

Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi w procesie jej detoksykacji

Anna Małachowska-Jutsz

Joanna Mrozowska

Maria Kozielska

Korneliusz Miksch

Instytut Inżynierii Środowiska i Energetyki

Politechnika Śląska

Gliwice

1. Wstęp

Rosnące zapotrzebowanie na produkty przemysłu naftowego i wynikająca stąd konieczność ich magazynowania i dystrybucji, stwarza poważne zagrożenie w środowisku naturalnym. Coraz częstsze skażenia gleby i wód powierzchniowych ropą i jej pochodnymi, zmuszają do szukania rozwiązań mających na celu odwrócenie drastycznych i długotrwałych zmian w ekosystemach.

Badania ostatnich lat wniosły wiele nowych informacji o wpływie ropopochodnych na glebę jako środowisko bytowania mikroorganizmów. Często jednak eksperymenty mające określić oddziaływanie ropy naftowej, bądź jej pochodnych na mikroorganizmy, przeprowadzane są *in vitro*, w warunkach laboratoryjnych, często z zastosowaniem czystych kultur. Istnieje niewiele pozycji literaturowych na temat oddziaływania ropopochodnych bezpośrednio na środowisko naturalne, w tym również glebowe. Niektórzy autorzy zwracają uwagę na to, że w badaniach ekotoksykologicznych powinna obowiązywać zasada realizmu środowiskowego. Oznacza to, że badania wpływu danego ksenobiotyku na środowisko należy przeprowadzać bezpośrednio w nim, traktując je jako całość i nie rozdzielać jego części biotycznej od abiotycznej. Dodatkowym problemem jest określenie czasu w jakim bada się wpływ ksenobiotyków na środowisko. Istotne, jak się wydaje, jest to żeby badania obejmowały okres co najmniej kilku bądź kilkunastu miesięcy, ponieważ szybkość procesu biodegradacji jest wypadkową oddziaływania ropopochodnych na żyjące w glebie drobnoustroje, jej struktury oraz rodzaju rozkładanego substratu. Związki chemiczne wchodzące w skład substratów rozkła-

dane są w określonej kolejności, czemu z reguły towarzyszy charakterystyczna sukcesja mikroorganizmów (1).

W celu określenia stopnia zagrożenia, wskazana jest identyfikacja związków chemicznych (13). W przypadku złożonych mieszanin, jakimi są produkty naftowe, identyfikacja obejmuje co najmniej podstawowe składniki grupowe będące w tych produktach (m.in. węglowodory alifatyczne, parafinowe i olefinowe, naftenowe i aromatyczne). Produkty ropopochodne zanieczyszczające środowisko glebowe rozpraszają się w nim w postaci substancji pływających na powierzchni roztworu glebowego, węglowodorów rozpuszczonych w wodzie, resztkowych zanieczyszczeń zaadsorbowanych na cząstkach gleby oraz gazów.

Fleischer (8) wytypował listę trzynastu specyficznych składników produktów ropopochodnych, które cechuje tendencja do rozprzestrzeniania się w środowisku glebowym, a także potencjalna toksyczność — (tab. 1).

TABELA 1
WYRÓŻNIONE SKŁADNIKI PRODUKTÓW ROPOPOCHODNYCH

Benzyna i oleje napędowe	Paliwa ciężkie
benzen	benzo(α)antracen
etylobenzen	benzo(α)piren
n-heptan	naftalen
n-pentan	fenantren
n-heksan	
l-pentan	
o-ksylen	
toluen	
fenol	

Decydującym etapem przemian biochemicznych, towarzyszącym rozkładowi węglowodorów wchodzących w skład produktów ropopochodnych, jest utlenianie alkanów oraz rozrywanie pierścieni aromatycznych. Procesy te są katalizowane przez specyficzne enzymy. Tylko niektóre mikroorganizmy są wyposażone w tego typu systemy enzymatyczne i wykazują zdolność rozkładu węglowodorów (11).

W pracy tej podjęto próbę zbadania wpływu olejów — lekkiego i ciężkiego, na aktywność biologiczną gleby i proces humifikacji. Wpływ ten określono za pomocą aktywności wybranych enzymów: proteaz, amylaz, dehydrogenaz i celulazy Cx. Oddziaływanie olejów na te enzymy wyrażono w postaci wskaźnika EC₅₀ (14). Ponadto glebę poddaną działaniu tych olejów próbowano rekultywować poprzez dodawanie do niej węglanu wapnia (powodującego desorpcję substancji odżywczych z koloidu glebowego i poprawiającego jego strukturę) oraz zaadaptowanych do rozkładu tych olejów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*.

2. Metodyka badań

Do badań użyto gleby o małej zawartości próchnicy pobranej z terenów leśnych oddalonych od źródeł emisji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (z warstwy, która nie przekraczała 30 cm grubości), o pH = 4,1. Glebę podsuszono na powietrzu, a następnie przesiano przez sito o średnicy oczek 1 mm. Porcje gleby w ilości 2000 g umieszczono w wiaderkach i doprowadzono do wilgotności wagowej 26% (utrzymywano ją na tym poziomie przez cały okres eksperymentu). Po wymieszaniu odstawiono ją na 7 dni w temperaturze pokojowej, w celu uaktywnienia mikroflory glebowej i ustalenia się równowagi biologicznej. Po tym okresie wykonano analizy mikrobiologiczne. Stwierdzono, że glebę zasiedlały bakterie, grzyby oraz promieniowce (17).

Kontrolę stanowiła gleba, do której nie wprowadzono czynników modyfikujących i oleju.

Zaadaptowana szczepionka bakteryjna, wprowadzona do gleby skażonej olejami, została przygotowana w następujący sposób:

1. Izolowano dominujące szczepy z gleby (o wysokiej zawartości substancji olejowych) terenów rafinerii Czechowice-Dziedzice metodą pasażowania:

— 10 g uśrednionej gleby + 90 cm³ soli fizjologicznej napowietrzano i mieszano przez 72 h (w warunkach głodowych w stosunku do mikroflory przypadkowej);

— pobrano 10 cm³ zawiesiny + 90 cm³ pożywki mineralnej MM + 1% oleju i inkubowano 72 h; następnie wykonano posiew 0,1 cm³ z rozcieńczenia 10⁻⁵ i inkubowano przez 48 h w temp. 27°C;

— wykonano posiew na podłoże YS z wyciągiem glebowym przygotowanym z pobranej z Czechowic gleby (9);

— wyizolowano czyste kultury i wybrano 10 dominujących grup z posiewu;

— wyizolowane szczepy przesiano na skosy agarowe.

2. Wybrano szczep najbardziej aktywny w stosunku do olejów: lekkiego i ciężkiego. Zastosowano tu metodę testowania. Na podłożu MM + 1% oleju zaszczepiono jednakową ilość materiału biologicznego i po 24 h hodowli sprawdzono nefelometrycznie procent transmisji (kontrolę stanowiła próbka bez bakterii).

3. Oznaczono wyizolowany szczep metodą EPL-21 i stwierdzono, że należy do rodzaju *Pseudomonas* sp. Wyizolowany szczep namnażano na podłożu MM + 1% oleju, odwirowano, zawieszono w soli fizjologicznej.

4. Wprowadzono do wytypowanych wiaderk w określonej ilości objętościowej i o określonej gęstości optycznej.

Aktywność poszczególnych enzymów w glebie skażonej olejem lekkim lub ciężkim przedstawiono jako odsetek aktywności tych enzymów w stosunku do gleby kontrolnej. Oddziaływanie olejów na badane enzymy glebowe wyrażono w formie tzw. wskaźnika EC₅₀, tj. dawki, przy której aktywność badanego enzymu została obniżona o 50% (14). Wyznaczono ją graficznie poprzez wykreślenie zależności pomiędzy aktywnością badanego enzymu a ln. dawki oleju. Ilość powstałych kwasów huminowych przedstawiono jako procent ilości tych kwasów w odniesieniu do masy próby kontrolnej.

Oznaczenie aktywności poszczególnych enzymów glebowych, tj. celulazy Cx, amylaz, proteaz i dehydrogenaz wykonano wg (15). Oznaczenie ilości kwasów huminowych wykonano na podstawie metody opracowanej przez Chena i Schnitzera (16).

Procentową zawartość kwasów huminowych oznaczono wg wzoru:

$$X = H/G \cdot 100 [\%]$$

H — ilość osadu uzyskanego po wysuszeniu do stałej wagi w temp. 60°C,

G — ilość gleby użytej do oznaczenia,

X — procentowa zawartość kwasów huminowych w badanej glebie.

3. Omówienie wyników

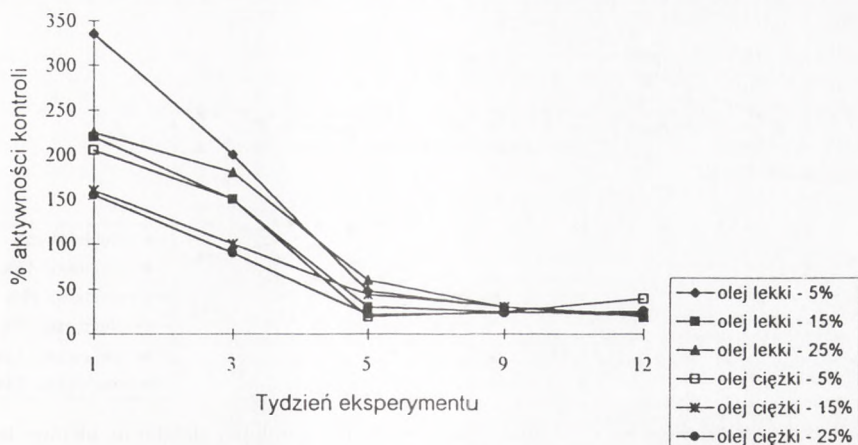
Badając wpływ stosowanych olejów na enzymy stwierdzono, że olej lekki oddziaływał bardziej niekorzystnie na ich aktywność niż ciężki. W przypadku wszystkich badanych enzymów w miarę upływu czasu stwierdzono spadek ich aktywności.

TABELA 2
KOMBINACJE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ MODELOWYCH

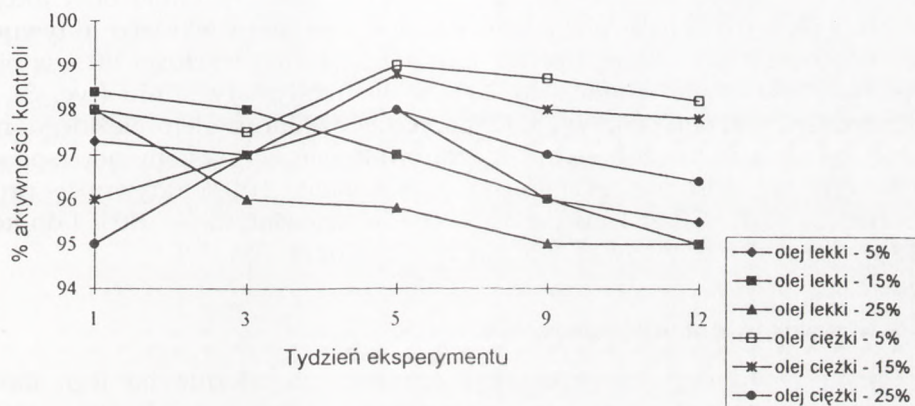
Olej	Stężenie w glebie (%)	Próbki gleby		
		1	2	3
lekki napędowy	5	olej	olej + CaCO ₃	olej + CaCO ₃ + bakterie
	15	olej	olej + CaCO ₃	olej + CaCO ₃ + bakterie
	25	olej	olej + CaCO ₃	olej + CaCO ₃ + bakterie
ciężki przekładniowy — Hipol	5	olej	olej + CaCO ₃	olej + CaCO ₃ + bakterie
	15	olej	olej + CaCO ₃	olej + CaCO ₃ + bakterie
	25	olej	olej + CaCO ₃	olej + CaCO ₃ + bakterie

3.1. Aktywność amylolityczna

W początkowym okresie eksperymentu (do trzeciego tygodnia) aktywność amylaz była wyraźnie stymulowana (w porównaniu z glebą kontrolną), zarówno w glebie w której znajdował się olej lekki, jak i ciężki (ryc. 1). Od piątego tygodnia badań, niezależnie od dawki oraz rodzaju ksenobiotyku aktywność amylaz praktycznie się nie zmieniła i oscylowała w granicach 50% aktywności próby kontrolnej (ryc. 1).



Ryc. 1. Krzywe ekotoksykologiczne dla amylaz w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego.



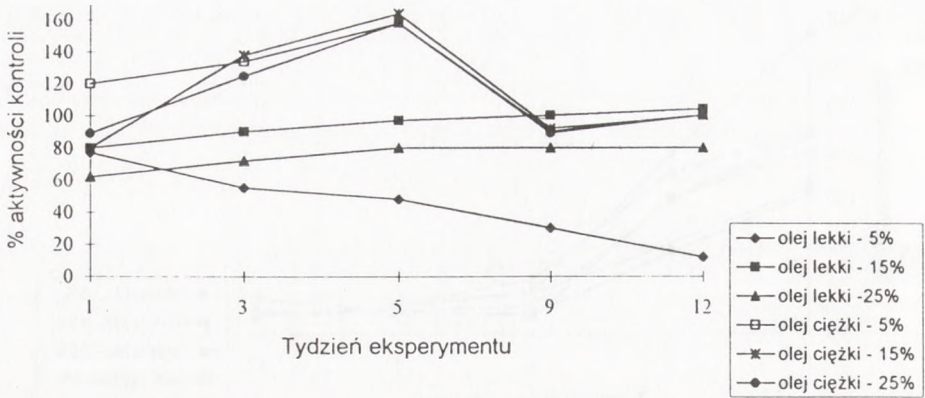
Ryc. 2. Krzywe ekotoksykologiczne dla celulazy Cx w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego.

3.2. Aktywność celulazy Cx

Aktywność celulazy Cx przez cały okres eksperymentu utrzymywała się mniej więcej na stałym poziomie, niezależnie od dawki i rodzaju ksenobiotyku i wahała się w granicach 95 – 97,5% aktywności próby kontrolnej (ryc. 2).

3.3. Aktywność proteolityczna

Aktywność proteolityczna w glebie poddanej działaniu oleju ciężkiego była wyższa aniżeli w glebie z dodatkiem oleju lekkiego. W glebie z dodatkiem oleju lekkiego w ilościach 15% oraz 25% aktywność proteolityczna utrzymywała się przez cały okres eksperymentu mniej więcej na tym samym poziomie



Ryc. 3. Krzywe ekotoksylogiczne dla proteaz w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego.

i wynosiła dla dawki 15% — około 85%, a dla 25% — około 60% aktywności próby kontrolnej. W glebie z dodatkiem 5% oleju lekkiego aktywność badanych enzymów w miarę upływu czasu zmalała od wartości 80% w pierwszym tygodniu eksperymentu do 20% w dwunastym tygodniu (ryc. 3).

Aktywność proteolityczna w glebie poddanej działaniu oleju ciężkiego, niezależnie od dawki ksenobiotyku kształtowała się w następujący sposób: w pierwszym tygodniu eksperymentu wynosiła około 100% aktywności próby kontrolnej, w piątym tygodniu badań 150%, w dziewiątym — 80% i do końca eksperymentu utrzymywała się na tym poziomie (ryc. 3).

3.4. Aktywność dehydrogenazowa

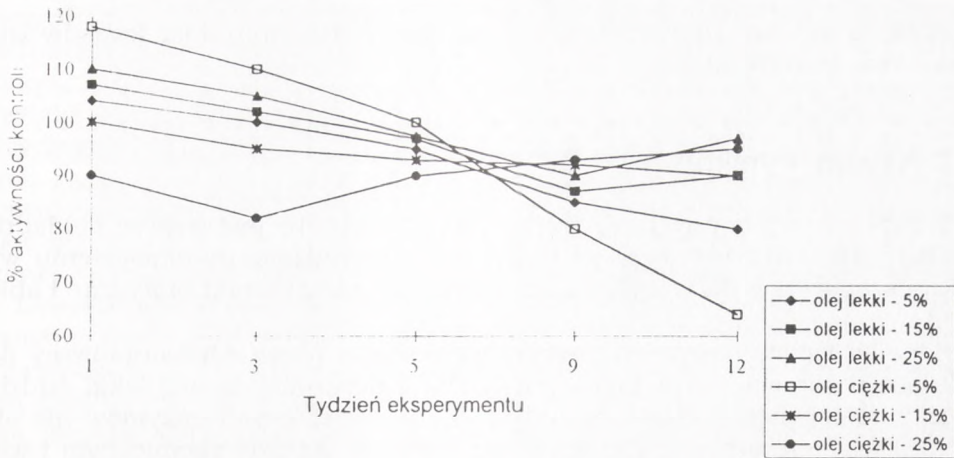
W glebie poddanej działaniu oleju lekkiego niezależnie od jego dawki aktywność dehydrogenaz w pierwszym tygodniu badań wynosiła 105 – 110%, w piątym tygodniu około 100% aktywności próby kontrolnej, w dwunastym tygodniu aktywność dehydrogenaz wahała się od 80% dla stężenia 5%, 92% dla 15% i 100% dla 25% oleju (ryc. 4).

W glebie poddanej działaniu oleju ciężkiego sytuacja była podobna, z tą jednak różnicą, że w glebie z dodatkiem 5% oleju aktywność badanych enzymów spadła z początkowej wartości 120% w pierwszym tygodniu do około 64% w dwunastym tygodniu (ryc. 4).

3.5. Zawartość kwasów huminowych

Podczas doświadczenia oznaczono również ilość kwasów huminowych na początku i na końcu badań.

Na początku badań w glebie nie poddanej działaniu ksenobiotyku (w kontroli) kwasy huminowe stanowiły 19,5% całej jej masy. W glebie poddanej działaniu oleju lekkiego, oraz oleju lekkiego + czynniki modyfikujące ilość



Ryc. 4. Krzywe ekotoksykologiczne dla dehydrogenaz w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego.

kwasy huminowych niewiele różniła się od kontroli (tab. 3). Po dwunastu tygodniach eksperymentu ilość kwasów huminowych w glebie kontrolnej wzrosła o około 1% w porównaniu z początkową ich zawartością. Oznaczona zawartość kwasów huminowych w glebie skażonej 5, 15 oraz 25% olejem lekkim była niższa niż ich ilość w próbce kontrolnej (tab. 3). Dodatek modyfikatorów spowodował wzrost oznaczanych kwasów w porównaniu z glebą bez ich dodatku (tab. 3).

TABELA 3
ILOŚĆ KWASÓW HUMINOWYCH POWSTAŁYCH
W GLEBIE Poddanej DZIAŁANIU OLEJÓW: LEKKIEGO I CIĘŻKIEGO

Stężenie oleju (%)	Olej lekki		Olej ciężki	
	2 tydzień	12 tydzień	2 tydzień	12 tydzień
5	16,5	21,0	11,0	22,0
5 + CaCO ₃	17,5	22,0	12,0	20,0
5 + CaCO ₃ + bakterie	18,0	28,5	11,0	25,0
15	5,0	15,0	7,5	12,5
15 + CaCO ₃	5,0	17,0	9,9	10,5
15 + CaCO ₃ + bakterie	13,5	16,5	11,0	12,7
25	5,0	12,0	5,0	9,0
25 + CaCO ₃	7,0	13,5	11,5	11,5
25 + CaCO ₃ + bakterie	9,5	16,0	16,0	13,7

Olej ciężki w stężeniu 5% w drugim tygodniu badań (tab. 3) spowodował obniżenie ilości kwasów huminowych o ok. 9% w porównaniu z próbą kontrolną. Nie zaobserwowano zasadniczego wpływu wprowadzonych czynników

modyfikujących na ich zawartość. W dwunastym tygodniu ilość kwasów znacznie wzrosła (tab. 3).

4. Dyskusja wyników

Wpływ ropopochodnych na środowisko glebowe nie jest jeszcze dokładnie poznany. Ropa naftowa oraz jej pochodne wprowadzone do ekosystemu wywołują szereg zjawisk, w wyniku oddziaływania na składniki biotyczne i abiotyczne.

Badając wpływ olejów na enzymy wytwarzane przez mikroorganizmy decydujące o aktywności metabolicznej gleb, stwierdzono, że olej lekki oddziaływał bardziej niekorzystnie na aktywność poszczególnych enzymów niż olej ciężki. Efekt ten jest zapewne wynikiem różnic w składzie chemicznym i właściwościach fizycznych tych olejów. Oleje ciężkie mają większą zawartość procentową składników o wysokim ciężarze cząsteczkowym niż lekkie (31). Te ostatnie szybciej zatem ulegają biodegradacji, jednak na skutek tego pojawiają się toksyczne metabolity pośrednie, które mogą powodować inhibicję samych enzymów, lub śmiertelność całej, bądź wybranej grupy mikroorganizmów, a co za tym idzie mogą obniżać aktywność enzymatyczną gleby (7,11).

Zachodzące w glebie reakcje rozkładu i syntezy katalizowane są przez specyficzne enzymy, z których część ma charakter typowo wewnątrzkomórkowy, tzn. ich aktywność związana jest ściśle z liczbą mikroorganizmów żyjących w glebie. Jednymi z nich są dehydrogenazy; aktywność dehydrogenazowa w glebie zależy zatem głównie od masy mikroorganizmów żyjących w glebie, a ta z kolei zależy od dostępnych źródeł węgla (3). Można przypuszczać, że wprowadzone oleje wyeliminowały gatunki bądź rodzaje mikroorganizmów mało odpornych na działanie tych ksenobiotyków (1).

Jednym z podstawowych procesów zachodzących w glebie jest proteoliza. Początkowa wyraźna stymulacja rozwoju bakterii z grupy proteolitycznych dla wszystkich prób gleby może być wynikiem uaktywnienia się mikroorganizmów proteolitycznych pod wpływem dodatkowego źródła węgla w postaci węglowodorów. Przez kolejne tygodnie aktywność ta wyraźnie się obniżyła. Można przypuszczać, że w badanym środowisku glebowym pojawiły się toksyczne metabolity pośrednie, powstałe w wyniku degradacji węglowodorów (10,11). Podobne zależności stwierdzono w przypadku aktywności enzymu rozkładającego węglowodany — amylazy. Na przykładzie tej grupy wyraźnie widać selekcję prowadzącą do wyparcia określonych mikroorganizmów o właściwościach amylolytycznych. Inną przyczyną obniżenia ich aktywności może być adsorpcja badanego enzymu na koloidach glebowych, przez co staje się on nieaktywny (14).

Bardzo istotny wpływ na aktywność katalityczną enzymów glebowych ma odczyn gleby. Gleba o niskim pH jest środowiskiem niekorzystnym dla rozwoju wielu mikroorganizmów, przede wszystkim dla bakterii, a więc od odczynu uzależniony jest skład jakościowy i ilościowy drobnoustrojów glebowych (12). Dodanie do gleby czynników modyfikujących istotnie wpłynęło na zmianę układu mikroflory glebowej, a tym samym na zwiększenie aktywności okre-

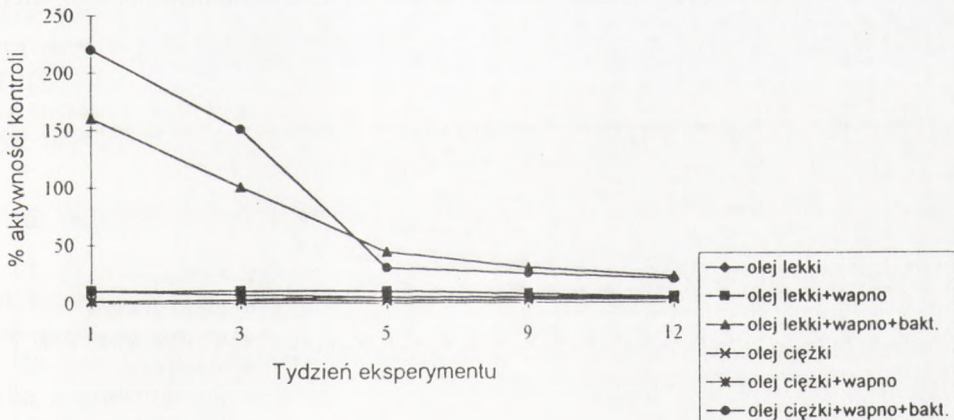
ślonych enzymów względem prób z samymi olejami. Wapnowanie gleby spowodowało ukierunkowaną selekcję mikroorganizmów, stwarzając jednocześnie korzystniejsze warunki rozwoju dla bakterii, a znacznie mniej korzystne dla grzybów (12). Właściwości gleby, a przede wszystkim jej odczyn, mogą także decydować o kierunku mikrobiologicznych przemian WWA. W glebach kwaśnych rozkład WWA przez dominujące w tym środowisku grzyby może powodować powstawanie wysoce rakotwórczych pośrednich form epoksydowych, podczas gdy w bakteryjnym rozkładzie WWA związki te nie tworzą się i wyściowy węglowodór może ulegać detoksykacji i całkowitej mineralizacji (10).

Drastyczny spadek aktywności amylolitycznej (ryc. 5) w glebach wapnowanych może świadczyć o tym, że został zahamowany wzrost grupy mikroorganizmów produkujących ten enzym. Prawdopodobnie głównym producentem amylaz były autochtoniczne grzyby, które po dodaniu wapnia zmniejszyły swą liczebność, a ich miejsce zajęły bakterie nie posiadające tego enzymu (16).

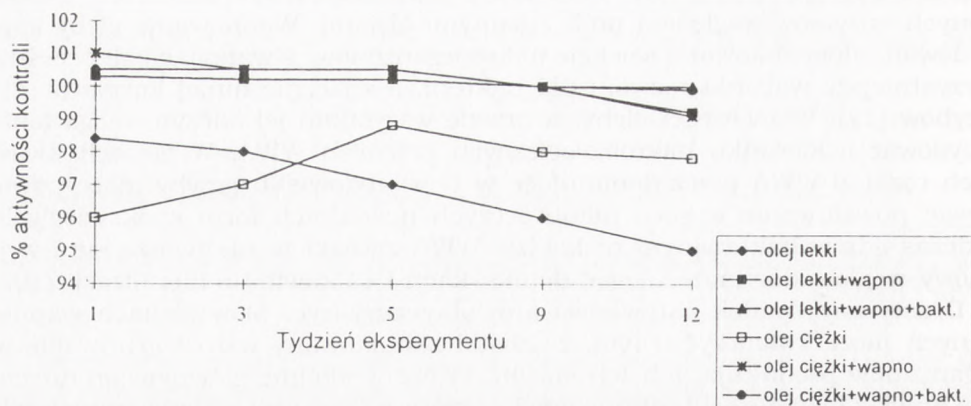
Wzrost aktywności proteolitycznej gleby po potraktowaniu jej CaCO_3 , mógł wynikać nie tylko ze zmian liczebności drobnoustrojów, lecz także ich składu gatunkowego. Proteoliza w glebie zachodzi dzięki enzymom wydzielanym przez mikroorganizmy w niej żyjące oraz enzymom zaadsorbowanym na koloidach glebowych. Proteazy są wytwarzane zarówno przez grzyby jak i bakterie, z tym, że proteazy grzybów charakteryzują się dużą tolerancją na zmiany odczynu ($\text{pH} = 4,0-8,0$), odmiennie niż proteazy bakterii ($\text{pH} = 7,0-8,0$) (10).

Wprowadzenie szczepionki bakteryjnej *Pseudomonas* sp. do gleby wcześniej wapnowanej spowodowało nieznaczny wzrost aktywności proteaz i dehydrogenaz. Dodanie bakterii tlenowych adaptowanych do rozkładu ropopochodnych spowodowało wzrost liczby mikroorganizmów znajdujących się w glebie, a tym samym wzrost aktywności oddechowej, miarą której jest aktywność tych enzymów.

W badaniach nie uwzględniono dość istotnego czynnika jakim jest ilość azotu i fosforu w glebie. W glebach skażonych olejami radykalnie zmienia się



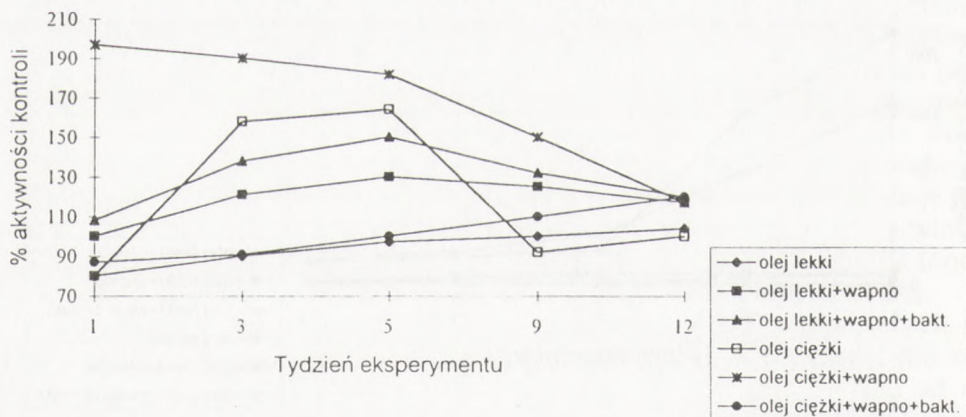
Ryc. 5. Krzywe ekotoksykologiczne dla amylaz w glebie poddawanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego w stężeniu 15% z dodatkiem czynników modyfikujących.



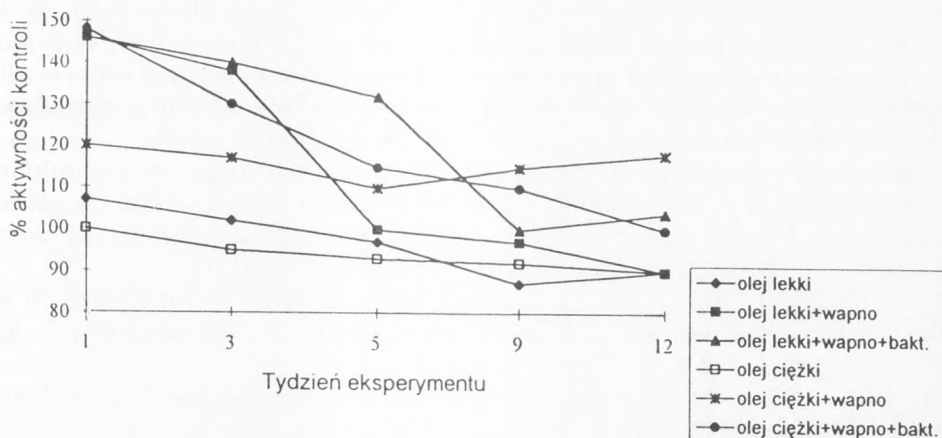
Ryc. 6. Krzywe ekotoksykologiczne dla celulazy Cx w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego w stężeniu 15% z dodatkiem czynników modyfikujących.

stosunek pomiędzy węglem organicznym z jednej strony oraz azotem i fosforem z drugiej. Ostry niedostatek tych makroelementów spowodowany nadmiarem węgla sprawia, że mikroorganizmy nie mogą w pełni korzystać z obfitości energii zawartej w węglowodorach (2). Potwierdzeniem przeprowadzonej dyskusji są krzywe ekotoksykologiczne. Wyraźnie pozytywny wpływ zabiegów biotechnologicznych stwierdzono dla dehydrogenaz i proteaz (ryc. 7,8). Wpływ zabiegów biotechnologicznych na aktywność celulolityczną był nieznaczny (ryc. 6).

W przeprowadzonych badaniach oznaczono również ilość powstałych kwasów huminowych. Tworzenie się humusu w glebie jest procesem przede wszystkim mikrobiologicznym oraz fizykochemicznym, w którym dominującą rolę odgrywa mikroflora glebowa. Przebieg humifikacji uzależniony jest od składu substancji będącej źródłem węgla, a także od warunków środowiska, które wpływają na rozwój i działalność mikroorganizmów glebowych (12). Wzrost ilości kwasów huminowych po dwunastu tygodniach badań świadczy o tym, że mikroflora zasiedlająca badaną glebę korzystała z wprowadzonego oleju



Ryc. 7. Krzywe ekotoksykologiczne dla proteaz w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego w stężeniu 15% z dodatkiem czynników modyfikujących.



Ryc. 8. Krzywe ekotoksykologiczne dla dehydrogenaz w glebie poddanej działaniu olejów: lekkiego i ciężkiego w stężeniu 15% z dodatkiem czynników modyfikujących.

jako źródła węgla. Produkty rozkładu węglowodorów mogły być wykorzystywane do syntezy substancji próchnicznych (12).

Bardzo ważnym czynnikiem przy rozkładzie substancji organicznej i gromadzeniu się kwasów huminowych jest obecność lub brak CaCO_3 w glebie. Regulując odczyn sole wapniowe nadają tlenowy charakter procesom rozkładu substancji organicznej, przyspieszając w ten sposób jej mineralizację oraz gromadzenie humusu (12). Efekty te zaobserwowano w prowadzonych badaniach (tab. 3).

Nie udało się jednak wyjaśnić dlaczego pomimo to, że olej lekki działał bardziej hamująco na aktywność wybranych enzymów glebowych niż olej ciężki, stwierdzono w próbkach gleby potraktowanej pierwszym olejem większy przyrost substancji humusowych. Prawdopodobnie mikroorganizmy będące „producentami” badanych enzymów nie potrafiły wykorzystać w pełni wprowadzonych węglowodorów jako źródła węgla. Olej lekki dla określonej grupy mikroorganizmów mógł okazać się bardziej dostępnym źródłem węgla niż ciężki, a tym samym produkowane metabolity w większym stopniu mogły być wbudowywane w próchnicę.

5. Wnioski

1. Wprowadzony do gleby olej napędowy, będący frakcją lekką, powodował większe obniżenie aktywności badanych enzymów glebowych niż olej silnikowy ciężki Hipol.

2. Nie stwierdzono wyraźnie dużych zależności pomiędzy wzrastającą dawką zastosowanych olejów a aktywnością enzymów.

3. W początkowym okresie badań stwierdzono wyższą aktywność amylaz, proteaz i dehydrogenaz w próbach gleby skażonej olejami w porównaniu

z glebą kontrolną (bez ksenobiotyków i czynników modyfikujących). W kolejnych tygodniach obserwowano na ogół spadek aktywności tych enzymów.

4. Aktywność celulolityczna w glebie z dodatkiem olejów była tylko o kilka procent niższa niż w glebie kontrolnej dla wszystkich stosowanych dawek przez cały okres badań.

5. Dodanie czynników modyfikujących, tj. CaCO_3 , oraz szczepionki bakteryjnej spowodowało wyraźny wzrost aktywności dehydrogenaz i proteaz w stosunku do gleby z ksenobiotykami. Zaobserwowano niewielki wzrost aktywności celulolitycznej oraz spadek aktywności amylaz.

6. W badaniach wykazano, że większy przyrost kwasów huminowych wystąpił w próbach gleby skażonej mniejszymi dawkami wprowadzonych ksenobiotyków.

7. Stwierdzono stymulację syntezy kwasów huminowych pod wpływem czynników modyfikujących.

8. Badania wykazały większy przyrost kwasów huminowych w próbach gleby skażonej olejem lekkim niż ciężkim.

Literatura

1. Aleksander M., (1975), *Ekologia mikroorganizmów*, PWN, Warszawa.
2. Badura L., (1985), *Post. Mikrobiol.*, XXIV (3), 153-184.
3. Burns B. G., (1983), *Extracellular enzyme-substrate interactions in soil. Microbes in their natural environments*, Eds. Slayer J. H., Whittenbury, R., Wimpenny J. W., Cambridge University Press, London, 249-298.
4. Burns R. G., (1980), *Microbial adhesion to soil surfaces: consequences for growth and enzyme activities. Mikrobial Adhesion to Surfaces*, Eds. Berkley R. C. W., Lynch J. M., Melling J., Rutter P. R., Vincent B., Horwood E., Chichester, 249-262.
5. Dobrzański B., Zawadzki S., (1981), *Gleboznawstwo*, PWRiL, Warszawa.
6. Dobrzański B., (1966), *Gleby i ich wartość użytkowa*, PWRiL, Warszawa.
7. Dutkiewicz T., Lebek G., Masłowski J., Mielżyńska D., Ryborz S., (1988), *WWA w środowisku przyrodniczym*, Instytut Kształtowania Środowiska, PWN, Warszawa.
8. Fleischer E. J., Noss P. R., Kostecki P. T., Calabrese E. J., (1986), *Proceedings of the Third Eastern Regional Groundwater Conference, National Water Well Association*, Springfield, 29-31.
9. Janson L. P., Curl E. A., Bond J. H., Friburg H. A., (1959), *Methods for studying soil microflora-Plant disease relationships*, Burges Publishing Co., Minneapolis.
10. Maliszewska-Kordybach B., (1993), *Trwałość WWA w glebie*, Inst. Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy.
11. Maliszewska-Kordybach B., (1987), *Post. Mikrobiol.*, XXVI (3).
12. Marszewska-Ziemięcka J., (1969), *Mikrobiologia gleby i nawozów organicznych*, PWRiL, Warszawa.
13. Oleńczuk-Neyman K., Peejzner J., Topolicki M., (1989), *Chemiczna i bakteriologiczna ocena skażenia gruntów stacji przetadunku paliw produktami ropopochodnymi*, Wydział Hydrotechniki, Politechnika Gdańska, 2(25), 50-59.
14. Pacha J., (1988), *Proteoliza w glebie potraktowanej wybranymi związkami metali*, *Acta Biologica Silesiana*, 9(26), Uniwersytet Śląski, Katowice.
15. Russel S., (1972), *Metody oznaczania enzymów glebowych*, Polskie Towarzystwo Gleboznawcze-Komisja Biologii Gleby, Warszawa.
16. Schnitzer M., Chen Y., (1977), *Science Soc. Am. J.*, 41, 352-358.
17. Zabłocka-Godlewska E., (1996), *Zmiany aktywności mikrobiologicznej gleby w zmodyfi-*

kowanych układach modelowych poddanych działaniu WWA, Mat. Symp. Biotechn. Środowisk; Gliwice-Ustroń 1995 (w druku).

Studies on enzyme activity in the petroleum contaminated soil, detoxification in a soil

Summary

In this paper the influence of selected oils which are aromatic hydrocarbons on microbial activity of a soil is discussed. Selected enzymes: amylases, proteases, dehydrogenases and cellulase Cx were tested. Besides, a soil with added oils was modified by adding e.g. *Pseudomonas*, adapted to oil degradation, CaCO₃. It was found that light oil added to soil lowered the enzymatic activity more significantly in comparison with the heavy oil. Protease and dehydrogenase activity in the soil to which modified compounds were added was higher than in the control soil. However, in the soil treated with smaller doses of xenobiotic compounds higher increment of humic acids was observed.

Key words:

enzymes, biodegradation, WWA, toxicity.

Adres do korespondencji:

Anna Małachowska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki,
Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice.