

**Arkadiusz Telesiński\*, Maciej Chruściel\*, Justyna Szymczak\***

**AKTYWNOŚĆ OKSYDAZY O-DIFENOLOWEJ W GLEBIE  
ZANIECZYSZCZONEJ KADMEM, OŁOWIEM I MIEDZIĄ**

**ACTIVITY OF O-DIPHENOL OXIDASE IN SOIL CONTAMINATED WITH  
CADMIUM, LEAD AND COPPER**

**Słowa kluczowe:** miedź, kadm, ołów, oksydaza o-difenolowa, gleba.

**Key words:** copper, cadmium, lead, o-diphenol oxidase, soil.

*The subject of presented study was the effect of contamination with copper, cadmium and lead alone and in mixture on o-diphenol oxidase activity in soil. The laboratory experiment was carried out on samples of light loamy sand ( $C_{org}$  content 0.87%), light silty clay ( $C_{org}$  content 1.09%) and medium clay ( $C_{org}$  content 3.38%). Into the 1 kg soil samples introduced aqueous solutions of  $Cd(NO_3)_2$ ,  $Pb(NO_3)_2$ ,  $Cu(NO_3)_2$ , separately or together in various combinations.*

*Doses of heavy metals were introduced borderline permissible concentrations in soil (0–0.3 m) belonging to group B of the Minister of Environment of the 9th in September 2002 ( $Cd - 4 mg \cdot kg^{-1}$ ;  $Cu - 150 mg \cdot kg^{-1}$ ;  $Pb - 100 mg \cdot kg^{-1}$ ). Immediately after the introduction of heavy metal solutions, and after 1, 3 and 6 hours o-diphenol oxidase activity was assayed.*

*Soil contamination with cadmium and lead resulted in inhibition of o-diphenol oxidase activity, while the presence of copper ions in the medium stimulated the enzyme activity. In soils with addition of different mixtures of heavy metals typically observed effect was larger than in soil contaminated with a metal. Moreover, the biggest changes on o-diphenol oxidase activity was observed in medium clay.*

---

\* *Dr inż. Arkadiusz Telesiński, Maciej Chruściel, dr inż. Justyna Szymczak – Zakład Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; tel.: 91 449 62 84; e-mail: arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl*

## 1. WPROWADZENIE

Wraz z intensywnym rozwojem cywilizacji człowiek wprowadza do środowiska różne ksenobiotyki – zarówno pochodzenia mineralnego, jak i organicznego. Za nieodwracalne zmiany w ekosystemach lądowych są odpowiedzialne w dużej mierze metale ciężkie – pozostałości wielu gałęzi przemysłowych, a zwłaszcza hut metali kolorowych [Mocek-Płóćniak, Sawicka 2006]. Są one szczególnie aktywne i szkodliwe ze względu na ich specyficzną rolę w procesach biochemicznych, a także w charakterystycznych interakcjach typu synergistycznego lub antagonistycznego [Kubica i in. 2006].

Bardzo dobrym wskaźnikiem stopnia oraz rozmiaru zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi jest aktywność enzymatyczna gleb [Mocek-Płóćniak 2010].

Oksydazy polifenolowe w glebie są grupą enzymów katalizujących reakcje utleniania związków fenolowych, które są uwalniane do gleby podczas hydrolizy mikrobiologicznej z wielu występujących naturalnie substancji oraz związków syntetycznych, np. pozostałości po:

- 1) plonach,
- 2) odpadach organicznych,
- 3) pestycydach

oraz

- 4) produktach przemysłowych.

Zazwyczaj związki te są niestabilne w glebie i mogą zostać poddane procesowi utleniania do chinonów, które dalej ulegają polimeryzacji w próchnicznopodobne makromolekuły [Park i in. 2000].

Związki fenolowe ogrywają zatem ważną rolę w glebie, ponieważ to właśnie z nich, a także w wyniku humifikacji cukrów, kwasów karboksylowych i aldehydów, powstają związki humusowe (kwasy fulwowe, huminowe i huminy), które kształtują żyzność gleby [Gramms i in. 1999; Skiba 2002]. Do tych enzymów zaliczamy oksydazy o-difenolową, p-difenolową i polifenolową.

## 2. CEL I METODY BADAŃ

Celem prezentowanych w niniejszej pracy badań było określenie oddziaływania związków kadmu, ołowiu i miedzi, wprowadzonych w różnych kombinacjach na aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie.

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na próbkach glebowych pobranych z poziomu ornopróchnicznego gleb brunatnordzawych RZD w Lipniku oraz czarnych ziem Równiny Gumienieckiej, a także Równiny Pyrzyckiej. Właściwości fizyczno-chemiczne badanych gleb podano w tabeli 1.

Do części ziemistych próbek wprowadzono wodne roztwory  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  i  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , oddzielnie lub łącznie w różnych kombinacjach. Dawki wpro-

wadzonych metali ciężkich były granicznymi wartościami dopuszczalnych stężeń w glebie (0–0,3 m) należącej do grupy B:

- 1) grunty zaliczone do użytków rolnych z wyłączeniem gruntów pod stawami i gruntów pod rowami,
- 2) grunty leśne oraz zadrzewione i zakrzewione,
- 3) nieużytki,

a także

- 4) grunty zabudowane i zurbanizowane z wyłączeniem terenów przemysłowych, użytków kopalnych oraz terenów komunikacyjnych

według rozporządzenia Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi [Rozporządzenie... 2002] ( $\text{Cd} - 4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $\text{Cu} - 150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $\text{Pb} - 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Punktem odniesienia była gleba niezanieczyszczona metalami ciężkimi.

Zaraz po wprowadzeniu do gleby soli metali ciężkich oraz po jednej, trzech i sześciu godzinach (h) oznaczono aktywność oksydazy o-difenolowej (o-DPO) zgodnie z metodą podaną przez Perruci'ego i in. [2000].

**Tabela 1.** Charakterystyka gleb użytych w doświadczeniu

**Table 1.** Characteristics of soil used in experiment

Właściwości fizyczno-chemiczne	Lipnik	Ostoja	Pyrzyce
Fracje granulometryczne			
• 1,0-0,1 mm	64%	43%	42%
• 0,1-0,02 mm	22%	30%	18%
• < 0,02 mm	14%	27%	40%
Grupa granulometryczna	Pgl	glp	gś
Materia organiczna [%]	3,697	4,959	8,965
$\text{C}_{\text{org}}$ [%]	0,872	1,095	3,382
$\text{N}_i$ [%]	0,039	0,248	0,621
C:N	22,5:1	4,5:1	5,5:1
pH			
w $\text{H}_2\text{O}$	6,59	7,09	7,73
w 1 M KCl	6,36	6,81	7,47

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie stosując dwuczynnikową analizę wariancji. Najmniejsze istotne różnice obliczono testem Tukey'a. Analizy wykonano niezależnie w odniesieniu do każdego terminu pomiaru.

### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

Aktywność oksydazy o-difenolowej w glebach zanieczyszczonych azotanami (V) miedzi, kadmu i ołowiu przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 2.** Aktywność oksydazy o-difenolowej [ $\mu\text{M}$  utlenionego katecholu  $\cdot$  (g s.m. gleby  $\cdot$  10 min) $^{-1}$ ] w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi

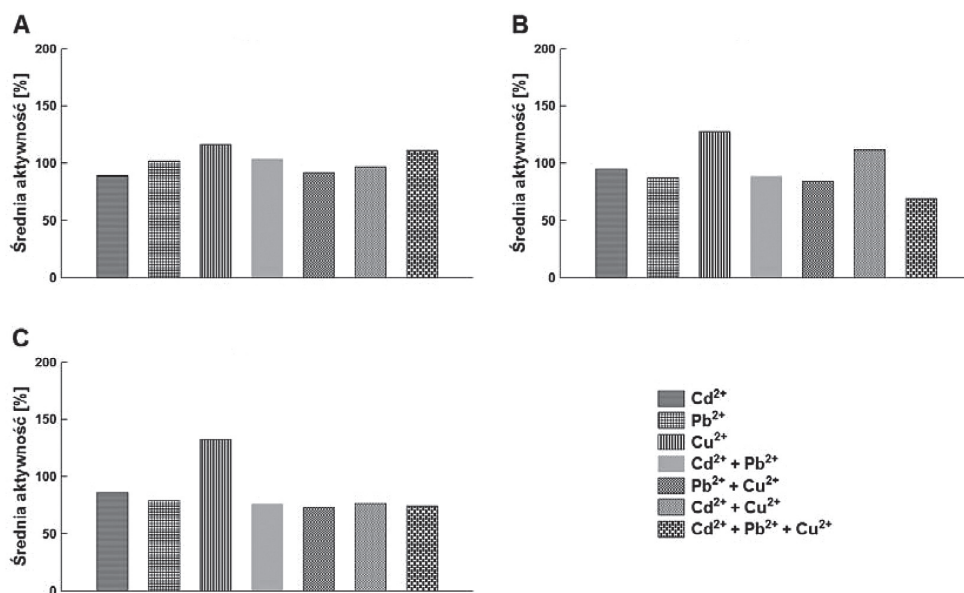
**Table 2.** Activity of o-diphenol oxidase in soil [ $\mu\text{M}$  oxidized catechol  $\cdot$  (g d.w. soli  $\cdot$  10 min) $^{-1}$ ] in soils contaminated with heavy metals

Gleba (II)	Metale ciężkie (I)								średnia
	kont-rola	Cd <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup> Pb <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	
<b>0 h</b>									
pgl	3,91	3,78	3,79	3,98	3,65	4,06	4,57	4,32	4,03
glp	3,53	3,48	3,00	4,61	2,97	3,17	3,77	2,38	3,36
gś	5,42	4,12	4,46	7,56	3,46	3,47	3,85	4,04	4,55
Średnia	4,29	3,79	3,81	5,39	3,36	3,65	4,07	3,58	3,98
NIR <sub>0,05</sub>	I = 0,522 I · II = 0,690				II = 0,244 II · I = 0,903				
<b>1 h</b>									
pgl	3,78	2,83	4,24	5,03	3,87	3,65	3,81	3,91	3,89
glp	3,63	3,47	3,26	4,06	2,97	2,51	4,98	2,44	3,42
gś	5,66	5,23	3,66	6,46	5,94	3,69	5,59	3,69	4,99
Średnia	4,35	3,84	3,72	5,18	4,26	3,28	4,80	3,35	4,10
NIR <sub>0,05</sub>	I = 0,364 I · II = 0,482				II = 0,170 II · I = 0,631				
<b>3 h</b>									
pgl	3,54	3,33	3,75	4,24	4,57	2,81	3,24	4,41	3,74
glp	5,78	5,31	5,02	7,11	5,42	4,64	6,27	3,28	5,35
gś	5,53	5,23	5,09	5,95	4,18	4,47	4,85	4,51	4,08
Średnia	4,95	4,62	4,62	5,76	4,73	3,97	4,79	4,07	4,69
NIR <sub>0,05</sub>	I = 0,360 I · II = 0,368				II = 0,168 II · I = 0,522				
<b>6 h</b>									
pgl	3,63	3,29	3,19	3,60	3,31	3,14	2,83	3,83	3,40
glp	6,11	5,73	5,26	8,77	5,65	5,88	5,61	5,13	6,02
gś	5,69	4,53	4,34	9,55	3,41	4,62	2,81	4,21	4,89
Średnia	5,14	4,52	4,26	7,43	4,12	4,55	3,75	4,39	4,77
NIR <sub>0,05</sub>	I = 0,301 I · II = 0,476				II = 0,141 II · I = 0,623				

Wprowadzenie do gleby metali ciężkich pojedynczo, jak i w mieszaninach powodowało zazwyczaj istotne zmiany aktywności oznaczanego enzymu. W celu lepszego zobrazowania efektu wywołanego przez metale ciężkie aktywność oksydazy o-difenolowej przeliczono w stosunku do aktywności gleby w glebie niezanieczyszczonej, przyjmując tę aktywność za

100%, i podano jako procent kontroli. Następnie obliczono średnią procentową aktywność ze wszystkich terminów pomiarów, a otrzymane wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych na rysunku 1.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że dodatek do gleby kadmu spowodował od 5- do 15-procentowe zmniejszenie średniej aktywności oksydazy o-difenolowej we wszystkich próbkach glebowych. Podobny efekt wywołało wprowadzenie ołowiu do gliny lekkiej pylastej oraz gliny średniej. W literaturze przedmiotu można znaleźć wiele informacji o inhibitującym wpływie metali ciężkich na aktywność enzymów glebowych [Lee i in. 2002; Nowak i in. 2003; Liu i in. 2004; Wyszowska i in. 2006; Sobolev, Begonia 2008; Szymczak i in. 2009]. Wprowadzenie do próbek glebowych miedzi stymulowało natomiast aktywność oksydazy o-difenolowej. Stwierdzona aktywacja enzymu zwiększała się od 16% do 32% wraz ze zwiększeniem liczby części spławialnych oraz ilości próchnicy. Podwyższenie aktywności oksydazy o-difenolowej może być wynikiem obecności miedzi w grupie prostetycznej tego enzymu [Claus 2010]. Nowak i in. [2003] podają, że metale w małych stężeniach mogą stymulować aktywność enzymów glebowych, w dużych ilościach natomiast powodują zmniejszenie liczebności drobnoustrojów wydzielających enzymy.



**Rys. 1.** Średnia aktywność oksydazy o-difenolowej w piasku gliniastym lekkim (A), glinie lekkiej pylastej (B) i glinie średniej (C) zanieczyszczonej metalami ciężkimi

**Fig. 1.** Mean activity of o-diphenol oxidase in light loamy sand (A), light silty clay (B) and medium clay (C) contaminated with heavy metals

Wprowadzenie do gleby mieszaniny dwóch metali ciężkich spowodowało zazwyczaj obniżenie aktywności oksydazy o-difenolowej w glebie. Niewielkie, kilkuprocentowe podwyższenie aktywności enzymu odnotowano jedynie w piasku gliniastym lekkim zanieczyszczonym kadmem i ołowiem, a także mieszaniną kadmu, ołowiu i miedzi, oraz w glinie lekkiej pylastej zanieczyszczonej miedzią i ołowiem.

Trudno jednoznacznie określić kierunek interakcji między oddziaływaniem mieszaniny metali ciężkich na aktywność oksydazy o-difenolowej. Wyszowska i in. [2007] podają, że rodzaj antagonistycznego bądź synergistycznego wpływu metali ciężkich na drobnoustroje glebowe zależy od składu jakościowego i ilościowego mikroflory, a także wielu właściwości fizyczno-chemicznych gleby. Kandeler i in. [2000] wykazali ponadto, że wpływ metali ciężkich i ich związków na zmiany aktywności enzymatycznej gleby jest związany z ich oddziaływaniem na wzrost i metabolizm mikroorganizmów glebowych przez zaburzenia ich funkcjonowania, denaturację białek lub zniszczenie integralności błon komórkowych. Według Nowak i in. [2003] działanie jonów metali na strukturę enzymu, a także ich wpływ na zmianę pH środowiska glebowego, doprowadza zarówno do zmniejszenia liczebności organizmów wydzielających enzym, jak i do osłabienia aktywności samego enzymu.

#### 4. PODSUMOWANIE

Zanieczyszczenie gleby kadmem i ołowiem spowodowało inhibicję aktywności oksydazy o-difenolowej. Obecność w podłożu jonów miedzi natomiast stymulowała aktywność enzymu.

W glebach z dodatkiem różnych mieszanin metali ciężkich zazwyczaj obserwowano większy efekt niż w glebie zanieczyszczonej jednym metalem. Największe zmiany aktywności oksydazy o-difenolowej odnotowano w glebie z największą ilością materii organicznej i liczbą części spławialnych (głina średnia).

#### PIŚMIENICTWO

- CLAUS H. 2010. Copper-containing oxidases: occurrence in soil microorganisms, properties, and applications. *Soil Biol.* 19: 281–313.
- GRAMMS G., ZIEGENHAGEN D., SORGE S. 1999. Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes. *Microb. Ecol.* 37: 140–151.
- KANDELER E., TSCHERKO D., BRUCE K.D., STEMMER M., HOBBS P.J., BARGETT R.D., AMELUNG W. 2000. Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a chernozem under different tillage management. *Biol. Fertil. Soils.* 32: 390–400.

- KUBICA B., KWIATEK W.M., STOBIŃSKI M., SKIBA S., SKIBA M., GOŁAŚ J., KUBICA M., TULEJA-KRYSA M., WRONA A., MISIAK R. 2006. Concentration of  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{40}\text{K}$  radionuclides and some heavy metals in soil samples from Chochołowska Valley from Tatra National Park. *Pol. J. Environ. Stud.* 16(5): 735–741.
- LEE I.-S., KIM O.K., CHANG Y.-Y., BAE B., KIM H.H., BAEK K.H. 2002. Heavy metal concentration and enzyme activities in soil from contaminated Korean shooting range. *J. Biosci. Bioengin.* 94(5): 406–411.
- LIU G.-S., XU D.-M., WANG L.-M., LI K.-B., LIU W.-P. 2004. Effect of organic/inorganic compounds on the enzymes in soil under acid rain stress. *J. Environ. Sci.* 16(2): 177–180.
- MOCEK-PŁÓCINIĄK A., SAWICKA A. 2006. Wpływ miedzi i ołowiu na liczebność mikroorganizmów w glebach w pobliżu huty miedzi „Legnica”. *Zesz. Nauk. Uniw. Przyr. Wroc. Ser. Rol.* 89(546): 259–270.
- MOCEK-PŁÓCINIĄK A. 2010. Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyr. Technol.* 4(6): 86.
- NOWAK J., SZYMCZAK J., SŁOBODZIAN T. 2003. Próba określenia 50% progu toksyczności dawek różnych metali ciężkich dla fosfatów glebowych. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 492: 241–248.
- PARK J.-W., DEC J., KIM J.-E., BOLLAG J.-M. 2000. Transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of humic acid. *J. Environ. Qual.* 29: 214–220.
- PERRUCI R., CASUCCI C., DUMONTET S. 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biol. Biochem.* 32: 1927–1933.
- ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ŚRODOWISKA z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (Dz.U. nr 165, poz. 1359).**
- SKIBA S. 2002. Gleba w środowisku przyrodniczym. w: Barabasz W. (red.), *Aktywność drobnoustrojów w różnych środowiskach*. Wyd. AR im. H. Kołłątaja w Krakowie, Kraków: 157–169.
- SOBOLEV D., BEGONIA F.T.M. 2008. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 5(5): 450–456.
- SZYMCZAK J., TELESIŃSKI A., KŁÓDKA D., NOWAK J. 2009. Rola bentonitu i humusu w zmniejszeniu toksyczności metali ciężkich w stosunku do wybranych enzymów glebowych. *Ochr. Środ. Zas. Nat.* 41: 456–461.
- WYSZKOWSKA J., KUCHARSKI J., LAJSZNER W. 2006. The effect of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals. *Pol. J. Environ. Stud.* 15(6): 927–934.
- WYSZKOWSKA J., BOROS E., KUCHARSKI J. 2007. Effect of interactions between nickel and other heavy metals on the soil microbiological properties. *Plant Soil Environ.* 53(12): 544–552.