

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA W PUŁAWACH

Agnieszka Klimkowicz-Pawlas

**WPŁYW WIELOPIERŚCIENIOWYCH WĘGLOWODORÓW
AROMATYCZNYCH NA AKTYWNOŚĆ
MIKROBIOLOGICZNĄ GLEB I NA ROŚLINY**

**Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów
pod kierunkiem
Prof. dr hab. Barbary Maliszewskiej-Kordybach**

Puławy, 2005

Składam serdeczne podziękowania

Pani Prof. dr hab. Barbarze Maliszewskiej-Kordybach

za życzliwość i pomoc przy wykonywaniu niniejszej pracy

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP i CEL PRACY	1
2. PRZEGLĄD LITERATURY	3
2.1. GLEBA JAKO ŚRODOWISKO ŻYCIA ORGANIZMÓW	3
2.1.1. <i>Gleba i jej funkcje</i>	3
2.1.2. <i>Gleba jako siedlisko dla organizmów glebowych</i>	5
2.1.3. <i>Rola mikroorganizmów glebowych w kształtowaniu środowiska glebowego</i>	8
2.1.4. <i>Czynniki degradujące środowisko glebowe</i>	12
2.2. ODDZIAŁYWANIE ZANIECZYSZCZEŃ CHEMICZNYCH NA ŚRODOWISKO GLEBOWE	14
2.2.1. <i>Rodzaje zanieczyszczeń chemicznych i ich wpływ na środowisko glebowe</i>	14
2.2.2. <i>Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)</i>	16
2.2.3. <i>Metody badań ekotoksykologicznych w środowisku glebowym</i>	17
2.3. ODDZIAŁYWANIE WWA NA ORGANIZMY GLEBOWE	22
2.3.1. <i>Czynniki decydujące o oddziaływaniu WWA w środowisku glebowym</i>	22
2.3.2. <i>Oddziaływanie WWA na rośliny</i>	27
2.3.3. <i>Oddziaływanie WWA na mikroorganizmy glebowe</i>	28
2.4. KRYTERIA OCENY JAKOŚCI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH PRZEZ WWA	30
3. MATERIAŁY I METODY	33
3.1. MATERIAŁY	33
3.1.1. <i>Materiał glebowy</i>	33
3.1.2. <i>Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne</i>	33
3.1.3. <i>Organizmy testowe</i>	37
3.1.3.1. <u>Rośliny</u>	37
3.1.3.2. <u>Mikroorganizmy</u>	37
3.2. METODYKA PROWADZENIA DOŚWIADCZEŃ	38
3.2.1. <i>Ocena wpływu WWA na rośliny</i>	39
3.2.2. <i>Badanie wpływu WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb</i>	40
3.3. METODY ANALITYCZNE	41
3.3.1. <i>Oznaczanie właściwości gleb</i>	41
3.3.2. <i>Oznaczanie zawartości WWA w ekstraktach glebowych</i>	41
3.3.2.1. <u>Określenie zawartości WWA w fazie wodnej gleby</u>	42
3.3.3. <i>Oznaczanie właściwości mikrobiologicznych gleb</i>	43
3.3.3.1. <u>Oznaczanie aktywności dehydrogenaz</u>	43
3.3.3.2. <u>Pomiar intensywności oddychania</u>	43
3.3.3.3. <u>Oznaczanie potencjału nitryfikacji</u>	44
3.4. SPOSÓB WYRAŻANIA I OCENY WYNIKÓW	44
3.4.1. <i>Wyniki</i>	44
3.4.2. <i>Stopień hamowania i stopień stymulacji</i>	45
3.4.3. <i>Wskaźniki toksyczności</i>	45
3.4.4. <i>Analiza statystyczna</i>	46

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW.....	47
4.1. ODDZIAŁYWANIE WWA NA ROŚLINY WE WCZESNEJ FAZIE ROZWOJU.....	47
4.1.1. Ocena parametrów określających reakcję roślin na zanieczyszczenie gleby przez WWA.....	48
4.1.2. Ocena wpływu materiału glebowego na wzrost roślin w próbkach kontrolnych.....	50
4.1.3. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od właściwości gleb.....	51
4.1.4. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od gatunku rośliny.....	53
4.1.5. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od właściwości badanych związków.....	55
4.1.6. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od zawartości tych związków w glebie – zawartości całkowitej i w fazie wodnej.....	57
4.1.7. Wyznaczenie parametrów toksyczności WWA w stosunku do roślin.....	60
4.2. ODDZIAŁYWANIE WWA NA AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ GLEB.....	64
4.2.1. Ocena parametrów określających reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleby przez WWA.....	65
4.2.2. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną od właściwości gleb.....	68
4.2.3. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb od właściwości badanych związków.....	71
4.2.4. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb od zawartości tych związków w glebie – zawartości całkowitej i w fazie wodnej.....	74
4.2.5. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb od czasu.....	77
4.2.6. Wyznaczenie parametrów toksyczności WWA w stosunku do mikroorganizmów glebowych.....	78
4.3. WYZNACZENIE PRZEWIDYWANEGO STĘŻENIA WWA NIE POWODUJĄCEGO EFEKTÓW TOKSYCZNYCH.....	84
5. Dyskusja.....	85
5.1. ODDZIAŁYWANIE WWA NA ROŚLINY.....	85
5.2. ODDZIAŁYWANIE WWA NA AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ GLEB.....	91
6. Podsumowanie i wnioski.....	97
7. Literatura.....	98
8. Załączniki.....	107

1. WSTĘP I CEL PRACY

Kluczowym elementem środowiska przyrodniczego jest gleba. Spełnia ona szereg istotnych funkcji, z których w odniesieniu do gleb użytkowanych rolniczo najważniejsza jest funkcja produkcyjna i siedliskowa [ISO 15799: 2003]. Gleba jest więc układem stanowiącym naturalne środowisko życia dla mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Organizmy bytujące w glebie kształtują wiele jej właściwości fizycznych i chemicznych, dlatego też wysoka ich aktywność i różnorodność jest warunkiem jakości gleby, jej żyzności i produktywności. Pogorszenie jakości gleby może nastąpić w wyniku nasilenia procesów erozyjnych, niewłaściwego sposobu użytkowania gruntów, mechanicznego niszczenia struktury gleby lub jej zakwaszenia, a zwłaszcza w wyniku zanieczyszczenia gleb przez szkodliwe substancje chemiczne [Baran i Turski 1996, Zawadzki 1999].

W ostatnich latach zaczęto zwracać uwagę na problem występowania w środowisku tzw. trwałych zanieczyszczeń organicznych, które są stosunkowo odporne na degradację i mogą przez długi czas pozostawać w środowisku glebowym stwarzając zagrożenie zarówno dla człowieka jak i biocenozy glebowej. Do grupy tych związków należą m.in. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), które mogą toksycznie oddziaływać na biotyczne elementy ekosystemu glebowego: rośliny, bezkręgowce i mikroorganizmy. Mikroorganizmy glebowe, będące w bezpośrednim kontakcie z glebą, uważane są za najlepsze organizmy wskaźnikowe stanu zanieczyszczenia ekosystemu glebowego zarówno ze względu na swoją dużą czułość jak i bardzo szybką reakcję na zmiany stanu środowiska [Torstensson 1997, Pankhurst i in. 1998].

Informacje o toksycznym oddziaływaniu ksenobiotyków w środowisku glebowym są niezbędne przy ocenie ryzyka związanego z zanieczyszczeniem gleby oraz przy ustalaniu tzw. „wartości granicznych”, określających zawartości substancji chemicznych w glebach nie powodujących negatywnych skutków ekologicznych. Ma to ogromne znaczenie w przypadku terenów wykorzystywanych rolniczo, gdzie wysoki poziom zanieczyszczeń może powodować zahamowanie wzrostu roślin uprawnych i niekorzystne zmiany w ich plonowaniu oraz pogorszenie jakości produkowanych ziemiopłodów.

Cel pracy

Celem pracy była ocena potencjalnej toksyczności WWA w stosunku do roślin (w początkowej fazie rozwoju) i mikroorganizmów glebowych (aktywność mikrobiologiczna).

Cele podrzędne obejmowały:

- wybór najodpowiedniejszej rośliny testowej i parametru mikrobiologicznego do badań toksyczności WWA w stosunku do biocenozy glebowej,
- ocenę wpływu właściwości WWA na ekotoksyczność tych związków,
- ocenę zależności pomiędzy toksycznością WWA i właściwościami gleb,
- wyznaczenie wskaźników toksyczności WWA w stosunku do roślin i mikroorganizmów glebowych.

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. GLEBA JAKO ŚRODOWISKO ŻYCIA ORGANIZMÓW

Gleby użytkowane rolniczo stanowią w Polsce około 60 % ogólnej powierzchni kraju [Baran i Turski 1996, Duer i Fotyma 1999]. Do gruntów rolnych zaliczamy między innymi: użytki rolne, gleby pod zabudowami rolniczymi, stawy rybne, torfowiska, oczka wodne. Gleba stanowi podstawowy nieodnawialny element środowiska przyrodniczego, a jedną z jej głównych funkcji jest funkcja produkcyjna mająca na celu zabezpieczenie potrzeb żywnościowych. Z tego względu ogromne znaczenie ma ochrona już istniejących zasobów glebowych oraz właściwości decydujących o jakości i przydatności rolniczej gleb.

2.1.1. Gleba i jej funkcje

Gleba jest naturalnym tworem wierzchniej warstwy skorupy ziemskiej powstałym w wyniku oddziaływania na zwietrzelinę skalną różnych czynników glebotwórczych (skała macierzysta, klimat, woda, organizmy żywe, działalność człowieka) w określonych warunkach rzeźby terenu [Zawadzki 1999]. Jako układ czterofazowy gleba składa się z fazy stałej, płynnej i gazowej oraz z organizmów żywych („biota”). Gleba jest więc złożonym, ożywionym tworem przyrody, w którym zachodzą ciągle procesy rozkładu i syntezy związków mineralnych i organicznych oraz ich przemieszczanie i akumulacja [Ugla 1979, Zawadzki 1999]. Jest ona integralnym składnikiem wszystkich ekosystemów lądowych i niektórych wodnych podlegającym stałej ewolucji.

Gleba spełnia w środowisku przyrodniczym szereg funkcji, które ogólnie można podzielić na produkcyjne, retencyjne, siedliskowe i kulturowe [Blum 1999, Dębicki i Gliński 1999, Zawadzki 1999, EC Communication 2002] .

Funkcja produkcyjna

Produkcja rolnicza, w tym produkcja żywności całkowicie zależy od gleby [Zawadzki 1999, EC Communication 2002]. Rośliny czerpią z gleby wodę oraz składniki pokarmowe niezbędne do produkcji biomasy, jednocześnie oddając tlen do

atmosfery. Wytworzona materia organiczna roślin wyższych stanowi z kolei pokarm dla ludzi i zwierząt.

Funkcja retencyjna

Dzięki zdolności zatrzymywania i magazynowania wody gleba spełnia rolę regulatora gospodarki wodnej w krajobrazie. Ze względu na bogate właściwości sorpcyjne (fizyczne, chemiczne i biologiczne) spełnia rolę naturalnego filtra dla wód gruntowych, które są głównym źródłem wody pitnej. Gleba ma zdolność zatrzymywania i transformowania zanieczyszczeń i substancji szkodliwych zarówno pochodzenia naturalnego jak i tych będących wynikiem działalności człowieka [Blum 1999, Dębicki i Gliński 1999, ISO 15799: 2003]. Jednak pojemność buforowa gleb oraz ich zdolność do magazynowania zanieczyszczeń są ograniczone. Stopniowe kumulowanie się zanieczyszczeń może bowiem doprowadzić do przekroczenia bariery odporności i spowodować uwolnienie do środowiska substancji stanowiących źródło zanieczyszczenia wód i łańcucha żywieniowego człowieka.

Funkcja siedliskowa

Gleba stanowi naturalne środowisko życia dla różnorodnych organizmów roślinnych i zwierzęcych [Uggla 1979, Kobus 1999, ISO 15799: 2003]. Pomędzy nimi a właściwościami glebowymi zachodzą ściśle wzajemne zależności. W glebie bytują obok siebie zarówno mikro- jak i makroorganizmy.

Ponad 85 % ogólnej biomasy organizmów glebowych stanowią mikroorganizmy, do których zaliczamy: wirusy, bakterie, promieniowce, grzyby i pierwotniaki. Przedstawicielami mezofauny glebowej są: nicienie, wazonkowce, pierścienice i stawonogi, zaś makrofauny m.in. myszy polne, chomiki i krety. Innym podstawowym składnikiem biocenoz wszystkich ekosystemów lądowych są rośliny [Lityński 1982, Szember 1997, Torstensson 1997, Zawadzki 1999, Paul i Clark 2000].

Gleba stwarza zamieszkującym ją organizmom określone warunki tlenowe, termiczne i wodne, jest podstawą bioróżnorodności środowiska [Blum 1999, EC Communication 2002].

Funkcja kulturowa

Gleby wykorzystywane są nie tylko do produkcji rolniczej, ogrodniczej lub leśnej, ale stanowią również dziedzictwo kulturowe, ponieważ skrywają i chronią ogromnej wartości bogactwo archeologiczne niezmiernie ważne dla poznania naszej historii [Blum 1999, Zawadzki 1999, EC Communication 2002]. Ponadto gleby

stanowią bazę przestrzenną dla rozwoju infrastruktury technicznej (grunty budowlane, transport, składowiska odpadów) oraz źródło surowców naturalnych (piasek, żwir, glina, minerały), energii i wody. Wraz ze skałami i wodami otwartymi w określonych warunkach geomorfologicznych i klimatycznych gleby decydują o charakterze krajobrazu, w którym żyjemy [Dębicki i Gliński 1999, Zawadzki 1999].

2.1.2. Gleba jako siedlisko dla organizmów glebowych

Najważniejsze funkcje dla gleb użytkowanych rolniczo to funkcja produkcyjna i siedliskowa czyli zaspokojenie potrzeb żywnościowych oraz zapewnienie środowiska życia dla mikroorganizmów glebowych, roślin i zwierząt [ISO 15799: 2003]. Aktywność i liczebność mikroorganizmów glebowych oraz wzrost i rozwój roślin uzależnione są od wielu czynników środowiska takich jak zawartość wody, odczyn, stosunki powietrzne, temperatura, zawartość składników pokarmowych [Kunicki-Goldfinger 1975, Szember 1997, Zawadzki 1999]. Woda jest niezbędna do budowy komórek organizmów glebowych. Ponadto woda glebowa wpływa na rozpuszczanie składników pokarmowych i zmiany pH roztworu glebowego oraz na stan napowietrzenia gleby. [Gołębiowska 1986, Zawadzki 1999]. Różne grupy organizmów glebowych odznaczają się różną wrażliwością na przesuszenie i mają różne zapotrzebowanie na wodę. Na ogół aktywność mikrobiologiczna w glebie jest optymalna przy wilgotności 50 – 60 % nasycenia całkowitej pojemności wodnej gleby. Spośród bakterii, które są bardziej wrażliwe na stres wodny niż grzyby, najmniejszą odpornością na zmiany stanu uwilgotnienia środowiska charakteryzują się bakterie nityfikacyjne (głównie z rodzaju *Nitrosomonas*) [Szember 1997, Paul i Clark 2000]. Poprzez oddziaływanie na dyfuzję tlenu i przemieszczanie się związków odżywczych woda wpływa zarówno na organizmy w niej bytujące, jak i na rośliny wyższe [Kopcewicz i Lewak 1998, Zawadzki 1999, Paul i Clark 2000].

Zasadnicze znaczenie dla przebiegu procesów energetycznych i oddechowych prowadzonych przez organizmy glebowe ma obecność tlenu w środowisku glebowym [Uggla 1979, Lityński 1982, Paul i Clark 2000]. Podczas oddychania mikroorganizmy glebowe i korzenie roślin pobierają tlen i wydzielają dwutlenek węgla. Dyfuzja gazów zachodzi bardzo intensywnie i ma tendencję do utrzymywania stanu równowagi pomiędzy pobieraniem O₂ i wydzielaniem CO₂ z gleby. Dwutlenek węgla może być

wykorzystywany przez autotrofy jako źródło pokarmu, ponadto spulchnia glebę, a po połączeniu z wodą jako kwas węglowy rozpuszcza trudno rozpuszczalne połączenia mineralne i uwalnia zawarte w nich składniki pokarmowe, przez co przyczynia się do podnoszenia żyzności gleby i wpływa korzystnie na rozwój roślin. Główną przeszkodą w swobodnej dyfuzji gazów może być brak porowatości powietrznej i nadmiar wody w glebie [Gołębiowska 1986, Paul i Clark 2000]. Gdy stężenie tlenu w porach glebowych spadnie poniżej 1 % dochodzi do zmiany metabolizmu z tlenowego na beztlenowy, pojawiają się mikroorganizmy beztlenowe mające zdolność do wytwarzania energii oraz wzrostu w warunkach braku O₂ [Uggla 1979, Lityński 1982, Gołębiowska 1986, Paul i Clark 2000]. Niewłaściwe warunki tlenowe w glebie wywierają również niekorzystny wpływ na rośliny powodując niedotlenienie korzeni roślin i zahamowanie ich oddychania. Negatywny wpływ niedoboru tlenu na rośliny może się również przejawiać poprzez: nagromadzenie się CO₂ w stężeniach szkodliwych, zmniejszenie zawartości azotu na skutek denitryfikacji i ulatniania się go z gleby w postaci gazowej oraz poprzez toksyczne oddziaływanie niektórych produktów powstających w procesach beztlenowych (np. metan, etylen, amoniak, siarkowodór) [Lityński i in. 1982, Misztal i in. 1997, Kopcewicz i Lewak 1998, Zawadzki 1999].

Innym czynnikiem wpływającym w różnym stopniu na organizmy glebowe jest stężenie jonów wodorowych w podłożu [Alexander 1975, Zawadzki 1999]. Zwykle kwańsze środowisko sprzyja rozwojowi grzybów, tak jak środowisko o odczynie obojętnym lub lekko zasadowym jest bardziej odpowiednie dla rozwoju bakterii i promieniowców. Poszczególne mikroorganizmy rozwijają się tylko w pewnych granicach wartości pH [Kunicki-Goldfinger 1975, Gołębiowska 1986]. Jednym z procesów najbardziej wrażliwych na pH w glebie jest biologiczna przemiana NH₄⁺ do NO₃⁻ - nitryfikacja (optymalne wartości pH to 6,6 – 8,0). Tempo nitryfikacji w glebach uprawnych spada przy pH poniżej 6,0 i jest znikome poniżej 4,5. W glebach leśnych nitryfikacja może zachodzić nawet przy pH poniżej 4, co prawdopodobnie związane jest z aktywnością odporniejszych na niski odczyn nitryfikatorów heterotroficznych. Większość spośród znanych bakterii może rozwijać się w zakresie pH od 4 do 9 [Szember 1997, Paul i Clark 2000, Boer i Kowalchuk 2001].

Natomiast większość roślin uprawnych najlepiej rozwija się przy odczynie gleb od słabo kwaśnego do obojętnego (pH od 5,6 do 7,2) [Lityński i in. 1982, Zawadzki 1999]. Rośliny uprawiane na glebach kwaśnych dają zwykle niższe plony o gorszej jakości (obniżenie zawartości wapnia i fosforu, a zwiększona zawartość toksycznych

mikroelementów). Tylko niektóre z roślin (łubin, seradela, owies, żyto, ziemniaki) są mało wrażliwe na zakwaszenie gleb. Ponadto na skutek niestabilności struktury gruzełkowej w glebach kwaśnych pogorszeniu ulegają stosunki powietrzne i wodne, wraz z węglanem wapnia wymyciu może ulec również część składników pokarmowych, część natomiast może przejść w nierozpuszczalne formy niedostępne dla roślin [Uggla 1979, Zawadzki 1999].

Zawartość niektórych pierwiastków w glebach oraz forma ich występowania jest głównym czynnikiem limitującym zaspokojenie potrzeb pokarmowych roślin. Forma występowania pierwiastków w glebach, a tym samym ich dostępność dla roślin, jest ściśle uzależniona od ilości i jakości koloidów w glebach, odczynu, właściwości sorpcyjnych, jak również od stanu oksydoredukcyjnego gleby [Zawadzki 1999]. Największe znaczenie w żywieniu roślin odgrywają makroelementy (N, P, K, Ca, Mg i S). Składniki te są w dużych ilościach pobierane przez system korzeniowy, a ich niedobór powoduje zahamowanie wzrostu roślin. Mniejsze zapotrzebowanie rośliny wykazują w stosunku do mikroelementów, które występują w glebach w bardzo małych ilościach, ale są niezbędne roślinom jako katalizatory procesów fizjologicznych (fotosynteza, oddychanie) [Uggla 1979, Lityński i in. 1982, Kopcewicz i Lewak 1998, Zawadzki 1999]. Makro- i mikroelementy są również niezbędne do prawidłowego rozwoju mikroorganizmów glebowych. Pierwiastki te oddziałują na skład chemiczny i przemiany rozwojowe organizmów oraz regulują czynności enzymatyczne [Gołębiowska 1986, Szember 1997, Paul i Clark 2000].

Kolejnym czynnikiem wpływającym na rozwój mikroorganizmów glebowych oraz wzrost roślin jest temperatura gleby. Ważne procesy glebowe, jak humifikacja i inne przemiany mikrobiologiczne (np. nityfikacja), wietrzenie, reakcje wymiany w znacznym stopniu uzależnione są od zmian temperatury. Ponadto temperatura wpływa także na wzrost ilości organizmów żywych i kiełkowanie nasion. Dla większości mikroorganizmów glebowych optymalna temperatura wynosi 20 – 30 °C [Uggla 1979, Gołębiowska 1986, Alef i Nannipieri 1995, Szember 1997, Zawadzki 1999, Paul i Clark 2000].

Niekorzystne zmiany warunków glebowych wywołane czynnikami naturalnymi lub antropogenicznymi (przesuszenie lub nadmiar wody, niedobór tlenu oraz makro- i mikroelementów, nadmierne zakwaszenie) mogą więc w istotny sposób ograniczać rozwój organizmów glebowych czyniąc je podatnymi na inne stresy (np. wpływ zanieczyszczeń chemicznych).

2.1.3. Rola mikroorganizmów glebowych w kształtowaniu środowiska glebowego

Właściwości glebowe zarówno fizyczne, chemiczne jak i biochemiczne uwarunkowane są działalnością organizmów glebowych, wśród których mikroorganizmy odgrywają wiodącą rolę. Rola mikroorganizmów glebowych rozpoczyna się już przy powstawaniu i kształtowaniu się gleby, bowiem przyczyniają się one do wietrzenia skał i minerałów oraz powstawania minerałów ilastych. Dzięki działalności mikroorganizmów tworzą się też i utrzymują agregaty glebowe [Lityński 1982, Szember 1997]. Liczne mikroorganizmy heterotroficzne (np. bakterie, promieniowce i grzyby) wytwarzają wielocukry i śluzy - substancje wiążące, które sklejają ze sobą drobne cząstki gleby. Ponadto strzępki grzybów przerastające glebę wiążą jej cząstki mechanicznie. W tworzeniu struktury gleby biorą udział również przedstawiciele mezo- i makrofauny glebowej. Ich rola polega na rozdrabnianiu resztek organicznych i mieszaniu substancji organicznej z mineralną częścią gleby, na przenoszeniu materiału glebowego na znaczne głębokości, a jednocześnie na spulchnieniu i drażeniu gleby [Uggla 1979, Zawadzki 1999, ISO 15799: 2003]. Taka aktywność organizmów glebowych przyczynia się do zapewnienia glebie dobrych warunków powietrznych i wodnych [Uggla 1979, Lityński 1982].

Mikroorganizmy kształtują również szereg istotnych właściwości chemicznych gleby [Alexander 1975, Lityński 1982, Torstensson 1997, Kobus 1999, Paul i Clark 2000]. Udział organizmów glebowych w tworzeniu próchnicy polega na wzbogacaniu gleby w materię organiczną, jej rozdrabnianiu i mieszaniu z częścią mineralną gleby oraz na jej humifikacji. Ogromną rolę w tych procesach odgrywają bakterie, grzyby i promieniowce oraz dżdżownice jako przedstawiciele fauny glebowej [Uggla 1979, Zawadzki 1999]. Dla utrzymania żyzności gleby jest rzeczą szczególnie ważną zachowanie równowagi pomiędzy mineralizacją a humifikacją, bowiem przewaga procesów rozkładu substancji organicznych (mineralizacja) nad powstawaniem próchnicy (humifikacja) pogarsza wszystkie właściwości fizyczne i chemiczne gleby uzależnione od obecności substancji próchnicznych [Lityński 1982]. Działalność mikroorganizmów glebowych istotna jest również w utrzymaniu odczynu środowiska [Kunicki-Goldfinger 1975, Kobus 1999, Paul i Clark 2000]. Alkaliczacja powodowana jest przez bakterie w środowiskach o dużej zawartości organicznych związków azotu jako rezultat tworzenia amoniaku. Częściej zachodzą jednak procesy zakwaszenia

podłoża w wyniku gromadzenia się kwasów organicznych w procesach fermentacji związków węglowodanowych, podczas utleniania związków nieorganicznych lub w czasie mineralizacji materii organicznej [Kunicki-Goldfinger 1975, Gołębiowska 1986, Szember 1997]. Procesy mineralizacji mają też cechy korzystne, gdyż dzięki nim złożone połączenia organiczne przechodzą powoli w proste związki mineralne i w ten sposób np. azot, fosfor czy siarka stają się dostępne dla roślin wyższych [Paul i Clark 2000]. Również część składników pokarmowych znajdujących się w glebie w postaci trudno przyswajalnych połączeń mineralnych (np. fosfor i potas) jest uwalniana przez niektóre mikroorganizmy glebowe i może być wykorzystana przez rośliny [Uggla 1979, Lityński 1982, Zawadzki 1999].

We wszystkich procesach biochemicznych związanych z przemianami związków organicznych i mineralnych w glebie decydującą rolę spełniają enzymy mikroorganizmów [Hicks i in. 1990, Dick i in. 1996, Rossel i in. 1997, Paul i Clark 2000]. Reakcje enzymatyczne stanowią podstawę metabolizmu glebowego, decydują o szybkości i kierunku przemian metabolicznych zachodzących w glebie [Gołębiowska 1986, Dick i in. 1996, Margesin i in. 2000]. Aktywność enzymatyczna gleb jest przeważnie bezpośrednio związana z aktywnością mikroorganizmów, jednak wykrywane w glebach enzymy mogą także pochodzić ze spor grzybowych, cyst pierwotniaków, nasion czy korzeni roślin [Alef i Nannipieri 1995, Paul i Clark 2000]. Główne kategorie enzymów glebowych to: oksydoreduktazy (dehydrogenazy, katalazy, peroksydazy), hydrolazy (celulazy, proteazy, ureazy, fosfatazy), transferazy, liazy, izomerazy i inwertazy [Kunicki-Goldfinger 1975, Gołębiowska 1986, Rossel i in. 1997, Paul i Clark 2000], spośród których najczęściej badanymi są oksydoreduktazy, hydrolazy i transferazy [Pankhurst i in. 1998]. Niektóre z tych enzymów (ureazy, dehydrogenazy) są konstytutywne, a więc stale syntetyzowane w komórce, inne zaś, takie jak celulaza, są adaptacyjne (indukcyjne) i syntetyzowane są tylko w obecności odpowiedniego substratu [Gołębiowska 1986, Alef i Nannipieri 1995, Paul i Clark 2000]. Znaczna część enzymów glebowych należy do grupy enzymów zewnątrzkomórkowych. Enzymy te mogą występować w formie wolnej w roztworze glebowym, mogą też ulegać sorpcji na mineralnych lub organicznych cząstkach gleby, co chroni je przed degradacją i przyczynia się do ich akumulacji w glebie [Hicks i in. 1990, Alef i Nannipieri 1995, Dick i in. 1996, Rossel i in. 1997]. Natomiast do enzymów wewnątrzkomórkowych należą dehydrogenazy, ich degradacja w glebie następuje bardzo szybko po obumarciu komórek, a więc nie ulegają one w glebie

akumulacji [Dick i in. 1996, Rossel i in. 1997, Pankhurst i in. 1998]. Dehydrogenazy katalizują utlenianie substratu w procesach oddechowych. Odłączają one z reguły od substratu po dwa elektrony i łącznie z nimi po dwa protony. Są to enzymy wysoce specyficzne, odwodorowują tylko określony substrat, dla każdego utlenianego w komórce substratu istnieje właściwa dla niego dehydrogenaza [Kunicki-Goldfinger 1975, Gołębiowska 1986, Myśków i in. 1996, Paul i Clark 2000]. Jednak w praktyce oznacza się nie pojedyncze dehydrogenazy, ale ich sumę [Alef i Nannipieri 1995, Dick i in. 1996, Rossel i in. 1997]. Aktywność enzymatyczna gleb może stanowić podstawę oceny żyzności i produktywności gleb [Myśków i in. 1996, Martyniuk i in. 1998, Gajda i in. 1999, Kucharski i in. 2000], może też być wykorzystana do oceny oddziaływania substancji szkodliwych w środowisku glebowym [Margesin i in. 2000, Baran i in. 2004].

Niektóre wyspecjalizowane grupy bakterii autotroficznych czerpią energię potrzebną im do asymilacji węgla z CO₂, utleniając pewne związki mineralne [Szember 1997, Kobus 1999]. Na szczególną uwagę zasługuje proces utleniania amoniaku do kwasu azotowego tzw. nityfikacja. Proces ten przebiega dwuetapowo. Pierwszy etap nityfikacji przeprowadzany jest przez grupę bakterii ogólnie określaną „nitroso”. W procesie tym biorą udział pałeczki tlenowe *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosococcus nitrosus* i *oceanus*, poza tym czynne też są *Nitrospira briensis* i *Nitrosolobus multiformis*. Przy udziale enzymu monooksygenazy amonowej sole amonowe są utleniane do hydroksylaminy, która pod wpływem działania innego enzymu oksydoreduktazy hydroksylaminowej jest utleniana do kwasu azotowego. Kwas ten następnie jest neutralizowany przez zasady znajdujące się w środowisku naturalnym i przekształca się w azotyny. W kolejnym etapie, pod wpływem dehydrogenazy azotynowej wytwarzanej przez bakterie z tzw. grupy „nitro” (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* i *Nitrospira*), azotyny zostają utlenione do kwasu azotowego, który neutralizowany przez zasady tworzy azotany [Hicks i in. 1990, Szember 1997, Paul i Clark 2000, Boer i Kowalchuk 2001]. Z reguły drugi etap nityfikacji przebiega intensywniej dzięki czemu w środowisku glebowym nie gromadzą się azotyny. Związki te są silnie trujące dla większości mikroorganizmów oraz dla roślin i człowieka. Proces nityfikacji mogą też przeprowadzać mikroorganizmy heterotroficzne (chemoorganotrofy), które są zdolne do produkcji NO₃⁻ zarówno z organicznych jak i nieorganicznych źródeł N. Do grupy tej należą takie bakterie jak: *Arthrobacter globiformis*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas* sp. i *Thiosphera* sp. oraz grzyby:

Aspergillus flavus, *Penicillium* sp. i *Cephalosporium* sp. [Paul i Clark 2000, Boer i Kowalchuk 2001]. Z rolniczego punktu widzenia nitryfikacja jest procesem korzystnym, szczególnie, gdy przebiega w okresie wegetacji roślin. Proces ten bowiem udostępnia roślinom azot w postaci jonów NO_3^- , a jednocześnie zapobiega większemu nagromadzeniu się amoniaku w glebie, co w pewnych warunkach mogłoby powodować straty azotu przez ulatnianie się tego gazu lub ujemnie wpływać na wzrost roślin, zwłaszcza w pierwszym okresie ich rozwoju [Lityński 1982, Zawadzki 1999]. Natomiast nasilenie nitryfikacji w okresie, kiedy rośliny nie pobierają azotanów, może prowadzić do strat azotu na skutek wymywania jonów azotanowych do głębszych warstw profilu glebowego poza zasięg systemu korzeniowego i stwarzać zagrożenie dla środowiska wodnego [Ugla 1979, Hicks i in. 1990, Kobus 1999].

W utrzymaniu żyzności gleby ogromną rolę odgrywają też bakterie siarkowe [Lityński 1982, Gołębiowska 1986, Szember 1997, Paul i Clark 2000]. Przeprowadzają one głównie niedostępne dla roślin mineralne połączenia siarki w siarczany, z których rośliny mogą korzystać. Jednocześnie usuwają z gleby siarkowodór, który w wyższym stężeniu jest bardzo toksyczny dla większości mikroorganizmów i roślin wyższych.

Oprócz pozytywnej roli, aktywność mikroorganizmów może niekorzystnie wpływać na właściwości środowiska glebowego. Przykładem takiej działalności jest utlenianie soli manganowych do manganowych nie przyswajalnych dla roślin [Ugla 1979, Lityński 1982], redukcja związków azotu prowadząca do strat tego składnika z gleby (proces denitryfikacji) oraz redukcja siarczanów i fosforanów zmniejszająca zapasy dostępnych form tych pierwiastków [Alexander 1975, Hicks i in. 1990, Szember 1997, Zawadzki 1999] czy immobilizacja dostępnych form składników pokarmowych w wyniku pobierania przez mikroorganizmy i wbudowywania w skład protoplazmy swoich komórek [Alexander 1975, Hicks i in. 1990, Kobus 1999, Zawadzki 1999].

Organizmy glebowe, wpływając na właściwości fizyczne i chemiczne gleby, głównie na dynamikę składników pokarmowych, oddziałują także na rozwój i plonowanie roślin wyższych [Ugla 1979, Hicks i in. 1990, Van de Leemkule 1998, Zawadzki 1999]. Szczególnie silny wpływ na rośliny wyższe wywierają organizmy ściśle z nimi współżyjące. Przykładem takiej zależności jest symbioza bakterii brodawkowych z roślinami motylkowymi lub mikoryza czyli współżycie roślin wyższych z grzybami [Gołębiowska 1986, Szember 1997, Paul i Clark 2000]. Pomędzy rośliną wyższą, a mikroorganizmami żyjącymi w jej ryzosferze zachodzi luźna symbioza – protokooperacja [Kunicki-Goldfinger 1975, Aprill i Sims 1990, Szember

1997, Paul i Clark 2000]. Mikroorganizmy rozwijające się w ryzosferze mają duże znaczenie dla roślin, bowiem dzięki stałej przemianie związków organicznych i mineralnych udostępniają im składniki pokarmowe. Ponadto chronią rośliny przed patogenami glebowymi i produkują substancje, które mogą stymulować lub hamować ich wzrost [Alexander 1975, Lityński 1982, Gołębiowska 1986, Szember 1997]. Z kolei rośliny, na skutek działania substancji pochodzących z wydzielin korzeniowych oraz produktów rozkładu obumierających i martwych komórek korzeni, mogą przyczyniać się do stymulacji rozwoju mikroorganizmów [Lityński 1982, Aprill i Sims 1990, Szember 1997].

Ważną rolę w kształtowaniu siedliskowej funkcji gleby spełnia również wzajemna zależność pomiędzy organizmami glebowymi [Alexander 1975, Kunicki-Goldfinger 1975, Gołębiowska 1986]. Dzięki dużej liczebności i różnorodności flory i fauny glebowej, zróżnicowanemu trybowi życia i metabolizmowi, wpływ jednych gatunków na inne jest znaczny i wielostronny. Zjawiska te mają duże znaczenie dla żyzności gleby i rozwoju roślin. Działalność metaboliczna mikroorganizmów glebowych przyczynia się do syntezy substancji biologicznie czynnych: aminokwasów, witamin, regulatorów wzrostu (kwas indoliloctowy), które mogą być wykorzystywane przez inne mikroorganizmy lub rośliny nie mające zdolności produkowania tych związków [Gołębiowska 1986, Uggla 1979, Zawadzki 1999]. Niektóre mikroorganizmy (promieniowce i grzyby) syntetyzują w środowisku glebowym również antybiotyki o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybowym lub mikotoksyny oddziałujące toksycznie nie tylko na mikroorganizmy glebowe, ale również na zwierzęta i człowieka [Lityński 1982, Gołębiowska 1986, Szember 1997, Paul i Clark 2000].

Gleba jest bardzo złożonym i dynamicznym układem stanowiącym naturalne środowisko życia dla mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Organizmy te wpływają na kształtowanie właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych gleb oraz przeprowadzają szereg istotnych procesów biochemicznych. Dobry stan organizmów glebowych (wysoka aktywność, liczebność i różnorodność) jest więc warunkiem dobrej jakości gleb, ich żyzności i odporności na czynniki stresowe.

2.1.4. Czynniki degradujące środowisko glebowe

Wszelkie zmiany zachodzące w środowisku glebowym powodujące pogorszenie jego właściwości fizycznych i chemicznych oraz spadek aktywności biologicznej

wpływają również negatywnie na warunki życia i plonowania roślin uprawnych oraz zmniejszają wartość użytkową pól rolnych i leśnych. Zmiany te określamy mianem degradacji gleb [Baran i Turski 1996, Zawadzki 1999]. Degradacja gleb ma różną genezę i może przybierać różne formy. Głównymi przyczynami degradacji gleby są: wadliwy sposób użytkowania, erozja wodna i wietrzna, przesuszenie lub zawodnienie ziemi, mechaniczne zniszczenie struktury gleby i zniekształcenie rzeźby terenu, chemiczne zanieczyszczenie i zasolenie gleby, zubożenie gleby w składniki pokarmowe, ubytek próchnicy i pogorszenie jej jakości, zakwaszenie lub alkalizacja, zanieczyszczenie mechaniczne oraz zanieczyszczenie organizmami chorobotwórczymi [Ugla 1979, Baran i Turski 1996, Zawadzki 1999]. Ponieważ gleba jest kluczowym elementem środowiska spełniającym szereg ważnych funkcji istotną sprawą stały się międzynarodowe działania mające na celu ochronę jej zasobów. W wydanym w 2002 roku przez Parlament Europejski komunikacie pt. „W kierunku Tematycznej Strategii Ochrony Gleby” („Towards a Thematic Strategy for Soil Protection” – EC Communication, Brussels, 18 April 2002) jako podstawowe zagrożenia dla gleb użytkowanych rolniczo zostały wymienione: erozja, zmniejszanie się zasobów substancji organicznej, zagęszczenie gleby, zmniejszanie się bioróżnorodności w glebach oraz zanieczyszczenia chemiczne gleb.

Szkodliwość erozji polega na niszczeniu wierzchniej, a często i głębszych warstw gleby oraz przemieszczaniu zawartych w niej składników mineralnych (głównie azotanów, przyswajalnego fosforu i potasu) do wód otwartych, czego wynikiem jest wyraźne naruszenie równowagi biologicznej, obniżenie zasobności i żyzności gleb [Zawadzki 1999, EC Communication 2002].

Zmniejszanie się zasobów próchnicy jest jednym ze skutków procesów erozyjnych oraz nieprawidłowego użytkowania ziemi, głównie braku nawożenia organicznego [Baran i Turski 1996]. Zubożenie gleb w substancję organiczną pogarsza ich fizyczne, chemiczne i biologiczne właściwości, a przede wszystkim wpływa na pogorszenie struktury gleby, obniżenie pojemności wodnej, zawartości i przyswajalności składników pokarmowych oraz odporności na erozję i degradację chemiczną [Ugla 1979, Duer i Fotyma 1999, Zawadzki 1999, EC Communication 2002].

Zagęszczenie gleby będące wynikiem stosowania ciężkiego sprzętu agrotechnicznego, składowania materiałów czy udeptywania przez zwierzęta i ludzi prowadzi zawsze do zniekształcenia jej struktury [Zawadzki 1999, EC Communication

2002]. Zwiększa się zagęszczenie masy glebowej, pogorszeniu ulega porowatość, dochodzi do zachwiania stosunków powietrzno-wodnych i zahamowania wymiany gazowej. Ograniczony dostęp powietrza do głębszych warstw gleby obniża biologiczną aktywność gleby, co z kolei wpływa na zmniejszenie jej żyzności i dostępności składników pokarmowych [Misztal i in. 1997, Duer i Fotyma 1999].

Jak opisano w rozdziale 2.1.1. gleba stanowi środowisko życia dla ogromnej liczby organizmów; obok siebie bytują tu bakterie, grzyby, pierwotniaki, pierścienice, nicienie, stawonogi i rośliny [Szember 1997, Paul i Clark 2000, ISO 15799: 2003]. Różnorodne organizmy glebowe odgrywają istotną rolę w utrzymaniu fizycznych i chemicznych właściwości gleby oraz jej żyzności, biorą udział w rozkładzie substancji organicznej oraz dostających się do gleb zanieczyszczeń [Alexander 1975, Gołębiowska 1986]. Niewłaściwe stosowanie zabiegów uprawowych, intensyfikacja nawożenia mineralnego i szerokie zastosowanie środków ochrony roślin prowadzi do zachwiania równowagi biologicznej i redukcji bioróżnorodności w glebach przyczyniając się jednocześnie do zmniejszenia odporności gleb na degradację [Zawadzki 1999, EC Communication 2002].

Jako jedno z istotnych zagrożeń w opracowywanej strategii ochrony gleb wymienia się zanieczyszczenia gleb, zwłaszcza związkami chemicznymi. Zagadnienie to zostanie szerzej omówione w kolejnym rozdziale.

2.2. ODDZIAŁYWANIE ZANIECZYSZCZEŃ CHEMICZNYCH NA ŚRODOWISKO GLEBOWE

2.2.1. Rodzaje zanieczyszczeń chemicznych i ich wpływ na środowisko glebowe

Ogólnie zanieczyszczenia chemiczne można podzielić na nieorganiczne i organiczne [Tarradellas i Bitton 1997, Alloway i Ayres 1999]. Spośród zanieczyszczeń nieorganicznych najczęściej występują i najsilniej wpływają na środowisko glebowe dwutlenek siarki i tlenki azotu, metale ciężkie oraz fluor [Baran i Turski 1996, Tarradellas i Bitton 1997, Alloway i Ayres 1999, Kabata-Pendias i Pendias 1999, Terelak i in. 1999, EC Communication 2002]. Negatywne skutki nadmiaru związków siarki i azotu to przede wszystkim degradacja chemiczna gleb przez zakwaszenie oraz zwiększenie rozpuszczalności wielu składników pokarmowych (Ca, Mg), co powoduje wymywanie ich z gleby [Kabata-Pendias i in. 1995, Motowicka-Terelak i Terelak

1998]. Szkodliwy wpływ fluoru w glebach o podwyższonej jego zawartości wiąże się ze zwiększoną jego ruchliwością i przyswajalnością – zwłaszcza w środowisku kwaśnym – oraz degradacją niektórych minerałów ilastych [Baran i Turski 1996, Alloway i Ayres 1999]. Metale śladowe wprowadzone do gleb podlegają w nich akumulacji i mogą przechodzić do łańcucha pokarmowego człowieka. Pierwiastki te wykazują niejednokrotnie działanie toksyczne w stosunku do organizmów roślinnych i zwierzęcych. Na skutek zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi (głównie Zn i Cd) może dochodzić do zmniejszenia się plonu roślin uprawnych oraz pogorszenia się ich wartości pokarmowej i paszowej [Kabata-Pendias i in. 1995, Scott-Fordsmand i Pedersen 1995, Kabata-Pendias i Pendias 1999, Terelak i in. 1999, Siebielec 2001], a także do obniżenia liczebności i aktywności mikroorganizmów glebowych [Scott-Fordsmand i Pedersen 1995, Gogolev i Wilke 1997, Smreczak i in. 1999, Siebielec 2001, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003, Stuczyński i in. 2003].

Bardzo zróżnicowaną grupę zanieczyszczeń o istotnym znaczeniu dla ekosystemu glebowego stanowią tzw. trwale zanieczyszczenia organiczne – TZO (*ang. Persistent Organic Pollutants – POPs*). Są to związki organiczne pochodzenia antropogenicznego, w dużym stopniu odporne na degradację fizyczną, chemiczną i biologiczną, które mogą przez długi czas przebywać w środowisku i oddziaływać szkodliwie na jego biotyczne elementy [Jones i in. 1996, Maliszewska-Kordybach 1999].

Tabela I.

Występowanie trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) w poszczególnych elementach środowiska według Jones'a [Maliszewska-Kordybach 1999].

element środowiska	TZO (%)	
	WWA	PCB
gleba	94,4	89,2
osady	5,4	9,9
woda	<0,01	0,3
powietrze	0,1	0,5

Większość z trwałych zanieczyszczeń organicznych charakteryzuje się małą rozpuszczalnością w wodzie i dużą w lipidach oraz wykazuje możliwość bioakumulacji w łańcuchu żywnościowym człowieka. TZO występują we wszystkich elementach

środowiska naturalnego, ale ponad 90 % tych ksenobiotyków koncentruje się ostatecznie w glebie - Tabela I [Wild i Jones 1995, Maliszewska-Kordybach 1999].

Do trwałych zanieczyszczeń organicznych możemy zaliczyć m. in. pestycydy chlorowane, polichlorowane bifenyle, dibenzofurany, dioksyny oraz niektóre wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) [Jensen i Folker-Hansen 1995, Terytze i in. 1995, Wild i Jones 1995, Jones i in. 1996, Tarradellas i Bitton 1997, Van de Leemkule i in. 1998, Alloway i Ayres 1999, Maliszewska-Kordybach 1999].

2.2.2. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)

Jedną z grup trwałych zanieczyszczeń organicznych są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), z których część wykazuje silne właściwości toksyczne, mutagenne i rakotwórcze [Menzie i in. 1992, Maliszewska-Kordybach 1999]. WWA są to związki organiczne zawierające od 2 do 13 pierścieni aromatycznych w cząsteczce w ułożeniu liniowym, kątowym lub klasterowym, zawierające mniejsze lub większe ilości podstawników alkilowych lub nitrowych [Mackay i in. 1992, Smreczak 1997, Maliszewska-Kordybach 1999]. Poszczególne związki różnią się między sobą właściwościami fizycznymi i chemicznymi, jednak większa ich część charakteryzuje się silnymi właściwościami hydrofobowymi i lipofilowymi, bardzo słabą rozpuszczalnością w wodzie, małą lotnością i silnym powinowactwem sorpcyjnym w stosunku do glebowej substancji organicznej [Mackay i in. 1992, Sabljic i in. 1995, Terytze i in. 1995]. Ogólnie przyjmuje się, iż węglowodory o wyższych masach cząsteczkowych, zawierające powyżej 3 pierścieni benzenowych w cząsteczce charakteryzują się mniejszą rozpuszczalnością w wodzie i mniejszą lotnością oraz wyższą lipofilnością w stosunku do węglodorów 2- i 3- pierścieniowych [ATSDR 1990, Mackay i in. 1992, Maliszewska-Kordybach 1999, Maliszewska-Kordybach 2000].

WWA mogą pochodzić ze źródeł naturalnych i antropogenicznych; występują we wszystkich elementach środowiska, co związane jest z ich powstawaniem we wszystkich procesach niecałkowitego spalania substancji organicznych [Wild i Jones 1995, Jones i in. 1996, Maliszewska-Kordybach 2000]. Do gleb wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne dostają się głównie z pyłami i opadami atmosferycznymi; część pyłów osadza się na nadziemnych częściach roślin, a po ich obumarciu dostaje się

do gleby [Wild i Jones 1995, Maliszewska-Kordybach 1999]. Ponadto źródłem WWA dla gleb użytkowanych rolniczo mogą być osady ściekowe i komposty stosowane w celach nawozowych, ścieki i spływy z dróg asfaltowych oraz wycieki paliw [Wild i Jones 1995, Jones i in. 1996].

Wprowadzone do gleby WWA ulegają w niej zarówno procesom biologicznym takim jak rozkład mikrobiologiczny i pobieranie przez rośliny [Heitcamp i Cerniglia 1987, Bleam i Cawthray 1988, Goodman i in. 1992, Cerniglia 1993, Fismes i in. 2002] jak i abiotycznym – sorpcja, wymywanie w głąb profilu glebowego, ulatnianie czy fotodegradacja [Chiou 1989, Jones i in. 1996, Ren i in. 1996, Hwang i Cutright 2003].

Z obecnością WWA w glebie wiąże się problem wpływu tych związków na środowisko przyrodnicze. Wcześniejsze prace dotyczące zagrożeń związanych z zanieczyszczeniem gleb użytkowanych rolniczo przez WWA skupiały się przede wszystkim na ocenie ryzyka związanego z zagrożeniem zdrowia człowieka np. w wyniku wdychania pyłu glebowego czy przechodzenia do łańcucha żywnościowego człowieka [Menzie i in. 1992, Maliszewska-Kordybach 1999]. W ostatnich latach zainteresowanie badaczy koncentruje się na ocenie oddziaływania zanieczyszczeń, w tym WWA, na całość ekosystemu glebowego z uwzględnieniem wszystkich jego biotycznych elementów: mikroorganizmów, bezkręgowców oraz roślin.

2.2.3. Metody badań ekotoksykologicznych w środowisku glebowym

W ocenie ryzyka wynikającego z zanieczyszczenia gleby szkodliwymi substancjami chemicznymi do niedawna opierano się wyłącznie na wynikach analiz chemicznych, które mogą dostarczać informacji o obecności, zawartości i rodzaju związków chemicznych, nie pozwalają jednak ocenić szkodliwych ekologicznych skutków oddziaływania zanieczyszczeń. Ogólną oceną wpływu związków toksycznych na specyficzne organizmy lub procesy zajmuje się toksykologia, a jedną z jej gałęzi jest ekotoksykologia zajmująca się określeniem wpływu substancji szkodliwych na wszystkie biotyczne elementy środowiska (w tym również środowiska glebowego) [Eijsackers 1994, Namieśnik i Jaśkowski 1995, Van Beelen i Doelman 1997]. Podstawowym problemem w badaniach ekotoksyczności jest dobór właściwych organizmów testowych. Ponieważ w ekosystemie glebowym bytują obok siebie zarówno rośliny, zwierzęta jak i mikroorganizmy i nie ma praktycznej możliwości

objęcia ich wszystkich badaniami, pojawia się pytanie: które organizmy i procesy zachodzące w glebie należy chronić lub jakie testy są najbardziej reprezentatywne dla określonej grupy organizmów. Wybór testów ekotoksykologicznych i opracowywanie odpowiednich norm są przedmiotem prac między innymi Komitetu Jakości Gleby Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (*International Standardisation Organisation Technical Committee „Soil Quality”* – ISO TC 190). Przy wyborze testów ważne są takie czynniki jak: powtarzalność testów, praktyczność i łatwość ich zastosowania oraz czułość [Torstensson 1997, ISO 15799: 2003].

W Tabeli II pokazano przykładowe zestawy testów ekotoksykologicznych zalecanych w badaniach mających na celu ochronę funkcji retencyjnej i siedliskowej gleb. Wyniki prowadzonych badań [Van de Leemkule i in. 1998, Fleischmann 2000, Kördel i Römbke 2001, Hund-Rinke i in. 2002] jak i zalecenia norm ISO [ISO 15799: 2003] wskazują na konieczność zastosowania przynajmniej jednego testu dla każdej grupy troficznej organizmów.

Do oceny wpływu zanieczyszczeń na biotyczne elementy agroekosystemu jako organizmy testowe najczęściej stosowane są rośliny oraz makro- i mikroorganizmy [ISO 15799: 2003]. Te ostatnie, ze względu na swoją dużą czułość jak i bardzo szybką reakcję na zmiany stanu środowiska, uważane są za najlepsze organizmy wskaźnikowe [Eijsackers 1994, Torstensson 1997, Van Beelen i Doelman 1997, Pankhurst i in. 1998].

Testy mikrobiologiczne mogą być podzielone na kilka poziomów; pierwszy dotyczy zmian genetycznych i fizjologicznych na poziomie organizmu, drugi poziom opisuje całą populację i obejmuje oznaczenia biomasy, oddychanie, liczebność populacji oraz zróżnicowanie ekologiczne mikroorganizmów. Trzeci poziom charakteryzuje aktywność enzymatyczną specyficznych grup lub całej populacji organizmów, zaś czwarty poziom opisuje interakcje zachodzące pomiędzy organizmami (np. mikoryza, symbioza bakterii brodawkowych z roślinami motylkowymi) [Eijsackers 1994, Rossel i in. 1997, Torstensson 1997, Pankhurst i in. 1998]. W praktyce reakcję mikroorganizmów glebowych na obecność zanieczyszczeń ocenia się najczęściej na dwóch poziomach: populacji i aktywności [Maliszewska-Kordybach i in. 2000].

W przypadku oceny funkcji siedliskowej gleby w stosunku do mikroorganizmów najczęściej zalecany – ze względu na wysoką czułość – jest test polegający na oznaczaniu potencjału nityfikacyjnego [ISO/DIS 15685: 2001] – Tabela II. Test ten pozwala określić potencjalną aktywność wyspecjalizowanej grupy bakterii autotroficznych – bakterii utleniających amoniak, które przeprowadzają pierwszy etap

nitryfikacji. Natomiast drugi etap nitryfikacji (utlenianie azotynów do azotanów) jest wynikiem aktywności bakterii z grupy *Nitrobacter*, które wykazują mniejszą czułość na zmiany stanu środowiska [Hicks i in. 1990, Van Beelen i Doelman 1997].

Tabela II.

Zestawy testów ekotoksykologicznych do oceny poszczególnych funkcji gleby.

funkcja gleby	organizm	test	literatura
retencyjna	rośliny	test z rzęsą wodną	ISO 15799: 2003
	mikroorganizmy	test z bakteriami luminescencyjnymi test z glonami	ISO 15799: 2003 Fleischmann 2000
siedliskowa	rośliny	test hamowania kiełkowania nasion i wzrostu roślin	ISO 15799: 2003 Kördel i Römbke 2001 Fleischmann 2000 Van de Leemkule i in. 1998
		test hamowania wzrostu korzeni	ISO 15799: 2003
	makroorganizmy	test z dżdżownicami	ISO 15799: 2003 Hund-Rinke i in. 2002 Kördel i Römbke 2001 Fleischmann 2000 Van de Leemkule i in. 1998
		test hamowania rozmnażania skoczogonków	ISO 15799: 2003 Hund-Rinke i in. 2002 Kördel i Römbke 2001
	mikroorganizmy	określenie potencjału nitryfikacyjnego	ISO 15799: 2003 Hund-Rinke i in. 2002 Fleischmann 2000
		określenie mineralizacji i nitryfikacji N	ISO 15799: 2003 Kördel i Römbke 2001 Van de Leemkule i in. 1998
		określenie oddychania mikroorganizmów	Hund-Rinke i in. 2002 Kördel i Römbke 2001 Fleischmann 2000
		określenie ilości i aktywności mikroorganizmów z wykorzystaniem krzywej oddychania	ISO 15799: 2003
		określenie biomasy mikroorganizmów	ISO 15799: 2003
		określenie symbiotycznego wiązania azotu	Van de Leemkule i in. 1998

Kolejnym parametrem zalecanym do oceny funkcji siedliskowej gleb jest oddychanie, jednak czułość tego testu (zwłaszcza oddychania podstawowego) jest dosyć dyskusyjna. Parametr ten odzwierciedla aktywność metaboliczną całej populacji mikroorganizmów glebowych (włączając w to bakterie, promieniowce i grzyby) z tego powodu często

możemy obserwować wzrost intensywności oddychania, podczas gdy inne procesy i aktywność enzymatyczna są zahamowane [Hicks i in. 1990, Rossel i in. 1997, Van Beelen i Doelman 1997, Pankhurst i in. 1998, Boer i Kowalchuk 2001].

Oznaczenia aktywności enzymatycznej gleb ze względu na problemy metodologiczne oraz stosunkowo niską czułość rzadko są stosowane do oceny bezwzględnej aktywności mikroflory glebowej, często natomiast wykorzystuje się je w badaniach ekotoksykologicznych [Eschenbach i in. 1991, Wilke 1997, Dick i in. 1996, Maliszewska-Korodybach i in. 2000, Turek-Szytow 2000, Maliszewska-Korodybach i Smreczak 2003]. W dotychczasowych badaniach oddziaływania WWA stosowano najczęściej oznaczenia aktywności dehydrogenaz, fosfataz, proteaz, katalaz i ureaz [Eschenbach i in. 1991, Mrozowska i in. 1995, Małachowska-Jutcz i in. 1997, Kucharski i in. 2000, Margesin i in. 2000, Maliszewska-Korodybach i Smreczak 2000, Baran i in. 2004].

W odniesieniu do bezkręgowców glebowych najczęściej stosowane są dwa testy: z dżdżownicami (*Eisenia fetida*) i ze skoczogonkami (*Folsomia candida*) – Tabela II, w których określa się ich rozmnażanie, biomasę lub śmiertelność. Dżdżownice i skoczogonki są stosunkowo wrażliwe na wpływ zanieczyszczeń chemicznych. Stale bytują one w środowisku glebowym i mogą pobierać związki szkodliwe całą powierzchnią ciała lub przez przewód pokarmowy wraz z cząsteczkami gleby [ISO 15799: 2003].

Dla oceny funkcji siedliskowej gleby w stosunku do roślin stosowane są testy krótkoterminowe pozwalające na określenie wpływu zanieczyszczeń na rośliny we wczesnej fazie ich rozwoju. Są to najczęściej testy hamowania długości korzenia [ISO 11269-1: 1993] oraz test hamowania kiełkowania nasion i wzrostu roślin [ISO 11269-2: 1995]; wzrost roślin ocenia się też często w oparciu o pomiar świeżej i suchej masy części nadziemnych. Jako gatunki najbardziej czułe na obecność substancji szkodliwych w normach ISO wymieniane są: z klasy roślin jednoliściennych – rajgras, owies, pszenica, jęczmień, sorgo i kukurydza, a z klasy dwuliściennych – gorczyca biała, rzepak, rzepa, rzeżucha, rzodkiew, koniczyna, sałata, pomidor i fasola [ISO 11269-2: 1995]. W badaniach ekotoksyczności WWA zaleca się stosowanie przynajmniej dwóch roślin testowych, po jednej z klasy jedno- i dwuliściennych.

Ponieważ część zanieczyszczeń dostających się do gleb może ulec z nich wymyciu i przedostać się do wód gruntowych lub powierzchniowych konieczna jest również ocena funkcji retencyjnej gleby (jakości fazy wodnej) [Blum 1999, ISO 15799:

2003]. W tym celu najczęściej wykorzystuje się następujące testy: test hamowania emisji światła przez bakterie luminescencyjne *Vibrio fischeri*, test hamowania wzrostu glonów *Scenedesmus subspicatus* lub *Selenastrum capricornutum* oraz test z rzęsą wodną (*Lemna minor*), w którym określa się wpływ zanieczyszczeń na liczbę, powierzchnię i świeżą masę liści tej rośliny oraz zawartość w nich chlorofilu [Fleischmann 2000, ISO 15799: 2003].

W oparciu o wyniki testów biologicznych wyliczane są wskaźniki toksyczności zanieczyszczeń: EC_x (ang. *x % Effect Concentration*) czyli stężenie związku toksycznego, które powoduje x % zahamowanie aktywności lub wzrostu organizmów oraz LOEC (ang. *Lowest Observable Effect Concentration*) i NOEC (ang. *No Observable Effect Concentration*) odpowiednio najniższe i najwyższe stężenie związku toksycznego nie powodujące istotnej inhibicji aktywności lub wzrostu organizmów [Van Straalen i Denneman 1989, Van Beelen i Doelman 1997]. Stosowanie wartości LOEC i NOEC jest obecnie krytykowane, bowiem wartości te uznawane są za mało obiektywne ze względu na fakt, iż zależą od wielu czynników m.in. od rodzaju stosowanej metody statystycznej, powtarzalności wyników oraz warunków prowadzenia doświadczeń [Chapman i in. 1996, Van Beelen i Doelman 1997, Sverdrup 2001].

Testy ekotoksykologiczne najczęściej przeprowadzane są w laboratoriach w ściśle kontrolowanych warunkach temperatury, wilgotności i oświetlenia, pojawia się więc problem przenoszenia wyników testów laboratoryjnych do warunków polowych. Dodatkowo w laboratorium może być testowanych tylko kilka gatunków, różniących się wrażliwością na czynniki stresowe, podczas gdy w zanieczyszczonym ekosystemie jest ich wiele. Wszystko to skłania badaczy do stosowania tzw. współczynników bezpieczeństwa (ang. „*safety factors*”), które mają na celu zwiększenie limitu bezpieczeństwa dla całej biocenozy [Van Straalen i Denneman 1989, Jensen i Folker-Hansen 1995, Roman i in. 1999]. W zależności od ilości dostępnych danych najczęściej przyjmują one wartości 10, 100 i 1000 [Jensen i Folker-Hansen 1995, Sverdrup 2001]. W oparciu o „*safety factors*” można wyznaczyć przewidywane stężenia zanieczyszczeń nie wywołujące efektu toksycznego (PNOEC – ang. *Predicted No Observed Effect Concentration*) – [Van Straalen i Denneman 1989, Jensen i Folker-Hansen 1995, Roman i in. 1999].

2.3. ODDZIAŁYWANIE WWA NA ORGANIZMY GLEBOWE

Problematyka związana z oddziaływaniem WWA na biotyczne elementy środowiska glebowego – mikroorganizmy, bezkręgowce i rośliny – stała się przedmiotem badań naukowców w okresie ostatnich 15 lat. Uzyskiwane wyniki są często niejednoznaczne i wskazują, że wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą działać hamująco [Hund i Traunspunger 1994, Remde i Hund 1994, Turek-Szytów 2000, Sverdrup 2001, Turek-Szytów i Miksch 2001, Kucharski i in. 2004, Wyszowska i Kucharski 2004], stymulująco [Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1997, Małachowska-Jutcz i in. 1997, Zabłocka-Godlewska i Buczkowska-Wesołowska 1998, Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003, Baran i in. 2004] lub nie wykazywać wpływu na organizmy testowe [Eschenbach i in. 1991, Lee i Banks 1993, Mahmood i Rao 1993, Smreczak 1998]. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne nie występują w przyrodzie pojedynczo, dlatego też w badaniach zarówno fitotoksyczności jak i ekotoksyczności często stosuje się mieszaninę tych związków [Baund-Grasset i in. 1993, Hund i Traunspunger 1994, Smreczak 1998, Sverdrup 2001, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003] lub produkty ropopochodne zawierające WWA [Lee i Banks 1993, Remde i Hund 1994, Mrozowska i in. 1995, Małachowska-Jutcz i in. 1997, Chaineau i in. 1997, Turek-Szytów i Miksch 2001, Kucharski i in. 2004, Wyszowska i Kucharski 2004], natomiast rzadziej badany jest wpływ pojedynczych węglowodorów [Mitchell i in. 1988, Ren i in. 1996, Ping i Tieheng 1996, Turek-Szytów 2000, Sverdrup 2001].

2.3.1. Czynniki decydujące o oddziaływaniu WWA w środowisku glebowym

Oddziaływanie WWA – tak jak i innych zanieczyszczeń o zbliżonych właściwościach – w środowisku glebowym jest uzależnione od wielu czynników [Rossel i in. 1997, Smreczak 1997, Pankhurst i in. 1998, Maliszewska-Kordybach 1999]. Zjawisko to wiąże się z abiotycznymi i biologicznymi właściwościami gleb, fizykochemicznymi właściwościami związków oraz ich zawartością w glebie, obecnością innych substancji, czasem oddziaływania węglowodorów na badane organizmy oraz z rodzajem receptora (organizmu testowego) [Hicks i in. 1990, Maliszewska-Kordybach 1993, Hund i Traunspunger 1994, Jensen i Folker-Hansen

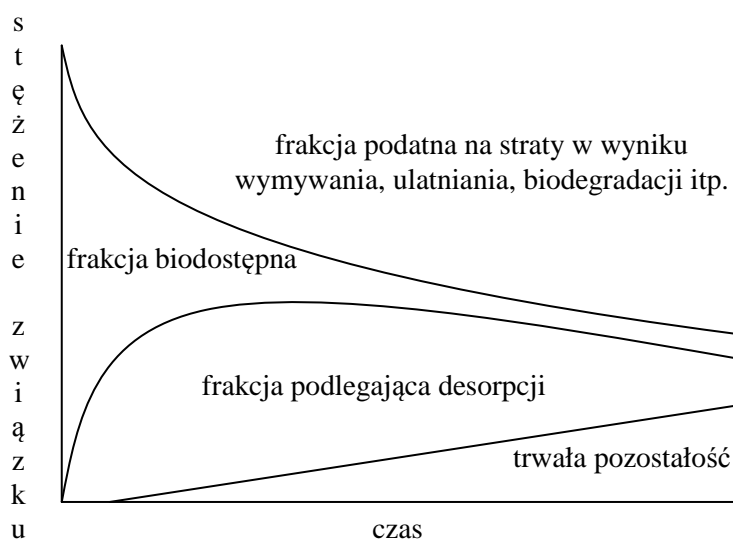
1995, Gogolev i Wilke 1997, Van de Leemkule i in. 1998, Smreczak i in. 1999, Fleischmann 2000, Sverdrup 2001, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003].

Podstawowym czynnikiem warunkującym oddziaływanie zanieczyszczeń chemicznych, w tym WWA, w środowisku jest ich biodostępność [Boesten 1993, Baveye i Bladon 1999, Reid i in. 2000, Sijm i in. 2000, Sverdrup 2001, Semple i in. 2003]. W zależności od dziedziny wiedzy reprezentowanej przez naukowców biodostępność jest różnie definiowana. Z biologicznego punktu widzenia biodostępna jest ta frakcja związku chemicznego, która może zostać pobrana przez określony organizm lub wywołać efekt toksyczny [Baveye i Bladon 1999, Alexander 2000, Semple i in. 2003, Harmsen 2004]. W tym znaczeniu biodostępność jest uzależniona przede wszystkim od rodzaju receptora, czasu jego kontaktu z zanieczyszczeniem i drogi pobrania [Boesten 1993, Semple i in. 2003, Harmsen 2004]. Chemicy natomiast za dostępną uważają tę ilość substancji chemicznej, która w danym czasie w specyficznych warunkach może desorbować z gleby do roztworu glebowego. Często więc jako frakcję biodostępną przyjmuje się stężenie danej substancji w fazie wodnej gleby (wyznaczone lub oznaczone) [Swartz i in. 1995, Reid i in. 2000, Sijm i in. 2000, Semple i in. 2003]. Jest to więc potencjalnie biodostępna frakcja zanieczyszczenia, którą określa się często metodami ekstrakcji chemicznej [Van Brummelen 1998, Baveye i Bladon 1999, Cuypers i in. 2000, Smreczak i Harmsen 2001, Harmsen 2004, Oleszczuk i Baran 2004]. Tak definiowana biodostępność może być uzależniona od właściwości gleby m.in. od zawartości węgla organicznego oraz od fizykochemicznych właściwości związków (rozpuszczalność, lotność, zdolności sorpcyjne). Informacje dotyczące zależności pomiędzy właściwościami gleb, a biodostępnością WWA oraz ich oddziaływaniem są jednak bardzo nieliczne [Kelsey i in. 1997, Tang i Alexander 1999, Krauss i in. 2000, Harmsen 2004].

W odniesieniu do związków nieorganicznych (makro- i mikroelementy, metale ciężkie) termin biodostępność był stosowany od dawna, opracowano również metodyki chemicznego oznaczania frakcji biodostępnej tych zanieczyszczeń [Kabata-Pendias i Pendias 1999]. Natomiast badania nad chemicznymi metodami określania tej frakcji dla zanieczyszczeń typu WWA podjęto dopiero w ostatnich latach w kilku ośrodkach naukowych, w tym w Zakładzie Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów IUNG w Puławach [Alexander 2000, Cuypers i in. 2000, Smreczak i Harmsen 2001, Hwang i Cutright 2003, Oleszczuk i Baran 2004].

Najważniejszym procesem abiotycznym decydującym o biodostępności WWA, a tym samym o ich toksyczności, jest sorpcja tych związków przez gleby – przede wszystkim przez substancję organiczną, ale również przez frakcje mineralne gleb [Chiou 1989, Reid i in. 2000, Sijm i in. 2000, Hwang i Cutright 2003].

Pomiędzy frakcją organiczną gleby, a cząsteczkami węglowodorów działają różnego rodzaju siły umożliwiające tworzenie się specyficznych wiązań fizycznych i chemicznych [Chiou 1989, Hicks i in. 1990]. Dzięki tworzeniu wiązań wodorowych i oddziaływaniu sił van der Waalsa WWA dostające się do gleby ulegają szybkiej sorpcji przez glebową substancję organiczną. Jak podają Jones i inni [1996] oraz Semple i inni [2003] niektóre z tych połączeń mogą mieć charakter odwracalny, co powoduje przechodzenie WWA do fazy wodnej gleby oraz umożliwia ich rozkład i zwiększa dostępność WWA dla organizmów glebowych. Natomiast część WWA bardzo silnie związana przez glebę nie podlega procesom desorpcji i pozostaje w niej jako tzw. trwała pozostałość – Rys. I [Jones i in. 1996].



Rys. I. Wpływ czasu na podatność na ekstrakcję i biodostępność zanieczyszczeń [Jones i in. 1996].

Udział pozostałości trwale związanej w ogólnej puli WWA zwiększa się wraz z wydłużeniem czasu kontaktu tych związków z glebą, co prowadzi do tzw. „starzenia się” (ang. *aging*) zanieczyszczeń [Hatzinger i Alexander 1995, Nam i in. 1998, Chung i Alexander 1999, Tang i Alexander 1999, Alexander 2000, Northcott i Jones 2000, Guthrie-Nickols 2003]. Procesy „starzenia się” WWA obejmują ich dyfuzję do mikroporów glebowych, podział pomiędzy substancję organiczną oraz silną sorpcję na

cząstkach glebowych [Hatzinger i Alexander 1995, Jones i in. 1996, Maliszewska-Kordybach 1999, Alexander 2000, Northcott i Jones 2000, Guthrie-Nickols 2003] i prowadzą do zmniejszenia biodostępności tych związków.

Intensywność procesów sorpcji zachodzących w glebie w znacznym stopniu zależy od warunków środowiskowych takich jak wilgotność i temperatura. Spadek temperatury gleby oraz obniżenie jej wilgotności może zwiększać zakres sorpcji fizycznej WWA przez glebę oraz obniżać ich rozpuszczalność i ciśnienie par, co ogranicza biodostępność tych związków dla mikroorganizmów glebowych oraz ich ulatnianie [Chiou 1989, Maliszewska-Kordybach 1993].

Bardzo istotne znaczenie w procesach sorpcji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych ma nie tylko ogólna zawartość glebowej substancji organicznej, ale i jej skład jakościowy. Z badań Chiou [1989] oraz Piatt'a i Brusseau [1998] wynika, że największą zdolnością sorpcyjną w stosunku do ksenobiotyków typu WWA charakteryzują się huminy, znacznie mniejszą kwasy huminowe, a najslabszą kwasy fulwowe.

O sorpcji WWA, a zarazem o ich biodostępności mogą decydować również właściwości tych związków [Hund i Traunspunger 1994, Wild i Jones 1995, Sverdrup 2001]. Sorpcyjne właściwości WWA w stosunku do glebowej substancji organicznej charakteryzowane są przez współczynnik K_{oc} [Sabljić i in. 1995, Swartz i in. 1995, Terytze i in. 1995, Reid i in. 2000]. W praktyce do opisu powinowactwa sorpcyjnego WWA stosuje się zamiast współczynnika K_{oc} skorelowany z nim parametr K_{ow} ($\log K_{ow}$) czyli współczynnik podziału oktanol/woda [Bulman i in. 1985, Chiou 1989, Maliszewska-Kordybach 1993, Sabljić i in. 1995, Swartz i in. 1995].

Reakcja organizmów glebowych na obecność zanieczyszczeń zależy nie tylko od czynników środowiskowo-glebowych i właściwości związku chemicznego, ale także od czasu kontaktu. Czynniki te rzadko oceniany jest w badaniach, a publikowane wyniki badań ekotoksyczności WWA obejmują testy o zróżnicowanym czasie kontaktu organizm-WWA [Sverdrup 2001, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003]. Słabszy efekt toksyczny obserwowany po dłuższym czasie związany jest zarówno ze zmniejszaniem się biodostępnej frakcji WWA w glebie (w wyniku ich sorpcji lub rozkładu) jak i z „aklimatyzacją” organizmów do obecności zanieczyszczeń [Carmichael i Pfaender 1997, Macleod i Semple 2002, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003]. Ten ostatni proces może być wynikiem uruchomienia specyficznych mechanizmów adaptacji takich jak: indukcje lub zwiększenie ilości

specyficznych enzymów; transfer genów lub ich mutacje oraz wzrost populacji mikroorganizmów bardziej odpornych w stosunku do WWA i uczestniczących w procesach biodegradacji tych związków [Howard i Banerjee 1984, Bleam i Cawthray 1988, Carmichael i Pfaender 1997, Macleod i Semple 2002, Semple i in. 2003].

WWA, które nie zostały zasorbowane nieodwracalnie przez glebę lub które nie zostały usunięte ze środowiska w wyniku procesów abiotycznych mogą ulegać rozkładowi mikrobiologicznemu [Bleam i Cawthray 1988, Aprill i Sims 1990, Cerniglia 1993, Maliszewska-Kordybach 1993, Wild i Jones 1995, Maliszewska-Kordybach 1999, Semple i in. 2003]. Główną rolę w procesach biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przypisuje się bakteriom, które mogą wykorzystywać te związki jako jedyne źródło węgla i energii. Zdolność rozkładania WWA, ale tylko na drodze kometabolizmu (w obecności innego łatwo dostępnego substratu), wykazują również grzyby [Bleam i Cawthray 1988, Cerniglia 1993]. Rozkład bakteryjny WWA prowadzi do detoksykacji i całkowitej mineralizacji związków wyjściowych, natomiast w wyniku działalności grzybów – które dominują w środowisku kwaśnym – dochodzi do powstania silnie rakotwórczych i mutagennych form epoksydowych [Heitcamp i Cerniglia 1987, Bauer i Capone 1988, Maliszewska-Kordybach 1993, Smreczak 1998].

Mechanizm toksycznego oddziaływania WWA w glebie może być różny w zależności od rodzaju związku, rodzaju organizmu i sposobu jego narażenia oraz od warunków środowiska [Van Brummelen i in. 1998]. Przypuszcza się, że jednym z głównych mechanizmów oddziaływania związków organicznych o silnym lipofilowym charakterze jest ich działanie narkotyczne [Sikkema i in. 1995, Van Brummelen i in. 1998, Lin i in. 2004]. Działanie to polega na interakcji WWA z lipidami błon cytoplazmatycznych organizmów, która prowadzi do naruszenia struktury błon i zwiększenia ich przepuszczalności [Sikkema i in. 1995, Lin i in. 2004]. Do wzrostu toksyczności WWA może doprowadzić fotoaktywacja tych związków. Pod wpływem działania promieniowania UV dochodzi bowiem do powstania wolnych rodników, które mogą powodować uszkodzenia struktur biologicznych [Ren i in. 1996, Van Brummelen i in. 1998]. Podczas przemian WWA może dojść również do ich aktywacji biochemicznej, w skutek czego ulegają one przekształceniu w związki bardziej reaktywne tworzące trwałe połączenia z cząsteczkami DNA. Powstałe w ten sposób związki mogą podnosić zdolność mutacji oraz dawać efekty kancerogenne i teratogenne [Namieśnik i Jaśkowski 1995, Van Brummelen i in. 1998]. Jednym z najmniej poznanych mechanizmów toksycznego działania WWA jest ich zdolność interakcji z

receptorami hormonów, co powoduje zakłócenia ich metabolizmu [Van Brummelen i in. 1998].

Toksyczne oddziaływanie zanieczyszczeń organicznych typu WWA może być uzależnione również od obecności w glebie innych substancji chemicznych [Jensen i Folker-Hansen 1995, Gogolev i Wilke 1997, Smreczak 1997, Maila i Cloete 2002, Riis i in. 2002]. Badania Maila i Cloete'a [2002] udowodniły, że niejonowe związki powierzchniowo czynne (np. Triton X – 100) mają zdolność zwiększania rozpuszczalności WWA oraz ich biodostępności, przez co węglowodory te mogą stać się bardziej toksyczne dla roślin. Gogolev i Wilke [1997], Riis i in. [2002] oraz Maliszewska-Kordybach i Smreczak [2003] wykazali nasilenie toksycznego oddziaływania WWA na mikroorganizmy w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, podczas gdy związki te oddzielnie zaaplikowane do gleb nie wywoływały efektów toksycznych lub powodowały nieznaczne zahamowanie aktywności badanych organizmów. Prawdopodobnie WWA poprzez oddziaływanie narkotyczne przyczyniają się do zmiany struktury i przepuszczalności błon komórkowych bakterii, w wyniku czego metale ciężkie łatwiej mogą wnikać do wnętrza komórek mikroorganizmów i wpływać na ich funkcje życiowe. Synergistyczne oddziaływanie tych grup zanieczyszczeń nie jest do końca potwierdzone [Gogolev i Wilke 1997]. Przyjmuje się, że dla hydrofobowych zanieczyszczeń o działaniu narkotycznym toksyczność mieszaniny równa się sumie efektów toksycznych pojedynczych związków wchodzących w jej skład. Mówimy wówczas o addytywności toksyczności [Swartz i in. 1995, Di Toro i in. 2000, Sverdrup 2001, Lin i in. 2004]. W przypadku WWA, które w środowisku glebowym występują zawsze w postaci mieszaniny, brak jest jednak dotychczas danych naukowych potwierdzających (lub negujących) to przypuszczenie.

2.3.2. Oddziaływanie WWA na rośliny

Nieliczne badania związane z oddziaływaniem WWA na rośliny dotyczą najczęściej roślin w początkowej fazie rozwoju [Mitchell i in. 1988, Gong i in. 2001, Sverdrup 2001, Turek-Szytow i Miksch 2001, Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003]. Reakcję roślin określa się zazwyczaj w oparciu o pomiar kiełkowania, długości korzenia, biomasy roślin i długości łodygi [Mitchell i in. 1988, Baund-Grasset i in. 1993, Kumerova i in. 1995, Ren i in. 1996, Smreczak 1998, Maliszewska-Kordybach i

Smreczak 2000, Gong i in. 2001, Sverdrup 2001, Turek-Szytow i Miksch 2001, Maila i Cloete 2002, Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003]. Niestety uzyskiwane wyniki są niejednoznaczne, stwierdzano zarówno hamowanie [Mitchell i in. 1988, Baund-Grasset i in. 1993, Chaineau i in. 1997, Smreczak 1998, Gong i in. 2001, Sverdrup 2001, Turek-Szytow i Miksch 2001, Maila i Cloete 2002] jak i stymulację wzrostu badanych roślin [Kummerova i in. 1995, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000]. W niektórych przypadkach nie obserwowano zaś żadnych istotnych efektów [Ren i in. 1996, Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003]. Wyniki tych badań uzależnione były najczęściej od właściwości WWA [Baund-Grasset i in. 1993, Kummerova i in. 1995, Sverdrup 2001, Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003], zawartości tych związków w glebie [Mitchell i in. 1988, Ren i in. 1996, Maila i Cloete 2002], rodzaju rośliny [Mitchell i in. 1988, Baund-Grasset i in. 1993, Chaineau i in. 1997, Gong i in. 2001, Sverdrup 2001] oraz od właściwości badanych gleb [Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000]. Wyznaczone wskaźniki toksyczności ($EC_x - x \% \text{ effect concentration}$) były bardzo zróżnicowane; wartości EC_{20} mieściły się w zakresie od 22 do 1300 mg na kg gleby, a EC_{50} od 30 do 4300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [Mitchell i in. 1988, Baund-Grasset i in. 1993, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000, Sverdrup 2001].

Wpływ WWA na rośliny dojrzałe oceniano analizując głównie wielkość ich plonu. Rośliny dojrzałe wykazują na ogół większą odporność na zanieczyszczenie środowiska w porównaniu z początkową fazą wzrostu, zagadnienie to w odniesieniu do WWA jest jednak słabo opisane w literaturze [Hund i Traunspunger 1994, Smreczak 1998]. Według Smreczak [1998] zanieczyszczenie gleby piaszczystej mieszaniną 4 WWA (fluoren+antracen+piren+chryzen) na poziomie $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ nie wpływa na wielkość plonu marchwi i gorzycy, hamuje natomiast wzrost korzenia pierwotnego jęczmienia, kukurydzy i gorzycy.

2.3.3. Oddziaływanie WWA na mikroorganizmy glebowe

Badania dotyczące oddziaływania WWA na mikroorganizmy glebowe przeprowadzano przeważnie na dwóch poziomach: populacji i aktywności. Na poziomie populacji określano: liczebność bakterii i grzybów [Maliszewska-Kordybach 1992, Lee i Banks 1993, Mahmood i Rao 1993, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1997,

Zabłocka-Godlewska i Buczkowska-Wesołowska 1998], liczebność pierwotniaków [Sverdrup 2001], oddychanie mikroorganizmów [Eschenbach i in. 1991, Hund i Traunspunger 1994, Remde i Hund 1994, Ping i Tieheng 1996, Margesin i in. 2000, Hollender i in. 2003] oraz biomasę organizmów glebowych [Margesin i in. 2000]. Na poziomie aktywności oceniano wpływ WWA głównie na aktywność enzymatyczną gleb charakteryzującą aktywność całej populacji mikroorganizmów glebowych. Najczęściej badano aktywność dehydrogenaz [Eschenbach i in. 1991, Wilke 1997, Kucharski i in. 2000, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000, Turek-Szytow 2000, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003, Baran i in. 2004], amylaz i proteaz [Mrozowska i in. 1995, Małachowska-Jutcz i in. 1997], lipaz, katalaz i ureaz [Margesin i in. 2000] oraz fosfataz kwaśnej i zasadowej [Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003, Baran i in. 2004]. Wpływ WWA na poziomie aktywności określano również w stosunku do specyficznych grup organizmów glebowych, z reguły w odniesieniu do bakterii nityfikacyjnych. Jednak w literaturze istnieje niewiele danych z tego zakresu [Hund i Traunspunger 1994, Remde i Hund 1994, Ping i Tieheng 1996, Sverdrup 2001, Kucharski i n. 2004].

Wyniki badań dotyczących wpływu WWA na mikroorganizmy są równie niejednoznaczne jak w przypadku roślin. Stwierdzano zarówno inhibicję [Hund i Traunspunger 1994, Mrozowska i in. 1995, Ping i Tieheng 1996, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1997, Wilke 1997, Turek-Szytow 2000, Sverdrup 2001, Wyszowska i Kucharski 2004], jak i stymulację [Maliszewska-Kordybach 1992, Mahmood i Rao 1993, Małachowska-Jutcz i in. 1997, Zabłocka-Godlewska i Buczkowska-Wesołowska 1998, Sverdrup 2001, Baran i in. 2004] lub brak zmian w aktywności mikrobiologicznej gleb [Eschenbach i in. 1991, Lee i Banks 1993, Remde i Hund 1994, Ping i Tieheng 1996]. Tylko w niektórych przypadkach [Wilke 1997, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000, Turek-Szytow 2000, Sverdrup 2001] wyznaczono wskaźniki toksyczności EC_x . Uzyskiwane wartości wskaźników mieściły się w szerokim zakresie stężeń, 50 % zahamowanie aktywności mikroorganizmów (EC_{50}) stwierdzano przy zawartości WWA w granicach 0,4 do 660 $mg \cdot kg^{-1}$ [Turek-Szytow 2000, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003]. Zróżnicowane oddziaływanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych związane było zarówno z ich właściwościami [Mahmood i Rao 1993, Turek-Szytow 2000, Sverdrup 2001] i zawartością w glebie [Remde i Hund 1994, Ping i Tieheng 1996, Wilke 1997, Sverdrup 2001] jak i czasem oddziaływania [Eschenbach i in. 1991, Klimkowicz-

Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003]. Przy ocenie reakcji mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez WWA istotne jest również określenie wpływu właściwości gleb, zagadnienie to jak dotychczas uwzględnione było w badaniach w bardzo ograniczonym zakresie [Maliszewska-Kordybach 1992, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000].

2.4. KRYTERIA OCENY JAKOŚCI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH PRZEZ WWA

Dotychczasowe kryteria oceny poziomu zanieczyszczenia gleb związkami organicznymi uwzględniały przede wszystkim ochronę zdrowia człowieka, zwracano uwagę na narażenie człowieka w wyniku bezpośredniego kontaktu z glebą lub w wyniku spożycia zanieczyszczonej żywności. Aktualne wymagania w tym zakresie dążą do ochrony wszystkich biotycznych elementów agroekosystemu. Przy ustalaniu tzw. „wartości granicznych” określających limity zawartości WWA w glebach nie powodujących skutków ekologicznych niezbędne są informacje o toksyczności tych związków w stosunku do organizmów glebowych. Jednak wciąż jest zbyt mało danych z tego zakresu. W oparciu o istniejące w literaturze informacje Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska zaproponowała „graniczne zawartości” różnych związków chemicznych w glebach (ang. *Ecological Soil Screening Level – Eco-SSL*), które chronią receptory ekologiczne [US EPA 2000]. Jako organizmy testowe wybrano organizmy żyjące stale w glebie, bytujące na jej powierzchni lub mające kontakt z glebą tylko okresowo. Były to: mikroorganizmy, bezkręgowce, rośliny, ptaki i zwierzęta. Niestety w przypadku gleb zanieczyszczonych przez WWA niewystarczająca ilość wiarygodnych danych z literatury uniemożliwiła ustalenie odpowiednich wartości Eco-SSL dla większości wybranych organizmów [US EPA 2000]. W świetle powyższych informacji (zbyt mała ilość danych ekotoksykologicznych) celowe wydaje się więc prowadzenie badań pozwalających ocenić ryzyko związane z oddziaływaniem zanieczyszczeń organicznych w środowisku glebowym, zwłaszcza w stosunku do roślin i mikroorganizmów glebowych. Wyznaczone w oparciu o wyniki tych badań wskaźniki toksyczności zanieczyszczeń mogą zostać wykorzystane przy określaniu kryteriów jakości gleb (SQC – ang. *Soil Quality Criteria*) oraz przy opracowywaniu wskazówek,

zaleceń i regulacji prawnych dotyczących oceny stanu zanieczyszczenia gleb związkami chemicznymi.

Tabela III. Kryteria oceny zawartości WWA w glebach.

Kraj	Zawartość WWA (mg·kg ⁻¹)		Gleba (% SOM)*	Uwagi
	Σ WWA	BaP		
Dania (<i>propozycje</i>)	≤ 1			ochrona środowiska glebowego [Jensen i Folker-Hansen 1995]
Holandia (<i>reg. prawne</i>)	≤ 1	≤ 0,025	10	poziom naturalny
	> 40		10	konieczność podjęcia działań [VROM 1995]
Niemcy (<i>reg. prawne</i>)	≤ 0,5	≤ 0,05		zawartość naturalna ochrona obszarów rolniczych [Trenck i in. 1994]
	≤ 10	≤ 1		
Polska (<i>reg. prawne</i>)	≤ 1			zawartość naturalna dla terenów chronionych i gleb użytkowanych rolniczo [Rozp. Min. Środ. 2002]
Wielka Brytania (<i>reg. prawne</i>)	> 500			konieczność rekultywacji – ogrody, tereny rekreacyjne [Jones i in. 1996]

*) zawartość substancji organicznej w glebie (ang. *Soil Organic Matter*); BaP – benzo(a)piren.

Kryteria oceny jakości gleb mogą być ujęte w regulacje prawne [Trenck i in. 1994, VROM 1995, Jones i in. 1996, Rozp. Min. Środ. 2002]. W Tabeli III przedstawiono graniczne wartości WWA, które można znaleźć w zaleceniach lub regulacjach prawnych różnych krajów. Jednym z czynników, które w istotny sposób determinują ustalanie SQC jest sposób użytkowania ze względu na funkcje gleby. I tak np. istniejące dotychczas regulacje holenderskie dotyczące kontroli jakości gleb i wód [VROM 1995] oparte zostały na tzw. podejściu wielofunkcyjnym, które zakładało ustalenie jednej wartości granicznej zanieczyszczeń dla wszystkich gleb niezależnie od sposobu ich użytkowania. Ponieważ zasada „wielofunkcyjności” gleby jest bardzo kosztowna i trudna do realizacji w praktyce, w ostatnim czasie zaczęto uwzględniać kwestię przydatności gleby do określonego sposobu użytkowania (ang. *fitness for use*). Podobne podejście do zagadnień oceny jakości gleb (uwzględniające kategorię wykorzystania terenu) stosowane jest w takich krajach europejskich jak Niemcy [Trenck i in. 1994], Wielka Brytania [Jones i in. 1996] i Polska [Rozp. Min. Środ. 2002]. Niektóre regulacje prawne biorą pod uwagę również właściwości gleby [Trenck i in. 1994, Van de Leemkule i in. 1998, Rozp. Min. Środ. 2002], które mogą decydować

o biodostępności zanieczyszczeń. W Niemczech i Holandii uwzględniana jest struktura gleby oraz zawartość substancji organicznej [Trenck i in. 1994, Van de Leemkule i in. 1998]. Natomiast w obowiązującym w Polsce Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. [Dz. U. Nr 165, poz. 1359] w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi obok sposobu użytkowania terenu uwzględniono również głębokość warstwy i wodoprzepuszczalność gruntu (ochrona funkcji retencyjnej gleby). W przypadku gleb użytkowanych rolniczo jako warstwę powierzchniową przyjęto warstwę 0 – 30 cm, a nie jak dotychczas stosowano często w badaniach gleb, warstwę 0 – 20 cm. W grupie substancji organicznych uwzględniono m.in. wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (9 związków oraz ich sumę). Podane w Rozporządzeniu „wartości standardowe” wprowadzają arbitralnie podział gleb i ziemi na niezanieczyszczone (zawartość zanieczyszczeń < wartości standardowej) i zanieczyszczone (zawartość zanieczyszczeń > wartości standardowej). Praktyczne wskazówki ułatwiające wprowadzenie w życie w/w Rozporządzenia zawarte są w opracowanych przez IUNG wytycznych dotyczących wyznaczania obszarów, na których przekroczone są standardy jakości gleb [Stuczyński i in. 2004].

Niestety obecna redakcja Rozporządzenia zawiera niedokładności i błędy np. w grupie WWA umieszczono benzo(a)fluoranten, związek nie występujący w glebie. Ponadto nie sprecyzowano czy podana w Rozporządzeniu suma zawartości WWA odnosi się do 9 związków podanych w tabeli czy też jest sumą 13 lub 16 węglowodorów najczęściej oznaczanych w laboratoriach. Z uwagi na w/w nieścisłości prawidłowa interpretacja wyników badań dotyczących zawartości WWA w środowisku glebowym jest utrudniona.

Przeprowadzony przegląd piśmiennictwa naukowego wskazuje, że zagadnienie wpływu zanieczyszczeń organicznych (w tym WWA) na biotyczne elementy ekosystemu glebowego wymaga jeszcze wielu badań. Dotyczy to głównie zależności oddziaływania WWA od właściwości węglowodorów i właściwości badanych gleb oraz wyznaczania wskaźników toksyczności tych zanieczyszczeń.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. MATERIAŁY

3.1.1. *Materiał glebowy*

W badaniach wykorzystano materiał glebowy pobrany z poziomu orno-próchnicznego (0 – 20 cm) gleb użytkowanych rolniczo oddalonych od źródeł emisji WWA z terenu województwa lubelskiego. Wybrano 12 gleb (oznaczonych w dalszej części pracy symbolami S1 – S12) reprezentujących siedem typów najczęściej występujących na terenie Polski (gleba rdzawa – S1; gleby płowe – S4, S5, S11; gleba brunatna – S3; mada – S8; czarne ziemie – S6, S10; rędziny – S2, S7, S9; czarnoziem – S12). Gleby te charakteryzowały się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi. Uwzględniono trzy grupy granulometryczne gleb mineralnych: piaski (S1 – S5), gliny (S6 – S10) oraz pyły (S11 – S12) o zróżnicowanej zawartości węgla organicznego (C_{org}) od 0,55 % do 3,21 % i o odczynie od kwaśnego ($pH_{KCl}=4,5$) do obojętnego ($pH_{KCl}=7,0$).

Pobrany materiał glebowy przeniesiono do laboratorium, gdzie został wysuszony w temperaturze pokojowej, a następnie przesiany przez sito o średnicy oczek 2 mm.

Właściwości fizykochemiczne materiałów glebowych podano w Tabeli 1. Metody analiz materiału glebowego opisano w podrozdziale 3.3.1.

3.1.2. *Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne*

Do badań wybrano cztery węglowodory: antracen, fenantren, piren i chryzen z grupy 16 WWA zalecanych do badań przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska [ATSDR 1990]. Wybór ten podyktowany był dużym zróżnicowaniem ich właściwości fizykochemicznych (Tabela 2) oraz ich częstym występowaniem w środowisku glebowym [Mackay i in. 1992, Sabljic i in. 1995]. WWA wprowadzano do gleby w postaci roztworu w chlorku metylenu (CH_2Cl_2). Przez rozpuszczenie 5 g odpowiedniego węglowodoru w 1000 ml CH_2Cl_2 otrzymano roztwór podstawowy (C), który następnie rozcieńczano uzyskując roztwory A o stężeniu $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ i B o stężeniu $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabela 1. Charakterystyka materiału glebowego użytego do badań.

Właściwości	Materiał glebowy (symbol gleby)											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
skł. granul.	ps	pgl	pgl	pgl	pgm	gl	glp	gs	gc	gc	plg	pli
fr <0,002 mm	2	2	5	3	8	13	14	32	35	12	6	15
fr <0,02 mm	10	12	15	14	20	29	33	46	66	55	35	49
SOM ^a	0,95	1,79	1,25	1,09	1,2	2,89	2,64	2,63	3,07	4,14	1,59	5,54
C _{org} ^b	0,55	1,04	0,72	0,63	0,7	1,68	1,54	1,53	1,78	2,4	0,92	3,21
pH _{KCl}	5,2	6,9	5,5	5,4	6,4	6,6	7,0	6,9	6,8	4,5	5,8	7,0
Hh ^c	1,35	0,45	2,62	2,03	1,43	1,80	1,13	1,05	0,30	3,23	1,80	0,68
P ₂ O ₅ ^d	76,0	28,0	17,0	9,3	54,2	29,0	20,8	5,6	2,7	27,2	14,6	104,0
K ₂ O ^e	8,8	12,0	16,0	11,3	34,8	56,6	43,9	14,4	29,2	37,0	12,3	13,1
Mg ^f	1,7	6,3	2,0	5,9	8,4	16,4	17,4	5,2	4,2	16,2	9,4	15,7
N _{og} ^g	0,039	0,130	0,100	0,070	0,070	0,118	0,099	0,114	0,128	0,150	0,110	0,240
C:N	14,1	8,0	7,2	9,0	10,0	14,2	15,4	13,4	13,9	16,0	8,4	13,4
Ca ²⁺ h	2,29	27,19	2,24	1,75	6,49	9,23	10,73	31,68	44,93	9,48	4,99	24,95
Mg ²⁺ h	0,31	0,94	0,26	0,66	0,95	1,56	2,53	1,15	1,15	2,01	0,73	2,25
K ⁺ h	0,32	0,74	0,51	0,38	0,87	1,25	0,83	0,78	2,12	1,17	0,61	0,65
Na ⁺ h	0,1	0,19	0,06	0,06	0,13	0,13	0,13	0,29	0,32	0,16	0,10	0,19
WHC ⁱ	28,0	26,0	30,0	30,5	31,6	35,9	37,3	40,1	43,3	45,3	37,0	43,0

^a/ zawartość substancji organicznej (%) (ang. *Soil Organic Matter*); ^b/ zawartość węgla organicznego (%); ^c/ kwasowość hydrolityczna (cmol[+]·kg⁻¹); ^d/ zawartość fosforu przyswajalnego (mg·100g⁻¹); ^e/ zawartość potasu przyswajalnego (mg·100g⁻¹); ^f/ zawartość magnezu przyswajalnego (mg·100g⁻¹); ^g/ zawartość azotu ogólnego (%); ^h/ zawartość kationów wymiennych (cmol[+]·kg⁻¹); ⁱ/ całkowita pojemność wodna (%) (ang. *Water Holding Capacity*)

Tabela 1. Charakterystyka materiału glebowego użytego do badań c.d..

właściwości	Materiał glebowy (symbol gleby)											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
DH ^j	40,8	45,1	9,4	38,0	39,7	70,1	95,5	94,2	91,2	75,6	51,9	109,0
OD ^k	5,8	5,0	2,9	4,6	5,7	4,5	4,1	6,6	3,1	6,0	8,8	7,1
NIT ^l	0,84	1,36	0,39	0,94	0,80	5,76	2,99	4,27	4,05	1,10	0,26	3,37
WWA ^m												
Fluoren	0,041	0,041	0,041	0,041	0,021	0,041	0,021	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
Fenantren	0,024	0,034	0,028	0,046	0,015	0,048	0,075	0,043	0,026	0,021	0,144	0,034
Antracen	0,017	0,070	0,073	0,101	0,010	0,195	0,049	0,051	0,017	0,018	0,050	0,124
Fluoranten	0,041	0,057	0,041	0,043	0,045	0,042	0,039	0,038	0,050	0,042	0,039	0,042
Piren	0,020	0,044	0,020	0,023	0,048	0,022	0,036	0,015	0,035	0,021	0,016	0,021
Benzo(a)antracen	0,005	0,007	0,004	0,007	0,018	0,005	0,017	0,002	0,010	0,005	0,002	0,004
Chryzen	0,011	0,014	0,011	0,014	0,017	0,012	0,017	0,009	0,015	0,011	0,009	0,009
Benzo(b)fluoranten	0,030	0,043	0,025	0,036	0,051	0,029	0,044	0,022	0,045	0,031	0,022	0,026
Benzo(k)fluoranten	0,032	0,037	0,031	0,034	0,027	0,032	0,026	0,030	0,038	0,032	0,030	0,032
Benzo(a)piren	0,015	0,037	0,008	0,020	0,054	0,013	0,047	0,005	0,035	0,013	0,005	0,013
Indeno(1,2,3-cd)piren	0,022	0,039	0,005	0,028	0,081	0,015	0,049	0,004	0,061	0,021	0,005	0,013
Dibenzo(a,h)antracen	0,005	0,006	0,002	0,006	0,012	0,003	0,008	0,002	0,010	0,005	0,003	0,003
Benzo(ghi)perylene	0,021	0,029	0,012	0,028	0,052	0,017	0,082	0,010	0,043	0,021	0,011	0,015
Σ 13 WWA	0,285	0,458	0,303	0,427	0,452	0,477	0,460	0,274	0,427	0,283	0,377	0,377

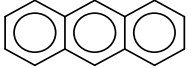
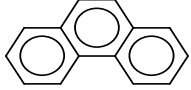
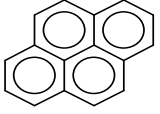
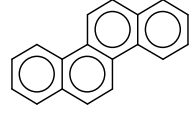
^{j/} aktywność dehydrogenaz ($\mu\text{g TPF}\cdot\text{g s.m.}^{-1}$); ^{k/} intensywność oddychania ($\mu\text{g CO}_2\cdot\text{g s.m.}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); ^{l/} potencjał nityfikacji ($\mu\text{g NO}_2\cdot\text{g s.m.}^{-1}$); ^{m/} zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

W celu otrzymania roztworów D i E rozpuszczono odpowiednio 12,5 i 25 g WWA w 1000 ml chlorku metylenu. Tak przygotowane roztwory przechowywano w ciemności w temperaturze 4 °C. Zadozowanie do próbek gleby odpowiednich ilości (2 lub 4 ml – Seria I i 6 ml – Seria II) roztworów A, B, C, D i E pozwalało na uzyskanie następujących poziomów zanieczyszczenia gleb:

- A/ 1 mg·kg⁻¹ – odpowiadający granicznej zawartości sumy 9 WWA w glebach użytkowanych rolniczo (warstwa 0 – 30 cm) wg regulacji prawnych w Polsce [Rozp. Min. Środ. DzU Nr 165 2002] i w Holandii [VROM 1995] oraz ekotoksykologicznemu kryterium zawartości WWA w glebach wg propozycji duńskiej [Jensen i Folker-Hansen 1995].
- B/ 10 mg·kg⁻¹ – odpowiadający granicznej zawartości WWA w glebach, powyżej której wzrost roślin może być nieprawidłowy wg zaleceń niemieckich [Trenck i in. 1994].
- C/ 100 mg·kg⁻¹ – odpowiadający granicznej zawartości WWA w glebach na terenach przemysłowych wg zaleceń niemieckich [Trenck i in. 1994].
- D/ 500 mg·kg⁻¹ – odpowiadający granicznej zawartości WWA dla gleb wykorzystywanych rolniczo, powyżej której istnieje konieczność ich rekultywacji – wg zaleceń angielskich [Jones i in. 1996].
- E/ 1000 mg·kg⁻¹ – odpowiadający granicznej zawartości WWA dla terenów rekreacyjnych wg zaleceń angielskich [Jones i in. 1996].

Tabela 2.

Charakterystyka wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zastosowanych w badaniach.

Właściwość	Antracen (Ant)	Fenantren (Fen)	Piren (Pir)	Chryzen (Ch)
Liczba pierścieni	3	3	4	4
Struktura				
Masa cząsteczkowa	178	178	202	228
R _w (µg·L ⁻¹) ¹	45	1300	132	2
Log K _{ow} ²	4,54	4,57	5,18	5,86
Log K _{oc} ³	4,27	4,28	4,66	5,51
TEF ⁴	0,01	0,001	0,001	0,01

1) R_w - rozpuszczalność w wodzie [Mackay i in. 1992]; 2) K_{ow} – współczynnik podziału oktanol/ woda [Mackay i in. 1992]; 3) K_{oc} – współczynnik podziału węgiel organiczny/ woda [Sabljić i in. 1995]; 4) TEF – współczynnik toksyczności WWA względem benzo(a)pirenu [Nisbet i LaGoy 1992].

Ze względu na fakt, że środowisko glebowe zasadniczo nigdy nie jest zanieczyszczone pojedynczymi węglowodorami [Wild i Jones 1995, Maliszewska-Kordybach 1999] do doświadczeń użyto również mieszaniny WWA. Zależnie od szczegółowego celu badań zastosowano mieszaninę trzech (antracen, fenantren, piren) lub czterech (antracen, fenantren, piren, chryzen) węglowodorów. Dodanie do próbek gleby po 6 ml mieszaniny 3 WWA (roztwory B, C i D) pozwoliło uzyskać następujące poziomy zanieczyszczenia: 10, 100, 300 i 500 mg·kg⁻¹ (tj. 3,3, 33, 100 i 167 mg·kg⁻¹ każdego WWA), w przypadku mieszaniny 4 WWA poziomy zanieczyszczenia były następujące: 10, 100, 400, 500 i 1000 mg·kg⁻¹ gleby (tj. 2,5, 25, 100, 125 i 250 mg·kg⁻¹ każdego związku).

3.1.3. Organizmy testowe

3.1.3.1. Rośliny

Do badań fitotoksyczności WWA wytypowano trzy rośliny: jedną z klasy jednoliściennych – pszenicę (*Triticum aestivum* L.) oraz dwie z klasy dwuliściennych – rzepak (*Brassica napus* L.) i pomidor (*Lycopersicon esculentum* Miller). Wyboru roślin dokonano ze względu na przynależność do różnych klas systematycznych zgodnie z zaleceniami normy ISO 11269 [1995]. Te same rośliny były stosowane we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach [Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000], co dawało możliwość porównania wyników.

3.1.3.2. Mikroorganizmy

Aktywność mikrobiologiczną gleb oceniano w oparciu o pomiar trzech parametrów:

- *intensywności oddychania* wyrażonej ilością wydzielonego CO₂ bez wzbogacania gleby w składniki pokarmowe (oddychanie podstawowe). Jest to pomiar niespecyficzny i odzwierciedla aktywność metaboliczną całej populacji mikroorganizmów glebowych.
- *aktywności dehydrogenaz* (aktywność ogólna), która charakteryzuje fizjologicznie aktywną biomasę mikroflory glebowej włączając w to zarówno bakterie, grzyby jak i promieniowce.

- *potencjału nityfikacji* (aktywność specyficzna), który odzwierciedla aktywność specyficznej grupy mikroorganizmów glebowych, bakterii utleniających amoniak. Mierzono pierwszy etap nityfikacji autotroficznej w glebach .
Metodyki oznaczania parametrów biologicznych opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.2. METODYKA PROWADZENIA DOŚWIADCZEŃ

Badania obejmowały dwie serie doświadczeń laboratoryjnych:

- Seria I: ocena wpływu WWA na rośliny (pkt 3.2.1.),
- Seria II: ocena wpływu WWA na mikroorganizmy glebowe (pkt 3.2.2.).

Schemat prowadzenia doświadczeń przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Schemat prowadzenia doświadczeń.

	Seria I - rośliny (n=2)	Seria II – mikroorganizmy (n=2)
czynniki	poziomy	poziomy
gleby	3 (S1, S9, S10)	9 (S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S11, S12)
WWA	4 (+ 1) (Ant, Fen, Pir, Ch, Σ 4 WWA)	4 (+ 2) (Ant, Fen, Pir, Ch, Σ 3 WWA, Σ 4 WWA)
zawartość WWA (mg·kg ⁻¹)	5 (0, 10, 100, 500, 1000)	5 (0, 1, 10, 100, 500)
rośliny	3 (pszenica, pomidor, rzepak)	_____
czas (dni)	1 (7 lub 14)	2 (7 i 15)
mierzone parametry	4 długość łodygi (Łd), długość korzenia (Kd), sucha masa części nadziemnych (SM), świeża masa części nadziemnych (SwM)	3 aktywność dehydrogenaz (DH), intensywność oddychania (OD), potencjał nityfikacji (NIT)

3.2.1. Ocena wpływu WWA na rośliny

W badaniach wpływu zanieczyszczenia gleby na rośliny uwzględniono rośliny w początkowym stadium ich rozwoju zgodnie z metodyką podaną w normie ISO 11269 [1995]. W plastikowych pojemnikach o objętości około 150 ml (górna średnica około 80 mm) umieszczano po 100 g powietrznie suchej gleby, do której dodawano antracen, fenantren, piren, chryzen w ilości 10, 100, 500 i 1000 mg·kg⁻¹ lub mieszaninę tych związków w ilości 10, 100, 500 i 1000 mg·kg⁻¹ (tj. po 2,5, 25, 125 i 250 mg·kg⁻¹ każdego związku). Węglowodory dodawano w formie roztworu w chlorku metylenu. Do próbek kontrolnych dodawano chlorek metylenu w ilości odpowiadającej każdej z zastosowanych dawek (2, 4 ml 100g⁻¹). Po 24 h od wprowadzenia WWA do gleby (czas potrzebny do odparowania rozpuszczalnika) próbki gleby dokładnie mieszano, a następnie uwilgotniano do poziomu 55 % pełnej pojemności wodnej. Po nawilżeniu gleby wysiewano nasiona wybranych roślin (10 nasion/pojemnik). Wcześniejsza ocena wykazała zdolność kiełkowania nasion roślin testowych >95 %. Testy przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych, w temperaturze pokojowej (20-22°C) przy oświetleniu naturalnym trwającym 12-16 godzin/dzień. Poziom wilgotności kontrolowano codziennie sprawdzając ciężar kilku wybranych pojemników z każdej kombinacji.

Ocenę oddziaływania WWA na rośliny oparto na pomiarach czterech parametrów:

- długości korzenia pierwotnego (Kd),
- długości łodygi (Łd),
- świeżej masy części nadziemnych (SwM),
- suchej masy części nadziemnych (SM).

Długość korzenia określano poprzez pomiar najdłuższego korzenia od jego końca do granicy hypokotyl – korzeń, pomiaru dokonano w ten sam sposób dla wszystkich badanych roślin. Długość łodygi w przypadku pszenicy odzwierciedlała długość od początku źdźbła do końca najdłuższego liścia, w przypadku pomidora i rzepaku długość łodygi do pierwszej pary liści właściwych. Pomiaru dokonano z dokładnością do 1 mm.

Świeżą masę dla wszystkich roślin określano przez zważenie nadziemnych części roślin bezpośrednio po ścięciu, następnie rośliny suszono w temperaturze 60 °C przez 24 h i wazono określając w ten sposób suchą masę części nadziemnych. Pomiaru SwM i SM dokonano z dokładnością do 0,0001 g.

Pomiarów dokonywano po 7 dniach dla rzepaku i po 14 dniach dla pszenicy i pomidora. Długość okresu wzrostu dla poszczególnych roślin ustalono na podstawie *Metodyki oceny nasion* [Dorywalski i in. 1964].

Wyniki wyrażono dla każdego powtórzenia jako średnią arytmetyczną z 6 pomiarów, po 2 rośliny najdłuższe i 2 najkrótsze odrzucano.

Cały cykl doświadczeń w tej serii obejmował 225 kombinacji (gleba/ roślina/ WWA/ poziom WWA), każda w dwóch powtórzeniach ($2 \times 225 = 450$ kombinacji).

Zastosowany w Serii I materiał glebowy pochodził z trzech gleb: S1, S9 i S10. Podstawowe właściwości tych gleb zasadniczo odpowiadały zaleceniom normy ISO 11269 [1995], niemniej zawartość węgla organicznego oraz części spławialnych w glebach S9 i S10 była nieco wyższa od górnego zakresu podanego w normie, natomiast wartość pH gleby S10 była poniżej zakresu tej normy (Tabela 1).

3.2.2. Badanie wpływu WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb

Suche próbki gleb przesiewano przez sito o średnicy oczek 2 mm, następnie 100 g próbki umieszczano w szklanych zlewkach o pojemności około 400 ml. Do tak przygotowanych próbek dodawano, starannie mieszając:

a) roztwory pojedynczych WWA (antracenu, fenantrenu, pirenu i chryzenu w chlorku metylenu) w takiej ilości, aby zawartość każdego węglowodoru w glebie odpowiadała 1, 10, 100 i 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;

b) roztwór mieszaniny 4 związków w ilości odpowiadającej 10, 100, 400 i 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby (tj. 2,5, 25, 100, 125 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ każdego związku) lub roztwór mieszaniny 3 związków w ilości 10, 100, 300 i 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tj. 3,3, 33, 100, 167 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ każdego związku).

Dla każdego poziomu WWA kontrolę stanowiły odpowiednie gleby z dodatkiem chlorku metylenu (dodawano taką ilość CH_2Cl_2 jaka była wprowadzona wraz z WWA). Próbki pozostawiano w ciemności na 24 h celem odparowania rozpuszczalnika. Po tym czasie do każdej próbki doważano po 200 g powietrznie suchej gleby (razem w każdej zlewce było 300 g), dokładnie mieszano i uwilgotniano do poziomu 55 % pełnej pojemności wodnej. Podziału próbek gleby dokonano w celu uzyskania lepszej ich homogeniczności oraz w celu obniżenia toksycznego oddziaływania chlorku metylenu. Próbki gleb inkubowano w temperaturze pokojowej (20 – 22 °C) w ciemności przez okres 15 dni. Wilgotność utrzymywano na stałym poziomie przez codzienne

sprawdzanie ciężaru zlewek i uzupełnianie zawartości wody. Badania prowadzono w warunkach (wilgotność i temperatura) uznanych za korzystne dla rozwoju mikroorganizmów glebowych [Gołębiowska 1986, Hicks i in. 1990, Paul i Clark 2000].

Oceny oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb dokonywano po czasie 0, 7 i 15 dni w oparciu o oznaczenia intensywności oddychania, aktywności dehydrogenaz i potencjału nityfikacyjnego. Czas 0 dni odpowiadał aktywności mikrobiologicznej oznaczanej bezpośrednio po uwilgotnieniu próbek gleby po 24 h od wprowadzenia węglowodorów.

Cały cykl doświadczeń w tej serii obejmował 350 kombinacji (gleba/ WWA/ poziom WWA/ czas) każda w dwóch powtórzeniach (2 x 350 = 700 kombinacji).

3.3. METODY ANALITYCZNE

3.3.1. Oznaczanie właściwości gleb

Właściwości fizyko-chemiczne gleb określono według metod powszechnie stosowanych w laboratoriach stacji chemiczno-rolniczych [Ostrowska i in. 1991]. Oznaczono następujące właściwości: skład granulometryczny, odczyn, kwasowość hydrolityczną, zawartość próchnicy, zawartość kationów wymiennych, zawartość azotu ogólnego oraz zawartość przyswajalnych dla roślin form fosforu, potasu i magnezu (Tabela 1).

3.3.2. Oznaczanie zawartości WWA w ekstraktach glebowych

W celu oznaczenia zawartości WWA materiale glebowym powietrznie suche próbki gleb (5 – 10 g) ekstrahowano chlorkiem metylenu przez okres 6 godzin w aparacie Soxhleta firmy Büchi. Zatężony prawie do sucha ekstrakt rozpuszczano w heksanie i oczyszczano w szklanych mikrokolumnkach napełnionych aktywowaną krzemionką (1 g) poprzez elucję mieszaniną CH_2Cl_2 /n-heksan w stosunku objętościowym 2:3. Uzyskany eluat odparowywano prawie do sucha i rozpuszczano w CH_2Cl_2 w objętości 1 ml. Analizy WWA dokonywano na chromatografie gazowym (GCQ MAT Finigan) z detektorem MS z pułapką jonową. Zastosowano kolumnę kapilarną DB-5ms (0.25 mm x 0,25 μm x 30 m) firmy J&W Scientific. Jakościowej

identyfikacji poszczególnych związków dokonywano przez porównywanie czasów retencji oraz spektrum masowego pików WWA na chromatogramach badanego ekstraktu z odpowiednimi pikami na chromatogramie mieszaniny wzorcowej (mieszanina 16 WWA PM-612 ULTRA Scientific). W celu analizy ilościowej zastosowano metodę wzorca wewnętrznego. Ze względu na właściwości fizykochemiczne zbliżone do badanych związków jako wzorce wewnętrzne zastosowano dwa związki z grupy WWA (perylene oraz 2, 3- benzofluoren) o zróżnicowanych czasach retencji i stosunku masy do ładunku.

Oznaczenia zawartości WWA wykonano w wyjściowym materiale glebowym na początku doświadczenia (czas 0 dni), wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono w Tabeli 1. Analizowano 13 związków z grupy 16 WWA zalecanych do badań przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska [ATSDR 1990] z wyłączeniem naftalenu, acenaftenu i acenaftylenu, węglowodorów najbardziej lotnych i rzadko występujących w glebie [Wild i Jones 1995, Maliszewska-Kordybach 1999].

3.3.2.1. Określenie zawartości WWA w fazie wodnej gleby

Biodostępność WWA dla organizmów glebowych i roślin oceniano na podstawie zawartości tych związków w fazie wodnej gleby [Boesten 1993, Jensen i Folker-Hansen 1995, Sikkema i in. 1995, Baveye i Bladon 1999, Reid in. 2000, Sijm i in. 2000, Sverdrup 2001]. Ze względu na krótki czas doświadczeń założono warunki równowagi pomiędzy zawartością WWA w fazie stałej i wodnej gleby. W celu określenia tej wartości wykorzystano równanie [Swartz i in. 1995]:

$$WWA_{fw} = WWA_g / K_{oc} * f_{oc},$$

gdzie: WWA_{fw} – stężenie WWA w fazie wodnej gleby ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),

WWA_g – zawartość WWA w glebie ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),

f_{oc} – frakcja węgla organicznego w glebie ($\text{kg}\cdot\text{kg}^{-1}$),

K_{oc} – współczynnik podziału oktanol/woda określający sorpcyjne powinowactwo WWA w stosunku do glebowej substancji organicznej ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Obliczone na podstawie powyższego równania przewidywane stężenia WWA w fazie wodnej badanych gleb podano w Załączniku A, w Tabelach A-1, A-2, A-3, A-4 i A-5.

3.3.3. Oznaczenie właściwości mikrobiologicznych gleb

3.3.3.1. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz

Aktywność dehydrogenaz w próbkach glebowych określano według metodyki opisywanej przez Casidę i in. [1964]. Po 6 g wilgotnej gleby umieszczano w probówkach, mieszano z 0,2 g CaCO₃, 1 ml TTC (chlorku 2,3,5,-tryfenylotetrazolu – jako akceptora elektronów) i 2,5 ml wody destylowanej. Probówki zamykano korkiem i inkubowano przez 24 h w temperaturze 37°C. Powstający w wyniku redukcji TTC w glebie tryfenyloformazan (TPF) ekstrahowano etanolem, a intensywność czerwonej barwy roztworu mierzono przy długości fali 485 nm wobec etanolu jako próby ślepej na spektrofotometrze typu Beckman DU-68. W każdej serii oznaczeń stosowano próbkę kontrolną nie zawierającą gleby.

Oznaczenia aktywności dehydrogenaz dla każdej próbki przeprowadzano trzykrotnie i wyniki wyrażano jako średnią arytmetyczną.

Jako wynik ostateczny podawano średnią z 6 oznaczeń (2 próbki dla każdej kombinacji doświadczenia x 3 powtórzenia).

3.3.3.2. Pomiar intensywności oddychania

Intensywność oddychania w materiale glebowym mierzono według metodyki podanej w normie ISO 16072 [2002]. Do małych zlewek odważano 25 g wilgotnej gleby i umieszczano w słoikach, do których wstawiano również naczynka zawierające 20 ml 0,05 M roztworu NaOH. Słoiki szczelnie zamykano i całość inkubowano przez 24 h w temperaturze pokojowej (20-22 °C). Wydzielony podczas inkubacji próbek CO₂ był sorbowany w roztworze NaOH, a następnie strącony (jako węglan baru) przez dodanie chlorku baru (roztwór 0,5 M). Nadmiar zasady odmiareczkowałyśmy 0,1 M HCl w obecności 3 kropli fenoloftaleiny jako wskaźnika. Do serii oznaczeń włączano próbki kontrolne nie zawierające gleby.

Oznaczenia intensywności oddychania dla każdej próbki wykonywano w trzech powtórzeniach, wyniki wyrażano jako średnią arytmetyczną.

Jako wynik ostateczny podawano średnią z 6 oznaczeń (2 próbki dla każdej kombinacji doświadczenia x 3 powtórzenia).

3.3.3.3. Oznaczanie potencjału nitryfikacji

Oznaczanie potencjału nitryfikacji przeprowadzono według metodyki ISO/DIS 15685 [2001], według której do oceny potencjalnej aktywności bakterii nitryfikujących jest wykorzystywany pierwszy etap nitryfikacji - utlenianie amoniaku. Próbkę 25 g wilgotnej gleby (55 % pełnej pojemności wodnej) umieszczano w kolbach stożkowych o pojemności 200 ml. Do każdej kolby dodawano pożywkę w takiej ilości, aby uzyskać 100 ml zawiesiny (100 minus zawartość wody w próbce). Pożywka zawierała 1,5 mM substratu - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM buforu fosforanowego (KH_2PO_4 i K_2HPO_4) oraz 5,625 mM chloranu sodu. pH pożywki wynosiło około 7,2. Próbki gleby z pożywką inkubowano wytrząsając przez 6 h w temperaturze 25 °C. W tych warunkach bakterie utleniające amoniak rozkładały siarczan amonu do azotynów, a ich dalsze utlenianie hamowano przez dodanie 0,5 M roztworu chloranu sodu. Po inkubacji pobierano po 2 ml zawiesiny gleby, do której dodawano 2 ml 4 M roztworu KCl. Tak przygotowane próbki sączono i po dodaniu sulfanilamidu i dwuchlorowodoru N-(1-Naftylo)etylenodwuaminy oznaczano zawartość azotynów według metodyki ISO/DIS 14256-1 [1999]. Intensywność purpurowej barwy roztworu mierzono przy długości fali 543 nm na spektrofotometrze typu Beckman DU-68. W każdej serii oznaczeń stosowano próbki kontrolne nie zawierające gleby.

Oznaczenia potencjału nitryfikacji dla każdej próbki wykonywano w dwóch powtórzeniach, wyniki wyrażano jako średnią arytmetyczną.

Jako wynik ostateczny podawano średnią z 4 oznaczeń (2 próbki dla każdej kombinacji doświadczenia x 2 powtórzenia).

3.4. SPOSÓB WYRAŻANIA I OCENY WYNIKÓW

3.4.1. *Wyniki*

Wyniki pomiarów dla poszczególnych obiektów wyrażono jako średnią arytmetyczną z wykonanych oznaczeń. Wszystkie bezwzględne wyniki przeprowadzonych pomiarów przedstawiono w Załączniku B (Tabele B-1, B-2 i B-3) oraz w Załączniku C (Tabele C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 i C-6). Natomiast w tekście pracy

– w celu umożliwienia porównywania danych dla różnych kombinacji doświadczeń – podawano wyniki względne wyrażone w % kontroli (kontrola = 100%).

3.4.2. Stopień hamowania i stopień stymulacji

Stopień hamowania – SH (-) i stopień stymulacji – SS (+) dla mierzonych parametrów wyznaczono w oparciu o równanie (Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003):

$$SH (SS) = (Ppr / Pk - 1) \times 100 \%$$

gdzie:

SH (SS) – stopień hamowania (stopień stymulacji),

Ppr – wartość efektu uzyskana dla próbki,

Pk – wartość efektu uzyskana dla kontroli.

3.4.3. Wskaźniki toksyczności

Toksyczność WWA w stosunku do badanych organizmów glebowych oceniano na podstawie następujących parametrów:

- EC₂₀ (20 % *Effect Concentration*) - stężenie związku toksycznego powodujące 20 % zahamowanie aktywności lub wzrostu organizmów.
- EC₅₀ (50 % *Effect Concentration*) - stężenie związku toksycznego powodujące 50 % zahamowanie aktywności lub wzrostu organizmów.
- LOEC (*Lowest Observable Effect Concentration*) - najniższe stężenie związku toksycznego, które powoduje istotną inhibicję aktywności lub wzrostu organizmów.
- NOEC (*No Observable Effect Concentration*) - najwyższe stężenie związku toksycznego, które nie powoduje istotnej inhibicji aktywności lub wzrostu organizmów.

Wyboru wskaźników toksyczności dokonano w oparciu o zalecenia normy ISO 15799 [2003]. Wskaźniki EC₂₀ i EC₅₀ wyznaczono na podstawie równań regresji liniowej i

logarytmicznej określających zależność pomiędzy ilością WWA wprowadzonych do gleby a mierzonym efektem.

3.4.4. Analiza statystyczna

Oceny wpływu badanych czynników na mierzone parametry dokonano w oparciu o 2 -czynnikową i 3 –czynnikową analizę wariancji szacując istotność różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$ (ANOVA, test LSD).

Zależności pomiędzy oddziaływaniem WWA na rośliny i aktywność mikrobiologiczną, a właściwościami gleb oraz pomiędzy mierzonymi parametrami określano na podstawie równań regresji wielokrotnej oraz wartości współczynników korelacji na poziomie istotności $\alpha \leq 0,05$ i $\alpha \leq 0,01$. Analiza regresji wielokrotnej została przeprowadzona metodą selekcji w przód.

Przy wyznaczaniu wskaźników toksyczności uwzględniano tylko te równania regresji liniowej i logarytmicznej, dla których współczynniki determinacji były istotne na poziomie $\alpha \leq 0,05$ i $\alpha \leq 0,1$.

Stosowano program komputerowy *Statgraphics Professional Plus* wersja 5,0.

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

4.1. ODDZIAŁYWANIE WWA NA ROŚLINY WE WCZESNEJ FAZIE ROZWOJU

Oceniając oddziaływanie WWA na rośliny brano pod uwagę następujące czynniki (Tabela 3):

- właściwości gleb,
- właściwości WWA,
- zawartość WWA w glebie,
- gatunek rośliny.

Bezwzględne wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w Załączniku B, w Tabelach B-1, B-2 i B-3.

Analiza wariancji (przeprowadzona dla wyników względnych – w stosunku do kontroli) wykazała, że fitotoksyczne oddziaływanie WWA, niezależnie od oznaczanego parametru (Łd, Kd, SwM i SM), zależało w sposób istotny (przy $\alpha \leq 0,05$) od wszystkich wyżej wymienionych czynników (Tabela 4).

Tabela 4.

Wyniki analizy wariancji dla całego zbioru danych (n=360); wpływ badanych czynników (właściwości gleby, właściwości WWA, zawartość WWA w glebie, gatunek rośliny) na fitotoksyczne oddziaływanie WWA.

Czynnik	Stopnie swobody	Mierzony parametr							
		Łd *		Kd*		SwM*		SM*	
		wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α
gleba	2	14,40	0,0000	8,20	0,0003	7,72	0,0005	18,56	0,0000
roślina	2	113,08	0,0000	9,73	0,0001	14,46	0,0000	0,17	0,8432
WWA	3	111,51	0,0000	2,43	0,0653	48,73	0,0000	23,94	0,0000
poziom WWA	4	64,48	0,0000	5,16	0,0005	9,94	0,0000	2,39	0,0506

*) Łd – długość łodygi, Kd – długość korzenia, SwM – świeża masa części nadziemnych, SM – sucha masa części nadziemnych, α – poziom istotności. Wszystkie analizowane parametry wyrażono w % kontroli.

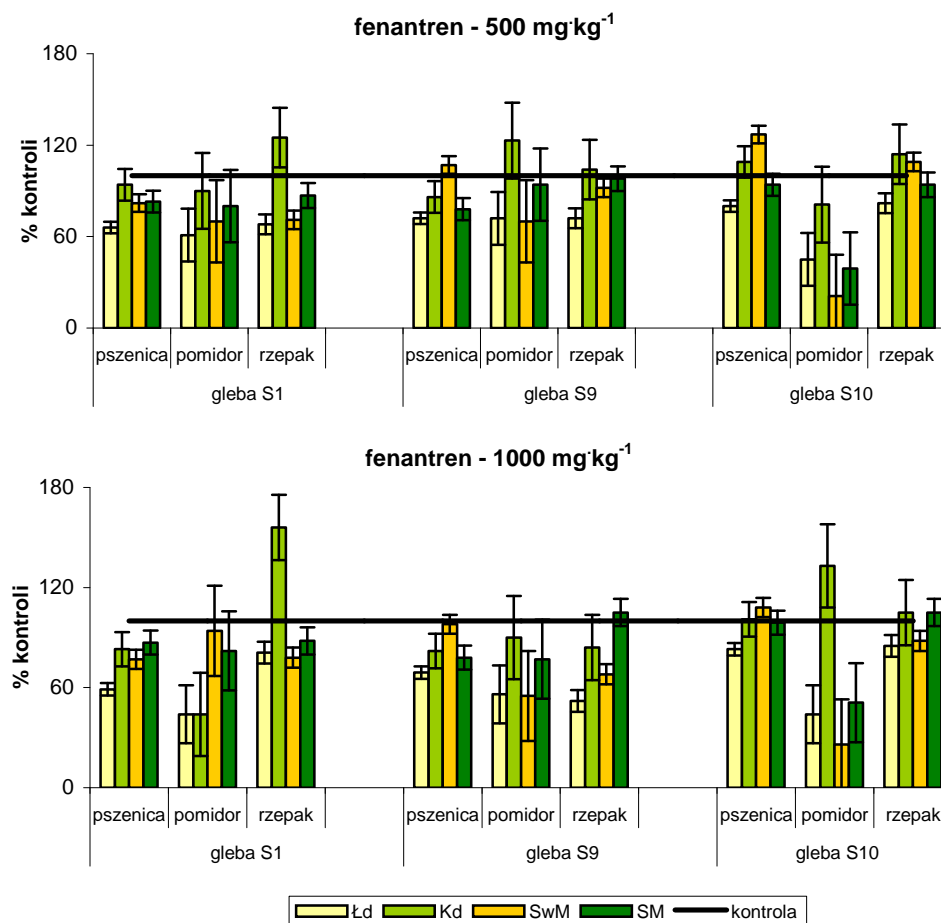
Nieistotna statystycznie była tylko zależność długości korzenia (Kd) od właściwości WWA i suchej masy części nadziemnych (SM) od gatunku rośliny. W przypadku pomiaru wartości Łd i SwM największy wpływ miał gatunek rośliny i właściwości

węglowodoru (WWA), natomiast dla pomiarów korzenia największe znaczenie miał gatunek rośliny i właściwości gleby (Tabela 4).

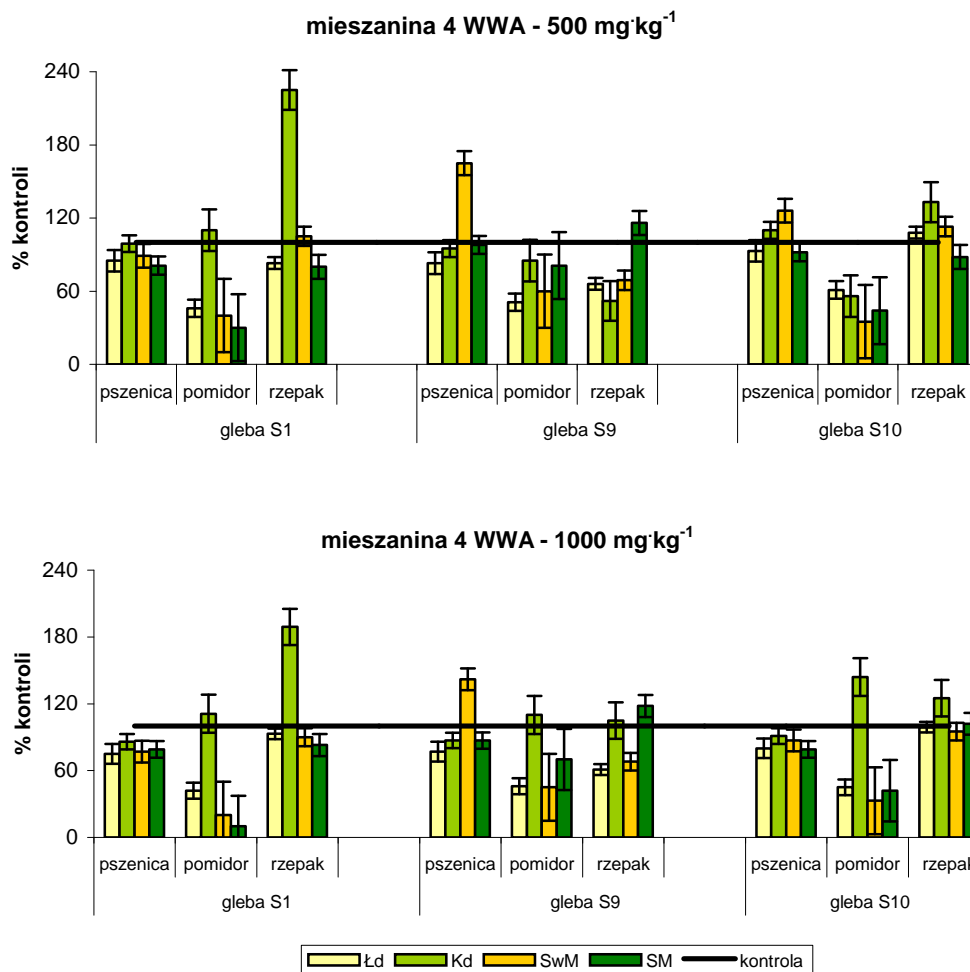
Wpływ poszczególnych czynników na reakcję roślin na zanieczyszczenie gleb przez WWA opisano w kolejnych podrozdziałach (4.1.3., 4.1.4., 4.1.5., 4.1.6.).

4.1.1. Ocena parametrów określających reakcję roślin na zanieczyszczenie gleby przez WWA

Na Rysunkach 1 i 2 porównano względne wartości czterech parametrów (Σd , Kd, SwM, SM), na podstawie których oceniano wzrost roślin przy dwóch najwyższych (500 i 1000 mg·kg⁻¹) poziomach zanieczyszczenia gleb przez WWA. Podano przykładowo wyniki tylko dla fenantrenu i mieszaniny 4 WWA, dla których obserwowano najsilniejszą reakcję roślin.



Rysunek 1. Porównanie względnych wartości parametrów opisujących reakcję roślin na zanieczyszczenie gleb przez fenantren (\pm odchylenie standardowe).



Rysunek 2.

Porównanie względnych wartości parametrów opisujących reakcję roślin na zanieczyszczenie gleb przez mieszaninę 4 WWA (\pm odchylenie standardowe).

Podobne różnice między poszczególnymi parametrami obserwowano przy innych poziomach zanieczyszczenia gleby zarówno w przypadku pojedynczych węglowodorów jak i mieszaniny 4 WWA.

Tabela 5.

Współczynniki korelacji pomiędzy parametrami opisującymi reakcję nadziemnych i podziemnych części roślin (% kontroli) na zanieczyszczenie gleb przez WWA („średnia gleba”, „średni poziom”, „średnie WWA”, n=120).

	pszenica			pomidor			rzepak		
	Kd	Łd	SwM	Kd	Łd	SwM	Kd	Łd	SwM
Łd	0,41*			0,17			0,24*		
SwM	0,07	0,24*		0,20	0,45*		0,14	0,70*	
SM	0,36*	0,59*	0,36*	0,34*	0,45*	0,88*	-0,15	0,02	0,26*

Łd – długość łodygi, Kd – długość korzenia, SwM – świeża masa części nadziemnych, SM – sucha masa części nadziemnych, * – wartości istotne na poziomie $\alpha \leq 0,05$.

Otrzymane wyniki wskazują, że ocena reakcji roślin w początkowym stadium rozwoju na obecność WWA w glebie zależy od zastosowanego kryterium: części podziemne reagują odmiennie niż części nadziemne. Stwierdzono ogólnie słabą korelację pomiędzy oznaczanymi parametrami – Tabela 5, przy czym zależności pomiędzy długością korzeni (Kd) a parametrami opisującymi reakcję nadziemnych części wszystkich roślin (Łd, SwM, SM) były przeważnie słabsze.

W większości przypadków najbardziej czułym parametrem do opisu reakcji badanych roślin na obecność WWA w glebie była długość łodygi (Rysunki 1 i 2). W niektórych kombinacjach świeża i sucha masa części nadziemnych były równie czułymi wskaźnikami jak Łd, ale charakteryzowały się większą zmiennością wyników (Tabele B-1, B-2 i B-3). Największą zmienność wyników obserwowano w przypadku pomiarów długości korzenia (Rysunek 2), gdyż korzenie roślin we wczesnej fazie rozwoju były bardzo delikatne, cienkie, często poskręcane i oklejone cząstkami gleby, co stwarzało trudności w dokonywaniu pomiarów. W związku z powyższym do oceny oddziaływania WWA na rośliny wybrano wyniki pomiaru długości części nadziemnych (Łd).

4.1.2. Ocena wpływu materiału glebowego na wzrost roślin w próbkach kontrolnych

Zgodnie z zaleceniami normy ISO 11269 w badaniach uwzględniono trzy rośliny: pszenicę, pomidor i rzepak. Są to rośliny o wysokich wymaganiach glebowych, dające najlepsze plony na glebach żyznych o średniej zwięzłości, dużej zasobności w substancję organiczną, o odczynie słabo kwaśnym lub zasadowym (optymalne pH dla pszenicy i rzepaku wynosi 6,5 – 7,4, dla pomidora 5 – 7) – [Wilczek 1993]. Materiał glebowy wybrany do badań pochodził z trzech gleb o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych (Tabela 1): S1 – gleba płowa o składzie granulometrycznym piasku słabo gliniastego oraz dwie gleby wytworzone z gliny ciężkiej S9 – rędzina i S10 – czarna ziemia. Gleby te nie w pełni odpowiadały optymalnym warunkom dla zastosowanych roślin (C_{org} 0,55 – 2,4; pH 4,5 – 6,8), ale, jak widać z danych podanych w Tabelach B-1, B-2 i B-3, zróżnicowanie właściwości gleb kontrolnych (bez WWA, ale z dodatkiem chlorku metylenu) miało niewielki wpływ na wzrost roślin w badanym okresie. Dla pszenicy wartość Łd wahała się od 22,1±2,1cm do 25,1±0,1 cm, dla pomidora od 5,3±0,1 cm do 6,4±0,1 cm i dla rzepaku

od $6,9 \pm 0,5$ cm do $7,9 \pm 0,3$ cm. W przypadku dwóch ostatnich roślin nieco wyższy wzrost odpowiadał glebie S10 o składzie granulometrycznym gliny ciężkiej i dość niskim odczynie ($pH = 4,5$), ale o wyższej zawartości substancji organicznej ($SOM = 4,14\%$) i stosunkowo wysokiej zawartości makroelementów (Tabela 1).

4.1.3. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od właściwości gleb

Przeprowadzona analiza wariancji (Tabela 4) wykazała, że właściwości gleby w sposób istotny wpływały na fitotoksyczne oddziaływanie WWA, jednak ich wpływ był słabszy, niż w przypadku pozostałych czynników (gatunek rośliny, właściwości WWA i zawartość WWA w glebie).

Wpływ zanieczyszczenia badanych gleb przez antracen, fenantren, piren i chryzen na poziomach 500 i $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na wzrost (Σd) badanych roślin przedstawiono na Rysunkach 3a i 3b. Na Rysunku 4 porównano natomiast względną długość łodygi roślin uprawianych na glebach zanieczyszczonych przez mieszaninę 4 węglowodorów na poziomie 500 i $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

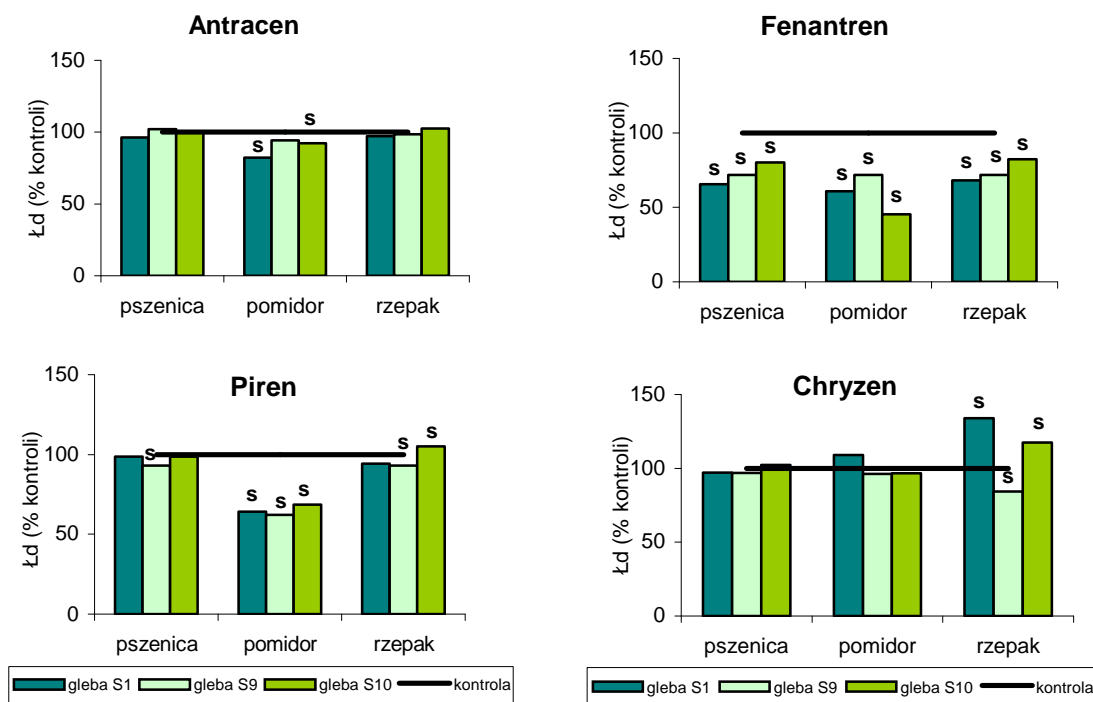
Tabela 6.

Statystyczna ocena zależności fitotoksycznego oddziaływania WWA od właściwości gleb (zakres stężeń WWA $0 - 1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Gleba	Właściwości gleby		Łd (% kontroli)*				
			pomidor ($n=30$)				
	<i>pH</i>	<i>SOM</i>	Ant	Fen	Pir	Ch	$\Sigma 4 \text{ WWA}$
S1	5,2	0,95	87,2 ^a	66,3 ^a	77,8 ^a	100,9 ^a	68,8 ^a
S10	4,5	4,14	90,9 ^a	70,3 ^a	79,6 ^a	102,9 ^a	76,3 ^b
S9	6,8	3,07	97,7 ^b	83,5 ^b	79,2 ^a	97,1 ^b	75,1 ^b
<i>pszenica (n=30)</i>							
S1	5,2	0,95	100,0 ^a	83,2 ^a	98,5 ^a	99,4 ^{ab}	91,4 ^a
S10	4,5	4,14	101,0 ^a	92,2 ^b	99,2 ^a	101,0 ^a	92,1 ^a
S9	6,8	3,07	100,5 ^a	85,3 ^a	97,7 ^a	97,6 ^b	90,8 ^a
<i>rzepak (n=30)</i>							
S1	5,2	0,95	104,9 ^a	86,1 ^a	107,7 ^a	122,2 ^a	98,8 ^a
S10	4,5	4,14	104,2 ^a	99,1 ^b	106,0 ^a	116,9 ^a	105,3 ^b
S9	6,8	3,07	96,6 ^b	83,0 ^a	89,8 ^b	92,7 ^b	83,0 ^c

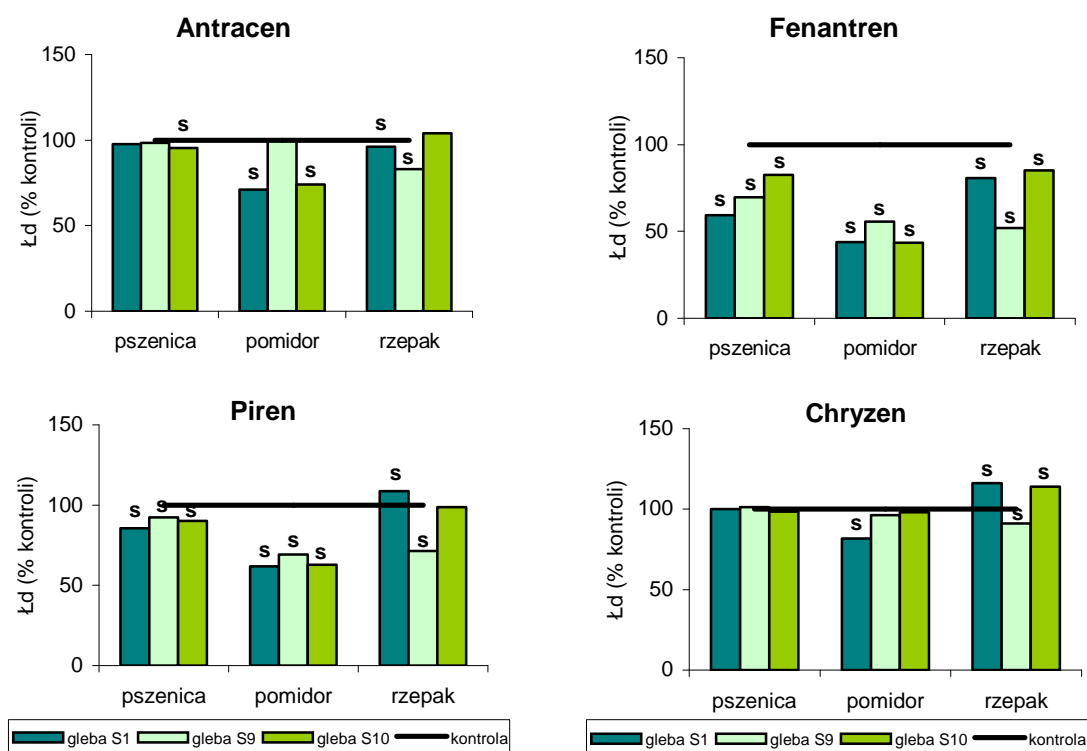
Wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha \leq 0,05$.

*) wartości średnie dla poziomów zanieczyszczenia $0, 10, 100, 500$ i $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.



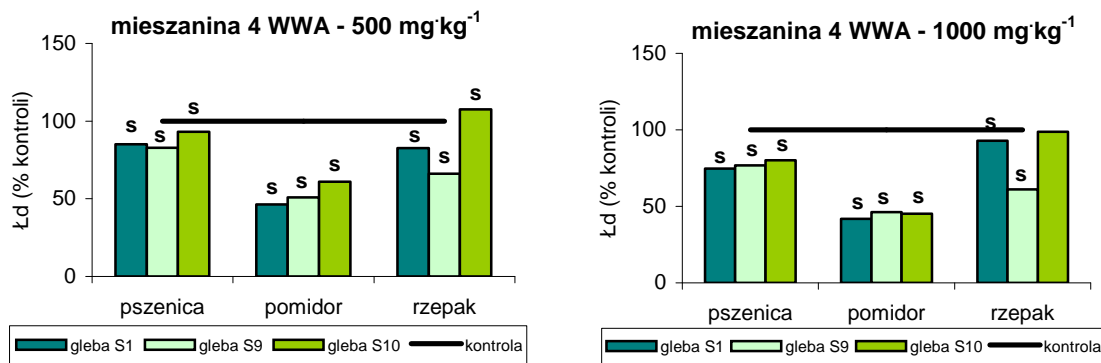
Rysunek 3a.

Wpływ zanieczyszczenia gleb przez WWA na poziomie $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na długość łodygi (Łd) pszenicy, pomidora i rzepaku (kontrola=100%; s – wartości statystycznie istotnie różne od kontroli przy $\alpha \leq 0,05$).



Rysunek 3b.

Wpływ zanieczyszczenia gleb przez WWA na poziomie $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na długość łodygi (Łd) pszenicy, pomidora i rzepaku (kontrola=100%; s – wartości statystycznie istotnie różne od kontroli przy $\alpha \leq 0,05$).



Rysunek 4.

Wpływ zanieczyszczenia gleb przez mieszaninę 4 WWA (poziom 500 i 1000 mg·kg⁻¹) na długość łodygi badanych roślin (kontrola=100%; s – wartości statystycznie istotnie różne od kontroli przy $\alpha \leq 0,05$).

Analizując wpływ właściwości gleby na fitotoksyczne oddziaływanie WWA w całym zakresie zastosowanych stężeń (Tabela 6) stwierdzono, że w większości przypadków reakcja roślin na obecność WWA była zbliżona w kwaśnych glebach S1 i S10, pomimo znacznego zróżnicowania w nich zawartości SOM (odpowiednio 0,95 i 4,14 %). Wyniki istotnie różniące się statystycznie (słabszy efekt toksyczny) uzyskano natomiast w glebie S9, która, chociaż podobnie jak gleba S10 była stosunkowo bogata w substancję organiczną (SOM=3,07%), charakteryzowała się obojętnym odczynem (pH 6,8) i wyższą aktywnością biologiczną (NIT=4,05 $\mu\text{g NO}_2^- \cdot \text{g s.m.}^{-1}$ w stosunku do wartości 0,84 i 1,10 $\mu\text{g NO}_2^- \cdot \text{g s.m.}^{-1}$ dla gleb S1 i S10) – Tabela 1.

4.1.4. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od gatunku rośliny

Do badań wybrano trzy rośliny uwzględnione w normie ISO 11269, dwie z klasy dwuliściennych: pomidor (*Lycopersicon esculentum* Miller) i rzepak jary (*Brassica napus* L.) oraz jedną z klasy jednoliściennych: pszenicę jarą (*Triticum aestivum* L.).

Jak wynika z danych przedstawionych na Rysunkach 3a, 3b i 4 oraz w Tabeli 7, w większości przypadków rośliną, która najsilniej reagowała na zanieczyszczenie gleby przez WWA był pomidor. Stopień hamowania wzrostu tej rośliny w glebach zanieczyszczonych mieszaniną 4 WWA przy zawartości 500 mg·kg⁻¹ był w granicach od -39 % do -54 %, a przy zawartości 1000 mg·kg⁻¹ od -54 % do -58 %) – Tabela 7. Poza mieszaniną 4 WWA najsilniejsze efekty toksyczne odnotowano w kombinacjach z

fenantrenem; przy najwyższym zastosowanym stężeniu (1000 mg·kg⁻¹) w granicach od -44 % do -56 % (Tabela 7). Rośliną najbardziej odporną na fitotoksyczne działanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych okazał się rzepak. Hamowanie wzrostu tej rośliny dla wszystkich badanych WWA obserwowano tylko w glebie S9, przy poziomie 1000 mg·kg⁻¹ w granicach od -9 % do -48 %. Natomiast w glebach S1 i S10 obserwowano zarówno efekty hamowania (głównie gleby zanieczyszczone fenantrenem) jak i stymulacji. Najsilniejsze efekty stymulacji wzrostu rzepaku (w granicach od +14 do +34 %) były widoczne w glebach zanieczyszczonych chryzenem – Tabela 7.

Tabela 7.

Stopień hamowania (-) i stopień stymulacji (+) wzrostu roślin (Łd) przy zanieczyszczeniu gleb antracenenem, fenantrenem, pirenem, chryzenem oraz mieszaniną tych węglowodorów na poziomie 500 i 1000 mg·kg⁻¹.

WWA	gleba S1			gleba S9			gleba S10			śr***
	pszenica	pomidor	rzepak	pszenica	pomidor	rzepak	pszenica	pomidor	rzepak	
<i>poziom - 500 mg·kg⁻¹</i>										
Ant	- 4	- 18	- 3	+ 2	- 6	- 1	0	- 8	+ 3	- 4
Fen	- 34	- 39	- 32	- 28	- 28	- 28	- 20	- 55	- 18	- 31
Pir	- 1	- 36	- 6	- 7	- 38	- 7	- 1	- 31	+ 5	- 14
Ch	- 3	+ 9	+ 34	- 3	- 4	- 16	+ 2	- 3	+ 18	+ 4
4WWA*	-15	-54	-17	-17	-49	-34	-7	-39	+ 8	- 25
suma efektów**	- 42	- 84	- 7	- 36	- 76	- 52	- 19	- 97	+ 8	- 45
<i>poziom - 1000 mg·kg⁻¹</i>										
Ant	- 2	- 29	- 4	- 2	0	- 17	- 5	- 26	+ 4	- 9
Fen	- 41	- 56	- 19	- 31	- 44	- 48	- 17	- 56	- 15	- 36
Pir	- 14	- 38	+ 9	- 8	- 31	- 29	- 10	- 37	- 1	- 18
Ch	0	- 18	+ 16	+ 1	- 4	- 9	- 2	- 2	+ 14	- 0,5
4WWA*	-25	-58	-7	-23	-54	-39	-20	-55	-1	- 31
suma efektów**	- 57	- 141	+ 2	- 40	- 79	- 103	- 35	- 121	+ 2	- 64

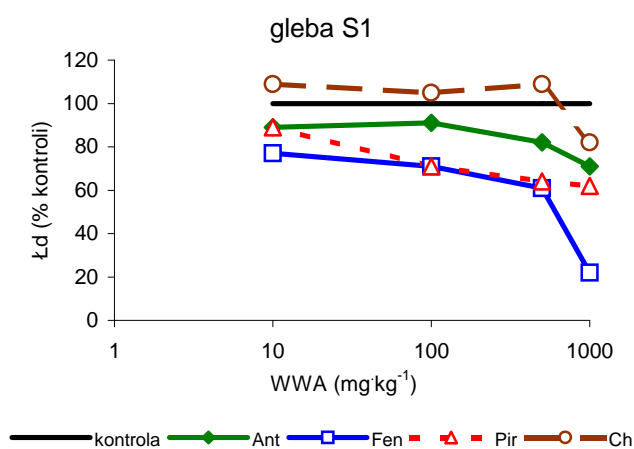
(-) % hamowania; (+) % stymulacji; *) efekty dla mieszaniny 4 węglowodorów (odpowiednio na poziomie 500 i 1000 mg·kg⁻¹); **) suma efektów dla pojedynczych WWA (antracenen+fenantren+piren+chryzen) - odpowiednio na poziomie 500 i 1000 mg·kg⁻¹; ***) średnia arytmetyczna (n=9).

4.1.5. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od właściwości badanych związków

W celu oceny zależności fitotoksycznego oddziaływania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych od właściwości tych związków w badaniach zastosowano cztery pojedyncze WWA różniące się zarówno właściwościami fizycznymi, chemicznymi jak i biologicznymi (Tabela 2).

Wyniki analizy wariancji (Tabela 4) wskazują, że spośród badanych czynników właściwości WWA w największym stopniu warunkowały oddziaływanie tych związków na rośliny we wczesnej fazie wzrostu. Na Rysunku 5 podano przykład tych zależności w przypadku najbardziej czułej z badanych roślin – pomidora, natomiast w Tabeli 7 określono – stopień hamowania lub stopień stymulacji dla wszystkich badanych roślin przy poziomie indywidualnych WWA oraz ich mieszaniny 500 i 1000 mg·kg⁻¹.

Najsilniejszym oddziaływaniem fitotoksycznym charakteryzowały się fenantren i piren – związki o stosunkowo dobrej rozpuszczalności w wodzie (Fen – 1300 µg·L⁻¹, Pir – 132 µg·L⁻¹ – Tabela 2). Obecność w badanych glebach fenantrenu powodowała zahamowanie wzrostu roślin w granicach od –18 % do –55 % przy poziomie 500 mg·kg⁻¹ i w granicach –15 % do –56 % przy poziomie 1000 mg·kg⁻¹ (średnio odpowiednio –31 % i –36 %) w stosunku do kontroli (Tabela 7). Wpływ pirenu był nieco słabszy, jednak i tu obserwowano w niektórych przypadkach stopień hamowania Łd rzędu –38 % (średnio dla najwyższych poziomów –14 % i –18 %) (Tabela 7).



Rysunek 5. Wpływ antracenu, fenantrenu, pirenu i chryzenu na wzrost pomidora uprawianego na glebie S1.

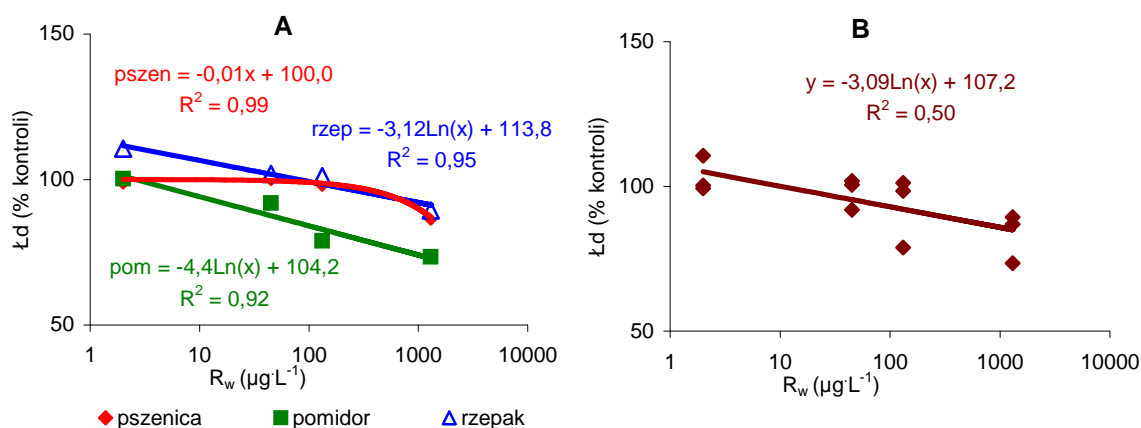
Natomiast antracen i chryzen charakteryzujące się niską rozpuszczalnością w wodzie nie powodowały już tak silnych efektów toksycznych. Zanieczyszczenie gleb chryzenem w niektórych przypadkach (rzepak na glebie S1 i S10) dawało efekt stymulacji wzrostu roślin nawet o 34 % (średnio o 2%) w porównaniu z próbkami kontrolnymi (Tabela 7). W celu określenia, które z podstawowych właściwości WWA charakteryzujących pośrednio ich biodostępność w glebie [Swartz i in. 1995, Reid i in. 2000] wpływają na ich fitotoksyczne oddziaływanie wyznaczono odpowiednie współczynniki korelacji (r). Uwzględniono wartości współczynnika podziału oktanol/woda ($\log K_{ow}$) oraz rozpuszczalność WWA w wodzie (R_w). Otrzymane zależności podano w Tabeli 8.

Tabela 8.

Zależność pomiędzy reakcją badanych roślin (Łd w % kontroli) na zanieczyszczenie gleb przez WWA a właściwościami tych związków („średnia gleba”, „średni poziom”, $n=120$).

właściwości WWA	Współczynniki korelacji		
	pszenica	pomidor	rzepak
$\log K_{ow}$	0,24*	0,34*	0,37*
R_w	-0,56*	-0,43*	-0,42*

R_w – rozpuszczalność w wodzie ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); K_{ow} – współczynnik podziału oktanol/woda;
* – istotne na poziomie $\alpha \leq 0,01$.



Rysunek 6.

Zależność średniej wartości Łd badanych roślin („średnia gleba”, „średni poziom WWA”, $n=90$) od rozpuszczalności WWA w wodzie (R_w); A – dla poszczególnych roślin, B – dla całego zbioru danych.

Najwyższe wartości ujemnych współczynników korelacji (r od $-0,42$ do $-0,56$) uzyskano dla zależności długości łodygi od rozpuszczalności węglowodorów w wodzie

(R_w) – Tabela 8. Do opisu tej zależności najodpowiedniejsze były równania typu: $y = ax + b$ lub $y = a \ln(x) + b$, które zmiany długości łodygi w zależności od rozpuszczalności WWA określały w 92 – 99 % (Rysunek 6). Zależność efektu fitotoksycznego WWA od wartości ich $\log K_{ow}$ była dużo słabsza – Tabela 8.

4.1.6. Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od zawartości tych związków w glebie – zawartości całkowitej i w fazie wodnej

Poziom zanieczyszczenia gleby przez WWA był kolejnym czynnikiem różnicującym reakcję roślin na obecność tych związków w glebie, przykłady tych zależności dla wszystkich badanych roślin uprawianych na glebach zanieczyszczonych fenantrenem i pirenem pokazano na Rysunku 7.

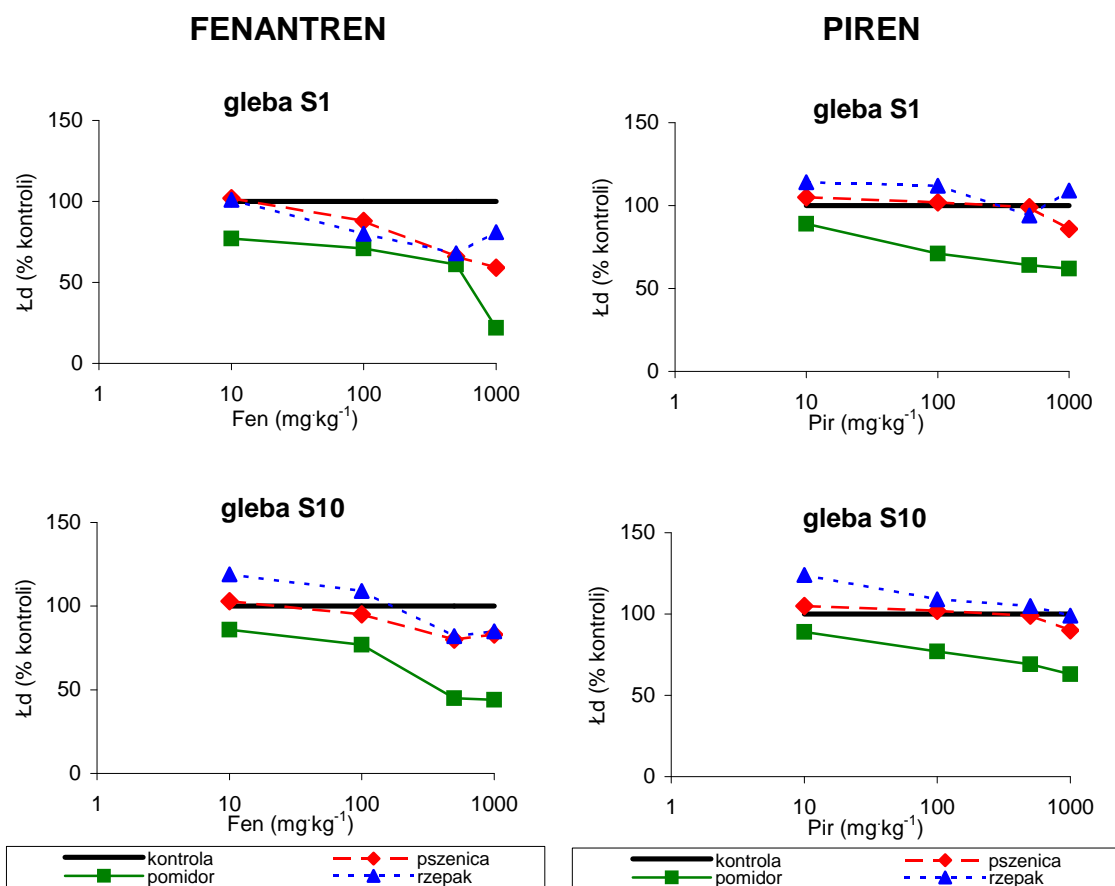
Wyniki analizy wariancji (Tabela 9) przeprowadzonej dla całego zbioru danych (wszystkie gleby, wszystkie rośliny) wskazują, że pierwsze efekty inhibicji wzrostu roślin obserwowano przy zawartości w glebie WWA $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (dla fenantrenu, pirenu i mieszaniny 4 WWA) lub dopiero przy $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (dla antracenu). W przypadku chryzenu efektu hamowania nie zaobserwowano. Zwiększenie zawartości WWA do $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ powodowało dalsze istotne zahamowanie wzrostu łodygi roślin tylko w przypadku zanieczyszczenia gleby fenantrenem, pirenem i mieszaniną 4 WWA (Rysunki 3b i 4, Tabela 9).

Tabela 9.
Zależność fitotoksycznego oddziaływania WWA od poziomu zanieczyszczenia gleby („średnia gleba”, „średnia roślina”, $n=90$).

Łd (% kontroli)					
poziom ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Ant	Fen	Pir	Ch	Σ 4 WWA
0	100 ^{ab}	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
10	100,6 ^a	98,9 ^a	102,2 ^a	106,4 ^b	99,8 ^a
100	100,3 ^{ab}	87,4 ^b	92,8 ^b	103,8 ^{ab}	90,7 ^b
500	96,2 ^{bc}	68,7 ^c	86,9 ^c	104,8 ^{ab}	75,2 ^c
1000	93,5 ^c	61,0 ^d	82,2 ^d	102,1 ^{ab}	68,6 ^d

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha \leq 0,05$.

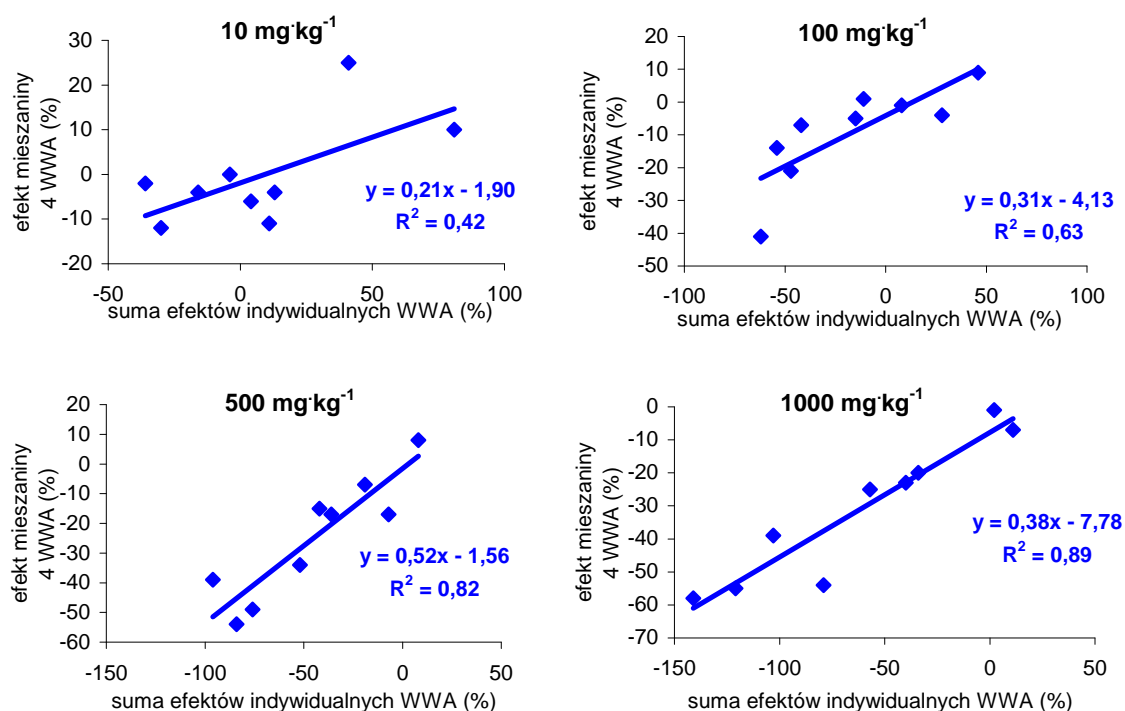
Przy niższych zawartościach WWA w glebie ($\leq 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) w niektórych przypadkach obserwowano efekt stymulacji wzrostu roślin szczególnie widoczny dla pszenicy i rzepaku (Rysunek 7). W glebach zanieczyszczonych chryzenem stymulacja wzrostu rzepaku utrzymywała się nawet przy zawartości $500 \text{ i } 1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ – Tabela 7.



Rysunek 7.

Zależność pomiędzy długością łodygi (Łd) badanych roślin a zawartością fenantrenu i pirenu w glebie S1 i S10 (kontrola=100 %).

W celu porównania efektów fitotoksycznych spowodowanych przez dodanie do gleb mieszaniny czterech WWA oraz odpowiednich indywidualnych węglowodorów wyznaczono sumę efektów zaobserwowanych dla tych związków – Tabela 7. Z przedstawionych danych (Tabela 7, Rysunek 8) wynika, iż pomiędzy fitotoksycznością mieszaniny 4 WWA a sumą efektów toksycznych wszystkich indywidualnych węglowodorów istnieje wyraźna statystycznie istotna zależność. Zależność tę najlepiej opisywał model regresji liniowej, który zmienność uzyskanych wyników przy najwyższym zastosowanym poziomie zanieczyszczenia gleb ($1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) tłumaczył w 89 %, natomiast przy poziomie $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ w 42 % (Rysunek 8). Efekt mieszaniny WWA wyniósł 21 – 52 % sumy efektów odpowiednich węglowodorów.

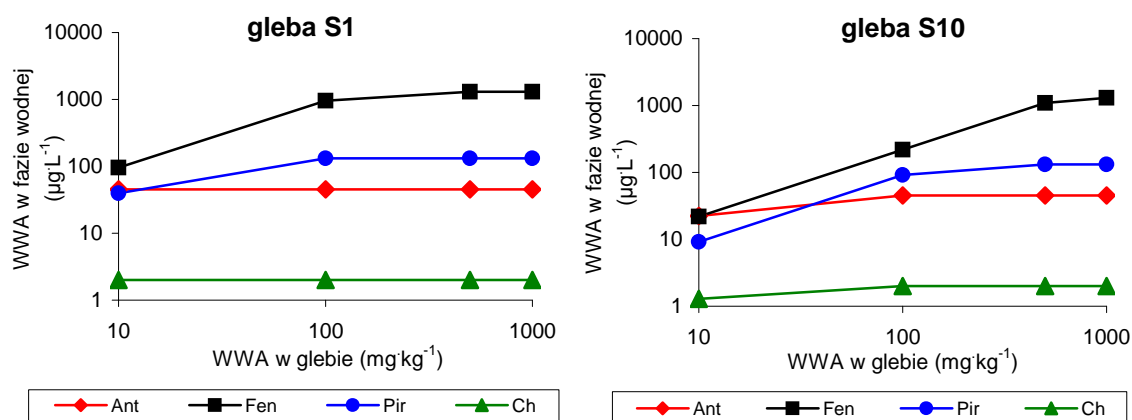


Rysunek 8.

Zależność pomiędzy sumą efektów fitotoksycznych indywidualnych WWA (antracenu, fenantrenu, pirenu, chryzenu) a fitotoksycznością mieszaniny tych związków.

Oddziaływanie WWA zależy nie tylko od ogólnej zawartości tych związków w glebie, ale uwarunkowane jest przede wszystkim ich biodostępnością. Zawartość WWA w fazie wodnej badanych gleb, odpowiadająca wg niektórych autorów [Swartz i in. 1995, Reid i in. 2000, Sijm i in. 2000, Semple i in. 2003] biodostępnej frakcji tych związków, obliczono według równania [Swartz i in. 1995]: $WWA_{fw} = WWA_g / K_{oc} * f_{oc}$ opisanego w podrozdziale 3.3.2.1.. W obliczeniach brano pod uwagę ilości węglowodorów wprowadzone do gleby na początku doświadczenia (Załącznik A, Tabele A-1 i A-2). Z przedstawionych danych (Tabele A-1 i A-2, Rysunek 9) wynika, że chociaż przy każdym poziomie WWA były dodawane do wszystkich trzech gleb w jednakowych ilościach, jednak ich zawartość w fazie wodnej (biodostępność) była bardzo zróżnicowana (Rysunek 9, Tabele A-1 i A-2). Przy dawce $WWA \geq 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ przewidywane stężenia antracenu i chryzenu w fazie wodnej wszystkich badanych gleb były wyższe niż granica rozpuszczalności tych związków w wodzie (Tabela A-1). W glebie S1 (o niskiej zawartości C_{org}) wyznaczone stężenia przewyższyły rozpuszczalność antracenu ($45 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) i chryzenu ($2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) nawet przy poziomie $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Natomiast zawartość fenantrenu i pirenu w fazie wodnej badanych gleb

wzrastała do poziomu $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ lub $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ osiągając dopiero wówczas granicę rozpuszczalności – Rysunek 9.



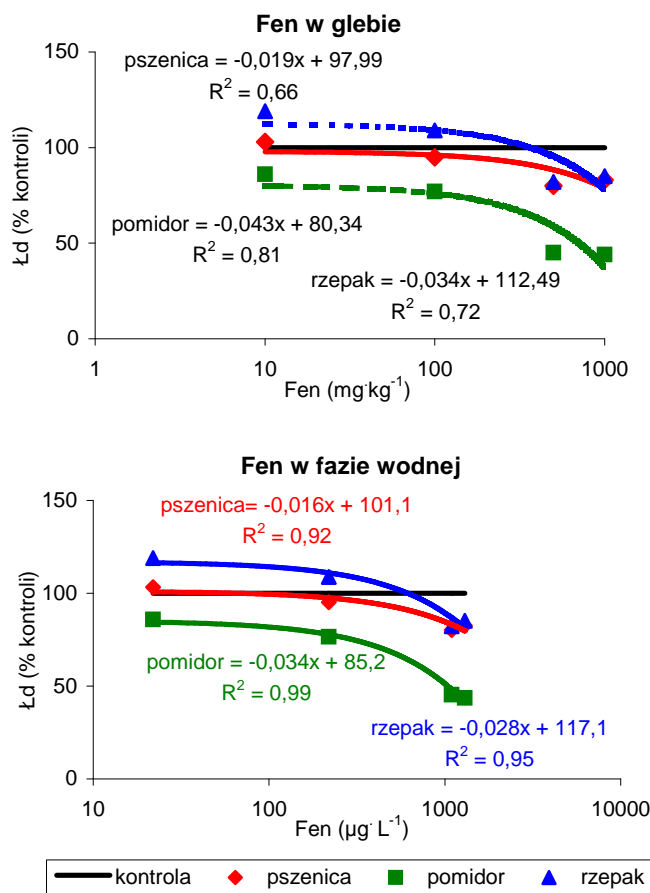
Rysunek 9.

Zależność pomiędzy zawartością antracenu, fenantrenu, pirenu i chryzenu w glebach S1 i S10 a zawartością tych węglowodorów w fazie wodnej.

4.1.7. Wyznaczenie parametrów toksyczności WWA w stosunku do roślin

Na podstawie zależności pomiędzy zawartością wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie i w fazie wodnej a zmianami długości części nadziemnych ($\text{\textcircled{L}}$) wyznaczono dawki WWA powodujące 50 lub 20-procentowe zahamowanie wzrostu roślin – odpowiednio EC_{50} i EC_{20} . Wartość EC_{50} jest powszechnie stosowana w toksykologii [ISO 15799: 2003] i określa negatywny efekt w stosunku do 50 % badanej populacji. Natomiast wartość EC_{20} wybrano ze względu na fakt, że w większości testów fitotoksyczności odchylenie standardowe dla wyników mieści się w granicach $\pm 20\%$, tak więc wartość EC_{20} opisuje wartości progowe dla pierwszych zanotowanych efektów negatywnych. Podobną dokładność (wartość SD) uzyskano też w badaniach prezentowanych w pracy (Rysunki 1 i 2, Tabele B-1, B-2, B-3). Do opisu tych zależności wykorzystano odpowiednie równania regresji liniowej (istotne statystycznie na poziomie $\alpha \leq 0,05$). Przykłady równań podano na Rysunku 10, a wyznaczone współczynniki toksyczności zamieszczono w Tabelach 10 i 11.

Zależność pomiędzy reakcją roślin a zawartością fenantrenu lepiej opisywały równania regresji liniowej uwzględniające zawartość tego węglowodoru w fazie wodnej (wyższe wartości współczynników determinacji R^2 od 0,92 do 0,99) – Rysunek 10.



Rysunek 10.

Równania regresji liniowej opisujące zależność pomiędzy reakcją badanych roślin na obecność fenantrenu a zawartością tego węglowodoru w glebie i w fazie wodnej (na przykładzie gleby S10; kontrola=100 %).

W celu określenia LOEC (najniższego zastosowanego stężenia WWA powodującego istotną inhibicję wzrostu roślin) oraz NOEC (najwyższego stężenia, przy którym nie obserwujemy istotnych zmian wzrostu) zastosowano analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

Wartości EC_{50} przekraczały z reguły najwyższy zastosowany poziom zanieczyszczenia gleb ($1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), tylko w przypadku pomidora uprawianego na glebach z dodatkiem fenantrenu i mieszanki 4 WWA dawki węglowodorów powodujące 50 % inhibicję wzrostu mieściły się w badanym zakresie (Fen: 551 – $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Σ 4 WWA: 655 – $850 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Tabela 10. W fazie wodnej odpowiednie wartości $\text{Łd-}EC_{50}$ dla tej rośliny w kombinacji z fenantrenem wynosiły $1030 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i z mieszaniną 4 WWA $642 - 1177 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabela 11).

Na 45 badanych kombinacji (gleba/roślina/WWA) wartości $\text{Łd-}EC_{20}$ statystycznie istotne na poziomie $\alpha \leq 0,05$ udało się wyznaczyć, zarówno w glebie jak i w fazie

wodnej, tylko w 64 % przypadków, przy czym jedynie 40 % wyznaczonych wartości mieściło się w zakresie stosowanych stężeń (Tabela 10) lub nie przekraczało granicy rozpuszczalności WWA w wodzie (Tabela 11).

Tabela 10.

Wskaźniki fitotoksyczności WWA (wyliczone na podstawie pomiaru długości łodygi) w zakresie 10 – 1000 mg·kg⁻¹ gleby

WWA	pszenica			pomidor			rzepak		
	S1	S9	S10	S1	S9	S10	S1	S9	S10
EC₂₀ (mg·kg⁻¹)									
Ant	-	-	>1000	567	-	833	-	>1000	-
Fen	370	473	947	101	387	135	-	369	956
Pir	>1000	>1000	>1000	229	43	157	-	729	>1000
Ch	-	-	-	>1000	-	-	-	-	-
4WWA	768	777	>1000	114	149	183	-	363	>1000
EC₅₀ (mg·kg⁻¹)									
Ant	-	-	>1000	>1000	-	>1000	-	>1000	-
Fen	>1000	>1000	>1000	551	1000	706	-	>1000	>1000
Pir	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	-	>1000	>1000
Ch	-	-	-	>1000	-	-	-	-	-
4WWA	>1000	>1000	>1000	655	774	850	-	>1000	>1000
LOEC (mg·kg⁻¹)									
Ant	-	-	1000	10	-	10	-	1000	-
Fen	100	10	500	10	100	10	100	100	500
Pir	1000	1000	1000	10	10	10	-	100	1000
Ch	-	100	-	1000	-	-	-	100	-
4WWA	500	100	1000	100	100	10	500	100	1000
NOEC (mg·kg⁻¹)									
Ant	-	-	500	<10	-	<10	-	500	-
Fen	10	<10	100	<10	10	<10	10	10	100
Pir	500	500	500	<10	<10	<10	-	10	500
Ch	-	10	-	500	-	-	-	10	-
4WWA	100	10	500	10	10	<10	100	10	500

- nie zaobserwowano statystycznie istotnej regresji na poziomie $\alpha \leq 0,05$;

EC_x wyznaczone z równań regresji liniowej;

LOEC i NOEC –określone w oparciu o analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

Uzyskane wartości wskaźników toksyczności były zróżnicowane w zależności od gatunku rośliny oraz rodzaju badanego związku. Najwyższą wrażliwość na obecność WWA wykazywał pomidor (niskie wartości parametrów ekotoksyczności – Tabela 10); wartości Łd-EC₂₀ wyznaczone dla tej rośliny wynosiły na glebach zanieczyszczonych fenantrenem: 101 – 387 mg·kg⁻¹, pirenem: 43 – 229 mg·kg⁻¹ i mieszaniną 4 WWA: 114 – 183 mg·kg⁻¹. Najniższą toksyczność odnotowano w glebach z dodatkiem antracenu i chryzenu, gdzie wartości wskaźnika EC₂₀ były w granicach od 567 mg·kg⁻¹ do 833

mg·kg⁻¹ dla antracenu, a dla chryzenu przekraczały 1000 mg·kg⁻¹. W fazie wodnej wartości Łd-EC₂₀ można było wyznaczyć dla pomidora uprawianego tylko na glebach z dodatkiem fenantrenu: 63 – 689 µg·L⁻¹, pirenu: 61 – 76 µg·L⁻¹ i mieszaniny 4 WWA: 165 – 293 µg·L⁻¹ (Tabela 11).

Tabela 11.

Wskaźniki fitotoksyczności WWA (wyliczone na podstawie pomiaru długości łodygi) z uwzględnieniem zawartości tych związków w fazie wodnej gleby.

WWA	pszenica			pomidor			rzepak		
	S1	S9	S10	S1	S9	S10	S1	S9	S10
EC₂₀ (µg·L⁻¹)									
Ant	-	-	-	-	-	-	-	45*	-
Fen	888	810	1242	63	689	153	888	702	1300*
Pir	-	132*	132*	76	72	61	-	-	132*
Ch	-	-	-	-	-	-	-	1,7	2*
4WWA	1413	730	726*	239	195	165	1479*	375	726*
EC₅₀ (µg·L⁻¹)									
Ant	-	-	-	-	-	-	-	45*	-
Fen	1300*	1300*	1300*	1300*	1300*	1036	1300*	1300*	1300*
Pir	-	132*	132*	132*	132*	132*	-	-	132*
Ch	-	-	-	-	-	-	-	2*	2*
4WWA	1479*	916*	726*	1177	740	642	1479*	916*	726*
LOEC (µg·L⁻¹)									
Ant	-	-	45*	45*	-	22	-	45*	-
Fen	954	29	1093	95	295	22	954	295	1093
Pir	132*	132*	132*	40	12	9	-	123	132*
Ch	-	2*	-	2*	-	-	-	2*	-
4WWA	1372*	151*	726*	385*	151*	14	1372*	151*	726*
NOEC (µg·L⁻¹)									
Ant	-	-	45*	<45*	-	<22	-	45*	-
Fen	95	<29	219	<95	29	<22	95	29	219
Pir	132*	132*	132*	<40	<12	<9	-	12	132*
Ch	-	1,7	-	2*	-	-	-	1,7	-
4WWA	385*	18	434*	60	18	<14	385*	18	434*

- nie zaobserwowano statystycznie istotnej regresji na poziomie $\alpha \leq 0,05$;

* wartości z uwzględnieniem granicy rozpuszczalności;

EC_x wyznaczone z równań regresji liniowej;

LOEC i NOEC –określone w oparciu o analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

Najniższe wartości LOEC odpowiadające poziomowi 10 mg·kg⁻¹ stwierdzono dla pomidora uprawianego na wszystkich badanych glebach, wyjątek stanowiła kombinacja z chryzenem (LOEC =1000 mg·kg⁻¹ na glebie S1) oraz z mieszaniną WWA (LOEC = 100 mg·kg⁻¹ na glebie S1 i S9). W przypadku pszenicy i rzepaku wartości tego wskaźnika były 10, 50 lub nawet 100 razy wyższe – Tabela 10.

4.2. ODDZIAŁYWANIE WWA NA AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ GLEB

Przy ocenie oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb rozpatrywano wpływ następujących czynników (tabela 3):

- właściwości gleb,
- właściwości WWA,
- zawartość WWA w glebie,
- czas oddziaływania.

Bezwzględne wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w Załączniku C, w Tabelach C-1, C-2, C-3, C-4, C-5 i C-6.

Przeprowadzono analizę wariancji wyników względnych, która wykazała że oddziaływanie WWA na aktywność mikrobiologiczną w przypadku dwóch parametrów (intensywności oddychania – OD i potencjału nityfikacji – NIT) zależało w sposób istotny ($\alpha \leq 0,05$) od wszystkich wyżej wymienionych czynników (Tabela 12) (z wyjątkiem zależności OD od czasu oddziaływania WWA). Intensywność oddychania zależała najsilniej od właściwości WWA i ich zawartości w glebie a potencjał nityfikacji – od zawartości WWA i właściwości gleby. Dla aktywności dehydrogenaz (DH) stwierdzono istotną zależność mierzonego parametru jedynie od właściwości gleb.

Tabela 12.

Wyniki analizy wariancji dla całego zbioru danych (n=320, „średnia gleba”, „średni poziom”, „średni czas”, 2 WWA); wpływ badanych czynników (właściwości gleby, właściwości WWA, poziom zanieczyszczenia gleby i czas oddziaływania) na ekotoksyczne oddziaływanie WWA.

Czynnik	Stopnie swobody	Mierzony parametr					
		DH*		OD*		NIT*	
		wartość F	α	wartość F	α	wartość F	α
gleba	7	18,41	0,0000	7,18	0,0000	49,10	0,0000
WWA	1	0,11	0,7488	45,16	0,0000	8,48	0,0039
poziom	4	0,69	0,6014	37,73	0,0000	82,24	0,0000
czas	1	0,16	0,6895	0,49	0,4926	5,58	0,0189

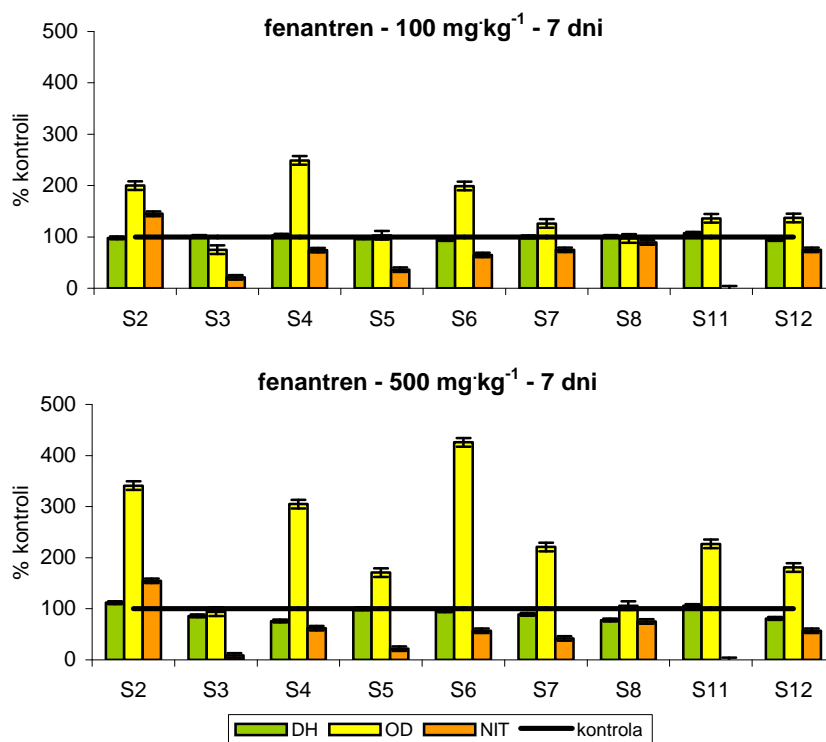
*) DH – aktywność dehydrogenaz; OD – intensywność oddychania; NIT – potencjał nityfikacyjny, α – poziom istotności. Wszystkie analizowane parametry wyrażono w % kontroli.

Wpływ poszczególnych badanych czynników na reakcję mikroorganizmów glebowych na zanieczyszczenie gleb przez WWA opisano w kolejnych podrozdziałach (4.2.2, 4.2.3., 4.2.4., 4.2.5.).

4.2.1. Ocena parametrów określających reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleby przez WWA

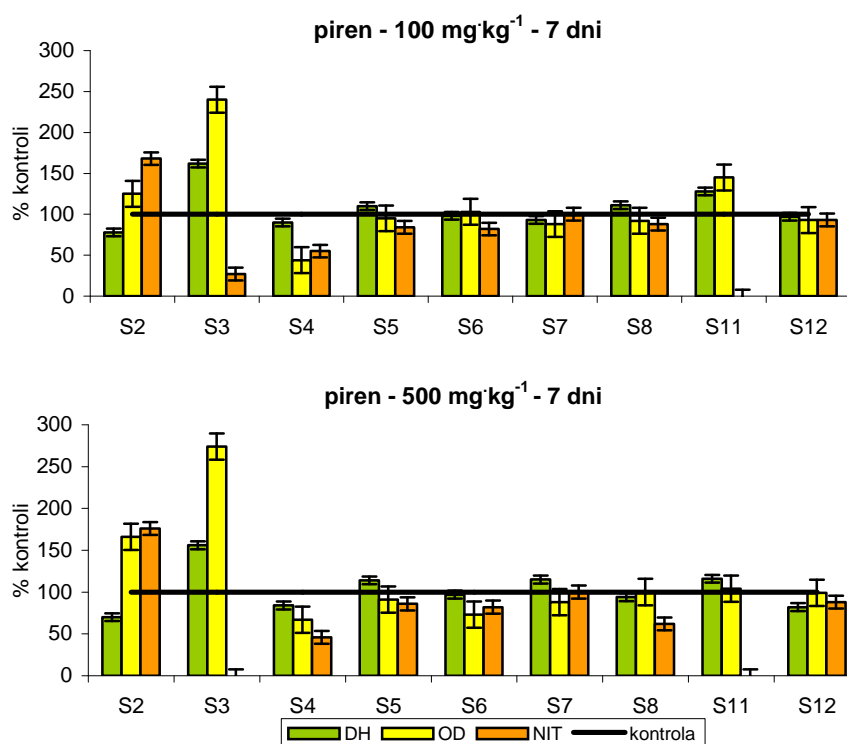
Na Rysunkach 11, 12, 13 i 14 porównano względne wartości parametrów (DH, OD, NIT), na podstawie których oceniano aktywność mikroorganizmów przy najwyższych poziomach zanieczyszczenia gleb przez WWA (100 i 500 mg·kg⁻¹) po czasie 7 i 15 dni. Podano przykładowo wyniki dla fenantrenu i pirenu, dla których obserwowano najsilniejszą reakcję mikroorganizmów. Podobne różnice pomiędzy badanymi parametrami obserwowano przy pozostałych poziomach zanieczyszczenia gleb zarówno w przypadku pojedynczych WWA jak i mieszaniny 3 i 4 węglowodorów. Najbardziej czułym parametrem opisującym reakcję mikroorganizmów glebowych na zanieczyszczenie gleb przez WWA był potencjał nityfikacji (Rysunki 11, 12, 13 i 14). Stwierdzono natomiast słaby toksyczny wpływ badanych węglowodorów na aktywność dehydrogenaz glebowych i intensywność oddychania, czyli na parametry niespecyficzne, charakteryzujące aktywność metaboliczną całej populacji mikroorganizmów glebowych [Hicks i in. 1990, Rossel i in. 1997, Pankhurst i in. 1998]. W przypadku OD często obserwowano efekty stymulacji aktywności mikrobiologicznej gleb widoczne nawet przy najwyższym zastosowanym stężeniu WWA – 500 mg·kg⁻¹. Nasilenie tych efektów obserwowano głównie w glebach zanieczyszczonych fenantrenem (Rysunki 11 i 13), przy czym silniejszy (w stosunku do kontroli) wzrost intensywności oddychania widoczny był po 15 dniach oddziaływania węglowodoru (Rysunek 13). Największą zmiennością uzyskanych wyników charakteryzowała się intensywność oddychania i aktywność dehydrogenaz, wartość 95 % przedziałów ufności sięgała 33 % podczas gdy dla potencjału nityfikacji mieściła się w zakresie 6 – 15 %.

Biorąc powyższe pod uwagę w dalszej części pracy opierano się głównie na wynikach pomiaru potencjału nityfikacji (NIT), jako najczulszego parametru.



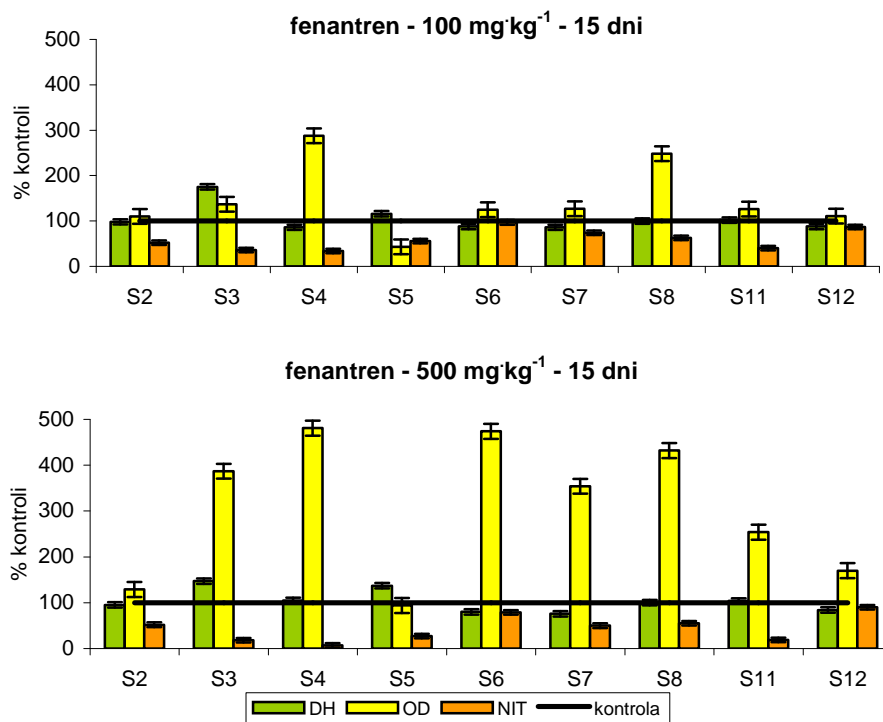
Rysunek 11.

Porównanie względnych wartości parametrów opisujących reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez fenantren po 7 dniach oddziaływania (\pm odchylenie standardowe).

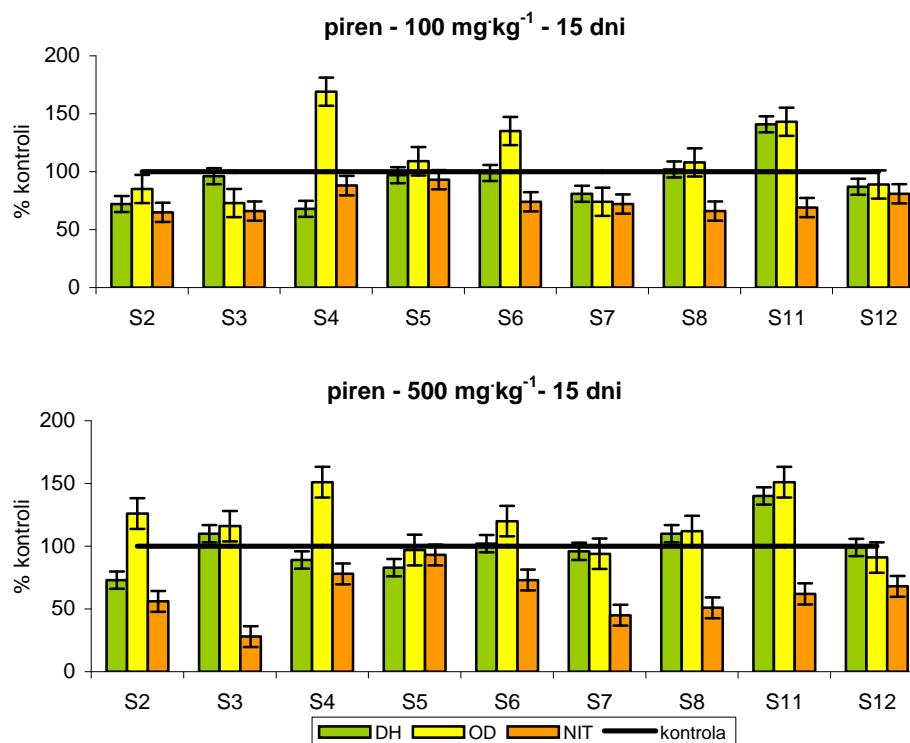


Rysunek 12.

Porównanie względnych wartości parametrów opisujących reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez piren po 7 dniach oddziaływania (\pm odchylenie standardowe).



Rysunek 13. Porównanie względnych wartości parametrów opisujących reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez fenantren po 15 dniach oddziaływania (± odchylenie standardowe) .

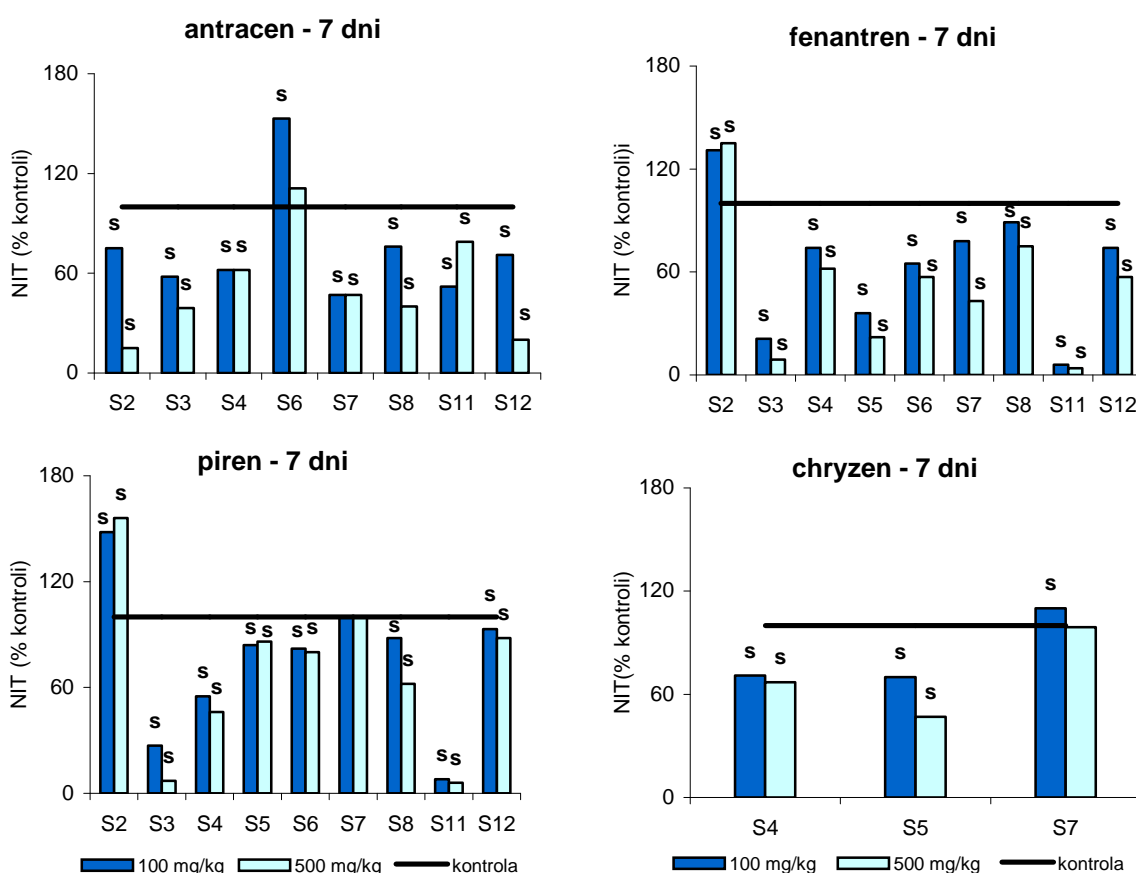


Rysunek 14. Porównanie względnych wartości parametrów opisujących reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez piren po 15 dniach oddziaływania (± odchylenie standardowe).

4.2.2. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną od właściwości gleb

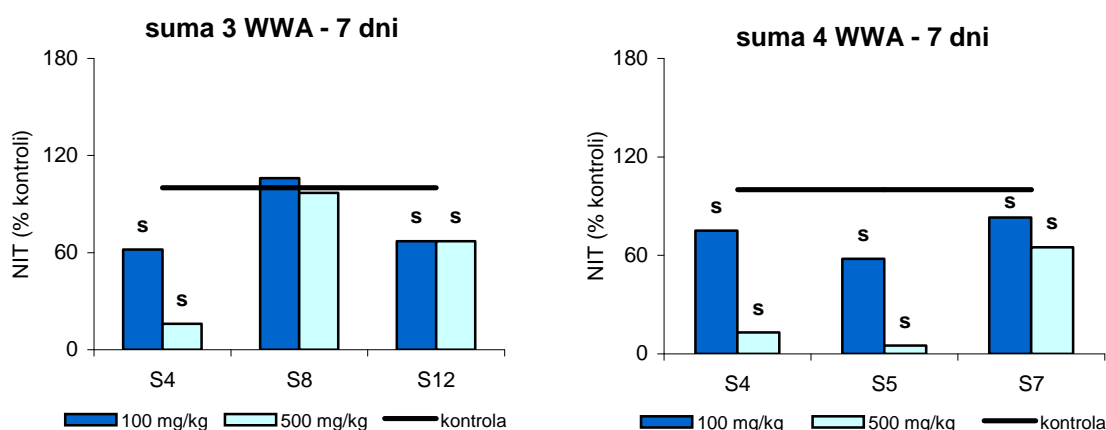
Przeprowadzona analiza wariancji (Tabela 12) wykazała, że oddziaływanie WWA na aktywność mikrobiologiczną, ocenianą na podstawie potencjału nityfikacji, zależało w sposób istotny od właściwości gleby. Wpływ tego czynnika był nawet silniejszy niż wpływ właściwości WWA i czasu oddziaływania badanych związków, ale słabszy niż w przypadku zawartości WWA w glebie.

Wpływ zanieczyszczenia badanych gleb antracenenem, fenantrenem, pirenem i chryzenem na poziomach 100 i 500 mg·kg⁻¹ na względną aktywność nityfikacji po 7 dniach oddziaływania tych związków przedstawiono na Rysunku 15. Natomiast na Rysunku 16 porównano reakcję mikroorganizmów w glebach zanieczyszczonych przez mieszaninę 3 i 4 węglowodorów. Różnice w stopniu hamowania lub stymulacji NIT w różnych glebach przy najwyższych zastosowanych poziomach podano w Tabeli 16.



Rysunek 15.

Wpływ zanieczyszczenia badanych gleb antracenenem, fenantrenem, pirenem i chryzenem na poziomach 100 i 500 mg·kg⁻¹ na aktywność mikroorganizmów (potencjał nityfikacji) po 7 dniach oddziaływania (kontrola=100%; s – wartości statystycznie istotnie różne od kontroli przy $\alpha \leq 0,05$).



Rysunek 16.

Wpływ zanieczyszczenia badanych gleb mieszaniną 3 i 4 WWA na poziomach 100 i 500 mg·kg⁻¹ na aktywność mikroorganizmów (potencjał nityfikacji) po 7 dniach oddziaływania (kontrola=100%; s – wartości statystycznie istotnie różne od kontroli przy $\alpha \leq 0,05$).

W Tabeli 13 porównano średnie (dla wszystkich poziomów WWA) wartości potencjału nityfikacji w badanych glebach.

Tabela 13.

Zależność oddziaływania WWA na potencjał nityfikacji od właściwości badanych gleb (zakres stężeń WWA 0 – 500 mg·kg⁻¹, czas 7 dni).

Gleba	Właściwości gleby		NIT (% kontroli) *					
	<i>pH_{KCl}</i>	<i>SOM</i>	Ant (n=80)	Fen (n=90)	Pir (n=90)	Ch (n=30)	Σ 4 WWA (n=30)	Σ 3 WWA (n=30)
S2	6,9	1,79	69,3 ^a	119,3 ^a	152,0 ^a	–	–	–
S3	5,5	1,25	69,6 ^a	50,2 ^b	50,7 ^b	–	–	–
S4	5,4	1,09	73,0 ^a	86,6 ^c	70,8 ^c	83,0 ^a	58,9 ^a	59,4 ^a
S5	6,4	1,20	–	66,7 ^d	89,4 ^d	68,8 ^b	49,2 ^b	–
S6	6,6	2,89	120,9 ^b	79,3 ^c	89,5 ^d	–	–	–
S7	7,0	2,64	69,4 ^a	83,1 ^f	107,8 ^c	108,8 ^c	84,1 ^c	–
S8	6,9	2,63	81,5 ^c	89,1 ^c	88,1 ^d	–	–	102,1 ^b
S11	5,8	1,59	97,6 ^d	46,2 ^g	37,8 ^f	–	–	–
S12	7,0	5,54	87,2 ^c	82,5 ^f	95,5 ^g	–	–	78,7 ^c

Wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha \leq 0,05$.

*) wartości średnie dla wszystkich poziomów WWA.

W większości przypadków silniejszy wpływ WWA na potencjał nityfikacji obserwowano w lekkich glebach kwaśnych S3, S4, S5 i S11 o stosunkowo niskiej zawartości substancji organicznej (1,25 – 1,59 %) (Rysunek 15, Tabela 13). Natomiast słabszą reakcję mikroorganizmów (wyższe wartości NIT) odnotowano w glebach S6,

S7, S8 i S12 o odczynie obojętnym (pH_{KCl} 6,6 – 7,0) i wysokiej zawartości SOM (2,63 – 5,54 %) – Tabela 13.

Tabela 14.

Zależność pomiędzy potencjałem nityfikacji (NIT w % kontroli) w glebach zanieczyszczonych przez WWA a właściwościami gleb („średnia gleba”, „średni poziom WWA”, czas 7 dni).

właściwości gleb	Współczynniki korelacji					
	Ant (n=80)	Fen (n=90)	Pir (n=90)	Ch (n=30)	Σ 4WWA (n=30)	Σ 3WWA (n=30)
C _{org}	0,17	0,14	0,21*	0,70**	0,38*	0,19
fr <0,002 mm	0,11	0,07	0,04	0,52**	0,30	0,66**
fr <0,02 mm	0,21	-0,06	-0,09	0,60**	0,33	0,52**
N _{og}	0,09	0,11	0,15	0,78**	0,39*	0,08
C:N	0,18	0,06	0,20	0,21	0,14	0,66**
Hh	0,08	-0,45**	-0,66**	-0,37*	-0,22	-0,44*
pH _{KCl}	0,05	0,37*	0,61**	0,40*	0,24	0,53**
NIT _{pocz}	0,38**	0,16	0,48**	0,75**	0,40*	0,65**
DH _{pocz}	0,15	0,10	0,45**	0,59**	0,30	0,55**
OD _{pocz}	-0,09	-0,11	-0,35**	-0,71**	-0,36	0,47**

NIT_{pocz} – początkowa aktywność nityfikacji; DH_{pocz} – początkowa aktywność dehydrogenazy; OD_{pocz} – początkowa intensywność oddychania * - istotne na poziomie α≤0,05; ** - istotne na poziomie α≤0,01

Tabela 15.

Równania regresji wielokrotnej opisujące zależność potencjału nityfikacji w glebach zanieczyszczonych przez WWA od właściwości gleb.

WWA	n	równanie regresji	R ²
Ant	80	NIT 7 = -11,6 *(pH _{KCl}) + 3,8 *(NIT _{pocz})	0,89
Fen	90	NIT 7 = -0,88 *(fr <0,02 mm) - 13,8 *(Hh) + 19,2 *(NIT _{pocz})	0,88
	90	NIT 15 = 12,0 *(pH _{KCl})	0,89
Pir	90	NIT 7 = 18,1 *(Hh) + 32,8 *(NIT _{pocz})	0,81
	90	NIT 15 = 14,5 *(pH _{KCl}) - 6,3 *(NIT _{pocz})	0,95
Ch	30	NIT 7 = 141,6 *(C _{org}) - 6,6 *(fr <0,002 mm)	0,93
Σ4WWA	30	NIT 7 = 61,7 *(C _{org})	0,76
	30	NIT 15 = 76,4 *(C _{org})	0,84
Σ3WWA	30	NIT 7 = 7,3 *(C:N)	0,94
	30	NIT 15 = 33,6 *(C _{org})	0,76

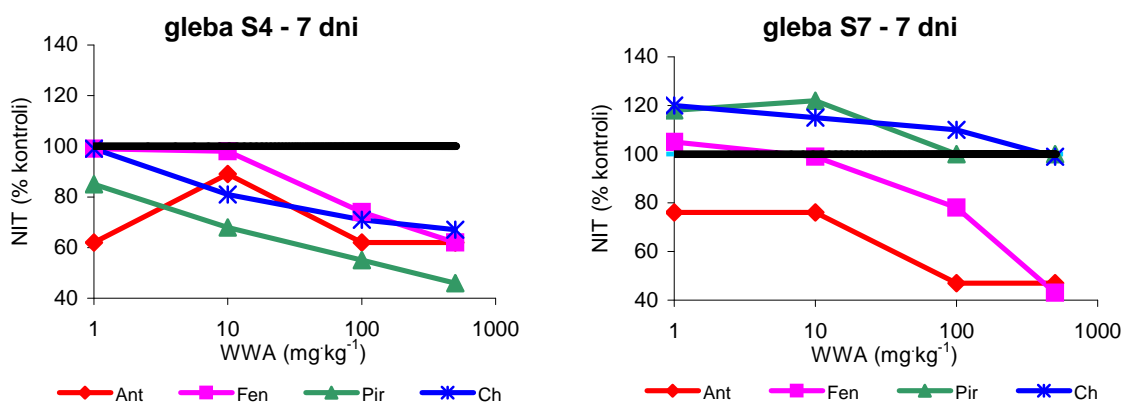
NIT_{pocz} – początkowa aktywność nityfikacji; analiza regresji wielokrotnej wykonana metodą selekcji w przód bez stałej w modelu, F=4,0, α≤0,05, uwzględnione w równaniach właściwości gleb nie były skorelowane.

Wyznaczone współczynniki korelacji pomiędzy średnimi wartościami NIT i właściwościami badanych gleb były raczej niskie (Tabela 14). Stosunkowo najwyższe

wartości r odpowiadały parametrom określającym kwasowość gleb (dla H_h : r od $-0,37$ do $-0,66$ i dla pH_{KCl} : r od $0,37$ do $0,61$) oraz początkową aktywność biologiczną gleb (dla NIT_{pocz} : r od $0,38$ do $0,75$). Związki z zawartością substancji organicznej w glebie były nieco słabsze. Najsilniej związane z właściwościami gleb było oddziaływanie chryzenu, a najslabiej – antracenu (Tabela 14). Dalsza analiza wyników (zastosowanie równań regresji wielokrotnej) wskazuje, że reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez WWA można opisać za pomocą parametrów charakteryzujących zarówno właściwości fizykochemiczne gleby (zawartość frakcji spławialnej i koloidalnej, odczyn, kwasowość hydrolityczna, zawartość węgla organicznego, stosunek C:N) jak i biologiczne (początkowa aktywność nityfikacji) – Tabela 15. Odpowiednie współczynniki determinacji (R^2) po 7 dniach i po 15 dniach były w zakresie 73 – 95 %. Reakcja mikroorganizmów była najsilniej zróżnicowana przy wysokich zawartościach WWA – Rysunek 19.

4.2.3. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb od właściwości badanych związków

W celu oceny zależności oddziaływania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na aktywność biologiczną gleb od właściwości tych związków w badaniach wykorzystano cztery węglowodory z grupy WWA o zróżnicowanych właściwościach fizyko-chemicznych (Tabela 2).



Rysunek 17.

Wpływ antracenu, fenantrenu, pirenu i chryzenu na aktywność nityfikacji w glebach S4 i S7 (po 7 dniach).

Wyniki analizy wariancji (Tabela 12) wykazały istotny wpływ właściwości WWA na reakcję mikroorganizmów w glebach zanieczyszczonych tymi związkami. Przykłady tych zależności dla dwóch wybranych gleb o zróżnicowanych właściwościach podano na Rysunku 17, natomiast w Tabeli 16 przedstawiono stopień hamowania lub stopień stymulacji NIT we wszystkich badanych glebach przy dwóch najwyższych zastosowanych poziomach WWA – 100 i 500 mg·kg⁻¹.

Tabela 16.

Stopień hamowania (-) i stopień stymulacji (+) potencjału nityfikacji przy zanieczyszczeniu gleb antracenenem, fenantrenem, pirenem, chryzenem oraz mieszaniną 3 i 4 węglowodorów na poziomie 100 i 500 mg·kg⁻¹ po 7 dniach oddziaływania węglowodorów.

WWA	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12	śr*
	<i>poziom - 100 mg·kg⁻¹</i>									
Ant	- 25	- 42	- 38	-	+ 53	- 53	- 24	- 48	- 29	- 26
Fen	+ 31	- 79	- 26	- 64	- 35	- 22	- 11	- 94	- 26	- 36
Pir	+ 48	- 73	- 45	- 16	- 18	0	- 12	- 92	- 7	- 24
Ch	-	-	- 29	- 30	-	+ 10	-	-	-	- 16
4WWA	-	-	- 25	- 42	-	- 17	-	-	-	- 28
3WWA	-	-	- 38	-	-	-	+ 6	-	- 33	- 22
<i>poziom - 500 mg·kg⁻¹</i>										śr*
Ant	- 85	- 61	- 38	-	+ 11	- 53	- 60	- 21	- 80	- 48
Fen	+ 35	- 91	- 38	- 78	- 43	- 57	- 25	- 96	- 43	- 48
Pir	+ 56	- 93	- 54	- 14	- 20	0	- 38	- 94	- 12	- 30
Ch	-	-	- 33	- 53	-	- 1	-	-	-	- 29
4WWA	-	-	- 87	- 95	-	- 35	-	-	-	- 72
3WWA	-	-	- 84	-	-	-	- 3	-	- 33	- 40

(-) % hamowania; (+) % stymulacji; „-” nie badano; *) średnia arytmetyczna dla poszczególnych WWA.

Najsilniejszym oddziaływaniem toksycznym charakteryzowały się antracen i fenantren – trzypierścieniowe węglowodory o niższej masie cząsteczkowej i stosunkowo niskich wartościach współczynnika podziału oktanol/woda oraz piren – związek czteropierścieniowy o wyższej masie cząsteczkowej, ale o dość dobrej rozpuszczalności w wodzie ($R_w = 132 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – Tabela 2. Obecność fenantrenu w dziewięciu badanych glebach powodowała zahamowanie potencjału nityfikacji w granicach od -11 % do -96 % (średnio -36 % na poziomie 100 mg·kg⁻¹ i -48 % na poziomie 500 mg·kg⁻¹).

Podobny stopień hamowania NIT odnotowano w glebach zanieczyszczonych antracenenem (odpowiednio -26 i -48 % w stosunku do kontroli) oraz pirenem (odpowiednio -24 % i -30 % w stosunku do kontroli) – Tabela 16. Również chryzen – węglowodór o wyższej masie cząsteczkowej, wysokiej wartości $\log K_{ow}$ (5,86) i bardzo niskiej rozpuszczalności ($R_w = 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) – oddziaływał toksycznie na mikroorganizmy glebowe, jednak jego wpływ był wyraźnie słabszy (-16 % przy $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i -29% przy $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Tabela 16, Rysunek 17).

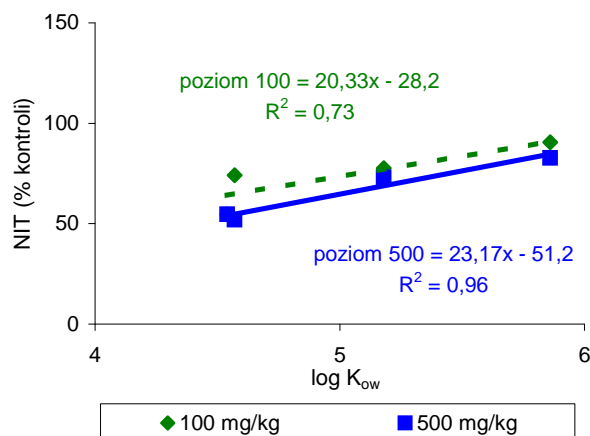
Efekty stymulacji potencjału nityfikacji stwierdzono tylko w 12 % badanych kombinacji przy czym trudno tu było o ustalenie jakichkolwiek prawidłowości – Tabela 16.

Tabela 17.

Zależność pomiędzy reakcją mikroorganizmów glebowych (NIT w % kontroli) na zanieczyszczenie wybranych gleb przez WWA a właściwościami tych związków („średnia gleba”, czas 7 dni, n=16).

właściwości WWA	Współczynniki korelacji	
	poziom $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	poziom $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
$\log K_{ow}$	0,54*	0,58*
R_w	-0,01	-0,37

R_w - rozpuszczalność w wodzie ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); K_{ow} – współczynnik podziału oktanol/ woda; * - istotne na poziomie $\alpha \leq 0,05$.



Rysunek 18.

Zależność średniej wartości NIT („średnia gleba”, n=16) po 7 dniach oddziaływania WWA od współczynnika podziału oktanol/woda ($\log K_{ow}$).

Obserwowane zmiany potencjału nityfikacji były uzależnione głównie od wartości $\log K_{ow}$ (współczynniki korelacji od 0,54 do 0,58 statystycznie istotne przy $\alpha \leq 0,05$) – Tabela 17. Do opisu tej zależności najodpowiedniejsze były równania typu: $y = ax + b$,

które zmiany potencjału nitryfikacji w zależności od $\log K_{ow}$ określały w 73 – 96 % (Rysunek 18). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej zależności (przy $\alpha \leq 0,05$) mierzonego parametru (NIT) od rozpuszczalności węglowodorów w wodzie (Tabela 17).

4.2.4. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb od zawartości tych związków – zawartości całkowitej i w fazie wodnej

Czynnikiem w największym stopniu warunkującym reakcję mikroorganizmów (NIT) w glebach zanieczyszczonych przez WWA była zawartość tych związków w glebie (Tabela 12). Na Rysunku 19 podano przykłady zależności potencjału nitryfikacji wszystkich badanych gleb od zawartości w nich fenantrenu i pirenu po 7 i 15 dniach oddziaływania.

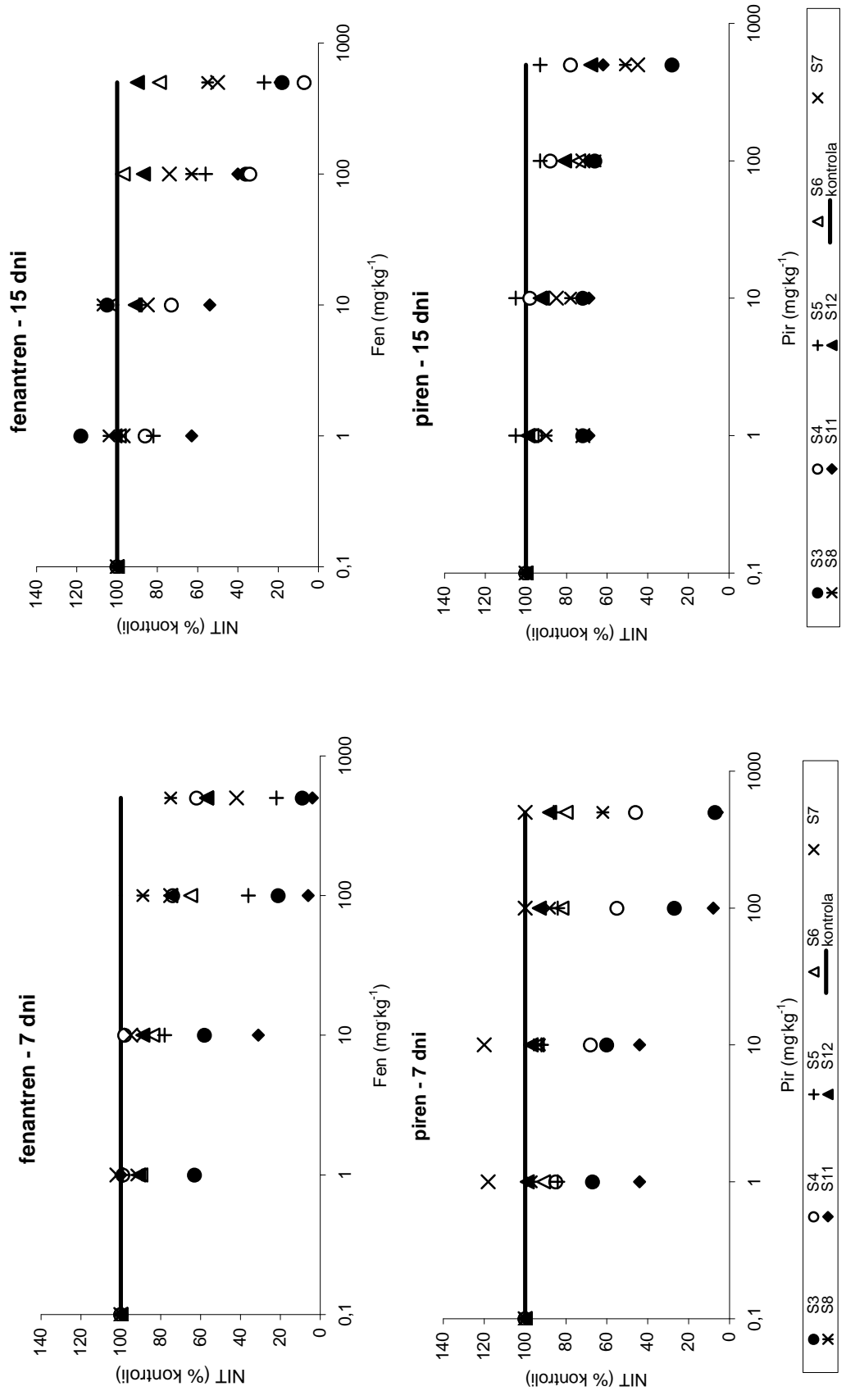
Tabela 18.

Zależność oddziaływania WWA na aktywność nitryfikacji od poziomu zanieczyszczenia gleby („średnia gleba”) po czasie 7 dni.

poziom ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	NIT (% kontroli)			
	Ant (n=80)	Fen (n=90)	Pir (n=90)	Ch (n=30)
0	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
1	93,6 ^b	92,0 ^b	92,9 ^b	95,3 ^b
10	94,3 ^b	81,4 ^c	92,7 ^b	84,5 ^c
100	71,1 ^c	64,0 ^d	77,4 ^c	83,7 ^c
500	56,0 ^d	53,2 ^e	71,1 ^d	70,8 ^d

Wartości oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się od siebie istotnie na poziomie $\alpha \leq 0,05$.

Wyniki przeprowadzonej dla całego zbioru danych analizy wariancji (Tabela 18) wskazują, że dla gleby o „średnich właściwościach” pierwsze efekty zahamowania potencjału nitryfikacji (LOEC) dla każdego z badanych WWA były widoczne już przy najniższym zastosowanym poziomie zanieczyszczenia ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Zwiększenie zawartości fenantrenu i chryzenu do $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ powodowało dalszą inhibicję NIT, podczas gdy w przypadku antracenu i pirenu nasilenie efektów obserwowano dopiero przy poziomie WWA $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Tabela 18). Zanieczyszczenie gleb na poziomie $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (najwyższe zastosowane stężenie) we wszystkich badanych kombinacjach

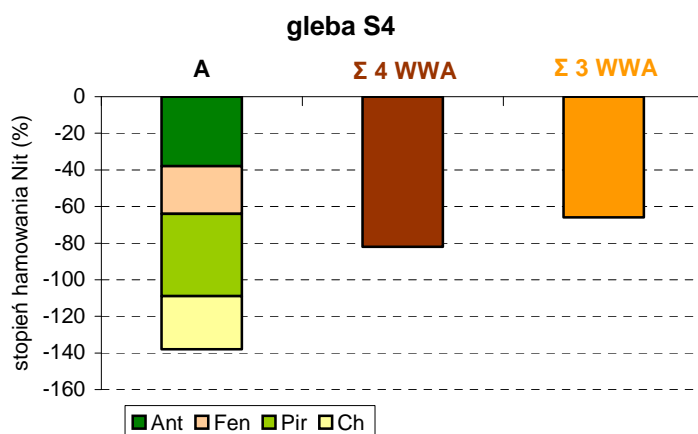


Rysunek 19. Zależność potencjału nityfikacji od zawartości w glebach fenantrenu i pirenu po 7 i 15 dniach oddziaływania tych związków (kontrola=100%).

powodowało dalszą statystycznie istotną inhibicję aktywności mikroorganizmów (Tabela 18, Rysunki 15, 16 i 19).

W niektórych przypadkach (gleby S3 i S7 zanieczyszczone fenantrenem lub pirenem) przy najniższych zawartościach WWA w glebie ($\leq 10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) obserwowano efekt stymulacji aktywności mikroorganizmów glebowych - Rysunek 19.

W doświadczeniu obok pojedynczych węglowodorów (antracen, fenantren, piren i chryzen) zastosowano dla niektórych gleb również mieszaninę 3 (Ant, Fen, Pir) oraz 4 WWA (Ant, Fen, Pir i Ch). Na Rysunku 20 porównano sumę efektów toksycznych spowodowanych przez dodanie do gleb indywidualnych węglowodorów (na poziomie $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) z toksycznym oddziaływaniem mieszaniny 3 i 4 WWA odpowiednio na poziomie 300 i $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tzn. $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ każdego węglowodoru). Stwierdzono, iż efekt mieszaniny 3 lub 4 węglowodorów był znacznie niższy niż suma efektów toksycznych powodowanych przez indywidualne WWA (Rysunek 20). W obu przypadkach efekt mieszaniny wynosił około 60 % sumy efektów toksycznych odpowiednich związków.



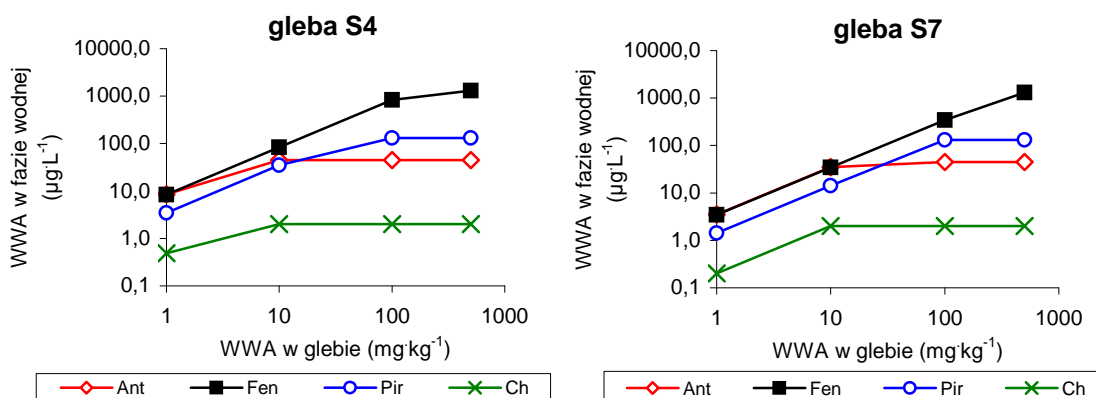
Rysunek 20.

Efekt hamowania potencjału nityfikacji w glebie S4 po 7 dniach oddziaływania WWA; $\Sigma 4$ WWA – efekt mieszaniny 4 WWA, $\Sigma 3$ WWA – efekt mieszaniny 3 WWA, A – suma efektów toksycznych indywidualnych WWA (antracen+fenantren+piren+chryzen).

W drugiej serii doświadczenia obliczono również (zgodnie z równaniem opisanym w podrozdziale 3.3.2.1.) zawartość WWA w fazie wodnej gleb. Uzyskane wyniki przedstawiono w Załączniku A w Tabeli A-3, A-4 i A-5 oraz na Rysunku 21.

W większości gleb teoretyczne stężenie antracenu i chryzenu w fazie wodnej osiągało granicę rozpuszczalności już przy zawartości tych związków w glebie $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, w przypadku pirenu odpowiadało to poziomowi zanieczyszczenia $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a dla fenantrenu – $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Rysunek 21). Najwyższe stężenia najlepiej

rozpuszczalnego w wodzie fenantrenu odpowiadały glebom S3, S4 i S5 o stosunkowo niskiej zawartości substancji organicznej (Załącznik A, Tabela A-3).



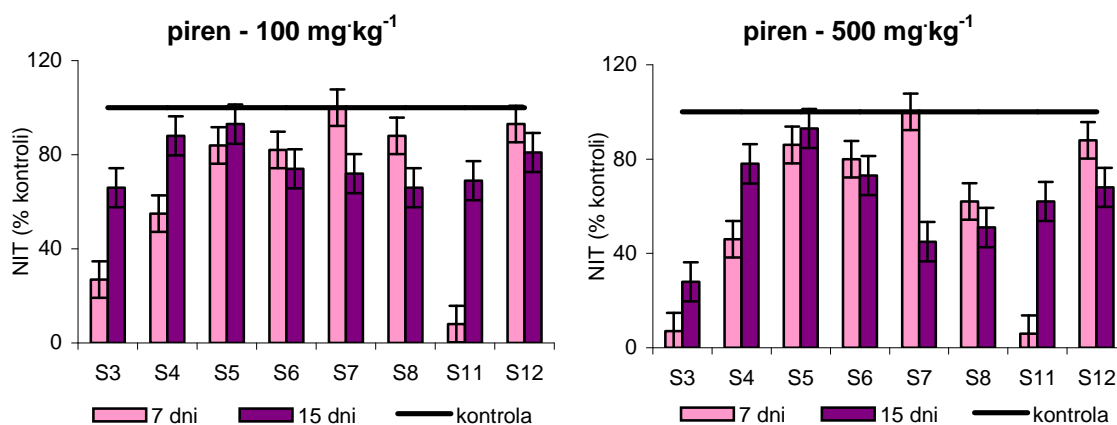
Rysunek 21.

Zależność pomiędzy zawartością antracenu, fenantrenu, pirenu i chryzenu w glebach S4 i S7 (o zróżnicowanych właściwościach) a przewidywaną zawartością tych węglowodorów w fazie wodnej (z uwzględnieniem granicy rozpuszczalności WWA).

4.2.5. Zależność oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb od czasu

Kolejnym czynnikiem istotnie różnicującym reakcję mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleb przez WWA był czas oddziaływania badanych związków. Wpływ czasu był jednak słabszy niż w przypadku pozostałych czynników (Tabela 12). Na Rysunku 22 (na przykładzie pirenu) porównano wpływ WWA na wartość NIT po 7 i 15 dniach inkubacji przy dwóch najwyższych zastosowanych poziomach zanieczyszczenia 100 i 500 mg·kg⁻¹.

Z przedstawionych danych (Rysunki 19 i 22) wynika, iż trudno jednoznacznie określić wpływ czasu na aktywność nityfikacji. W niektórych glebach (np. S7) silniejsze oddziaływanie WWA obserwowano po dłuższym czasie, a w innych przypadkach (kwaśne gleby lekkie S3, S4 i S11 o niskiej zawartości SOM i najniższej nityfikacji początkowej) silniejsze hamowanie potencjału nityfikacji obserwowano po 7 dniach od wprowadzenia węglowodorów. Wydłużenie czasu oddziaływania WWA do 15 dni powodowało w tych glebach zmniejszenie efektów toksycznych (Rysunki 19 i 22).



Rysunek 22.

Porównanie potencjału nityfikacji gleb zanieczyszczonych pirenem (poziom 100 i 500 mg·kg⁻¹ po 7 i 15 dniach oddziaływania (kontrola=100%; ± odchylenie standardowe).

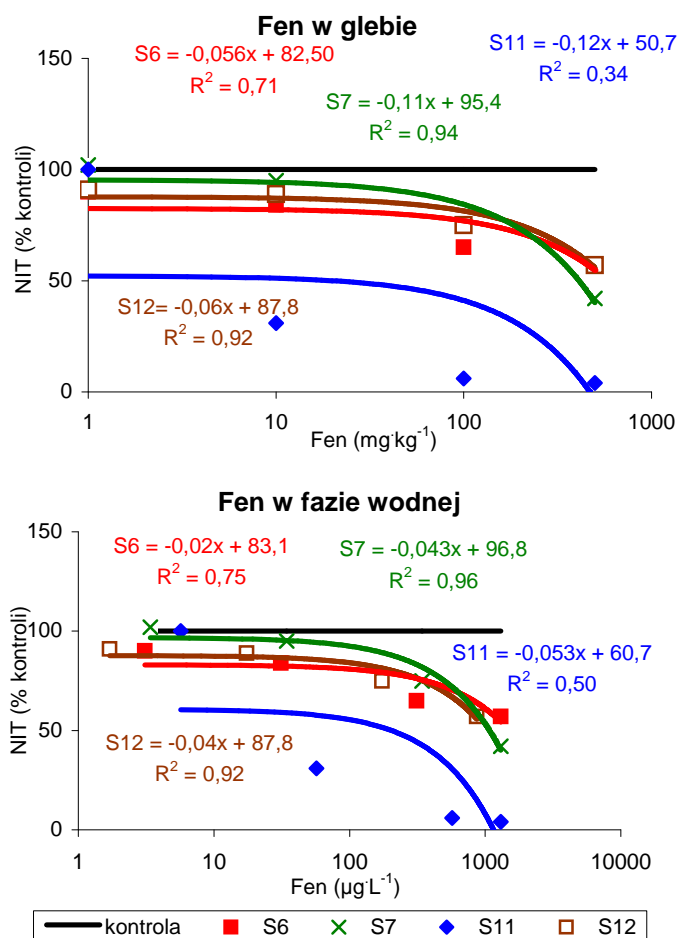
4.2.6. Wyznaczenie parametrów toksyczności WWA w stosunku do mikroorganizmów glebowych

Na podstawie zależności pomiędzy zawartością WWA w glebach i w fazie wodnej a reakcją mikroorganizmów glebowych wyrażoną zmianami potencjału nityfikacji (Rysunek 19) wyznaczono współczynniki toksyczności WWA. W tym celu wykorzystano równania regresji liniowej (istotne na poziomie $\alpha \leq 0,1$), w oparciu o które wyliczono dawki WWA powodujące 20 i 50 % zahamowanie NIT (odpowiednio EC₂₀ i EC₅₀). Przykłady zależności opisanych równaniami podano na Rysunku 23, a wartości wyznaczonych współczynników toksyczności po czasie 7 dni w Tabelach 19 i 20, natomiast po 15 dniach w Tabelach 19a i 20a.

W celu określenia LOEC (najniższego stężenia WWA powodującego istotną inhibicję aktywności mikroorganizmów) oraz NOEC (najwyższego stężenia, przy którym nie obserwujemy istotnych zmian) zastosowano analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

Dla wszystkich węglowodorów wyznaczone współczynniki toksyczności zależały od właściwości gleb (Tabele 19 i 19a). Na 35 kombinacji (gleba/WWA) w badanym zakresie stężeń mieściło się 50 % wartości NIT-EC₅₀. Wartości tego wskaźnika były na podobnym poziomie i wynosiły dla antracenu: 243 – 396 mg·kg⁻¹, fenantrenu: 6 – 485 mg·kg⁻¹, pirenu: 57 – 497 mg·kg⁻¹, chryzenu: 420 – 449 mg·kg⁻¹ a

dla mieszaniny 4 WWA: 178 – 457 mg·kg⁻¹, przy czym czas kontaktu WWA/gleba miał niewielki wpływ (Tabela 19 i 19a).



Rysunek 23.

Równania regresji liniowej opisujące wpływ zawartości fenantrenu w glebie i w fazie wodnej na aktywność nityfikacji (na przykładzie wybranych gleb).

Natomiast w fazie wodnej stężenia WWA powodujące 50 % zahamowanie aktywności nityfikacji w badanym zakresie można było wyznaczyć tylko w 30 – 37 % przypadków (Tabela 20 i 20a). Wartości wskaźnika NIT-EC₅₀ nie przekraczające granicy rozpuszczalności uzyskano dla gleb zanieczyszczonych fenantrenem i pirenem oraz mieszaniną 3 i 4 węglowodorów. Po 7 dniach wynosiły one dla Fen: <5 – 1088 µg·L⁻¹, Pir: <2 – 131 µg·L⁻¹, Σ 4 WWA: 472 – 640 µg·L⁻¹ i Σ 3 WWA: 743 µg·L⁻¹ (Tabela 20), zaś po 15 dniach wartości te były wyraźnie wyższe i wynosiły Fen: 297 – 1295 µg·L⁻¹, Σ 4 WWA: 863 – 1052 µg·L⁻¹ i Σ 3 WWA: 903 µg·L⁻¹ (Tabela 20a).

Drugim wyznaczonym wskaźnikiem toksyczności WWA było EC₂₀ – stężenie węglowodorów powodujące 20 % zahamowanie potencjału nityfikacji. W badanym zakresie stężeń wartości NIT- EC₂₀ udało się wyznaczyć zarówno w glebie jak i w fazie wodnej w 43 – 50 % kombinacji. Uzyskane wartości różniły się znacznie w zależności od badanego węglowodoru i rodzaju materiału glebowego (Tabela 19, 19a, 20 i 20a).

Tabela 19.

Wskaźniki toksyczności WWA (wyliczone na podstawie pomiaru potencjału nityfikacji) w zakresie 1 – 500 mg·kg⁻¹ gleby po 7 dniach oddziaływania badanych związków (n=8).

WWA	7 dni									
	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12	
EC₂₀ (mg·kg⁻¹)										
Ant	<1	<1	<1	-	>500	<1	120	373	26	
Fen	<1	<1	201	<1	45	140	347	<1	130	
Pir	<1	<1	<1	n.o.	444	>500	226	<1	>500	
Ch	-	-	121	<1	-	>500	-	-	-	
4WWA	-	-	63	15	-	247	-	-	-	
3WWA	-	-	<1	-	-	-	>500	-	223	
EC₅₀ (mg·kg⁻¹)										
Ant	243	327	>500	-	>500	379	396	>500	264	
Fen	<1	24	>500	225	>500	412	>500	6	>500	
Pir	<1	57	390	n.o.	>500	>500	>500	<1	>500	
Ch	-	-	>500	449	-	>500	-	-	-	
4WWA	-	-	245	178	-	>500	-	-	-	
3WWA	-	-	81	-	-	-	>500	-	>500	
LOEC (mg·kg⁻¹)										
Ant	1	1	1	-	10	100	100	100	10	
Fen	10	1	100	1	1	10	1	10	10	
Pir	1	1	1	1	1	1	10	1	100	
Ch	-	-	10	1	-	500	-	-	-	
4WWA	-	-	10	100	-	100	-	-	-	
3WWA	-	-	10	-	-	-	300	-	10	
NOEC (mg·kg⁻¹)										
Ant	<1	<1	<1	-	1	10	10	10	1	
Fen	1	<1	10	<1	<1	1	<1	1	1	
Pir	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	<1	10	
Ch	-	-	1	<1	-	100	-	-	-	
4WWA	-	-	<10	10	-	10	-	-	-	
3WWA	-	-	<10	-	-	-	100	-	<10	

n.o. – nie zaobserwowano statystycznie istotnej regresji na poziomie $\alpha \leq 0,1$;

EC_x wyznaczone z równań regresji liniowej;

LOEC i NOEC –określone w oparciu o analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

W 30 – 40 % przypadków (zarówno po czasie 7 jak i 15 dni) uzyskano wartości NIT-EC₂₀ poniżej najniższego zastosowanego stężenia (1 mg·kg⁻¹) (Tabela 19 i 19a). W badanym zakresie stężeń po 7 dniach najniższe NIT-EC₂₀ dla antracenu odpowiadały wartości 26 mg·kg⁻¹ (gleba S12), dla fenantrenu – 45 mg·kg⁻¹ (gleba S6), dla pirenu – 226 mg·kg⁻¹ (gleba S8), dla chryzenu – 121 mg·kg⁻¹, dla mieszaniny 4 WWA – 15 mg·kg⁻¹ (gleba S5) a dla mieszaniny 3 WWA – 223 mg·kg⁻¹ (gleba S12) – Tabela 19.

Tabela 19a.

Wskaźniki toksyczności WWA (wyliczone na podstawie pomiaru potencjału nitrifikacji) w fazie wodnej gleb zakresie 1 – 500 mg·kg⁻¹ gleby po 15 dniach oddziaływania badanych związków (n=8).

WWA	15 dni								
	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12
EC₂₀ (mg·kg⁻¹)									
Ant	n.o.	n.o.	-	-	-	-	-	-	n.o.
Fen	<1	90	<1	6	484	110	177	<1	>500
Pir	114	<1	422	197	263	<1	15	<1	247
Ch	-	-	62	<1	-	<1	-	-	-
4WWA	-	-	139	232	-	>500	-	-	-
3WWA	-	-	28	-	-	-	162	-	<1
EC₅₀ (mg·kg⁻¹)									
Ant	n.o.	n.o.	-	-	-	-	-	-	n.o.
Fen	475	265	153	274	>500	485	>500	73	>500
Pir	>500	261	>500	428	>500	430	491	>500	>500
Ch	-	-	>500	>500	-	420	-	-	-
4WWA	-	-	341	457	-	>500	-	-	-
3WWA	-	-	284	-	-	-	500	-	>500
LOEC (mg·kg⁻¹)									
Ant	1	1	-	-	-	-	-	-	500
Fen	10	1	1	1	10	10	100	1	10
Pir	100	1	100	100	10	1	1	1	10
Ch	-	-	1	1	-	1	-	-	-
4WWA	-	-	100	400	-	500	-	-	-
3WWA	-	-	100	-	-	-	100	-	300
NOEC (mg·kg⁻¹)									
Ant	<1	<1	-	-	-	-	-	-	100
Fen	1	<1	<1	<1	1	1	10	<1	1
Pir	10	<1	10	10	1	<1	<1	<1	1
Ch	-	-	<1	<1	-	<1	-	-	-
4WWA	-	-	10	100	-	400	-	-	-
3WWA	-	-	10	-	-	-	10	-	100

n.o. – nie zaobserwowano statystycznie istotnej regresji na poziomie $\alpha \leq 0,1$;

EC_x wyznaczone z równań regresji liniowej;

LOEC i NOEC – określone w oparciu o analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

Wyznaczone w fazie wodnej najniższe wartości EC₂₀ wynosiły odpowiednio Ant: 3 µg·L⁻¹, Fen: 155 µg·L⁻¹, Pir: 7 µg·L⁻¹, Ch: 2 µg·L⁻¹, Σ 4 WWA: 92 µg·L⁻¹ i Σ 3 WWA: 131 µg·L⁻¹ (Tabela 20). Natomiast po dłuższym czasie oddziaływania związków (15 dni) dla fenantrenu, pirenu i chryzenu otrzymano niższe wartości Nit-EC₂₀ i wynosiły one odpowiednio 6, 15 i 62 mg·kg⁻¹, tylko dla mieszaniny 4 WWA uzyskano wyższe EC₂₀ (139 mg·kg⁻¹) – Tabela 20.

Tabela 20.

Wskaźniki toksyczności WWA (wyliczone na podstawie pomiaru potencjału nityfikacji) w fazie wodnej gleby po 7 dniach oddziaływania badanych związków (n=8).

WWA	7 dni								
	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12
EC₂₀ (µg·L⁻¹)									
Ant	11	4	n.o.	-	n.o.	3	28	45*	10
Fen	<5	<7	677	156	155	390	952	<6	195
Pir	n.o.	<3	7	n.o.	132*	132*	101	<2	132*
Ch	-	-	2	<1	-	2*	-	-	-
4WWA	-	-	211	92	-	322	-	-	-
3WWA	-	-	131	-	-	-	749*	-	<14
EC₅₀ (µg·L⁻¹)									
Ant	45*	45*	n.o.	-	n.o.	45*	45*	45*	42
Fen	<5	260	1300*	692	1300*	1088	1300*	202	945
Pir	n.o.	50	131	n.o.	132*	132*	132*	<2	132*
Ch	-	-	2*	2*	-	2*	-	-	-
4WWA	-	-	640	472	-	608*	-	-	-
3WWA	-	-	743	-	-	-	749*	-	455*
LOEC (µg·L⁻¹)									
Ant	5	7	8	-	32	45*	45*	45*	18
Fen	50	7	833	7	3	34	3	57	17
Pir	2	3	3	3	1	1	14	2	72
Ch	-	-	2*	0,4	-	2*	-	-	-
4WWA	-	-	52	313*	-	168*	-	-	-
3WWA	-	-	68	-	-	-	749*	-	14
NOEC (µg·L⁻¹)									
Ant	<5	<7	<8	-	3	35	35	45*	2
Fen	5	<7	83	<7	<3	3	<3	6	2
Pir	<2	<3	<3	<3	<1	<1	1	<2	7
Ch	-	-	0,5	<0,4	-	2*	-	-	-
4WWA	-	-	<52	47	-	21	-	-	-
3WWA	-	-	<68	-	-	-	207*	-	<14

n.o. – nie zaobserwowano statystycznie istotnej regresji na poziomie $\alpha \leq 0,1$;

* wartości z uwzględnieniem granicy rozpuszczalności;

EC_x wyznaczone z równań regresji liniowej;

LOEC i NOEC – określone w oparciu o analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

Przedstawione w Tabeli 19 i 19a dane wskazują, iż w większości przypadków badane węglowodory wykazywały silniejsze oddziaływanie toksyczne na mikroorganizmy glebowe (NIT) po 7 dniach trwania doświadczenia. Najniższe wartości LOEC, w 90 % odpowiadające poziomowi zanieczyszczenia 1 – 10 mg·kg⁻¹, stwierdzono dla gleb zanieczyszczonych fenantrenem i pirenem. Nie stwierdzono wyraźnej zależności tego wskaźnika (LOEC) od właściwości badanych gleb (Tabela 19 i 19a).

Tabela 20a.

Wskaźniki toksyczności WWA (wyliczone na podstawie pomiaru potencjału nitrifikacji) w fazie wodnej gleby po 15 dniach oddziaływania badanych związków (n=8).

WWA	15 dni								
	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12
EC₂₀ (µg·L⁻¹)									
Ant	<5	n.o.	-	-	-	-	-	-	n.o.
Fen	<5	390	40	172	1269	310	484	<6	n.o.
Pir	62	<3	132*	132*	94	<1	28	<2	76
Ch	-	-	1	n.o.	-	1	-	-	-
4WWA	-	-	386	560	-	<21	-	-	-
3WWA	-	-	205	-	-	-	282	-	259
EC₅₀ (µg·L⁻¹)									
Ant	<5	n.o.	-	-	-	-	-	-	n.o.
Fen	1139	770	557	839	1300*	1247	1295	297	n.o.
Pir	132*	119	132*	132*	132*	132*	132*	132*	132*
Ch	-	-	2*	n.o.	-	2*	-	-	-
4WWA	-	-	863	1052	-	<21	-	-	-
3WWA	-	-	903	-	-	-	749*	-	455*
LOEC (µg·L⁻¹)									
Ant	5	7	-	-	-	-	-	-	45*
Fen	50	7	8	7	31	34	343	6	17
Pir	132*	3	132*	132*	13	1	1	2	7
Ch	-	-	0,5	0,4	-	0,2	-	-	-
4WWA	-	-	342*	929*	-	6088*	-	-	-
3WWA	-	-	348*	-	-	-	207*	-	291*
NOEC (µg·L⁻¹)									
Ant	<5	<7	-	-	-	-	-	-	45*
Fen	5	<7	<8	<7	3	3	34	<6	2
Pir	21	<3	35	31	1	<1	<1	<2	1
Ch	-	-	<0,5	<0,4	-	<0,2	-	-	-
4WWA	-	-	52	313*	-	522*	-	-	-
3WWA	-	-	68	-	-	-	28	-	127*

n.o. – nie zaobserwowano statystycznie istotnej regresji na poziomie $\alpha \leq 0,1$;

* wartości z uwzględnieniem granicy rozpuszczalności;

EC_x wyznaczone z równań regresji liniowej;

LOEC i NOEC – określone w oparciu o analizę wariancji (ANOVA, test LSD, $\alpha \leq 0,05$).

4.3. WYZNACZENIE PRZEWIDYWANEGO STĘŻENIA WWA NIE POWODUJĄCEGO EFEKTÓW TOKSYCZNYCH

W oparciu o uzyskane wartości współczynników toksyczności WWA w stosunku do roślin (podrozdział 4.1.7.) i do mikroorganizmów glebowych (podrozdział 4.2.6.) wyznaczono przewidywane stężenia węglowodorów nie powodujące efektów toksycznych (PNOEC – ang. *Predicted No Observed Effect Concentration*).

W tym celu wykorzystano równanie zaproponowane przez Jensen'a i Folker-Hansen'a [1995]:

$$\text{PNOEC} = \text{najniższa wartość EC}_x \cdot 100^{-1},$$

uwzględniając najniższą wartość współczynnika toksyczności EC_{20} oraz tzw. „współczynnik bezpieczeństwa”, a uzyskane wartości PNOEC przedstawiono w Tabeli 21.

Tabela 21.

Przewidywane stężenia WWA nie powodujące efektów toksycznych (PNOEC – *Predicted No Observed Effect Concentration*).

WWA	PNOEC (mg·kg ⁻¹)	
	rośliny*	mikroorganizmy**
Ant	5,67	0,26
Fen	1,01	0,45
Pir	0,43	2,26
Ch	–	1,21
Σ 4 WWA	1,14	0,15

*) określone na podstawie pomiaru długości łodygi,

***) określone na podstawie pomiaru potencjału nityfikacji.

5. DYSKUSJA

5.1. ODDZIAŁYWANIE WWA NA ROŚLINY

Zanieczyszczenie gleb przez związki z grupy WWA wywierało wpływ na wzrost roślin w początkowym (10 – 14 dni) okresie ich rozwoju. Rośliny w tej fazie wzrostu wykazują szczególną wrażliwość na działanie substancji szkodliwych [Mitchell i in. 1988, Smreczak 1998, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000]. Zaobserwowane efekty obejmowały obniżenie wzrostu części nadziemnych, zmniejszenie plonu świeżej i suchej masy roślin (Załącznik B, Tabele B-1, B-2 i B-3), a także zahamowanie wzrostu korzeni (Rysunki 1 i 2). Szczegółową ocenę oddziaływania WWA na rośliny oparto w tej pracy na pomiarach długości części nadziemnych (stan korzeni nie gwarantował bowiem dokładnych pomiarów). Pomiarów zmian wywoływanych przez WWA w częściach nadziemnych roślin wykorzystywane były też w innych badaniach [Mitchell i in. 1988, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, Gong i in. 2001, Sverdrup 2001, Turek-Szytow i Miksch 2001] oraz zalecane są w normie ISO [11269-2: 1995].

Zaobserwowane efekty obejmowały – w zależności od wpływu czynników uwzględnionych w badaniach – zarówno stymulacje jak i hamowanie wzrostu roślin (Tabela 7, Rysunki 5 i 7).

Stymulujący wpływ WWA na wzrost badanych roślin obserwowano przeważnie przy niższych zawartościach WWA ($\leq 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ale w niektórych przypadkach np. w glebach zanieczyszczonych chryzenem, istotny efekt dodatni był widoczny nawet przy najwyższej zawartości tego węglowodoru rzędu $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tabele 7 i 9, Rysunek 3b). Rośliną najczęściej reagującą dodatnio na obecność WWA był rzepak (Tabela 7, Rysunki 3a, 3b i 7), ale zjawisko to obserwowano i dla pozostałych roślin (Rysunki 1 i 2). Nasiona rzepaku charakteryzują się dużą zawartością tłuszczu rzędu 42 – 49 % [Wilczek 1993], co może sprzyjać stymulującemu oddziaływaniu WWA na wzrost tej rośliny [Smreczak 1998]. Stymulujący wpływ związków o wyższej masie cząsteczkowej na wzrost roślin (np. kapusty i sałaty) w glebach zanieczyszczonych przez WWA notowano również w innych pracach [Kummerova i in. 1995, Smreczak 1998, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000, Fimes i in. 2002]. Według Fimes'a i in. [2002] węglowodory o wyższych

masach i strukturze cząsteczek zbliżonej do giberelin mogą oddziaływać na rośliny jako stymulatory wzrostu. Mechanizm stymulacji wzrostu roślin przy niewielkich zawartościach substancji toksycznych określa się mianem „*hormesis*”, tłumaczony jest specyficzną ewolucją mechanizmu kontroli fizjologicznej w organizmach, w wyniku której obserwuje się nadmierną reakcję na małe odchylenia od normy [Jensen i Folker-Hansen 1995]. Zjawisko to tłumaczone jest również przez: wzrost aktywności mikrobiologicznej w wyniku biodegradacji WWA prowadzący do poprawy warunków rozwoju roślin, możliwość działania WWA jako aktywatorów wzrostu roślin oraz wzrost dostępności składników pokarmowych w glebie spowodowany wiązaniem WWA przez cząstki glabowe [Jensen i Folker-Hansen 1995, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000].

Przy wyższych zawartościach WWA ($> 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) wzrost badanych roślin ulegał w większości przypadków wyraźnemu zahamowaniu (Tabele 7 i 9, Rysunek 7), co pozostaje w zgodzie z wynikami wcześniejszych prac [Mitchell i in. 1988, Sverdrup 2001, Maila i Cloete 2002, Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003]. Mechanizm toksycznego oddziaływania WWA na rośliny został opisany przez Goodman'a i in. [1992] oraz Ren'a i in. [1996]. We wczesnym stadium rozwoju wzrost korzeni roślin zachodzi głównie poprzez rozrost komórek, w mniejszym zaś stopniu przez podziały komórkowe. Obecne wówczas w glebie związki toksyczne (w tym WWA) mogą hamować działanie hormonów wzrostu (np. auksyn) lub wpływać na zmiany metabolizmu komórkowego, mogą również powodować mechaniczne uszkodzenia błon komórkowych [Goodman i in. 1992]. Takie oddziaływanie WWA prowadzi do zmniejszenia zdolności komórek do zatrzymywania wody i składników pokarmowych, co może przejawiać się zmniejszeniem nagromadzenia świeżej masy korzeni przy jednoczesnym braku wpływu na procesy elongacji komórek. Natomiast poprzez utrudnianie transportu substancji odżywczych z korzeni WWA mogą pośrednio wpływać również na wzrost nadziemnych części roślin [Goodman i in. 1992, Ren i in. 1996].

Wpływ WWA na wzrost roślin uzależniony był zarówno od gatunku rośliny, właściwości węglowodorów, poziomu zanieczyszczenia gleb przez WWA, jak i od właściwości badanych gleb (Tabela 4). Najistotniejszym czynnikiem decydującym o oddziaływaniu WWA była wrażliwość gatunkowa roślin, kształtująca się w kolejności: pomidor $>$ pszenica $>$ rzepak (Tabele 7 i 10). W przypadku pomidora pierwsze efekty toksyczne obserwowano już przy zawartości WWA $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Rysunki 5 i 7), a

najniższy odnotowany wskaźnik toksyczności Łd-EC_{20} ($43 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) odpowiadał hamowaniu wzrostu tej rośliny w glebie S9 zanieczyszczonej pirenem (Tabela 10). Natomiast dla pozostałych roślin wyznaczone wartości LOEC były nawet 100 razy wyższe (Tabela 10); istotną inhibicję wzrostu pszenicy i rzepaku stwierdzono dopiero przy poziomie 100 lub $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tabela 9). Wysoką czułość pomidora na zanieczyszczenie gleb przez WWA potwierdzono także w badaniach Maliszewskiej-Kordybach i Smreczak [1999, 2000], gdzie zaobserwowano następującą wrażliwość roślin na zanieczyszczenie gleb mieszaniną 4WWA: pomidor > pszenica > owies \geq fasola > słonecznik > kukurydza.

Oddziaływanie WWA na rośliny było uzależnione również od właściwości gleby (Tabela 6, Rysunki 3a i 3b), ale przy niewielkiej ilości badanych gleb trudno było ustalić istotne zależności pomiędzy właściwościami materiału glebowego a reakcją roślin. Nieco silniejsze efekty toksyczne stwierdzono w przypadku roślin uprawianych na glebie kwaśnej o niskiej zawartości substancji organicznej ($\text{SOM} = 0,95 \%$), a więc w warunkach mniej korzystnych dla ich rozwoju [Wilczek 1993]. Natomiast mniejszą wrażliwość roślin odnotowano na glebach bardziej zasobnych w SOM (Tabela 6, Rysunek 4), co może wiązać się z silniejszą sorpcją WWA przez glebową substancję organiczną [Chiou 1989, Reid i in. 2000, Sijm i in. 2000, Hwang i Cutright 2003], a tym samym z mniejszą ich dostępnością dla roślin [Boesten 1993, Reid i in. 2000, Sijm i in. 2000, Sverdrup 2001, Semple i in. 2003]. Podobną zależność zmniejszenia oddziaływania WWA na wzrost roślin w glebach o wysokiej zawartości substancji organicznej stwierdziły Maliszewska-Kordybach i Smreczak [2000].

Poza parametrami środowiskowymi (gleba, gatunek rośliny) bardzo istotne znaczenie w ocenie fitotoksycznego oddziaływania WWA miały właściwości poszczególnych związków (Tabela 4). Najsilniejsze efekty hamowania wzrostu roślin zanotowano w glebach zanieczyszczonych fenantrenem i pirenem (Tabela 7, Rysunek 5), a znacznie słabsze – antracenenem i chryzenem, węglowodorami o małej rozpuszczalności w wodzie (R_w) i stosunkowo wysokiej hydrofobowości [Sabljić i in. 1995, Terytze i in. 1995, Reid i in. 2000]. Stwierdzono, że fitotoksyczny efekt WWA (Rysunek 6, Tabela 8) uzależniony był przede wszystkim od ich rozpuszczalności w wodzie (współczynniki korelacji od $-0,42$ do $-0,56$). Rozpuszczalność w wodzie jest podstawową cechą wpływającą na dostępność WWA dla roślin, które mogą pobierać te związki z roztworu glebowego. Zawartość WWA w fazie wodnej gleby utożsamiana jest często z biodostępną frakcją tych związków w glebie [Swartz i in. 1995, Reid i in.

2000, Sijm i in. 2000], chociaż wielu badaczy uważa ten problem za dużo bardziej skomplikowany, stosując w celu określenia frakcji biodostępnej WWA bardziej złożone metodyki [Cuypers i in. 2000, Smreczak i Harmsen 2001, Harmsen 2004]. Roztwór glebowy bowiem nie jest czystą wodą, lecz zawiera rozpuszczalne składniki mineralne i organiczne, substancje koloidalne, zawiesiny a także gazy [Uggla 1979, Misztal i in. 1997, Zawadzki 1999]. Taki skład roztworu glebowego prawdopodobnie może zwiększać rozpuszczalność WWA, czego wyrazem może być (zaobserwowany w tej pracy) wzrost efektów toksycznych (Tabela 9) nawet po przekroczeniu granicy rozpuszczalności węglowodorów w wodzie (Rysunek 9, Załącznik A, Tabela A-1).

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach efekt toksyczny mieszaniny 4 lub 3 WWA był niższy (Tabela 7, Rysunek 8) niż suma efektów toksycznych indywidualnych węglowodorów. Może to świadczyć o innym niż narkotyczny [Di Toro i in. 2000, Lin i in. 2004] mechanizmie oddziaływania WWA na rośliny. Niemniej przy ocenie fitotoksyczności WWA zaobserwowano ścisły związek pomiędzy efektami mieszaniny i sumą efektów jej składników. Istotność tego związku wzrastała wraz ze wzrostem zawartości WWA w glebie (przy poziomie $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ efekt mieszaniny można było w około 90 % ocenić na podstawie sumarycznych efektów pojedynczych WWA). Uzyskane wyniki trudno porównać z danymi innych autorów, gdyż w literaturze naukowej brak jest doniesień z tego zakresu.

Wyznaczone w oparciu o pomiar długości łodygi wartości współczynników toksyczności zależały w sposób istotny od gatunku rośliny oraz właściwości badanych związków (Tabele 10 i 11). Najwyższą wrażliwość na obecność WWA wykazywał pomidor, reakcja tej rośliny była najsilniejsza w glebach zanieczyszczonych fenantrenem (EC_{20} : $101\text{-}387 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), pirenem (EC_{20} : $43\text{-}229 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i mieszaniną 4 WWA (EC_{20} : $114\text{-}183 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Tabela 10. Uzyskane wyniki porównano z danymi literaturowymi dotyczącymi toksyczności WWA w stosunku do roślin (Tabela 22). Wartości wyznaczonych wskaźników toksyczności z reguły odpowiadały wynikom innych badań [Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000, Sverdrup 2001]. Jednak w większości przypadków porównywanie uzyskanych rezultatów z wynikami innych prac jest trudne ze względu na fakt, iż dotychczasowe badania prowadzone były w bardzo zróżnicowanych warunkach (testowano różne gatunki roślin i różne węglowodory, część badań prowadzono w glebach, część natomiast w roztworach wodnych) – Tabela 22.

Tabela 22.

Porównanie wyznaczonych wskaźników fitotoksyczności WWA z informacjami z literatury.

roślina	wskaźnik toksyczności (mg·kg ⁻¹)		warunki doświadczenia	literatura
	EC _(x)	NOEC		
kiełkowanie nasion				
sałata proso owies	590 ₍₅₀₎ 1170 ₍₅₀₎ 1815 ₍₅₀₎	190 390 605	Σ WWA, gleba naturalnie zanieczyszczona	Baund-Grasset i in. 1993
owies soja	525 ₍₅₀₎ > 1000 ₍₅₀₎		doświadczenie laboratoryjne, antracen, gleba: SOM 2 %, pH 5,5	Mitchell i in. 1988
rżęzucha rzepa		390	olej mineralny, gleba naturalnie zanieczyszczona	Gong i in. 2001
rżęzucha	50 ₍₂₀₎ 1000 ₍₈₀₎		Σ 5 WWA gleba naturalnie zanieczyszczona	Maila i Cloete 2002
jęczmień gorczyca biała słonecznik		100	doświadczenie laboratoryjne, Σ 4 WWA gleba: SOM 1,4 %, pH 7,0	Smreczak i Maliszewska-Kordybach 2003
rzepak		4*	doświadczenie laboratoryjne, antracen, benzo(a)piren, fluoranten roztwór wodny	Ren i in. 1996
długość korzenia				
sałata proso owies	1200 ₍₅₀₎ 4225 ₍₅₀₎ 4300 ₍₅₀₎		Σ WWA, gleba naturalnie zanieczyszczona	Baund-Grasset i in. 1993
sałata	100 ₍₁₇₎ *		doświadczenie laboratoryjne, benzo(a)piren, roztwór wodny	Kummerova i in. 1995
rzepak	4 ₍₅₀₎ *		doświadczenie laboratoryjne, antracen, benzo(a)piren, fluoranten roztwór wodny	Ren i in. 1996
pszenica owies kukurydza pomidor fasola słonecznik	73 ₍₂₀₎ 96 ₍₂₀₎ 151 ₍₂₀₎ 47 ₍₂₀₎ 90 ₍₂₀₎ 97 ₍₂₀₎		doświadczenie laboratoryjne, Σ 4 WWA 3 gleby: SOM 1,25- 5,54 %, pH 6,8-7,9	Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, 2000

*) stężenie WWA wyrażone w mg·L⁻¹, SOM – zawartość substancji organicznej (ang. *Soil Organic Matter*).

Tabela 22.

Porównanie wyznaczonych wskaźników fitotoksyczności WWA z informacjami z literatury c.d..

roślina	wskaźnik toksyczności (mg·kg ⁻¹)		warunki doświadczenia	literatura
	EC _(x)	NOEC		
długość łodygi				
pszenica	76 ₍₂₀₎	/10	doświadczenie laboratoryjne, Σ 4 WWA 3 gleby: SOM 1,25- 5,54 %, pH 6,8-7,9	Maliszewska-Kordybach i Smreczak 1999, 2000
owies	95 ₍₂₀₎			
kukurydza	138 ₍₂₀₎	100		
pomidor	22 ₍₂₀₎	10		
fasola	110 ₍₂₀₎	100		
słonecznik	125 ₍₂₀₎			
pszenica				
pomidor	43 ₍₂₀₎ -947 ₍₂₀₎	10-500		wyniki niniejszej pracy
rzepak				
świeża masa części nadziemnych				
owies	30 ₍₅₀₎		doświadczenie laboratoryjne, antracen, gleba: SOM 2 %, pH 5,5	Mitchell i in. 1988
soja	> 1000 ₍₅₀₎			
rzeżucha	390 ₍₂₀₎		olej mineralny, gleba naturalnie zanieczyszczona	Gong i in. 2001
rzepa				
koniczyna czerwona	37 ₍₂₀₎ – 140 ₍₂₀₎ 79 ₍₂₀₎ – 710 ₍₅₀₎		doświadczenie laboratoryjne, fluoren, fenantren, piren, fluoranten, gleba: SOM 2,8 %, pH 6,2	Sverdrup 2001
gorczyca biała	77 ₍₂₀₎ – 650 ₍₂₀₎ 480 ₍₂₀₎ – 1600 ₍₅₀₎			
rajgras	300 ₍₂₀₎ – 1300 ₍₂₀₎ 760 ₍₂₀₎ – 1200 ₍₅₀₎			

SOM – zawartość substancji organicznej (ang. *Soil Organic Matter*).

Wyznaczone wartości współczynników toksyczności WWA w stosunku do roślin (Tabela 10) wykorzystano, zgodnie z propozycją Jensen'a i Folker-Hansen'a [1995], do obliczenia przewidywanych stężeń węglowodorów nie powodujących efektów toksycznych (PNOEC) – Tabela 21. Uzyskane wartości PNOEC wynosiły dla gleb zanieczyszczonych antracenenem: 5,67 mg·kg⁻¹, fenantrenem: 1,01 mg·kg⁻¹, pirenem: 0,43 mg·kg⁻¹ i mieszaniną 4 WWA: 1,14 mg·kg⁻¹. Wyznaczone stężenia nie powodujące efektów toksycznych dla antracenu, fenantrenu i pirenu były znacznie wyższe niż graniczne zawartości tych związków (0,1 mg·kg⁻¹) podawane w krajowych regulacjach prawnych dla gleb użytkowanych rolniczo [Rozp. Min. Środ. 2002]. Natomiast wartość dla mieszaniny WWA odpowiada w przybliżeniu wartości granicznej z Rozporządzenia dla Σ 9 WWA. Biorąc pod uwagę, że w Polsce tylko ok. 10 % gleb użytkowanych zawiera WWA w ilości > 1 mg·kg⁻¹ [Terelak i in. 1999, Maliszewska-

Kordybach 2000] problem negatywnego oddziaływania WWA na rośliny na tych obszarach można uważać za bardzo ograniczony.

5.2. ODDZIAŁYWANIE WWA NA AKTYWNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ GLEB

Zanieczyszczenie gleb przez WWA wywierało wpływ na aktywność mikroorganizmów, którą oceniano na dwóch poziomach. Na poziomie populacji oznaczano intensywność oddychania (OD), zaś na poziomie aktywności oznaczano aktywność ogólną – aktywność dehydrogenaz (DH) oraz aktywność specyficzną – potencjał nitrifikacji (NIT). W przypadku aktywności dehydrogenaz i intensywności oddychania stwierdzono słaby toksyczny wpływ WWA (Załącznik C, Tabele C-2, C-3, C-5 i C-6). Są to parametry niespecyficzne, charakteryzujące aktywność metaboliczną całej populacji mikroorganizmów glebowych (bakterie, grzyby, promieniowce), z czego prawdopodobnie wynika ich mniejsza czułość na zmiany zachodzące w agroekosystemie [Rossel i in. 1997, Torstenson 1997, Pankhurst i in. 1998]. W odniesieniu do intensywności oddychania obserwowano często efekty stymulacji aktywności mikroorganizmów utrzymujące się nawet przy najwyższym zastosowanym poziomie zanieczyszczenia gleb ($500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) – Rysunki 11, 12, 13, 14. Nasilenie tych efektów było widoczne zwłaszcza w glebach zanieczyszczonych fenantrenem (Rysunki 11 i 13) i utrzymywało się nawet po 15 dniach oddziaływania węglowodoru (Rysunek 13, Załącznik C, Tabela C-6). Po przesuszeniu i ponownym uwilgotnieniu gleb (co odnosi się do materiału glebowego wykorzystanego w tej pracy), na skutek dominujących procesów rozkładu substancji organicznej, często dochodzi do wtórnej stymulacji rozwoju mikroorganizmów [Gołębiowska 1986]. Procesy te mogą zachodzić intensywniej w obecności łatwo dostępnego źródła węgla i energii, jakim może być np. fenantren [Cerniglia 1993]. Ponadto, po wprowadzeniu WWA do gleby może dochodzić do śmierci niektórych mikroorganizmów, a ich obumarłe komórki są wykorzystywane jako substrat przez pozostałe przy życiu organizmy [Hicks 1990]. Stąd też często możemy stwierdzić tymczasowy efekt inhibicji intensywności oddychania (Rysunek 12), które następnie wraca do wartości zbliżonej do kontroli (Rysunek 14).

Natomiast w odniesieniu do potencjału nitrifikacji w większości przypadków (Rysunki 11, 12, 13 i 14, Załącznik C, Tabele C-1 i C-4) stwierdzono silne toksyczne

oddziaływanie związków z grupy WWA. Potencjał nityfikacji odzwierciedla aktywność specyficznej grupy mikroorganizmów glebowych, które przeprowadzają pierwszy etap nityfikacji autotroficznej w glebach. Bakterie z rodzaju *Nitrosomonas* i *Nitrospira* (utleniające amoniak) są szczególnie wrażliwe na zmiany stanu środowiska, zwłaszcza na działanie substancji szkodliwych [Hicks i in. 1990, Van Beelen i Doelman 1997, Paul i Clark 2000, Boer i Kowalchuk 2001] (stąd wybór tego parametru do oceny oddziaływania WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb w tej pracy). Pomiarzy zarówno intensywności oddychania jak i aktywności enzymatycznej gleb są często stosowane w badaniach toksyczności [Eschenbach i in. 1991, Remde i Hund 1994, Ping i Tieheng 1996, Małachowska-Jutcz i in. 1997, Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2000, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003]. Natomiast niewiele jest danych dotyczących wpływu WWA na aktywność bakterii nityfikacyjnych [Remde i Hund 1994, Ping i Tieheng 1996, Sverdrup 2001], chociaż pomiar tego parametru (podobnie jak intensywność oddychania) zalecany jest w normie ISO [15799: 2003].

Wpływ WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb uzależniony był zarówno od właściwości gleb i poziomu ich zanieczyszczenia przez WWA, jak i od właściwości węglowodorów oraz czasu ich oddziaływania (Tabela 12).

Aktywność mikroorganizmów glebowych (wyrażona wartością potencjału nityfikacji) w dużym stopniu (choć nie największym) zależała od właściwości badanych gleb (Tabela 12). Reakcja mikroorganizmów na obecność WWA uzależniona była głównie od kwasowości gleb (odczyn i kwasowość hydrolityczna) i ich aktywności biologicznej, a także od zawartości węgla organicznego oraz od zawartości frakcji spławialnej i koloidalnej (Tabele 14 i 15). Ogólnie można stwierdzić, iż WWA wykazywały silniejszy toksyczny wpływ na mikroorganizmy w lekkich glebach kwaśnych o stosunkowo niskiej zawartości substancji organicznej (SOM od 1,25 % do 1,59 %), charakteryzujących się ponadto niską aktywnością biologiczną (Tabela 13, Rysunki 15 i 16). W glebach takich niska zawartość substancji organicznej oraz frakcji koloidalnych nie sprzyja sorpcji WWA, a więc większa ilość tych związków jest dostępna dla mikroorganizmów. Poza tym niekorzystne warunki glebowe (np. związane z niskim pH) przyczyniają się do obniżenia aktywności biologicznej i zwiększenia wrażliwości mikroorganizmów na działanie dodatkowych czynników stresowych takich jak obecność zanieczyszczeń [Sverdrup 2001]. W literaturze informacje o zależności ekotoksycznego oddziaływania WWA od właściwości gleb są bardzo ograniczone [Krauss i in. 2000, Maliszewska-Kordybach i in. 2000].

Reakcja mikroorganizmów glebowych na obecność WWA w największym stopniu zależała od zawartości tych związków w glebie (Tabela 12). W glebach mało zasobnych w próchnicę efekty hamowania potencjału nityfikacji obserwowano już przy najniższym zastosowanym stężeniu węglowodorów $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tabela 18, Rysunek 19). Taka zawartość WWA odpowiadała poziomowi zanieczyszczenia gleb użytkowanych rolniczo zarówno w Polsce jak i w innych krajach europejskich [Jensen i Folker-Hansen 1995, VROM 1995, Terelak i in. 1999, Rozp. Min. Środ. 2002]. Przy najwyższym stężeniu WWA $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tabela 16, Rysunki 15, 16 i 19) zaobserwowano prawie całkowite zahamowanie potencjału nityfikacji (stopień hamowania osiągał wartości nawet 96 %) – Tabela 16. W podobnych warunkach (zawartość oleju antracenowego w glebie $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Remde i Hund [1994] również stwierdzili całkowite zahamowanie aktywności nityfikacji. Natomiast Ping i Tieheng [1996] w glebie zanieczyszczonej fenantrenem na poziomie $250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ zanotowali jedynie 6 % inhibicję aktywności nityfikacji.

Toksyczne oddziaływanie WWA na mikroorganizmy glebowe uzależnione było również od właściwości badanych związków (Tabela 12). Najsilniejsze efekty hamowania potencjału nityfikacji zanotowano w glebach zanieczyszczonych antracem i fenantrenem (Rysunki 15 i 17, Tabela 16), a znacznie słabsze – chryzenem, węglowodorem o bardzo niskiej rozpuszczalności w wodzie i wysokiej wartości $\log K_{ow}$ (5,86). Oddziaływanie chryzenu było najsilniej związane z właściwościami gleb, co wydaje się wskazywać na większe powinowactwo sorpcyjne związków o wyższych masach cząsteczkowych do mineralnej i organicznej frakcji gleb [Maliszewska-Kordybach 1993, Swartz i in. 1995, Sijm i in. 2000].

Węglowodory zawierające 2 lub 3 pierścienie aromatyczne w cząsteczce (np. fenantren, antracem) charakteryzuje stosunkowo wysoka rozpuszczalność w wodzie, co decyduje o większej zdolności przechodzenia tych związków do roztworu glebowego i większej ich dostępności [Sabljić i in. 1995, Swartz i in. 1995, Terytze i in. 1995, Reid i in. 2000]. Stwierdzono jednak, że ekotoksyczne oddziaływanie WWA uzależnione było przede wszystkim od wartości współczynnika podziału oktanol/woda (współczynniki korelacji od 0,54 do 0,58) – Tabela 17, Rysunek 18. Parametr ten ($\log K_{ow}$) stosowany jest do opisu powinowactwa sorpcyjnego WWA w stosunku do glebowej substancji organicznej [Bulman i in. 1985, Chiou 1989, Maliszewska-Kordybach 1993, Sabljić i in. 1995, Swartz i in. 1995]. Silna sorpcja WWA na cząsteczkach gleby może prowadzić do zmniejszenia ich biodostępności, a w konsekwencji do redukcji

toksycznego oddziaływania tych związków [Jones i in. 1996, Semple i in. 2003, Harmsen 2004]. Podobnie stosunkowo niską toksyczność lub brak wpływu WWA o wysokiej lipofilności na aktywność mikroorganizmów glebowych wykazali inni badacze [Wilke 1997, Sverdrup 2001].

W celu zweryfikowania hipotezy o addytywności toksyczności związków w mieszaninie [Di Toro i in. 2000, Lin i in. 2004] porównano oddziaływanie pojedynczych WWA z oddziaływaniem ich mieszaniny, przy tym samym poziomie $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ każdego węglowodoru. Podobnie jak w przypadku oddziaływania WWA na rośliny stwierdzono, iż efekty toksyczne powodowane przez mieszaninę 3 lub 4 węglowodorów były znacznie niższe niż suma efektów toksycznych powodowanych przez indywidualne WWA (Rysunek 20). Uzyskane rezultaty wydają się pozostawać w sprzeczności z danymi literaturowymi [Swartz i in. 1995, Di Toro i in. 2000, Sverdrup 2001, Lin i in. 2004] i wskazują raczej na znoszenie się efektów toksycznych WWA w mieszaninie, a więc na ich działanie antagonistyczne niż na addytywność toksyczności. Jednak z uwagi na małą ilość danych porównawczych jednoznaczna interpretacja wyników jest bardzo trudna, a omawiane zagadnienie wymaga dalszego wyjaśnienia.

W ocenie wpływu WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb istotne znaczenie miał również czas oddziaływania tych związków (Tabela 12, Rysunek 22). Jednak trudno było jednoznacznie określić wpływ tego czynnika na zakres oddziaływania WWA. W niektórych przypadkach (kwaśne gleby lekkie o niskiej zawartości substancji organicznej) efekt WWA malał z czasem (Rysunek 22). Wcześniejsze badania [Maliszewska-Kordybach 1993] wykazały, że w glebach lekkich, świeżo zanieczyszczonych przez WWA, rozkład tych związków w początkowym okresie zachodzi stosunkowo szybko; w czasie pierwszych 15 dni odnotowano straty antracenu i pirenu rzędu 20 – 30 %. Straty te mogą być wynikiem zarówno rozkładu mikrobiologicznego, jak i procesów abiotycznych takich jak ulatnianie i „unieruchamianie” (ang. *sequestration*) [Hatzinger i Alexander 1995, Nam i in. 1998, Chung i Alexander 1999, Tang i Alexander 1999, Alexander 2000, Northcott i Jones 2000, Guthrie-Nickols 2003]. Ten ostatni proces, prowadzący do „starzenia” (ang. *aging*) zanieczyszczeń w glebie, ma jednak większe znaczenie w glebach cięższych, o wyższej zawartości substancji organicznej i frakcji koloidalnej [Alexander 2000, Guthrie-Nickols 2003]. Zmniejszenie się zawartości WWA w glebie może więc prowadzić do zaobserwowanego (w okresie 7 – 15 dni) obniżenia efektów toksycznych (Rysunek 19). W glebach cięższych, gdzie spadek zawartości WWA jest przeważnie

niższy [Maliszewska-Kordybach 1993], nie obserwowano wpływu czasu na toksyczne oddziaływanie WWA (Rysunki 19 i 22). Być może efekt ten byłby widoczny przy dłuższych okresach doświadczalnych.

Mikroorganizmy, będące w bezpośrednim kontakcie z glebą, uważane są za najlepsze organizmy wskaźnikowe stanu zanieczyszczenia ekosystemu glebowego, zarówno ze względu na swoją dużą czułość, jak i bardzo szybką reakcję na zmiany stanu środowiska [Torstensson 1997, Van Beelen i Doelman 1997, Pankhurst i in. 1998]. Przeprowadzone badania również wykazały, że ta grupa organizmów silniej reaguje na obecność zanieczyszczeń w glebie niż rośliny, wartości wyznaczonych wskaźników toksyczności były zdecydowanie niższe (Tabele 19 i 20), pierwsze zmiany potencjału nityfikacji (wartości LOEC) obserwowano już przy poziomie zanieczyszczenia $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Wartości wskaźnika LOEC uzyskane w tej pracy były wyraźnie niższe niż podawane dotychczas w literaturze (Tabela 23). Najbardziej zbliżone wyniki podawała Turek-Szytow [2000], która badała aktywność dehydrogenaz po 24 godzinach od zanieczyszczenia gleb przez WWA i uzyskała dla antracenu oraz fenantrenu następujące wartości $EC_{20} = 0,1 - 0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $EC_{50} = 0,5 - 4,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a dla pirenu i chryzenu $EC_{20} = 0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i $EC_{50} = 1,5 - 4,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Zastosowanie „wskaźnika bezpieczeństwa” (ang. „*safety factor*”) pozwoliło wyznaczyć przewidywane stężenie węglowodorów nie wywołujące efektu toksycznego (PNOEC), które dla antracenu wynosiło $0,26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, dla fenantrenu $0,45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, dla pirenu $2,26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, dla chryzenu $1,21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a dla mieszaniny 4 WWA $0,15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Tabela 21). Uzyskane wartości PNOEC w przypadku pojedynczych węglowodorów były na podobnym poziomie (antraceni) lub nieco wyższe (fenantren, piren, chryzen) od podawanych w polskich regulacjach prawnych zawartości granicznych dla tych związków ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [Rozp. Min. Środ. 2002]. Tylko w glebach zanieczyszczonych mieszaniną 4 WWA przewidywane stężenie tych związków nie powodujące efektów toksycznych było znacznie niższe niż podawane w rozporządzeniu zawartości mieszaniny WWA [Rozp. Min. Środ. 2002]. Może to sugerować, iż zawartość $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ podawana jako wartość graniczna dla gleb użytkowanych rolniczo może nie w pełni zabezpieczać ochronę całego agroekosystemu. Jest to szczególnie istotne w przypadkach „awaryjnego” zanieczyszczenia gleb substancjami zawierającymi WWA, gdyż w glebach świeżo zanieczyszczonych oddziaływanie WWA jest z reguły silniejsze. Natomiast w glebach poddawanych działaniu zanieczyszczeń przez dłuższy czas może zachodzić proces „aklimatyzacji” mikroorganizmów glebowych prowadzący

do uruchomienia specyficznych mechanizmów adaptacji, takich jak mutacje czy wzrost populacji mikroorganizmów bardziej odpornych w stosunku do tych zanieczyszczeń [Bleam i Cawthray 1988, Carmichael i Pfaender 1997, Macleod i Semple 2002, Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003].

Tabela 23.

Porównanie wyznaczonych wskaźników toksyczności WWA w stosunku do mikroorganizmów glebowych z informacjami z literatury.

parametr	wskaźnik toksyczności ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)		WWA	czas (dni)	literatura
	EC _(x)	NOEC			
intensywność oddychania, aktywność dehydrogenaz		200	fluoranten	10	Eschenbach i in. 1991
aktywność dehydrogenaz	10 ₍₂₀₎		benzo(a)piren	15	Wilke 1997
aktywność dehydrogenaz	0,1 ₍₂₀₎ -0,5 ₍₂₀₎ 0,5 ₍₅₀₎ -4 ₍₅₀₎		antracen, fenantren, piren, chryzen	1	Turek-Szytów 2000
aktywność dehydrogenaz	560 ₍₅₀₎ -660 ₍₅₀₎		Σ 2 WWA (antracen, piren)	7	Klimkowicz-Pawlas i Maliszewska-Kordybach 2003
aktywność dehydrogenaz	10 ₍₉₀₎ 100 ₍₃₅₎		Σ 4 WWA (fluoren, antracen, piren, chryzen)	15	Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003
liczebność mikroorganizmów		100	Σ WWA (antracen, piren, fenantren)	168	Lee i Banks 1993
liczebność mikroorganizmów		1000	antracen, fenantren, piren, fluoranten, chryzen	450	Mahmood i Rao 1993
aktywność nityfikacji, intensywność oddychania	250 ₍₆₎	250	fenantren		Ping i Tieheng 1996
potencjał nityfikacji	4100 ₍₁₀₀₎		Σ 16 WWA	3	Hund i Traunspunger 1994
potencjał nityfikacji	100 ₍₅₂₎ 500 ₍₁₀₀₎	20	olej (antracen i fenantren)		Remde i Hund 1994
aktywność nityfikacji	13 ₍₁₀₎ -130 ₍₁₀₎	24-79	fluoren, fenantren, piren, fluoranten	30	Sverdrup 2001
potencjał nityfikacji	45 ₍₂₀₎ -444 ₍₂₀₎	1-10	antracen, fenantren, piren, chryzen	7	wyniki niniejszej pracy

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Zanieczyszczenie gleb przez związki z grupy WWA wywierało wpływ zarówno na rośliny w początkowym stadium ich rozwoju jak i na aktywność mikroorganizmów glebowych, przy czym reakcja mikroorganizmów była silniejsza niż reakcja roślin.
2. Reakcja obu badanych grup organizmów wchodzących w skład biocenozy glebowej – roślin i mikroorganizmów – na obecność WWA w glebie uzależniona była zarówno od właściwości WWA jak i od charakterystyki gleb.
3. Podatność roślin na wpływ WWA zależała także od ich gatunku; rośliną najbardziej czułą (a więc najodpowiedniejszą do testów toksyczności) był pomidor. Natomiast najczulszym wskaźnikiem toksycznego oddziaływania WWA na mikrobiologiczne właściwości gleb był potencjał nityfikacji, opisujący aktywność specyficznej grupy mikroorganizmów glebowych.
4. Najistotniejszym czynnikiem wpływającym na toksyczne oddziaływanie WWA w glebie były właściwości tych związków decydujące o ich biodostępności. W przypadku roślin szczególne znaczenie miała rozpuszczalność WWA w wodzie, natomiast przy ocenie aktywności mikrobiologicznej istotniejszy był współczynnik K_{ow} opisujący powinowactwo sorpcyjne WWA do glebowej substancji organicznej.
5. Toksyczne oddziaływanie mieszaniny węglowodorów z grupy WWA było zawsze niższe niż suma efektów jej pojedynczych składników, co może wskazywać na antagonistyczne oddziaływanie WWA w mieszaninie.
6. Właściwości gleb odgrywały główną rolę przy ocenie wpływu WWA na aktywność mikrobiologiczną gleb. Najsilniejsze efekty toksyczne obserwowano w glebach lekkich o kwaśnym odczynie i słabej aktywności biologicznej.
7. Wyznaczone parametry ekotoksyczności WWA wskazują, że aktualne regulacje prawne w Polsce z zakresu ochrony gleb w większości przypadków w zadowalającym stopniu zabezpieczają stan środowiska glebowego i jego funkcje siedliskowe dla roślin i mikroorganizmów.
8. W przyszłości wskazane byłoby uwzględnienie właściwości gleb w procedurach oceny ryzyka ekotoksykologicznego dla gleb zanieczyszczonych przez WWA.

7. LITERATURA

1. Alef K., Nannipieri P. 1995: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press Harcourt Brace & Company, Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
2. Alexander M. 1975: Ekologia mikroorganizmów. PWN, Warszawa.
3. Alexander M. 2000: Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 4259-4265.
4. Alloway B. J., Ayres D. C. 1999: Chemiczne podstawy zanieczyszczenia środowiska. PWN, Warszawa.
5. Aprill W., Sims R. C. 1990: Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 20, 253-365.
6. ATSDR – US Agency for Toxic Substances and Disease Registry Public Health Statement: polycyclic aromatic hydrocarbons 1990.
7. Baran S., Turski R. 1996: Degradacja ochrona i rekultywacja gleb. AR Lublin.
8. Baran S., Bielińska J. E., Oleszczuk P. 2004: Enzymatic activity in airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma*, 118, 221-232.
9. Bauer J.E., Capone D.G. 1988: Effects of co-occurring hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments slurries. *Appl. Environ. Microb.*, 54, 1649-1655.
10. Baund-Grasset F., Baund-Grasset S., Safferman S. I. 1993: Evaluation of the bioremediation of contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, 26, 1365-1374.
11. Baveye P., Bladon R. 1999: Bioavailability of organic xenobiotics in the environment. W: *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment*. Block J.C., Goncharuk V.V., Baveye P. (eds.). NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 227-248.
12. Bleam R.D., Cawthray M.K. 1988: Microbial polynuclear aromatic hydrocarbon degradation - review and case histories. W: *International Conference on Physical, Chemical and Biological Detoxification Hazardous Wastes*. Wu, Yeun C., Technomic (eds.). Lancaster, PA, USA, 868-882.
13. Blum W.E. 1999: The role of soil in a sustainable environment - a holistic approach. *Roczn. Glebozn. (Soil Science Annual)*, t. L, nr 3, 21-28.
14. Boer W., Kowalchuk G. A. 2001: Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms. Review. *Soil Biol. Biochem.*, 33, 853-866.
15. Boesten J.J.T.I. 1993: Bioavailability of organic chemicals in soil related to their concentration in the liquid phase: a review. *The Science of the Total Environment*. Supplement, 397-407.
16. Bulman T.L., Lesage S., Fowlie P.J.A., Webber M.D. 1985: The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil. Petroleum Association for Conservation of the Canadian Environment Report, Ottawa, Canada, No. 85-2.
17. Carmichael L.M., Pfaender K.F. 1997: Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: relationship to soil characteristics and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 666-675.

18. Casida L.E., Klein D.A., Santoro T. 1964: Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98, 371-376.
19. Cerniglia C. E. 1993: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 331-338.
20. Chaîneau C. H., Morel J. L., Oudot J. 1997: Phytotoxicity of plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.*, 26, 1478-1483.
21. Chapman P.M., Caldwell R.S., Chapman P.F. 1996: A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use, *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 77-79.
22. Chiou C.T. 1989: Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. W: *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. Sawhney B.L., Brown K. (eds.). Soil Science Society of America Special Publication, No. 22.
23. Chung N., Alexander M. 1999: Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3605-3608.
24. Cuyper Ch., Grotenhuis T., Joziassse J., Rulkens W. 2000: Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 2057-2063.
25. Dębicki R., Gliński J. 1999: Międzynarodowa konwencja o ochronie gleb, Projekt wg Dokumentu z Tutzing, Niemcy. Lublin.
26. Dick R. P., Breakwell D. P., Turco R. F. 1996: Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. W: *Methods of Assessing Soil Quality*. Doran J. W., Jones A. J. (eds.), Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
27. Di Toro D. M., McGrath J. A., Hansen D. J. 2000: Technical basis for narcotic chemicals and polycyclic aromatic hydrocarbon criteria. I. Water and tissue. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 1951-1970.
28. Dorywalski J., Wojciechowicz M., Bartz J. 1964: Metodyka oceny nasion. PWRiL, Warszawa.
29. Duer I., Fotyma M. 1999: Polski kodeks dobrej praktyki rolniczej. IUNG, Puławy.
30. EC Communication „Towards a Thematic Strategy for Soil Protection”, Bruksela 18 kwietnia 2002.
31. Eijsackers H. 1994: Ecotoxicology of Soil Organisms: Seeking the Way in a Pitch-Dark Labyrinth. W: *Ecotoxicology of Soil Organisms*. Donker H. M., Eijsackers, H., Heimbach F. (eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 3-32.
32. Eschenbach A., Gehlen P., Bierl R. 1991: Untersuchung zum Einfluss von Fluoranthene und Benzo(a)pyren auf Bodenmikroorganismen und zum mikrobiellen Abbau dieser Substanzen. *Mitteilungen d. Dt. Bodenkundlichen Gesellschaft*, 63, 91-94.
33. Fismes J., Perrin-Ganier C., Empereur-Bissonnet P., Morel J. L. 2002: Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic aromatic hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *J. Environ. Qual.*, 31, 1649-1656.
34. Fleischmann S. 2000: Success control of bioremediation at a former armament plant – ecotoxicological tests W: *Contaminated Soil*. Proceedings of the Seventh International FZK/TNO conference on Contaminated Soil. 18-22 September, Lipsk, Niemcy, 1161-1162.

35. Gajda A.M., Martyniuk S., Stachyra A.M., Wróblewska B., Zięba S. 1999: Związki pomiędzy mikrobiologicznymi i biochemicznymi właściwościami gleby a jej produktywnością. W: *Mat. Kongresu Polskiego Towarzystwa Gleboznawczego oraz Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Rola gleby w funkcjonowaniu ekosystemów”*, Lublin, 119-120.
36. Gogolev A., Wilke B.-M. 1997: Combination effects of heavy metals and fluoranthene on soil bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, 25, 274-278.
37. Gołębiowska J. 1986: Mikrobiologia rolnicza. PWRiL, Warszawa.
38. Gong P., Wilke B.-M., Strozzi E., Fleischmann S. 2001: Evaluation and refinement of a continuous germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere*, 44, 491-500.
39. Goodman B. A., the late Allison M. J., Oparka K. J., Hillman J. R. 1992: Xenobiotics: their activity and mobility in plants and soils. *J. Sci. Food Agric.*, 52, 1-20.
40. Guthrie-Nickols E., Grasham A., Kazunga Ch., Sangaiah R., Gold A., Bortiatynski J., Salloum M., Hatcher P. 2003: The effect of aging on pyrene transformation in sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 40-49.
41. Harmsen J. 2004: Landfarming of polycyclic aromatic hydrocarbons and mineral oil contaminated sediments. *Ph.D. Thesis*. Wageningen University, Wageningen, the Netherlands.
42. Hatzinger P. B., Alexander M. 1995: Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.*, 29, 537-545.
43. Heitcamp M.A., Cerniglia C.E. 1987: Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6, 535-546.
44. Hicks R. J., Stotzky G., van Voris P. 1990: Review and Evaluation of the Effects of Xenobiotic Chemicals on Microorganisms in Soil. *Adv. App. Microb.*, 35, 195-253.
45. Hollender J., Althoff K., Mundt M., Dott W. 2003: Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. *Chemosphere*, 53, 269-275.
46. Howard P.H., Banerjee S. 1984: Interpreting results from biodegradability tests of chemicals in water and soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 3, 551-562.
47. Hund K., Traunspunger W. 1994: Ecotox-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29, 371-390.
48. Hund-Rinke K., Koerdel W., Hennecke D., Achazi R., Warnecke D., Wilke B.-M., Winkel B., Heiden S. 2002: Bioassays for the ecotoxicological and genotoxicological assessment of contaminated soils (results of a Round-Robin test). Part II: Assessment of the habitat function of soils - tests with soil microflora and fauna. *J. Soils & Sediments*, 2, 83-90.
49. Hwang S., Cutright T. J. 2003: Statistical implications of pyrene and phenanthrene sorptive phenomena: effects of sorbent and solute properties. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 152-159.
50. ISO 11269-1, 1993: Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth.

51. ISO 11269-2, 1995: Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 1: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.
52. ISO/DIS 14256-1, 1999: Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field moist soils by extraction with potassium chloride solution. – Part 1: Manual method.
53. ISO/DIS 15685, 2001: Soil quality – Determination of potential nitrification – Rapid test by ammonium oxidation.
54. ISO 16072, 2002: Soil quality – Laboratory methods for determination of microbial soil respiration (N65).
55. ISO 15799, 2003: Soil quality – Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials.
56. Jensen J., Folker-Hansen P. 1995: *Soil quality criteria for selected organic compounds*. Danish Environmental Protection Agency. Working Report No. 47.
57. Jones K. C., Alcock R. E., Johnson D. L., Northcott G. L., Semple K. T., Woolgar P. J. 1996: Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land Contamination and Reclamation*, 4, 189-197.
58. Kabata-Pendias A., Pendias H. 1999: *Biogeochemia pierwiastków śladowych*. PWN, Warszawa.
59. Kabata-Pendias A., Piotrowska M., Motowicka-Terelak T., Maliszewska-Kordybach B., Filipiak K., Krakowiak A., Pietruch Cz. 1995: *Podstawy oceny chemicznego zanieczyszczenia gleb: metale ciężkie, siarka i WWA*. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa, 41 pp.
60. Kelsey J. W., Kottler B. D., Alexander M. 1997: Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 214-217.
61. Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B. 2003: Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. *Water Air and Soil Pollution*, 145, 169-186.
62. Kobus J. 1999: Interaction between soil, plant and microorganisms. *Roczn. Glebozn. (Soil Science Annual)*, t. L, nr 3, 89-110.
63. Kopcewicz J., Lewak S. 1998: *Podstawy fizjologii roślin*. PWN, Warszawa.
64. Kördel W., Römbke J. 2001: Requirements on physical, chemical and biological testing methods for estimating the quality of soils and soil substrates. *J. Soils & Sediments*, 1, 98-104.
65. Krauss M., Wilcke W., Zech W. 2000: Availability of PAHs and PCBs to Earthworms in urban soils. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 4335-4340.
66. Kucharski J., Jastrzębska E., Wyszowska J., Hłasko A. 2000: Wpływ zanieczyszczenia gleby olejem napędowym i benzyną ołowiową na jej aktywność enzymatyczną. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 472, 457-464.
67. Kucharski J., Jastrzębska E., Wyszowska J. 2004: Wpływ substancji ropopochodnych na przebieg procesów amonifikacji i nitryfikacji. *Acta Agraria et Silvestria, Series Agraria*, 42: 249-255.
68. Kummerova M., Slovak L., Holoubek I. 1995: Phytotoxicity studies of benzo(a)pyrene with *Lactuca sativa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 51, 197-203.
69. Kunicki-Goldfinger W. 1975: *Życie bakterii*. PWN Warszawa.

70. Lee E., Banks M. K. 1993: Bioremediation of petroleum contaminated soil using vegetation: a microbial study. W: *Petroleum Contaminated Soil*. Robinson J. W. (ed.) Marcel Dekker, Inc.
71. Lin Z., Du J., Yin K., Wang L., Yu H. 2004: Mechanism of concentration addition toxicity: they are different for nonpolar narcotic chemicals, polar narcotic chemicals and reactive chemicals. *Chemosphere*, 54, 1691-1701.
72. Lityński T., Jurkowska H. 1982: Żyzność gleby i odżywianie się roślin. PWN, Warszawa.
73. Mackay D., Shiu W.Y., Ma K.C. 1992: *Illustrated Handbook of Physical-chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Vol. II.*, Lewis Publishers, Boca Raton-Ann Arbor-London-Tokyo.
74. Macleod C.J.A., Semple K.T. 2002: The adaptation of two similar soils to pyrene catabolism. *Environ. Poll.*, 119, 357-364.
75. Mahmood S. K., Rao P. R. 1993: Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Poll.*, 79, 15-20.
76. Maila M. P., Cloete T. E. 2002: Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50, 107-113.
77. Maliszewska-Kordybach B. 1992: Wpływ nawożenia organicznego na trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach. *Arch. Ochr. Środ.*, 2, 153-162.
78. Maliszewska-Kordybach B. 1993: Trwałość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie. *Praca habilitacyjna*, Wyd. IUNG, H (4), Puławy, 81 pp.
79. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 1997: Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the number of soil microflora. W: *Materials of Speciality Conference Management and Fate of Toxic Organics in Sludge Applied to Land*. Copenhagen.
80. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 1999: Fitotoksyczne oddziaływanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach o zróżnicowanych właściwościach. *Roczn. Glebozn.* t. L, nr 1 /2, 15-30.
81. Maliszewska-Kordybach B. 1999: Persistent organic contaminants in the environment: PAHs as a case study. W: *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment.*, Block J.C., Goncharuk V.V, Baveye Ph. (eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 3-34.
82. Maliszewska-Kordybach B. 2000: Organic contaminants in agricultural soils in Central and East European countries as compared to West European countries; example of PAHs. W: *Soil quality, sustainable agriculture and environmental security in central and eastern Europe*. Wilson M. J., Maliszewska-Kordybach (eds.), Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishing, 49-60.
83. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 2000: Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – effect on plants. *Environ. Technol.*, 21, 1099-1110.
84. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., Martyniuk S. 2000: Wpływ wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na mikrobiologiczne właściwości gleb o zróżnicowanej

- kwasowości i zawartości substancji organicznych. *Roczn. Glebozn. (Soil Science Annual)*, t. LI, 3-4, 5-18.
85. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 2003: Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*, 28, 719- 728.
 86. Małachowska-Jutcz A., Mrozowska J., Kozielska M., Miksch K. 1997: Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi. *Biotechnologia*, 1 (36), 79-91.
 87. Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. 2000: Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40, 339-346.
 88. Martyniuk S., Zięba S., Maćkowiak Cz. 1998: Relationship between enzymatic activity of soil and yields of spring barley in a long-term field experiment. *Zesz. Nauk. Akad. Rol. Wrocl.* 332, 31-38.
 89. Menzie C. A., Potocki B. B., Santodonato J. 1992: Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 1278-1284.
 90. Misztal M., Smal H., Wójcikowska-Kapusta A. 1997: Litosfera i jej ochrona. AR Lublin.
 91. Mitchell R. L., Burchett M. D., Pulkownik A., McCluskey L. 1988: Effects of environmentally hazardous chemicals on the emergence and early growth of selected Australian plants. *Plant and Soil*, 112, 195-199.
 92. Motowicka-Terelak T., Terelak H. 1998: Siarka w glebach Polski – stan i zagrożenie. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
 93. Mrozowska J., Zabłocka-Godlewska E., Małachowska-Jutcz A., Twarda B., Kozielska M. 1995: Zmiany aktywności biologicznej gleby w zmodyfikowanych układach modelowych poddanych działaniu WWA. W: *Mat. III Symposium Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”*, Ustroń-Jaszowiec, 195-203.
 94. Myśków W., Stachyra A., Zięba S., Masiak D. 1996: Aktywność biologiczna gleby jako wskaźnik jej żyzności i urodzajności. *Roczn. Glebozn.* t. XLVII, nr 1 /2, 89-99.
 95. Nam K., Chung N., Alexander M. 1998: Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 3785-3788.
 96. Namieśnik J., Jaśkowski J. 1995: Zarys ekotoksykologii. Gdańsk.
 97. Nisbet I.C.T., LaGoy P.K. 1992: Toxic Equivalency Factors (TEFs) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Regular Toxicology and Pharmacology*, 16, 290-300.
 98. Northcott G.L., Jones K.C. 2000: Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ. Poll.* 108: 19-43.
 99. Oleszczuk P., Baran S. 2004: The concentration of mild-extracted polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges. *J. Environ. Sci. Health A*, 11-12(39), 2799-2815.
 100. Ostrowska A., Gawliński K., Szczubiałka Z. 1991: Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin. Instytut Ochrony Roślin, Warszawa.
 101. Pankhurst C.E., Rogers S.L., Gupta V.S.R. 1998: Microbial parameters for monitoring soil pollution. W: *Environmental Biomonitoring: The Biotechnology Ecotoxicology Interface*. Lynch J.M., Wiseman A. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, 46-68.

102. Paul E. A., Clark F. E. 2000: Mikrobiologia i biochemia gleb. UMCS Lublin.
103. Piatt J. J., Brusseau M. L. 1998: Rate-limited sorption of hydrophobic organic compounds by soils with well-characterized organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 1604-1608.
104. Ping G., Tieheng S. 1996: Side-effects of organic and inorganic pollutants on soil nitrification and respiration. *J. Environ. Sci.*, 8, 66-76.
105. Reid B.J., Jones K.C., Semple K.T. 2000: Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments – a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Poll.* 108, 103-112.
106. Remde, A. Hund, K. 1994: Response of soil autotrophic nitrification and soil respiration to chemical pollution in long-term experiments. *Chemosphere*, 29, 2, 391-404.
107. Ren L., Zieler L.F., Dixon D.G., Greenberg B.M. 1996: Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) during germination and early seedling development. *Ecotox. Environ. Safety*, 33, 73-80.
108. Riis V., Babel W., Pucci O. H. 2002: Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere*, 49, 559-568.
109. Roman G., Isnard P., Jonany J.-M. 1999: Critical analysis of methods for assessment of Predicted No-Effect Concentration. *Ecotox. Environ. Saf.*, 43, 117-125.
110. Rossel D., Tarradellas J., Bitton G., Morel J.L. 1997: Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case of dehydrogenase and hydrolytic enzymes. W: *Soil Ecotoxicology*. Tarradellas J., Bitton G., Rossel D. (eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 179-206.
111. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. DzU Nr 165, poz. 1358 i 1359.
112. Sabljic A., Gusten H., Verhaar H., Hermens J. 1995: QSAR modelling of soil sorption. Improvements and systematics of log K_{oc} vs. log K_{ow} correlations. *Chemosphere*, 31, 4489--4514.
113. Scott-Fordsmand J.J., Pedersen M.B. 1995: Soil quality criteria for selected inorganic compounds. Danish Environmental Protection Agency. Working Report No. 48.
114. Semple K. T., Morriss A. W. J., Paton G. I. 2003: Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54, 809-818.
115. Siebielec G. 2001: Wpływ cynku, ołowiu i kadmu na wybrane biologiczne wskaźniki gleb użytkowanych rolniczo w rejonie Tarnowskich Gór. *Praca doktorska*, IUNG, Puławy.
116. Sijm D., Kraaij R., Belfroid A. 2000: Bioavailability in soil and sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environ. Poll.* 108, 113-119.
117. Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. 1995: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Review* 59, 201-222.
118. Smreczak B. 1997: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w układach gleba – roślina wyższa. *Roczn. Glebozn. (Soil Science Annual)*, t. XLVIII, nr 3 / 4, 37-47.
119. Smreczak B. 1998: Rozkład niektórych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w glebie i ich oddziaływanie na wybrane rośliny. *Praca doktorska*, IUNG, Puławy.

120. Smreczak B., Maliszewska-Kordybach B., Martyniuk S. 1999: Effects of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. W: *Bioavailability of Organic Xenobiotics in the Environment*. Block J.C., Goncharuk V.V., Baveye Ph. (eds.). NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 377-380.
121. Smreczak B., Harmsen J. 2001: PAH biodegradation – the role of bioavailability. W: *Proceedings of the First European Bioremediation Conference*. Technical University of Crete, Chania, Greece, 2 – 5 lipca, 67-70.
122. Smreczak B., Maliszewska-Kordybach B. 2003: Seeds germination and root growth of selected plants in PAH contaminated soil. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 946-949.
123. Stuczyński T. I., McCarty G. W., Siebielec G. 2003: Response of soil microbiological activities to cadmium, lead and zinc salt amendments. *J. Environ. Qual.*, 32, 1346-1355.
124. Stuczyński T., Siebielec G., Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., Gawrysiak L. 2004: Wyznaczanie obszarów, na których przekroczone są standardy jakości gleb. *Poradnik metodyczny dla administracji*. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
125. Sverdrup L.E. 2001: Toxicity of tar constituents in terrestrial ecosystem. Effects of eight polycyclic aromatic compounds on terrestrial plants, soil invertebrates and microorganisms. *Ph.D. Thesis*, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo.
126. Swartz R.C., Schults D.W., Ozretich R.J., Lamberson J.O., Cole F.A., DeWitt T.H., Redmond M.S., Ferraro S.P. 1995: ΣPAH: A model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11, 1977-1987.
127. Szember A. 1997: *Zarys mikrobiologii rolniczej*. AR Lublin.
128. Tang J., Alexander M. 1999: Mild extractability and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 18, No. 12, 2711-2714.
129. Tarradellas J., Bitton G. 1997: Chemical pollutants in soils. W: *Soil Ecotoxicology*. Tarradellas J., Bitton G., Rossel D. (eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 3-32.
130. Terelak H., Motowicka-Terelak T., Pondel H., Maliszewska-Kordybach B., Pietruch Cz. 1999: Monitoring chemizmu gleb ornych Polski. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa.
131. Terytze K., Kördel W., Aldag R., Hanel J., Hein D., Keller E., Klein M., Kuhnt G., Müller-Wegener U., Scheunert I., Schmidt M., Spittler M., Von der Trenck K. Th. 1995: Detection and determination limits of priority organic pollutants in soil. *Chemosphere*, 31, 4, 3051-3083.
132. Torstensson, L. 1997: Microbial assays in soil. W: *Soil Ecotoxicology*. Tarradellas J., Bitton G., Rossel D. (eds.), Lewis Publishers, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 207-233.
133. Trenck K. T., Ruf J., Flittner M. 1994: Guide values for contaminated sites. *Environ. Sci. and Pollut. Res.*, 1, 253-261.
134. Turek-Szytów J. 2000: Kontrola i ocena wpływu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) na proces rekultywacji gleb zanieczyszczonych tymi związkami. *Praca doktorska*, Politechnika Śląska, Gliwice.
135. Turek-Szytów J., Miksch K. 2001: Fitotoksyczność oleju antracenowego. W: *Mat. VII Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Biotechnologia Środowiskowa”* Wisła-Jarzębata, 315-325.

136. Uggle, H. 1979: Gleboznawstwo rolnicze. PWN, Warszawa.
137. US Environmental Protection Agency 2000: Ecological Soil Screening Level Guidance. Waszyngton, 10 lipca.
138. Van Beelen P., Doelman P. 1997: Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere*, 34, 455-499.
139. Van Brummelen T. C., Van Hattum B., Crommentuijn T., Kalf D. F. 1998: Bioavailability and ecotoxicity of PAHs. W: *The Handbook of Environmental Chemistry*. Vol. 3, part J: *PAHs and related compounds*. Neilson A. H. (eds.), 203-263.
140. Van de Leemkule M. A., van Hesteren S., Pruijsma M. A. 1998: Minimum soil quality: a use-based approach from ecological perspective: Part 2. Immobile organic micro-pollutants. Technical Soil Protection Committee, The Netherlands, Report TCB R09.
141. Van Straalen N. M., Denneman C. A. J. 1989: Ecotoxicological evaluation of soil quality criteria. *Ecotox. Environ. Saf.*, 18, 241-251.
142. VROM 1995: Leidraad Bodembescherming, Afl. 10.
143. Wilczek M. 1993: Przewodnik do ćwiczeń ze szczegółowej uprawy roślin. AR Lublin.
144. Wild S.R., Jones K.C. 1995: Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Poll.*, 88, 91-108.
145. Wilke B.-M. 1997: Effects of non-pesticide organic pollutants on soil microbial activity. W: *Soils and environment. Soil processes from mineral to landscape scale*. Advances in GeoEcology 30. Auerswald K., Stanjek H., Bigham J. M. (eds.), 117-132.
146. Wyszowska J., Kucharski J. 2004: proces nityfikacji w glebie zanieczyszczonej olejem opałowym. *Roczn. Glebozn. (Soil Science Annual)*, t. LV, nr 2, 517-525.
147. Zabłocka-Godlewska E., Buczkowska-Wesołowska K. 1998: Ocena wpływu wybranych WWA oraz modyfikacji układu na zmiany jakościowo-ilościowe głównych grup mikroorganizmów w glebie piaszczysto-bielicowej. W: *Mat. Ogólnopolskiego Sympozjum Naukowo-Technicznego „Bioremediacja Gruntów”* Wisła-Bukowa, 59-73.
148. Zawadzki S. 1999: Gleboznawstwo. PWRiL, Warszawa.

8. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik A.

Tabela A-1.

Przewidywane stężenia pojedynczych WWA w fazie wodnej gleb wykorzystanych w Serii I doświadczenia (rośliny).

Zawartość w glebie (mg·kg ⁻¹)	Zawartość w fazie wodnej (µg·L ⁻¹)		
	S1	S9	S10
	Ant		
10	97,6 (45)	30,2	22,4
100	976,4 (45)	301,7 (45)	223,8 (45)
500	4882,1 (45)	1508,5 (45)	1118,8 (45)
1000	9764,1 (45)	3017,0 (45)	2237,6 (45)
	Fen		
10	95,4	29,5	21,9
100	954,2	294,8	218,7
500	4770,9 (1300)	1474,1 (1300)	1093,3
1000	9541,8 (1300)	2948,3 (1300)	2186,7 (1300)
	Pir		
10	39,8	12,3	9,1
100	397,8 (132)	122,9	91,2
500	1988,9 (132)	614,5 (132)	455,8 (132)
1000	3977,7 (132)	1229,1 (132)	911,6 (132)
	Ch		
10	5,6 (2)	1,7	1,3
100	56,2 (2)	17,4 (2)	12,9 (2)
500	280,9 (2)	86,8 (2)	64,4 (2)
1000	561,9 (2)	173,6 (2)	128,8 (2)

W nawiasach podano wartości odpowiadające granicy rozpuszczalności WWA w wodzie.

Tabela A-2.
Przewidywane stężenia mieszaniny 4 WWA w fazie wodnej gleb wykorzystanych w Serii I doświadczenia (rośliny) .
Zawartość w glebie (mg·kg⁻¹)
Zawartość w fazie wodnej (µg·L⁻¹)

Σ4WWA	WWA	Ant	Fen	Pir	Ch	Σ4WWA
S1						
10	2,5	24,4	23,9	9,9	1,4	59,6
100	25	244,1 (45)	238,5	99,4	14,0 (2)	596,1 (385)
500	125	1220,5 (45)	1192,7	497,2 (132)	70,2 (2)	2980,7 (1372)
1000	250	2441,0 (45)	2385,4 (1300)	994,4 (132)	140,5 (2)	5961,4 (1479)
S9						
10	2,5	7,5	7,4	3,1	0,4	18,4
100	25	75,4 (45)	73,7	30,7	4,3 (2)	184,2 (151)
500	125	377,1 (45)	368,5	153,6 (132)	21,7 (2)	921,0 (547)
1000	250	754,3 (45)	737,1	307,3 (132)	43,4 (2)	1842,0 (916)
S10						
10	2,5	5,6	5,5	2,3	0,3	13,7
100	25	55,9 (45)	54,7	22,8	3,2 (2)	136,6 (124)
500	125	279,7 (45)	273,3	113,9	16,1 (2)	683,1 (434)
1000	250	559,4 (45)	546,7	227,9 (132)	32,2 (2)	1366,1 (726)

W nawiasach podano wartości odpowiadające granicy rozpuszczalności WWA w wodzie.
Dla Σ4WWA wartości w nawiasach uwzględniają granice rozpuszczalności indywidualnych WWA.

Tabela A-3.
Przewidywane stężenia pojedynczych WWA w fazie wodnej gleb wykorzystanych w Serii II doświadczenia (mikroorganizmy) .

Zawartość w glebie (mg·kg ⁻¹)		Zawartość w fazie wodnej (µg·L ⁻¹)											
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12			
Ant													
1	5,2	7,5	8,5	3,2	3,5	5,8	1,8						
10	51,6 (45)	74,6 (45)	85,2 (45)	32,0	35,1	58,4 (45)	17,8						
100	516,4 (45)	745,9 (45)	852,4 (45)	319,7 (45)	351,0 (45)	583,7 (45)	177,8 (45)						
500	2581,9 (45)	3729,4 (45)	4262,1 (45)	1598,3 (45)	1755,0 (45)	2918,6 (45)	889,1 (45)						
Fen													
1	5,0	7,3	8,3	3,1	3,4	5,7	1,7						
10	50,5	72,9	83,3	31,2	34,3	57,0	17,4						
100	504,6	728,9	833,0	312,4	343,0	570,4	173,8						
500	2523,1(1300)	3644,5(1300)	4165,1(1300)	1561,9(1300)	1715,0(1300)	2852,2(1300)	868,9						
Pir													
1	2,1	3,0	3,5	1,3	1,4	2,4	0,7						
10	21,0	30,4	34,7	13,0	14,3	23,8	7,2						
100	210,4 (132)	303,9 (132)	347,3 (132)	130,2	143,0 (132)	237,8 (132)	72,4						
500	1051,8 (132)	1519,3 (132)	1736,3 (132)	651,1 (132)	715,0 (132)	1189,0 (132)	362,2 (132)						
Ch													
1		0,5	0,4	0,2									
10		4,9 (2)	4,4 (2)	2,0									
100		49,1 (2)	44,1 (2)	20,2 (2)									
500		245,3 (2)	220,7 (2)	101,0 (2)									

W nawiasach podano wartości odpowiadające granicy rozpuszczalności WWA w wodzie.

Tabela A-4. Przewidywane stężenia mieszaniny 4 WWA w fazie wodnej gleb wykorzystanych w Serii II doświadczenia (mikroorganizmy).

Zawartość w glebie (mg·kg ⁻¹)		Zawartość w fazie wodnej (µg·L ⁻¹)				
Σ4WWA	WWA	Ant	Fen	Pir	Ch	Σ4WWA
S4						
10	2,5	21,3	20,8	8,7	1,2	52,0
100	25	213,1 (45)	208,3	86,8	12,3 (2)	520,4 (342)
400	100	852,1 (45)	833,0	347,3 (132)	49,1 (2)	2081,8 (1012)
500	125	1065,5 (45)	1041,3	434,1 (132)	61,3 (2)	2602,2 (1220)
S5						
10	2,5	19,2	18,7	7,8	1,1	46,8
100	25	191,8 (45)	187,4	78,1	11,0 (2)	468,4 (313)
400	100	767,2 (45)	749,7	312,5 (132)	44,1 (2)	1873,6 (929)
500	125	959,0 (45)	937,1	390,7 (132)	55,2 (2)	2342,0 (1116)
S7						
10	2,5	8,8	8,6	3,6	0,5	21,4
100	25	87,7 (45)	85,8	35,7	5,0 (2)	214,3 (168)
400	100	351,0 (45)	343,0	143,0 (132)	20,2 (2)	857,2 (522)
500	125	438,7 (45)	428,8	178,7 (132)	25,2 (2)	1071,5 (608)

W nawiasach podano wartości odpowiadające granicy rozpuszczalności WWA w wodzie.

Dla Σ4WWA wartości w nawiasach uwzględniają granice rozpuszczalności indywidualnych WWA.

Tabela A-5. Przewidywane stężenia mieszaniny 3 WWA w fazie wodnej gleb wykorzystanych w Serii II doświadczenia (mikroorganizmy).

Zawartość w glebie (mg·kg ⁻¹)		Zawartość w fazie wodnej (µg·L ⁻¹)				
Σ3WWA	WWA	Ant	Fen	Pir	Σ3WWA	
S4						
10	3,3	28,4	27,8	11,6	67,7	
100	33	284,1 (45)	277,7	115,8	677,6 (438)	
300	100	852,4 (45)	833,0	347,3 (132)	2032,7 (1010)	
500	167	1420,7 (45)	1388,4 (1300)	578,8 (132)	3387,8 (1477)	
S8						
10	3,3	11,7	11,4	4,8	27,9	
100	33	117,0 (45)	114,3	47,7	279,0 (207)	
300	100	351,0 (45)	343,0	143,0 (132)	837,0 (520)	
500	167	585,0 (45)	571,7	238,3 (132)	1395,0 (749)	
S12						
10	3,3	5,9	5,8	2,4	14,1	
100	33	59,3 (45)	57,9	24,1	141,3 (127)	
300	100	177,8 (45)	173,8	72,4	424,0 (291)	
500	167	296,4 (45)	289,6	120,7	706,7 (455)	

W nawiasach podano wartości odpowiadające granicy rozpuszczalności WWA w wodzie.
Dla Σ3WWA wartości w nawiasach uwzględniają granice rozpuszczalności indywidualnych WWA.

Załącznik B.

Tabela B-1. Reakcja pszenicy na zanieczyszczenie gleb przez WWA.

WWA	stężenie (mgkg ⁻¹)	Łd* (cm)			Kd* (cm)			SwM* (mg)			SM* (mg)		
		S1	S9	S10	S1	S9	S10	S1	S9	S10	S1	S9	S10
Ant	kontrola 0	22,1±2,1	25,1±0,1	24,7±1,6	7,1±0,8	7,3±0,5	6,8±0,2	108±2,0	108±1,0	156±9,0	16,4±1,5	17,5±0,6	15,7±0,1
	10	23,4±1,2	25,5±0,9	25,4±0,4	7,3±0,3	7,1±0,2	9,0±1,3	106±0,1	156±3,0	194±4,0	17,8±2,4	18,9±0,7	18,0±0,2
	100	22,1±2,0	25,2±1,2	26,3±0,4	6,9±0,5	7,1±0,2	7,6±0,2	101±3,0	130±4,0	190±7,0	16,1±1,3	18,3±0,8	17,6±1,7
	500	21,3±0,8	25,6±1,3	24,8±0,1	7,1±0,1	6,7±0,4	8,2±0,5	93±3,0	128±2,0	180±17,0	14,9±0,8	17,5±1,0	17,7±1,8
	1000	20,9±1,0	24,5±0,5	24,0±0,4	7,0±0,3	6,9±0,3	5,3±0,2	84±4,0	174±8,0	168±18,0	14,5±1,5	20,0±0,1	17,6±0,6
Fen	kontrola 0	22,1±2,1	25,1±0,1	24,7±1,6	7,1±0,8	7,3±0,5	6,8±0,2	108±2,0	108±1,0	156±9,0	16,4±1,5	17,5±0,6	15,7±0,1
	10	22,6±0,1	24,3±0,1	25,5±0,2	7,2±0,2	6,7±0,3	8,2±0,4	98±6,0	144±2,0	219±2,0	15,6±1,0	15,7±0,2	17,8±1,0
	100	19,5±1,9	22,3±0,2	23,5±0,1	7,0±0,2	6,5±1,0	6,1±0,1	97±5,0	110±1,0	190±0,1	14,1±0,2	14,9±0,2	15,8±0,3
	500	14,5±0,3	18,0±0,3	19,8±0,9	6,7±0,1	6,3±0,1	7,4±1,3	89±8,0	116±4,0	198±2,0	13,6±1,0	13,6±1,8	14,8±0,1
	1000	12,7±0,2	17,3±0,1	20,8±0,3	6,5±0,3	5,8±0,5	8,3±0,1	86±6,0	103±0,1	188±4,0	13,5±0,2	13,5±1,8	16,1±0,6
Pir	kontrola 0	22,1±2,1	25,1±0,1	24,7±1,6	7,1±0,8	7,3±0,5	6,8±0,2	108±2,0	108±1,0	156±9,0	16,4±1,5	17,5±0,6	15,7±0,1
	10	23,3±0,6	26,1±0,2	25,9±0,1	7,8±0,4	7,6±0,3	8,1±1,4	128±7,0	209±2,0	228±2,0	15,5±1,7	18,9±1,8	17,1±0,5
	100	22,6±0,2	24,8±0,8	25,3±0,1	6,8±0,4	6,9±0,2	7,5±0,1	108±5,0	200±4,0	223±2,0	15,3±0,3	17,9±0,3	17,0±0,1
	500	21,8±0,2	23,4±0,8	24,4±0,2	7,0±0,1	6,5±0,1	8,3±0,4	118±2,0	184±2,0	223±7,0	16,0±0,2	17,1±0,4	16,3±0,4
	1000	18,3±0,1	23,0±0,5	22,7±0,1	7,0±0,1	6,3±0,1	6,3±1,0	116±2,0	178±7,0	212±3,0	15,1±0,4	17,1±0,4	16,0±0,1
Ch	kontrola 0	22,1±2,1	25,1±0,1	24,7±1,6	7,1±0,8	7,3±0,5	6,8±0,2	108±2,0	108±1,0	156±9,0	16,4±1,5	17,5±0,6	15,7±0,1
	10	22,2±0,8	23,4±0,9	24,6±1,0	7,4±0,5	7,0±0,2	7,8±0,2	126±3,0	197±10,0	222±5,0	14,5±1,2	17,0±0,1	16,5±0,8
	100	21,9±0,2	24,4±0,3	25,9±0,6	7,1±0,1	7,0±0,1	9,7±0,5	122±6,0	199±20,0	210±4,0	13,9±1,8	16,7±1,0	16,4±0,8
	500	20,8±0,3	24,1±0,2	25,8±0,9	7,2±0,8	6,3±0,3	8,1±0,1	128±2,0	192±7,0	206±6,0	14,6±0,2	17,7±0,7	16,3±0,4
	1000	19,2±0,2	24,0±1,5	24,6±1,3	7,6±0,4	6,1±1,3	8,0±0,5	115±4,0	195±5,0	201±7,0	14,0±0,2	17,6±0,1	15,0±1,8
4 WWA	kontrola 0	22,1±2,1	25,1±0,1	24,7±1,6	7,1±0,8	7,3±0,5	6,8±0,2	108±2,0	108±1,0	156±9,0	16,4±1,5	17,5±0,6	15,7±0,1
	10	21,2±1,6	25,0±0,9	21,9±3,6	7,3±0,1	7,2±0,5	9,0±0,5	113±6,0	198±20,0	201±1,0	13,2±0,7	18,1±2,1	13,7±0,1
	100	22,3±0,1	23,8±0,8	24,4±0,8	6,4±0,5	7,1±0,2	8,9±0,1	116±8,0	193±2,0	192±6,0	16,4±0,0	17,2±1,9	13,8±0,3
	500	18,8±2,4	20,8±0,1	23,0±0,2	7,0±0,6	6,9±0,4	7,5±0,3	96±6,0	178±3,0	196±3,0	13,3±0,8	17,1±0,4	14,5±0,3
	1000	16,0±1,3	19,1±1,0	20,2±1,9	6,7±0,2	6,2±0,1	7,5±0,1	85±0,1	149±13,0	152±2,0	12,3±0,5	15,1±0,6	12,8±0,6

Łd - długość łodygi; Kd - długość korzenia; SM - sucha masa części nadziemnych; SwM - świeża masa części nadziemnych;

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (n = 6)

Tabela B-2. Reakcja pomidora na zanieczyszczenie gleb przez WWA.

WWA	stężenie (mg kg ⁻¹)	Łd* (cm)			Kd* (cm)			SwM* (mg)			SM* (mg)		
		S1	S9	S10	S1	S9	S10	S1	S9	S10	S1	S9	S10
		kontrola 0	5,6±0,1	5,3±0,1	6,4±0,1	1,0±0,2	1,3±0,2	1,6±0,1	23±2,0	53±3,0	62±3,0	2,7±0,7	3,1±0,4
10	5,0±0,4	5,0±0,3	6,1±0,1	1,0±0,1	1,1±0,2	1,2±0,1	39±1,0	60±4,0	57±4,0	3,6±0,1	3,9±0,2	4,4±0,1	
100	5,1±0,3	5,2±0,2	5,9±0,7	0,9±0,2	1,6±0,2	1,1±0,1	34±1,0	53±2,0	55±5,0	2,9±0,2	3,4±0,1	4,0±0,1	
500	4,6±0,1	5,0±0,1	5,9±0,2	1,1±0,2	1,5±0,1	1,6±0,1	31±8,0	55±0,1	52±3,0	2,8±0,3	3,5±0,3	3,7±0,1	
1000	3,9±0,1	5,2±0,5	4,6±0,7	1,0±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1	20±3,0	51±2,0	37±1,0	1,9±0,4	3,4±0,3	3,6±0,1	
Fen	kontrola 0	5,6±0,1	5,3±0,1	6,4±0,1	1,0±0,2	1,3±0,2	1,6±0,1	23±2,0	53±3,0	62±3,0	2,7±0,7	3,1±0,4	5,7±0,5
10	4,3±0,5	5,4±0,4	5,5±0,2	1,1±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1	30±4,0	62±5,0	55±5,0	2,9±0,2	3,8±0,2	3,7±0,1	
100	4,0±0,8	4,6±0,3	4,9±0,8	1,1±0,1	1,5±0,1	1,1±0,2	25±5,0	46±2,0	53±0,1	2,7±0,3	3,3±0,4	3,9±0,1	
500	3,4±1,3	3,8±0,2	2,9±0,2	0,9±0,2	1,6±0,1	1,3±0,1	16±0,1	37±0,1	13±3,0	2,2±0,1	2,9±0,1	2,2±0,1	
1000	1,2±1,6	2,9±0,3	2,7±0,1	0,4±0,6	0,9±0,1	1,2±0,1	17±0,1	27±1,0	11±1,0	1,8±0,1	2,3±0,1	2,3±0,3	
Pir	kontrola 0	5,6±0,1	5,3±0,1	6,4±0,1	1,0±0,2	1,3±0,2	1,6±0,1	23±2,0	53±3,0	62±3,0	2,7±0,7	3,1±0,4	5,7±0,5
10	5,0±0,4	4,9±0,2	5,7±0,6	1,1±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	43±2,0	54±2,0	43±5,0	3,4±0,1	3,2±0,1	4,0±0,3	
100	4,0±0,5	3,8±0,2	4,9±0,1	0,8±0,2	1,6±0,1	1,5±0,1	34±0,1	39±0,1	35±3,0	3,3±0,4	2,6±0,1	3,5±0,1	
500	3,6±0,4	3,3±0,3	4,4±0,3	0,8±0,1	1,4±0,2	1,4±0,1	32±1,0	34±0,1	23±3,0	3,1±0,3	2,4±0,2	3,2±1,8	
1000	3,4±0,1	3,6±0,2	3,9±0,1	0,9±0,1	1,4±0,2	1,1±0,1	20±0,1	32±1,0	21±0,1	3,1±0,6	2,2±0,2	3,0±0,1	
Ch	kontrola 0	5,6±0,1	5,3±0,1	6,4±0,1	1,0±0,2	1,3±0,2	1,6±0,1	23±2,0	53±3,0	62±3,0	2,7±0,7	3,1±0,4	5,7±0,5
10	6,1±0,5	5,1±0,2	6,4±0,1	1,2±0,2	1,5±0,1	1,7±0,5	59±0,1	59±7,0	33±3,0	4,1±0,1	3,5±0,3	4,0±0,1	
100	5,9±0,1	5,1±0,5	6,4±0,2	1,1±0,1	1,3±0,3	1,4±0,1	57±1,0	59±5,0	47±3,0	4,1±0,2	3,8±0,1	4,1±0,2	
500	6,0±0,1	5,0±0,1	6,0±0,2	1,2±0,2	1,4±0,2	1,2±0,4	62±2,0	56±4,0	43±1,0	5,0±0,1	3,9±0,1	3,8±0,4	
1000	4,9±0,1	5,1±0,1	5,2±0,1	1,0±0,3	1,4±0,4	1,0±0,1	46±2,0	57±3,0	36±1,0	3,7±0,1	3,9±0,1	3,3±0,1	
4 WWA	kontrola 0	5,6±0,1	5,3±0,1	6,4±0,1	1,0±0,2	1,3±0,2	1,6±0,1	23±2,0	53±3,0	62±3,0	2,7±0,7	3,1±0,4	5,7±0,5
10	5,5±0,3	5,1±0,5	5,6±0,5	1,1±0,2	1,6±0,3	1,2±0,2	39±5,0	61±5,0	38±5,0	3,9±0,6	4,2±0,2	3,2±0,5	
100	3,3±0,1	4,2±0,2	5,5±0,2	0,9±0,1	1,2±0,1	1,0±0,1	23±0,1	51±7,0	36±2,0	2,5±0,1	3,5±0,2	3,0±0,1	
500	2,6±0,3	2,7±0,2	3,9±0,2	1,1±0,1	1,1±0,2	0,9±0,1	9±0,1	32±5,0	22±4,0	0,8±0,1	2,5±0,3	2,5±0,1	
1000	2,3±0,4	2,4±0,1	2,8±0,4	1,0±0,7	1,1±0,1	1,3±0,1	4±0,1	22±1,0	14±0,1	0,2±0,1	2,1±0,2	1,9±0,1	

Łd - długość łodygi; Kd - długość korzenia; SM - sucha masa części nadziemnych; SwM - świeża masa części nadziemnych;
*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (n = 6)

Tabela B-3. Reakcja rzepaku na zanieczyszczenie gleb przez WWA.

WWA	stężenie (mg.kg ⁻¹)	Łd* (cm)						Kd* (cm)						SwM* (mg)						SM* (mg)							
		S1		S9		S10		S1		S9		S10		S1		S9		S10		S1		S9		S10			
Ant	kontrola 0	6,9±0,5	7,1±0,1	7,9±0,3	1,2±0,2	2,7±0,7	2,1±0,3	66±0,1	26±0,1	47±4,0	4,6±0,1	4,4±0,8	4,8±0,2	10	7,1±0,4	7,5±0,1	8,4±0,4	1,6±0,1	2,1±0,3	2,0±0,3	65±1,0	27±7,1	43±3,0	4,5±0,1	4,9±0,4	4,4±0,1	
	100	7,6±0,1	6,7±0,4	8,6±0,1	1,2±0,2	2,3±0,9	2,1±0,1	64±0,0	25±3,1	54±3,0	4,6±0,2	4,5±0,2	4,2±0,1	500	6,7±0,1	7,0±1,0	8,1±0,3	1,5±0,1	2,4±0,2	2,0±0,2	65±4,0	25±7,1	55±0,1	4,3±0,1	4,7±0,6	4,2±0,6	
	1000	6,6±0,2	6,4±0,2	7,7±0,1	1,7±0,1	2,5±0,8	2,7±0,1	71±2,0	23±5,1	61±4,0	4,9±0,2	3,9±0,5	4,6±0,2	Fen	kontrola 0	6,9±0,5	7,1±0,1	7,9±0,3	1,2±0,2	2,7±0,7	2,1±0,3	66±0,1	26±0,1	47±4,0	4,6±0,1	4,4±0,8	4,8±0,2
	10	7,0±0,4	7,3±0,7	9,4±0,1	1,6±0,2	2,5±0,1	2,1±0,3	54±0,0	30±0,1	61±2,0	3,9±0,1	4,8±0,2	4,6±0,1	100	5,5±0,3	6,3±0,1	8,6±0,6	1,5±0,2	2,0±0,1	2,2±0,3	46±4,0	25±0,1	54±0,1	3,9±0,3	4,4±0,1	4,5±0,6	
	500	4,7±0,3	5,1±0,1	6,5±0,6	1,5±0,1	2,8±0,5	2,4±0,1	47±2,0	24±0,1	51±5,0	4,0±0,3	4,3±0,2	4,5±0,1	1000	4,6±0,1	4,0±0,1	6,3±0,7	1,4±0,1	1,6±0,5	2,1±0,3	49±3,0	17±0,1	38±2,0	3,7±0,4	4,2±0,1	4,4±0,3	
Pir	kontrola 0	6,9±0,5	7,1±0,1	7,9±0,3	1,2±0,2	2,7±0,7	2,1±0,3	66±0,1	26±0,1	47±4,0	4,6±0,1	4,4±0,8	4,8±0,2	10	7,9±0,4	6,7±0,5	9,8±0,2	1,5±0,2	1,9±0,1	2,4±0,1	78±2,0	28±3,0	60±1,0	4,4±0,1	4,9±0,6	4,8±0,3	
	100	7,7±0,1	6,4±0,6	8,6±0,1	1,5±0,1	2,0±0,5	2,6±0,3	73±2,0	29±3,0	59±1,0	4,2±0,2	4,6±0,2	4,3±0,2	500	6,5±0,1	6,6±0,1	8,3±0,2	1,8±0,5	1,9±0,2	2,5±0,1	62±5,0	23±1,0	62±2,0	4,0±0,1	4,3±0,3	4,6±0,1	
	1000	6,2±0,2	5,5±0,1	7,3±0,5	1,8±0,3	1,8±0,3	2,1±0,1	63±3,0	22±1,0	54±1,0	4,1±0,1	3,4±0,1	4,5±0,2	Ch	kontrola 0	6,9±0,5	7,1±0,1	7,9±0,3	1,2±0,2	2,7±0,7	2,1±0,3	66±0,1	26±0,1	47±4,0	4,6±0,1	4,4±0,8	4,8±0,2
	10	8,5±0,1	7,2±0,3	10,4±0,1	1,3±0,1	2,1±0,2	2,6±0,4	93±3,0	29±1,0	62±2,0	4,9±0,1	5,4±0,4	4,7±0,3	100	8,7±0,2	6,0±0,1	9,4±0,3	1,4±0,1	1,7±0,3	2,4±0,2	92±1,0	26±0,1	53±0,1	4,6±0,1	5,0±0,2	4,3±0,1	
	500	8,2±0,2	6,5±0,2	8,7±1,5	1,4±0,6	2,4±0,1	2,1±0,6	81±3,0	27±4,0	54±2,0	4,1±0,3	5,1±0,5	4,4±0,2	1000	7,9±0,6	6,2±0,1	8,1±0,6	1,5±0,1	2,0±0,1	2,2±0,3	87±3,0	22±3,0	53±2,0	4,3±0,8	4,8±0,1	4,5±0,3	
4 WWA	kontrola 0	6,9±0,5	7,1±0,1	7,9±0,3	1,2±0,2	2,7±0,7	2,1±0,3	66±0,1	26±0,1	47±4,0	4,6±0,1	4,4±0,8	4,8±0,2	10	8,6±0,4	6,7±0,1	8,7±0,3	1,6±0,1	1,8±0,1	2,4±0,6	95±4,0	37±1,0	66±3,0	4,8±0,3	5,6±0,6	4,7±0,1	
	100	6,6±0,2	6,6±0,5	8,6±0,1	1,4±0,1	2,1±0,2	2,5±0,3	80±1,0	29±3,0	64±1,0	4,2±0,3	5,3±0,2	4,2±0,1	500	5,7±0,6	4,7±0,1	8,5±0,2	2,7±0,1	1,4±0,1	2,8±0,4	69±0,1	18±1,0	53±0,1	3,7±0,3	5,1±0,3	4,2±0,2	
	1000	5,3±0,2	4,7±0,1	7,3±0,2	1,7±0,1	2,0±0,1	2,5±0,1	57±8,0	17±0,1	41±4,0	3,5±0,4	4,7±0,4	4,3±0,1	4 WWA	kontrola 0	6,9±0,5	7,1±0,1	7,9±0,3	1,2±0,2	2,7±0,7	2,1±0,3	66±0,1	26±0,1	47±4,0	4,6±0,1	4,4±0,8	4,8±0,2
	10	8,6±0,4	6,7±0,1	8,7±0,3	1,6±0,1	1,8±0,1	2,4±0,6	95±4,0	37±1,0	66±3,0	4,8±0,3	5,6±0,6	4,7±0,1	100	6,6±0,2	6,6±0,5	8,6±0,1	1,4±0,1	2,1±0,2	2,5±0,3	80±1,0	29±3,0	64±1,0	4,2±0,3	5,3±0,2	4,2±0,1	
	500	5,7±0,6	4,7±0,1	8,5±0,2	2,7±0,1	1,4±0,1	2,8±0,4	69±0,1	18±1,0	53±0,1	3,7±0,3	5,1±0,3	4,2±0,2	1000	5,3±0,2	4,7±0,1	7,3±0,2	1,7±0,1	2,0±0,1	2,5±0,1	57±8,0	17±0,1	41±4,0	3,5±0,4	4,7±0,4	4,3±0,1	

Łd - długość łodygi; Kd - długość korzenia; SM - sucha masa części nadziemnych; SwM - świeża masa części nadziemnych;
 *) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe (n = 6)

Załącznik C.

Tabela C-1. Potencjał nityfikacji (NIT) w glebach zanieczyszczonych przez WWA po 7 dniach oddziaływania tych związków.

WWA	stężenie (mg kg ⁻¹)	NIT* (µg NO ₂ ⁻ · g s.m. ⁻¹)									
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12	
Ant	kontrola 0	0,53±0,02	0,64±0,05	0,37±0,10		0,21±0,07	0,17±0,01	0,94±0,15	0,29±0,04	0,65±0,05	
	1	0,45±0,03	0,50±0,03	0,23±0,04		0,25±0,12	0,13±0,05	0,94±0,08	0,37±0,11	0,53±0,06	
	10	0,35±0,05	0,48±0,02	0,29±0,05		0,31±0,08	0,13±0,05	0,85±0,14	0,39±0,08	0,54±0,09	
	100	0,40±0,05	0,37±0,03	0,23±0,04		0,29±0,05	0,08±0,01	0,71±0,15	0,15±0,04	0,46±0,05	
	500	0,08±0,02	0,25±0,03	0,23±0,04		0,21±0,05	0,08±0,01	0,38±0,05	0,21±0,04	0,13±0,03	
Fen	kontrola 0	0,55±0,04	0,43±0,04	0,99±0,04	0,67±0,02	4,62±0,21	2,66±0,16	3,04±0,15	0,13±0,01	1,90±0,07	
	1	0,50±0,03	0,27±0,02	0,98±0,05	0,66±0,05	4,17±0,16	2,7±0,08	2,80±0,08	0,13±0,01	1,73±0,07	
	10	0,60±0,02	0,25±0,03	0,97±0,04	0,52±0,02	3,90±0,20	2,54±0,08	2,72±0,12	0,04±0,01	1,70±0,04	
	100	0,80±0,08	0,09±0,02	0,73±0,04	0,24±0,02	3,01±0,17	1,99±0,08	2,70±0,15	0,00±0,00	1,42±0,08	
	500	0,85±0,05	0,04±0,00	0,61±0,02	0,15±0,02	2,63±0,17	1,11±0,07	2,27±0,20	0,00±0,00	1,08±0,05	
Pir	kontrola 0	2,36±0,25	0,15±0,02	0,87±0,05	0,63±0,02	3,44±0,20	0,49±0,02	2,92±0,01	0,09±0,02	0,86±0,08	
	1	3,56±0,06	0,10±0,02	0,74±0,02	0,53±0,02	3,12±0,07	0,58±0,02	2,84±0,07	0,04±0,01	0,85±0,14	
	10	3,91±0,25	0,09±0,02	0,59±0,02	0,58±0,01	3,25±0,25	0,59±0,03	2,72±0,05	0,04±0,01	0,83±0,02	
	100	3,96±0,13	0,04±0,01	0,48±0,02	0,53±0,02	2,83±0,08	0,49±0,02	2,57±0,05	0,00±0,00	0,80±0,02	
	500	4,15±0,10	0,00±0,00	0,40±0,02	0,54±0,08	2,76±0,08	0,49±0,02	1,81±0,07	0,00±0,00	0,76±0,02	
Ch	kontrola 0			1,35±0,12	0,30±0,02		0,96±0,02				
	1			1,30±0,08	0,21±0,02		1,15±0,03				
	10			1,10±0,04	0,17±0,02		1,10±0,04				
	100			0,96±0,05	0,21±0,02		1,06±0,02				
	500			0,90±0,04	0,14±0,01		0,95±0,02				
4 WWA	kontrola 0			0,71±0,04	0,26±0,02		1,01±0,03				
	10			0,63±0,08	0,23±0,02		0,96±0,07				
	100			0,53±0,05	0,15±0,02		0,84±0,10				
	400			0,13±0,02	0,00±0,00		0,77±0,06				
	500			0,09±0,02	0,00±0,00		0,66±0,02				
3 WWA	kontrola 0			1,55±0,10				2,33±0,15		4,59±0,27	
	10			1,33±0,05				2,61±0,11		3,75±0,35	
	100			0,96±0,07				2,46±0,04		3,06±0,25	
	300			0,52±0,04				2,25±0,11		3,57±0,18	
	500			0,25±0,05				2,26±0,15		3,09±0,18	

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe, n = 4 (2 powtórzenia x 2 oznaczenia)

Tabela C-2. Aktywność dehydrogenaz (DH) w glebach zanieczyszczonych przez WWA po 7 dniach oddziaływania tych związków.

WWA	stężenie (mg.kg ⁻¹)	DH* (µg TPF.g s.m. ⁻¹)											
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12			
Ant	kontrola 0	11,62±1,57	9,33±2,00	2,59±0,22		19,32±0,66	30,06±4,22	35,2±4,72	11,99±0,99	28,60±2,09			
	1	9,91±1,24	4,09±0,74	2,56±0,37		25,54±2,65	28,24±2,72	58,15±5,50	16,63±1,33	24,99±1,05			
	10	9,35±1,60	3,61±0,76	2,68±0,31		21,25±4,07	28,49±1,90	55,19±4,42	22,00±0,94	28,92±5,70			
	100	10,32±0,58	4,63±2,15	3,83±0,41		17,72±2,79	28,62±2,24	48,12±1,16	15,76±1,91	57,83±5,80			
	500	9,97±1,76	7,48±0,82	3,40±0,80		14,40±1,50	39,23±3,34	43,32±4,19	12,35±1,29	57,24±3,46			
Fen	kontrola 0	60,88±3,02	14,05±0,47	45,19±2,35	62,65±0,86	106,86±3,19	104,91±1,06	89,50±2,45	62,35±2,77	135,76±2,77			
	1	73,11±2,52	12,89±0,51	44,39±1,72	64,48±2,68	104,05±1,97	106,03±1,82	80,17±1,46	66,90±2,86	139,99±4,38			
	10	51,75±3,04	13,53±0,58	46,70±2,62	66,68±2,53	108,04±2,82	117,75±2,22	90,53±3,51	68,39±3,80	140,16±3,73			
	100	59,50±2,22	14,16±0,61	46,59±3,46	61,57±1,29	101,33±1,95	104,98±1,61	90,84±2,99	66,45±2,35	128,37±2,97			
	500	68,20±2,35	12,13±0,59	34,54±2,64	62,56±0,95	102,57±3,39	93,05±2,08	70,15±3,43	65,96±1,16	109,38±3,55			
Pir	kontrola 0	61,08±1,64	9,37±0,47	23,96±1,00	28,26±1,88	57,14±2,73	59,68±2,47	53,82±1,06	31,59±1,75	87,78±2,26			
	1	54,87±1,14	8,59±0,36	23,41±1,50	27,17±1,30	55,26±3,43	57,21±2,26	61,30±2,50	27,44±1,88	86,13±2,32			
	10	56,40±0,90	7,66±0,34	23,19±1,34	31,77±1,93	55,62±2,44	55,81±2,37	53,53±2,07	31,51±1,51	80,96±2,15			
	100	47,80±1,68	15,15±0,74	21,52±1,66	31,22±2,00	55,78±1,75	55,49±2,16	59,48±2,59	40,44±2,13	85,50±3,61			
	500	42,96±1,77	14,62±0,58	20,05±1,18	32,23±2,26	55,36±2,51	68,76±2,46	50,56±3,87	36,50±0,88	71,58±3,04			
Ch	kontrola 0			14,53±1,10	35,02±2,16		63,37±2,37						
	1			17,34±0,97	34,90±2,58		62,15±3,87						
	10			15,35±0,64	35,67±1,84		62,72±1,65						
	100			15,22±0,92	32,99±1,88		63,66±2,35						
	500			13,02±0,84	32,94±1,73		64,46±2,31						
4 WWA	kontrola 0			25,74±1,57	41,29±1,76		71,36±1,22						
	10			25,14±1,36	49,65±2,64		68,32±1,64						
	100			23,91±1,25	48,39±1,68		66,09±2,34						
	400			17,99±0,29	37,87±1,85		62,16±2,09						
	500			15,86±1,52	41,70±2,52		54,17±1,46						
3 WWA	kontrola 0			20,42±1,11				46,31±2,17		86,71±4,18			
	10			21,53±0,94				33,74±1,76		90,77±2,39			
	100			20,21±2,27				31,57±1,38		81,61±3,38			
	300			17,54±1,50				32,18±1,71		80,80±2,36			
	500			20,13±1,57				32,56±2,09		80,73±2,54			

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe, n = 6 (2 powtórzenia x 3 oznaczenia)

Tabela C-3. Intensywność oddychania (OD) w glebach zanieczyszczonych przez WWA po 7 dniach oddziaływania tych związków.

WWA	stężenie (mg kg ⁻¹)	OD* (μg CO ₂ g s.m. ⁻¹ h ⁻¹)									
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12	
Ant	kontrola 0	3,91±0,31	3,54±0,30	1,49±0,21		1,50±0,15	2,49±0,19	4,31±0,42	3,42±0,61	5,79±0,28	
	1	2,84±0,11	3,18±0,29	1,41±0,14		1,64±0,12	3,47±0,30	3,17±0,10	2,24±0,49	6,20±0,32	
	10	3,06±0,43	3,71±0,09	1,68±0,04		1,77±0,02	2,80±0,07	3,60±0,17	3,12±0,82	6,85±0,14	
	100	3,52±0,28	2,67±0,19	1,98±0,12		1,81±0,06	2,54±0,14	3,49±0,23	3,19±0,08	5,95±0,32	
	500	3,34±0,18	3,31±0,12	1,57±0,22		1,81±0,04	2,48±0,14	4,44±0,25	3,37±0,26	6,36±0,23	
Fen	kontrola 0	3,40±0,08	1,78±0,13	1,48±0,03	3,43±0,08	1,49±0,05	4,69±0,15	4,94±0,29	4,22±0,15	7,01±0,21	
	1	3,52±0,32	2,77±0,21	1,23±0,06	2,02±0,04	1,61±0,03	4,99±0,22	4,81±0,17	7,30±0,15	5,65±0,26	
	10	3,34±0,16	2,57±0,12	2,42±0,10	3,26±0,17	2,31±0,26	5,83±0,38	4,78±0,66	6,49±0,55	8,39±1,09	
	100	6,79±0,06	1,33±0,12	5,16±0,17	3,54±0,32	4,45±0,31	5,92±0,33	4,80±0,14	5,73±0,10	9,63±0,13	
	500	11,60±0,12	1,68±0,13	4,52±0,09	5,88±0,30	9,33±0,13	10,38±0,07	5,22±0,07	9,59±0,18	12,67±0,29	
Pir	kontrola 0	2,38±0,21	1,06±0,07	2,73±0,16	3,68±0,18	1,52±0,29	3,36±0,24	4,82±0,20	2,26±0,17	5,62±0,80	
	1	2,68±0,18	2,72±0,18	2,42±0,20	4,31±0,32	1,17±0,03	3,19±0,65	3,68±0,29	3,54±0,19	4,58±0,24	
	10	1,64±0,13	3,24±0,52	2,29±0,26	2,55±0,25	1,44±0,14	3,13±0,36	5,49±0,29	3,37±0,14	5,39±0,21	
	100	2,97±0,18	2,99±0,29	1,21±0,06	3,51±0,23	1,56±0,17	2,94±0,16	4,45±0,18	3,28±0,07	5,22±0,21	
	500	3,95±0,20	2,90±0,17	1,82±0,10	3,35±0,71	1,11±0,17	2,96±0,10	4,81±0,37	2,35±0,18	5,55±0,29	
Ch	kontrola 0										
	1										
	10										
	100										
	500										
4 WWA	kontrola 0										
	10										
	100										
	400										
	500										
3 WWA	kontrola 0										
	10										
	100										
	300										
	500										

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe, n = 6 (2 powtórzenia x 3 oznaczenia)

Tabela C-4. Potencjał nityfikacji (NIT) w glebach zanieczyszczonych przez WWA po 15 dniach oddziaływania tych związków.

WWA	stężenie (mg kg ⁻¹)	NIT* (µg NO ₂ ⁻ · g s.m. ⁻¹)											
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12			
Ant	kontrola 0	0,14±0,02	0,39±0,05	1,11±0,05	1,95±0,11	5,76±0,20	2,01±0,06	3,96±0,16	0,68±0,04	0,06±0,02			
	1	0,06±0,02	0,10±0,02	0,95±0,03	1,60±0,10	5,73±0,18	1,95±0,05	4,11±0,15	0,43±0,04	0,06±0,02			
	10	0,04±0,00	0,11±0,04	0,81±0,05	1,73±0,10	5,95±0,05	1,71±0,05	4,25±0,11	0,37±0,04	0,12±0,03			
	100	0,04±0,00	0,13±0,02	0,38±0,04	1,10±0,04	5,56±0,11	1,48±0,06	2,49±0,25	0,27±0,02	0,11±0,02			
	500	0,04±0,00	0,12±0,03	0,08±0,01	0,52±0,04	4,56±0,10	1,00±0,06	2,16±0,08	0,13±0,01	0,13±0,03			
Fen	kontrola 0	0,25±0,03	0,22±0,02	0,40±0,04	0,43±0,02	1,68±0,03	0,53±0,02	1,40±0,06	0,13±0,01	1,26±0,02			
	1	0,23±0,02	0,26±0,02	0,38±0,02	0,45±0,04	1,63±0,03	0,38±0,03	1,26±0,06	0,09±0,02	1,27±0,02			
	10	0,18±0,02	0,23±0,02	0,39±0,02	0,45±0,02	1,57±0,04	0,45±0,04	1,09±0,04	0,09±0,02	1,15±0,03			
	100	0,13±0,02	0,08±0,01	0,35±0,02	0,40±0,02	1,25±0,09	0,38±0,03	0,92±0,02	0,09±0,02	1,10±0,04			
	500	0,13±0,02	0,04±0,01	0,31±0,02	0,40±0,02	1,22±0,03	0,24±0,02	0,72±0,03	0,08±0,01	1,14±0,09			
Pir	kontrola 0	0,66±0,10	0,29±0,05	0,93±0,03	0,70±0,04	1,68±0,05	1,68±0,05	1,68±0,05	0,13±0,01	0,99±0,04			
	1	0,64±0,08	0,21±0,05	0,83±0,04	0,51±0,02	1,53±0,02	1,53±0,02	1,53±0,02	0,09±0,02	0,98±0,03			
	10	0,60±0,04	0,21±0,05	0,84±0,04	0,54±0,01	1,16±0,05	1,16±0,05	1,16±0,05	0,09±0,02	0,91±0,04			
	100	0,43±0,04	0,19±0,04	0,58±0,05	0,49±0,02	1,20±0,05	1,20±0,05	1,20±0,05	0,09±0,02	0,80±0,07			
	500	0,37±0,05	0,08±0,01	0,56±0,02	0,44±0,02	0,76±0,04	0,76±0,04	0,76±0,04	0,08±0,01	0,67±0,02			
Ch	kontrola 0			0,78±0,06	0,45±0,04		1,18±0,03						
	10			0,73±0,04	0,48±0,02		1,06±0,09						
	100			0,70±0,00	0,45±0,02		1,08±0,05						
	400			0,40±0,04	0,27±0,02		1,15±0,04						
	500			0,14±0,02	0,19±0,02		1,17±0,11						
4 WWA	kontrola 0			0,77±0,05	0,45±0,04		1,18±0,03						
	10			0,73±0,05	0,48±0,02		1,06±0,09						
	100			0,48±0,02	0,45±0,02		1,08±0,05						
	400			0,28±0,04	0,27±0,02		1,15±0,04						
	500			0,26±0,04	0,19±0,02		1,17±0,11						
3 WWA	kontrola 0			0,77±0,05	0,45±0,04		1,18±0,03						
	10			0,73±0,05	0,48±0,02		1,06±0,09						
	100			0,48±0,02	0,45±0,02		1,08±0,05						
	300			0,28±0,04	0,27±0,02		1,15±0,04						
	500			0,26±0,04	0,19±0,02		1,17±0,11						
							1,19±0,06		1,67±0,10				
							1,14±0,05		1,61±0,02				
							0,98±0,03		1,50±0,07				
							0,82±0,05		1,20±0,07				
							0,59±0,02		1,19±0,03				

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe, n = 4 (2 powtórzenia x 2 oznaczenia)

Tabela C-5. Aktywność dehydrogenaz (DH) w glebach zanieczyszczonych przez WWA po 15 dniach oddziaływania tych związków.

WWA	stężenie (mg kg ⁻¹)	DH* (µg TPF g s.m. ⁻¹)									
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12	
Ant	kontrola 0	11,83±1,13	6,65±0,54	4,19±0,59		27,54±2,71	23,96±1,04	41,26±1,73	18,36±1,27	25,24±1,13	
	1	10,55±0,86	6,72±1,60	4,54±0,45		24,36±2,00	27,50±1,99	44,21±3,59	22,36±1,83	24,30±3,90	
	10	9,16±2,02	5,67±2,19	4,54±0,43		23,15±2,17	27,04±1,65	55,16±4,64	21,63±2,27	33,47±3,47	
	100	10,75±1,30	5,43±0,54	4,48±0,58		23,59±2,13	28,32±3,49	39,16±3,53	24,64±2,58	32,80±6,33	
	500	12,08±0,88	6,69±1,19	3,81±0,34		23,01±2,40	24,63±2,12	46,35±2,75	16,61±1,42	32,82±6,82	
Fen	kontrola 0	117,04±3,80	20,50±1,21	52,12±2,21	68,20±2,80	125,38±3,84	139,58±3,46	151,23±4,38	60,77±2,43	70,78±2,19	
	1	111,63±2,87	27,18±0,82	49,17±2,69	64,33±1,19	126,32±4,86	124,44±2,03	153,47±5,54	50,95±3,99	67,63±3,04	
	10	110,65±3,68	32,74±1,40	44,75±2,89	66,69±0,87	123,68±3,19	120,68±5,94	154,33±3,64	59,84±1,83	69,40±2,20	
	100	115,06±3,00	35,89±1,75	44,95±2,52	79,32±3,13	109,75±2,37	119,77±4,04	151,77±6,72	61,70±3,64	62,29±2,22	
	500	111,17±3,01	30,17±1,32	54,81±2,04	93,39±1,90	99,73±3,27	106,31±4,11	151,51±3,95	63,34±1,87	59,27±2,76	
Pir	kontrola 0	51,62±2,65	9,24±0,54	26,63±1,04	28,22±1,75	54,06±2,19	70,10±3,00	43,07±1,32	27,29±1,52	84,10±2,03	
	1	50,79±3,30	10,46±0,64	29,59±1,93	26,18±1,67	52,28±2,35	68,82±2,70	41,06±2,37	33,69±2,41	83,99±2,90	
	10	41,97±1,24	8,85±0,29	23,93±0,75	27,37±1,27	54,57±3,91	54,66±1,11	41,97±2,39	32,17±1,33	71,35±3,17	
	100	37,23±1,94	8,89±0,44	18,10±1,05	27,32±1,33	53,43±2,53	57,06±2,81	43,73±3,10	38,61±2,35	73,10±0,94	
	500	37,67±1,03	10,12±0,76	23,73±1,75	23,34±0,97	55,34±1,18	67,28±3,14	47,42±2,56	38,26±1,01	83,61±3,25	
Ch	kontrola 0			24,27±1,16	36,09±0,97		59,32±2,23				
	1			25,70±1,77	34,58±2,57		57,62±2,40				
	10			25,23±1,34	32,77±1,08		58,46±1,57				
	100			23,84±1,75	34,65±0,72		58,14±1,95				
	500			22,82±1,15	29,96±1,31		61,40±1,25				
4 WWA	kontrola 0			29,11±2,88	36,65±1,06		66,00±2,06				
	10			24,82±1,49	36,09±0,91		60,98±1,92				
	100			22,02±1,23	27,59±1,10		52,14±1,41				
	400			14,17±0,35	22,36±1,36		45,90±1,10				
	500			15,48±0,47	14,48±1,64		35,79±1,26				
3 WWA	kontrola 0			25,24±1,74				49,76±2,56		87,26±1,44	
	10			23,84±1,19				42,77±1,02		80,75±2,61	
	100			21,31±2,01				41,11±3,45		78,12±2,16	
	300			19,26±1,30				41,70±1,91		69,35±3,66	
	500			16,11±1,05				42,94±1,94		63,01±0,87	

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe, n = 6 (2 powtórzenia x 3 oznaczenia)

Tabela C-6. Intensywność oddychania (OD) w glebach zanieczyszczonych przez WWA po 15 dniach oddziaływania tych związków.

WWA	stężenie (mg·kg ⁻¹)	OD* (µg CO ₂ ·g s.m. ⁻¹ ·h ⁻¹)									
		S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S11	S12	
Ant	kontrola 0	3,50±0,06	1,31±0,09	1,41±0,22		2,61±0,26	2,09±0,27	3,88±0,42	3,36±0,22	4,13±0,58	
	1	3,17±0,37	1,07±0,06	2,02±0,07		3,16±0,17	3,00±0,07	5,32±0,48	1,74±0,16	6,40±0,23	
	10	3,08±0,11	1,14±0,05	2,17±0,04		2,50±0,20	2,79±0,39	4,08±0,68	1,61±0,17	5,73±0,21	
	100	4,31±1,13	1,04±0,10	2,28±0,10		2,43±0,18	2,39±0,24	4,65±0,33	2,08±0,15	4,53±0,07	
	500	3,98±0,29	1,32±0,29	1,69±0,28		3,02±0,29	2,62±0,22	4,37±0,20	2,53±0,21	3,99±0,09	
Fen	kontrola 0	4,15±0,85	1,75±0,09	0,72±0,13	2,52±0,21	1,71±0,07	1,93±0,03	2,11±0,08	2,63±0,13	3,80±0,05	
	1	2,22±0,12	1,27±0,08	0,74±0,22	1,17±0,09	1,81±0,05	2,03±0,08	2,47±0,30	2,11±0,13	2,80±0,25	
	10	3,24±0,18	1,18±0,10	1,66±0,08	1,24±0,34	1,27±0,04	1,57±0,05	4,37±0,10	3,53±0,28	3,91±0,07	
	100	4,55±0,38	2,39±0,11	2,29±0,18	1,08±0,05	2,14±0,14	2,45±0,11	5,23±0,36	3,31±0,11	4,21±0,50	
	500	5,36±0,57	6,78±0,30	5,62±0,23	2,38±0,02	8,11±0,09	6,84±0,51	9,11±0,12	6,68±0,50	6,45±0,12	
Pir	kontrola 0	2,69±0,09	0,97±0,05	1,87±0,10	3,31±0,05	1,65±0,14	2,09±0,10	3,99±0,14	2,65±0,12	5,22±0,36	
	1	2,56±0,25	0,83±0,06	2,26±0,07	2,29±0,36	2,88±0,40	3,21±0,32	3,63±0,33	4,29±0,17	5,81±0,44	
	10	2,51±0,17	0,60±0,09	3,61±0,20	5,32±0,49	3,23±0,25	2,39±0,28	3,56±0,26	3,53±0,15	4,31±0,12	
	100	2,29±0,17	0,71±0,12	3,16±0,06	3,61±0,30	2,23±0,12	1,55±0,11	4,30±0,23	3,78±0,45	4,67±0,18	
	500	3,39±0,16	1,13±0,11	2,83±0,22	3,20±0,08	1,98±0,72	1,97±0,15	4,46±0,19	3,28±0,46	4,75±0,21	
Ch	kontrola 0										
4 WWA	kontrola 0										
	10										
	100										
	400										
	500										
3 WWA	kontrola 0										
	10										
	100										
	300										
	500										

*) średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe, n = 6 (2 powtórzenia x 3 oznaczenia)

