

OCENA ODDZIAŁYWANIA ZWIĄZKÓW SELENU ORAZ BENZYNY NA AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMÓW PRZEMIAN ZWIĄZKÓW AZOTU W GLEBIE

Michał Stręk[✉], Arkadiusz Telesiński

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki oddziaływania benzyny oraz selenu (IV) i (VI), na aktywność wybranych enzymów przemian azotu w glebie. Badania prowadzono w doświadczeniu laboratoryjnym na glebie zakwalifikowanej jako piasek gliniasty o zawartości węgla organicznego $8,7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Do próbek gleby wprowadzono w różnych kombinacjach kwas selenowy (IV) lub kwas selenowy (VI) (ilość dodanego Se wynosiła $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.) oraz benzynę w ilościach 2, 10 i $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Wszystkie próbki doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i inkubowano w stałej temperaturze 20°C . W 1., 7., 14., 28. i 56. dniu doświadczenia oznaczono spektrofotometrycznie aktywność reduktazy azotanowej, ureazy oraz proteaz. Wprowadzenie do gleby benzyny w dawce $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. wywołało stymulację aktywności ureazy oraz reduktazy, podczas gdy większe dawki benzyny inhibowały aktywność enzymów przemian azotu w glebie lekkiej. Po dodaniu selenu, zwłaszcza Se (VI) do gleby zanieczyszczonej benzyną w dawkach 10 i $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono głównie stymulację oznaczanych enzymów, zwłaszcza reduktazy azotanowej.

Słowa kluczowe: selen, benzyna, gleba, reduktaza azotanowa, ureaza, proteazy

WSTĘP

Nadmierna eksploatacja złóż naftowych, awarie podczas wydobywania, magazynowania i transportu surowców, stają się głównymi przyczynami narastającego skażenia środowiska substancjami ropopochodnymi [Gouda i in. 2016].

Kluczowe dla prawidłowego przebiegu procesu biodegradacji związków ropopochodnych jest występowanie odpowiedniej ilości substancji biogennej, w tym także azotu [Xenia i Refugio 2016]. Istotnym czynnikiem determinującym jego dostępność dla

[✉]michal.strek@zut.edu.pl

organizmów żywych jest metabolizm mikroflory glebowej. Mikroorganizmy rozkładając szczątki organiczne sprawiają, że azot staje się dostępny dla roślin. Przemiany związków azotu katalizowane są wiele enzymów, zarówno z klasy oksydoreduktaz, jak i hydrolaz [van Groenigen i in. 2015]. Substancje ropopochodne mogą jednakże negatywnie wpływać na aktywność mikroorganizmów i wydzielane przez nie enzymy [Stręk i Telesiński 2016a]. Dlatego też opracowanie szczegółowych programów zapobiegania degradacji gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, rekultywacji gleb zdegradowanych i ponownego ich zagospodarowania jest niezwykle ważnym problemem [Gałązka 2015].

Selen jako mikroskładnik dla organizmów żywych budzi kontrowersje. Z jednej strony jest on toksyczny już w niewielkich dawkach, które mogą prowadzić do negatywnych skutków środowiskowych, a z drugiej strony deficyt tego pierwiastka jest globalnym problemem związanym ze zwiększoną podatnością zwierząt i ludzi na wiele chorób [Borowska i in 2015]. Prowadzone wcześniej badania wykazały, że aplikacja selenu do gleb zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi może ograniczyć toksyczne oddziaływanie tych związków na aktywność niektórych enzymów oksydoredukcyjnych w glebie [Stręk i Telesiński 2015a, 2016a].

Celem badań była próba określenia oddziaływania selenu oraz benzyny na aktywność wybranych enzymów przemian związków azotu: reduktazy azotanowej, ureazy i proteazy w glebie lekkiej.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono, na próbkach gleb pobranych z poziomu ornopróchnicznego (0–30 cm) ziem rdzawych typowych znajdujących się na terenie Rolniczej Stacji Doświadczalnej w Lipniku (woj. zachodniopomorskie). Gleba ta charakteryzuje się składem granulometrycznym piasku gliniastego oraz zawartością węgla organicznego $8,7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. Do części ziemistych pobranego materiału glebowego wprowadzono w różnych kombinacjach benzynę bezołowiową (Statoil) oraz selen (w ilości $0,05 \text{ mmol Se} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m.) na dwóch stopniach utlenienia: (IV) i (VI), w postaci H_2SeO_3 i H_2SeO_4 (prod. Fluka). Odniesieniem (kontrolą) była gleba bez selenu i benzyny. W trakcie doświadczenia wilgotność próbek była utrzymywana na poziomie 60% maksymalnej pojemności wodnej. Glebę wymieszano i przechowywano w szczelnie zamkniętych szklanych pojemnikach typu twist w temperaturze 20°C . We wszystkich kombinacjach w trzech powtórzeniach badano spektrofotometrycznie aktywność reduktazy azotanowej – EC 1.6.6.1 [Abdelmagid i Tabatabai 1987], ureazy – EC 3.5.1.5 [Kandeler i Gerber 1988] oraz proteazy – EC 3.4.4.x [Ladd i Butler 1972] w 1., 7., 14., 28. i 56. dniu doświadczenia. W oznaczeniach zastosowano spektrofotometr UV-1800 firmy Shimadzu.

Na podstawie otrzymanych wyników aktywności enzymów obliczono indeks oddziaływania selenu, zgodnie ze wzorem podanymi przez Kaczyńską i innych [2015]:

$$IF_{\text{Se}} = \frac{A_{\text{Se}}}{A}$$

gdzie: IF_{Se} – indeks oddziaływania selenu;
 A – aktywność oksydoreduktaz w glebie kontrolnej lub w glebie zawierającej benzynę;
 A_{Se} – aktywność oksydoreduktaz w glebie po aplikacji selenu.

Wartości IF_{Se} równe 1 świadczą o braku wpływu selenu na aktywność oznaczanych enzymów, wartości powyżej i poniżej 1 wskazują odpowiednio na inhibicję i stymulację aktywności enzymu.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu oprogramowania Statistica 12.5 (Statsoft, Inc.). Grupy jednorodnie wyznaczono na podstawie obliczonych testem Tukeya najmniejszych istotnych różnic na poziomie $p < 0,05$. Na podstawie analizy wariancji η^2 wykazano procentowy udział poszczególnych czynników na zmiany aktywności oznaczanych enzymów.

WYNIKI I DYKUSJA

W porównaniu do gleby kontrolnej wprowadzenie benzyny w dawce $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ spowodowało w 1. dniu doświadczenia istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmniejszenie aktywności reduktazy azotanowej i proteaz (odpowiednio o 16,21 i 28,76%) oraz zwiększenie aktywności ureazy (o 55,56%). Stymulacja aktywności ureazy utrzymywała się przez cały okres trwania doświadczenia i kształtowała się na poziomie od 7,86% (28. dzień doświadczenia) do 65,44% (7. dzień doświadczenia). Również aktywność reduktazy azotanowej od 7. dnia do końca trwania doświadczenia uległa zwiększeniu w stosunku do kontroli (o 46,57–166,18%). Z kolei aktywność proteaz w 7. dniu doświadczenia była mniejsza niż w glebie kontrolnej (o 13,60%), podczas gdy w dwóch ostatnich terminach także odnotowano aktywację tej grupy enzymów (odpowiednio o 136,05 i 78,12%). Wielu autorów wykazało stymulację aktywności enzymów biorących udział w obiegu związków azotu pod wpływem niskich dawek benzyny lub innych substancji ropopochodnych [Rao i in. 2010, Ziółkowska i Wyszowski 2010, Stręk i Telesiński 2016a]. Prowadzone wcześniej badania wykazały ponadto, że aplikacja benzyny w niewielkich dawkach stymuluje aktywność innych enzymów, np. dehydrogenaz czy peroksydaz [Stręk i Telesiński 2015a].

Po dodaniu do gleby benzyny, w dawkach 10 i $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ odnotowano we wszystkich terminach pomiarów istotne statystycznie ($p < 0,05$) zmniejszenie aktywności reduktazy azotanowej. Po aplikacji benzyny w dawce $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ stwierdzona inhibicja jednakże zmniejszała się (od 93,16 do 30,36%), a w dawce $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ zwiększała się (od 97,10 do 99,79%) w trakcie trwania doświadczenia. Wprowadzenie benzyny w dawce $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ spowodowało także obniżenie aktywności ureazy w 28. i 56. dniu doświadczenia (odpowiednio o 35,68 i 46,55%) oraz aktywności proteaz w 7. i 14. dniu doświadczenia (odpowiednio o 47,79 i 21,98%), podczas gdy stymulacja aktywności pod wpływem tej dawki benzyny wystąpiła w przypadku ureazy w 14. dniu doświadczenia (o 15,07%), a w przypadku proteaz w 28. i 56. dniu doświadczenia (odpowiednio o 32,62 i 72,27%). Zanieczyszczenie gleby benzyną w dawce $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$, spowodowało inhibicję aktywności ureazy i proteaz w trakcie trwania

całego doświadczenia. To obniżenie aktywności było mniejsze niż w przypadku reduktazy azotanowej i wynosiło 57,37–82,85% dla ureazy oraz 41,18–57,94% dla proteaz (tab. 1). Kucharski i inni [2010] wykazali, że w glebie zanieczyszczonej benzyną, a także olejem napędowym zachodziła silna immobilizacja azotu. Ponadto zanieczyszczenia te silnie hamowały proces nityfikacji. Według danych literaturowych inhibicja enzymów glebowych jest najczęściej obserwowanym efektem skażenia gleby substancjami ropopochodnymi [Rao i in. 2010, Akubugwo i in. 2015, Stręk i Telesiński 2015a, Stręk i Telesiński 2016a].

Obliczone wartości indeksu oddziaływania selenu wykazały, że w glebie bez dodatku benzyny wprowadzenie Se (IV) od 7. do 28. dnia doświadczenia stymulowało aktywność reduktazy azotanowej (IF_{Se} 1,27–1,49), a Se (VI) od 14. do 56. dnia doświadczenia (IF_{Se} 1,05–2,03). Aktywność ureazy w glebie zawierającej Se (IV) była wyższa niż w glebie kontrolnej jedynie w 1. dniu doświadczenia (IF_{Se} 1,17), podczas gdy aplikacja Se (VI) spowodowała podwyższenie aktywności enzymu w trakcie trwania doświadczenia (IF_{Se} 1,17–1,39). Aktywność proteaz natomiast zwiększyła się pod wpływem Se (IV) tylko w 28. dniu doświadczenia (IF_{Se} 1,41), a pod wpływem Se (VI) w 7., 14. i 56. dniu doświadczenia (IF odpowiednio: 1,11, 1,19 i 1,21). W pozostałych przypadkach aktywność oznaczanych enzymów była mniejsza lub zbliżona do wartości w glebie kontrolnej (rys. 1A). W literaturze istnieją doniesienia zarówno o stymulacji [Nowak i in. 2004, Borowska i Koper 2011], jak i inhibicji aktywności enzymatycznej gleb pod wpływem selenu [Nowak i in. 2002, Onyszko i Telesiński 2015]. Wynika to między innymi z właściwości gleby, stopnia utlenienia selenu, jego dawki, a także rodzaju oznaczanego enzymu.

Przeprowadzone wcześniej badania wykazały, że zastosowanie selenu może ograniczyć oddziaływanie różnych substancji ropopochodnych na aktywność enzymów oksydoredukcyjnych [Stręk i Telesiński 2015a, 2016a, b] oraz pojemność antyoksydacyjną gleby [Stręk i Telesiński 2015b]. W przypadku enzymów biorących udział w przemianach związków azotu również niejednokrotnie ujawnia się ten efekt, zwłaszcza w glebie zawierającej dawkę benzyny 10 i 50 g·kg⁻¹ s.m.

W glebie z dodatkiem benzyny w dawce 2 g·kg⁻¹ s.m. aktywność reduktazy azotanowej w 1. dniu po aplikacji Se (IV) nie uległa zmianom, a w kolejnych dniach doświadczenia wystąpił stopniowy spadek aktywności tego enzymu do wartości IF_{Se} wynoszące 0,28 w ostatnim terminie pomiaru. Wprowadzenie Se (VI) wywołało zwiększenie aktywności reduktazy azotanowej w 1. dniu doświadczenia (IF_{Se} – 1,39), podczas gdy w kolejnych terminach pomiarów aktywność enzymu była zbliżona lub mniejsza w porównaniu do stwierdzonej w glebie z dodatkiem samej benzyny (rys. 1B). W przypadku ureazy wprowadzenie Se (IV) spowodowało w trakcie trwania całego doświadczenia spadek aktywności tego enzymu (IF 0,28–0,81). Po aplikacji Se (VI) wystąpiła przez pierwsze dwa tygodnie doświadczenia zbliżona aktywność ureazy w porównaniu do gleby zawierającej benzynę, a w 28. i 56. dniu doświadczenia nastąpiło zwiększenie aktywności enzymu (IF_{Se} odpowiednio 1,65 i 1,29). Aktywność proteaz w glebie z dodatkiem selenu ulegała wahaniom w trakcie trwania doświadczenia i w porównaniu do gleby zawierającej benzynę w dawce 2 g·kg⁻¹ s.m. była większa po dodaniu Se (IV) tylko w 7. dniu doświadczenia (IF_{Se} – 1,44), a po dodaniu Se (VI) w 7. i 14. dniu doświadczenia (IF_{Se} 1,38 i 1,15).

Tabela 1. Zmiany aktywności enzymów przemian związków azotu w glebie po aplikacji benzyny
 Table 1. Changes of activity of enzymes involved in nitrogen transformations in soil treated with gasoline

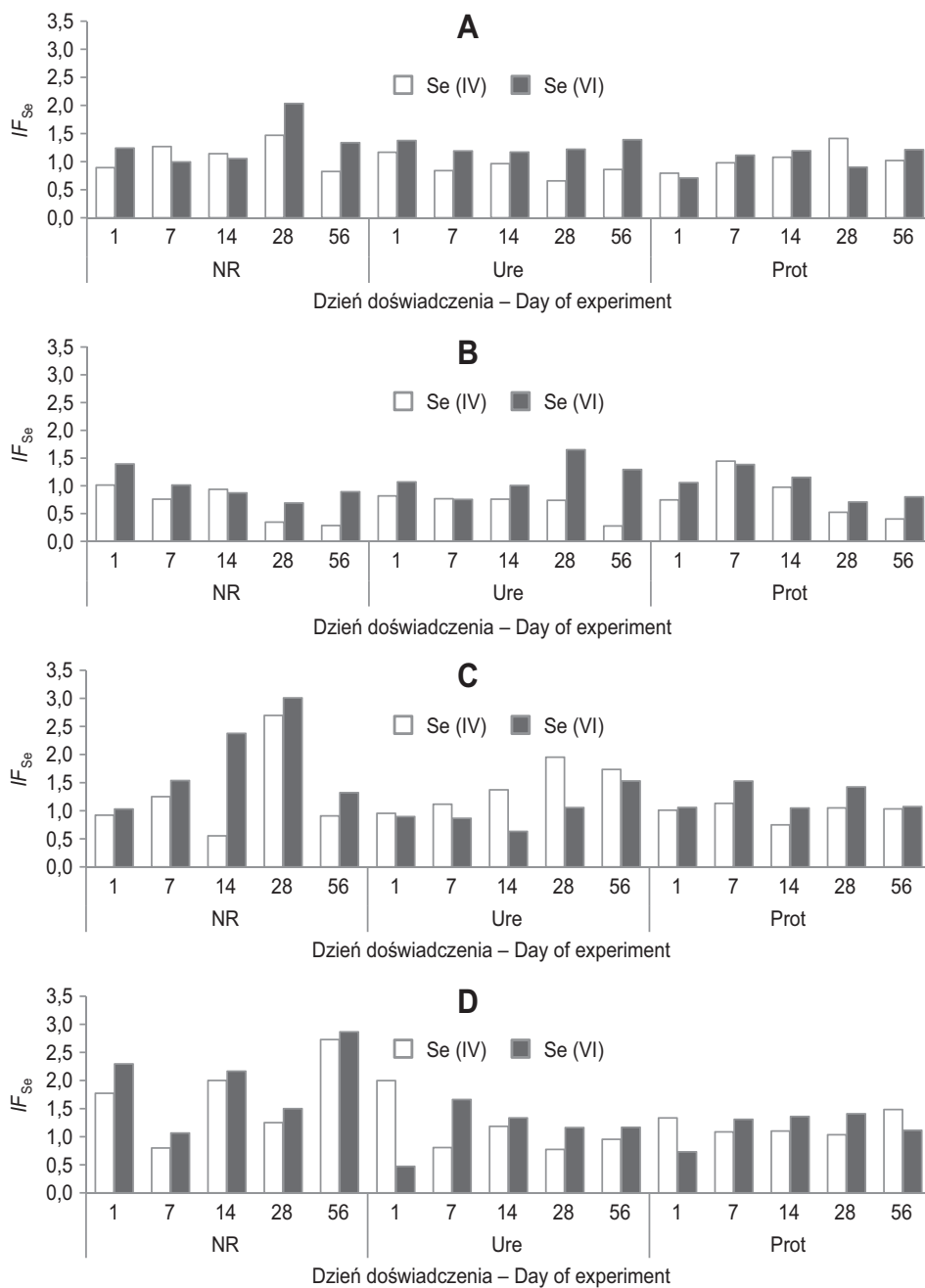
Dawka benzyny Gasoline dose [g·kg ⁻¹]	Dzień doświadczenia Day of experiment				
	1	7	14	28	56
Reduktaza azotanowa [μg N-NO ₂ ⁻ ·kg ⁻¹ s.m.·24 h ⁻¹] Nitrate reductase [μg N-NO ₂ ⁻ ·kg ⁻¹ d.m.·24 h ⁻¹]					
0	288,09 a	279,36 b	236,66 b	233,43 b	273,85 b
2	241,40 b	409,47 a	409,36 a	621,35 a	595,72 a
10	19,70 c	15,18 c	21,64 c	52,95 c	168,81 c
50	8,35 d	5,69 d	1,14 d	1,14 d	0,57 d
Ureaza [mg N-NH ₄ ·kg ⁻¹ s.m.·2 h ⁻¹] Urease [mg N-NH ₄ ·kg ⁻¹ d.m.·2 h ⁻¹]					
0	65,69 b	74,45 b	57,78 c	68,06 b	66,91 b
2	102,19 a	123,17 a	75,33 a	73,41 a	88,80 a
10	66,88 b	70,25 b	66,49 b	43,79 c	35,76 c
50	14,16 c	12,77 c	24,63 d	28,28 a	20,07 d
Proteazy [mg Tyr·kg ⁻¹ s.m.·2 h ⁻¹] Proteases [mg Tyr·kg ⁻¹ d.m.·2 h ⁻¹]					
0	3,06 a	2,72 a	1,82 a	2,33 c	2,24 b
2	2,18 b	2,35 b	2,01 a	5,50 a	3,99 a
10	1,97 b	1,42 c	1,42 b	3,09 b	3,87 a
50	1,58 c	1,60 c	0,85 c	0,98 d	1,24 c

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami w obrębie kolumn dla enzymu nie różnią się statystycznie $p < 0,05$.

Mean values denoted with the same letters within a column for enzyme do not differ statistically ($p < 0.05$).

Wprowadzenie selenu do gleby zawierającej benzynę w dawce 10 g·kg⁻¹ s.m. również spowodowało liczne wahania aktywności oznaczanych enzymów. Po aplikacji Se (IV) stwierdzono stymulację aktywności reduktazy azotanowej w 28. dniu doświadczenia (IF_{Se} 2,69), ureazy – od 7. dnia do końca trwania doświadczenia (IF_{Se} 1,12–1,73) oraz proteaz w 7. dniu doświadczenia (IF_{Se} 1,13). Z kolei dodatek Se (VI) zwiększał w trakcie trwania całego doświadczenia aktywność reduktazy azotanowej (IF_{Se} 1,03–3,01) oraz aktywność proteaz (IF_{Se} 1,05–1,52). Aktywność ureazy uległa stymulacji jedynie w 56. dniu doświadczenia (IF_{Se} 1,53) (rys. 1C).

Dodatek selenu do gleby zawierającej benzynę w dawce 50 g·kg⁻¹ s.m. spowodował zwiększenie aktywności oznaczanych enzymów. Wprowadzenie Se (IV) stymulowało aktywność reduktazy azotanowej prawie przez cały czas trwania doświadczenia (IF_{Se} odpowiednio: 1,25–2,73) z wyjątkiem 7. dnia, aktywność ureazy w 1. i 14. dniu doświadczenia (IF_{Se} odpowiednio: 2,00 i 1,18) oraz aktywność proteaz we wszystkich terminach pomiarów (IF_{Se} 1,03–1,48). Po aplikacji Se (VI) z kolei odnotowano podwyższenie aktywności reduktazy azotanowej we wszystkich terminach pomiarów (IF_{Se} 1,07–2,86), a także aktywności ureazy i proteaz od 7. dnia do końca trwania doświadczenia (IF_{Se} odpowiednio: 1,16–1,66 i 1,11–1,41) (rys. 1D).



Rys. 1. Indeksy oddziaływania selenu (IF_{Se}) na aktywność reduktazy azotanowej (NR), ureazy (Ure) oraz proteaz (Prot) w glebie bez dodatku benzyny (A) oraz zawierającej benzynę w dawkach 2 (B), 10 (C) i 50 (D) $g \cdot kg^{-1}$ s.m.

Fig. 1. Indices of selenium effect (IF_{Se}) on activity of nitrate reductase (NR), urease (Ure) and proteases (Prot) in soil without gasoline (A) and in soil treated with gasoline at dosages 2 (B), 10 (C) i 50 (D) $g \cdot kg^{-1}$ d.m.

Wyniki analizy η^2 wykazały, że na aktywność oznaczanych enzymów największy wpływ miała dawka benzyny, a procentowy udział tego czynnika na zmiany aktywności reduktazy azotanowej, ureazy i proteaz wynosił odpowiednio: 88,66, 81,07 i 51,16%. Jest to potwierdzeniem prowadzonych wcześniej badań nad oddziaływaniem selenu i innych dodatków modyfikujących na aktywność enzymatyczną gleby zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi [Kaczyńska i in. 2015, Stręć i Telesiński 2016a, c]. Procentowy udział aplikacji selenu w kształtowaniu aktywności oznaczanych enzymów był zdecydowanie mniejszy niż benzyny. Jednakże w przypadku reduktazy azotanowej i ureazy udział tego czynnika był większy niż wpływ terminu analiz (tab. 2).

Tabela 2. Procentowy udział czynników doświadczalnych w kształtowaniu aktywności enzymów przemian związków azotu w glebie

Table 2. Percentage participation of variable factors in the formation of enzymes involved in nitrogen transformations in soil

Czynnik Factor	Reduktaza azotanowa Nitrate reductase	Ureaza Urease	Proteazy Proteases
B	88,66	81,07	51,16
Se	3,21	4,32	2,73
D	2,55	1,94	26,74
B × Se	2,73	7,69	3,93
B × D	1,13	1,94	11,37
Se × D	0,84	1,66	1,41
B × Se × D	0,80	1,15	2,45
Błąd – Error	0,08	0,25	0,20

WNIOSKI

1. Wprowadzenie do gleby benzyny w dawce 2 g·kg⁻¹ s.m. wywołało stymulację aktywności ureazy oraz reduktazy. Z kolei zanieczyszczenie gleby większymi dawkami benzyny inhibitowało aktywność enzymów przemian azotu w glebie lekkiej.

2. Aplikacja Se (VI), spowodowała stymulację aktywności enzymów przemian związków azotu, zwłaszcza w glebie zanieczyszczonej benzyną.

3. Zarówno dodatek Se (IV), jak i Se (VI) w największym stopniu oddziaływał na aktywność reduktazy azotanowej.

LITERATURA

- Abdelmagid H.M., Tabatabai M.A., 1987. Nitrate reductase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.* 19, 421–427.
- Akubugwo E.I., Elebe E.U., Osuocha K.U., 2015. Studies on the impact of crude oil exploration on soil quality and crops grown in Kpean community in Khana local government area of Rivers State, Nigeria. *Int. Res. J. Biochem. Biotechnol.* 3 (1), 44–50.

- Borowska K., Koper J., 2011. Dynamics of changes of selenium content in soil and red clover (*Trifolium pretense* L.) affected by long-term organic fertilization on the background of selected soil oxidoreductases. *Pol. J. Environ. Stud.* 20 (6), 1403–1410.
- Borowska K., Lemanowicz J., Koper J., Siwik-Ziomek A., Piotrowska-Długosz A., Polkowska M., 2015. Zależności między zawartością fitodostępnych form selenu, siarki i fosforu w glebie oraz ich wpływ na pobieranie selenu przez rośliny pszenicy ozimej w warunkach zróżnicowanego nawożenia. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 580, 3–11.
- Gałązka A., 2015. Zanieczyszczenia gleb substancjami ropopochodnymi z uwzględnieniem biologicznych metod ich oczyszczenia. *Kosmos* 64 (1), 145–164.
- Gouda A.H., El-Gendy A.S., El-Razek T.M.A., El-Kassas H.I., 2016. Evaluation of phytoremediation and bioremediation for sandy soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Int. J. Environ. Sci. Develop.* 7 (7), 490–493.
- Kaczyńska G., Borowik A., Wyszowska J., 2015. Soil dehydrogenases as an indicator of contamination of the environment with petroleum products. *Water Air Soil Pollut.* 226 (11), 372.
- Kandeler E., Gerber H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72.
- Kucharski J., Tomkiel M., Boros A., Wyszowska J., 2010. The effect of soil contamination with diesel oil and petrol on the nitrification process. *J. Elem.* 15 (1), 111–118.
- Ladd I.N., Butler J.H.A., 1972. Short-term assay of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* 4, 19–30.
- Nowak J., Klódko D., Kąklewski K., 2002. Influence of various concentrations of selenic acid (IV) on the activity of soil enzymes. *Sci. Total Environ.* 291 (1–3), 105–110.
- Onyszko M., Telesiński A., 2015. Wpływ selenu i fluoru na aktywność fosfatyz w glebie lekkiej. *Inż. Ekolog.* 43, 109–114.
- Nowak J., Kąklewski K., Ligocki M., 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol. Biochem.* 36 (10), 1553–1558.
- Rao M.A., Scelza R., Scotti R., Gianfreda L., 2010. Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10 (3), 333–353.
- Stręk M., Telesiński A., 2015a. Zmiana aktywności wybranych enzymów oksydoredukcyjnych wytwarzanych przez mikroorganizmy w glebie lekkiej zanieczyszczonej benzyną w obecności jonów selenu. *Ochr. Środ.* 37 (1), 43–47.
- Stręk M., Telesiński A., 2015b. Assessment of selenium compounds use in limitation of petroleum impact on antioxidant capacity in sandy soil. *Environ. Protect. Nat. Res.* 26 (3), 6–11.
- Stręk M., Telesiński A., 2016a. Comparison of selenite (IV) and selenate (VI) effect on some oxidoreductive enzymes in soil contaminated with spent engine oil. *Plant Soil Environ.* 62 (4), 157–163.
- Stręk M., Telesiński A., 2016b. Porównanie oddziaływania selenu na aktywność peroksydazową gleby skażonej olejem napędowym lub przepracowanym olejem silnikowym. *Acta Agroph.* 23 (3), 147–161.
- Stręk M., Telesiński A., 2016c. Oddziaływanie nadtlenu wapnia na aktywność wybranych oksydoreduktaz w glebie zanieczyszczonej olejem krezotowym. *Chem. Environ. Biotechnol.* 19, 7–11.
- Van Groenigen J.W., Huygens D., Boeckx P., Kuyper T.W., Lubbers I.M., Rütting T., Groffman P.M., 2015. The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil* 1, 235–236.
- Xenia M.E., Refugio M.V., 2016. Microorganisms metabolism during bioremediation of oil contaminated soils. *J. Bioremed. Biodeg.* 7, 340.
- Ziółkowska A., Wyszowski M., 2010. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants. *Ecol. Chem. Engin. S* 17 (1), 73–82.

ASSESSMENT OF SELENIUM AND GASOLINE EFFECT ON ACTIVITY OF SOME ENZYMES INVOLVED IN NITROGEN TRANSFORMATION IN SOIL

Summary. This paper describes the impact of selenium in two oxidation states (IV and VI) and gasoline on activity of enzymes involved in nitrogen transformations in soil: nitrate reductase (EC 1.6.6.1), urease (EC 3.5.1.5) and proteases (EC 3.4.4.x). The experiment was carried out in laboratory conditions on a soil material taken from the topsoil of Brunic Arenosol. According to the classification of the United States Department of Agriculture, it was soil with a granulometric composition of loamy sand with organic carbon content of $8.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ d.m.}$ and total nitrogen content $0.97 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ d.m.}$ Different combinations of selenic (IV) acid or selenic (VI) acid (the Se amount was $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$) and gasoline at the dosages of 2, 10 i $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ d.m.}$ were added to soil samples. All samples were adjusted to 60% of the maximum water holding capacity and stored at a temperature of 20°C . Activity of nitrate reductase, urease and proteases was determined on days 1, 7, 14, 28 and 56 using spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu) in three repetitions. The results were examined using Tukey's HSD test ($p < 0.05$) and two-way η^2 analysis. Basing on obtained results there was also calculated influence factor of selenium. Which equals to quotient of activity of enzyme in soil with selenium and activity in control sample or with contamination. Soil treatment with gasoline at the dosage of $2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ d.m.}$ increased activity of nitrate reductase and urease during whole experiment except day 1 for nitrate reductase. Higher gasoline dosages caused inhibition of all measured enzymes. Application of Se (VI) to soil contaminated with gasoline at dosage $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ d.m.}$ caused stimulation of nitrate reductase and proteases in all days of experiment. Selenium (IV) in soil with gasoline at the dosage $50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} \text{ d.m.}$ caused stimulation of all measured enzymes except day 1 for protease and urease. The η^2 analysis showed that gasoline had higher effect on activity of assayed enzymes than selenium, and percentage participations of this factors in the formation of nitrate reductase, urease and proteases were 88.66, 81.07 and 51.16%, respectively. Percentage participation of selenium effect was considerably lower for all enzyme activities than gasoline impact.

Key words: selenium, gasoline, soil, nitrate reductase, urease, proteases