soils. Int. Agrophysics, 14, 365-376.

Włodarczyk T., Gliński J., Stępniewski W., Stępniewska Z., Brzezińska M., Kuraz V., 2001. Aeration properties and enzyme activity on the example of *Arenic Chernozem* (Tisice). Int. Agrophysics, 15, 131-138.

Włodarczyk T., Kotowska U., 2006. Nitrate and ammonium transformation and redox potential changes in organic soil (*Eutric Histosol*) treated with municipal waste water. Int. Agrophysics, 20, 69-76.

Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M., 2002. Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions. Biol. Fertil. Soils, 36, 200-206.

Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M., Przywara G., 2008. Impact of different aeration conditions on the content of extractable nutrients in soil. Int. Agrophysics, 22, 371-375.

Włodarczyk T., Witkowska-Walczak B., 2006. Water-air properties of muck-like soils. Pol. J. Soil Sci., XXXIX/1, 1-10.

Wyczółkowski A.I., Wyczółkowska M., Dąbek-Szreniawska M., 2006. Biologiczna aktywność gleb pod roślinami w wybranym płodozmianie. Acta Agrophysica, 8 (1), 275-284.

Wyłupek T., Martyn W., Koper K., 2004. Wartość rolnicza zbiorowisk trawiastych jako wskaźnik stanu środowiska przyrodniczego spowodowanego wydobyciem siarki. Annales UMCS, LIX 4, E, 1715-1722.

Wyszkowska J., Wyszkowski M., 2003. Effect of soil contamination with nickel on enzymatic activity. Pol. J. Nat. Sci., 12 (4), 479-485.

Xiang S.R., Doyle A., Holden P.A., Schimel J.P., 2008. Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils. Soil Biol. Biochem., 40, 2281-2289.

Yao X.H., Min H., Lu Z.H., Yuan H.P., 2006. Influence of acetamprid on soil enzymatic activities and respiration. Eur. J. Soil Biol., 42, 120-126.

Yang L.J., Li T.L., Fu S.F., 2005. Effect of manure and chemical fertilizer on the dynamics of soil enzymatic activities in vegetable soil. Chin. J. Soil Sci., 36 (2), 223-226.

Young I.M., Ritz K., 2000. Tillage, habitat space and function of soil microbes. Soil Tillage Res., 53, 201-213.

Zawadzki S., 1999. Gleboznawstwo. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, Poland.

Zou C., Penfold C., Sands R., Mishra R.K., Hudson I., 2001. Effects of soil air-filled porosity, soil matric potential and soil strength on primary root growth of radiata pine seedlings. Plant Soil, 236 (1), 105-115.

10. STRESZCZENIE

W Polsce, w procesach glebotwórczych i na bazie rodzimej skały macierzystej ukształtowały się gleby, których procentowy udział w skali kraju jest następujący: 82% stanowią gleby brunatne i bielicowe, 9% gleby bagienne hydrogeniczne, 5% mady, po 2% czarne ziemie, czarnoziemy oraz rędziny. W przedstawionej pracy wykorzystano materiał glebowy, reprezentujący wszystkie wspomniane powyżej typy gleb, co dało możliwość reprezentatywnego dla Polski zweryfikowania postawionej w rozprawie hipotezy, iż: aktywność dehydrogenazowa (*DHA*) mikroorganizmów glebowych może być wykorzystana jako indykator zarówno niedoboru tlenu w glebie, jak również powrotu do stanu korzystnego natlenienia (normoksja). Poprzez obserwacje zmian zachodzących w glebie w szerokim zakresie jej uwilgotnienia – od pełnej pojemności wodnej (*pF* 0), do punktu będącego miarą wody dostępnej dla korzeni roślin – *pF* 3,2, dokonano rozpoznania naukowego w obrębie zjawiska reoksydacji. Określono również współzależności między liczebnością mikroorganizmów glebowych a zmiennymi parametrami aeracyjnymi (*pF*, *ODR*, *Eh*), podczas postępującego procesu osuszania gleb. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, iż *DHA* determinowana jest w sposób istotny ($p<0,05$) przez dostępność wody (*pF*), tlenu (*ODR*) i potencjał oksydoredukcyjny (Eh_7), wykazując ujemne korelacje. Wymienione parametry stanowią istotne zmienne środowiskowe, warunkujące występowanie i aktywność metaboliczną mikroflory bakteryjnej, decydującej o życiu biologicznym w glebie. Stwierdzono również, iż liczebność mikroorganizmów glebowych w sposób istotny ($p<0,05$) warunkowana jest przez dostępność wody i potencjał oksydoredukcyjny (współzależności ujemne) oraz przez dostępność tlenu (korelacje dodatnie). Potwierdzono hipotezę, iż *DHA* może pełnić rolę indykatora stanu natlenienia w środowisku glebowym.

Słowa kluczowe: gleba, aktywność dehydrogenazowa, dostępność tlenu, potencjał wodny gleb

11. SUMMARY

DEHYDROGENASE ACTIVITY OF SOIL MICROORGANISMS AND OXYGEN AVAILABILITY DURING REOXIDATION PROCESS OF SELECTED MINERAL SOILS FROM POLAND

In Poland, as a result of the soil-forming processes and on the base of the parent materials the following soil types were formed, corresponding to a country prevalence area: 82% is represented by *Eutric Cambisols* and *Orthic Podzols*, 9% – by *Eutric Histosols*, 5% – by *Eutric Fluvisols* and last 2% – by *Mollic Gleysols*, *Haplic Phaeozems* and *Rendzina Leptosols*. The soil materials used in the presented study included each of the above-mentioned soil types, which enabled the verification of the hypothesis, representative for Poland, i.e., whether dehydrogenase activity (*DHA*) could be employed as an indicator of both oxygen deficiency and of the good oxygenation status (normoxia). Having taken into consideration the observed soil changes in response to a broad humidity spectrum, i.e. from full water capacity conditions (*pF* 0) to *pF* 3.2, corresponding to the range of available water for plant roots, the reoxidation phenomenon was successfully recognised. The relationships between the microorganism abundance of the soils and the varying aeration parameters (*pF*, *ODR*, *Eh*) during reoxidation were investigated. The conducted experiments showed that *DHA* is significantly ($p<0.05$) negatively correlated with water (*pF*), oxygen availability (*ODR*) and redox potential (Eh_7). The above-mentioned environmental factors can affect the presence and metabolic activity of bacteria microflorae which are crucial for soil biological life. It was also proven that microorganisms abundance is significantly ($p<0.05$) affected by water availability and redox potential (negative correlations), as well as by oxygen availability (positive relationships). The hypothesis suggesting that *DHA* could be an indicator of soil oxygenation status was confirmed.

Keywords: soil, dehydrogenase activity, oxygen availability, soil water potential

Adres Autorki:

Agnieszka Wolińska
Katolicki Uniwerystet Lubelski Jana Pawła II,
Instytut Biotechnologii, Katedra Biochemii i Chemii Srodowiska
Al. Kraśnicka 102, 20-71 Lublin
e-mail: awolin@kul.lublin.pl

The John Paul II Catholic Univeristy of Lublin,
Institute of Biotechnology,
Department of Biochemistry and Environmental Chemistry
Al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin, Poland.
e-mail: awolin@kul.lublin.pl