

**Justyna Szymczak\*, Arkadiusz Telesiński\*, Dariusz Kłódka\*,  
Janina Nowak\***

**ROLA BENTONITU I HUMUSU W ZMNIEJSZENIU TOKSYCZNOŚCI  
METALI CIĘŻKICH W STOSUNKU DO WYBRANYCH ENZYMÓW  
GLEBOWYCH**

**THE INFLUENCE OF THE BENTONITE AND THE HUMUS IN THE  
REDUCE OF HEAVY METALS TOXICITY WITH RELATION TO CHOSEN  
SOIL ENZYMES**

**Słowa kluczowe:** dehydrogenazy, ureaza, kadm, bentonit, humus, gleba.

**Key words:** dehydrogenases, urease, cadmium, bentonite, humus, soil.

*The aim of this study was the utilization of sorptive matters, such as the bentonite or the humus, in neutralizing of heavy metals in soils overmuch laden these compounds. Results made the potted experience show that the cadmium (II) acetate used to the soil in all concentrations caused the inhibition of the activity of dehydrogenases and urease in the soil, whereat the effect increased in due measure the height of the metal concentration. Calculated index  $EC_{50}$  based on obtained values of the enzymatic activity (dehydrogenases and urease) in the light soil polluted with different doses of cadmium salts also in the soil with addition 5% of the humus or the bentonite. From analyses it results that the use of sorptive materials considerably enlarged the dose of the metal making 50% the inhibition of the enzymes activity.*

## **1. WPROWADZENIE**

Rozwój przemysłu, energetyki i rolnictwa przyczynił się do nagromadzenia w glebie toksycznych związków, w tym również metali ciężkich [Rosada 2007, Moreno i in. 2001, Kuczyńska 2003]. Wysoka koncentracja zanieczyszczeń powoduje uwolnienie tych substan-

---

\* *Dr inż. Justyna Szymczak, dr inż. Arkadiusz Telesiński, dr inż. Dariusz Kłódka, prof. dr hab. Janina Nowak – Katedra Biochemii, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; tel.: 91 449 62 83; 502 654 094; e-mail: justyna.szymczak@zut.edu.pl*

cji do środowiska i prowadzi do pogorszenia właściwości fizycznych, chemicznych oraz biologicznych gleb, co w konsekwencji może prowadzić do obniżenia żyzności i degradacji gleb [Wyszkowska, Kucharski 2003, Dziadek, Waclawek 2005]. Coraz większe uznanie zyskuje oznaczanie aktywności biologicznej gleby przez pomiar jej aktywności enzymatycznej [Kucharski, Hłasko-Nasalska 2005]. Najczęściej badanymi systemami enzymów w glebie z powodu ich roli w utlenianiu i uwalnianiu nieorganicznych składników z materii organicznej są oksydoreduktazy, transferazy i hydrolazy [Nowak i in. 2003, Bielińska i Mocek 2003]. Ważną rolę ochronną spełniają w glebie związki próchniczne, które charakteryzuje duża pojemności sorpcyjna. W związku z tym na terenach rolniczych zanieczyszczonych metalami ciężkimi wielką wagę przywiązuje się do zawartości próchnicy glebowej [Rosada 2007]. Możliwość wykorzystania substancji sorbujących takich jak bentonit czy humus budzi duże nadzieje w unieszkodliwianiu metali ciężkich, w glebach nadmiernie obciążonych tymi związkami. Zbadanie i ocena tej możliwości były celem badań prezentowanych w niniejszym opracowaniu.

## 2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono w warunkach szklarniowych w latach 2004 – 2005. Podłoże do badań stanowiła glina lekka pylasta (zawartość części spławialnych 12%, zawartość węgla organicznego 0,7%, odczyn lekko kwaśny lub obojętny). Rośliną testową w doświadczeniu była facelia błękitna (*Phacelia tanacetifolia*). Materiał glebowy zanieczyszczono octanem kadmu (II) w ilościach 0,05; 0,5; 5,0 i 50,0 mM  $Cd^{+2} \cdot kg^{-1}$ , dodatkowo w celu porównawczym, do podłoża zanieczyszczonego kadmem wprowadzono 5-procentowy dodatek bentonitu lub humusu.

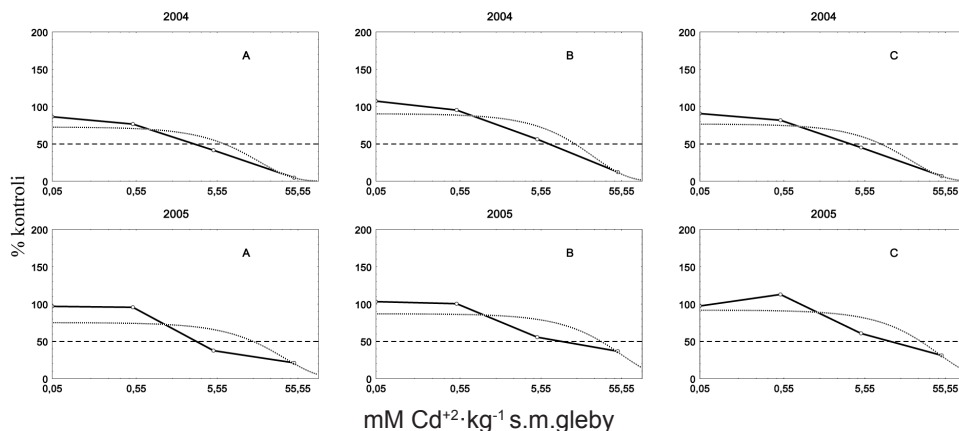
W pierwszym dniu doświadczenia oraz w fazach rozwojowych rośliny pobierano próbki glebowe do analiz. W tak przygotowanych próbkach przeprowadzono pomiar aktywności dehydrogenaz według metody [Thalmana 1986] w modyfikacji [Malkomesa 1993] oraz ureazy według metody [Kandeler i Gerber 1996], wykonując analizy w trzech powtórzeniach. Dane dotyczące aktywności enzymów odczytano w jednostkach aktywności i przeliczono w stosunku procentowym do aktywności enzymu w glebie kontrolnej, przyjętej za 100 %. Następnie obliczono średnie ze wszystkich terminów pomiarów i przedstawiono je graficznie na wykresach semilogarytmicznych.

## 3. UZYSKANE WYNIKI BADAŃ

Przeprowadzone badania wykazały negatywny wpływ kadmu na aktywność enzymów. Przy najwyższej z zastosowanych dawek (50 mM) aktywność dehydrogenaz i ureazy była niemalże całkowicie zahamowana.

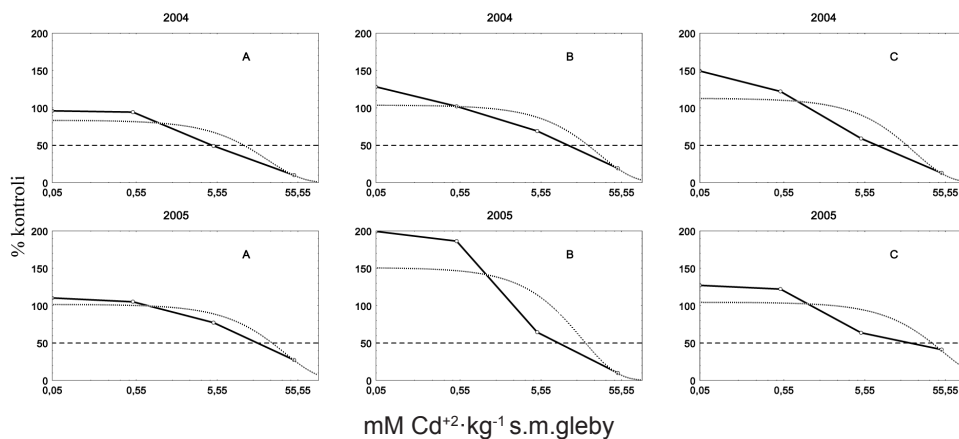
Wartości uśrednione aktywności ureazy z całego okresu doświadczenia wskazują, że wszystkie użyte w doświadczeniu dawki soli kadmu (II) spowodowały inhibicję aktywności

enzymu w glebie, zarówno w pierwszym, jak i w drugim roku badań (rys. 1A). W przypadku dehydrogenaz inhibicję aktywności enzymu wywołaną wszystkimi dawkami soli zaobserwano w pierwszym roku. W roku 2005 dwie najniższe dawki soli kadmu spowodowały niewielką aktywację dehydrogenaz, do ok. 10% (rys. 2A).



**Rys. 1.** Zależność aktywności ureazy w glebie z dodatkiem: octanu kadmu (II) (A), octanu kadmu (II) łącznie z humusem (B), octanu kadmu (II) łącznie z bentonitem (C)

**Fig. 1.** The dependence of urease activity in the soil with addition: cadmium (II) acetate (A), cadmium (II) acetate with humus (B), cadmium (II) acetate with bentonite (C)



**Rys. 2.** Zależność aktywności dehydrogenaz w glebie z dodatkiem: octanu kadmu (II) (A), octanu kadmu (II) łącznie z humusem (B), octanu kadmu (II) łącznie z bentonitem (C)

**Fig. 2.** The dependence of dehydrogenases activity in the soil with addition: cadmium (II) acetate (A), cadmium (II) acetate with humus (B), cadmium (II) acetate with bentonite (C)

Do wykresów przebiegu zmian aktywności enzymów glebowych pod wpływem poszczególnych stężeń soli kadmu dopasowano krzywe wykładnicze (tab. 1). Wysoka wartość współczynnika determinacji ( $R^2$ ), w większości przekraczająca 0,95, świadczy o znaczącym dopasowaniu krzywych wykładniczych do uzyskanych w doświadczeniu danych empirycznych. Poszczególne równania opisujące uzyskane krzywe wykładnicze posłużyły do wyznaczenia takiego stężenia metalu, które powoduje 50-procentową inhibicję aktywności enzymu ( $EC_{50}$ ) w glebie (tab. 1). Otrzymane wyniki badań wskazują, że dawki metalu powodujące taką inhibicję aktywności dehydrogenaz w glebie były prawie dwukrotnie wyższe od tych powodujących ten sam efekt w stosunku do ureazy. Obiekty zanieczyszczone kadmem, do których zastosowano substancje sorpcyjne (5-procentowy dodatek humusu bądź bentonitu), charakteryzowała większa aktywność badanych enzymów niż analogiczne bez dodatku czynnika łagodzącego. Wartości  $EC_{50}$  dotyczące aktywności enzymów w glebie zanieczyszczonej związkami kadmu były w większości przypadków mniejsze niż w glebie z dodatkiem substancji sorpcyjnych.

**Tabela 1.** Matematyczna postać funkcji wykładniczej wraz z wartościami współczynnika determinacji ( $R^2$ ) dla poszczególnych kombinacji soli kadmu i substancji sorpcyjnych

**Table 1.** Mathematical form of exponential function with values of determination coefficients for individual of combinations of cadmium salts and sorptive matters

Kombinacje	Dehydrogenazy			Ureaza		
	Postać funkcji	$R^2$	$EC_{50}$ ( $mM \cdot kg^{-1}$ )	Postać funkcji	$R^2$	$EC_{50}$ ( $mM \cdot kg^{-1}$ )
<b>2004 r.</b>						
<b>A</b>	$y = 83,49e^{-0,043x}$	0,9582	<b>15,08</b>	$y = 72,70e^{-0,055x}$	0,9780	<b>6,81</b>
<b>B</b>	$y = 103,80e^{-0,0343x}$	0,9529	<b>21,30</b>	$y = 90,49e^{-0,0403x}$	0,9626	<b>14,72</b>
<b>C</b>	$y = 118,82e^{-0,0441x}$	0,9259	<b>19,63</b>	$y = 76,73e^{-0,0486x}$	0,9719	<b>8,81</b>
<b>2005 r.</b>						
<b>A</b>	$y = 101,75e^{-0,0266x}$	0,9769	<b>26,71</b>	$y = 75,19e^{-0,0263x}$	0,7301	<b>15,51</b>
<b>B</b>	$y = 150,99e^{-0,0555x}$	0,9206	<b>19,91</b>	$y = 87,05e^{-0,0179x}$	0,7549	<b>30,97</b>
<b>C</b>	$y = 104,64e^{-0,0194x}$	0,7455	<b>38,07</b>	$y = 91,94e^{-0,0221x}$	0,8564	<b>27,56</b>

**Objaśnienia:** **A** – octan kadmu (II); **B** – octan kadmu (II) + 5% humusu; **C** – octan kadmu (II) + 5% bentonitu  
 $EC_{50}$  – dawka soli kadmu powodująca obniżenie aktywności enzymu o 50%.

#### 4. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że aktywność analizowanych enzymów w glebie zanieczyszczonej octanem kadmu (II) była generalnie istotnie niższa od aktywności enzymów w glebie niezanieczyszczonej. Doświadczenia przeprowadzone przez Strzelec [1997] potwierdzają negatywne oddziaływanie metali ciężkich na aktywność enzymatyczną gleb. Autorka zaobserwowała ujemną korelację pomiędzy stopniem zanieczyszczenia gleby Zn, Pb i Cd a aktywnością dehydrogenaz i liczebnością drobnoustrojów. O hamowaniu aktyw-

ności poszczególnych enzymów przez metale ciężkie donoszą również Niklińska i Chmiel [1997] oraz Nowak i inni [2003].

Ważną rolę ochronną spełniają w glebie związki próchniczne, które charakteryzuje duża pojemność sorpcyjna. W związku z tym na terenach rolniczych zanieczyszczonych metalami ciężkimi wielką wagę przywiązuje się do zawartości próchnicy glebowej, która potrafi uwstecznić metale na tyle skutecznie, że można ją uznać za czynnik zapobiegający negatywnym skutkom skażenia gleby. Z badań własnych wynika, że wprowadzenie do gleby 5-procentowego dodatku humusu zwiększyło w większości przypadków dawkę metalu powodującą 50-procentową inhibicję aktywności enzymów (dla ureazy prawie o połowę). Ochronna rola próchnicy glebowej wynika ze specyfiki związków humusowych stanowiących główny jej składnik. Związki humusowe charakteryzuje duża zawartość grup funkcyjnych, takich jak grupy karboksylowe, hydroksylowe, aminowe i inne, dzięki którym w reakcjach z metalami mogą tworzyć sole oraz chelatowe związki kompleksowe [Rosada 2007]. Właściwości bentonitu przyczyniły się również do zwiększenia stężenia soli kadmu, powodującego 50-procentową inhibicję aktywności dehydrogenaz i ureazy w obydwu latach badań. Wiąże się to z tym, że minerały ilaste oraz tlenki żelaza i glinu (najczęściej uwodnione), stanowiące najbardziej rozdrobnioną koloidalną fazę gleby, są najaktywniejszymi składnikami mineralnej frakcji gleby i posiadają ogromne znaczenie w kształtowaniu szeregu jej właściwości [Stuczyński i in. 2004]. W glebach o większej zawartości minerałów ilastych można zauważyć zmniejszenie się rozpuszczalności soli metali ciężkich, a spowodowane to jest głównie efektem adsorpcji – sorpcji wymiennej kationów na powierzchni minerałów ilastych, powstałej wskutek izomorficznego podstawienia kationów o wyższej wartościowości kationami o niższej wartościowości [Gębski 1998].

## 5. WNIOSKI

1. W przeprowadzonym w latach 2004 i 2005 doświadczeniu wazonowym octan kadmu (II) zastosowany do gleby we wszystkich stężeniach spowodował inhibicję aktywności dehydrogenaz i ureazy.
2. Efekt zaobserwowanej inhibicji aktywności badanych enzymów zwiększał się w miarę wzrostu stężenia metalu.
3. Po wprowadzeniu do gleby zanieczyszczonej octanem kadmu (II) 5-procentowego dodatku bentonitu i humusu zwiększyła się dawka metalu powodująca 50-procentową inhibicję aktywności badanych enzymów.

## PIŚMIENNICTWO

BIELIŃSKA E.J., MOCEK A. 2003. Aktywność enzymatyczna gleby użytkowanej sadowniczo jako wskaźnik stanu środowiska wywołany stosowaniem ściółek z tworzyw sztucznych. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 492: 25–39.

- DZIADEK K., WACŁAWEK W. 2005. Metale w środowisku. Cz. I. Metale ciężkie (Zn, Cu, Ni, Pb, Cd) w środowisku glebowym. *Chemia, Dydaktyka, Ekologia i Metrologia* 10 (1–2): 33–44.
- GĘBSKI M. 1998. Czynniki glebowe oraz nawozowe wpływające na przyswajanie metali ciężkich przez rośliny. *Postępy Nauk Rol.* 5: 3–16.
- KANDELER E., GERBER H. 1996. Urease activity by colorimetric technique. In: Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. *Methods in Soil Biology*. Springer: 213–217.
- KUCHARSKI J., HŁASKO-NASALSKA A. 2005. Aktywność enzymatyczna gleby zanieczyszczonej miedzią a plonowanie roślin. *Acta Agr. Silv.* XLV: 55–64.
- KUCZYŃSKA L. 2003. Liczebność drobnoustrojów i aktywność enzymatyczna gleby skażonej popiołem z węgla kamiennego. *Rocz. Glebozn.* LIV (1–2): 99–106.
- MALKOMES H.P. 1993. Eine modifizierte Methode zur Erfassung der Dehydrogenase – aktivität (TTC – reduction) im Boden nach Herbizidan – wendung. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschultzd* 45, 9, 180.
- MORENO J.L., GARCIA C., LANDI L., FALCHINI L., PIETRAMELLARA G., NANNIPIERI P. 2001. The ecological dose value ( $ED_{50}$ ) for assessing Cd toxicity on ATP content and dehydrogenase and urease activities of soil. *Soil Biol. Biochem.* 33: 483–489.
- NIKLIŃSKA M., CHMIEL M. 1997. Porównanie oporności na metale ciężkie u mikroorganizmów gleb z rejonów silnie zanieczyszczonych miedzią lub cynkiem. W: Barabasz W. (red.). *Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie*. AR Kraków: 491–504.
- NOWAK J., SZYMCZAK J., SŁOBODZIAN T. 2003. Próba określenia 50% progu toksyczności dawek różnych metali ciężkich dla fosfataz glebowych. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk. Rol.* 492: 241–248.
- ROSADA J. 2007. Ekologiczne aspekty wykorzystania obszarów objętych oddziaływaniem emisji hut miedzi do upraw roślin. *Postępy Ochr. Rośl.* 47 (1): 119–127.
- STRZELEC A. 1997. Zależność pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi gleb a ich aktywnością biologiczną. Porównanie oporności na metale ciężkie u mikroorganizmów gleb z rejonów silnie zanieczyszczonych miedzią lub cynkiem. W: Barabasz W. (red.). *Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie*. AR Kraków: 639–645.
- STUCZYŃSKI T., SIEBIELEC G., MALISZEWSKA-KORDYBACH B., SMRECZAK B., GAWRYSIK L. 2004. Wyznaczanie obszarów, na których przekroczone są standardy jakości gleb. *Biblioteka Monitoringu Środowiska, IOŚ*. Warszawa.
- THALMAN A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21: 249–258.
- WYSZKOWSKA J., KUCHARSKI J. 2003. Właściwości biochemiczne i fizykochemiczne gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi. *Zesz. Probl. Nauk Roln.* 492:435–442.