

PORÓWNANIE EKOTOKSYCZNOŚCI 1-BUTYLO-2,3-DIMETYLOIMIDAZOLIOWYCH CIECZY JONOWYCH Z ANIONEM TETRAFLUOROBORANOWYM I HEKSAFLUOROFOSFORANOWYM W STOSUNKU DO WYBRANYCH ENZYMÓW GLEBOWYCH

Arkadiusz Telesiński¹✉, Robert Biczak², Barbara Pawłowska²,
Michał Stręk¹, Maciej Płatkowski¹

¹ Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie

Streszczenie. Celem podjętych badań było określenie oddziaływania dwóch 1-butylo-2,3-dimetyloimidazoliowych cieczy jonowych z różnymi anionami: tetrafluoroboranowym [BMMIM][BF₄] i heksafluorofosforanowym [BMMIM][PF₆] na aktywność wybranych enzymów glebowych: dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej oraz ureazy. Badania przeprowadzono na piasku gliniastym o zawartości węgla organicznego 9,50 g·kg⁻¹. Do gleby wprowadzono wodne roztwory [BMMIM][BF₄] lub [BMMIM][PF₆] w ilościach: 0, 1, 10, 50, 100, 400, 700 i 1000 mg·kg⁻¹ s.m. Tak przygotowaną glebę napełniano wazony, do których następnie wysiano po 15 nasion jęczmienia jarego lub rzodkiewki. Przez cały okres badań utrzymywano stałą temperaturę 20 ±2°C oraz wilgotność na poziomie 70%. W 14. dniu doświadczenia oznaczono spektrofotometrycznie aktywność wymienionych enzymów. Wprowadzenie do gleby [BMMIM][BF₄] i [BMMIM][PF₆] spowodowało inhibicję aktywności wszystkich enzymów glebowych, pogłębiającą się wraz ze wzrostem dawki analizowanych substancji. Spośród oznaczanych enzymów najbardziej wrażliwa na obecność obu cieczy jonowych okazała się fosfataza kwaśna. Jedynie po aplikacji analizowanych związków, w dawce 1000 mg·kg⁻¹, największa inhibicja aktywności wystąpiła w przypadku ureazy.

Słowa kluczowe: ciecze jonowe, gleba, dehydrogenazy, ureaza, fosfatazy, wskaźnik oporności

✉arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl

WSTĘP

Aktualnie na całym świecie prowadzi się coraz więcej badań nad syntezą i właściwościami cieczy jonowych, które wskazują na możliwość praktycznego ich zastosowania [Pham i in. 2010]. Pierwszym opisanym przez Waldena w 1914 roku związkiem tego typu był azotan etyloamoniowy $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3]^+[\text{NO}_3]^-$, ale szersze zainteresowanie cieczami jonowymi datuje się na 1990 rok, kiedy to odkryto możliwości ich wykorzystania jako środowiska reakcji [Majewska i Białecka-Florjańczyk 2010]. Ze względu na swoje właściwości stały się one głównymi rozpuszczalnikami w tzw. zielonej chemii, znajdując szerokie zastosowanie w takich dziedzinach nauki, jak: synteza organiczna, biokataliza, elektrochemia, chemia analityczna i wiele innych [Liu i in. 2006, Matzke i in. 2009].

W odróżnieniu od rozpuszczalników organicznych ciecz jonowe są płynnymi solami całkowicie zbudowanymi z jonów. Składają się one zazwyczaj z dużego organicznego kationu oraz o wiele mniejszego nieorganicznego lub organicznego anionu [Stepnowski 2005]. Ładunek dodatni w tych solach zlokalizowany jest na atomie azotu, fosforu lub siarki [Pernak i in. 2005]. Wśród cieczy jonowych poszukuje się związków chemicznych o właściwościach biobójczych, które mogłyby zastąpić komercyjnie stosowane, niebezpieczne dla zdrowia i życia człowieka biocydy [Janiszewska i in. 2010].

W praktyce najczęściej stosowane są ciecz jonowe imidazoliowe i pirydyniowe. Najbardziej popularne i najdokładniej przebadane są z kolei pochodne 1-alkilo-3-metyloimidazoliowe [Docherty i in. 2007].

Słaba prężność par cieczy jonowych bywa często utożsamiana z brakiem ich szkodliwego oddziaływania na środowisko. Nie można jednak wykluczyć, że w wyniku dobrej rozpuszczalności w wodzie cieczy jonowych, ich resztkowe pozostałości znajdują się w ściekach i środowisku. Źródłem zanieczyszczenia środowiska mogą być również produkty i odpady zawierające ciecz jonowe. Pod uwagę należy brać także zanieczyszczenia wprowadzane bezpośrednio do środowiska wodno-glebowego, w wyniku różnorodnych zdarzeń incydentalnych takich jak awarie urządzeń technologicznych oraz pojazdów transportowych [Amde i in. 2015]. Rozpuszczalność w wodzie, a także zdolność do tworzenia wiązań wodorowych wpływają w znaczący sposób na szybkość dystrybucji, biodostępność, potencjał biodegradacyjny oraz bioakumulację cieczy jonowych w środowisku. Związki rozpuszczalne w wodzie rozprzestrzeniają się najszybciej zarówno w środowisku glebowym, jak i wodnym, będąc łatwiej dostępnymi dla mikroorganizmów oraz organizmów wyższych [Zhao i in. 2007]. Wiele cieczy jonowych zawiera w anionie atomy fluoru. Aniony takie mogą w środowisku ulegać hydrolizie, czego efektem może być powstawanie toksycznego fluorowodoru [Swatłowski i in. 2003].

Precyzyjną miarą stanu ekochemicznego gleb, uwzględniającą zarówno pojemność homeostatyczną danego ekosystemu ekologicznego, jak i poziom zanieczyszczenia środowiska, który zagraża organizmom żywym, jest aktywność enzymów glebowych [Bieleńska i Mocek 2010].

Celem podjętych badań było więc określenie oddziaływania dwóch cieczy jonowych: tetrafluoroboranu 1-butylo-2,3-dimetyloimidazoliowego [BMMIM][BF₄] i heksafluorofosforanu 1-butylo-2,3-dimetyloimidazoliowego [BMMIM][PF₆] na aktywność dehydrogenaz, fosfataz i ureazy.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w hali vegetacyjnej Zakładu Biochemii i Ekotoksykologii Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

W badaniach użyto glebę o składzie granulometrycznym piasku gliniastego, z zawartością węgla organicznego $9,50 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ilością frakcji $<0,02 \text{ mm}$ $10,01\%$ oraz pH $6,0$. Do gleby wprowadzono wodne roztwory [BMMIM][BF₄] lub [BMMIM][PF₆] w ilościach: $0, 1, 10, 50, 100, 400, 700$ i $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m. Po aplikacji cieczy jonowych wilgotność gleby doprowadzono do 70% maksymalnej pojemności wodnej i na tym poziomie utrzymywano ją w trakcie trwania doświadczenia. Tak przygotowaną glebę napełniono po trzy wazonów dla każdego wariantu, a następnie wysiano do nich po 15 nasion jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) lub rzodkiewki (*Raphanus sativus* L. subvar. *radicula* Pers.). Przez cały okres badań utrzymywano stałą temperaturę $20 \pm 2^\circ\text{C}$ i natężenie oświetlenia równe 7000 lux ów, w systemie 16 godzin na dzień i 8 godzin na noc. W 14. dniu doświadczenia pobrano próbki gleb i oznaczono w nich spektrofotometrycznie aktywność dehydrogenaz, EC 1.1.1.x [Thalmann 1968], fosfatazy kwaśnej, EC 3.1.3.2 i zasadowej, EC 3.1.3.1 [Tabatabai i Bremner 1969] oraz ureazy, EC 3.5.1.5 [Kandeler i Gerber 1988]. Do oznaczeń użyto spektrofotometru UV-1800 firmy Shimadzu. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono indeksy oporności enzymów (RS), zgodnie ze wzorem podanym przez Orwin i Wardle'a [2004].

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz komplementarnie porównano testem post-hoc Tukeya HSD, wykorzystując oprogramowanie Statistica 12.5 Statsoft. Przyjęty poziom istotności wyniósł $p < 0,05$.

WYNIKI I DISKUSJA

Wprowadzenie do gleby obu cieczy jonowych: [BMMIM][BF₄] oraz [BMMIM][PF₆] spowodowało w większości przypadków istotne zmiany aktywności oznaczanych enzymów.

W doświadczeniu wazonowym z jęczmieniem jarym aplikacja [BMMIM][BF₄] w dawce $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, w porównaniu do gleby kontrolnej, spowodowała istotny statystycznie spadek aktywności dehydrogenaz (o $5,25\%$), fosfatazy zasadowej (o $4,18\%$) oraz wzrost aktywności ureazy (o $2,58\%$). Po wprowadzeniu [BMMIM][PF₆] w tej dawce odnotowano istotną statystycznie inhibicję aktywności fosfatazy kwaśnej (o $3,33\%$) i fosfatazy zasadowej (o $6,00\%$). Pozostałe dawki badanych cieczy jonowych obniżały aktywność wszystkich oznaczanych enzymów, a zaobserwowana inhibicja pogłębiała się wraz z ich zwiększaniem i przy dawce $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ wynosiła dla dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej oraz ureazy, dla [BMMIM][BF₄], odpowiednio: $63,21, 56,05, 46,82$ i $86,70\%$, a dla [BMMIM][PF₆], odpowiednio: $45,37, 62,11, 53,02$ i $85,24\%$ (tab. 1).

W doświadczeniu z rzodkiewką po zastosowaniu [BMMIM][BF₄] w dawce $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ stwierdzono istotnie statystycznie wzrost aktywności dehydrogenaz (o $5,72\%$) oraz spadek aktywności fosfatazy kwaśnej (o $3,12\%$) i fosfatazy zasadowej (o $10,14\%$). Wprowadzenie [BMMIM][PF₆] w tej dawce wywołało zaś inhibicję aktywności fosfatazy kwaśnej

(o 4,82%) i fosfatazy zasadowej (o 9,72%). Podobnie jak w doświadczeniu z jęczmieniem jarym aplikacja większych dawek obu soli 1-butylo-2,3-dimetyloimidazoliowych hamowała aktywność wszystkich oznaczanych enzymów (tab. 2). Analogicznie do doświadczenia z jęczmieniem jarym zaobserwowana inhibicja pogłębiała się wraz ze zwiększeniem dawki cieczy jonowych i przy 1000 mg·kg⁻¹ wynosiła dla dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej oraz ureazy, dla [BMMIM][BF4], odpowiednio: 35,74, 48,02, 47,19 i 85,36%, a dla [BMMIM][PF6], odpowiednio: 39,97, 58,39, 53,69, 85,52%.

Prowadzone wcześniej badania nad oddziaływaniem 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych na aktywność enzymatyczną gleby wykazały zwiększającą się inhibicję aktywności enzymów glebowych: dehydrogenaz, katalazy, fosfatazy zasadowej, proteaz oraz amylazy wraz ze zwiększeniem dawki, jak i długością podstawnika alkilowego [Telesiński 2010]. Spadek aktywności dehydrogenaz glebowych pod wpływem siedmiu różnych imidazoliowych cieczy jonowych odnotowali również Liwarska-Bizukojc i inni [2015]. Wielu autorów donosi także o negatywnym wpływie imidazoliowych cieczy jonowych na aktywność drobnoustrojów, które są głównym źródłem enzymów w glebie [Carson i in. 2009, Wang i in. 2011, Yu i Nie 2011, Guo i in. 2015, Mester i in. 2015].

Tabela 1. Zmiany aktywności enzymów glebowych po aplikacji [BMMIM][BF4] i [BMMIM][PF6] w doświadczeniu wazonowym z jęczmieniem jarym

Table 1. Changes of soil enzyme activities after treatment with [BMMIM][BF4] and [BMMIM][PF6] in pot experiment with spring barley

Dawka cieczy jonowej Ionic liquids dose	DHA	Fk	Fz	URE
[BMMIM][BF4]				
0	8,18 ±0,04 ^a	265,10 ±13,06 ^a	242,24 ±4,35 ^a	207,78 ±2,53 ^b
1	7,75 ±0,91 ^b	260,26 ±7,46 ^{ab}	232,12 ±3,73 ^b	213,15 ±2,55 ^a
10	6,67 ±0,92 ^c	233,00 ±11,19 ^c	231,24 ±4,36 ^b	188,08 ±7,60 ^c
50	6,03 ±0,51 ^c	196,07 ±8,70 ^c	200,91 ±10,19 ^d	172,85 ±11,40 ^d
100	5,17 ±0,46 ^f	186,84 ±4,35 ^f	198,71 ±6,22 ^d	164,79 ±2,35 ^c
400	5,06 ±0,33 ^f	146,84 ±7,46 ^h	149,03 ±6,84 ^f	162,10 ±1,27 ^c
700	3,34 ±0,14 ^g	130,57 ±8,08 ⁱ	135,41 ±8,70 ^g	145,98 ±8,87 ^f
1000	3,01 ±0,08 ^g	116,50 ±5,61 ⁱ	128,81 ±10,57 ^h	27,64 ±2,78 ⁱ
[BMMIM][PF6]				
0	8,12 ±0,13 ^a	267,25 ±10,54 ^a	244,05 ±8,46 ^a	206,89 ±2,78 ^b
1	8,03 ±0,26 ^a	258,36 ±3,58 ^b	229,41 ±5,64 ^b	205,99 ±3,24 ^b
10	7,42 ±0,45 ^{cd}	224,68 ±8,54 ^d	224,64 ±3,89 ^c	182,36 ±5,04 ^c
50	6,98 ±0,33 ^d	200,27 ±4,36 ^c	221,35 ±7,05 ^c	170,33 ±2,39 ^d
100	5,89 ±0,42 ^c	172,28 ±6,24 ^g	200,36 ±5,62 ^d	160,91 ±3,57 ^c
400	5,76 ±0,43 ^c	121,04 ±2,28 ^j	175,36 ±4,58 ^c	125,60 ±4,58 ^g
700	5,01 ±0,38 ^f	118,64 ±3,89 ^j	123,25 ±6,54 ^b	98,26 ±6,58 ^h
1000	4,46 ±0,14 ^h	101,26 ±5,55 ^k	114,65 ±4,73 ⁱ	30,54 ±1,57 ⁱ

DHA – dehydrogenazy [mg TPF·kg⁻¹ s.m.·16 h⁻¹] – dehydrogenases [mg TPF·kg⁻¹ d.w.·16 h⁻¹].

Fk – fosfatasa kwaśna [mg p-NP·kg⁻¹ s.m.·h⁻¹] – acid phosphatase [mg p-NP·kg⁻¹ d.w.·h⁻¹].

Fz – fosfatasa zasadowa [mg p-NP·kg⁻¹ s.m.·h⁻¹] – alkaline phosphatase [mg p-NP·kg⁻¹ d.w.·h⁻¹].

URE – ureaza [mg N-NH₄·kg⁻¹ s.m.·2 h⁻¹] – urease [mg N-NH₄·kg⁻¹ d.w.·2 h⁻¹].

Obliczone wskaźniki oporności wykazały, że wprowadzenie obu cieczy jonowych w dawce 1 mg·kg⁻¹ w niewielkim stopniu wpłynęło na aktywność oznaczanych enzymów, zwłaszcza fosfatazy kwaśnej i ureazy w przypadku [BMMIM][BF4] oraz dehydrogenazy i ureazy w przypadku [BMMIM][PF6]. Analiza wpływu większych dawek cieczy jonowych na wskaźniki oporności wykazała, że po aplikacji [BMMIM][BF4] w dawkach od 10 do 700 mg·kg⁻¹ najbardziej wrażliwe na obecność tej cieczy jonowej w glebie okazały się dehydrogenazy oraz fosfataza kwaśna (spadek wartości RS od 0,79 do 0,37), z kolei po zastosowaniu [BMMIM][PF6] tylko fosfataza kwaśna (spadek wartości RS od 0,72 do 0,29). W glebie z największą dawką obu cieczy jonowych największy spadek indeksu oporności wystąpił w przypadku aktywności ureazy (dla [BMMIM][BF4] RS = 0,07, a dla [BMMIM][PF6] RS = 0,08) – rysunek.

Tabela 2. Zmiany aktywności enzymów glebowych po aplikacji [BMMIM][BF4] i [BMMIM][PF6] w doświadczeniu wazonowym z rzodkiewką

Table 2. Changes of soil enzyme activities after treatment with [BMMIM][BF4] and [BMMIM][PF6] in pot experiment with common radish

Dawka cieczy jonowych Ionic liquids dose	DHA	Fk	Fz	URE
[BMMIM][BF4]				
0	8,03 ± 0,55 ^b	263,67 ± 5,17 ^a	241,06 ± 4,69 ^a	207,11 ± 5,68 ^a
1	8,49 ± 0,33 ^a	255,45 ± 6,87 ^b	216,61 ± 5,78 ^c	201,51 ± 3,47 ^{ab}
10	7,58 ± 0,68 ^c	235,17 ± 7,36 ^c	231,23 ± 2,96 ^b	200,61 ± 6,21 ^b
50	7,43 ± 0,47 ^{cd}	226,94 ± 9,61 ^d	230,17 ± 3,86 ^b	185,39 ± 2,98 ^c
100	6,37 ± 0,18 ^{de}	214,88 ± 4,69 ^e	181,00 ± 2,66 ^e	183,60 ± 3,38 ^c
400	5,76 ± 0,51 ^{ef}	212,69 ± 1,99 ^e	161,86 ± 3,89 ^e	149,57 ± 5,02 ^c
700	5,31 ± 0,38 ^f	152,39 ± 4,98 ^g	145,12 ± 4,83 ^h	132,55 ± 3,87 ^f
1000	5,16 ± 0,28 ^{fg}	137,04 ± 3,87 ^h	127,31 ± 5,01 ⁱ	30,32 ± 1,89 ^h
[BMMIM][PF6]				
0	8,13 ± 0,47 ^b	265,36 ± 4,58 ^a	245,20 ± 3,58 ^a	207,28 ± 7,32 ^a
1	8,20 ± 0,73 ^b	252,56 ± 7,21 ^b	221,36 ± 7,01 ^{bc}	205,24 ± 3,19 ^a
10	7,76 ± 0,14 ^c	220,36 ± 4,58 ^{de}	218,36 ± 1,88 ^c	188,36 ± 5,43 ^c
50	7,66 ± 0,61 ^c	193,56 ± 2,58 ^d	215,36 ± 4,87 ^c	168,36 ± 4,57 ^c
100	6,87 ± 0,47 ^d	173,54 ± 4,45 ^f	192,36 ± 5,06 ^d	158,36 ± 4,89 ^d
400	6,00 ± 0,27 ^{de}	136,35 ± 6,02 ^h	171,86 ± 4,47 ^f	127,63 ± 3,38 ^f
700	5,42 ± 0,30 ^f	120,36 ± 2,58 ⁱ	124,84 ± 5,39 ⁱ	101,35 ± 4,69 ^g
1000	4,88 ± 0,21 ^g	110,42 ± 6,24 ^j	113,56 ± 4,87 ^j	30,01 ± 2,33 ^h

DHA – dehydrogenazy [mg TPF·kg⁻¹ s.m.·16 h⁻¹] – dehydrogenases [mg TPF·kg⁻¹ d.w.·16 h⁻¹].

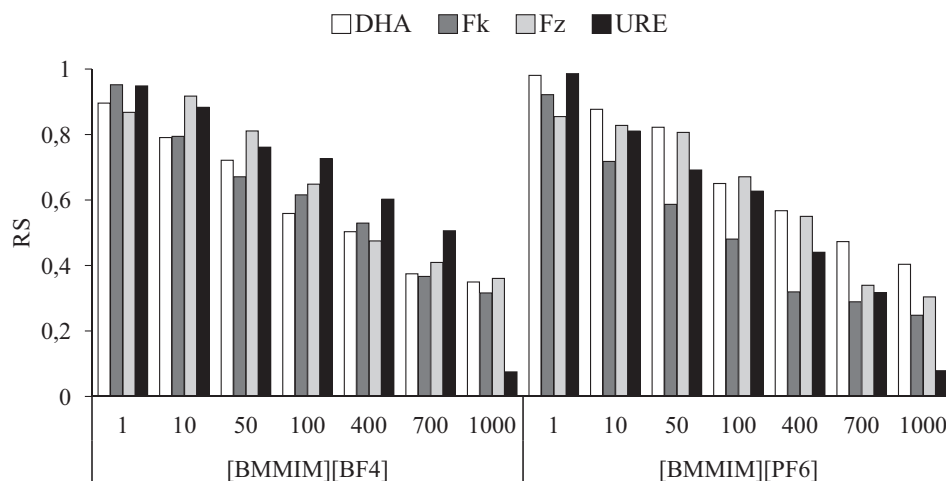
Fk – fosfataza kwaśna [mg p-NP·kg⁻¹ s.m.·h⁻¹] – acid phosphatase [mg p-NP·kg⁻¹ d.w.·h⁻¹].

Fz – fosfataza zasadowa [mg p-NP·kg⁻¹ s.m.·h⁻¹] – alkaline phosphatase [mg p-NP·kg⁻¹ d.w.·h⁻¹].

URE – ureaza [mg N-NH₄·kg⁻¹ s.m.·2 h⁻¹] – urease [mg N-NH₄·kg⁻¹ d.w.·2 h⁻¹].

Zmiany aktywności oznaczanych enzymów mogą wynikać z bezpośredniego oddziaływania kationu imidazoliowego, jak również z hydrolizy anionów i uwalniania do środowiska glebowego jonów fluorkowych [Freire i in. 2010]. Wcześniejsze badania

wykazały, że wprowadzenie do gleby 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych z anionem tetrafluoroboranowym spowodowało podwyższenie w glebie zawartości fluoru rozpuszczalnego i potencjalnie dostępnego dla roślin. Ponadto stwierdzono istotną statystycznie ujemną korelację między zawartością fluoru a aktywnością enzymatyczną gleby [Telesiński 2012]. Negatywny wpływ fluoru na właściwości mikrobiologiczne i biochemiczne gleb potwierdzają również badania wielu autorów [Telesiński i in. 2010, Monadal i in. 2015, Onyszko i Telesiński 2015, Szostek i in. 2015].



Rys. Średnie wskaźniki oporności (RS) enzymów glebowych po zastosowaniu [BMMIM][BF4] i [BMMIM][PF6]: DHA – dehydrogenazy, Fk – fosfataza kwaśna, Fz – fosfataza zasadowa, URE – ureaza

Fig. Mean resistance indices (RS) of soil enzymes after treatments with [BMMIM][BF4] and [BMMIM][PF6]: DHA – dehydrogenases, Fk – acid phosphatase, Fz – alkaline phosphatase, URE – urease

WNIOSKI

1. Wprowadzenie do gleby dwóch 1-butylo-2,3-dimetyloimidazoliowych cieczy jonowych z anionami: tetrafluoroboranowym [BMMIM][BF4] i heksafluorofosforanowym [BMMIM][PF6] spowodowało inhibicję aktywności enzymów glebowych: dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej i ureazy pogłębiającą się wraz ze wzrostem dawki analizowanych substancji.

2. Spośród oznaczanych enzymów najbardziej wrażliwa na obecność [BMMIM][BF4] i [BMMIM][PF6] okazała się fosfataza kwaśna. Jedynie po aplikacji analizowanych związków w dawce 1000 mg·kg⁻¹ największa inhibicja aktywności wystąpiła w przypadku ureazy.

3. Pomimo wykazanej ekotoksyczności [BMMIM][BF4] i [BMMIM][PF6] w stosunku do aktywności enzymatycznej gleby, trudno jednoznacznie wskazać, która z analizowanych soli wywarła większy wpływ na oznaczane parametry biochemiczne.

LITERATURA

- Amde M., Liu J.-F., Pang L., 2015. Environmental application, fate, effect and concerns of ionic liquids. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12611–12627.
- Bielińska E.J., Mocek A., 2010. Właściwości sorpcyjne i aktywność sorpcyjna gleb parków miejskich na terenach o zróżnicowanym wpływie antropopresji. *J. Res. Appl. Agric. Engin.* 55 (3), 20–23.
- Carson L., Chau P.K.W., Earle M.J., Gilea M.A., Gilmore B.F., Gorman S.P., McCanna M.T., Seddom K.R., 2009. Antibiofilm activities of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquids. *Green Chem.* 11 (4), 492–497.
- Docherty K.M., Dixon J.K., Kulpa C.F., 2007. Biodegradability of imidazolium and pyridinic ionic liquids by an activated sludge microbial community. *Biodegradation* 18 (4), 481–493.
- Freire M.G., Neves C.M.S.S., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., Fernandes A.M., 2010. Hydrolysis of tetrafluoroborate and hexafluorophosphate counter ions in imidazolium-based ionic liquids. *J. Phys. Chem. A* 114 (11), 621–630.
- Guo P., Zhu L., Wang J., Wang J., Liu T., 2015. Effects of alkyl-imidazolium ionic liquid [Omim]Cl on the functional diversity of soil microbial communities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 9059–9066.
- Janiszewska D., Syguda A., Pernak J., 2010. Ciechowskie ciecze jonowe. *Przem. Chem.* 89 (11), 1441–1445.
- Kandeler E., Gerber H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72.
- Liu X., Zhou F., Liang Y., Liu W., 2006. Benzotriazole as additive for ionic liquid lubricant: one pathway towards actual application of ionic liquids. *Tribol. Lett.* 23 (3), 191–196.
- Liawska-Bizukojc E., Maton C., Stevens C.V., 2015. Biodegradation of imidazolium ionic liquids by activated sludge microorganisms. *Biodegradation* 26, 453–463.
- Majewska E., Białecka-Florjańczyk E., 2010. Zielona chemia w przemyśle spożywczym. *Chem. Dydakt. Ekol. Metrol.* 15 (1), 21–27.
- Matzke M., Thiele K., Müller A., Filser J., 2009. Sorption and desorption of imidazolium based ionic liquids in different soil types. *Chemosphere* 74 (4), 568–574.
- Mester P., Wagner M., Rossmann P., 2015. Antimicrobial effects of short chained imidazolium-based ionic liquids – Influence of anion chaotropicity. *Ecotox. Environ. Saf.* 111, 96–101.
- Mondal N.K., Pal K.C., Dey M., Ghosh S., Das C., Datta J.K., 2015. Seasonal variation of soil enzymes in areas of fluoride stress in Birbhum District, West Bengal, India. *J. Taib. Univ. Sci.* 9 (2), 133–142.
- Onyszko M., Telesiński A., 2015. Wpływ selenu i fluoru na aktywność fosfataz w glebie lekkiej. *Inż. Ekol.* 43, 109–114.
- Orwin K.H., Wardle D.A., 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biol. Biochem.* 36 (11), 1907–1912.
- Pernak A., Iwanik K., Majewski P., Grzymisławski M., Pernak J., 2005. Ionic liquids as an alternative to formalin in histopathological diagnosis. *Acta Histochem.* 107 (2), 149–156.
- Pham T.P.T., Cho C.-W., Yun T.-S., 2010. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: A review. *Water Res.* 44 (2), 352–372.
- Stepnowski S., 2005. Preliminary assessment of the sorption of some alkyl imidazolium cations as used in ionic liquids to soil and sediments. *Aust. J. Chem.* 58 (3), 511–516.
- Swatłowski R.P., Holbrey J.D., Rogers R.D., 2003. Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *Green Chem.* 5 (4), 361–363.
- Szostek R., Ciećko Z., Walczak M., Swiontek-Brzezinska M., 2015. Microbiological and enzymatic activity of soil after pollution with fluorine. *Pol. J. Environ. Sci.* 24 (6), 2641–2646.

- Tabatabai M.A., Bremner J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1 (4), 307–310.
- Telesiński A., Smolik B., Grabczyńska E., 2010. Formation of adenylate energy charge (AEC) versus the fluorine content in forest soil in the area affected by emission from Police Chemical Plant. *Journal of Elementol.* 15 (2), 355–362.
- Thalmann A., 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21, 249–258.
- Wang H., Malhorta S.V., Francis A.J., 2011. Toxicity of various anions associated with methoxyethyl methyl imidazolium-based ionic liquids on *Clostridium* sp. *Chemosphere* 82 (11), 1597–1603.
- Yu Y., Nie Y., 2011. Toxicity and antimicrobial activities of ionic liquids with halogen anion. *J. Environ. Protect.* 2 (3), 298–303.
- Zhao D., Liao Y., Zhang G., 2007. Toxicity of ionic liquids. *Clean* 35 (1), 42–48.

COMPARISON OF ECOTOXICITY OF 1-BUTYL-2,3-DIMETHYLIMIDAZOLIUM IONIC LIQUIDS WITH TETRAFLUOROBORATE AND HEXAFLUOROPHOSPHATE ANION FOR SELECTED SOIL ENZYMES

Summary. Ecotoxicity of two 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium ionic liquids (ILs) with different anion: tetrafluoroborate [BMMIM][BF₄] and hexafluorophosphate [BMMIM][PF₆], to soil enzymes was tested in the research. A pot experiment was carried out in the vegetation hall of the Department of Biochemistry and Ecotoxicology at Jan Długosz University in Częstochowa. A monocotyledonous plant, the spring barley (*Hordeum vulgare* L.) and a dicotyledonous plant, the common radish (*Raphanus sativus* L. subvar. *radicula* Pers.) were used in the experiment. The seeds of the plants, originating from the same source, were sown into a 90-mm diameter plastic plant pot that was filled with the reference soil and a soil thoroughly mixed with the studied ILs. The ILs was used at the dosages of 0, 1, 10, 50, 100, 400, 700 and 1,000 mg·kg⁻¹ d.m. The soil used in the experiment was loamy sand with a dissolved matter containing of approximately 10%, an organic carbon of 9.0 g·kg⁻¹ and pH in 1 M KCl equal to 6.0. Throughout the testing period (14 days), constant substrate moisture content at the level required for the plants (70% field water capacity) and a constant temperature 20 ±2°C. On day 14 the soil samples were collected to analyze activity of dehydrogenase (EC 1.1.1.x), acid phosphatase (EC 3.1.3.2), alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1), and urease (EC 3.5.1.5) were measured spectrophotometrically. Obtained results showed that the application of [BMMIM][BF₄] and [BMMIM][PF₆] to soil caused inhibition of all enzymes activities, which increased with increase in ionic liquids dosages. Among all assayed enzymes acid phosphatase was the most vulnerable for treatment with both ionic liquids. However, in soil with the highest dosage (1,000 mg·kg⁻¹) of both ionic liquids, the resistance indices (RS) of urease activity were the lowest (RS values were 0.07 and 0.08, respectively). Despite proved ecotoxicity of [BMMIM][BF₄] and [BMMIM][PF₆] to the soil enzyme activity, it is difficult to clearly indicate which analyzed ILs had a stronger impact on determined biochemical parameters.

Key words: ionic liquids, soil, dehydrogenases, urease, phosphatases, resistance index