

Elżbieta WOŁEJKO, Urszula WYDRO, Tadeusz ŁOBODA*

ZMIANY LICZEBNOŚCI WYBRANYCH MIKROORGANIZMÓW W STREFIE RYZOSFEROWEJ TRAW PO APLIKACJI OSADU ŚCIEKOWEGO

Celem pracy było przedstawienie zmian liczebności wybranych mikroorganizmów w strefie ryzosferowej traw po aplikacji osadu ściekowego. Badania przeprowadzono na 4 powierzchniach doświadczalnych zlokalizowanych na pasach zieleni wzdłuż głównych ciągów komunikacyjnych w Białymstoku. Czynnikiem w doświadczeniu były 2 dawki osadu ściekowego 7,5 i 15 kg/m² ś.m., obiektu bez osadu (kontrola) oraz 2 mieszanki traw gazonowych: Eko i Roadside. Badania mikrobiologiczne strefy ryzosferowej wykazały sezonowe wahania ogólnej liczby bakterii, liczby bakterii Gram ujemnych oraz liczebności bakterii *Pseudomonas fluorescens*. Głównymi czynnikami, powodującymi zmiany liczebności analizowanych bakterii w strefie ryzosferowej były zastosowane dawki osadów ściekowych.

1. WSTĘP

Rozwój cywilizacji w głównej mierze transportu jest zagrożeniem, które sprawia, że gleby na terenach miejskich wymagają stałej ochrony i zabiegów rekultywacyjnych ze względu na postępującą ich chemiczną degradację, która prowadzi do trwałego i postępującego pogarszania ich właściwości [7]. Grunty na terenach miejskich tworzone są zwykle z odpadów budowlanych, co powoduje, że ich struktura jest zbita, mają niską zawartość próchnicy oraz pojemność wodną, są słabo przepuszczalne dla wody, a także wykazują się słabą aktywnością biologiczną [8].

Wobec narastającego deficytu materii organicznej w glebach zachodzi konieczność poszukiwania innych źródeł materii organicznej i składników biogennych [5], które nadawałyby się do nawożenia terenów miejskich. Interesującym wydaje się aspekt wykorzystania

* Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,
u.wydro@doktoranci.pb.edu.pl, e.wolejko@pb.edu.pl.

osadów ściekowych w uprawach wieloletnich na glebach wymagających rekultywacji, gdzie stopniowo uwalniające się składniki pokarmowe gwarantują vegetację roślin na satysfakcjonującym poziomie [12]. Osady ściekowe posiadają zróżnicowane właściwości, które zależą od ilości i jakości ścieków oraz wielkości ładunku zanieczyszczeń dopływających do oczyszczalni. Istotny wpływ na jakość osadów mają również rodzaj sieci kanalizacyjnej, zastosowane parametry technologiczne, wiek osadu oraz sposób w jaki przerabia się osady np. stabilizacja, higienizacja [17].

Wprowadzane do gleby związki organiczne i mineralne wraz z osadami ściekowymi mają istotny wpływ na liczebność mikroorganizmów oraz ulegają przemianom przy udziale enzymów [19]. Według Rozporządzenia [18], osady ściekowe mogą być stosowane w rolnictwie i do rekultywacji gruntów na cele rolne, jeżeli nie wyizolowano bakterii z rodzaju *Salmonella* w 100 g osadów przeznaczonych do badań, natomiast liczba żywych jaj pasożytów jelitowych *Ascaris sp.*, *Trichuris sp.*, *Toxocara sp.* w 1 kg s.m.o. wynosi 0. W przypadku stosowania osadów na pozostałe cele – wskaźnik ATT (suma inwazyjnych jaj *Ascaris*, *Toxocara* i *Trichocephalus* w 1 kg s.m. osadu) nie powinien przekraczać 300.

Strefa przykorzeniowa należy do obszaru o najintensywniejszej aktywności biologicznej, charakteryzującej się bogatą florą bakteryjną i grzybową oraz ma ona duży wpływ na pobieranie przez korzenie substancji pokarmowych [11]. Aktywność drobnoustrojów odgrywa bardzo ważną rolę w życiu roślin, te natomiast w widoczny sposób wpływają na rozwój drobnoustrojów glebowych. Rośliny kształtują więc mikroflorę glebową i wpływają na przemiany mikrobiologiczne, nieustannie zachodzące w tym środowisku [20]. Jak wskazuje Głazewska-Maniewska i in. [4], drobnoustroje rozwijają się w ścisłej współzależności z roślinami od momentu kiełkowania nasion aż do czasu osiągnięcia przez roślinę pełnej dojrzałości, a ta współzależność może być obojętna dla roślin bądź też wywierać korzystny lub szkodliwy wpływ na ich wzrost. Bień [1] oraz Krzywy i Iżewska [14] w swoich badaniach zwracają również uwagę, iż wśród drobnoustrojów glebowych występują zarówno mikroorganizmy patogenne, groźne dla człowieka jak i saprofityczne, obojętne z sanitarnego punktu widzenia ale odgrywającą ważną rolę w rozkładzie substancji zanieczyszczających środowisko.

Celem pracy było przedstawienie zmian liczebności wybranych mikroorganizmów w strefie ryzosferowej traw po aplikacji osadu ściekowego.

2. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

2.1. ZAŁOŻENIE DOŚWIADCZENIA

Badania przeprowadzono w 2012 r. na 4 powierzchniach doświadczalnych zlokalizowanych na pasach zieleni wzdłuż głównych ciągów komunikacyjnych w Białym-

stoku. Każdy punktów badawczych o powierzchni 90 m² podzielono na 3 bloki, stanowiące kolejne powtórzenia. Finalnie, całą powierzchnię podzielono na 18 obiektów, każde o powierzchni 5 m² (2×2,5 m). Czynnikiem w doświadczeniu były 2 dawki osadu ściekowego: 7,5 i 15 kg/m² ś.m. (tj. ok 14,5 i 29 t/ha suchej masy) oraz obiekty bez osadu (kontrola) jak również 2 mieszanki traw gazonowych: Eko która zawierała 30% *Lolium perenne* cv. Niga, 15% *Poa pratensis* cv. Amason, 22,6% *Festuca rubra* cv. Adio i 32,4% *Festuca rubra* cv. Nimba. i Roadside w skład której wchodziło 32% *Lolium perenne* cv. Barmedia, 5% *Poa pratensis* cv. Baron, 52% *Festuca rubra* cv. Barustic, 5% *Festuca rubra commutata* cv. Bardiva (BE) i 6% *Festuca rubra commutata* cv. Bardiva (NL).

Ustabilizowany osad ściekowy z Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Sokółce i glebę poddano badaniom, zgodnie z wymogami zamieszczonymi w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 13 lipca 2010 roku w sprawie komunalnych osadów ściekowych [18]. Właściwości osadu zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Właściwości osadu ściekowego użytego w doświadczeniu

Parametry	Właściwości osadu ściekowego
pH	6,7
Sucha masa (%)	19,3
Substancja organiczna (% s. m.)	58,4
P ogólny (% s. m.)	2,73
N ogólny (% s. m.)	3,99
N amonowy (% s. m.)	0,14
Ca (% s. m.)	5,51
Mg (% s. m.)	0,66
Pb(mg/kg s. m.)	23,5
Cd (mg/kg s. m.)	<0,50
Cr (mg/kg s. m.)	58,0
Cu (mg/kg s. m.)	194
Ni (mg/kg s. m.)	22,0
Zn (mg/kg s. m.)	1459
Hg (mg/kg s. m.)	1,044

2.2. OZNACZENIA MIKROBIOLOGICZNE

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono trzykrotnie w maju, lipcu i październiku 2012 roku. z każdego poletka do badań pobrano korzenie wraz z przylegającą do nich glebą. Następnie przygotowano 5 gramowe naważki, które przeniesiono do 45 cm³ jałowego roztworu soli fizjologicznej (0,85% NaCl) w kolbach Erlenmajera, wytrząsano przez 30 minut na wytrząsarce. Następnie tak otrzymaną zawiesinę gleby rozcieńczono w roztworze fizjologicznym NaCl w stosunku 1:10–1:1000 000. Zawiesinę glebową otrzymanych rozcieńczeń nanoszono ilości 0,1 ml.

Analizę mikrobiologiczną wykonano w 3 powtórzeniach i każdorazowo określano: ogólną liczbę bakterii (na 10% podłożu Tryptic Soy Agar), liczbę bakterii *gram* ujemnych (na 10% podłożu Tryptic Soy Agar z dodatkiem 1% fioletu krystalicznego) oraz liczbę bakterii fluorescencyjnych z rodzaju *Pseudomonas* na podłożu King B [13] (obecność w podłożu siarczanu magnezu sprzyja wytwarzaniu charakterystycznej pigmentacji przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*). Bakterie były inkubowane przez 3 dni w temperaturze 28 °C. Wyniki podano w jednostkach tworzących kolonie – jtk, w przeliczeniu na 1 g suchej masy gleby.

Liczbę bakterii fluorescencyjnych *Pseudomonas* odczytano w świetle UV na transluminatorze, gdzie policzono kolonie wykazujące fluorescencję.

2.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

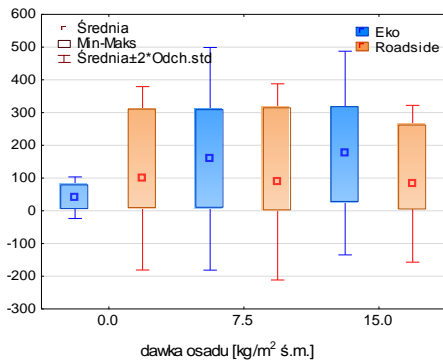
Wykonano statystykę podstawową uzyskanych wyników, stosując pakiet *Statistica* 10.0. Wykonano analizę wariancji ANOVA pomiędzy czynnikami doświadczenia, a liczbą mikroorganizmów w strefie ryzosferowej. Różnice istotne obliczono testem Tukeya przy poziomie istotności $p < 0,05$.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

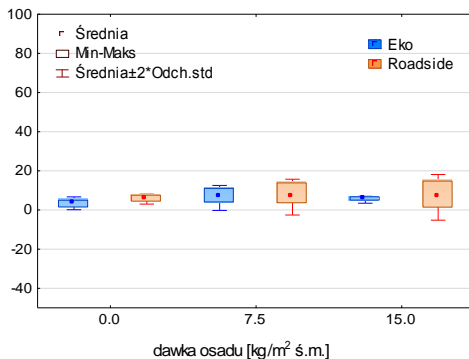
Z uwagi na dużą zawartość substancji organicznych, azotu, fosforu wapnia, magnezu oraz mikroelementów w osadach ściekowych, racjonalnym wydaje się wykorzystanie tego bioodpadu do przywrócenia tych składników do środowiska, szczególnie w sytuacji kiedy coraz częściej obserwuje się deficyt substancji organicznej w glebie [2, 21]. Jak wskazują Joniec i Furczak [10] dodanie osadu ściekowego do gleby powoduje wzmożenie aktywności mikrobiologicznej gleby i intensywny rozwój ryzosfery. Ponadto, liczebność drobnoustrojów w glebie będzie zależała od wielu czynników tj. pH gleby, stosunków wodno-powietrznych, zawartości materii organicznej, jak również od temperatury otoczenia. Z kolei Gondek [6] wskazuje, iż dostępność składników pokarmowych z osadów ściekowych jest funkcją panujących w okresie wegetacji warunków klimatycznych, dawki zastosowanego osadu ściekowego oraz wartości stosunku C:N.

Ogólna liczba bakterii [jtk·10⁷/g s.m.]

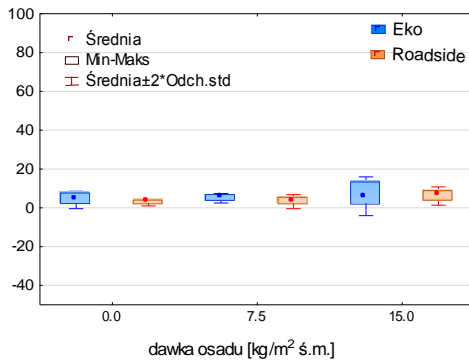
Maj



Lipiec



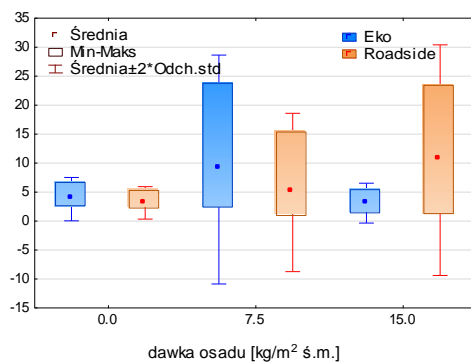
Październik



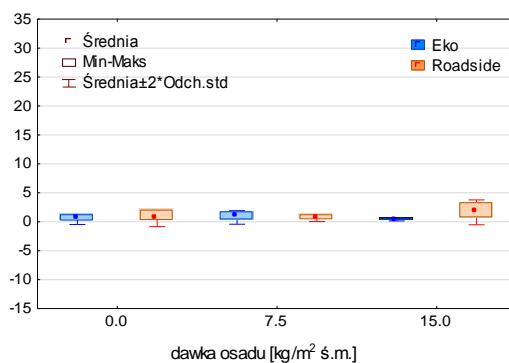
Rys. 1. Wpływ dawki osadu ściekowego (0; 7,5; 15 kg/m²) na ogólną liczbę bakterii [jtk·10⁷/g s.m.] w strefie ryzosferowej mieszanek traw Eko i Roadside w zależności od terminu poboru próbek

Liczba bakterii gram ujemnych [jtk·10⁶/g s.m.]

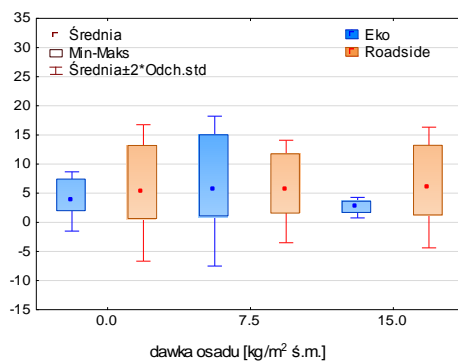
Maj



Lipiec



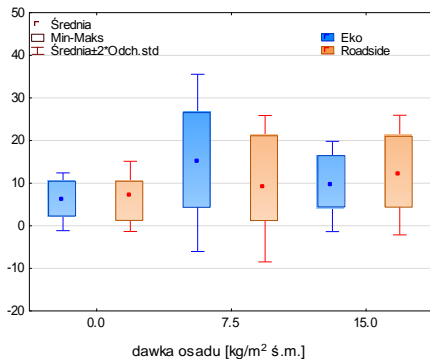
Październik



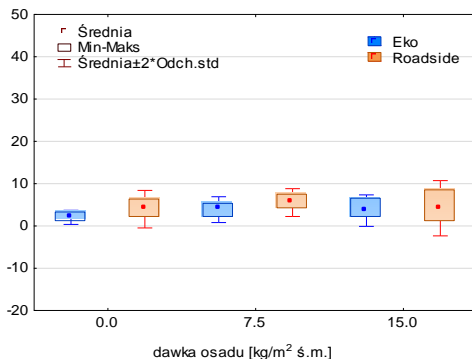
Rys. 2. Wpływ dawki osadu ściekowego (0; 7,5; 15 kg/m²) na liczbę bakterii gram ujemnych [jtk·10⁶/g s.m.] w strefie ryzosferowej mieszanek traw Eko i Roadside w zależności od terminu poboru próbek

Liczba bakterii *P. fluorescens* [jtk·10⁵/g s.m.]

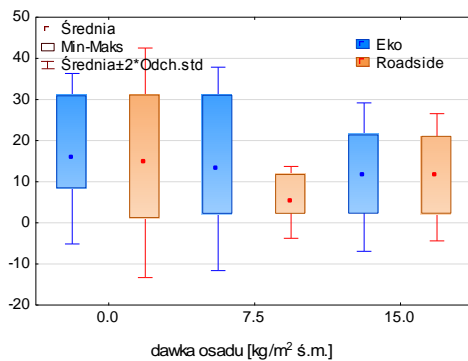
Maj



Lipiec



Październik



Rys. 3. Wpływ dawki osadu ściekowego (0; 7,5; 15 kg/m²) na liczbę bakterii *P. fluorescens* [jtk·10⁵/g s.m.] w strefie ryzosferowej mieszanek traw Eko i Roadside w zależności od terminu poboru próbek

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowane nawożenie osadem ściekowym wpłynęło na aktywność mikrobiologiczną w strefie ryzosferowej zastosowanych mieszanek traw. Na początku sezonu wegetacji, w maju średnia ogólna liczba bakterii w strefie ryzosferowej była najwyższa przy najwyższej zastosowanej dawce osadu ściekowego (15 kg/m^2) ($176,1 \cdot 10^7$ jtk/g s.m. gleby) z mieszanką Eko, natomiast najmniejszą zaobserwowano w próbkach zebranych z obiektów, bez stosowania osadów ściekowych ($2,7 \cdot 10^7$ jtk/g s.m. gleby), z mieszanką Roadside. Generalnie, wraz ze wzrostem dawek osadu ściekowego następował wzrost całkowitej liczby mikroorganizmów (rys. 1). Ponadto, wraz z rozwojem mikroorganizmów glebowych ilość substancji odżywczej zostaje wykorzystana, gromadzone są wówczas produkty przemian biochemicznych co może wpłynąć na zmiany właściwości fizyko-chemiczne gleb, a tym samym obniżyć ogólną liczbę bakterii w podłożu, co zostało przedstawione w badaniach Novák i in. [16] i można było zaobserwować w badaniach własnych.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono pozytywny wpływ dawek osadu ściekowego na wzrost liczby bakterii *gram*-ujemnych w strefie ryzosferowej (rys. 2). Drobnoustroje w trakcie prowadzenia różnych procesów biochemicznych, uwalniają do gleby metabolity, które modyfikują warunki i wpływają na rozwój mikroorganizmów zasiedlających teren [3, 21]. Średnia największa liczba bakterii *gram*-ujemnych była w próbach zebranych w maju przy najwyższej zastosowanej dawce osadu ściekowego $15,0 \text{ kg/m}^2$ ($10,5 \cdot 10^6$ jtk/g s.m. gleby) z mieszanką Roadside, a najmniejszą liczbę bakterii otrzymano dla próbek pobranych w lipcu na obiektach kontrolnych ($0,3 \cdot 10^6$ jtk/g s.m. gleby) z mieszanką Eko.

Do jednych z najliczniej występujących grup drobnoustrojów w przyrodzie należą komórki bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Te gram ujemne pałeczki są przedstawicielami tzw. ryzobakterii, które charakteryzują się tym, że tworzą asocjacje z korzeniami roślin. Bakterie te degradują wiele różnych cukrów, aminokwasów, alkoholi. Przedstawiciele tego gatunku mogą degradować związki wysoko molekularne, np. kwasy huminowe lub pestycydy [15]. Na rysunku 3 przedstawiono wpływ dawki osadu na liczbę bakterii *Pseudomonas fluorescens* w zależności od zastosowanej mieszanki traw. Średnio najwięcej bakterii *Pseudomonas fluoerscens* odnotowano na poletkach, na których zastosowano dawkę osadu w ilości $7,5 \text{ kg/m}^2$ i mieszankę Eko i Roadside (ok. $12 \cdot 10^5$ jtk/g s.m) dla obu mieszanek, zaś najmniejszą na poletkach kontrolnych (odpowiednio: 7 i $6 \cdot 10^5$ jtk/g s.m).

Mercado-Blanco i in.[16] podają, iż niektóre bakterie z rodzaju *Pseudomonas* produkują dyfundujące, fluoryzujące związki zwane sideroforami, które posiadają duże powinowactwo ze związkami żelaza. Gatunki te są wykorzystywane do biologicznej kontroli fitopatogenów występujących w glebie [15]. Oprócz funkcji ochronnej mogą one wzbogacać glebę w substancje odżywcze, hormony roślinne i witaminy oraz zwiększać biodostępności tych produktów dla roślin [20].

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że istotne różnice statystyczne liczby badanych mikroorganizmów występują w zależności od terminu poboru pró-

bek, natomiast pozostałe czynniki doświadczenia nie wpłynęły istotnie na rozwój mikroorganizmów w strefie ryzosferowej (tab. 2).

Tabela 2. Wpływ czynników doświadczenia na średnią liczbę wybranych mikroorganizmów w strefie ryzosferowej

Czynniki		ogólna liczba bakterii [jtk·10 ⁸ /g s.m.]	liczba bakterii gram ujemnych [jtk·10 ⁶ /g s.m.]	liczba bakterii <i>P. fluorescens</i> [jtk·10 ⁵ /g s.m.]
A-dawka osadu	0 kg/m ²	2,6	2,8	8,1
	7.5 kg/m ²	4,5	4,3	8,5
	15 kg/m ²	4,7	4,0	8,5
B-termin poboru	maj	1,1 a*	5,7 a*	9,5 a*
	lipiec	5,6 b*	7,3 b*	3,9 b*
	październik	4,5 b*	4,6 a*	4,6 a*
C-mieszanka traw	eko	4,5	3,2	8,8
	roadside	3,3	4,2	8,0

*Średnie w kolumnach dla poszczególnych czynników oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie na poziomie $p < 0,05$.

4. WNIOSKI

1. Badania mikrobiologiczne strefy ryzosferowej wykazały sezonowe wahania ogólnej liczby bakterii, liczby bakterii gram ujemnych oraz liczebności bakterii *Pseudomonas fluorescens*. Głównymi czynnikami, powodującymi zmiany liczebności analizowanych bakterii w strefie ryzosferowej były zastosowane dawki osadów ściekowych.
2. Największa liczba bakterii *Pseudomonas fluorescens* oraz gram ujemnych została zaobserwowana w maju oraz w październiku, natomiast najniższa liczba bakterii wystąpiła w lipcu, co mogło być wynikiem czynników atmosferycznych.
3. Ogólna liczba bakterii była najwyższa w miesiącu maju, natomiast w kolejnych miesiącach istotnie się zmniejszyła.

Praca została sfinansowana z pracy statutowej S/WBiŚ/3/2015 oraz z pracy własnej MB/WBiŚ/14/2014.

LITERATURA

- [1] BIENIŃ J., *Osady ściekowe. Teoria i praktyka*, Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2002.
- [2] CZYŻYK F., KOZDRAŚ M., *Właściwości chemiczne i kompostowanie osadów z wiejskich oczyszczalni ścieków*, Woda – Środowisko – Obszary – Wiejskie, 2004, Vol. 4, No. 2a, 559–569.
- [3] DURSKA G., *Antagonistyczne interakcje pomiędzy metylotrofami wyizolowanymi z gleby ryzosferowej i pozaryzosferowej jęczmienia oraz innymi mikroorganizmami glebowymi*, Nauka Przyroda Technologia, 2010, 4, 6, 74.
- [4] GŁAŻEWSKA-MANIEWSKA R., MACIEJEWSKA A., MELECH A., *Występowanie bakterii glebowych z rodzaju *Arthrobacter* spp. w uprawie żyta ozimego oraz ich enzymatyczne i antagonistyczne właściwości*, Acta Scientiarum Polonorum seria Agricultura, 2004, Vol. 3, No. 1, 129–37.
- [5] GONDEK K., FILIPEK-MAZUR B., *Agrochemiczna ocena wartości nawozowej kompostów różnego pochodzenia*, Acta Agrophysica, 2005, Vol. 5No. 2, 271–282.
- [6] GONDEK K., *Wpływ nawożenia nawozami mineralnymi, obornikiem od trzody chlewnej i komunalnymi osadami ściekowymi na plon i niektóre wskaźniki jakości ziarna pszenicy jarej (*triticum aestivum* L.)*, Acta Agrophysica, 2012, Vol. 19, No. 2, 289–302.
- [7] GREINERT A., *Ochrona i rekultywacja terenów zurbanizowanych*, Wyd. Politechniki Zielonogórskiej, Monografia, 2000, 97.
- [8] GREINERT A., *Gleby i grunty miejskie*. W: Stan środowiska w Zielonej Górze w 1999 roku. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska, Zielona Góra, 2000, 107–117.
- [9] JANKIEWICZ, U., *Bioaktywne metabolity ryzosferowych bakterii *Pseudomonas**, Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 2010, Vol. 30, No. 2, 83–92.
- [10] JONIEC J., FURCZAK J., *Liczebność wybranych grup drobnoustrojów w glebie biellicowej pod uprawą wierzby użyźnionej osadem ściekowym w drugim roku jego działania*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, 2007, Vol. LXII, No. 1, 93–104.
- [11] JURKIEWICZ A., ORŁOWSKA E., ANIELSKA T., GODZIK B., TURNAU K., *The influence of mycorrhiza and EDTA application on heavy metal uptake by different maize varieties*, Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, Ser. Bot. 2004, Vol. 46, 7–18.
- [12] KABAŁA C., KARCZEWSKA A., KOZAK M., *Przydatność roślin energetycznych do rekultywacji i zagospodarowania gleb zdegradowanych*, Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu 2010, Rolnictwo XCVI, 576, 97–118.
- [13] KALEMBASA D., MALINOWSKA E., *Działanie osadu ściekowego na zawartość metali ciężkich w biomacie trawy *Miscanthus sacchariflorus* oraz w glebie*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 2010, Vol. 42, 198–203.
- [14] KING E.O., WARD M.K., RANEY D.E., *Two simple media for the demonstration of phycoyanin and fluorescein*, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1954, Vol. 44, 301–307.
- [15] KRZYWY E., IŻEWSKA A., *Gospodarka ściekami i osadami ściekowymi*, Wyd. Akademii Rolniczej w Szczecinie, Szczecin 2004.
- [16] MERCADO-BLANCO J., VAN DER DRIFT K.M., OLSSON P.E., THOMAS-OATES J.E., VAN LOON L.C., BAK-KER P.A., *Analysis of the pms CEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374*. Journal of Bacteriology, 2001, 6, 1909–1920.
- [17] NOVÁK J., STANKOVIĚOVÁ K., CHLAPÍK J., LABUDA R., JAWOREKOWÁ S., *Characteristic of eutrophic soils in Slovak National Parks*. Ekológia trávneho porastu VII – medzinárodná vedecká konferencia, 2007, 72–77.

- [18] ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA z dnia 13 lipca 2010 r. w sprawie komunalnych osadów ściekowych (Dz.U. 2010 nr 137 poz. 924).
- [19] SULLIVAN T. S., STROMBERGER M. E., PASCHKE M. W., IPPOLITO J. A., *Long-term impacts of infrequent biosolids applications on chemical and microbial properties of semi-arid rangeland soil*, *Biology and Fertility of Soils*, 2005, Vol. 42, No. 3, 258–266.
- [20] WOLIŃSKA A., *Aktywność dehydrogenazowa mikroorganizmów glebowych i dostępność tlenu w procesie reoksydacji wybranych mineralnych gleb Polski*, *Acta Agrophysica*, 2010, Vol. 180, Rozpr. Monogr. 3.
- [21] WONG J.W.C., LAI K.M., FANG M., MA K.K., *Effect of sewage sludge amendment on soil microbial activity and nutrient mineralization*, *Environmental International*, 1998, Vol. 24, No. 8, 935–943.

CHANGES IN THE NUMBER OF SELECTED MICROORGANISMS IN GRASS RHIZOSPHERE AFTER APPLICATION OF SEWAGE SLUDGE

The aim of the study was to present changes in the number of selected microorganisms in grasses rhizosphere after the application of sewage sludge. The study was conducted on four specially prepared research plot along the main roads in Białystok. Three doses of sewage sludge were applied: 0 (control), 7.5 and 15 kg/m². Then the plots were seeded with two mixtures of lawn grasses: Eko and Roadside. Microbiological tests of the rhizosphere showed seasonal variations of the total number of bacteria, Gram-negative bacteria counts and the number of bacteria *Pseudomonas fluorescens*. The used of sewage sludge doses was the main factor causing changes in the number of analyzed bacteria in the rhizosphere.