

Anna Kot¹, Magdalena Frąć^{1*}

¹ Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

Wpłynęło we wrześniu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Odpady organiczne. 3. Aktywność enzymatyczna 4. Analiza profilu metabolicznego (CLPP – Community Level Physiological Profiles). 5. Badania różnorodności mikroorganizmów oparte na metodzie molekularnej PCR-DGGE. 6. Podsumowanie

Methods used in the evaluation of the organic wastes influence on soil microbial activity

Abstract: Organic wastes are useful in agriculture as organic and nutrients fertilizers. Changes in soil environment after application of organic wastes may be successfully controlled using conventional and molecular methods. Microorganisms play important role in soil organic matter transformations. Evaluation of their enzymatic activity, functional and genetic diversity can be used as sensitive tool to assess soil quality and fertility. It is important to combine conventional microbiological methods with molecular techniques, to obtain more information about population of soil microbiota.

1. Introduction. 2. Organic wastes. 3. Enzymatic activity 4. Community Level Physiological Profiles – CLPP. 5. Research of microbial diversity based on PCR-DGGE molecular method. 6. Summary

Słowa kluczowe: aktywność mikrobiologiczna gleby, odpady organiczne

Key words: soil microbial activity, organic wastes

1. Wprowadzenie

Różnorodność mikroorganizmów glebowych oraz roślin uprawnych w znaczny sposób wpływa na funkcjonowanie ekosystemów lądowych, szczególnie agroekologicznych [17]. Utrzymywanie równowagi pomiędzy biologicznymi, chemicznymi i fizycznymi komponentami gleby stanowi o jej jakości i przydatności produkcyjnej [42]. Bardzo czułym wskaźnikiem zmian zachodzących w środowisku glebowym jest aktywność mikroorganizmów glebowych [48]. Dynamika zmian zachodzących w obrębie ekosystemów glebowych ma istotne znaczenie w ocenie stanu i możliwości wykorzystania gleby [53]. Mikroorganizmy odgrywają istotną rolę, pełniąc szereg funkcji, m.in. w: utrzymaniu struktury gleby, humifikacji, uwalnianiu związków organicznych, utylizacji zanieczyszczeń oraz uczestniczą w procesach transformacji materii organicznej [59].

W rolnictwie oraz w zabiegach rekultywacji gleby coraz częściej wykorzystywane są odpady organiczne, pochodzące z przetwórstwa owocowo-warzywnego, mleczarskiego, ziemniaczano-krochmalniczego oraz zakładów browarniczych, produkcji żelatyny, przetwórstwa rybnego i rzeźni, których zastosowanie z jednej strony pozwala na ochronę gleby stabilizując materię organiczną, z drugiej zaś jest sposobem rolniczego zagospodarowania i utylizacji odpadów organicznych. Większość odpadów zawiera cenne składniki odżywcze,

które mogą być wykorzystywane do poprawy żyzności gleby. Jest to tym bardziej ważne, iż intensywne uprawy prowadzi do stopniowej degradacji materii organicznej w glebie, wpływając na pogorszenie jej właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych [58].

2. Odpady organiczne

Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA – United States Environmental Protection Agency) wprowadza przepisy, które mają na celu ochronę zdrowia publicznego oraz środowiska przed chemicznymi i mikrobiologicznymi zanieczyszczeniami, jakie występują m.in. w osadach ściekowych i pofermentacyjnych. Z danych EPA wynika, że 66% z 1,2 mln t osadów ściekowych jest wykorzystywanych w celu zwiększenia zawartości składników mineralnych i poprawienia kondycji gleb użytkowanych rolniczo. Obecnie EPA wprowadza nowe standardy w celu ograniczenia występowanie dioksyn i ich pochodnych w tych odpadach. Poprzednie przepisy ogólnie regulowały postępowanie z osadami ściekowymi na etapie ich ostatecznego wykorzystania lub utylizacji i dotyczyły aplikacji odpadów i ich przetworzonych form, wykorzystywanych jako nawóz do gruntów, utylizacji na gruntowych składowiskach powierzchniowych (wysypiskach) oraz utylizacji poprzez spalanie [84]. W Polsce politykę dotyczącą

* Autor korespondencyjny: Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin; tel. 81 744 50 61; e-mail: m.frac@ipan.lublin.pl

charakterystyki i postępowania z odpadami, czy osadami ściekowymi reguluje Uchwała Rady Ministrów Nr 233 z dnia 29 grudnia 2006 r. w sprawie „Krajowego planu gospodarki odpadami 2010”, wskazując na ograniczenia ekonomiczne i dopuszczalne parametry jakościowe, będące wyznacznikami rolniczego lub rekultywacyjnego zastosowania osadów ściekowych [85].

Odpady komunalne. Za odpady komunalne uważane są „odpady powstające w gospodarstwach domowych, a także odpady niezawierające odpadów niebezpiecznych, pochodzące od innych wytwórców odpadów, które za względu na swój charakter i skład są podobne do odpadów powstających w gospodarstwie domowym”. Należą do nich komunalne osady ściekowe, powstające w procesie oczyszczania ścieków. Odsetek powstających osadów uwarunkowany jest stopniem rozkładu substancji organicznych, zawartością zanieczyszczeń w ściekach oraz przyjętą i realizowaną metodą oczyszczania. 2875 oczyszczalni ścieków w Polsce w roku 2004 wyprodukowało w sumie 476 tysięcy ton komunalnych osadów ściekowych w przeliczeniu na suchą masę, z czego 28,1% było wykorzystanych w rekultywacji terenów, w tym gruntów na cele orne, 17,0% było użytych w rolnictwie, a 7,6% zastosowanych do uprawy roślin przeznaczonych do produkcji kompostu [85]. Powstawanie ścieków komunalnych na drodze fizykochemicznych lub biologicznych metod, wiąże się ze znacznymi kosztami. Związane jest to z etapem odwadniania osadu w celu zmniejszenia jego objętości do celów transportowych i ekonomicznego przechowania. Zdolność do odwadniania osadów zależy od zawartości w nich materii organicznej [65].

Odpady inne niż komunalne. W Polsce odpady, inne niż komunalne, których zagospodarowanie stwarza problemów zostały podzielone na 10 grup. Do grupy 02 zaliczono odpady pochodzące z rolnictwa, sadownictwa, upraw hydroponicznych, rybołówstwa, leśnictwa, łowiectwa oraz przetwórstwa żywności. Powstają one w znacznej ilości w: ubojniach, zakładach przetwórstwa mięsnego, zakładach przetwórstwa mleczarskiego, chłodniach, gospodarstwach rolnych, ogrodnictwa i hodowlanych, browarach, cukrowniach, gorzelnianach oraz innych zakładach zajmujących się produkcją i przetwórstwem żywności. Na terenie Polski jest od kilkunastu do kilkudziesięciu tysięcy zakładów, w których powstają wyżej wymienione odpady. W 2004 roku stanowiły one około 7% wszystkich odpadów wytworzonych w kraju, co wynosiło 9 mln t. Jest to wynik zadawalający, ponieważ ich ilość w odniesieniu do 2000 roku zmalała o 17% [85]. Wspomniane odpady rolnicze można podzielić na dwie kategorie. Do pierwszej należą pozostałości na polu lub sadach po zbiorach oraz odpady uzyskane po procesach przetworzenia płodów rolnych do materiałów użytkowych. Do pierwszych zaliczamy łodygi, liście, strąki nasion,

do drugich zaś łupiny, wytloki, pestki i korzenie. Część z odpadów rolniczych może być wykorzystywana jako pasza dla zwierząt, w praktykach agronomicznych lub w przemyśle [12]. Odpady przemysłu spożywczego pochodzą głównie z zakładów: przetwórstwa mleczarskiego, browarniczych, produkcji żelatyny, przetwórstwa rybnego, rzeźni, przetwórnictwa owoców i warzyw oraz przemysłu ziemniaczano-krochmalniczego. Zawierają one wysoką dawkę węgla organicznego, z drugiej strony niewielkie dawki toksycznych substancji w porównaniu z innymi odpadami przemysłowymi. Odpady z biogazowni, w tym pulpy pofermentacyjnej, stanowią grupę spoza przemysłu spożywczego. Odpady przemysłowe charakteryzują się różną zawartością suchej masy, węgla organicznego, azotu mineralnego oraz całkowitego, fosforu całkowitego oraz zróżnicowanym stosunkiem C:N w zależności od pochodzenia. Różne są też proporcje celulozy, hemicelulozy oraz lignin w tych odpadach. W związku z tym suplementacja gleby odpadami przemysłowymi niesie za sobą niejednorodne skutki zależne od ich charakterystyki. Utylizacja odpadów przemysłowych w sektorze rolniczym będzie nabierała większego znaczenia, z uwagi na regulacje w obrębie państw i wspólnot gospodarczych, które wymagają pozbywania się odpadów bogatych w substancje organiczne, pochodzące z różnych gałęzi przemysłu [11, 86].

W ostatnich latach powstaje coraz więcej prac badawczych opartych na badaniu żyzności i parametrów biologicznych gleby po jej suplementacji odpadami organicznymi [22, 45, 3]. Antolín i wsp. [4] przeprowadzili badania gleb zdegradowanych regionu śródziemnomorskiego, pod uprawą jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare L.*). Celem badań była ocena relacji między fizjologią uprawianej rośliny, a wybranymi właściwościami gleby przy zastosowaniu konwencjonalnego nawożenia nieorganicznego, jednorazowego nawożenia osadami ściekowymi oraz wielokrotnego zastosowania tych odpadów. Zastosowanie osadów ścieków komunalnych w przeprowadzonym doświadczeniu spowodowało wzrost żyzności gleby i poprawę jej fizycznych właściwości, a także zwiększenie uzyskanych plonów. Rośliny z poletka o zwiększonej dawce osadów ściekowych charakteryzowały się wyższym wskaźnikiem suchej masy oraz większą ilością białka w liściach. Sama gleba wyróżniała się niższym pH, większym poziomem stężenia całkowitego węgla, lepszą zdolnością do ekstrakcji metali ciężkich oraz do wymiany kationowej. Właściwości biologiczne gleby nawożonej osadami charakteryzowały się wyższą aktywnością enzymatyczną (ureazy, proteazy, fosfataz oraz β -glukozydazy) oraz wyższą biomasa w porównaniu do gleby kontrolnej. Rolnicze zagospodarowanie odpadów organicznych wpływało na: spontaniczny oraz długotrwały rozwój szaty roślinnej, krótkotrwały wzrost poziomu materii organicznej, biomasy drobnoustrojów, transpiracji

oraz aktywności niektórych enzymów zaangażowanych w obieg C i N. Badania Ros [63] wykazały, że wraz ze wzrostem dawkowania odpadów komunalnych świeżych i kompostowanych stwierdzono wzrost aktywności mikrobiologicznej gleby. Zastosowanie osadu w celach nawozowych, wpływało na szybki przyrost materii organicznej. Również struktura zbiorowisk mikroorganizmów ulega szybkim zmianom po aplikacji osadu. Profil genetyczny bakterii w glebie po zastosowaniu osadu różnił się w znacznym stopniu od obiektu kontrolnego. Różnice były zauważalne nawet po 3 miesiącach od zastosowania osadu. Podobny stan utrzymywał się w odniesieniu do zbiorowisk grzybów [75].

3. Aktywność enzymatyczna

Enzymy znajdujące się w środowisku glebowym wytwarzane są głównie przez biomasę drobnoustrojów, fauny oraz flory glebowej, jak również z rozkładu obumarłych resztek roślinnych i zwierzęcych [56]. Enzymy katalizują przemiany związków organicznych w glebie, uczestnicząc w degradacji składników resztek roślinnych. Aktywność enzymatyczna jest wyznacznikiem stanu biologicznego gleby, a także pomaga ocenić jej stan ekologiczny. Powszechnie uznanym jest fakt, iż biologiczne parametry gleby są wczesnym wskaźnikiem poziomu degradacji gleby i mogą być skorelowane z jej właściwościami fizycznymi i chemicznymi [14]. Aktywność enzymów glebowych, w sposób pośredni, wykorzystywana jest do oceny intensywności przemian zachodzących w środowisku glebowym. Procesy enzymatyczne charakteryzują się dużą wrażliwością na zmiany zachodzące w glebie pod wpływem czynników naturalnych i antropogenicznych.

W celu określenia biologicznego stanu gleby zależnej na terenie miejskim, zbadano zależność między aktywnością enzymatyczną i żyznością gleby, a także między aktywnością enzymatyczną i fizykochemicznymi właściwościami gleby. Jak wykazały badania aktywność enzymatyczna stanowi bardzo istotny miernik do oszacowania żyzności gleby. Zanotowano również duży związek między aktywnością enzymów a pH, zdolnością wymiany kationów, zawartością węgla organicznego, dostępnego K i P oraz zawartością węgla pochodzenia mikrobiologicznego [67]. Do oceny stanu ekologicznego gleby najczęściej wykorzystywana jest aktywność dehydrogenaz, fosfataz i celulaz, a także ureazy oraz proteazy. Aktywność wymienionych enzymów została wykorzystana do oceny stanu gleby po dodaniu osadów, pochodzących z czyszczalni ścieków mleczarskich, w celu zweryfikowania zmian żyzności gleby [22].

Znane są również badania oddziaływania różnych dawek kompostowanego osadu ścieków komunalnych

na właściwości biologiczne gleby [79]. Przeprowadzone badania w oparciu o testy enzymatyczne obejmujące aktywność ureazy, fosfataz, sacharazy oraz katalazy, wykazały, że aktywność wszystkich enzymów wzrastała w zależności od dawki osadów wprowadzonych do gleby. Na wyniki miał znaczący wpływ również czas analizy mierzony od momentu dodania osadów. Ureaza i sacharaza osiągnęły maksimum aktywności w 50 dniu, z kolei aktywność fosfatazy i katalazy była maksymalna w 80 dniu po dodaniu osadów ściekowych do gleby.

D e h y d r o g e n a z y. Podstawowymi enzymami wykorzystywanymi w analizach aktywności biologicznej gleby są dehydrogenazy, które wykorzystywane są jako wskaźnik aktywności oddechowej organizmów glebowych, w tym aktywności mikrobiologicznej. Dlatego też aktywność dehydrogenaz ulega zmianom w wyniku zmian w strukturze mikroorganizmów glebowych, jak również w wyniku zmian potencjału redox (Eh) w glebie [16, 23]. W środowisku glebowym beztlenowce fakultatywne zużywają utlenione związki nieorganiczne, jak NO_3^- , jako końcowe akceptory elektronów, dlatego w glebach charakteryzujących się dużym stopniem denitryfikacji zauważa się równoczesną zwiększoną aktywność dehydrogenaz. Funkcjonowanie dehydrogenaz jest powiązane z wieloma procesami biochemicznymi w glebie, do których należy m.in. emisja gazów cieplarnianych CO_2 i N_2O . Dehydrogenazy są enzymami katalizującymi przenoszenie wodoru z utlenionego substratu na akceptor, działającymi wyłącznie w żywych, nienaruszonych komórkach. Dehydrogenazy, będące enzymami wewnątrzkomórkowymi, są bardziej wrażliwe na naturalne i antropogeniczne czynniki stresowe niż enzymy, związane z koloidami glebowymi, co wskazuje na większą podatność mikroorganizmów niż enzymów glebowych na oddziaływanie czynników środowiskowych. W związku z tym pomiar aktywności dehydrogenaz przy użyciu TTC, jako substratu ulegającego redukcji, odzwierciedla aktywność całej populacji drobnoustrojów środowiska glebowego. Aktywność dehydrogenaz rośnie wraz ze wzrostem wprowadzanej do gleby substancji organicznej, np. osadu ściekowego, wskazując na intensywniejsze procesy jej mineralizacji [81]. Badania niektórych autorów [22, 23] wykazały pozytywny wpływ osadu ściekowego na aktywność dehydrogenaz. Dehydrogenazy należą do enzymów, które w warunkach zakwaszenia przejawiają niską aktywność, natomiast w glebach słabo zasadowych osiągają optimum aktywności katalizacyjnej. Badania przeprowadzone przez W ł o d a r c z y k i wsp. [81] wykazały, że aktywność dehydrogenaz wzrastała krzywoliniowo wraz ze wzrostem masy organicznej oraz spadała wraz ze wzrostem Eh, osiągając maksymalną wartość przy pH 7,1.

F o s f a t a z y. Dostępność fosforu może być czynnikiem ograniczającym rozwój roślin wielu ekosystemów.

Rośliny, podobnie jak i inne organizmy, wykorzystują wyłącznie nieorganiczne związki fosforu w postaci jonów ortofosforanowych, dlatego też związki organiczne fosforu muszą być wcześniej rozłożone na drodze hydrolizy przy udziale enzymów hydrolitycznych zwanych fosfatazami. W związku z tym znaczenie tych enzymów jest duże zarówno w rolnictwie, jak też z ekonomicznego punktu widzenia, związanego ze zmniejszeniem nakładów finansowych na nawozy mineralne. Zapotrzebowanie roślin na fosfor pokrywane jest w większości z transformacji glebowej materii organicznej. Mineralizacja fosforu organicznego zachodzi głównie z udziałem mikroorganizmów, a aktywność fosfataz odgrywa ważną rolę w degradacji substancji organicznej po początkowym rozkładzie, katalizowanym przez wieloskładnikowe systemy enzymatyczne. Fosfatazy katalizują rozpad zarówno estru fosforu pochodzenia organicznego, jak też bezwodniki kwasu fosforowego do nieorganicznej postaci fosforu. Występowanie fosfataz w glebie wynika z obecności grzybów i komórek bakteryjnych bytujących głównie w ryzosferze oraz z samych korzeni roślinnych [73]. Dick i wsp. [15] wykorzystywali te enzymy jako wyznaczniki optymalnego odczynu gleby dla wzrostu plodów rolnych. Stosunek aktywności fosfatazy zasadowej do fosfatazy kwaśnej okazał się czułym wskaźnikiem zmian pH w glebie, zwłaszcza wzbogaconej w materię organiczną. Aktywność fosfataz w środowisku glebowym odzwierciedla aktywność enzymów związanych z koloidami glebowymi i substancjami humusowymi. Enzymy te mogą również występować w roztworze glebowym, a także jako fosfatazy związane z żywymi i martwymi komórkami roślin i mikroorganizmów [73]. W środowisku glebowym najczęściej badane są fosfomonoestery: kwaśna i zasadowa, które odgrywają istotną rolę w cyklu biogeochemicznego krążenia fosforu w przyrodzie. Aktywność fosfataz w środowisku glebowym zależy od wielu czynników, wśród których najważniejsze to: sprawność katalityczna enzymu, warunki fizyczne i chemiczne gleby, skład i różnorodność mikroorganizmów, temperatura i wilgotność, a także sposób użytkowania gleby.

Ureaza. Ureaza jest enzymem katalizującym, hydrolizę mocznika do dwutlenku węgla i jonu amonu. Enzym ten jest uwalniany z żywych i zdeintegrowanych komórek drobnoustrojów. W glebie jest przyswajany przez cząsteczki gliny i magazynowany w kompleksie związków huminowych [52]. Przeprowadzono badania mające na celu zweryfikowanie wpływu różnych form azotu na wytwarzanie ureazy w glebie o zróżnicowanej zawartości węgla organicznego. Jony NH_4^+ oraz NO_3^- stymulowały aktywność mikrobiologiczną, jednocześnie te formy azotu hamowały w sposób pośredni produkcję ureazy. Inhibicję powodowały substancje powstałe wskutek asymilacji tych związków

przez drobnoustroje glebowe [47]. Szybkość rozkładu mocznika zależy od odczynu gleby, z uwagi na to, że rozwój bakterii mocznikowych przy małej wartości pH ulega zahamowaniu. Ureaza charakteryzuje się wysoką specyficznością, a optimum działania wykazuje w temperaturze 37°C oraz przy pH 7,2–7,9. Enzym ten występuje w glebie w powiązaniu z substancjami próchnicznymi lub minerałami ilastymi, wykazując w tych kompleksach bardzo dużą trwałość [52]. W środowisku glebowym ureaza wykorzystywana jest do oceny skuteczności nawożenia azotem, a także stanowi dobry test bioindykacyjny w ocenie jakości gleby. Badania niektórych autorów [9, 14, 22] wskazują, że aktywność ureazy skorelowana jest z zawartością węgla organicznego i azotu ogólnego. Aktywność tego enzymu wykorzystywana jest również do oceny stanu ekologicznego gleb poddanych działaniu odpadów organicznych. Wielu autorów [22, 58, 63] stwierdziło w swoich badaniach istotny wpływ osadu ściekowego na aktywność ureazy oraz spadek tej aktywności w czasie trwania doświadczenia. Badania wykazały również istotny wzrost aktywności ureazy wraz ze wzrostem dawki osadu ściekowego zastosowanego do gleby.

Proteazy. Proteazy są enzymami katalizującymi reakcję hydrolizy złożonych związków azotowych (białek, polipeptydów, oligopeptydów). W wyniku degradacji tych związków powstają krótsze peptydy i aminokwasy. Jest to bardzo zróżnicowana grupa biokatalizatorów, z różnym powinowactwem do substratów, mechanizmem katalizy, optimum temperaturowym i pH, a także zróżnicowaną stabilnością w różnych środowiskach. Enzymy proteolityczne działają specyficznie ze względu na rodzaj grup funkcyjnych aminokwasów znajdujących się przy hydrolizowanym wiązaniu. Proteazy dzieli się ze względu na miejsce działania na endopeptydazy i egzopeptydazy. W środowisku glebowym pełnią one ważną rolę w depolimeryzacji substancji białkowych, sprzyjając ich mineralizacji w innych procesach biochemicznych, a także są kluczowym czynnikiem regulującym ilość dostępnego azotu w glebie dla roślin i samego ich wzrostu [41, 73]. Proteazy jako enzymy pozakomórkowe mogą być oznaczane ilościowo w dwojaki sposób: przekształcając substraty w glebie, niezależnie od zakresu aktywności biologicznej środowiska glebowego oraz poprzez zakres kształtowania ekosystemu mikroorganizmów glebowych [9]. Do mikroorganizmów o uzdolnieniach proteolitycznych, występujących w środowisku glebowym należą głównie bakterie tlenowe i beztlenowe, a także grzyby i promieniowce. Aktywność enzymów proteolitycznych środowiska glebowego może być wykładnikiem potencjalnego tempa mineralizacji organicznych połączeń azotu w glebie [41]. Badania przeprowadzone przez wielu autorów [6, 9, 14, 22], dotyczące aktywności proteaz gleb użyźnionych odpadami organicznymi,

w tym osadami ściekowymi, wskazują na pobudzający wpływ zastosowanych materiałów na aktywność omawianego enzymu. Badania wykazały również wysoce istotną korelację pomiędzy wysokością dawki osadu ściekowego, a aktywnością proteaz glebowych. Ponadto, stwierdzono, że aktywność ta była skorelowana z zawartością C-organicznego i N ogółem w glebie.

C e l u l a z y. Kompleks celulaz jest grupą enzymów, które odpowiedzialne są za rozkład celulozy oraz polisacharydów zbudowanych z jednostek glukozy połączonych wiązaniem β (1–4)-glikozydowym. Ta cecha celulaz jest niezwykle istotna w glebach uprawianych rolniczo, gdyż węgiel pochodzący z rozpadu wspomnianego polimeru jest głównym źródłem węgla do wzrostu i rozwoju drobnoustrojów glebowych [13]. Celulazy w środowisku glebowym pochodzą z resztek roślinnych znajdujących się w glebie. Tylko nieznaczna ich ilość pochodzi ze źródeł mikrobiologicznych [61]. Enzymy te w środowisku glebowym pełnią ważną rolę, uczestnicząc w transformacjach występujących w glebie resztek roślinnych, w skład których wchodzi w znacznej większości połączenia celulozy.

β - g l u k o z y d a z a. Enzym ten jest produkowany przez szereg organizmów, począwszy od roślin i zwierząt poprzez grzyby i bakterie. Jest odpowiedzialny za końcowy etap hydrolizy celulozy rozkładając dwucukry który uwalnia glukozę dostępną dla drobnoustrojów [20]. β -glukozydaza jest przydatna przy oznaczaniu jakości gleby i może być wskaźnikiem zmian aktywności biologicznej gleby, jak również wskaźnikiem wpływu zabiegów agrotechnicznych na środowisko glebowe [7, 54]. Mechanizmy tych zjawisk nie są jeszcze dobrze poznane, dlatego **K n i g h t** oraz **D i c k** [39] przebadali wpływ zabiegów agrotechnicznych na kinetykę reakcji enzymatycznej przy udziale β -glukozydazy oraz stopnia stabilizacji enzymu z koloidami glebowymi. Wyniki wskazują, że różne zabiegi agrotechniczne w sposób istotny obniżają aktywność enzymatyczną poprzez zmniejszenie ilości enzymu w glebie. Dotyczy to przede wszystkim β -glukozydazy związanej z cząsteczkami gleby.

A m y l a z a. Amylaza jest enzymem składającym się z dwóch frakcji: α -amylazy oraz β -amylazy, hydrolizujących skrobię [64, 76]. Amylaza jest enzymem powszechnie występującym w roślinach i glebie. Pomimo, iż w przyrodzie występuje wiele enzymów zdolnych do hydrolizy skrobi, to amylaza odgrywa zasadniczą rolę w rozkładzie tego polimeru. Powszechnie wiadomo, że α -amylaza ma zdolność do konwertowania skrobi do glukozy i/lub oligosacharydów, z kolei β -amylaza przekształca skrobię do maltozy [76]. Aktywność amylazy jest zależna od wielu czynników środowiskowych. Roślinność działa dwójako na aktywność amylazy – bezpośrednio wydzielając enzym do podłoża i dostarczając substratu do hydro-

liza oraz pośrednio wydzielając związki absorbowane przez mikroorganizmy, które pobudzają je do syntezy enzymu [46]. Aktywność amylazy wykorzystywana jest w środowisku glebowym do oceny stopnia degradacji złożonych węglowych połączeń organicznych, informując pośrednio o stanie ekologicznym gleb poddanych działaniu różnych odpadów organicznych.

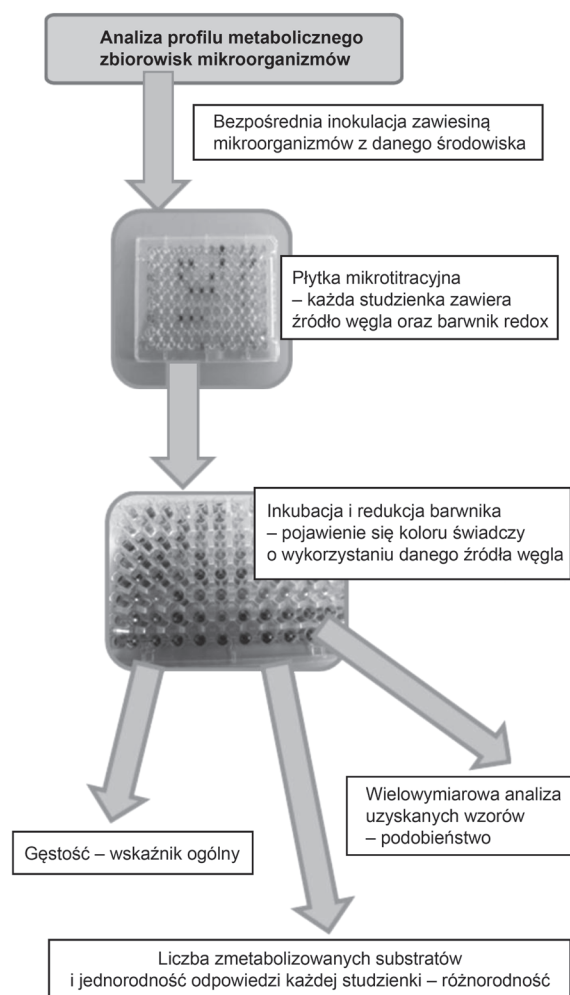
4. Analiza profilu metabolicznego gleby (CLPP – Community Level Physiological Profiles)

Od kiedy stwierdzono, iż substraty organiczne (tzw. węgiel organiczny) jest głównym czynnikiem kontrolującym wzrost mikroorganizmów w glebie [80] rozwinięto metodę, opartą na zdolności mikroorganizmów do katabolizowania różnych źródeł węgla w podłożu, nazwaną CLPP – Community Level Physiological Profiling [26]. Metoda polega na ekstrakcji mikroorganizmów z gleby i bezpośredniej inokulacji płytek **Biolog**[®], zawierających odpowiednie źródła węgla zawieszoną mikroorganizmów. Wyznacznikiem degradacji źródła węgla jest wywołana zmiana barwy fioletu tetrazoliowego [33]. Przygotowanie zawiesiny mikroorganizmów glebowych obejmuje wytrząsanie gleby w wodzie lub płynie fizjologicznym oraz inokulację płytek otrzymanym roztworem glebowym. Następnie płytki inkubowane są w stałej temperaturze (Rys. 1). Zmiana barwy wywołana utlenianiem substratów w studzienkach jest mierzona spektrofotometrycznie jako absorbancja lub gęstość optyczna OD (Optical Density) [38].

L i u i wsp. [44] w badaniach profilu metabolicznego gleby wykorzystali 1 M bufor K_2HPO_4 (pH=7) w celu ekstrakcji mikroorganizmów. Zawieszone w nim cząsteczki gleby były wytrząsane przez 30 minut, a następnie po opadnięciu zawiesiny glebowej po kolejnych 30 minutach pobierano 2 ml supernatantu, wykonując odpowiednie rozcieńczenia. Inokulat w objętości 145 μ l wprowadzano do każdego dołka płytki. Inkubacja trwała 4 doby w temperaturze 26°C. Pomiar OD dokonywane były w 24 godzinnych odstępach, przy długości fali 590 nm.

Typy płytek

Na rynku występują płytki **Biolog**, które służą do identyfikacji oraz charakterystyki metabolicznej różnych grup mikroorganizmów: grzybów strzępkowych (FF plates), drożdży (YT plates), beztlenowców (AN plates), bakterii Gram⁺ (GP plates) oraz bakterii Gram⁻ (GN plates). W ostatnim czasie opracowano również płytki **GENIII**, które wykorzystuje się w identyfikacji bakterii Gram⁺ oraz Gram⁻ bez wcześniejszego ich różnicowania. Do czasu wprowadzenia płytek **GNIII** (**Biolog EcoPlates**) w badaniach środowiskowych wykorzystywano płytki **GN**.



Rys. 1. Analiza profilu katabolicznego zbiorowisk mikroorganizmów

Dla indywidualnych potrzeb stosuje się płytki Biolog[®] MT, które nie zawierają standardowych substratów, jak to ma miejsce w poprzednich przypadkach, ale są one wybierane do konkretnych eksperymentów. Płytki MT zawierają jedynie barwnik reagujący na reakcje utleniania i redukcji [32].

Czynniki wpływające na wyniki analizy i ograniczenia metody

Na wyniki analiz CLPP wpływa sposób przechowywania próbek do momentu analizy. G o b e r n a i wsp. [30] przeprowadzili badania dotyczące sposobu przechowywania (chłodzenie, zamrażanie i przechowywanie w temperaturze pokojowej) próbek gleby, pochodzących z różnych głębokości na profil metaboliczny. W wyniku badań stwierdzili, że sposób przechowywania gleby ma istotny wpływ na profil metaboliczny zbiorowisk bakterii. Zmianom ulega odsetek zużycia grup substratów w kierunku wykorzystania kwasów karboksylowych, fenoli i amin po 1 miesiącu przechowywania w temperaturze 4°C. Przypisuje się to fizycznym uszkodzeniom agregatów i zmianom zamkniętej w nich materii organicznej.

Gęstość inokulum może wpływać na profil otrzymany przy analizie CLPP [24]. Schmitt i wsp. [66] przeprowadzili badania z serią następujących po sobie rozcieńczeń. Każda płytka typu EcoPlate była zaszczipiana trzema kolejnymi rozcieńczeniami. Dla każdej serii i każdego z 31 substratów wyznaczone zostały krzywe zmiany zabarwienia – WCD (Well Color Development) oraz AWCD (Average Well Color Development). Profil metaboliczny został ustalony na podstawie udziału zabarwienia każdego substratu do całkowitego stanu zabarwienia płytki.

Innym bardzo ważnym ograniczeniem jest selektywność systemu Biolog[®] tylko do drobnoustrojów zdolnych do wzrostu i rozwoju w laboratoryjnych warunkach eksperymentalnych [26]. Metoda pokazuje zdolność do metabolizowania substratów nie przez całą populację drobnoustrojów, ale tylko przez grupę obejmującą mikroorganizmy hodowalne [62]. Kolejnym problemem jest wspomniana wcześniej niejednorodność w szybkości wzrostu bakterii. Podczas inkubacji, dynamicznie może się zmieniać struktura zbiorowiska bakterii. CLPP sprzyja szybko rozwijającym się szczepom, gdy inne jeszcze nie wykazują swego wzrostu i wkładu w rozkład substratów [27, 71].

CLPP w badaniach środowiskowych gleby

Omawiany system jest szeroko używany w badaniach środowiskowych, gdzie zbiorowiska bakteryjne analizowane są w kontekście indykatora stanu gleby poddanej działaniu różnych czynników. Badania G u a n e t i i wsp. [31] dotyczyły odłogowanej gleby zdegradowanej, ubogiej w materię organiczną oraz gleby użytkowanej rolniczo, gdzie badano zdolność degradacji celulozy. Wiele badań dotyczy również profilu metabolicznego gleb skażonych metalami ciężkimi. Badania różnorodności filogenetycznej obejmowały gleby aglomeracji miejskich, poddane ciągłej ekspozycji na metale ciężkie [82] oraz gleb skażonych metalami ciężkimi w warunkach eksperymentalnych. Znane są również badania dotyczące wpływu pojedynczych metali ciężkiego np. Cd [78] na drobnoustroje, lub działanie kilku metali równocześnie, np. Cu-Pb [55]. Liu i wsp. [44] przeprowadzili badania dotyczące akumulacji antybiotyków w glebie i oceny potencjalnych skutków ich występowania na mikroorganizmy agroekosystemów. Badania obejmowały m.in. zmiany funkcjonalnego różnicowania mikroorganizmów w glebie gliniastej traktowanej sulfametoksazolem (SMX) i chlorotetracyklinami (CTC). Znane są również badania wpływu akumulacji pestycydów w glebie na jej stan biologiczny z użyciem systemu Biolog EcoPlates [21]. Niektóre z badań odnoszą się do gleby nienaruszonej, nie poddanej działalności człowieka. Przykładem takich badań jest gleba pochodząca z naturalnego środowiska – Tatrzańskiego Parku Narodowego, w której oceniano wpływ czynniki-

ków mikroklimatycznych (silne wiatry niszczące połączoną, pożary obszarów leśnych) na stan gleby [28].

Analiza statystyczna

Jest wiele sposobów na przedstawienie wyników statystycznych uzyskanych w ramach badań przeprowadzonych z wykorzystaniem systemu Biolog. Wybór metody zależy od ilości pomiarów absorbancji dokonywanych podczas inkubacji płytek oraz specyfiki doświadczenia. Z uwagi na ciągłe zmiany procesów metabolicznych zachodzących na płytkach, wyrwykowe pomiary absorbancji mogą odzwierciedlać stan tylko niektórych populacji drobnoustrojów w próbce, a nie całej wspólnoty mikroorganizmów. Dlatego zaleca się wielokrotne pomiary w systematycznych odstępach czasu i wybieranie tych optymalnych dla badanych prób [27, 72]. Dla wskaźnika AWCD wybiera się pomiary charakteryzujące się ujednoczoną wartością absorbancji dla całej płytki [25]. AWCD jest obliczane na podstawie metody opracowanej przez Garlanda oraz Millsa [26] według wzoru:

$$AWCD = \Sigma(C-R)/n$$

C – odczyt spektrofotometryczny gęstości optycznej
R – odczyt spektrofotometryczny gęstości optycznej dołka kontrolnego
n – ilość substratów (dla płytek GN,GP n=91, dla Eco-Plate n=31).

Jako miarę substratów uległych utylizacji i różnorodności w stopniu wykorzystywania poszczególnych związków wykorzystuje się indeks Shannon-Weavera (H), który wyrażony jest wzorem:

$$H = \Sigma p_i \ln p_i$$

p_i – udział aktywności mikrobiologicznej na danym substracie [83].

Do analiz statystycznych również wykorzystywany jest indeks jednorodności (E):

$E = H/H_{max} = H/\log S$ oraz S (substrate richness) w tym wypadku to liczba substratów zużytych przez daną próbkę gleby.

Niezależnie od rodzaju pomiaru spektrofotometrycznego (OD, AWCD, parametry analizy kinetycznej, analiza poszczególnych substratów) do opracowania uzyskanych wyników niezbędne jest wykorzystanie wielowymiarowych metod statystycznych. Najbardziej popularną metodą jest analiza głównych składowych PCA (Principal Component Analysis). Każdy parametr krzywej kinetycznej lub pomiar absorbancji każdego z substratów jest kolejną zmienną, w konsekwencji ilość zmiennych może przewyższać ilość próbek [34]. Analiza głównych składowych zmniejsza liczbę zmiennych tylko do kilku lub kilkunastu składowych, które mają większe znaczenie – PC (Principal Component). Każda składowa (PC) jest wyznacznikiem innej kombinacji

początkowych zmiennych i wyjaśnia pewną część całkowitej zmienności [24]. W ocenie wyników wykorzystywana jest również analiza skupień, która umożliwia zbadanie powiązań pomiędzy grupami badanych substratów, pojedynczymi substratami, a badanymi obiektami doświadczalnymi.

5. Badanie różnorodności mikroorganizmów oparte na metodzie molekularnej

– PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Dużym problemem w badaniach biologii gleb jest wysoka różnorodność mikroorganizmów. Z puli drobnoustrojów występujących w próbkach środowiskowych tylko niewielki ułamek bakterii może być wyizolowany w warunkach laboratoryjnych przy użyciu pożywek różnicujących [36]. Z tego względu coraz częściej w badaniach środowiskowych wykorzystywane są metody polegające na ekstrakcji materiału genetycznego oraz powielania i badania zawartych w nim genów. Metody te są sposobem analizy zmian genetycznego zróżnicowania populacji mikroorganizmów środowiska glebowego [19]. Jedną z metod opartych na technikach biologii molekularnej jest PCR-DGGE (łańcuchowa reakcja polimerazy i elektroforeza w gradiencie żelu denaturującego). Metoda polega na amplifikacji badanego DNA ekstrahowanego z gleby i jego rozdzielanie w żelu denaturującym według składu nukleotydowego. Na żelu akrylamidowym powstaje genetyczny profil lub *fingerprint* (genetyczny odcisk), reprezentujący strukturę drobnoustrojów badanej próby glebowej. Każdy prążek reprezentuje inny genotyp mikroorganizmów, a względna liczebność mikroorganizmów jest skorelowana z intensywnością prążka. Otrzymany profil jest odzwierciedleniem proporcji produktów łańcuchowej reakcji polimerazy, lecz nie zawsze proporcji wyjściowej próbki [10].

Elektroforeza w gradiencie żelu denaturującego – DGGE (Denaturant Gel Gradient Electrophoresis) oraz elektroforeza w gradiencie temperatury – TGGE (Temperature Gel Gradient Electrophoresis) przyczyniła się do zrewolucjonizowania metod biologii molekularnej. Metoda PCR-DGGE początek zawdzięcza mikrobiologii klinicznej, gdzie została zastosowana do wykrywania mutacji punktowych w DNA. W tej metodzie produkty reakcji PCR o jednakowej długości są determinowane na podstawie różnic w składzie pojedynczych nukleotydów. Służą do tego czynniki denaturujące, tj. mocznik oraz formamid, które tworzą liniowy gradient w żelu (DGGE) oraz czynniki temperaturowe (TGGE) [43, 49]. Rozdzielanie fragmentów DNA w DGGE i TGGE wynika z faktu, iż więcej czynnika denaturującego jest potrzebne do rozszczepienia sekwencji zawierającej

znaczoną część guaniny i cytozyny. Między tymi nukleotydami znajdują się aż trzy wiązania wodorowe, stabilizujące podwójną helisę DNA, gdy między adeniną a tyminą tylko dwa. Gdy dwuniciowy fragment DNA zostanie częściowo stopiony, jego dalsza migracja w żelu poliakrylamidowym zostaje zatrzymana. Nastąpi to gdy domena o najmniejszej temperaturze topnienia (T_m) osiągnie charakterystyczną dla siebie T_m , docierając do odpowiedniego miejsca w liniowym gradientie temperatury lub substancji denaturującej. Różnice w temperaturach topnienia domen materiału genetycznego powodują różne ich końcowe umiejscowienie w żelu [51, 68].

Izolacja DNA

Pierwszym etapem w badaniach materiału genetycznego jest izolacja DNA, oczyszczanie oraz oszacowanie jego ilości i jakości. Większość metod opiera się na bezpośredniej lizie komórek drobnoustrojów z matrycy glebowej. Używa się do tego kombinacji metod związanych z wykorzystaniem trawienia enzymatycznego, detergentów oraz mechanicznego wytrząsania. Bez względu na rodzaj kwasu nukleinowego ekstrakcja powinna dostarczyć dużej ilości czystego materiału genetycznego. W przypadku izolacji kwasów nukleinowych z gleby otrzymanie dobrej jakości materiału genetycznego może być problematyczne, gdyż w glebie znajduje się frakcja organiczna, która przechodząc wraz z DNA lub RNA do dalszych etapów badań może zakłócać i hamować reakcję amplifikacji [29]. Dlatego też w badaniach próbek glebowych stosuje się metody oczyszczania materiału genetycznego, które są kluczowym etapem uzyskania wysokiej jakości kwasu nukleinowego.

Markery w łańcuchowej reakcji polimerazy

Wiele genów może być użytych jako markery molekularne w reakcji PCR. Należy pamiętać by były to regiony wysoko konserwatywne oraz zmienne gatunkowo. W większości publikacji dotyczących mikroorganizmów glebowych badania zbiorowisk bakterii prowadzone są w oparciu o jednostkę 16S rRNA [5, 57, 62, 70]. Badania zróżnicowania genetycznego zbiorowisk grzybów prowadzone są głównie w oparciu o fragmenty rybosomalnego DNA, jak 18S rRNA [6] oraz ITS2 [77]. Aby dokładnie zbadać bioróżnorodność mikroorganizmów glebowych, można użyć zarówno startery do różnicowania bakterii, jak i grzybów [6].

W celu wyznaczenia genetycznego polimorfizmu w środowisku glebowym można wykorzystywać startery do analizy genów funkcjonalnych. Gen kodujący podjednostkę monoooksygenazy amonu *amoA* jest stosowany w badaniach mikroorganizmów nityfikacyjnych środowisk naturalnych i stanowi odzwierciedlenie ich stanu filogenetycznego [1, 18, 40]. Geny kodujące reduktazę azotynu (*nirK* oraz *nirS*) są stosowane jako markery

molekularne dla zbiorowisk bakterii denitryfikacyjnych [74]. Gen *nirK* jest preferowany do badań próbek gleby, podczas gdy *nirS* do badań osadów morskich [8, 60].

Optymalizacja warunków metody

Ważnym krokiem metody DGGE jest analiza materiału genetycznego pod względem zdolności topnienia badanego DNA. Istotny jest dobór czasu trwania elektroforezy oraz skali gradientu. Żele z prostopadłym gradientem do kierunku elektroforezy, charakteryzują się gradientem denaturującym lub temperaturowym wzrastającym od lewej do prawej strony. Próbki nałożone po lewej stronie żelu (mała koncentracja czynnika denaturującego) będą poruszać się jako cząsteczka dsDNA, gdy próbki z prawej strony (duża koncentracja czynnika denaturującego) będą od razu denaturowane i zatrzymane w żelu. Pośrodku żelu ruchliwość DNA zależy od koncentracji czynnika denaturującego, odpowiadającego domenie o najmniejszej temperaturze topnienia [51]. W celu wyznaczenia odpowiedniego gradientu dla różnych fragmentów DNA, można również zastosować żel o szerokim spektrum denaturacji, np. 20–80%. Taki eksperyment pozwala na optymalizację zakresu czynnika denaturującego, w którym wszystkie prążki będą skutecznie uchwycone, w odniesieniu do badanej próbki. W przypadku bardzo złożonych zbiorowisk bakterii, może być konieczne użycie nawet kilku (dwa lub więcej) żeli o różnych zakresach gradientu [37].

Optymalny czas trwania elektroforezy, wyznaczany jest w żelu z coraz większym temperaturowym lub denaturującym gradientem, rosnącym liniowo wraz z kierunkiem elektroforezy. Próbki DNA wprowadzane są na żel w stałych odstępach czasu (np. 30 minut), aby wyznaczyć maksymalną rozdzielczość dla danego materiału w czasie. Gdy materiał genetyczny dotrze do punktu jego częściowej denaturacji i nie będzie poruszał się dalej mimo dalszej elektroforezy. Do badań powinien zostać wybrany minimalny czas zatrzymania migracji DNA w żelu. W celu otrzymania większej rozdzielności prążków, czas trwania elektroforezy powinien być skorelowany z właściwym napięciem elektrycznym. Porównując migrację tych samych próbek w różnych warunkach, najlepszy stopień rozdzielenia uzyskiwany jest przy wysokich napięciach i krótkich czasach trwania elektroforezy [50, 51, 69].

Aby sprawdzić jak warunki aparaturowe (procent akrylamidu w żelu, grubość żelu, głębokość studzienek wyznaczających drogę migracji DNA, objętość nakładanych próbek, ilość DNA, zagęszczenie żelu, temperatura, napięcie elektryczne, czas elektroforezy) wpływają na profil genetyczny, A s c h e r i wsp. [6] zbadali dwa systemy obsługujące DGGE. System 1-DCode, Biorad, Hercules, CA, USA oraz System 2 Ingeny PhorU system, Ingeny, Leiden, NL. Są to pierwsze tego typu badania, uwzględniające aparaturę jako

czynnik wpływający na wyniki analizy struktury zbiorowisk mikroorganizmów w glebie.

Modyfikacje i sposoby zwiększenia efektywności metody PCR-DGGE

Metoda PCR-DGGE oparta na analizie w obrębie genu 16S rRNA, pomimo że jest obecnie bardzo popularna, posiada liczne mankamenty, które prowadzą do uzyskiwania błędnych wyników. Ahn i wsp. [2] badali wybrane parametry i procedury jako ewentualne źródła zafałszowania wyników. Badania te obejmowały weryfikację następujących parametrów metody: dopasowanie starterów, koncentracja dNTP-ów, rodzaj polimerazy, struktura drugorzędowa produktów reakcji PCR, koncentracja akrylamidu i bisakrylamidu w żelu, T_m domen materiału genetycznego. Badania wykazały, iż intensywność prążków zależy od różnicy w temperaturach topnienia pomiędzy domeną o najwyższej i najniższej T_m , tj. prążki są intensywniejsze gdy różnica ta jest niewielka, pomimo wprowadzenia takiej samej ilości DNA do studzienek. Pod względem ilościowym populacje bakterii glebowych zostały najefektywniej wykryte i uwidocznione, gdy zastosowano kombinację starterów w reakcji PCR, zoptymalizowano koncentrację dNTP-ów w mieszaninie reakcyjnej i dobrano koncentrację akrylamidu/bisakrylamidu w żelu denaturującym.

Problemem pojawiającym się w analizach otrzymanych profili genetycznych jest występowanie podwójnych prążków, które w istocie powinny tworzyć jeden prążek, odpowiadający jednej populacji mikroorganizmów. Artefakty w postaci podwójnych prążków prowadzą do zawyżonej oceny różnorodności genetycznej próbki środowiskowej. Opracowano prosty sposób wyeliminowania tego problemu, poprzez modyfikację warunków reakcji PCR. Dodatkowe prążki mogą powstawać jako niespecyficzne produkty podczas reakcji PCR, gdy elongacja zostanie przedwcześnie zakończona. Zastosowanie dłuższego czasu ostatecznej elongacji pozwala na dokończenie przyłączania odpowiednich nukleotydów przez polimerazę, co zmniejsza ryzyko uzyskania podwójnych prążków, utrudniających analizę uzyskanych wyników [35].

Ponadto, by uzyskać wyraźne wyniki rozdziału i większą wykrywalność do jednego końca startera należy dołączyć klamry zawierające sekwencje GC o długości 30–50 nukleotydów. Działają one jak domeny o wysokiej temperaturze topnienia, nie pozwalając na zupełne rozszczepienie podwójnej nici DNA [68].

6. Podsumowanie

W pracy został przedstawiony przegląd podstawowych metod użytecznych w badaniu mikrobiologii gleby, z uwzględnieniem badań molekularnych, przy czym należy zwrócić uwagę na ich uniwersalność.

Omówione metody mogą być wykorzystywane praktycznie do badań każdego typu odpadów organicznych oraz gleb poddanych działaniu tych odpadów, przy minimalnej optymalizacji procedur laboratoryjnych. W mikrobiologii środowiskowej użycie technik molekularnych ułatwia analizę zbiorowisk mikroorganizmów, jednak do pełnej charakterystyki zespołów mikroorganizmów występujących w odpadach i glebach poddanych ich działaniu, konieczne jest połączenie technik molekularnych z konwencjonalnymi metodami mikrobiologicznymi, z uwzględnieniem analizy profilu metabolicznego, różnorodności funkcjonalnej oraz aktywności enzymatycznej badanego środowiska.

Piśmiennictwo

1. Aakra A., Utaker J.B., Pommerening-Roser A., Koops H.P., Nes I.F.: Detailed phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 2021–2030 (2001)
2. Ahn J.H., Kim Y.J., Kim T., Song H.G., Kang Ch.H., Ka J.O.: Quantitative improvement of 16S rDNA DGGE analysis for soil bacterial community using real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* **78**, 216–222 (2009)
3. Andrés P.: Ecological risk of the use of sludge as fertilizer in soil restoration: Effects on the soil microarthropod populations. *Land Degrad. Develop.* **10**, 67–77 (1999)
4. Antolín M. C., Pascual I., García C., Polo A., Sánchez-Díaz M.: Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean conditions. *Field Crops Res.* **94**, 224–237 (2005)
5. Asakawa S., Makoto M.: Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 1322–1329 (2008)
6. Ascher J., Ceccherini M., Chroňáková A., Jirout J., Borgogni F., Elhottová D., Šimek M., Pietramellara G.: Evaluation of the denaturing gradient gel electrophoresis-apparatus as a parameter influencing soil microbial community fingerprinting. *World J. Microb. Biotechnol.* **26**, 1721–1726 (2010)
7. Bandick A.K., Dick R.P.: Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1471–1479 (1999)
8. Braker G., Zhou J., Wu L., Devol A.H., Tiedje J.M.: Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2096–2104 (2000)
9. Burns R.G.: Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. *Soil. Biol. Biochem.* **14**, 423–427 (1982)
10. Chandler D.P., Frederickson J.K., Brockman J.: Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. *Molecular Ecology*, **6**, 475–482 (1997)
11. De Neve S., Sleutel S., Hofman G.: Carbon mineralization from composts and food industry wastes added to soil. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **67**, 13–20 (2003)
12. Demirbas A.: Waste management, waste resource facilities and waste conversion processes. *Energy Conv. Manag.* **52**, 1280–1287 (2011)
13. Deng S.P., Tabatabai M.A.: Cellulase activity of soils. *Soil. Biol. Biochem.* **26**, 1347–1354 (1994)
14. Dick R.P.: Soil enzyme activities as indicators of soil quality In: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*, red. Doran

- i wsp. Soil Science Society of America, Madison, s. 107–124, (1994)
15. Dick W.A., Cheng L., Wang P.: Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol. Biochem.* **32**, 1915–1919 (2000)
 16. Dick W.A., Tabatabai M.A.: Significance and potential uses of soil enzymes. In: J. Soil Microb. Ecol., red. Metting F.M. Dekker, New York, s. 95–127, (1993)
 17. Diekow J., Mielniczuk J., Knicker H., Bayer C., Deborah P.D., Kogel-Knabner I.: Carbon and nitrogen stocks in physical fractions of a subtropical Acrisol as influenced by long-term no-till cropping systems and N fertilization. *Plant. Soil*, **268**, 319–328 (2005)
 18. Dong X., Reddy G. B.: Ammonia-oxidizing bacterial community and nitrification rates in constructed wetlands treating swine wastewater. *Ecol. Eng.* **40**, 189–197 (2012)
 19. Ellis R.J., Morgan P., Weightman A.J., Fry J.C.: Cultivation dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 3223–3230 (2003)
 20. Esen A.: β -Glucosidases: overview (w): β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology, red. Esen A. American Chemical Society, Washington, DC, 1993 s. 1–141
 21. Floch C., Chevremont A.C., Joanic K., Capowiez Y., Criquet S.: Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog Eco-plates. *Eur. J. Soil Biol.* **47**, 256–263 (2011)
 22. Frąc M., Jezierska-Tys S.: Agricultural utilisation of dairy sewage sludge: Its effect on enzymatic activity and microorganisms of the soil environment. *Afric. J. Microb. Res.* **5**, 1755–1762 (2011)
 23. Garcia C., Hernandez T., Costa F.: Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soil. *Sci. Plant Anal.* **28**, 123–134 (1997)
 24. Garland J.L.: Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**, 289 (1997)
 25. Garland J. L.: Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 213 (1996)
 26. Garland J.L., Mills A.: Classification and characterisation of heterotrophic microbial communities on the basis or patterns of community level sole carbon source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2351–235 (1991)
 27. Gomez E., Ferreras L., Conti M.: Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* **26**, 21–30 (2004)
 28. Gömöryová E., Štrelcová K., Gömöry P.D.G.: Soil microbial characteristics at the monitoring plots on windthrow areas of the Tatra National Park (Slovakia): their assessment as environmental indicators. *Environ. Monit. Assess.* **174**, 31–45 (2011)
 29. Griffith R.I., Manefield M., Whiteley A.S., Bailey M.J.: DNA and RNA extraction from soil (w) *Molekular Micriobioloial Ecology Manual*, red. Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D.L., van Elsas J.D., Kluwert Acad. Pub. Second Edition, s. 149–158 (2004)
 30. Groberna M., Insam H., Pascual J.A., Sanchez J.: Strage effects on the community level physiological profiles of Mediterranean forest soil. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 173–178 (2005).
 31. Guenet B., Juarez S., Bardoux G., Pouteaud V., Cheviron N., Marraud Ch., Abbadie L., Chenu C.: Metabolic capacities of microorganisms from a long-term bare fallow. *Appl. Soil Ecol.* **51**, 87–93 (2011)
 32. Haack S.K., Garchowh Klug M.J., Forneyl J.: Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1458 (1995)
 33. Hatzinger P.B., Palmer P., Smith R.L., Peñarrieta C.T., Yoshinari T.: Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **52**, 47–58 (2003)
 34. Heuer H., Smalla K.: Evaluation of community-level catabolic profiling using Biolog GNmicroplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J. Microbiol. Meth.* **30**, 49 (1997)
 35. Janse I., Bok J., Zwart G.: A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microb. Meth.* **57**, 279–281 (2004)
 36. Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait M.: Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microb.* **68**, 2391–239 (2002)
 37. Joynt J., Bischoff R.F., Turco A., Konopka M., Nakatsu C.H.: Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and organic solvents. *Microb. Ecol.* **51**, 209–219 (2006)
 38. Kelly J.J., Tate R.L.: Use of Biolog for the analysis of microbial communities from zinc-contaminated soils. *J. Environ. Qual.* **27**, 600 (1998)
 39. Knight T.R., Dick R.P.: Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 2089–2096 (2004)
 40. Kowalchuk G.A., Stephen. J.R.: Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 485–529 (2001)
 41. Ladd J.N., Jackson R.B. Nitrogen in Agricultural Soils (w) Am. Soc. Agron red. Stevenson F.J., Wl., s. 173–228 (1982)
 42. Lagomarsino A., Moscatelli M.C., Di Tizio A., Mancinelli R., Grego S., Marinari S.: Soil biochemical indicators as a tool to assess the short-term impact of agricultural management on changes in organic C in a Mediterranean environment. *Ecol. Indic.* **9**, 518–527 (2009)
 43. Lessa E.P., Applebaum G.: Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol. Ecol.* **2**, 119–129 (1993)
 44. Liu F, Wu J, Ying G. G., Luo Z., Feng H.: Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1615–1623 (2012)
 45. López-Mosquera M.E., Morión C., Carral E.: User of dairy-industry sludge as fertilizer for grasslands in northwest Spain: Heavy metal levels in soil and plants. *Res. Conserw. Recycl.* **30**, 95–109 (2000)
 46. Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A.: Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *Afric. J. Biotechnol.* **7**, 181–191 (2008)
 47. McCarty G.W., Shogren D.R., Bremner J.M.: Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Biol. Fert. Soil.* **12**, 261–264 (1992)
 48. Mele P.M., Crowley D.E.: Application of self-organizing maps for assessing soil biological quality. *Agric. Ecosyst. Environ.* **126**, 139–152 (2008)
 49. Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700 (1993)
 50. Muyzer G., Hottentrager A.P., Wawer C.: Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA: A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities (w) *Molecular microbial ecology manual*, red. Akkermans i wsp., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, the Netherlands, s. 1–23 (1996)
 51. Muyzer G., Smalla K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gel gradient (TGGE)

- in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 127–141 (1998)
52. Nannipieri P.: Potential use of soil enzymes as indicator of productivity, sustainability and pollution (w) *Soil Biota. Management in sustainable Farming System*, red. Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R., Grace P.R., CSIRO, Adelaide, s. 238–244 (1994)
 53. Nautiyal C.S., Chauhan P.S., Mehta DasGupta S., Seem K., Varma A., Staddon W.J.: Tripartite interactions among *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, *Piriformospora indica* DSM 11827, and *Cicer arietinum* L. *W.J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1393–1399 (2010)
 54. Ndiaye E.L., Sandeno J.M., McGrath D., Dick R.P.: Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *Am. J. Altern. Agric.* **15**, 26–36 (2000)
 55. Pan J., Yo L.: Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. *Ecol. Eng.* **37**, 1889–1894 (2011)
 56. Peng X.H., Zhang B., Zhao Q.G.: Effect of soil organic carbon on aggregate stability after vegetative restoration on severely eroded red soil. *Acta Ecol. Sinica*, **23**, 2176–2182 (2003)
 57. Pérez-Leblic M.I., Turmero A., Hernández M., Hernández A.J., Pastor J., Ball A.S., Rodríguez J., Arias M.E.: Influence of xenobiotic contaminants on landfill soil microbial activity and diversity. *J. Environ. Manag.* **95**, 285–290 (2012)
 58. Perucci P., Bonciarelli U., Santilocchi R., Bianchi A.A.: Effect of rotation, nitrogen fertilization and management of crop residues on some chemical, microbiological and biochemical properties of soil. *Biol. Fertil. Soils*, **24**, 311–316 (1997)
 59. Preston S., Wirth S., Ritz K., Griffiths B.S., Young L.M.: The role played by microorganisms in the biogenesis of soil cracks: importance of substrate quantity and quality. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 1851–1858 (2001)
 60. Prieme A., Braker G., Tiedje J. M.: Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1893–1900 (2002)
 61. Richmond P.A. Occurrence and functions of native cellulose (w) *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*, red. Haigler C.H. oraz Weimer P.J., Dekker, New York, s. 5–23 (1991)
 62. Ros M., Goberna M., Pascual J.A., Klammer S., Insam H.: 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *J. Microb. Meth.* **72**, 221–226 (2008)
 63. Ros M., Hernandez M.T., Garcia C.: Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 463–469 (2003)
 64. Ross D.J.: Invertase and amylase activities in ryegrass and white clover plants and their relationships with activities in soils under pasture. *Soil Biol. Biochem.* **8**, 351–356 (1976)
 65. Ruiz T., Kaosol T., Wisniewski Ch.: Dewatering of urban residual sludges: Filterability and hydro-textural characteristics of conditioned sludge. *Sep. Purif. Technol.* **72**, 275–281 (2010)
 66. Schmitt H., Haapakangas H., van Beelen P.: Effects of antibiotics on soil microorganisms: time and nutrients influence pollution-induced community tolerance. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1882–1892 (2005).
 67. Shan Q., Yu Y., Yu J., Zhang J.: Soil enzyme activities and their indication for fertility of urban forest soil. *Front. Environ. Sci. Engin. China*, **2**, 218–223 (2008)
 68. Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S., Myers R.M.: Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 232–236 (1989)
 69. Sigler W.V., Miniaci C., Zeyer J.: Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. *J. Microbiol. Meth.* **57**, 17–22 (2004)
 70. Silva G.S., Marques E.L.S., Dias J.C.T., Lobo I.P., Gross E., Brednel M., da Cruz R.S., Rezende R.P.: Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic Rain Forest. *Appl. Soil Ecol.* **55**, 27–35 (2012)
 71. Smalla K., Wachtendorf U., Heuer H., Liu W.T., Forney L.: Analysis of Biolog GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1220–1225 (1998)
 72. Stefanowicz A.: The Biolog Plates Technique as a Tool in Ecological Studies of Microbial Communities. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 669–676 (2006)
 73. Stevenson J.J.: *Cycles of soil: C, N, P, S, Micronutrients*. John Wiley, New York 1986.
 74. Strous M., Pelletier E., Manganot S., Rattei T., Lehner A., Taylor M.W.: Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, **44**, 790–794 (2006)
 75. Suhadolc M., Schroll R., Hagn A., Dorfler U., Michael M., Lobnik F.: Single application of sewage sludge – Impact on the quality of an alluvial agricultural soil. *Chemosphere*, **81**, 1536–1543 (2010)
 76. Thoma J.A., Spradlin J.E., Dygert S.: *Plant and animal amylases (w) The Enzymes*, red. Boyer P.D., *The Enzymes*, Ed 3, Vol. 5. Academic Press, New York, 1970 s. 115–189
 77. Thornhill D.J., Kemp D.W., Sampayo E.M., Schmidt G.W.: Comparative analyses of amplicon migration behavior in differing denaturing gradient electrophoresis (DGGE) systems. *Coral. Reefs*, **29**, 83–91 (2010)
 78. Wakerin S.T., Chu G., Liang Y, McLaughlin M.: A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes. *Pedobiologia*, **53**, 149–158 (2010)
 79. Wang J., Yi Y.L., De Tang F, Rui Pang X., Lin Chen Z., Peng L.M., Zhou X.Y., Yang Ch.L.: Effects of Composted Sewage Sludge on the Enzyme Activities in the Aeolian Sandy Soil. *Adv. Mat. Res.* **523**, 3341–3344 (2012)
 80. Wardle D.A.: A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. *Biol. Rev.* **67**, 321–358 (1992)
 81. Włodarczyk T., Stępniewski W., Brzezińska M.: Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions. *Biol. Fertil. Soils*, **36**, 200–206 (2002)
 82. Yuangen T., Campbell C.D., Clark L., Cameron C.M., Paterson E.: Microbial indicators of heavy metal contamination in urban and rural soils. *Chemosphere*, **63**, 1942–1952 (2006)
 83. Zak J.C., Willing M.R., Moorhead D.L., Widman H.G.: Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 1101–1108 (1994)
 84. Federal Register/Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge/Vol. 66, No. 246/Friday, December 21, 2001
 85. Uchwała Rady Ministrów Nr 233 z dnia 29 grudnia 2006 r. w sprawie „Krajowego planu gospodarki odpadami 2010”
 86. Survey of wastes spread on land – draft final report. European Commission Directorate General for Environment. Gendebien A.H., Ferguson R., Brink J., Horth H., Sullivan M., Davis R. i wsp. 2001

Praca naukowa finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Programu LIDER 2011–2014.



