

Katedra Mikrobiologii Rolniczej Akademii Rolniczej w Lublinie

JADWIGA FURCZAK, ELŻBIETA WIELGOSZ

*Aktywność enzymatyczna oraz niektóre właściwości
chemiczne osadu ściekowego poddanego czteroletniej
transformacji agrotechnicznej*

Enzymatic Activity and Some Chemical Properties of Sewage Sludge
Subjected to Four -Year Agrotechnical Transformation

Zasadniczym czynnikiem ograniczającym w dużej mierze przyrodnicze, w tym rolnicze, zagospodarowanie osadów ściekowych jest zawartość w nich substancji toksycznych, a zwłaszcza metali ciężkich (1, 10, 14). Dlatego też osady ściekowe poddawane są uprzednio różnym zabiegom prowadzącym do ich uzdatnienia.

Jednym z biologicznych sposobów oczyszczania osadu ściekowego z metali ciężkich jest agrotechniczna transformacja z zastosowaniem roślin kumulujących te pierwiastki w zielonej masie. Dotychczasowe badania B o r k o w s k i e j i wsp. (3, 4, 5) wykazały, że właściwościami takimi cechuje się między innymi wiklina koszykarska (*Salix viminalis*), topinambur (*Helianthus tuberosus*) i ślaziowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* Rusby). W i e l g o s z stwierdziła (16, 17), że ulepszany przy udziale tych roślin osad ścieków komunalnych jest bardzo aktywny pod względem mikrobiologicznym. Ważnym parametrem obrazującym stan biologiczny środowiska oraz informującym o nasileniu i kierunku przebiegających w nim procesów biochemicznych jest aktywność enzymatyczna. Wielokrotnie podkreślano, że odzwierciedla ona bardziej bezpośrednio aktywność biologiczną niż pomiary liczebności drobnoustrojów (11).

Celem niniejszych badań było poznanie aktywności kilku enzymów uczestniczących w przemianach azotu i fosforu organicznego w osadzie ścieków komunalno-przemysłowych, poddanym kilkuletniej transformacji przy udziale wymienio-

nych roślin, na tle osadu bez obsady roślinnej. Równolegle śledzono towarzyszące tej aktywności zmiany w zawartości węgla, azotu i fosforu oraz procesy humifikacji materii organicznej.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badaniami objęto poletka osadowe doświadczenia Katedry Szczegółowej Uprawy Roślin AR w Lublinie, zlokalizowane na terenie Oczyszczalni Ścieków Komunalnych „Hajdów” w Lublinie. Każde poletko (o powierzchni 12 m^2) zawierało 50 cm warstwę przefermentowanego osadu ścieków komunalno-przemysłowych i obsadzone zostało: ślazowcem pensylwańskim (*Sida hermaphrodita* Rusby), wikliną koszykarską (*Salix viminalis*), topinamburem (*Helianthus tuberosus*). Kontrolę doświadczenia stanowiły poletka osadowe bez obsady roślinnej. Podstawowym założeniem doświadczenia było zbadanie możliwości uprawy tych roślin na podłożu osadowym oraz określenie ich przydatności do oczyszczania odpadu z metali ciężkich.

Próbki do badań enzymatycznych i chemicznych pobierano z całego profilu osadu. W przypadku poletek obsadzanych roślinami osad pochodził z zasięgu oddziaływania ich korzeni. W uśrednionych próbkach określano: aktywność proteazy zgodnie z metodą L a d d a i wsp. (12), aktywność ureazy wg metody opracowanej przez Z a n t u a i wsp. (18), aktywność kwaśnej fosfatazy metodą T a b a t a b a i i wsp. (13), zawartość azotu ogólnego metodą Kjeldahla, zawartość węgla ogółem metodą Tiurina, zawartość frakcji węgla wydzielonych mieszaniną $0,1 \text{ M Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + 0,1 \text{ M NaOH}$ metodą Kononowej i Bielezikowej.

Analizy chemiczne wykonano w Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Lublinie oraz w Instytucie Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego AR w Lublinie. Badania enzymatyczne i chemiczne osadu przeprowadzono w trzecim i czwartym roku trwania doświadczenia. Analizy enzymatyczne wykonywano 3-krotnie w sezonie wegetacyjnym każdego roku, natomiast chemiczne - raz w roku, pod koniec sezonu wegetacyjnego.

Wyniki oznaczeń enzymatycznych opracowano statystycznie, stosując analizę wariancji z wykorzystaniem przedziałów ufności Tuckeya, przy założonym poziomie istotności $P = 0,05$ lub $P = 0,01$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Aktywność proteazy i ureazy w osadzie poddanym kilkuletniej agrotechnicznej transformacji ilustrują tab.1 i 2. Zamieszczone w nich dane wskazują, że średni poziom tej aktywności w obiektach z uprawą roślin był wyrównany i nie różnił się istotnie (z wyjątkiem kombinacji z wikliną koszykarską) od wykrytego w osadzie kontrolnym. Zbliżonej aktywności proteolitycznej i urolitycznej towarzyszyła podobna wilgotność i odczyn osadu omawianych kombinacji doświadczalnych, co odnotowała W i e l g o s z (16). Brak oddziaływania roślin na aktywność enzymów mógł wynikać między innymi z przystąpienia do tych badań w trzecim roku trwania doświadczenia. Obserwacje przeprowadzone przez Wielgosz (17) nad aktywnością dehydrogenaz wskazują bowiem na to, że różnicujący wpływ niektórych roślin ujawnił się przede wszystkim w dwu pierwszych latach transformacji tego odpadu.

Tab. 1. Aktywność proteazy (μg tyrozyny/ 1g s.m. osadu / 1h)
 Protease activity (μg tyrosine/ 1g d.m. of sludge/ 1h)

Kombinacje doświadczalne	1997				1998				Średnia 1997-1998
	6 V	14 VII	12 IX	średnia	11 V	13 VII	4 IX	średnia	
Osad pod uprawą: ślázowca									
pensylwańskiego	147,5	74,6	75,4	99,2	110,2	75,0	136,4	107,2	103,2
topinamburu	230,9	55,3	58,1	114,8	109,1	44,4	113,5	89,0	101,9
wikliny koszykarskiej	200,2	180,5	135,2	172,0	76,5	49,2	30,2	52,0	112,0
Osad bez obsady roślin	134,8	105,3	14,0	84,7	118,3	54,6	93,9	88,9	86,8

NIR pomiędzy: obiektami – 85,63**, latami – różnice nieistotne, * $P = 0,05$.

Tab 2. Aktywność ureazy (μg $\text{N-NH}_4^+/\text{1g}$ s.m. osadu / 24h)
 Urease activity (μg $\text{N-NH}_4^+/\text{1g}$ d.m. of sludge/ 24h)

Kombinacje doświadczalne	1997				1998				Średnia 1997-1998
	6 V	14 VII	12 IX	średnia	11 V	13 VII	4 IX	średnia	
Osad pod uprawą: ślázowca									
pensylwańskiego	4982	2844	2282	3369	2884	1949	1680	2171	2770
topinamburu	6105	2316	1915	3445	2433	2348	1698	2160	2802
wikliny koszykarskiej	5613	3069	2354	3679	3225	3271	1489	2662	3170
Osad bez obsady roślin	4299	2279	2097	2892	2226	2185	1575	1995	2443

NIR pomiędzy: obiektami – różnice nieistotne, latami – 81,25*, * $P = 0,05$.

Aktywność proteolityczna i urolityczna osadu obniżała się na ogół w miarę upływu czasu, przy czym efekt ten zaznaczył się wyraźniej i znalazł statystyczne potwierdzenie w przypadku ureazy. Z dotychczasowych badań nad aktywnością enzymatyczną gleby wynika, że aktywność analizowanych enzymów jest dodatnio skorelowana z zawartością węgla organicznego i azotu ogólnego (2, 6, 8, 9). Być może i w tych warunkach główną przyczyną postępującego obniżenia aktywności proteazy i ureazy był spadek poziomu wymienionych parametrów chemicznych (tab. 4). Natomiast czynniki klimatyczne oraz odczyn i wilgotność osadu, podobnie jak wykazano dla innych testów biochemicznych (17), nie odegrały większego znaczenia w omawianych zmianach.

Uprawiane na osadzie ściekowym rośliny nie wpłynęły również istotnie na średnią aktywność kwaśnej fosfatazy (tab. 3). Potencjalna zdolność osadu do hydrolizy fosforu organicznego była zbliżona pod obsadą wszystkich roślin i kształ-

Tab. 3. Aktywność kwaśnej fosfatazy, (μg p-nitrofenolu/1g s.m. osadu/1h)
 Acid phosphatase activity (μg p-nitrophenol/1g d.m. of sludge/1h)

Kombinacje doświadczalne	1997				1998				Średnia 1997-1998
	6 V	14 VII	12 IX	średnia	11 V	13 VII	4 IX	średnia	
Osad pod uprawą: ślázowca									
pensylwańskiego	263,8	339,9	207,9	270,5	107,9	165,9	148,3	140,7	205,6
topinamburu	265,9	241,3	198,4	235,2	71,0	108,1	130,3	103,2	169,6
wikliny koszykarskiej	220,5	327,5	242,0	263,3	77,3	110,2	125,7	104,4	183,9
Osad bez obsady roślin	133,1	297,6	206,3	212,3	64,9	106,5	116,8	96,1	154,2

NIR pomiędzy: obiektami – 81,05**, latami – 31,27**, **P = 0,01.

Tab. 4. Zawartość węgla i azotu (%)
 Carbon and nitrogen content (%)

Kombinacje doświadczalne	Po 3 latach transformacji (1997)			Po 4 latach transformacji (1998)		
	C-ogółem	N-ogólny	C-ogółem/ N-ogólny	C-ogółem	N-ogólny	C-ogółem/ N-ogólny
Osad pod uprawą: ślázowca						
pensylwańskiego	23,41	3,05	7,68	17,63	2,18	8,09
topinamburu	21,41	2,24	9,56	20,60	2,39	8,62
wikliny koszykarskiej	19,60	2,30	8,52	15,61	1,03	15,16
Osad bez obsady roślin	22,36	2,74	8,16	18,37	2,48	7,41

towała się na poziomie stwierdzonym w kontroli. Analogicznie jak w przypadku innych enzymów w obiektach z testowanymi roślinami wystąpiła jedynie tendencja w kierunku wzrostu tej aktywności, zaznaczająca się silniej w osadzie spod ślázowca pensylwańskiego.

We wszystkich kombinacjach aktywność fosfatazy, podobnie jak ureazy, obniżyła się istotnie w końcowej fazie badań. Faktu tego nie można przypisywać czynnikom klimatycznym czy zmianom wilgotności i odczynu osadu, ponieważ kształtowały się one w analizowanym okresie na zbliżonym poziomie (15). Wydaje się, że odnotowany efekt spowodowany był częściowo obniżeniem węgla ogółem w osadzie (tab. 4), którego zawartość, jak wynika z badań prowadzonych w glebie, jest w dużym stopniu powiązana z aktywnością fosfatazy (2, 6, 8, 9). Przyczyna spadku aktywności tego enzymu mogło być również zmniejszenie ilości łatwiej

Tab 5. Zawartość frakcji węgla wydzielonych mieszaniną 0,1M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ + 0,1 NaOH
(% w stos. do C-ogółem)

Content of carbon fractions isolated using 0.1M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ + 0.1M NaOH (% in relation to C-total)

Kombinacje doświadczalne	Po 3 latach transformacji (1997)	Po 4 latach transformacji (1998)
Osad pod uprawą:		
ślazowca pensylwańskiego	17,44	18,81
topinamburu	19,73	17,23
wikliny koszykarskiej	17,87	19,17
Osad bez obsady roślin	18,16	21,97

Tab. 6. Zawartość kwasów huminowych (C_{kh}) i fulwowych (C_{kf}) (% w stos. do C-ogółem)
Humic acids (C_{kh}) and fulvic acids (C_{kf}) content (% in relation to C-total)

Kombinacje doświadczalne	Po 3 latach transformacji (1997)				Po 4 latach transformacji (1998)			
	C_{kh}	C_{kf}	C_{kh} / C_{kf}	E_4/E_6	C_{kh}	C_{kf}	C_{kh} / C_{kf}	E_4/E_6
Osad pod uprawą:								
ślazowca pensylwańskiego	5,89	11,54	0,51	8,23	7,15	11,66	0,61	7,52
topinamburu	7,94	11,79	0,67	8,53	7,67	9,62	0,80	7,44
wikliny koszykarskiej	7,40	10,47	0,71	5,80	7,69	11,48	0,67	6,67
Osad bez obsady roślin	7,29	10,87	0,67	5,63	10,46	11,50	0,91	6,56

dostępnych związków organicznych fosforu, stymulujących jego syntezę i stanowiących substrat hydrolizy. Z badań dotyczących środowiska glebowego wynika bowiem, że aktywność kwaśnej fosfatazy jest dodatnio skorelowana z tą właściwością chemiczną (6, 7).

Przeprowadzone nad badanymi enzymami obserwacje wskazują na to, że dopływ do osadu substancji organicznej pochodzącej z uprawianych roślin, podobnie jak w przypadku większości testów mikrobiologicznych i biochemicznych (16, 17), nie znalazł wyraźnego odzwierciedlenia również w tych parametrach aktywności biologicznej.

Czteroletnia transformacja osadu przyczyniła się do mineralizacji występującej w nim substancji organicznej (tab. 4). Najwyraźniej efekt ten uwidocznił się w kombinacji obsadzonej wikliną koszykarską. Wartości stosunku C:N po trzech latach trwania doświadczenia były we wszystkich obiektach na ogół zbliżone, z tendencją do wzrostu poziomu w osadzie pod topinamburem i wikliną koszykarską (tab. 4). Natomiast po czterech latach badań stosunek ten rozszerzył się wyraźnie w poletku z wikliną koszykarską, co było spowodowane głównie spadkiem zawartości azotu ogólnego. Uzyskany wynik nie jest zaskoczeniem, ponieważ jak wiadomo wiklina należy do roślin azotolubnych.

Tab. 7. Zawartość badanych form fosforu
Content of phosphorus forms

Kombinacje doświadczalne	Po 3 latach transformacji (1997)		Po 4 latach transformacji (1998)	
	P-ogólny, %	P-przyswajalny, g/1kg s.m. osadu	P-ogólny, %	P-przyswajalny, g/1kg s.m. osadu
Osad pod uprawą:				
ślazowca pensylwańskiego	1,66	10,23	1,32	3,50
topinamburu	1,43	10,15	1,23	3,60
wikliny koszykarskiej	1,46	9,73	0,76	2,20
Osad bez obsady roślin	1,83	10,40	1,25	3,40

Frakcja wydzielona mieszaniną $0,1M Na_4P_2O_7 + 0,1M NaOH$ jest uważana za najbardziej aktywną frakcję próchnicy właściwej. Uprawa roślin na osadzie nie wpłynęła znacząco na jej poziom, czego dowodzą zbliżone wartości tego parametru we wszystkich obiektach, zarówno po trzech, jak i po czterech latach trwania doświadczenia (tab. 5). Ilość frakcji była około dwukrotnie niższa w kombinacjach z osadem niż w madzie lekkiej (15), co świadczy o większej zawartości w związkach próchnicznych transformowanego odpadu substancji o złożonym składzie, mało podatnych na rozkład oraz nie ulegających ekstrakcji.

Wśród związków próchnicznych wydzielonych z osadu mieszaniną $0,1M Na_4P_2O_7 + 0,1M NaOH$ wyodrębniono kwasy huminowe i fulwowe (tab. 6). We wszystkich obiektach po trzech latach badań zaznaczyła się przewaga kwasów fulwowych nad huminowymi, a ich stosunek kształtował się podobnie (0,51-0,71). Pod koniec czwartego roku wzrosła zawartość kwasów huminowych w osadzie z uprawą ślazu pensylwańskiego i w kontroli. W większości obiektów podwyższył się również na ogół stosunek $C_{kh} : C_{kf}$. Wskaźnikiem jakości kwasów huminowych jest iloraz absorbancji ($E_4 : E_6$). Zarówno po trzech, jak i po czterech latach transformacji osadu niższy poziom tego wskaźnika stwierdzono w kombinacji z wikliną i bez obsady roślinnej. Uzyskane wyniki sugerują większą kondensację cząsteczek kwasów huminowych w osadzie tych obiektów.

Zawartość fosforu ogólnego i przyswajalnego po trzech latach trwania doświadczenia utrzymywała się we wszystkich kombinacjach na zbliżonym poziomie (tab. 7). Po zakończeniu doświadczenia wykazano na ogół niewielkie obniżenie poziomu fosforu ogólnego i wyraźne - fosforu przyswajalnego, przy czym odnotowany efekt uwidocznił się najsilniej w osadzie spod uprawy wikliny. Przeprowadzone obserwacje potwierdzają duże znaczenie tej rośliny w oczyszczaniu środowiska również z nadmiaru owego biogenu.

PODSUMOWANIE

Stwierdzono, że zarówno trzyletnia, jak i czteroletnia uprawa roślin (ślazowiec pensylwański, topinambur, wiklina koszykarska) na osadzie ściekowym nie wpłynęła różnicująco na jego aktywność proteolityczną, urolityczną i fosfatazową. We wszystkich obiektach (z uprawą roślin i w kontrolnym) wystąpił jednak spadek aktywności wraz z upływem czasu. Efekt ten zaznaczył się wyraźniej w przypadku ureazy i fosfatazy.

Transformacji osadu towarzyszył spadek poziomu węgla, azotu i fosforu ogólnego oraz fosforu przyswajalnego. Zmiany w zawartości węgla, azotu i fosforu wystąpiły wyraźniej pod uprawą wikliny koszykarskiej. Równolegle z tymi procesami zachodziła humifikacja substancji organicznej osadu, przy czym największą kondensację kwasów huminowych zarejestrowano w obiekcie z wikliną koszykarską i w kontroli. W związkach próchnicznych wszystkich kombinacji z osadem wykryto dużo substancji o złożonym składzie, mało podatnych na rozkład oraz nie ulegających ekstrakcji. Z punktu widzenia prawidłowego przebiegu roślinnej transformacji osadu istotne jest, że badane rośliny oczyszczając go z metali ciężkich nie zakłóciły procesów mikrobiologicznych ważnych dla rozwoju roślin i wartości nawozowej osadu.

PIŚMIENNICTWO

1. Baran S., Turski R.: Wybrane zagadnienia z utylizacji i unieszkodliwiania odpadów, wyd., Akademia Rolnicza, Lublin 1999.
2. Bonmati M., Ceccanti B., Nanni per P.: Spatial Variability of Phosphatase, Urease, Protease, Organic Carbon and Total Nitrogen in Soil. *Soil Biol. Biochem.* 23, 391-396, 1991.
3. Borkowska H., Jackowska I., Piotrowski J., Styk B.: Intensywność pobierania niektórych pierwiastków z gleby mineralnej i osadów pościekowych przez ślazowiec pensylwański i topinambur (bulwa). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, z. 437, 103-107, 1996.
4. Borkowska H., Jackowska I., Piotrowski J., Styk B.: Wstępna ocena przydatności kilku gatunków roślin wieloletnich do rekultywacji osadów pościekowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, z. 434, 927-930, 1996.
5. Borkowska H., Jackowska I., Piotrowski J., Styk B.: Pobieranie ołowiu przez ślazowiec pensylwański z osadu pościekowego. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E*, vol. 54, Lublin 1999.
6. Chazijew F. Ch.: Sistemno-ekologiczeskij analiz fermentatiwnej aktiwnosti pocz. wyd. Nauka, Moskwa 1982.
7. Cieśła W., Koper J.: Wpływ wieloletniego nawożenia mineralno-organicznego na ukształtowanie się poziomu fosforu organicznego i przyswajalnego oraz aktywności enzymatycznej gleby. *Rocz. Glebozn.*, 41, 73-83, 1990.
8. Frankenberger W. T. Jr., Dick W. A.: Relationships Between Enzyme Activities and Microbial Growth and Activity Indices in Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47, 945-951, 1983.

9. Gostkowska K., Furczak J., Domżał H., Bielińska E. J.: Suitability of Some Biochemical and Microbiological Tests for the Evaluation of the Degradation Degree of Podzolic Soil on the Background of its Differentiated Usage. *Polish J. Soil Sci.*, 31, 69-78, 1998.
10. Krzywy E.: *Przyrodnicze zagospodarowanie ścieków i osadów*. Wyd. Akademia Rolnicza, Szczecin 1999.
11. Ladd J. N.: Soil Enzymes. In: *Soil Organic Matter and Biological Activity*. ed., D. Vaughan, R.E. Malcolm, Netherlands, 1985.
12. Ladd J. N., Butler J. H. A.: Short-term Assays of Soil Proteolytic Enzyme Activities Using Proteins and Dipeptide Derivatives as Substrates. *Soil Biol. Biochem.*, 4, 19-30, 1972.
13. Tabatabai M. A., Bremner J. M.: Use of p-nitrophenyl Phosphate for Assay of Soil Phosphatase Activity. *Soil Biol. Biochem.*, 1, 301-307, 1969.
14. Urbaniak M.: *Przerób i wykorzystanie osadów ze ścieków komunalnych*. Wyd. Ekoinżynieria, Lublin 1997.
15. Wielgosz E.: Badania nad aktywnością mikrobiologiczną osadu ścieków komunalnych poddanego roślinnej transformacji. Praca doktorska, Katedra Mikrobiologii Rolniczej, Akademia Rolnicza, Lublin, 1999.
16. Wielgosz E.: Dynamika rozwoju różnych grup drobnoustrojów w osadach ścieków komunalnych pod obsadą niektórych roślin. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E*, vol. 55, Lublin 2000.
17. Wielgosz E.: Aktywność biochemiczna w osadach pościekowych poddanych czteroletniej transformacji roślinnej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio E*, vol. 55, Lublin 2000.
18. Zantua M. I., Bremner J. M.: Comparison of Methods of Assaying Urease Activity in Soil. *Soil Biol. Biochem.*, 7, 291-295, 1975.

Autorzy pracy składają serdeczne podziękowania Pani prof. dr hab. H. Borkowskiej i Panu prof. dr. hab. B. Stykowi z Katedry Szczegółowej Uprawy Roślin AR w Lublinie za udostępnienie modelu doświadczenia oraz Pani prof. dr hab. M. Flis-Bujak z Instytutu Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska Przyrodniczego AR w Lublinie za konsultacje przy opracowywaniu wyników analiz chemicznych.

SUMMARY

On the plots made of municipal and industrial sewage sludge *Sida hermaphrodita* Rusby, *Helianthus tuberosus* and *Salix viminalis* were cultivated. The control of this experiment were municipal sewage sludge plots without plants. The aim of the studies was to compare the enzymatic activity and some chemical properties of sludge subjected to many-year transformation under above mentioned conditions. The results indicated that plant cultivation did not differentiate the protease, urease and acid phosphatase activities in the sludge. However, decrease of those enzyme activities along with the time course occurred in all objects. The sludge transformation was accompanied by the decrease of total carbon, nitrogen, phosphorus and available phosphorus contents, as well as organic matter humification. The strongest changes of carbon, nitrogen and phosphorus contents were found in the sludge planted with *Salix viminalis*. The sludge from this object and control was characterized by the most condensed humic acids.