



Biodostępność i bioakumulacja hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych.

Część I. Informacje ogólne

Patryk Oleszczuk

Pracownia Rekultywacji Gleb i Gospodarki Odpadami,
Instytut Gleboznawstwa i Kształtowania Środowiska,
Akademia Rolnicza, Lublin

Bioavailability and bioaccumulation of hydrophobic organic pollutants. Part I. General remarks

Summary

Contaminants entering the soil environment as by-products of industrial or technological processes undergo various transformations. Some easily undergo degradation, volatilization or leaching, some are accumulated in the living organisms, while others get strongly bound to soil components through sorption, sequestration or bound-residue formation. In literature, it has been proved that the above mentioned processes considerably limit the bioavailability of contaminants and hence the effectiveness of biodegradation is lowered. The present study is a review of the literature on the issue of bioavailability of persistent organic pollutants for microorganisms and soil invertebrates. The first part presents some definitions of bioavailability and bioaccumulation proposed by various authors. Factors influencing the process of biodegradation have also been described with special attention drawn to their relation to the processes of bioavailability.

Key words:

organic contaminants, bioavailability, bioaccumulation, bioconcentration, ecotoxicology, remediation, soil, sediment, sequestration, bound-residue.

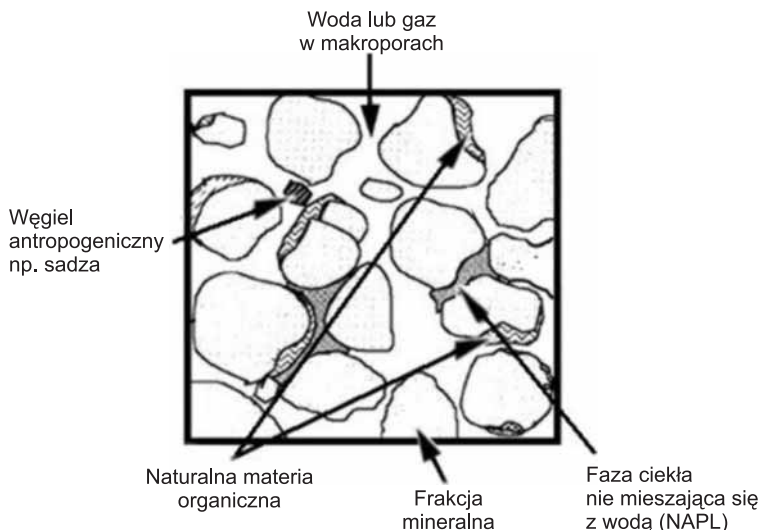
Adres do korespondencji

Patryk Oleszczuk,
Pracownia Rekultywacji
Gleb
i Gospodarki Odpadami,
Instytut Gleboznawstwa
i Kształtowania
Środowiska,
Akademia Rolnicza,
ul. Leszczyńskiego 7,
20-069 Lublin;
e-mail:
patryk.oleszczuk@
ar.lublin.pl

1. Wstęp

Hydrofobowe zanieczyszczenia organiczne (HZO) obejmują obszerną grupę związków, które łączą w sobie dużą trwałość w środowisku oraz niejednokrotnie wysokie właściwości mutagenne, kancerogenne i toksyczne. Z powodu powinowactwa do tłuszczów, większości z nich, mogą one akumulować się w poszczególnych ogniwach łańcucha pokarmowego, stwarzając dodatkowe potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Związki te ze względu na apolarny charakter często również określane są jako hydrofobowe zanieczyszczenia organiczne (HZO). Z uwagi na wiele źródeł powstawania HZO (1), obecne są one we wszystkich elementach środowiska. Ocenia się jednak, że w około 90%, ostatecznie ulegają one akumulacji w glebach (2).

Zanieczyszczenia, które dostają się do środowiska glebowego podlegają różnym przemianom. Pewna ich część łatwo ulega rozkładowi, ulatnianiu bądź wymywaniu, inne akumulują się w organizmach żywych, a jeszcze inne silnie łączą się ze składnikami gleby. Z punktu widzenia ekotoksykologii oraz remediacji gleb zanieczyszczonych przez te związki pożądane staje się ich usunięcie. Jednym z czynników, który w dużej mierze decyduje o efektywności rozkładu/akumulacji HZO w glebach i osadach dennych jest ich dostępność dla (mikro-)organizmów. Gleba i osad denny – zwane niekiedy wspólnie geosorbentami (3) – to złożone układy w których oddziaływania z zanieczyszczeniami organicznymi zależą od ich właściwości oraz budowy. Na rysunku 1 przedstawiono przykładową budowę oraz możliwe oddziaływania cząsteczki hydrofobowego zanieczyszczenia organicznego z geosorbentem.



Rys. 1. Uproszczony schemat budowy geosorbenta (3).

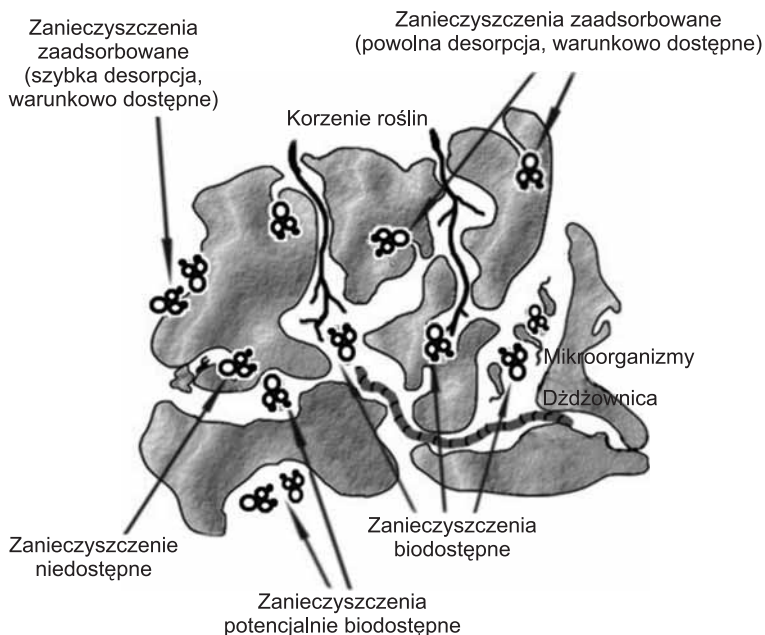
W zależności od rodzaju i siły tych oddziaływań zanieczyszczenie wykazuje różny zakres dostępności dla (mikro-)organizmów.

W pierwszej części pracy przedstawiono najczęściej stosowane definicje związane z zagadnieniem biodostępności oraz bioakumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych. Opisano również czynniki mające wpływ na proces biodegradacji zwracając szczególną uwagę na jego powiązanie z procesem biodostępności.

2. Biodostępność – stosowane definicje

W literaturze można spotkać szereg definicji biodostępności (4-7), które niejednokrotnie są dyskusyjne i nie obejmują wszystkich aspektów dotyczących opisywanego zagadnienia. Generalnie termin **biodostępność definiuje się jako całkowitą zawartość zanieczyszczenia w glebie lub osadzie dennym, znajdującą się w stanie wolnym (nie będącą trwale związaną z matrycą), które to zanieczyszczenie jest lub może być pobrane przez organizm** (4,8). Przedstawiona definicja stanowi w pewnym stopniu rdzeń, który przez różnych autorów podlega uściśleniom bądź rozszerzeniom uwzględniającym dodatkowe czynniki i procesy. Na przykład w definicji zaproponowanej przez ECETOC (5) za biodostępną uważa się tę frakcję zanieczyszczenia, która posiada zdolność do współdziałania z biosystemem mikroorganizmu. Z kolei Spacie i Hamelink (9) definiują biodostępność jako koncentrację substancji chemicznej obecnej w środowisku albo pewną część tej substancji, która jest potencjalnie dostępna i może podlegać procesom biologicznym. Według jednej z definicji zaproponowanych w Raplocie NRC (6) jako **frakcję biodostępną określa się taką koncentrację zanieczyszczenia, która dostępna jest dla organizmu na drodze absorpcji poprzez systemy życiowe, lub taką ilość, która powoduje efekt toksyczny**.

W przytoczonych definicjach za frakcję biodostępną uznaje się zatem tę część substancji, która jest dostępna w danej chwili. Gleba jest złożonym dynamicznym układem. W takich układach zanieczyszczenie, mimo że w danym momencie jest wolne (np. znajduje się w wodzie glebowej) nie jest fizycznie dostępne dla organizmu (rys. 2). Ograniczenie fizycznej dostępności zanieczyszczeń może nastąpić m.in. w wyniku okluzji wewnątrz formujących się cząsteczek materii organicznej. W określonych jednak warunkach – na skutek różnych procesów zachodzących w glebie – może dojść do uwolnienia tych zanieczyszczeń bądź ułatwienia ich kontaktu z organizmem. Semple i in. (7) w celu rozróżnienia rzeczywiście w danym czasie biodostępnych zanieczyszczeń, jak również tych, które w krótkim czasie mogą również stać się biodostępne zaproponowali pojęcia biodostępny (ang. *bioavailable*) oraz potencjalnie biodostępny (ang. *bioaccessible*). Zgodnie z prezentowanymi definicjami za biodostępne zanieczyszczenie uważa się to, które w danym czasie może swobodnie przejść z matrycy (gleba, osad denny itp.) poprzez błonę komórkową do wnętrza organizmu. Wewnątrz komórki ksenobiotyk może ulegać szeregu procesom, takim jak np. akumulacja, asymilacja, transformacja i degradacja. Według cytowanych autorów (7) za



Rys. 2. Biodostępne i potencjalnie biodostępne zanieczyszczenia organiczne w glebie na podstawie (7).

potencjalnie biodostępny przyjmuje się składnik (zanieczyszczenie), który może przejść ze środowiska poprzez błonę komórkową do wnętrza organizmu, pod warunkiem, że organizm ma dostęp do tego składnika. W tym przypadku zanieczyszczenie jest „wolne”, brak jest jednak jego fizycznego kontaktu z organizmem (rys. 2). W prezentowanych definicjach za biodostępny uważa się zarówno składnik, który jest podatny na biodegradację oraz składnik, który może ulegać bioakumulacji w organizmach.

3. Biokoncentracja i bioakumulacja zanieczyszczeń

Biokoncentrację/bioakumulację ksenobiotyku wyraża się w postaci współczynnika biokoncentracji/bioakumulacji, który definiowany jest jako stosunek stężenia zanieczyszczenia w organizmie (często wyrażany w przeliczeniu na lipidy) do jego zawartości w danym elemencie środowiska (gleba, woda, osad denny) (często wyrażany w przeliczeniu na zawartość węgla organicznego).

$$BASF = \frac{C_t / f_l}{C_s / f_{oc}}$$

gdzie:

C_t – stężenie zanieczyszczenia w organizmie; f_l – zawartość lipidów w organizmie; C_s – zawartość zanieczyszczenia w matrycy (gleba, osad denny, itp.); f_{oc} – zawartość węgla organicznego w matrycy.

Należy uściślić, że rozważany w tej pracy szczególny rodzaj sytuacji i wskaźnika, jakim jest współczynnik BSAF (ang. *biota-sediment accumulation factor*) odnosi się do akumulacji w układzie organizm-osad (lub gleba). Wartości powyższego współczynnika wahają się w szerokich granicach. Według Thorsena i in. (10) wartości $BCF < 1$ mogą wskazywać, że organizm wykazuje zdolność do metabolizmu zanieczyszczenia (11), bądź też zanieczyszczenie wykazuje ograniczoną biodostępność dla tego organizmu. Wartości powyżej 1 wskazują na wyraźną bioakumulację ksenobiotyku przez organizm (6).

Bioakumulacja zanieczyszczeń przez bezkręgowce wodne i glebowe może odbywać się na drodze (12): bezpośredniego pobierania z wody (wody glebowej), pobierania gleby lub osadu dennego wraz z pokarmem (pokarm i zanieczyszczenia związane są z cząsteczkami glebowymi) oraz bezpośredniego pobierania z żywnością. Straty zanieczyszczeń mogą być związane z bezpośrednim wydalaniem ich do wody, gleby lub osadu dennego. Dodatkowo w wyniku procesów rozwojowych może dochodzić do „rozcieńczenia” zanieczyszczeń na skutek rozmnażania oraz wzrostu organizmu (przy braku „świeżych” ksenobiotyków). Ponadto zanieczyszczenia mogą ulegać w organizmie procesowi biotransformacji. Poznanie, głównych źródeł zanieczyszczeń oraz ich przemian w organizmie ważne jest nie tylko z punktu widzenia biodostępności, ale również odgrywa istotną rolę w modelowaniu ich losów w środowisku (13).

W istotnym stopniu zakres akumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych zależy od ekologii danego organizmu. W środowisku wodnym wyróżnić można następujące grupy organizmów ze względu na możliwe drogi akumulacji zanieczyszczeń: organizmy unoszące się w toni wodnej (np. plankton), organizmy żyjące na powierzchni osadów dennych (małże, ślimaki) oraz organizmy żyjące w osadach dennych (ochotkowate). Akumulacja zanieczyszczeń w przypadku grupy pierwszej zachodzi przede wszystkim z wody bądź cząstek zawieszonych w wodzie (np. rozpuszczalnej materii organicznej, koloidów). Kolejną grupę stanowią organizmy żyjące na powierzchni osadów bądź częściowo w nich zakopane, które chronione są przed bezpośrednim kontaktem z osadem dennym muszlą (np. małże). Zanieczyszczenia pobierane są przez te organizmy bezpośrednio z pożywieniem. Trzecia grupa organizmów znajduje się w bezpośrednim kontakcie z osadem dennym. Organizmy te mogą akumulować zanieczyszczenia zarówno z wody, jak również z cząstek osadów lub gleby. Zasadniczo organizmy należące do trzeciej z wymienionych grup wykazują wyższy poziom akumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych, aniżeli organizmy żerujące na powierzchni osadów bądź w toni wodnej (14).

W środowisku glebowym obserwuje się większą akumulację zanieczyszczeń organicznych przez dżdżownice aniżeli przez skorupiaki (15). Istotny wpływ na zakres akumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych wywiera zawartość lipidów. Stwierdzono liniowy wzrost współczynnika bioakumulacji ksenobiotyków organicznych wraz ze wzrostem zawartości lipidów w organizmie. Odnotowano (16,17) również, że dany organizm żerujący w różnych warunkach może charaktery-

zować się również różnym współczynnikiem biokoncentracji tego samego zanieczyszczenia.

Poza wspomnianą już ekologią danego gatunku istotną rolę w procesach bioakumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych odgrywają ich właściwości. W przypadku związków charakteryzujących się współczynnikiem podziału oktanol-woda ($\log K_{ow}$) od 0 do 3 stwierdzono (18) liniowy wzrost ich bioakumulacji wraz ze wzrostem hydrofobowości związku (wzrost $\log K_{ow}$). Oznaczone wartości BSAF dla tych ksenobiotyków kształtują się zwykle na poziomie $<0,1$ (19). W przypadku zanieczyszczeń charakteryzujących się zakresem $\log K_{ow}$ 3-6 akumulacja ich kształtuje się na stałym poziomie bez względu na wartość tego parametru. Przyjmuje się również, że w przypadku tego typu związków, BSAF może przyjmować wartości powyżej 10 (11,19-21). W badaniach pokazano (8,22,23), że zanieczyszczenia organiczne charakteryzujące się wartością $\log K_{ow} <3-4$ pobierane są głównie z wody (zawartej w porach glebowych), podczas gdy akumulacja związków silnie hydrofobowych ($\log K_{ow} > 5$) następuje przede wszystkim z cząstek stałych zawieszonych w wodzie. Dla przykładu Ekelund i in. (22) stwierdzili, że akumulacja heksachlorobenzenu przez małże (*Abra nitida*) następowała z cząstek zawieszonych, podczas gdy mniej apolarny związek – lindan, ulegał bezpośredniej akumulacji z wody. Podobną prawidłowość zaobserwowali również Belfroid i in. (23), którzy odnotowali, że akumulacja heksachlorobenzenu przez dżdżownice odbywa się głównie z cząstek zawieszonych, podczas gdy związki „lżejsze” (tetra- i pentachlorobenzen) akumulowane są głównie z fazy wodnej. Kierunek akumulacji zanieczyszczeń związany jest również z „wiekiem” ksenobiotyków. Johnson i in. (24) powołując się na badania własne oraz badania prowadzone przez innych autorów (25,26) wskazują, że „stare” zanieczyszczenia w większym stopniu ulegają akumulacji przez układ pokarmowy aniżeli wówczas gdy wchłaniane są przez skórę. Autorzy sugerują (24-26), że podczas przechodzenia gleby/osadu dennego przez układ pokarmowy – pod wpływem substancji trawiennych – dochodzi do zmian w strukturze gleby (odblokowywanie nano- i mikroporów), oraz zmniejszeniu ulega siła oddziaływań pomiędzy ksenobiotykiem a materią organiczną. Wynikiem tego jest zwiększenie dostępności zanieczyszczeń, które poza organizmem nie były dla niego dostępne. Gevao i in. (27) odnotowali, że pestycydy (dikamba, atrazyna i isoproturon) mogą być pobierane przez dżdżownice mimo stwierdzenia występowania tych związków w formie bardzo silnie związanej z matrycą glebową (ang. *bound-residue*).

Poza właściwościami zanieczyszczenia oraz rodzajem organizmów istotną rolę w pobieraniu i akumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych pełni (4): ilość i skład materii organicznej (28,29), skład granulometryczny/wielkość agregatów (30) oraz obecność składników odżywczych w środowisku (31). Ma i in. (31) stwierdzili w obecności pokarmu dodawanego w postaci suszonych liści olchy, kilkakrotne obniżenie się akumulacji fluorantenu przez dżdżownice (*Lumbricus rubellus*). Dokładniej wpływ pozostałych wymienionych czynników został opisany w drugiej części pracy (32).

Ważnym aspektem w ocenie biodostępności, jak również bioakumulacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych przez bezkręgowce jest zdolność organizmów do ich biotransformacji/metabolizmu, jak również ich wydalania. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku bioakumulacji HZO, również ich biotransformacja i wydalanie w istotnym stopniu determinowana jest rodzajem związku, jak również rodzajem organizmu. Boon i in. (33) oraz Belfroid i in. (34) stwierdzili jedynie nieznaczną (nie jest ona istotna statystycznie) biotransformację chlorobenzenów, polichlorowanych bifenyli i dioksyn przez bezkręgowce glebowe. W badaniach prowadzonych przez niektórych autorów (35,36) wskazuje się jednak, że bezkręgowce zdolne są do biotransformacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz chlorowanych pestycydów. Istotną rolę w wydalaniu zanieczyszczeń organicznych przez bezkręgowce – obok wspomnianych czynników i właściwości – pełnią wiek organizmu, pora roku oraz właściwości gleby/osadu dennego (12,21,37).

4. Biodegradacja i proces biodostępności zanieczyszczeń

Istnieje wiele fizycznych, chemicznych i biologicznych czynników, które mają wpływ na zakres i intensywności biodegradacji zanieczyszczeń organicznych. Degradacja ich może być ograniczona (38,39) przy braku składników odżywczych (takich jak: azot, fosfor i potas), obniżeniu dostępności tlenu, niskiej temperatury czy też niekorzystnego odczynu. Ponadto poziom zanieczyszczeń, może być na tyle wysoki, że ogranicza degradację w wyniku toksycznego oddziaływania na mikroorganizmy. Poza wspomnianymi czynnikami Reid i in. (40) wymieniają następujące zasady, które muszą być spełnione aby doszło do biodegradacji zanieczyszczeń organicznych: 1) organizmy muszą posiadać zdolność do biodegradacji określonego zanieczyszczenia; 2) substancja musi być podatna na biodegradację (biodegradowalna); 3) musi być zapewniony kontakt zanieczyszczenia z mikroorganizmem (musi być dostępna dla mikroorganizmu).

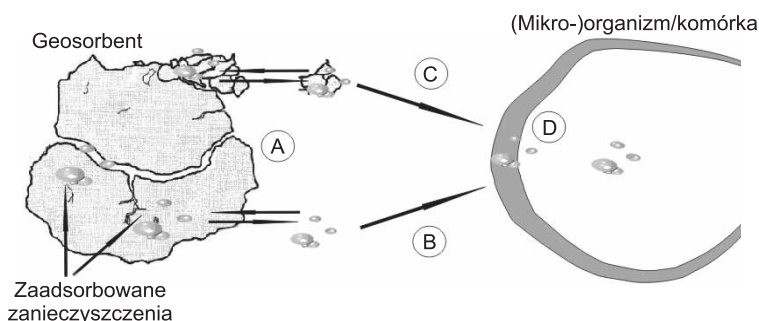
W badaniach pokazano (41,42), że mikroflora glebowa wykazuje znaczne zróżnicowanie w degradacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych. Zdolność kataboliczna powodowana jest przede wszystkim adaptacją mikroorganizmów do degradacji związków naturalnie występujących w środowisku, które charakteryzuje podobna budowa chemiczna jak zanieczyszczeń (43). Zdolność taka rozwijana jest m.in. (44): na drodze syntezy specyficznych enzymów oraz zmian genetycznych w wyniku których, mikroorganizmy uzyskują nowe zdolności metaboliczne degradacji zanieczyszczeń.

Powszechnie przyjmuje się, że podatność związku na degradację biologiczną związana jest z jego rozpuszczalnością w wodzie. Degradacja następuje w wyniku bezpośredniego kontaktu zanieczyszczenia znajdującego się w fazie wodnej z komórką mikroorganizmu zdolną do jego degradacji. Przejście zanieczyszczenia zaadsorbowanego na matrycy do fazy wodnej (desorpcja zanieczyszczenia) determinuje

zatem intensywność biodegradacji, a zarazem biodostępność zanieczyszczenia. Prowadzone są jednak badania, w których wskazuje się, na zdolność niektórych szczepów bakteryjnych do degradacji zanieczyszczeń zaadsorbowanych na cząstkach glebowych. Zagadnienie to szerzej zostanie omówione w drugiej części pracy (32) opisującej sorpcję zanieczyszczeń organicznych w środowisku.

W wyniku zmian zachodzących w glebie może dochodzić do obniżenia bądź podwyższenia dostępności zanieczyszczeń dla organizmów. Proponowane wcześniej definicje biodostępności ograniczały się jedynie do ogólnego bardzo wąskiego przedstawienia opisywanego zagadnienia. W celu zobrazowania – w ujęciu dynamicznym – pojęcia biodostępności naukowcy z Uniwersytetu w Stanford (6) „rozbili” opisywane zagadnienie na poszczególne etapy definiując całość jako **proces biodostępności**.

Proces biodostępności cytowani autorzy definiują jako fizyczne, chemiczne i biologiczne współdziałania, które powodują „wystawienie” organizmów na bezpośrednie oddziaływanie zanieczyszczeń obecnych w glebach i osadach dennych (geosorbentach). Proces biodostępności polega na możliwości oddziaływania zanieczyszczenia ze światem biologicznym. W celu graficznego przedstawienia problemu zastosowano schemat przedstawiony na rysunku 3, w którym wyróżniono 4 etapy (A-D) wspólne opisane pojęciem **procesu biodostępności**. Etap I opisany literą A obejmuje procesy związane z unieruchomieniem bądź uwolnieniem zanieczyszczenia w glebie lub osadzie dennym (geosorbentach) (rys. 3 A) na skutek zjawisk fizycznych, chemicznych i biochemicznych. Wiązanie zanieczyszczeń może następować na drodze sorpcji na stałych cząstkach matrycy, bądź też w wyniku okluzji w strukturach materii organicznej. Ważnym aspektem siły tych oddziaływań, jak również ich zakresu jest proces „starzenia się” (ang. *aging*) zanieczyszczeń. Zanieczyszczenia mogą być uruchomione ponownie w wyniku zmian w wilgotności, zmian właściwości powierzchniowych geosorbenta bądź też innych zjawisk fizycznych i chemicznych. Do biologicznych procesów mogących wpływać na uruchomienie zanieczyszczeń zalicza się działalność mikroorganizmów, roślin i bezkręgowców.



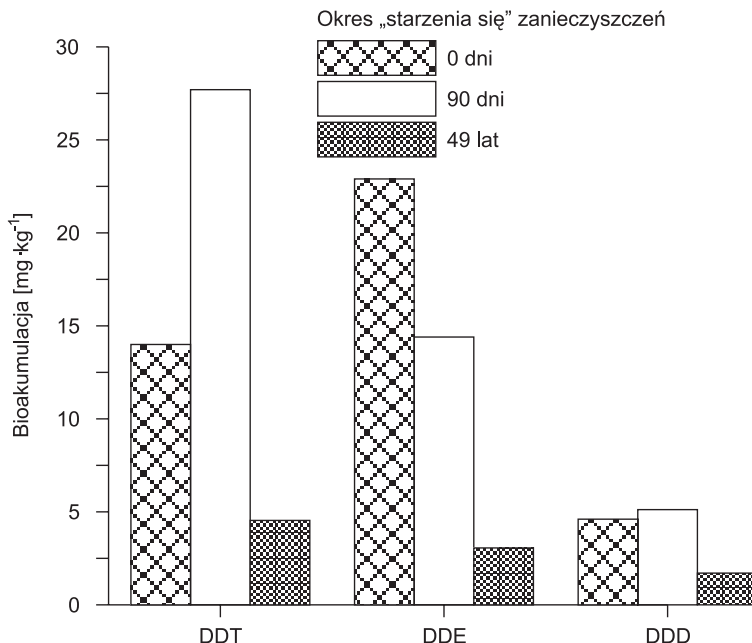
Rys. 3. Proces biodostępności opisany w raporcie NRC (6). Opis poszczególnych liter przedstawiono w tekście.

Opisane literami B i C (rys. 3 B i C) etapy związane są z bezpośrednim pobieraniem zanieczyszczeń przez organizm, przy czym etap B dotyczy zanieczyszczenia rozpuszczonego w fazie wodnej bądź gazowej, podczas gdy etap C określa zanieczyszczenie nadal związane z geosorbentem. Transport rozpuszczonych zanieczyszczeń zachodzi na drodze dyfuzji oraz dyspersji, w wyniku których związek znajduje się w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią organizmu. W przypadku etapu C procesy dyfuzji i dyspersji mają miejsce, wówczas gdy zanieczyszczenie jest związane z cząstkami ruchomymi np. koloidami bądź rozpuszczalnym węglem organicznym. Podczas transportu zanieczyszczeń mogą zachodzić reakcje ich transformacji na skutek różnych procesów (np. oksydo-redukcyjnych, hydrolizy, fotolizy itp.), w wyniku których dochodzi do zwiększenia biodostępności zanieczyszczeń.

Proces opisany literą D (rys. 3 D) dotyczy samego przejścia zanieczyszczenia ze środowiska zewnętrznego poprzez barierę fizjologiczną do wnętrza (mikro-)organizmu. Ze względu na istnienie setek organizmów o różnej fizjologii, bezpośrednie pobieranie zanieczyszczeń przez komórkę – jak również czynniki utrudniające lub ułatwiające ten proces – są zróżnicowane w zależności od budowy organizmu.

5. Sekwestracja i pozostałość związana

Od kilku miesięcy do kilkunastu lat po zanieczyszczeniu gleby przez związki organiczne, mimo stwierdzenia podatności ich na biodegradację oraz potwierdzenia obecności mikroorganizmów zdolnych do rozkładu tych ksenobiotyków zanieczyszczenia nie ulegają mineralizacji (45-48). Związki te nadal mogą być ekstrahowane z gleb przy zastosowaniu silnych rozpuszczalników organicznych, jednak ich dostępność dla mikroorganizmów oraz bezkręgowców glebowych zostaje znacznie zredukowana. Zjawisko tego typu zaobserwowano w przypadku: insektycydów (48-50), herbicydów (47), wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (47,49), 1,2-dibromoetanu (45) oraz węglowodorów ropopochodnych (46) (rys. 4). Podobną zależność obserwuje się w przypadku toksyczności pestycydów w stosunku do owadów i roślin. Toksyczność pestycydów ulega zmniejszeniu wraz z upływem czasu mimo występowania ich w glebie na poziomie, przy którym efekt toksycznego działania powinien być obserwowany (51,52). W literaturze opisywane zjawisko nosi nazwę starzenia się zanieczyszczeń (ang. *aging*). W procesie starzenia zanieczyszczeń istotną rolę pełni powolna sorpcja, dyfuzja oraz podział równowagowy (zwane wspólnie sekwestracją) (ang. *sequestration*) (53). Wzajemny udział wymienionych procesów świadczy o zakresie i intensywności sekwestracji zanieczyszczeń organicznych. Przyjmuje się dwa możliwe wytłumaczenia procesu sekwestracji ksenobiotyków organicznych w glebach i osadach dennych (53,54): dyfuzja do wnętrza materii organicznej (ang. *organic matter diffusion*) oraz zatrzymywanie wewnątrz nano- i mikroporów glebowych (ang. *sorption-retarded diffusion*).



Rys. 4. Wpływ czasu na akumulację pestycydów chloroorganicznych przez dżdżownice (46).

Cykl badań nad wpływem różnych czynników na proces sekwestracji zanieczyszczeń organicznych prowadzili naukowcy z Cornell University (m.in. 55-66), jak również inni badacze (67-71). W prezentowanych przez cytowanych autorów wynikach badań wskazuje się, że istotną rolę w opisywanym procesie pełnią właściwości gleb.

Chung i Alexander (55) badali 16 utworów glebowych pod kątem ich zdolności do sekwestracji atrazyny i fenantrenu. W zależności od typu gleby opisywany proces osiągał maksimum po czasie od 120 do 240 dni od wprowadzenia ksenobiotyków. Proces sekwestracji – zarówno jego zakres jak i szybkość – zależał również od rodzaju zanieczyszczenia. Wskazuje to na różne mechanizmy sekwestracji ksenobiotyków o zróżnicowanych właściwościach. Sharer i in. (71) oceniali desorpcję 4 związków (chlorobenzen, 1,2-dibromometan, atrazyna i 2,4-D) po 1, 30, i 420 dniach od wprowadzenia ich do gleby. Proces starzenia nie wpłynął jedynie na zmianę w desorpcji 2,4-D. W przypadku pozostałych związków notowano istotne różnice między frakcją desorbowaną na początku doświadczenia (po pierwszym dniu) i po 420 dniach. Odnotowano również zróżnicowanie w zakresie i szybkości sekwestracji w zależności od rodzaju związku. Zwiększenie wraz z czasem frakcji pirenu ulegającej procesowi sekwestracji obserwowali Macleod i Semple (67). Autorzy odnotowali większy zakres tego procesu w glebie leśnej charakteryzującej się większą zawartością materii organicznej (10,5% C_{org}) aniżeli w glebie pobranej z obszaru użytku zielonego (4,5% C_{org}). Podobnie we wcześniej cytowanych badaniach (55), jak również w pracy Bogana i Sullivana (70) ob-

serwowano dodatnią zależność między udziałem zanieczyszczeń, które uległy procesowi sekwestracji a zawartością materii organicznej. Nam i in. (61) stwierdzili słabszą mineralizację fenantrenu ulegającemu procesowi sekwestracji w glebach, w których zawartość węgla organicznego kształtowała się powyżej 2%. Zjawiska tego nie obserwowano natomiast w glebach z nieznaczną zawartością węgla organicznego. Autorzy wskazują, na możliwość istnienia granicznego poziomu zawartości węgla organicznego (w tym przypadku < 2%), przy którym sekwestracja zanieczyszczeń jest nieznaczna bądź w ogóle nie występuje (61).

Podobnie jak w przypadku mineralizacji, proces sekwestracji wpływa również na ograniczenie bioakumulacji zanieczyszczeń organicznych przez bezkręgowce (72-74). Leppänen i Kukkonen (72) stwierdzili istotne obniżenie akumulacji pirenu i benzo[a]pirenu przez *Lumbriculus variegatus*. Conrad i in. (73) również notowali w miarę upływu czasu stopniową redukcję akumulacji pirenu przez ten sam organizm testowy.

W szczegółowych badaniach pokazano, że zakres sekwestracji zanieczyszczeń zależy nie tylko od ilości, ale również od rodzaju, właściwości, wieku i pochodzenia substancji organicznej (64,70,75). Wpływ poszczególnych frakcji materii organicznej na proces sekwestracji zależy również od właściwości samych zanieczyszczeń. Seibel i in. (75), zanotowali zróżnicowany wpływ kwasów huminowych na stopień degradacji naftalenu, fenantrenu i pirenu. O ile dla naftalenu – w obecności kwasów huminowych – notowano obniżenie się stopnia jego degradacji, o tyle w przypadku fenantrenu i pirenu stwierdzono przyspieszenie mineralizacji tych związków. Autorzy sugerują (75), że w obecności kwasów huminowych może dochodzić do zwiększenia biodostępności zanieczyszczeń. Podobnie pozytywny wpływ kwasów huminowych na zakres degradacji fenantrenu stwierdzili również White i in. (64). Wraz ze „starzeniem się” fenantrenu (w glebie z której usunięto kwasy huminowe) obniżeniu uległ również zakres mineralizacji tego związku. W badaniach pokazano (76), że zasadowa ekstrakcja kwasów huminowych z glebowej substancji organicznej może prowadzić do jej zagęszczenia, przede wszystkim w odniesieniu do frakcji charakteryzującej się wysoką masą cząsteczkową, tj. humin. Usunięcie frakcji kwasów huminowych może ponadto zwiększać pole powierzchni oraz obniżać średnicę porów (77), co z kolei wpływa na zwiększenie sorpcji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych. Izotermi adsorpcji dwutlenku węgla na huminach pokazują, że ta frakcja materii organicznej posiada szereg porów średnicy nanometrów, w których obecne są specyficzne dla związków organicznych centra sorpcyjne (78). Zakłada się (54,79), że struktury kwasów fulwowych i huminowych zawierają centra aktywne (charakteryzujące frakcję gumową/amorficzną), z których desorpcja jest szybka, podczas gdy w budowie huminów dominują centra aktywne (frakcja szklista/skondensowana) o powolnej i bardzo powolnej kinetyce desorpcji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych.

W badaniach modelowych przy zastosowaniu różnych sorbentów potwierdza się, że porowatość może zwiększać zakres sekwestracji, ograniczając jednocześnie

biodostępność zanieczyszczeń (60). Rola porowatości zależy jednak od właściwości nanoporów. Nam i Alexander (60) badając zakres mineralizacji/desorpcji fenantrenu w obecności materiałów o zróżnicowanej porowatości i hydrofobowości stwierdzili, że istotną rolę w ograniczeniu desorpcji zanieczyszczenia wykazywały adsorbenty o średnicy porów 5 i 300-400 nm z hydrofobową powierzchnią wewnętrzną. Z zaadsorbowanych 97% fenantrenu, desorpcji uległo jedynie 1,0 i 3,4% tego związku odpowiednio po 5 i 240. godzinach. W przypadku pozostałych badanych sorbentów charakteryzujących się strukturą porowatą, jednak pozbawionych wewnętrznej hydrofobowej struktury porów nie odnotowano istotnego wpływu porowatości na zakres mineralizacji/desorpcji fenantrenu.

W kompleksowych badaniach (57) nad wpływem właściwości fizykochemicznych gleb na zakres sekwestracji i mineralizacji fenantrenu oraz atrazyny potwierdzono wyraźną rolę glebowej materii organicznej w tych procesach. Chung i Alexander (57) odnotowali istotną dodatnią zależność między ilością fenantrenu, który uległ procesowi sekwestracji a zawartością węgla organicznego w glebie. Poza materią organiczną autorzy oceniali również wpływ porów glebowych, sumy kationów zasadowych, powierzchni właściwej oraz zawartości minerałów ilastych na proces biodostępności i sekwestracji. Jedynie w przypadku minerałów ilastych (zarówno dla fenantrenu, jak i atrazyny) nie notowano zależności, które wskazywałyby na istotną ich rolę w opisywanym procesie.

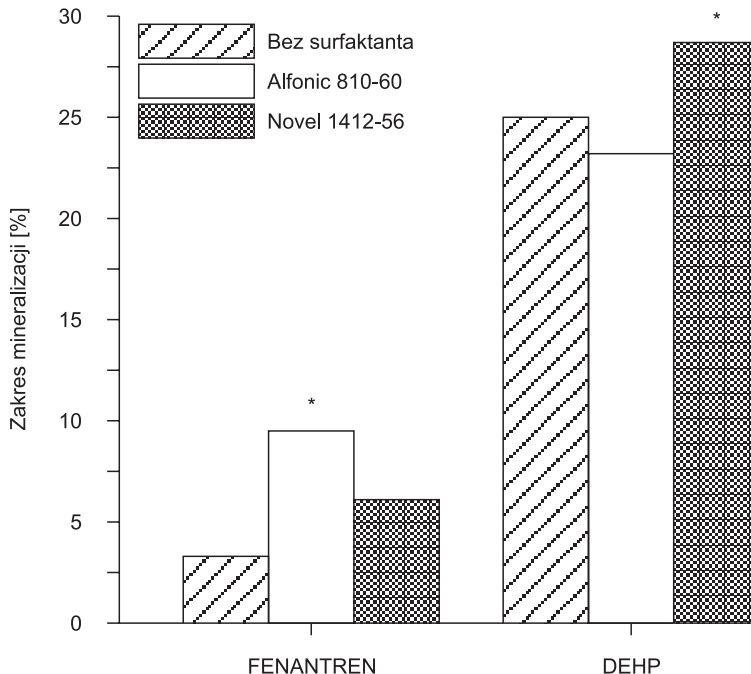
W badaniach nad biodostępnością i sekwestracją zanieczyszczeń organicznych w glebach pokazuje się, że na zakres tych procesów mogą mieć wpływ poza wymienionymi właściwościami gleb również: koncentracja zanieczyszczenia (56), suszenie/zwilżanie gleby (65,66), wilgotność gleby (58) oraz obecność innych WWA (63) i związków powierzchniowo czynnych (62,65,80).

White i in. (66) stwierdził, że suszenie i zwilżanie gleby podczas sekwestracji fenantrenu powoduje zwiększenie frakcji zanieczyszczenia, która ulega temu procesowi. Autorzy nie zaobserwowali natomiast podobnej zależności w przypadku ftalanu di(2-etyloheksylu) (DEHP). Nie stwierdzono również różnic w bioakumulacji badanych zanieczyszczeń przez *Eisenia foetida* między glebą poddawaną wspomnianym procesom a glebą, w której zanieczyszczenia ulegały sekwestracji przy stałej wilgotności. Suszenie i zwilżanie gleby, w której fenantren znajdował się w formie ograniczonej dostępności, spowodowało wzrost jego mineralizacji. Ponownie nie obserwowano tego efektu w przypadku DEHP. Zwiększenie liczby serii suszenia/zwilżania gleby z trzech (66) do sześciu (65) redukowało natomiast mineralizację fenantrenu. Kottler i in. (68) badali wpływ zwilżania gleby wodą na proces sekwestracji fenantrenu przed lub w trakcie dodawania tego związku. Zwilżanie gleby przed wprowadzeniem badanego ksenobiotyku zmniejszało frakcję zanieczyszczenia, która uległa procesowi sekwestracji. Dodanie fenantrenu do gleby suchej zwiększało efekt sekwestracji w stosunku do gleby zwilżonej. Chung i Alexander (56) oceniali wpływ koncentracji zanieczyszczenia (1, 10 i 100 mg/kg gleby) na zakres sekwestracji fenantrenu oraz akumulację tego związku przez dżdżownice. Autorzy stwierdzili ob-

niżenie się udziału fenantrenu, który ulegał opisywanemu procesowi wraz ze wzrostem koncentracji zanieczyszczenia. Przy najwyższym stężeniu obserwowano również ograniczenie akumulacji fenantrenu przez dżdżownice. Badając zakres sekwestracji i mineralizacji fenantrenu w zależności od wielkości agregatów glebowych (0-0,125; 0,125-0,25; 0,25-0,5; 0,5-1,0 oraz 1,0-4,0) White i in. (65) stwierdzili, że w przypadku wszystkich wydzielonych frakcji, z wyjątkiem agregatów o najmniejszej średnicy (0-0,125), sekwestracja wpłynęła na obniżenie zakresu degradacji fenantrenu. Zaobserwowano zależność, w której zmniejszaniu średnicy agregatów towarzyszyło obniżenie się zakresu mineralizacji badanego związku. Zależności tej nie odnotowano natomiast w przypadku związku, który nie został poddany procesowi sekwestracji (65).

W procesie desorpcji można obserwować efekt wypierania jednych zanieczyszczeń przez drugie na zasadzie rywalizacji o miejsca aktywne. White i in. (62) wykazali, że dodatek pirenu lub antracenu może powodować wzrost mineralizacji fenantrenu, który poddany był procesowi sekwestracji. Zjawisko to autorzy potwierdzili również w kolejnych badaniach (63). Największy wpływ wypierania obserwowano przy niskich zawartościach fenantrenu oraz wysokich dodawanego pirenu.

Na proces zwiększenia biodostępności zanieczyszczeń, które uległy procesowi starzenia istotny wpływ ma również obecność związków powierzchniowo czynnych



Rys. 5. Wpływ surfaktantów na zakres mineralizacji związków organicznych poddanych procesowi maskowania (62).

(62,65,80,81). White i in. (62) stwierdzili, że w obecności surfaktantów zwiększa się zakres mineralizacji ksenobiotyków, które uległy procesowi sekwestracji (rys. 5). Autorzy odnotowali, że wpływ ten zależy od rodzaju związku powierzchniowo czynnego, rodzaju zanieczyszczenia, a także warunków prowadzenia procesu biodegradacji. W badaniach prowadzonych przez cytowanych autorów obecność surfaktanta „Novel 1412-56” poprawiła zakres mineralizacji DEHP (rys. 5), natomiast nie wpłynęła na degradację fenantrenu. W przypadku zastosowania surfaktanta „Alfonic 810-60” zaobserwowano odwrotną tendencję (62). W badaniach autorów (65) prowadzonych w glebowej zawieszynie wodnej wykazano, że w innych warunkach wspomniane surfaktanty mogą hamować biodegradację zanieczyszczeń.

Początkowo termin pozostałości związanej był stosowany w stosunku do pestycydów zgodnie z definicją opracowaną w 1975 r. przez Amerykański Instytut Nauk Biologicznych (AIBS). Zgodnie z definicją za pozostałość związaną w glebie uznaje się „nieekstrahowalną” i „nieidentyfikowalną” chemicznie pozostałość pestycydów połączoną z kwasami fulwowymi, humusowymi lub frakcją humin (1). Według zaproponowanej w późniejszym okresie (82) przez IUPAC (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry) definicji za pozostałość związaną (zwaną również „pozostałością nieulegającą ekstrakcji”), uznaje się tę frakcję pestycydów wprowadzaną do środowiska, która nie ulega ekstrakcji metodami, nie wpływającymi w istotny sposób na strukturę chemiczną (pestycydów). Obecnie definicja pozostałości związanej uległa licznym modyfikacjom, jednakże główny jej „szkielet” nadal opiera się na propozycjach AIBS oraz IUPAC. Dla przykładu Führ i in. (83) proponują: „Pozostałość związaną stanowią związki obecne w glebie, roślinach i zwierzętach, które występują po wyekstrahowaniu jako związki pierwotne lub ich metabolity, przy założeniu, że proces ekstrakcji nie wpływa na zmiany związku i jego właściwości. Występowanie związku w postaci pozostałości związanej zasadniczo redukuje jego przyswajalność oraz biodostępność. Zagadnienie tworzenia, przemian i właściwości pozostałości związanej dokładnie opisane zostało w pracy (1).

5. Podsumowanie

Biodostępność hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych jest zagadnieniem nowym, rozwijanym dopiero w nielicznych ośrodkach naukowych na świecie. Dokładne poznanie zjawisk i czynników odpowiedzialnych za ten proces jest ważne nie tylko z punktu widzenia ekotoksykologicznego, ale również zwiększenia skuteczności procesów bioremediacyjnych. Z prezentowanych w tej części pracy informacji widać, że proces biodostępności zależy nie tylko od rodzaju związku (jego właściwości), ale również od warunków środowiskowych, a także rodzaju i wieku organizmu. Z tego względu opracowanie odpowiednich definicji, jak również modeli dotyczących opisywanego zagadnienia w stosunku do wszystkich grup organizmów jest niezmiernie trudne, co stawia przed badaczami nowe wyzwania.

Praca finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2005-2008 jako projekt badawczy (nr 2 P06S 005 29). P. Oleszczuk dziękuje Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej za przyznanie Krajowego Stypendium dla Młodych Naukowców.

Literatura

1. Oleszczuk P., (2004), *Post. Mikrobiol.*, 43, 189-204.
2. Paterson S., Mackay D. A., (1989), *Ecol. Modelling*, 47, 85-95.
3. Luthy R. G., Aiken G. R., Brusseau M. L., Cunningham S. D., Gschwend P. M., Pignatello J. J., Reinhard M., Traina S. J., Weber W. J. Jr., Westall J. C., (1997), *Environ. Sci. Technol.*, 12, 3341-3347.
4. Belfroid A. C., Sijm D. T. H. M., van Gestel C. A. M., (1996), *Environ. Rev.*, 4, 276-299.
5. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC), Technical Report, (2002), 84, 24-26.
6. National Research Council (NRC), (2002), National Academies Press, Washington, DC.
7. Semple K. T., Doick K. J., Jones K. C., Buraue P., Craven A., Harms H., (2004), *Environ. Sci. Technol.*, 38, 228A-231A.
8. Anderson J., Birge W., Gentile J., Lake J., Rodgers J., Swartz R., (1987), *Fate and effects of sediment-bound chemicals*, Eds. Dickson K. K., Maki A. W., Brungs W. A, Pergamon Press, New York, 267-297.
9. Spacie A., Hamelink J. L., (1995), *Bioaccumulation. In Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*, Ed. Rand G. M., Taylor & Francis, Washington, DC.
10. Thorsen W. A., Cope W. G., Shea D., (2004), *Environ. Sci. Technol.*, 38, 2029-2037.
11. Tracey G. A., Hansen D. J., (1996), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30, 467-475.
12. Sijm D., Kraaij R., Belfroid A., (2000), *Environ. Pollut.*, 108, 113-119.
13. Mackay D., Fraser A., (2000), *Environ. Pollut.*, 110, 375-391.
14. Hickey C. W., Roper D. S., Hooland P. T., Trower T. M., (1995), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29, 221-231.
15. van Brummelen T. C., Verweij R. A., Wedzinga S. A., van Gestel C. A. M., (1996), *Chemosphere*, 32, 315-341.
16. Landrum P. F., (1988), *Aquatic Toxicol.*, 12, 245-271.
17. Gobas F. A. P. C., Bedard D. C., Ciborowski J. J. H., Haffner G. D., (1989), *J. Great Lakes Res.*, 15, 581-588.
18. Sijm D. T. H. M., van der Linde A., (1995), *Environ. Sci. Technol.*, 29, 2769-2777.
19. Opperhuizen A., Sijm D. H. T. M., (1990), *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 175-186.
20. Morrison H. A., Gobas F. A. P. C., Lazar R., Haffner G. D., (1996), *Environ. Sci. Technol.*, 30, 3377-3384.
21. Ingersoll C. G., Brunson E. L., Wang N., Dwyer F. J., Ankley G. T., Mount D. R., Huckins J., Petty J., Landrum P. F., (2003), *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 872-885.
22. Ekelund R., Granmo A., Berggren M., Renberg L., Wahlberg C., (1987), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 38, 500-508.
23. Belfroid A., Sikkenk M., van Gestel K., Hermens J., (1994), *Environ. Toxicol. Chem.*, 13, 93-99.
24. Johnson D., Jones K. C., Langdon C. J., Pearce T. P., Semple K. T., (2002), *Soil Biol. Biochem.*, 34, 1363-1370.
25. Barois I., Villemain G., Lavelle P., Toutain F., (1993), *Geoderma*, 56, 57-66.
26. Landrum P. F., (1989), *Environ. Sci. Technol.*, 23, 588-595.
27. Gevaio B. I., Mordaunt C., Semple K. T., Pearce T. G., Jones K. C., (2001), *Environ. Sci. Technol.*, 35, 501-507.
28. Swindoll C. M., Applehans F. M., (1987), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 39, 1055-1062.
29. Landrum P. F., Faust W. R., (1991), *Aquatic toxicology and risk assessment*, Eds. Mayes M. A., Barron M. G., American Society for Testing Materials, Philadelphia, 14, 263-279.

30. Lynch T. R., Johnson H. E., (1982), *Aquatic toxicology and hazard assessment*, Eds. Pearson J. G., Foster R. B., Bishop W. E., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 5, 273-287.
31. Ma W., Immerzeel J., Bodt J., (1995), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 32, 226-232.
32. Oleszczuk P., (2007), *Biotechnologia*, 1(76), 26-39.
33. Boon J. P., Eijgenraam F., Everaarts J. M., Duinker J. C., (1989), *Mar. Environ. Res.*, 27, 159-176.
34. Belfroid A., Seinen W., van Gestel K., Hermens J., van Leeuwen K., (1995), *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2, 5-15.
35. Livingstone D. R., Kirhin M. A., Wiseman A., (1989), *Xenobiotica*, 19, 1041-1062.
36. Levesee G. J., Giesy Jp., Landrum P. F., Gerould S., Bowling J., Fannin J. W., Haddock J. D., Bartell S., (1982), *Arch. Environ. Cotnam. Toxicol.*, 11, 25-31.
37. Belfroid A. C., Sijm D. T. H. M., (1998), *Chemosphere*, 37, 1221-1234.
38. Shuttleworth K. L., Cerniglia C. E., (1995), *Appl. Bichem. Biotechnol.*, 54, 291-301.
39. Boopathy R., (2000), *Biores. Tech.*, 74, 63-67.
40. Reid B. J., Stokes J. D., Jones K. C., Semple K. T., (2000), *Environ. Sci. Technol.*, 34, 3174-3179.
41. Juhasz A. L., Naidu R., (2000), *Inter. Biodeter. Biodegrad.*, 45, 57-88.
42. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabuzek S., (2003), *Pol. J. Environ. Stud.*, 12, 11-26.
43. Dagely S., (1975), *Essays in biochemistry*, Eds. Campbell P. N., Aldridge W. N., Academic Press, London, 11, 81-130.
44. Pritchard P. H., Bourquin A. W., (1984), *Adv. Microb. Ecol.*, 7, 133-215.
45. Steinberg S. M., Pignatello J. J., Sawhney B. L., (1987), *Environ. Sci. Technol.*, 21, 1201-1208.
46. Loehr R. C., Webster M. T., (1996), *J. Soil Contam.*, 5, 361-383.
47. Kelsey J. W., Kottler B. D., Alexander M., (1997), *Environ. Sci. Technol.*, 31, 214-217.
48. Robertson B. K., Alexander M., (1998), *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 1034-1038.
49. Morrison D. E., Robertson B. K., Alexander M., (2000), *Environ. Sci. Technol.*, 34, 709-713.
50. Tang J., Robertson B. K., Alexander M., (1999), *Environ. Sci. Technol.*, 33, 4346-4351.
51. Edwards C. A., Beck S. D., Lichtenstein E. P., (1957), *J. Econ. Entomol.*, 50, 622-626.
52. Bowmer K. H., (1991), *Austral. J. Soil Res.*, 29, 339-350.
53. Semple K. T., Morriss W. J., Paton G. I., (2003), *Europ. J. Soil Sci.*, 54, 809-818.
54. Pignatello J. J., Xing B., (1996), *Environ. Sci. Technol.*, 30, 1-11.
55. Chung N., Alexander M., (1998), *Environ. Sci. Technol.*, 32, 855-860.
56. Chung N., Alexander M., (1999), *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3605-3608.
57. Chung N., Alexander M., (2002), *Chemosphere*, 48, 109-115.
58. Kottler B. D., White J. C., Kelsey J. W., (2001), *Chemosphere*, 42, 893-898.
59. Kottler B. D., Alexander M., (2001), *Environ. Pollut.*, 113, 293-298.
60. Nam K., Alexander M., (1998), *Environ. Sci. Technol.*, 32, 71-74.
61. Nam K., Chung N., Alexander M., (1998), *Environ. Sci. Technol.*, 32, 3785-3788.
62. White J. C., Alexander M., Pignatello J. J., (1999), *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 182-187.
63. White J. C., Hunter M., Pignatello J. J., Alexander M., (1999), *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1728-1732.
64. White J. C., Hunter M., Nam K., Pignatello J. J., Alexander M., (1999), *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 1720-1727.
65. White J. C., Kelsey J. W., Hatzinger P. B., Alexander M., (1997), *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2040-2045.
66. White J. C., Quinones-Rivera A., Alexander M., (1998), *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 2378-2382.
67. Macleod C. J. A., Semple K. T., (2000), *Environ. Sci. Technol.*, 34, 4952-4957.
68. Hwang S., Cutright T. J., (2002), *Chemosphere*, 47, 891-899.
69. Dictor M. C., Berne N., Mathieu O., Moussay A., Saada A., (2003), *Oil Gas Sci. Technol.*, 58, 481-488.
70. Bogan B. W., Sullivan W. R., (2003), *Chemosphere*, 52, 1717-1726.
71. Sharer M., Park J.-H., Voice T. C., Boyd S. A., (2003), *J. Environ. Qual.*, 32, 1385-1392.
72. Leppanen M. T., Kukkonen J. V. K., (2000), *Aquat. Toxicol.*, 49, 227-241.
73. Conrad A. U., Comber S. D., Simkiss K., (2002), *Chemosphere*, 49, 447-454.
74. ten Hulscher T. E. M., Postma J., den Besten P. J., Stroomberg G. J., Belfroid A., Wegener W., Faber J. H., van der Pol J. J. C., Hendriks A. J., van Noort P. C. M., (2003), *Environ. Toxicol. Chem.*, 22, 2258-2265.

75. Seibel F., Heidenreich S., Frimmel F. H., (1996), *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 24, 260-266.
76. Hayes M. H. B., Mccarthy P., Malcolm R. L., Swift R. S., (1989), *Humic Substances II*. John Wiley & Sons, New York.
77. Malekani K., Rice J. A., Lin J. S., (1997), *Soil Sci.*, 162, 333-342.
78. de Jonge H., Mittelmeijer-Hazeleger M. C., (1996), *Environ. Sci. Technol.*, 30, 408-413.
79. Cornelissen G., Rigterink H., Ferdinandy M. M. A., van Noort P. C. M., (1998), *Environ. Sci. Technol.*, 32, 966-970.
80. Jones-Hughes T., Turner A., (2005), *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1688-1697.
81. Oleszczuk P., (2002), *Roczn. Glebozn.*, 1/2, 61-75.
82. Roberts T. R., (1984), *Pure Appl. Chem.*, 56, 945-956.
83. Führ F., Ophoff H., Burauel P., Wanner U., Haider K., (1998), *State Commission for the Assessment of Chemicals used in Agriculture*, Wiley-VCH, DFG.