

## Aktywność mikrobiologiczna i biochemiczna pod sadzonkami klonu zwyczajnego oraz lipy drobnolistnej rosnącymi na osadzie pogórnicyz silnie zanieczyszczonym pierwiastkami śladowymi

Microbiological and biochemical activity under Norway maple and small-leaved lime seedlings growing on post-mining sediment with high trace elements contamination

### ABSTRACT

Mocek-Płóćiniak A., Mleczek M., Skowrońska M. 2020. Aktywność mikrobiologiczna i biochemiczna pod sadzonkami klonu zwyczajnego oraz lipy drobnolistnej rosnącymi na osadzie pogórnicyz silnie zanieczyszczonym pierwiastkami śladowymi. Sylwan 164 (2): 127-132. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2019119>.

The aim of the study was to determine the abundance of soil microbiome and enzymatic activity in a control soil sample and in samples with post-mining sediment containing high concentrations of arsenic and some trace elements. The samples were collected under two-year-old seedlings of Norway maple (*Acer plantanoides* L.) and small-leaved lime (*Tilia cordata* Mill.), which came from the Pniewy Forest District (western Poland). Optical emission spectrometry with excitation in plasma induced by the Agilent 5110 ICP-OES spectrometer was applied to analyse the concentration of arsenic and other heavy metals in the substrates and plant material. Before analysis the samples were mineralised with concentrated (65%) nitric acid (V). The count of selected groups of soil microorganisms was measured with the serial dilution method by Koch. The microbiome was measured on selective media. The activity of dehydrogenases as well as acid and alkaline phosphatase was measured spectrophotometrically. The soil and sediment on which the seedlings grew were characterised by the following physicochemical parameters: soil texture (control – loamy sand, sediment – silt), pH (control – 5.85-5.92, sediment – 7.13-7.43), the content of phosphorus (control – 117-121 mg/kg, sediment – 38-46 mg/kg), potassium (control – 6.97-7.03 mg/kg, sediment – 57-61 mg/kg), nitrogen (control – 0.53-0.65 mg/kg, sediment – 1.7-2.1 mg/kg) and total carbon (control – 9.4-10.2 g/kg, sediment – 54.2-57.2 g/kg). The samples contained: control – 0.24 mg/kg, sediment – 282 mg/kg of As<sub>total</sub>, control – below the detection limit, sediment – 1,766 and 16,220 mg/kg of As(III) and (V) respectively. The counts of the microorganisms were lower ( $10^3$ - $10^5$ ) than in typical arable soils ( $10^5$ - $10^9$ ). The counts of bacteria and actinobacteria under the lime seedlings in the control were greater than in the sediment, whereas the counts of moulds were roughly identical. The counts of bacteria and moulds in the sediments under the maple seedlings were greater than in the control, whereas the counts of actinobacteria were roughly identical. The sediments under both species exhibited higher alkaline and acid phosphatase activity than the control soil sample. Only dehydrogenases exhibited higher activity in the control soil under both tree seedlings.

### KEY WORDS

arsenic, heavy metals, post-mining sediment, microorganisms, enzymatic activity

## ADDRESSES

Agnieszka Mocek-Płóćiniak <sup>(1)</sup> – e-mail: agnieszka.mocek-plociniak@up.poznan.pl  
 Mirosław Młeczek <sup>(2)</sup>, Monika Skowrońska <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;  
 ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań

<sup>(2)</sup> Zakład Analiz Antropogenicznych Zanieczyszczeń Środowiska, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;  
 ul. Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

<sup>(3)</sup> Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; ul. Akademicka 13,  
 20-950 Lublin

## Wstęp

Arsen (As) należy do najbardziej toksycznych pierwiastków spośród występujących powszechnie w środowisku. Pod wpływem naturalnych procesów oraz działalności człowieka uwalniany jest on do gleby, wód i powietrza. Międzynarodowa Agencja Badań nad Nowotworami (IARC) klasyfikuje ten metaloid w pierwszej grupie czynników rakotwórczych. Głównym rezerwuarem As jest litosfera. Do biosfery uwalniany bywa on w wyniku wietrzenia skał czy erupcji wulkanów. Działalność antropogeniczna (procesy wydobywania i hutnictwa rud metali nieżelaznych, spalanie paliw kopalnianych – węgla brunatnego i drewna, stosowanie w rolnictwie i hodowli zwierząt gospodarskich nawozów, pestycydów i herbicydów) przyczynia się także do znacznego zanieczyszczenia środowiska naturalnego jego związkami [Mucha i in. 2017]. Na działanie toksycznych związków As narażone są zarówno organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Toksyczność związków arsenu uzależniona jest głównie od wartościowości tego pierwiastka. Najniebezpieczniejsze są jego związki nieorganiczne. Arsen (III) jest bardziej toksyczny niż związki As (V) [Drewniak, Skłodowska 2007]. Żywe komórki bakteryjne, roślinne, zwierzęce i ludzkie narażone są głównie na działanie As w postaci arsenianów i arseninów. Te pierwsze hamują fosforylację oksydacyjną, blokując łańcuch oddechowy, natomiast drugie wykazują silną toksyczność, upośledzając funkcje wielu białek.

Celem badań było określenie liczebności podstawowych grup mikroorganizmów glebowych oraz aktywności enzymatycznej w glebie kontrolnej i osadzie pogórnym zawierającym wysokie stężenia arsenu i kilku metali ciężkich pochodzących spod hodowli dwóch bezlistnych sadzonek drzew – klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) i lipy drobnolistnej (*Tilia cordata* Mill.). W literaturze przedmiotu można odnaleźć szereg informacji dotyczących wpływu metali ciężkich (m.in. Cu, Zn, Pb, Cr i Cd) na aktywność mikrobiologiczną i biochemiczną gleby. Brak jednakże doniesień opisujących równocześnie oddziaływanie wysokiej zawartości arsenu na powyższe parametry.

## Materiał i metody

Materiał roślinny stanowiły 2-letnie bezlistne sadzonki: *Acer platanoides* L. (klon zwyczajny – K) oraz *Tilia cordata* Mill. (lipa drobnolistna – L). Sadzonki pochodziły z Nadleśnictwa Pniewy w województwie wielkopolskim (52°29'4"N, 16°15'28"E) i charakteryzowały się zbliżonymi rozmiarami. Oba gatunki wsadzano do doniczek o wymiarach 21×21 cm (średnica × wysokość), zawierających osad pogórnicy lub glebę stanowiącą kontrolę. Oznaczenie parametrów fizykochemicznych osadu i gleby wykonano w trzech powtórzeniach, wykorzystując materiały referencyjne według wykazu metod podanych w opracowaniu Mocka i Drzymały [2010]. Stężenie As w podłożach i materiale roślinnym, jak również metali ciężkich analizowano za pomocą optycznej

spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej spektrometrem Agilent 5110 ICP-OES (Agilent, USA), po uprzedniej mineralizacji próbek z wykorzystaniem stężonego (65%) kwasu azotowego (V) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Analizę zawartości As (V) oraz As (III) w glebie i osadzie pogórnym prowadzono z wykorzystaniem układu technik łączonych wysokosprawnej chromatografii cieczowej wraz z detekcją absorpcyjnej spektrometrii atomowej z generowaniem wodoroków (HPLC-HG-AAS) oraz z detekcją indukcyjnie sprzężonej plazmy optycznej spektrometrii emisyjnej (HPLC-ICP-OES). Liczebność wybranych grup mikroorganizmów glebowych określono metodą seryjnych rozcieńczeń według Kocha i wyrażono w jtk/g s.m. gleby. Wymienione grupy drobnoustrojów oznaczono na podłożach wybiórczych: ogólna liczebność heterotroficznych bakterii – podłoże agarowe firmy Standard Merck; liczebność promieniowców – Pochon; liczebność grzybów pleśniowych – Martin [1950]. Aktywność dehydrogenaz oraz fosfatazy kwaśnej i zasadowej oznaczono spektrofotometrycznie (Novospec) metodą Thalmanna [1968] oraz Tabatabai i Bremnera [1969].

## Wyniki i dyskusja

Gleba kontrolna, na której rosły sadzonki wspomnianych drzew, należała pod względem uziarnienia do piasków gliniastych (pg i LS) [Soil... 1999; Klasyfikacja... 2009]. Osad pogórnicy według wspomnianych kryteriów zaliczono odpowiednio do pyłu zwykłego (pyz) i pyłu (Silty – Si).

Odczyn próbki kontrolnej kształtował się na poziomie  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  5,85-5,92, a osadu pogórnicy  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  7,13-7,43. Zawartość łatwo dostępnego fosforu mieściła się w glebie w zakresie 117-121 mg/kg, natomiast w osadzie 38-46 mg/kg. Zawartość przyswajalnego potasu w kontroli zawierała się w przedziale 6,97-7,03 mg/kg, a w osadzie 57-61 mg/kg. Materię organiczną charakteryzowały azot i węgiel, których zawartość przedstawiała się następująco: gleba kontrolna 0,53-0,65 g/kg N i 9,4-10,2 g/kg C<sub>org</sub>; osad 1,7-2,1 g/kg N i 54,2-57,2 g/kg C<sub>org</sub>.

Ogólna zawartość As w osadzie była bardzo wysoka (tab. 1) [Salminen 2005]. Wśród form zdecydowanie przeważał arsen (V) w formie anionu ( $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ), co wynikało z dominacji procesów utleniania nad redukcją. Było to zjawisko korzystniejsze, gdyż formy As (V) są ogólnie mniej toksyczne zarówno dla roślin, jak i mikroorganizmów aniżeli formy As (III), występujące w związku

**Tabela 1.**

Zawartość [mg/kg] arsenu i wybranych metali ciężkich w glebie kontrolnej (Kontrola) i osadzie pogórnym (Osad) [Młeczek i in. 2017] oraz najwyższe wartości w glebach europejskich (Max [Salminen i in. 2005])  
Content [mg/kg] of arsenic and selected heavy metals in the control soil sample (Kontrola) and post-mining sediment (Osad) [Młeczek et al. 2017] as well as the highest values in European soils (Max [Salminen et al. 2005])

	Kontrola	Osad	Max
As <sub>tot</sub>	0,24	18 022	282
As (III)	*	1 766	b.d.
As (V)	*	16 220	b.d.
As <sub>org</sub>	*	36	b.d.
Cu	1,33	4 511	256
Zn	18,00	1 565	2 900
Pb	4,99	3 865	970
Ni	0,75	359	2 690
Cr	1,32	1 260	6 230
Cd	0,21	1 030	14

\* poniżej granicy wykrywalności; b.d. – brak danych

\* below detection limit; b.d. – lack of data

( $H_3AsO_3$ ) w warunkach redukcyjnych i przy niskim pH [Bowell 1994; O'Neil 1995; Neff 1997; Balasoiu i in. 2001; Karczewska i in. 2005].

Zawartość poszczególnych metali ciężkich w analizowanym osadzie była bardzo wysoka, ponieważ wielokrotnie przekraczała ilość spotykaną w glebach uprawnych Polski i dość rzadko w wielu glebach terenów przemysłowych [Rozporządzenie... 2016]. W glebie kontrolnej zawartość tych pierwiastków należy uznać za niską (tab. 2).

Liczebność bakterii heterotroficznych i promieniowców pod sadzonkami lipy drobnolistnej była większa w glebie kontrolnej aniżeli w osadzie. Liczebności grzybów pleśniowych w doświadczeniu z lipą należy określić jako zbliżone, z niewielką przewagą w osadzie. W przypadku doświadczenia realizowanego z sadzonkami klonu zwyczajnego większą liczebność bakterii heterotroficznych i grzybów pleśniowych określono w osadzie pogórnym niż w glebie kontrolnej, przy w miarę wyrównanych liczebnościach promieniowców. Generalnie średnią liczebność wszystkich analizowanych mikroorganizmów (tab. 3) należy uznać za niską ( $10^3$ - $10^5$ ) w porównaniu do liczebności mikrobiomu występującego w wielu glebach ukształtowanych z naturalnych polodowcowych materiałów macierzystych ( $10^5$ - $10^9$ ) [Martyniuk 2017]. Należy przyjąć, że zróżnicowane parametry fizyczno-chemiczne gleby kontrolnej i osadu, a szczególnie zawartość materii organicznej i wielu pierwiastków śladowych, wywoływały zróżnicowane interakcje, które wpływały inhibująco bądź stymulująco na rozwój mikrobiomu w analizowanych warunkach. Na działanie toksycznych związków As narażone są zarówno organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Jednak tylko mikroorganizmy – głównie bakterie i grzyby pleśniowe – wykształciły różne mechanizmy usuwania As z komórek, warunkujące oporność na arseniny i arseniany

**Tabela 2.**

Liczebność mikroorganizmów glebowych pod sadzonkami klonu zwyczajnego (Kl) i lipy drobnolistnej (Lp) w glebie kontrolnej (kontrola) i osadzie pogórnym (osad)

Abundance of soil microorganisms under Norway maple (Kl) and small-leaved lime (Lp) seedlings in control soil sample (kontrola) and in post-mining sediment (osad)

	Bakterie heterotroficzne Heterotrophic bacteria [ $10^5$ jtk/g s.m. gleby] [ $10^5$ cfu/g d.m. of soil]	Promieniowce Actinobacteria [ $10^4$ jtk/g s.m. gleby] [ $10^4$ cfu/g d.m. of soil]	Grzyby pleśniowe Moulds [ $10^3$ jtk/g s.m. gleby] [ $10^3$ cfu/g d.m. of soil]
Lp kontrola	157,70	1010,77	303,08
Lp osad	138,23	239,32	347,25
Kl kontrola	79,33	273,81	53,74
Kl osad	266,02	207,25	418,55

**Tabela 3.**

Zakres liczebności [jtk/g s.m. gleby] i biomasa [kg/ha] najważniejszych mikroorganizmów bytujących w glebie [Martyniuk 2017]

Range of count (Liczebność [cfu/g d.m. of soil]) and biomass (Biomasa [kg/ha]) of the most important soil organisms [Martyniuk 2017]

	Liczebność	Biomasa
Bakterie Bacteria	$10^7$ - $10^9$	300-3000
Promieniowce Actinobacteria	$10^6$ - $10^8$	300-3000
Grzyby Moulds	$10^5$ - $10^6$	500-5000

oraz zastosowanie ich w fito- i bioremediacji terenów zanieczyszczonych. Może się to odbywać poprzez:

- zmniejszenie pobierania anionów  $\text{HAsO}_4^{2-}$  i  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  przez systemy transportu fosforanów [Cervantes i in. 1994];
- przeprowadzenie transformacji chemicznych toksycznych związków arsenu – metylacja, demetylacja, redukcja, utlenianie [Drewniak, Skłodowska 2007];
- wykorzystanie specjalnych systemów detoksykacji arsenu, tzw. systemów ArsC, których mechanizm działania polega na redukcji As (V), a następnie usuwaniu As (III) poza komórkę [Silver, Phung 1996].

W przypadku doświadczeń z lipą drobnolistną i klonem zwyczajnym w glebie kontrolnej stwierdzono wielokrotnie większą aktywność dehydrogenaz niż w osadzie pogórnym (tab. 4). Odwrotne zależności, choć mniej wyraźne, zaobserwowano w przypadku fosfatazy zasadowej i kwaśnej. Może to wynikać z niewielkich ilości fosforu łatwo dostępnego w osadzie. Fosfatazy są bowiem bardziej aktywne w utworach glebowych o małej zawartości fosforu przyswajalnego, czyli występującego w formie jonów diwodorofosforanowych (V) –  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  bądź też wodorofosforanowych (V) –  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

Zebrana po 90 dniach doświadczenia biomasa sadzonek klonu zwyczajnego i lipy drobnolistnej była mniejsza niż pochodząca z gleby kontrolnej, odpowiednio o 55,5 i 48,7%. W poszczególnych częściach roślin stwierdzono także zróżnicowaną akumulację arsenu, która przedstawiała się następująco [Mleczek i in. 2017]:

- klon zwyczajny: korzenie około 1600, pędy około 140, liście około 30 mg/kg;
- lipa drobnolistna: korzenie około 600, pędy około 100, liście około 12 mg/kg.

## Wnioski

- ✦ Osady pogórnice charakteryzowały się silnym zanieczyszczeniem związkami arsenu i wieloma innymi pierwiastkami śladowymi. W ogólnej zawartości As dominowały mniej toksyczne dla roślin i drobnoustrojów formy As (V), a zasadowy odczyn tych osadów oraz większa zawartość materii organicznej ograniczały dostępność i mobilność wielu pierwiastków śladowych, w tym metali ciężkich.
- ✦ Pomimo niekorzystnych parametrów chemicznych osadów sadzonki klonu zwyczajnego i lipy drobnolistnej zdolne były do wzrostu, aczkolwiek przyrosty ich biomasy były przynajmniej o połowę mniejsze niż sadzonek hodowanych na glebie kontrolnej. Większą odpornością na

**Tabela 4.**

Aktywność enzymatyczna pod sadzonkami klonu zwyczajnego (Kl) i lipy drobnolistnej (Lp) w glebie kontrolnej (kontrola) i osadzie pogórnym (osad)

Enzymatic activity under Norway maple (Kl) and small-leaved lime (Lp) seedlings in control soil sample (kontrola) and in post-mining sediment (osad)

	Dehydrogenazy Dehydrogenases [mg TPF/kg s.m. gleby/24h] [mg TPF/kg d.m. of soil/24h]	Fosfataza zasadowa Alkaline phosphatase [mg PNP/kg s.m. gleby/h] [mg PNP/kg d.m. of soil/h]	Fosfataza kwaśna Acid phosphatase [mg PNP/kg s.m. gleby/h] [mg PNP/kg d.m. of soil/h]
Lp kontrola	0,093	12,51	43,09
Lp osad	0,005	33,36	115,37
Kl kontrola	0,212	13,90	54,21
Kl osad	0,004	22,24	108,42

wpływ badanych zanieczyszczeń znajdujących się w osadzie charakteryzował się klon (większa akumulacja tych związków w tkankach korzeni).

- ✦ Klonu zwyczajnego nie można wprawdzie zaliczyć do hiperakumulatorów (metalofitów) nadających się do rekultywacji składowisk przedmiotowych osadów, ale może być on wykorzystywany do prób zalesiania zbiorników osadów poprzemysłowych.
- ✦ Podczas 90-dniowego doświadczenia pilotażowego stwierdzono bardzo wyraźne, aczkolwiek zróżnicowane liczebności podstawowych grup mikroorganizmów w analizowanych próbkach osadów i gleby kontrolnej. Świadczyć to może o hamującym bądź stymulującym wpływie określonych ksenobiotyków na rozwijający się mikrobiom w badanym okresie. Wskazane byłyby zatem dalsze badania wazonowe i polowe z wprowadzeniem do osadów określonych grup drobnoustrojów, które charakteryzowałyby się większą odpornością na wysokie stężenie arsenu i innych pierwiastków śladowych zakumulowanych w osadzie pogórnym.
- ✦ Aktywność dehydrogenaz w osadach była zdecydowanie mniejsza (20-50-krotnie) aniżeli w glebie kontrolnej, co może świadczyć o słabych przemianach węgla i azotu. W próbkach osadu stwierdzono dwukrotnie większą aktywność fosfataz, co może wynikać z niewielkiej ilości łatwo dostępných form fosforu (odczyn zasadowy), powodujących wzrost aktywności tych enzymów.

## Literatura

- Balasoju C. C. F., Zagury G. J., Deschenes L. 2001. Partitioning and speciation of chromium. Copper and arsenic in CCA-contaminated soils: influence of soil emposition. *Sci. Total Environ.* 280: 239-255.
- Bowell R. J. 1994. Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. *Appl. Geochem.* 9: 279-286.
- Cervantes C., Ji G., Ramirez J. L., Silver S. 1994. Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 355-367.
- Drewniak Ł., Skłodowska A. 2007. Rola bakterii w biogeochemicznym cyklu arsenu. *Post. Mikrobiol.* 46 (3): 275-285.
- Karczewska A., Szule A., Duszyńska D. 2005. Arsen w glebach leśnych rejonu Złotego Jaru (w Górach Złoty) na obszarze dawnego górnictwa złota i arsenu. W: Gworek B. [red.]. *Obieg pierwiastków w przyrodzie: bioakumulacja, toksyczność, przeciwdziałanie.* Warszawa, IOŚ. 22-26.
- Klasyfikacja uziarnienia gleb i utworów mineralnych PTG. 2009. *Roczn. Glebozn.* 40 (2): 5-16.
- Martin J. P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69: 215-232.
- Martyniuk S. 2017. Żywa gleba. *Farmer* 4: 116-120.
- Mleczek M., Goliński P., Krzesłowska M., Gąsecka M., Magdziak Z., Rutkowski P., Budzyńska S., Waliszewska B., Kozubik T., Karolewski Z., Niedzielski P. 2017. Phytoextraction of potentially toxic elements by six tree species growing on hazardous mining sludge. *Environ Sci Pollut Res* 24: 22183-22195.
- Mocek A., Drzymała S. 2010. *Geneza, analiza i klasyfikacja gleb.* Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
- Mucha S., Berezowski M., Markowska K. 2017. Mechanizmy toksyczności i transportu arsenu u mikroorganizmów. *Post. Mikrobiol.* 56: 88-99.
- Neff J. M. 1997. Ecotoxicology of arsenic in the marine environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (5): 917-927.
- O'Neil P. 1995. Arsenic. W: Allowey B. J. [red.]. *Heavy metals in soils.* Blackie, Glasgow. 83-99.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi. 2016. *Dz. U., poz.* 1395.
- Salminen R. [red.]. 2005. *Geochemical Atlas of Europe. Part 1. Background Information, Methodology and Maps.* Geological Survey of Finland, Otamedia Oy, Espoo.
- Silver S., Phung L. T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprise. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753-789.
- Soil taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 1999. *Agriculture Handbook*, 436, Washington, DC: USDA, NRCS.
- Tabatabai M. A., Bremner J. M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301-307.
- Thalman A. 1968. Zur methodic der bestimmung der dehydrogenaseaktivität on boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch* 21: 249-258.