

WPŁYW SELENU I FLUORU NA AKTYWNOŚĆ FOSFATAZ W GLEBIE LEKKIEJ

Mirosław Onysko¹, Arkadiusz Telesiński¹

¹ Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, e-mail: miroslaw.onysko@zut.edu.pl

STRESZCZENIE

Celem podjętych badań było określenie oddziaływania związków fluoru oraz selenu (na dwóch stopniach utlenienia: IV i VI), wprowadzonych osobno oraz w mieszaninie na aktywność fosfatazową gleby lekkiej. Doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych na piasku gliniastym o zawartości węgla organicznego 8,7 g/kg, do którego wprowadzono w różnych kombinacjach fluor (10 mmol/kg) oraz selen (0,05 mmol/kg). W odstępach tygodniowych przez okres 28 dni oznaczano spektrofotometrycznie aktywność fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono wskaźniki oporności enzymów (RS). Wykazano że wprowadzenie do gleby fluoru i selenu spowodowało istotne statystycznie obniżenie aktywności oznaczanych enzymów. Aktywność fosfatazy alkalicznej charakteryzowała się większą wrażliwością na obecność fluoru i selenu w glebie niż fosfataza kwaśna. Dla fosfatazy alkalicznej największe obniżenie RS wystąpiło po aplikacji fluoru wraz z selenem na stopniu utlenienia IV, a dla fosfatazy kwaśnej – fluoru wraz z selenem na stopniu utlenienia VI.

Słowa kluczowe: fosfatazy, fluor, gleba, selen, wskaźnik oporności.

EFFECT OF SELENIUM AND FLUORIDE ON PHOSPHATASE ACTIVITIES IN SANDY SOIL

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the impact of fluoride and selenium (in two oxidation states IV and VI), introduced separately and in a mixture on soil phosphatase activity soil. The experiment was carried out in laboratory conditions on loamy sand samples with organic carbon content 8.7 g/kg. Various combinations of fluoride (10 mmol kg) and selenium (0.05 mmol/kg) were added into soil samples. Over a period of 28 days, at weekly intervals. Alkaline phosphatase and acid phosphatase activities were determined by spectrophotometry. Based on the obtained results, the resistance index (RS) for enzymes was calculated. It was found that the addition of fluoride and selenium into the soil resulted in a statistically significant decrease of assayed enzyme activities. Alkaline phosphatase activity was more sensitive to the presence of fluoride and selenium in the soil than acid phosphatase. The values of RS were lowest for alkaline phosphatase in soil treated with fluoride and selenium in the oxidation state IV, and for acid phosphatase in soil treated with fluoride and selenium in the oxidation state VI.

Keywords: acid phosphatase, alkaline phosphatase, fluoride, soil, selenium, resistance index.

WSTĘP

Selen i fluor są pierwiastkami powszechnie występującymi w środowisku, a ich korzystne lub toksyczne oddziaływanie w dużym stopniu zależy od stężenia. Średnia zawartość selenu w glebach w skali świata wynosi 0,33 mg/kg. Zwiększone ilości tego pierwiastka występują w glebach bogatych w związki żelaza i substancję organiczną oraz glebach zasolonych [Guo i in. 2000]. Pod względem geochemicznym selen jest silnie związany z siarką i największe jego ilości występu-

ją w minerałach siarczkowych i siarce rodzimej pochodzenia wulkanicznego [Purzyńska 2000]. Znaczne ilości selenu wprowadzane są do środowiska w wyniku spalania węgla i ropy naftowej. Pierwiastek ten jest również powszechnie stosowany w przemyśle elektrochemicznym, fotoelektrycznym oraz szklarskim jako składnik barwników [Niedzielski i in. 2000]. Selen w glebach występuje na wszystkich swoich podstawowych stopniach utlenienia: -II, 0, IV i VI, w zależności od potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, pH i udziału mikroorganizmów [Mehdi i in. 2013].

Problem zanieczyszczenia środowiska fluorem zrodził się dopiero we współczesnym świecie, w związku z działalnością przemysłową człowieka (huty aluminium, fabryki nawozów fosforowych, huty żelaza), co doprowadziło do nagromadzenia toksycznych związków fluoru w powietrzu, wodzie i glebie [Gramowska i Siepak 2002]. Fluor występuje w glebie w postaci zarówno rozpuszczalnej, jak i ogólnej. W glebach nie narażonych na zanieczyszczenie przemysłowe przeważająca część fluoru występuje w formie trudno rozpuszczalnej, a obecność form rozpuszczalnych może świadczyć o przekroczeniu granicy mechanizmów, które go unieruchamiają [Telesiński i Śnioszek 2009].

Oddziaływanie zanieczyszczeń na stan ekologiczny gleby można w bardzo dobry sposób ocenić na podstawie aktywności enzymatycznej [Bielińska i Mocek-Płóćniak 2010, Wang i in. 2015]. Enzymy glebowe są bardzo często określane jako wskaźnik biochemicznej i mikrobiologicznej aktywności gleb [Kalembasa i in. 2014]. Fosfatazy należą do szerokiej grupy enzymów, które katalizują hydrolizę organicznych połączeń fosforu i są stosowane do oceny potencjalnego tempa mineralizacji tych związków w glebie [Mocek-Płóćniak 2010]. Jak podają Olander i Vitousek [2000] aktywność fosfataz w środowisku glebowym odzwierciedla aktywność enzymów związanych z koloidami glebowymi i substancjami humusowymi. Fosfatazy są także uważane za dobry wskaźnik potencjału mineralizacji fosforu organicznego oraz aktywności biologicznej gleby [Banerjee i in. 2012].

Celem niniejszej pracy było określenie oddziaływania związków fluoru oraz selenu, osobno oraz w mieszaninie na aktywność fosfatazową gleby lekkiej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych przez okres 28 dni, w układzie kompletnej randomizacji, z użyciem gleby pobranej z poziomu orno-próchnicznego (0–30 cm) gleb rdzawych typowych z terenu Rolniczej Stacji Doświadczalnej w Lipniku (woj. zachodniopomorskie). Gleba ta charakteryzuje się składem granulometrycznym piasku gliniastego oraz zawartością węgla organicznego $8,7 \text{ gC}_{\text{org}}/\text{kg}$. Do pobranego materiału glebowego wprowadzono różne kombinacje fluoru (w postaci NaF), w ilo-

ści 10 mmol/kg oraz selenu na dwóch stopniach utlenienia: IV i VI (w postaci H_2SeO_3 i H_2SeO_4) w ilości 0,05 mmol/kg.

Następnie doprowadzono wilgotność gleby do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Glebę dokładnie wymieszano i przechowywano w temp. 20°C . Punktem odniesienia była gleba bez dodatku wymienionych pierwiastków. We wszystkich wariantach doświadczenia, w trzech powtórzeniach, oznaczono spektrofotometrycznie aktywność fosfatazy kwaśnej oraz fosfatazy alkalicznej zgodnie z metodą Tabatabai i Bremnera [1969], w odstępach tygodniowych.

Do sporządzania roztworów wykorzystano wodę dejonizowaną (demineralizator HLP Smart 2000, Hydrolab) o średniej przewodności właściwej $0,15 \mu\text{S}/\text{cm}$ i napięciu powierzchniowym $72,3 \text{ mN}/\text{m}$ w temperaturze 25°C . W oznaczeniach spektrofotometrycznych zastosowano spektrofotometr UV-1800 firmy Shimadzu.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Najmniejsze istotne różnice (NIR) obliczono według procedury Duncana przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Obliczenia wykonano niezależnie dla wyników uzyskanych w każdym terminie pomiaru.

W celu oceny oddziaływania fluoru i selenu na aktywność oznaczanych fosfataz wyniki przeliczono i podano jako procentowe zmiany (ang. relative change) aktywności w stosunku do gleby kontrolnej, zgodnie ze wzorem podanym przez Chaer i in. [2009]. Obliczono również wskaźniki oporności (ang. resistance index) enzymów według Orwina i Wardle'a [2004].

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Wprowadzenie selenu i fluoru spowodowało istotne zmiany aktywności fosfatazy alkalicznej oraz fosfatazy kwaśnej w glebie (tab. 1). Po aplikacji fluoru (F) wykazano, w trakcie trwania całego doświadczenia, istotną statystycznie inhibicję aktywności fosfatazy alkalicznej oraz fosfatazy kwaśnej, która wynosiła, odpowiednio: 6,58–16,92% i 10,30–20,85% (rys. 1a).

Po aplikacji do gleby selenu na stopniu utlenienia IV (SeIV) stwierdzono spadek aktywności obu fosfataz w początkowym okresie trwania doświadczenia. Wykazana inhibicja była istotna statystycznie w następujących dniach doświadczenia: dla fosfatazy alkalicznej – 7. (27,20%), a

Tabela 1. Aktywność fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej w glebie z dodatkiem różnych kombinacji selenu i fluoru [mg p-NP/kg s.m·h]**Table 2.** Activity of alkaline phosphatase and acid phosphatase in soli treated with selenium and fluoride [mg p-NP/kg dm·h]

Kombinacja fluoru i selenu	Dzień doświadczenia				
	1.	7.	14.	21.	28.
Fosfataza alkaliczna					
kontrola	38,32	37,76	35,54	34,43	33,87
F	33,31	31,37	32,48	30,53	31,64
SeIV	36,09	27,49	39,43	38,87	41,09
SeVI	44,70	40,54	36,37	32,21	28,32
F+SeIV	24,99	21,93	29,71	24,16	24,16
F+SeVI	24,99	16,38	20,82	19,16	29,99
NIR _{0,05}	3,25	4,86	3,01	3,47	1,55
Fosfataza kwaśna					
kontrola	205,46	282,92	259,89	262,38	231,56
F	172,14	253,77	205,70	220,40	203,77
SeIV	185,75	226,00	246,83	305,13	233,78
SeVI	151,87	184,36	230,17	334,29	252,96
F+SeIV	162,98	185,75	229,61	229,84	221,28
F+SeVI	164,92	192,13	245,16	226,79	197,41
NIR _{0,05}	11,59	14,36	12,83	14,76	18,88

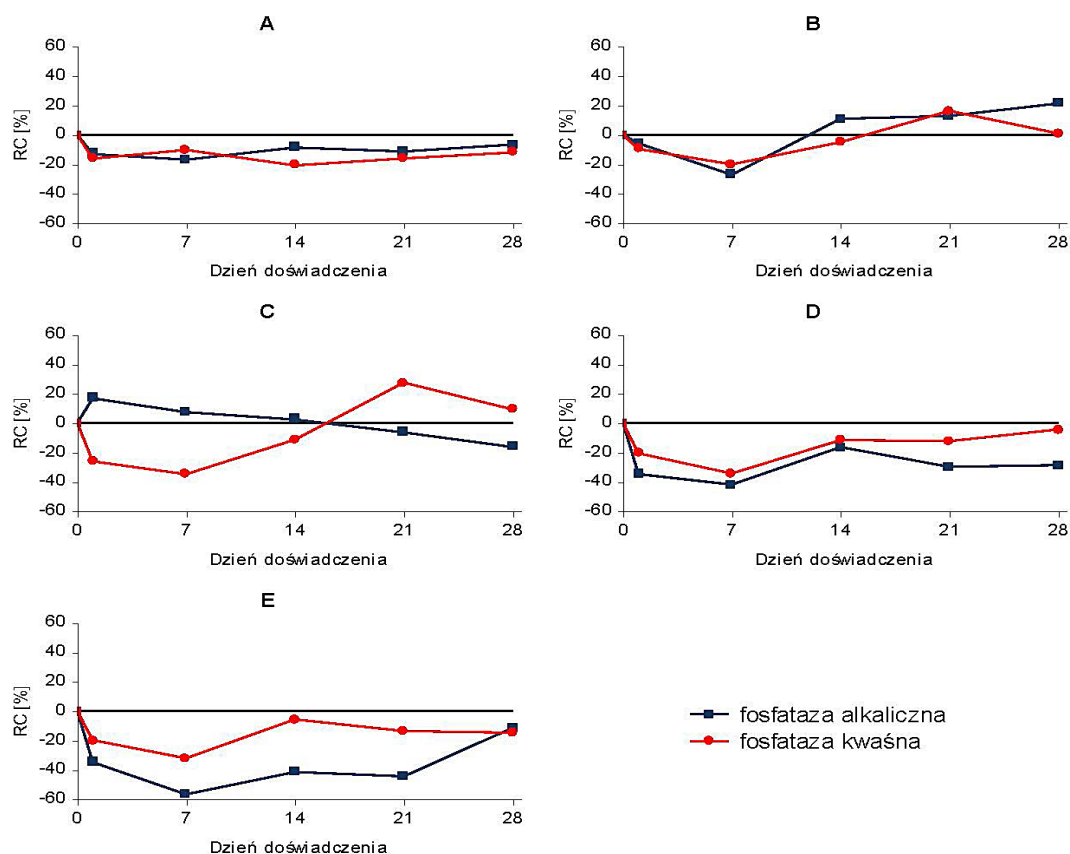
dla fosfatazy kwaśnej – 1., 7. i 14. (5,02-20,12%). Natomiast istotną statystycznie stymulację aktywności fosfatazy alkalicznej odnotowano w 14., 21. i 28. dniu doświadczenia (10,94-21,32%), podczas gdy podwyższenie aktywności fosfatazy kwaśnej wystąpiło jedynie po trzech tygodniach trwania doświadczenia (16,29) (rys. 1b).

Aktywność fosfatazy alkalicznej w glebie z dodatkiem selenu na stopniu utlenienia VI (SeVI) w 1. dniu doświadczenia uległa podwyższeniu o 16,65%, a następnie w trakcie trwania doświadczenia stopniowo zmniejszała się w stosunku do gleby kontrolnej i w ostatnim dniu doświadczenia odnotowano inhibicję aktywności tego enzymu o 16,39%. Inaczej kształtowała się aktywność fosfatazy kwaśnej. Do 14. dnia doświadczenia wprowadzenie SeVI spowodowało istotne statystycznie obniżenie aktywności enzymu o 11,44–34,84%, podczas gdy w 21. i 28. dniu doświadczenia odnotowano stymulację aktywności fosfatazy kwaśnej, odpowiednio o: 27,41 i 9,24% (rys. 1c).

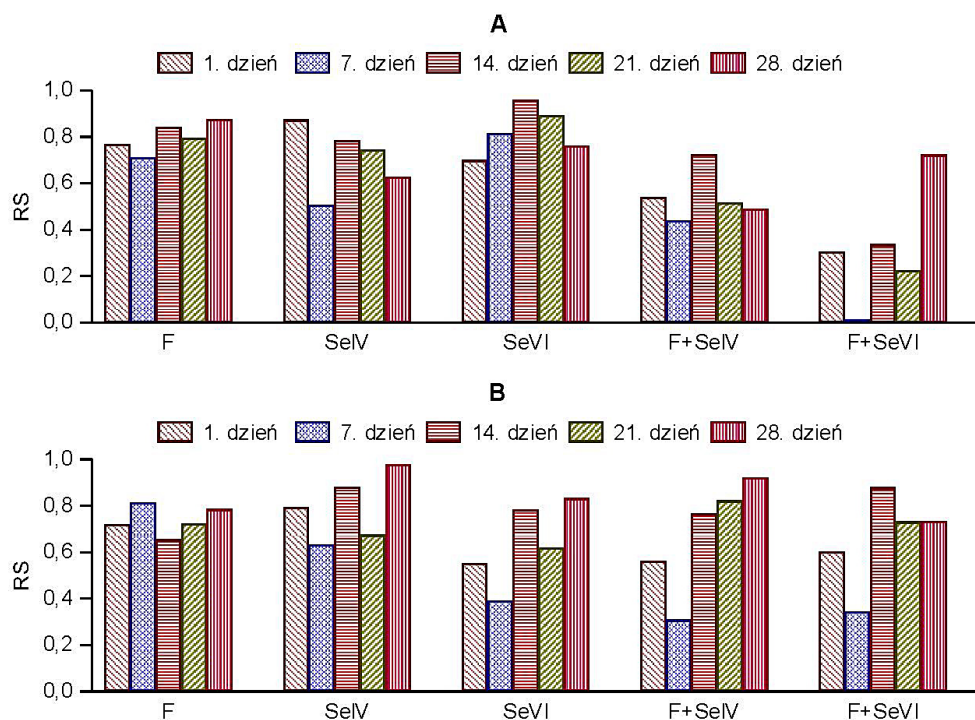
Wprowadzenie do gleby fluoru wraz z selenem na obu stopniach utlenienia spowodowało obniżenie aktywności obu fosfataz. W większości terminów pomiarów inhibicja aktywności fosfatazy alkalicznej była większa niż fosfatazy zasadowej. Najniższą aktywność enzymów wykazano w 7. dniu doświadczenia i w wariacie F+SeIV

była ona niższa niż w glebie kontrolnej o 41,92 i 34,34% (rys. 1d), a w przypadku F+SeVI o 56,62 i 32,09% (rys. 1e), odpowiednio dla fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej.

Obliczone współczynniki oporności (RS) dla fosfatazy alkalicznej oraz fosfatazy kwaśnej po wprowadzeniu fluoru i selenu były dodatnie w trakcie trwania całego doświadczenia. Orwin i Wardle [2004] podają, że wartości RS mieszczą się w przedziale od 1 do -1, gdzie 1 oznacza brak wpływu danego ksenobiotyku na badany parametr. Wraz ze wzrostem negatywnego oddziaływania zanieczyszczenia zmniejszają się wartości RS. Można zatem stwierdzić, że aplikacja fluoru, jak i selenu w niewielkim stopniu wpłynęła na aktywność fosfataz, gdyż wartości RS kształtowały się na poziomie 0,51–0,98. Jedynie w 7. dniu doświadczenia, w glebie z dodatkiem SeVI odnotowano niższą wartość RS (0,39). Natomiast po wprowadzeniu fluoru wraz z selenem wartości RS wyraźnie się obniżyły. W glebie z dodatkiem F+SeIV najniższe wartości RS wynosiły 0,44 w przypadku fosfatazy alkalicznej oraz 0,31 w przypadku aktywności fosfatazy kwaśnej. Natomiast aplikacja F+SeVI, przez 21 dni doświadczenia zdecydowanie obniżyła RS dla fosfatazy alkalicznej – wartości tego indeksu wynosiły 0,01–0,34 (rys. 2).



Rys. 1. Procentowe zmiany (RC) aktywności fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej w glebie po aplikacji fluoru (A), seleniu IV (B), seleniu VI (C), fluoru z seleniem IV (D) oraz fluoru z seleniem VI (E)
Fig. 1. Relative changes (RC) of activity of alkaline phosphatase and acid phosphatase in soil treated with fluoride (A), selenium IV (B), selenium VI (C), fluoride and selenium IV (D), fluoride and selenium VI (E)



Rys. 2. Przebieg zmian współczynników oporności dla fosfatazy alkalicznej (A) oraz fosfatazy kwaśnej w glebie po aplikacji fluoru i seleniu (B)
Fig. 2. Changes of resistance indices for alkaline phosphatase (A) and acid phosphatase in soil treated with fluoride and selenium (B)

Otrzymane wyniki badań wskazują na negatywne oddziaływanie fluoru oraz selenu na aktywność fosfataz glebowych. Nowak i in. [2005] również wykazały w trakcie pięćdziesięciodniowego doświadczenia obniżenie aktywności fosfataz glebowych pod wpływem fluoru. Smolik i in. [2009] odnotowały spadek aktywności fosfataz glebowych wraz ze wzrostem stężenia fluoru w glebie. Zmiany aktywności tych enzymów mogą wynikać ze zdolności jonów fluorkowych do tworzenia połączeń kompleksowych z atomami glinu oraz berylu, co znacząco wpływa na zawartość fosforanów w glebie [Nowak i in. 2005]. Natomiast Hu i in. [2013] badając aktywność różnych enzymów w glebie z podwyższoną zawartością selenu wykazali niewielki wpływ tego pierwiastka na aktywność fosfatazy alkalicznej. Nowak i in. [2002] stwierdzili, że dodatek do gleby ciężkiej selenu na IV stopniu utlenienia spowodował inhibicję aktywności fosfatazy kwaśnej przy wszystkich stężeniach pierwiastka. Aktywność fosfatazy alkalicznej wzrosła przy niskich dawkach SeIV, podczas gdy stężenie tego pierwiastka 5 mmol/kg inhibowało aktywność enzymu.

W literaturze można również znaleźć doświadczenia o antagonistycznym lub synergistycznym działaniu selenu i fluoru. Badania te jednak prowadzone są głównie na zwierzętach [Gao i in. 2005, Yu i in. 2006] lub roślinach [Telesiński i in. 2009], a rodzaj wzajemnego oddziaływania tych pierwiastków zależy od oznaczanego enzymu, stężenia, jak i czasu trwania doświadczenia. Wykazano również, że wprowadzenie selenu do gleby ograniczało oddziaływanie ołowiu na aktywność oksydazy o-difenolowej [Stręk i Telesiński 2014] oraz benzyny na aktywność dehydrogenaz i peroksydaz [Stręk i Telesiński 2015].

WNIOSKI

1. Wprowadzenie do gleby fluoru i selenu powodowało najczęściej istotne statystycznie obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej w glebie lekkiej. Największy efekt został zaobserwowany po aplikacji mieszaniny tych pierwiastków, zwłaszcza fluoru z selenem na stopniu utlenienia VI.
2. Aktywność fosfatazy alkalicznej charakteryzowała się większą wrażliwością na obecność fluoru i selenu w glebie niż aktywność fosfatazy kwaśnej.

3. Obliczone wskaźniki oporności (RS) fosfataz wykazały negatywne zmiany w aktywności enzymów pod wpływem łącznego zanieczyszczenia gleby selenem i fluorem. Dla fosfatazy alkalicznej największe obniżenie RS wystąpiło po aplikacji fluoru wraz z selenem na stopniu utlenienia IV, a dla fosfatazy kwaśnej – fluoru wraz z selenem na stopniu utlenienia VI.
4. Aktywność fosfatazowa gleby może być przydatnym wskaźnikiem obecności w glebie selenu i fluoru.

PIŚMIENNICTWO

1. Banerjee A., Sanyal S., Sen S., 2012. Soil phosphatase activity of agricultural land: A possible index of soil fertility. *Agricultural Science Research Journals* 2(7), 412–419.
2. Bielińska E.J., Mocek-Płócinia A., 2010. Impact of ecochemical soil conditions on selected heavy metals content in garden allotment vegetables. *Polish Journal of Environmental Studies*. 19(5), 895–900.
3. Chaer G., Fernandes M., Myrold D., Bottomley P., 2009. Comparative resistance and resilience of soil microbial communities and enzyme activities in adjacent native forest and agricultural soils. *Microbial Ecology* 58, 414–424.
4. Gao Y.-H., Fu S.-B., Xu C.-B., Wan G.-M., Wu Y., Sun D.-J., 2005. Action and antagonistic effects of selenium on fluorosis associated with brick tea. *Chinese Journal of Epidemiology* 24(1), 11–13.
5. Gramowska H., Siepak J., 2002. Wpływ poziomu fluorków na reakcje liści igieł drzew miasta Poznania i okolic. *Rocznik Ochrona Środowiska* 4, 455–477.
6. Guo L., Jury W.A., Frankenberg W.T., Zhang Y., 2000. Characterizing kinetics of sequential selenium transformation in soil. *Journal of Environment Quality* 29, 1041–1048.
7. Hu B., Liang D., Liu J., Xie J., 2013. Ecotoxicological effects of copper and selenium combined pollution on soil enzyme activities in planted and unplanted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(5), 1109–1116.
8. Kalembasa D., Kuźmińska B., Kalembasa S., 2014. Wpływ wapnowania i materiałów organicznych na aktywność ureazy i dehydrogenaz w glebie zanieczyszczonej niklem. *Inżynieria Ekologiczna* 36, 7–17.
9. Mehdi Y., Hornick J.-L., Istasse L., Dufrasne I., 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* 18, 3292–3311.

10. Mocek-Płóćiniak A., 2010. Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyroda Technologie* 4, 6, #86.
11. Niedzielski P., Siepak M., Siepak J., 2000. Występowanie i zawartości arsenu, antymonu i selenu w wodach i innych elementach środowiska. *Rocznik Ochrona Środowiska* 2, 317–341.
12. Nowak J., Kąklewski K., Kłódka D., 2002. Influence of various concentrations of selenic acid (IV) on the activity of soil enzymes. *Science of The Total Environment* 29(1-3), 105–110.
13. Nowak J., Smolik B., Zakrzewska H., 2005. Relations between fluorine content in soil and inhibition of soil enzymes activity. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 8(2), #15.
14. Olander L.P., Vitousek P.M., 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49, 175–190.
15. Orwin K.H., Wardle D.A., 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1907–1912.
16. Purzyńska K., 2000. Związki selenu w środowisku naturalnym. *Wiadomości Chemiczne* 54, 140–150.
17. Smolik B., Nowak J., Kłódka D., Szymczak J., Telesiński A., 2009. Ocena przydatności humusu w ograniczeniu niekorzystnego działania jonów fluoru na aktywność wybranych hydrolaz glebowych w doświadczeniu laboratoryjnym. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 537, 337–344.
18. Stręk M., Telesiński A., 2014. Badania nad możliwością wykorzystania selenu w ograniczeniu oddziaływania ołowiu na wybrane przemiany metaboliczne związków fenolowych w glebie i siewkach pszenicy jarej (*Triticum aestivum* L.). *Polish Journal of Agronomy* 18, 45–51.
19. Stręk M., Telesiński A., 2015. Zmiana aktywności wybranych enzymów oksydoredukcyjnych wytwarzanych przez mikroorganizmy w glebie lekkiej zanieczyszczonej benzyną w obecności jonów selenu. *Ochrona Środowiska* 37(1), 43–47.
20. Tabatabai M.A., Bremner J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1(4), 307–310.
21. Telesiński A., Śnioszek M., 2009. Bioindykatory zanieczyszczenia środowiska naturalnego fluorem. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 42(4), 1148–1145.
22. Telesiński A., Śnioszek M., Musik D., Paszun W., Hury G., 2009. Określenie rodzaju interakcji pomiędzy oddziaływaniem związków selenu i fluoru na aktywność katalazy w roślinach soi (*Glycine max* L. Merr.). *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 41, 227–235.
23. Wang R., Dorodnikov M., Yang S., Zhang Y., Filley T.R., Turco R.F., Zhang Y., Xu Z., Li H., Jiang Y., 2015. Responses of enzymatic activities within soil aggregates to 9-year nitrogen and water addition in a semi-arid grassland. *Soil Biology and Biochemistry* 81, 159–167.
24. Yu R.-A., Xia T., Wang A.-G., Chen X.-M., 2006. Effect of selenium and zinc on renal oxidative stress and apoptosis induced by fluoride in rats. *Biomedical and Environmental Sciences* 19(6), 439–444.