

## **OCENA PRZYDATNOŚCI BENTONITU W ZMNIEJSZENIU TOKSYCZNEGO DZIAŁANIA KADMU W STOSUNKU DO WYBRANYCH ENZYMÓW GLEBOWYCH**

*Janina Nowak, Dariusz Klódka, Justyna Szymczak, Marta Cieszyńska*

Katedra Biochemii, Akademia Rolnicza w Szczecinie

### **Wstęp**

W literaturze istnieje sporo informacji na temat wpływu metali ciężkich (w tym kadmu) na różne procesy mikrobiologiczne i biochemiczne zachodzące w glebie [MORENO i in. 2001; WYSZKOWSKA, KUCHARSKI 2003; NOWAK i in. 2003]. Wprowadzone w nadmiarze do gleby zmieniają jej odczyn, wpływają na liczebność drobnoustrojów, zakłócają przebieg procesów zachodzących w glebie i roślinach [CHEN i in. 2003; WEBER, KARCZEWSKA 2004; LIAO i in. 2005]. Stopień wysycenia jonami metalicznymi oraz adsorpcja na mineralnych cząstkach gleby decyduje o ich ruchliwości i możliwości przemieszczania się w profilu glebowym. Minerale ilaste należą do ważniejszych składników gleby, wpływają na jej właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne. Wpływ ten zależy zarówno od ilości jak i od rodzaju występujących minerałów w glebie. Dzięki dużej powierzchni sorpcyjnej (zewnątrznej i wewnętrznej) bentonit odgrywa dużą rolę w procesach chemicznych gleby [GREINERT 1995; PATORCZYK-PYTLIK 1999]. Możliwość wykorzystania substancji sorbujących, takich jak bentonit, budzi duże nadzieje w unieszkodliwianiu metali ciężkich w glebach nadmiernie obciążonych tymi związkami.

Celem badań było określenie oddziaływania zanieczyszczenia gleby kadmem na jej aktywność enzymatyczną oraz próba zmniejszenia niekorzystnego wpływu kadmu poprzez wprowadzenie do gleby różnych ilości minerału ilastego w postaci bentonitu.

### **Materiał i metody**

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na próbkach gleby o składzie granulometrycznym gliny lekkiej pylastej, pobranych z poziomu orno-próchniczego gleb Równiny Gumienieckiej o zawartości próchnicy 1,2%. Pobrany materiał glebowy podzielono na kilogramowe naważki, do których wprowadzono siarczan kadmu(II) w postaci wodnych roztworów w ilościach 0,05; 0,50 i 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup>, dodatkowo w celu porównawczym do gleb zanieczyszczonych kadmem wprowadzono bentonit w ilości 1, 5 i 10%. Przez cały okres doświadczenia próbki glebowe przechowywano w polietylenowych pojemnikach w optymalnych warun-

kach temperatury (20°C) i wilgotności (60% m.p.w.). W tak przygotowanych próbkach oznaczono kolorymetrycznie w trzech powtórzeniach w 1., 7., 14., 28. i 56. dniu aktywność dehydrogenaz [E.C.1.1.1.] według metody THALMANA [1968] w modyfikacji ÖHLINGERA [1996], ureazy [E.C.3.5.1.5.] według metody KANDLER i GERBER [1996], fosfatazy kwaśnej [E.C.3.1.3.2.] i zasadowej [E.C.3.1.3.1.] według metody TABATABAI i BREMNERA [1969] i EIVAZI i TABATABAI [1977] w modyfikacji MARGESIN [1996].

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabeli 1 w formie wartości procentowych w stosunku do aktywności enzymów w glebie kontrolnej, przyjmując jej aktywność za 100%. Wykresy na rys. 1 przedstawiają uśrednione wartości aktywności badanych enzymów ze wszystkich dni pomiarów, przeliczone jako procent aktywności w glebie kontrolnej, w zależności od stężenia wprowadzonej soli metalu oraz zastosowanych dodatków sorbujących.

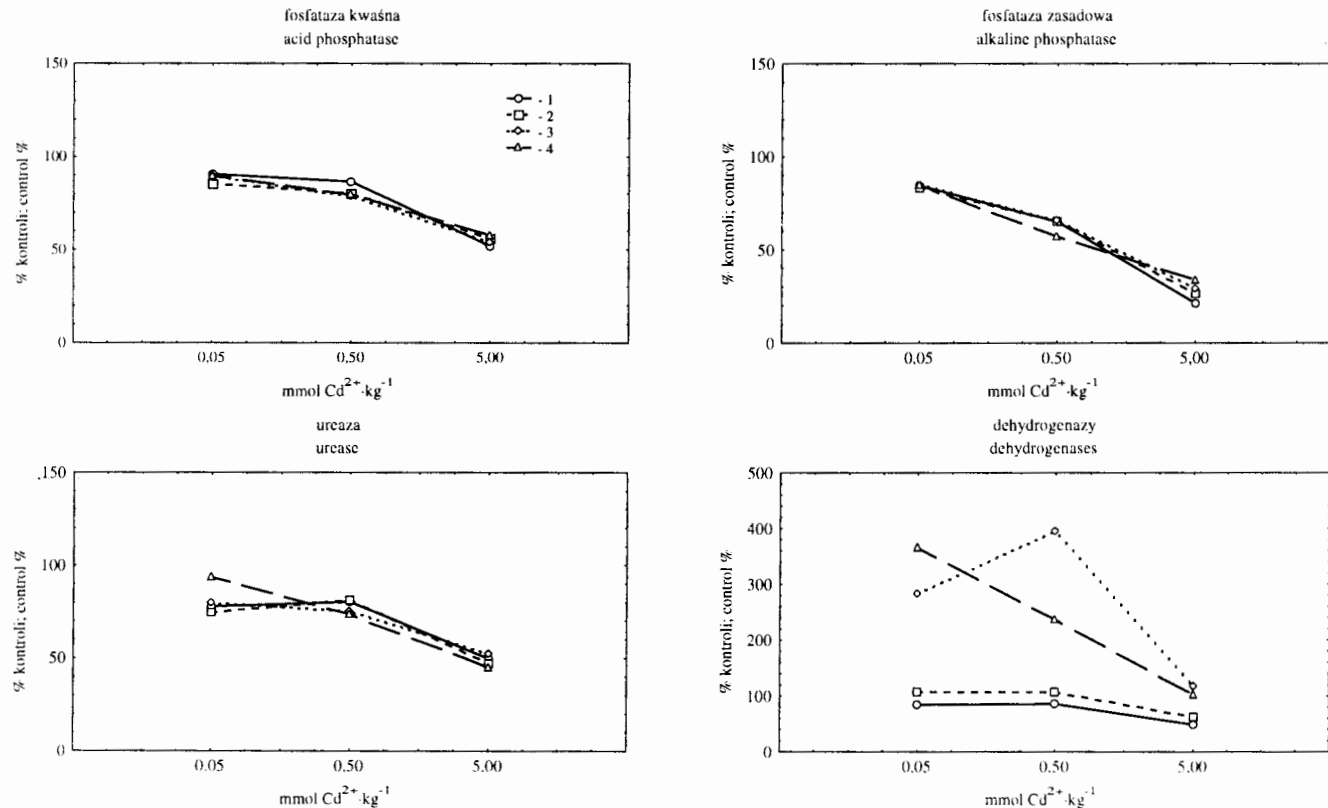
## Wyniki i dyskusja

Wyniki badań wskazują, że zanieczyszczenie gleby siarczanem kadmu wpłynęło ujemnie na aktywność badanych enzymów glebowych. Siła negatywnego oddziaływania była uzależniona od stopnia zanieczyszczenia gleby i rodzaju enzymu. Wraz z wzrostem stężenia kadmu w glebie wzrastał stopień inhibicji aktywności wszystkich badanych enzymów (od około 10% inhibicji przy stężeniu 0,05 mmol·kg<sup>-1</sup> do 50% inhibicji przy stężeniu 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup>). Ujemny wpływ metali ciężkich na aktywność analizowanych enzymów glebowych zaobserwowali również w swoich badaniach [MORENO i in. 2001; WYSZKOWSKA, KUCHARSKI 2003]. Wprowadzenie do gleby, w celu zmniejszenia negatywnego wpływu zanieczyszczenia gleb kadmem, zastosowanych dawek bentonitu wpłynęło w różnym stopniu na zmiany aktywności enzymów. Biorąc pod uwagę wartości uśrednione (średnia aktywność enzymów obliczona ze wszystkich dni pomiarów) można zauważyć, że 1% dodatek bentonitu do gleby zanieczyszczonej siarczanem kadmu we wszystkich stosowanych stężeniach wpłynął w niewielkim (kilkuprocentowym) stopniu na zmiany aktywności ureazy i obydwu fosfataz (rys. 1). Jedyne w przypadku dehydrogenaz po wprowadzeniu do gleby bentonitu w ilości 1% zaobserwowano podwyższenie aktywności enzymu średnio o około 12% przy każdym z zastosowanych stężeń siarczanu kadmu. Wprowadzenie do gleby 5% dodatku bentonitu wpłynęło w znaczącym stopniu tylko na zmiany aktywności fosfatazy zasadowej (8% podwyższenie aktywności enzymu względem aktywności enzymu wywołanej samym dodatkiem do gleby soli kadmu w stężeniu 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup>) i wyraźnie na podwyższenie aktywności dehydrogenaz (o 200% przy stężeniu 0,05 mmol·kg<sup>-1</sup>, 310% przy stężeniu 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup> i o 65% przy stężeniu 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup>). Po wprowadzeniu do gleby zanieczyszczonej solą kadmu w stężeniu 0,05 mmol·kg<sup>-1</sup> bentonitu w najwyższej z zastosowanych dawek (10%) zaobserwowano podwyższenie aktywności ureazy (o 16%) i dehydrogenaz (o 280%), natomiast nie zaobserwowano zmian w aktywności fosfataz glebowych. Po zastosowaniu tej dawki bentonitu do gleby zanieczyszczonej siarczanem kadmu w stężeniu 0,5 mmol·kg<sup>-1</sup> zaobserwowano podwyższenie aktywności tylko dehydrogenaz (o około 150%), natomiast w przypadku pozostałych z oznaczanych enzymów niewielkie obniżenie ich aktywności (około 8%). Wprowadzenie do gleby zanieczyszczonej najwyższym z stosowanych w doświadczeniu stężeń soli kadmu dodatku bentonitu w ilości 10%

Procentowe zmiany aktywności badanych enzymów  
Percentage changes in activities of studied enzymes

(mmol Cd <sup>2+</sup> ·kg <sup>-1</sup> s.m. gleby; DM soil)	Termin analizy; Term of analysis (dzień; day)																			
	1				7				14				28				56			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
Fosfataza zasadowa; Alkaline phosphatase																				
0,05	73	75	86	73	83	77	80	80	77	72	76	84	93	93	84	91	98	98	99	96
0,50	72	72	65	59	68	65	64	57	68	65	68	62	62	70	65	55	54	53	66	51
5,00	43	49	44	77	24	30	34	32	16	19	28	27	12	18	18	19	11	15	19	13
Fosfataza kwaśna; Acid phosphatase																				
0,05	94	82	102	102	97	87	81	80	92	78	87	86	87	88	84	84	84	91	92	94
0,50	87	81	86	84	98	88	81	88	86	89	81	80	75	66	74	75	87	78	74	71
5,00	64	59	67	60	50	46	52	56	50	65	57	51	47	50	49	65	48	58	43	54
Dehydrogenazy; Dehydrogenases																				
0,05	84	98	209	233	88	122	232	318	101	95	305	487	69	138	414	488	80	77	254	298
0,50	96	126	347	259	109	103	360	210	85	95	473	234	91	146	459	270	48	67	335	211
5,00	64	76	144	124	36	59	110	110	41	46	118	89	47	75	123	95	54	53	89	93
Ureaza; Urease																				
0,05	97	93	109	124	62	60	62	73	64	64	74	88	97	91	97	103	69	65	65	79
0,50	86	102	115	100	98	75	76	75	64	69	41	49	74	93	72	72	47	43	43	43
5,00	42	31	42	36	69	66	85	63	54	54	46	54	53	57	58	41	31	27	32	31

- A bez bentonitu; without bentonite  
 B 1% bentonitu; 1% bentonite  
 C 5% bentonitu; 5% bentonite  
 D 10% bentonitu; 10% bentonite



Rys. 1. Średnia aktywność badanych enzymów z całego okresu doświadczenia: 1 – siarczan(VI) kadmu(II), 2 – siarczan(VI) kadmu(II) + 1% bentonitu, 3 – siarczan(VI) kadmu(II) + 5% bentonitu, 4 – siarczan(VI) kadmu(II) + 10% bentonitu

Fig. 1. Average activity of studied enzymes for whole experiment duration: 1 – cadmium(II) sulphate(VI), 2 – cadmium(II) sulphate(VI) + 1% bentonite, 3 – cadmium(II) sulphate(VI) + 5% bentonite, 4 – cadmium(II) sulphate(VI) + 10% bentonite

spowodowało podwyższenie aktywności fosfatazy kwaśnej o 6%, fosfatazy zasadowej o 12% i dehydrogenaz o 54%, natomiast nie wpłynęło na aktywność ureazy.

Zmniejszenie toksyczności metali ciężkich w stosunku do mikroorganizmów glebowych poprzez wprowadzenie do gleby naturalnych sorbentów mineralnych zaobserwowała także w swoich badaniach PATORCZYK-PYTLIK [1999]. GREINERT [1995] w swojej pracy opisał metodę poprawy żyzności gleb i eliminacji toksycznego wpływu metali na roślinność, polegającą na ilowaniu gleb piaszczystych. Z badań autora wynika, że na stopień dostępności metali miał wpływ zarówno rodzaj, jak i dawka ilów. W miarę wzrostu dawki iltu do podłoża obniżała się w nim zawartość Cd i Zn – form rozpuszczalnych.

W przeprowadzonych badaniach, liniową zależność pomiędzy wzrostem dawki bentonitu (do gleby zanieczyszczonej kadmem) a podwyższeniem aktywności enzymu (zmniejszenie toksycznego wpływu kadmu) stwierdzono tylko w przypadku aktywności dehydrogenaz i przy najniższym stężeniu soli kadmu.

### Wnioski

1. Zanieczyszczenie gleby kadmem spowodowało wystąpienie inhibicji aktywności enzymatycznej, przy czym jej wielkość była dodatnio skorelowana ze stężeniem tego pierwiastka.
2. Zastosowanie bentonitu w celu niwelowania hamującego działania kadmu w stosunku do enzymów glebowych okazało się niejednoznaczne, w przypadku różnych stężeń kadmu, a także w przypadku różnej ilości tego sorbentu.
3. Dodatek bentonitu do gleby zanieczyszczonej siarczanem(VI) kadmu(II) w I stężeniu ( $0,05 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) spowodował zmniejszenie stopnia inhibicji aktywności dehydrogenaz (przy każdej stosowanej dawce bentonitu) oraz zmniejszenie stopnia inhibicji ureazy (przy dawce 5 i 10% bentonitu).
4. Wprowadzenie materiału sorbującego do gleby zawierającej siarczan(VI) kadmu(II) w stężeniu  $5,00 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  spowodowało zmniejszenie toksycznego oddziaływania kadmu na aktywność dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej i zasadowej (przy wszystkich dawkach bentonitu) i na aktywność ureazy (przy dawce 5% bentonitu).

### Literatura

- EIVAZI F., TABATABAI M.A. 1977. *Phosphatases in soil*. Soil Biol. Biochem. 9: 167–192.
- CHEN Y.X., HE Y.F., LUO Y.M., YU Y.L., LIN Q., WONG M.H. 2003. *Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium*. Chemosphere 50: 789–793.
- GREINERT A. 1995. *Wpływ dodatku iltów do gleby piaskowej na plonowanie roślin oraz sorpcję i przyswajalność Pb, Cd i Zn*. Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol. 418: 685–690
- KANDELER E., GERBER H. 1996. *Urease activity by colorimetric technique*, w: *Methods in soil biology*. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R., Springer: 213–217.

LIAC M., LUO Y., ZHAO X., HUANG CH. 2005. *Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in a paddy soil*. J. Zhejiang Univ. Sci. 6B, 5: 324–330.

MARGESIN R. 1996. *Acid and alkaline phosphomonoesterase activity with the substrate p-Nitrophenyl*. w: *Methods in soil biology*. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (red.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 13(2): 213–217.

MORENO J.L., GARCIA C., LANDI L., FALCHINI L., PIETRAMELLARA G., NANNIPIERI P. 2001. *The ecological dose value (ED<sub>50</sub>) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil*. Soil Biol. Biochem. 33: 483–489.

NOWAK J., SZYMCZAK J., SLOBODZIAN T. 2003. *Próba określenia 50% progu toksyczności dawek różnych metali ciężkich dla fosfatyz glebowych*. Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol. 492: 241–248.

ÖHLINGER R. 1996. *Dehydrogenase activity with the substrate TTC*, w: *Methods in soil biology*. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (red.). Springer Verlag, Berlin: 241–243.

PATORCZYK-PYTLIK B. 1999. *Ocena możliwości wykorzystania bentonitu jako sorbenta metali ciężkich wprowadzonych do gleby z osadem ściekowym*. Folia Univ. Agric. Stetin., Agric. 200, 77: 305–310.

TABATABAI M.A., BREMNER J.M. 1969. *Use of soil phosphate activity*. Soil Biol. Biochem. 1: 301–307.

THALMAN A. 1968. *Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)*. Landwirtsch. Forsch. 21: 249–258.

WEBER J., KARCZEWSKA A. 2004. *Biogeochemical processes and the role of heavy metals in the soil environment*. Geoderma. 122: 105–107.

WYSZKOWSKA J., KUCHARSKI J. 2003. *Właściwości biochemiczne i fizykochemiczne gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi*. Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol. 492: 435–442.

**Słowa kluczowe:** enzymy glebowe, fosfataza kwaśna, fosfataza zasadowa, ureaza, dehydrogenazy, bentonit, kadm

### Streszczenie

Doświadczenia przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na próbkach gleby o składzie granulometrycznym gliny lekkiej pyłastej, do których dodano wodne roztwory siarczanu(VI) kadmu(II) w ilościach 0,05; 0,50 i 5,00 mmol·kg<sup>-1</sup> oraz bentonit w ilości 1, 5 i 10%. W tak przygotowanych próbkach gleb dokonano pomiaru aktywności dehydrogenaz, ureazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że zanieczyszczenie gleby siarczanem(VI) kadmu(II) spowodowało inhibicję aktywności wszystkich badanych enzymów glebowych. Stopień inhibicji uzależniony był od stężenia metalu w glebie. Zastosowanie bentonitu do gleby zanieczyszczonej solą kadmu w I stężeniu (0,05 mmol·kg<sup>-1</sup>) spowodowało zmniejszenie stopnia inhibicji aktywności dehydrogenaz (przy każdej stosowanej dawce bentonitu) oraz zmniejszenie stopnia inhibicji ure-

azy (przy dawce 5 i 10% bentonitu). W przypadku zastosowania materiału sorbującego do gleby zawierającej sól kadmu w stężeniu  $5,00 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  zaobserwowano zmniejszenie toksycznego oddziaływania kadmu na aktywność dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej i zasadowej (przy wszystkich dawkach bentonitu) i na aktywność ureazy (przy dawce 5% bentonitu).

ESTIMATING THE EFFECT OF BENTONITE  
AS A FACTOR DECREASING  
TOXIC INFLUENCE OF CADMIUM  
ON SELECTED SOIL ENZYMES

*Janina Nowak, Dariusz Klódko, Justyna Szymczak, Marta Cieszyńska*  
Department of Biochemistry, Agricultural University, Szczecin

Key words: soil enzymes, acid phosphatase, alkaline phosphatase, urease, dehydrogenase, bentonite, cadmium

Summary

Experiments were carried out under laboratory conditions. Samples of light silty boulder loam soil were treated with water solution of cadmium(II) sulphate(IV). The doses used were 0.05; 0.50 i  $5.00 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ . In all soil samples the activities of dehydrogenase, urease, acid- and alkaline phosphatase were measured. Then, for each cadmium dose, three next experimental combinations were realized – with 1, 5 and 10% bentonite addition.

The results showed, that soil pollution with cadmium, results in inhibited activity of all tested enzymes, and the intensity of this inhibition depends on metal concentration in soil. After addition of bentonite, to soil polluted with I cadmium concentration ( $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the inhibition of dehydrogenase activity was reduced (for all used bentonite doses). Similar effect was stated for urease activity, however only for 5 and 10% bentonite content in soil. Application of bentonite to soil containing the highest cadmium dose ( $5 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) results in decreased toxic effect of this metal on dehydrogenase, acid and alkaline phosphatases activities (all used bentonite doses) as well as on the urease activity (only at bentonite dose 5%).

Prof. dr hab. Janina **Nowak**  
Katedra Biochemii  
Akademia Rolnicza  
ul. Słowackiego 17  
71-434 SZCZECIN  
e-mail: jnowak@agro.ar.szczecin.pl