

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA  
WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA  
INSTYTUT INŻYNIERII OCHRONY ŚRODOWISKA

JACEK KRZYŻAK

WSPOMAGANA FITOSTABILIZACJA METALI CIĘŻKICH  
W GLEBACH

Praca doktorska napisana pod kierunkiem  
dr hab. Grażyny Płaza, prof. nadzw. IETU

Wrocław 2013

Pani dr hab. Grażynie Płaza, prof. nadzw. IETU za pomoc i opiekę,  
oraz wszystkim pozostałym osobom  
które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy,  
składam serdeczne podziękowania

*Jacek Krzyżak*

## SPIS TREŚCI

1. WSTĘP .....	7
2. STUDIA LITERATUROWE .....	9
2.1. WYSTĘPOWANIE, ŹRÓDŁA METALI CIĘŻKICH W GLEBACH I ZAGROŻENIA Z NIMI ZWIĄZANE.....	9
2.2. CZYNNIKI DECYDUJĄCE O ROZPUSZCZALNOŚCI METALI CIĘŻKICH W GLEBACH.....	10
2.3 TECHNOLOGIE I METODY REMEDIACJI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH METALAMI CIĘŻKIMI.....	11
2.3.1. Metody techniczne .....	11
2.3.2. Metody biologiczne .....	12
2.4 METODY OCENY EFEKTYWNOŚCI PROCESU REMEDIACJI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH METALAMI CIĘŻKIMI.....	26
2.4.1. Metody fizykochemiczne.....	27
2.4.2. Metody biologiczne .....	28
3. CEL I ZAKRES PRACY .....	31
4. MATERIAŁY I METODY .....	33
4.1. CHARAKTERYSTYKA TERENU BADAŃ.....	33
4.2. CHARAKTERYSTYKA GLEBY WYKORZYSTANEJ W DOŚWIADCZENIACH.....	34
4.3. CHARAKTERYSTYKA DODATKÓW STABILIZUJĄCYCH.....	34
4.4. NAWOŻENIE MINERALNE .....	34
4.5. EKSPERYMENT WAZONOWY .....	35
4.5.1. Określenie dawki węgla brunatnego wprowadzanego do gleby w celu ograniczenia biodostępności Pb, Cd i Zn.....	35
4.5.2. Wybór drugiego stabilizatora wprowadzanego łącznie z 10% węgla brunatnego, wspomagającego obniżenie biodostępności metali ciężkich w glebie zanieczyszczonej.....	36
4.6. EKSPERYMENT LIZYMETRYCZNY .....	37
4.7. EKSPERYMENT POLETKOWY .....	38
4.8. PROCEDURY ANALITYCZNE .....	39
4.8.1. Analizy fizyczno-chemiczne.....	39
4.8.2. Analizy mikrobiologiczne.....	40

4.8.3. Analizy toksykologiczne.....	49
4.8.4. Analizy statystyczne .....	49
5. WYNIKI BADAŃ .....	50
5.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE I CHEMICZNE GLEBY ORAZ DODATKÓW STABILIZUJĄCYCH .....	50
5.2. EKSPERYMENT WAZONOWY: ETAP I .....	51
5.3. EKSPERYMENT WAZONOWY: ETAP II .....	60
5.4. EKSPERYMENT LIZYMETRYCZNY .....	69
5.5 EKSPERYMENT POLETKOWY .....	72
5.5.1. Zmiany odczynu gleby oraz biodostępności metali ciężkich i arsenu w glebie po wprowadzeniu dodatków stabilizujących .....	72
5.5.2. Wzrost roślin i kumulacja metali ciężkich w częściach nadziemnych i korzeniach kostrzewy trzcinowej .....	76
5.5.3. Analiza toksyczności gleby .....	79
5.5.4. Aktywność enzymatyczna wyznaczona testem API <sup>®</sup> ZYM.....	81
5.5.5. Aktywność wybranych enzymów glebowych .....	83
5.5.6. Indeks enzymatyczny oraz indeks biochemicznej jakości gleby.....	85
5.5.7. Korelacje pomiędzy aktywnością oznaczanych enzymów – analiza głównych składowych (PCA) .....	86
5.5.8. Liczba bakterii, promieniowców i grzybów .....	88
6. Dyskusja wyników.....	91
7. Wnioski .....	101
8. Literatura .....	103

## SPIS TABEL:

Tabela 1. Dodatki glebowe i ich wpływ na mobilność metali ciężkich, (za Kumpiene 2010, modyfikacje własne)

Tabela 2. Właściwości fizyczne i chemiczne gleby wykorzystanej w doświadczeniach

Tabela 3. Charakterystyka drobnoziarnistej frakcji węgla brunatnego wykorzystanego w doświadczeniach

Tabela 4. Produkcja biomasy na poletkach badawczych w dwóch sezonach wegetacyjnych (g s.m.)

Tabela 5. Porównanie kumulacji badanych pierwiastków w częściach nadziemnych i korzeniach kostrzewy trzinowej

Tabela 6. Zmiany toksyczności w glebie kontrolnej i badanej podczas trwania doświadczenia

Tabela 7. Zestawienie odczytów intensywności zabarwienia w poszczególnych studzienkach paska testu API<sup>®</sup>ZYM zgodnie z tabelą porównawczą producenta dla gleby kontrolnej (GK) i stabilizowanej (GF)

## SPIS RYSUNKÓW:

Rys. 1. Schemat procesu wspomaganego fitostabilizacji (opracowanie własne)

Rys. 2. Podział metod mikrobiologicznych stosowanych do oceny jakości gleb (Płaza i wsp., 2003)

Rys. 3. Schemat przeprowadzonych badań

Rys. 4. Ogólny widok miejsca poboru gleby

Rys. 5. Schemat lizymetru

Rys. 6. Zmiany odczynu gleby po sześciu tygodniach od wprowadzeniu węgla brunatnego

Rys. 7. Zmiany biodostępności ołowiu po sześciu tygodniach od wprowadzenia węgla brunatnego

Rys. 8. Zmiany biodostępności kadmu po sześciu tygodniach od wprowadzenia węgla brunatnego

Rys. 9. Zmiany biodostępności cynku po sześciu tygodniach od wprowadzenia węgla brunatnego

Rys. 10. Wzrost i morfologia kostrzewy trzinowej „Asterix” w zależności od dawki wprowadzonego węgla brunatnego

Rys. 11. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na przyrost biomasy *F. arundinacea* „Asterix”

Rys. 12. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na kumulację ołowiu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”

Rys. 13. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na kumulację kadmu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”

- Rys. 14. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na kumulację cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”
- Rys. 15. Zmiany odczynu gleby po sześciu tygodniach od wprowadzeniu węgla brunatnego (WB) wraz z superfosfatem potrójnym (SF) lub wapnem nawozowym (WN)
- Rys. 16. Wpływ dodatków stabilizujących na zmianę biodostępności ołowiu w glebie
- Rys. 17. Wpływ dodatków stabilizujących na zmianę biodostępności kadmu w glebie
- Rys. 18. Wpływ dodatków stabilizujących na zmianę biodostępności cynku w glebie
- Rys. 19. Wzrost i morfologia kostrzewy trzcinowej „Asterix” w zależności od ilości wprowadzonych stabilizatorów
- Rys. 20. Wpływ różnych dawek stabilizatorów na przyrost biomasy *F. arundinacea* „Asterix”
- Rys. 21. Wpływ różnych dawek stabilizatorów na kumulację ołowiu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”.
- Rys. 22. Wpływ dodatków stabilizujących na kumulację kadmu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* Asterix”
- Rys. 23. Wpływ dodatków stabilizujących na kumulację cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”
- Rys. 24. Zmiana odczynu odcieków pobranych w trakcie eksperymentu lizymetrycznego
- Rys. 25. Zmiany zawartości ołowiu w powstających odciekach w trakcie eksperymentu lizymetrycznego
- Rys. 26. Zmiany zawartości kadmu w powstających odciekach w trakcie eksperymentu lizymetrycznego
- Rys. 27. Zmiany zawartości cynku w powstających odciekach w trakcie eksperymentu lizymetrycznego
- Rys. 28. Zmiany odczynu gleby w trakcie eksperymentu poletkowego
- Rys. 29. Zmiany biodostępności ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w trakcie trwania eksperymentu poletkowego
- Rys. 30. Wzrost kostrzewy trzcinowej na poletku kontrolnym oraz z wprowadzonym dodatkiem węgla brunatnego i wapna nawozowego
- Rys. 31. Kumulacja ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w częściach nadziemnych kostrzewy trzcinowej
- Rys. 32. Wpływ wspomaganą fitostabilizacji na aktywność wybranych enzymów glebowych
- Rys. 33. Zmiany indeksu enzymatycznego i biochemicznej jakości gleby w trakcie monitorowania procesu
- Rys. 34. Analiza głównych składowych (PCA) aktywności enzymów w glebie kontrolnej i stabilizowanej
- Rys. 35. Liczba bakterii heterotroficznych, promieniowców i grzybów mikroskopowych w trakcie trwania eksperymentu

## 1. WSTĘP

Gleba stanowiąca zewnętrzną warstwę litosfery jest niezwykle istotnym elementem każdego ekosystemu ze względu na jej udział w przepływie materii i energii. Dla człowieka tym bardziej szczególnie, że warunkuje wzrost roślin, a w konsekwencji możliwość produkcji żywności. Odpowiednia czystość i funkcje siedliskowe gleb są warunkami koniecznymi do zapewnienia prawidłowego przepływu materii w obrębie łańcucha troficznego. Zanieczyszczone gleby stanowią poważny udział w narażeniu ludzi i zwierząt na metale ciężkie, przez włączanie się w łańcuch pokarmowy, inhalację lub bezpośrednie spożycie cząstek gleby (Pierzyński, 1997; Vangronsveld, 1998).

Źródłem zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi w Polsce jest przede wszystkim działalność przemysłu wydobywczego i przetwórczego rud metali nieżelaznych, przemysłu chemicznego oraz energetyki. Szczególne nasilenie tych zjawisk można zaobserwować w części południowo-zachodniej Polski, głównie na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP). Silne zanieczyszczenie gleb powoduje spadek bioróżnorodności, zahamowanie wzrostu roślin, wysokie ryzyko migracji zanieczyszczeń, przede wszystkim poprzez erozję wietrzną oraz ich wymywanie do wód podziemnych. Rozprzestrzenianie się tych zanieczyszczeń zwiększa prawdopodobieństwo narażenia ludzi i zwierząt. Ponadto, zanieczyszczenia chemiczne gleb (w tym metale ciężkie) wpływają negatywnie na bytujące w nich organizmy żywe, powodując eliminację gatunków wrażliwych, nadmierny rozwój organizmów opornych, a w konsekwencji prowadzą do zaburzeń w obiegu materii i energii, uniemożliwiając prawidłowe jej funkcjonowanie.

Zgodnie z założeniami Strategii Tematycznej Unii Europejskiej w dziedzinie ochrony gleby (2006), stanowiącej podwaliny do przygotowywanej przez Komisję Europejską Dyrektywy Glebowej, gleba stanowi zasób nieodnawialny, który spełnia wiele funkcji niezmiernie ważnych dla działalności człowieka i dla przetrwania ekosystemów, krytyczny z punktu widzenia interesów krajów Unii Europejskiej. Nakłada ona również na kraje członkowskie obowiązek zapobiegania procesom degradacji gleby, zarówno tym zachodzącym w sposób naturalny, jak i tym wywołowanym przez szereg działań człowieka, które ograniczają zdolność gleby do pełnienia jej funkcji. Powyższy dokument oraz przygotowywane projekty Dyrektywy Glebowej wskazują na konieczność zachowania podstawowych funkcji gleb,

tj. produkcyjnej, siedliskowej i retencyjnej oraz ich ochrony przed zagrożeniami, m.in. przed zanieczyszczeniami chemicznymi.

W wielu przypadkach spełnienie norm i standardów jakości gleb jest niewykonalne z przyczyn technicznych lub ekonomicznych. Głównym celem rekultywacji nie jest więc usunięcie zanieczyszczeń za wszelką cenę, wbrew realiom ekonomicznym bądź technologicznym, ale ograniczenie ryzyka ich negatywnego wpływu na środowisko (Stuczyński i wsp., 2004).

W odpowiedzi na wzrastające zagrożenie dla jakości zdrowia i jakości środowiska wypracowano szereg technologii remediacji zanieczyszczonych gleb (Vangronsveld i Cunningham, 1998). Oczyszczanie gleby metodami termicznymi, chemicznymi lub elektrolitycznymi (twarde technologie) może być związane ze zniszczeniem życia biologicznego, ubytkiem materii organicznej lub zmianami w sposobie oddziaływania na organizmy żywe (Hamby, 1996; Dermont i wsp., 2008). Interesującą alternatywą dla wyżej wymienionych technologii są metody biologiczne (fitoremediacja i bioremediacja), charakteryzujące się niższymi kosztami oraz brakiem niekorzystnego wpływu na glebę. Na terenach o wysokich stężeniach metali można z powodzeniem zastosować wspomaganą fitostabilizację *in situ*. Jest to metoda stosunkowo nowa, polegająca na zastosowaniu doglebowych dodatków immobilizujących metale wraz z odpowiednio dobranymi gatunkami roślin. Definiowana jest jako unieruchamianie zanieczyszczeń w glebie na skutek ich absorpcji i kumulacji w korzeniach, adsorpcji na powierzchni korzeni lub przekształcenia w obrębie ryzosfery w związki trudno rozpuszczalne (Hamby, 1996; Vangronsveld i Cunningham, 1998). Metoda fitostabilizacji wykorzystuje procesy biologiczne i chemiczne zachodzące w strefie korzeniowej. Dzięki wydzielinom korzeniowym oraz uwalnianiu przez korzenie dwutlenku węgla, strefa korzeniowa jest obszarem, w którym następuje zatrzymywanie zanieczyszczeń i ich wytrącanie. W wyniku oddziaływania roślin na środowisko glebowe, biodostępne formy metali mogą przekształcić się w formy trudniej dostępne (Salt i wsp., 1995; Berti i wsp., 1998; Sas-Nowosielska i wsp., 2008). Fitostabilizacja zanieczyszczeń zmierza w kierunku utworzenia pokrywy roślinnej zabezpieczającej glebę przed erozją, migracją zanieczyszczeń w głąb ziemi lub po jej powierzchni wraz ze spływem wód opadowych (Li i Chaney, 1998; Vangronsveld i Cunningham, 1998; Berti i Cunningham, 2000).



## 2. STUDIA LITERATUROWE

### 2.1. WYSTĘPOWANIE, ŹRÓDŁA METALI CIĘŻKICH W GLEBACH I ZAGROŻENIA Z NIMI ZWIĄZANE

Metale ciężkie w glebach mogą pochodzić z dwóch źródeł – naturalnych i antropogenicznych. Do najważniejszych ich źródeł można zaliczyć: produkty wietrzenia skały macierzystej, jako źródło naturalne oraz dopływ z zewnątrz składników zawierających metale ciężkie, np. wraz przepływającą wodą, opadem atmosferycznym suchym i mokrym, działalnością przemysłową i gospodarczą oraz niekontrolowanym wprowadzaniem do gleb przez człowieka substancji takich jak ścieki, odpady oraz nawozy mineralne i organiczne (Kabata-Pendias i Pendias, 2001; Karczevska, 2002).

Skała macierzysta jako najważniejsze naturalne źródło metali ciężkich dostarcza zróżnicowane ich ilości, w zależności od jej rodzaju, składu mineralogicznego, czy też pochodzenia (Karczevska, 2002). Metale ciężkie pochodzenia antropogenicznego związane są przede wszystkim z przemysłem hutniczym i metalurgicznym, produkcją oraz złomowaniem akumulatorów, przemysłem chemicznym, składowaniem odpadów oraz energetyką (Marchwińska i Kucharski, 1990; Kabata-Pendias i Pendias, 2001; Karczevska, 2008).

Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi może powodować zagrożenie zarówno dla człowieka jak i funkcjonowania ekosystemu. Do głównych typów zagrożeń związanych z obecnością metali ciężkich w glebach należy zaliczyć: wymywanie do wód powierzchniowych i podziemnych, fitotoksyczność, ekotoksyczność wobec fauny glebowej, erozję wietrzną – zanieczyszczenie pyłowe. Zagrożenie dla człowieka wiąże się z włączaniem ich do łańcucha pokarmowego w wyniku ich pobierania przez rośliny i zwierzęta, a następnie kumulacją zanieczyszczeń w tkankach i organach (Karczevska 2002, Karczevska i Kabała, 2010). Długotrwała ekspozycja na metale ciężkie może powodować określone skutki zdrowotne, takie jak choroby nowotworowe, uszkodzenia organów, np. uszkodzenia nerek przez kadm i arsen lub zmiany w funkcjonowaniu układu krwionośnego wywołane związkami ołowiu (Pruvot i wsp., 2006; Poggio i wsp., 2009).

## 2.2. CZYNNIKI DECYDUJĄCE O ROZPUSZCZALNOŚCI METALI CIĘŻKICH W GLEBACH

Rozpuszczalne formy metali ciężkich mają najbardziej istotne znaczenie z punktu widzenia zagrożenia dla roślin, flory i fauny glebowej oraz włączania ich do łańcucha pokarmowego. Rośliny pobierają je z gleby poprzez roztwór glebowy, a jednocześnie rozpuszczalne formy metali ciężkich w łatwy sposób migrują w środowisku, stanowiąc istotne zagrożenie zarówno dla wód powierzchniowych, jak i podziemnych (Kabata-Pendias i Pendias, 2001; Karczewska, 2008).

Odczyn gleby jest głównym czynnikiem decydującym o rozpuszczalności metali ciężkich w glebie. Od odczynu zależy równowaga procesów sorpcji i desorpcji kationów wodorowych oraz kationów metali. Rozpuszczalność metali ciężkich warunkowana procesami sorpcji wymiennej jest niska w zakresie odczynów obojętnych oraz alkalicznych i wzrasta wraz z obniżeniem wartości pH. Wzrost rozpuszczalności w środowisku kwaśnym wiąże się z faktem, że silnie zakwaszona gleba prowadzi do powolnego rozpuszczania tlenków żelaza, glinu i manganu oraz uwalniania metali ciężkich z minerałów pierwotnych i wtórnych (Karczewska, 2002). Za najbardziej ruchliwy i najłatwiej rozpuszczalny uważany jest kadm, który podlega mobilizacji już przy wartości pH 6,5, podczas gdy przy znacznie większym zakwaszeniu gleby następuje uruchamianie innych metali – cynku, miedzi czy niklu. Ruchliwość metali jako stosunek ilości form rozpuszczalnych do związanych w fazie stałej gleby, w warunkach kwaśnego odczynu gleby maleje w szeregu:  $Cd > Zn > Ni > Mn > Cu > Pb > Hg$ .

Kolejnym istotnym czynnikiem decydującym o zatrzymywaniu jonów metali ciężkich w glebie oraz ich migracji do roztworu glebowego jest pojemność sorpcyjna gleby. Zależna ona jest od udziału i rodzaju minerałów ilastych, zawartości próchnicy oraz uwodnionych tlenków glinu i żelaza (Alloway, 1995; Karczewska, 2002; 2008). Wiązanie metali ciężkich w glebach o większej pojemności sorpcyjnej i cięższym uziarnieniu uwzględnia się przy klasyfikacji stopnia zanieczyszczenia gleb (Kabata-Pendias i Pendias, 2001).

Istotne znaczenie dla procesów uruchamiania i immobilizacji metali ciężkich mają warunki oksydo-redukcyjne. W wyniku procesów redukcyjnych z uwodnionych tlenków manganu i żelaza do roztworu przechodzą najpierw jony  $Mn^{2+}$ , a następnie  $Fe^{2+}$ , a ich rozpuszczanie wiąże się z uwalnianiem wcześniej zaadsorbowanych i okludowanych metali ciężkich (Karczewska, 2002). Zmianom warunków tlenowych

w glebie towarzyszą również inne procesy, mogące mieć wpływ na mobilność metali w glebie, takie jak rozkład materii organicznej, przyczyniający się do uwalniania metali. Z drugiej zaś strony, w warunkach silnie beztlenowych powstaje siarkowodór, który powoduje wytrącanie się metali w postaci siarczków. W związku z tym trudno jest przewidzieć wpływ warunków oksydo-redukcyjnych na zachowanie się metali ciężkich w glebach (Karczewska, 2002; 2008).

## 2.3 TECHNOLOGIE I METODY REMEDIACJI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH METALAMI CIĘŻKIMI

### 2.3.1. Metody techniczne

W metodach technicznych oczyszczania gleb i gruntów podstawowe technologie obejmują usunięcie zanieczyszczonej wierzchniej warstwy i uzupełnienie ubytku czystym materiałem glebowym, odizolowanie zanieczyszczonej warstwy obojętnym, czystym materiałem, obróbkę chemiczną lub fizyczną materiału glebowego w celu dekompozycji, usunięcia lub unieruchomienia zanieczyszczeń. Stosowanie tzw. „twardych” technologii remediacji powierzchni ziemi na ogół wywołuje liczne skutki uboczne, takie jak: zmiana struktury gleby, zmiany w bioróżnorodności i funkcjonowaniu organizmów, spadek zawartości materii organicznej itp. Spośród licznych metod technicznych do najważniejszych należy zaliczyć następujące (Adamski, 1993; Hamby, 1996; Dermont i wsp., 2008):

#### *a) Desorpcja termiczna*

Jest to metoda rekultywacji gleb stosowana po ich uprzednim wydobyciu. Jej stosowanie daje efekt w przypadku gleb zanieczyszczonych takimi związkami jak: lotne, pół-lotne chlorowane i niechlorowane związki organiczne, polichlorowane bifenylole (PCB), pestycydy, dioksyny, furany oraz cyjanki organiczne.

#### *b) Utlenianie chemiczne*

Metoda ta stosowana jest w przypadku gleb zanieczyszczonych związkami, które w formie utlenionej nie są toksyczne. Jej efektywność zależy od chemizmu zanieczyszczeń oraz od rodzaju zastosowanego utleniacza. Utlenianie niektórych związków może wymagać kombinacji czynników utleniających albo dodatkowo użycia promieniowania ultrafioletowego. Sterowanie procesem polega na doborze

odpowiedniego utleniacza, pH i temperatury reakcji. W procesie stosowane są następujące utleniacze: ozon, nadtlenek wodoru, podchloryny, chlor, ditlenek chloru.

#### *c) Przemycanie gleby*

Oczyszczanie gleby w procesie jej przemycania bazuje na jednym z dwóch możliwych w danym układzie mechanizmów. Pierwszy z nich polega na rozpuszczeniu zanieczyszczeń bądź też na wprowadzeniu ich w stan zawieszenia w roztworze przemycającym. Roztwór ten jest następnie oczyszczany konwencjonalnymi metodami stosowanymi w technologii ścieków. Drugi mechanizm polega na zmniejszeniu objętości zanieczyszczonej gleby w wyniku rozdziału cząstek gleby o różnych wymiarach. Koncepcja obniżenia stopnia zanieczyszczenia gleby w drugim mechanizmie polega na łączeniu się cząsteczek zanieczyszczeń z cząstkami gliny i frakcji pylistych. Oddzielone zanieczyszczone frakcje gleby mogą być dodatkowo oczyszczane bądź składowane. Natomiast oczyszczone większe frakcje mogą być ponownie wykorzystywane.

#### *d) Elektrokinetyczne usuwanie metali*

Metoda elektrokinetyczna jest metodą *in situ*, która wykorzystuje pole elektryczne wytwarzane przez przepływ prądu stałego w glebie. Wskutek działania tego pola, zanieczyszczenia - metale ciężkie, migrują w kierunku odpowiednich elektrod, gromadzą się na nich, a następnie razem z nimi bezpiecznie usuwane są z gleby. Remediacja elektrokinetyczna polega na umieszczeniu systemu elektrod w ziemi i podłączenia do nich niskiego napięcia. Między anodą i katodą powstaje pole elektryczne. W efekcie w glebie i roztworze glebowym obserwuje się następujące zjawiska: elektromigrację jonów metali, elektroosmozę oraz zmianę pH.

### 2.3.2. Metody biologiczne

Interesującą alternatywą dla wyżej wymienionych technologii jest biologiczna metoda postępowania z terenami zanieczyszczonymi metalami ciężkimi - fitoremediacja, charakteryzująca się niższymi kosztami oraz brakiem niekorzystnego wpływu na środowisko. Aplikacja fitotechnologii dodatkowo wspomaga utworzenie szaty roślinnej. Obecność spontanicznie występujących roślin pozwala przypuszczać, że rośliny posiane w celu przeprowadzenia fitoremediacji nie napotkają na warunki ograniczające ich wzrost i rozwój.

W fitoremediacji można wyszczególnić następujące metody: fitoekstrakcję, w której wykorzystuje się zdolność roślin do pobierania zanieczyszczeń do części nadziemnych i usuwania ich z plonem oraz fitostabilizację, polegającą na unieruchomieniu zanieczyszczeń w strefie korzeniowej roślin i ograniczeniu ich włączania do łańcucha troficznego (Marmioli i McCutcheon, 2003).

### 2.3.2.1. Fitoekstrakcja

Jest metodą polecaną do stosowania w warunkach niskich lub średnich stężeń zanieczyszczeń. W fitoekstrakcji wykorzystuje się zdolność roślin do kumulacji zanieczyszczeń w częściach nadziemnych, które następnie usuwane są wraz z zanieczyszczonym plonem (Van Nevel, 2007). Jednym z rodzajów fitoekstrakcji jest fitoekstrakcja wspomagana, nazywana także indukowaną hiperakumulacją. Idea tej metody polega na dodaniu do gleby substancji chelatującej, np. EDTA, której zadaniem jest zwiększenie pobierania zanieczyszczeń do części nadziemnych roślin, a następnie usunięcie metali z gleby wraz z biomasą części nadziemnych roślin (Alkorta i wsp., 2004; Wu i wsp., 2004; Nouri i wsp., 2010).

Proces indukowanej hiperakumulacji składa się z czterech następujących po sobie etapów:

- przebadanie terenu i określenie, jaka kombinacja związku chelatującego i rośliny powinna być zastosowana,
- przygotowanie miejsca i uprawa wybranych roślin aż do momentu uzyskania odpowiedniej biomasy,
- wprowadzenie do gleby substancji chelatującej metodą oprysku, w fazie maksymalnego wzrostu roślin,
- zbiór roślin po krótkim, trwającym od kilku dni do kilku tygodni, okresie kumulacji metali.

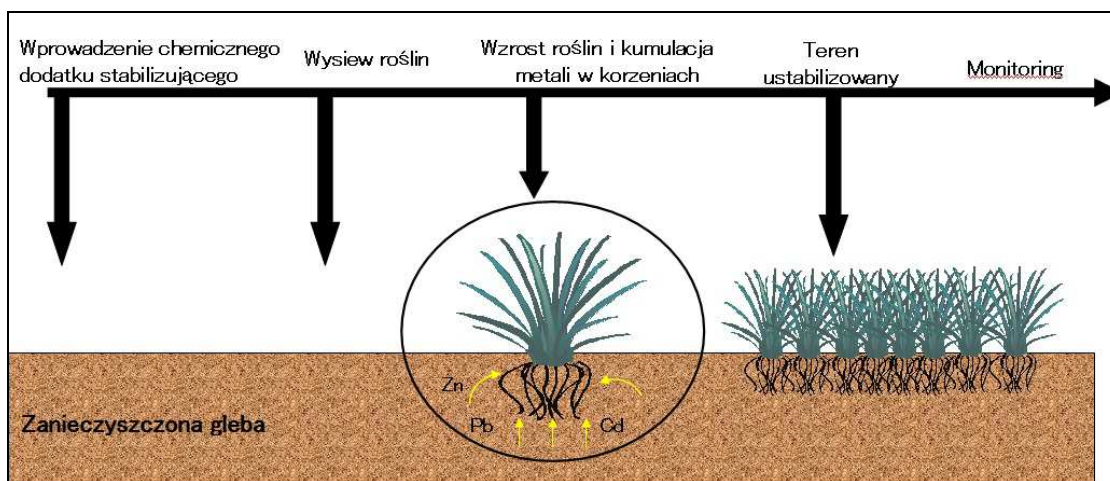
Roślinami stosowanymi w fitoekstrakcji wspomaganej są m.in. kukurydza, słonecznik oraz gorczyca sarepska (Wu i wsp., 2004; Zaccheo i wsp., 2006; Shams i wsp., 2010). Cechuje je znaczna biomasa i stosunkowo duża tolerancja wobec metali ciężkich w glebie. Nie są znane u tych roślin mechanizmy tolerancji na tak duże zawartości metali w tkankach, przez co obumierają w krótkim czasie (Ebbs i Kochian 1998; Shibata i wsp., 2007).

W indukowanej hiperakumulacji wykorzystywane są zarówno związki kompleksujące syntetyczne, np. kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) i kwas

dietylenotriaminopentaoctowy (DTPA), jak i naturalne substancje kompleksujące, do których zaliczane są m.in.: kwas cytrynowy i kwas winowy oraz aminokwasy takie jak glicyna i histydyna (Ebbs i Kochian 1998; Alcorta i wsp., 2004; Shibata i wsp., 2007; Bianchi i wsp. 2008; Gunawardana i wsp., 2010).

### 2.3.2.2. Wspomagana fitostabilizacja

Jest to metoda stosunkowo nowa, wypracowywana na przestrzeni ostatniej dekady, polegająca na zastosowaniu doglebowych dodatków immobilizujących metale wraz z odpowiednio dobranymi gatunkami roślin. Unieruchamianie zanieczyszczeń w glebie oparte jest na następujących procesach: absorpcji i kumulacji w korzeniach, adsorpcji na powierzchni korzeni lub przekształcenia w obrębie ryzosfery w związki trudno rozpuszczalne (Berti i wsp., 1998; Vangronsveld i Cunningham, 1998; Ruttens i wsp., 2006). Metoda fitostabilizacji wykorzystuje procesy biologiczne i chemiczne zachodzące w strefie korzeniowej. Dzięki wydzielinom korzeniowym oraz uwalnianiu przez korzenie dwutlenku węgla strefa korzeniowa jest obszarem, w którym następuje zatrzymywanie zanieczyszczeń i ich wytrącanie. W wyniku oddziaływania roślin na środowisko glebowe, biodostępne formy metali mogą przechodzić w formy trudniej dostępne (Salt i wsp., 1995; Berti i wsp., 1998; Sas-Nowosielska i wsp., 2008). Fitostabilizacja zanieczyszczeń zmierza w kierunku utworzenia pokrywy roślinnej, zabezpieczającej glebę przed erozją, migracją zanieczyszczeń w głąb ziemi lub po jej powierzchni wraz ze spływem wód opadowych (Li i Chaney, 1998; Vangronsveld, 1998; Berti i Cunningham, 2000; Knox i wsp., 2001). Schemat procesu wspomaganego fitostabilizacji metali ciężkich w glebach przedstawiono na Rysunku 1.



Rys. 1. Schemat procesu wspomaganego fitostabilizacji (opracowanie własne)

#### 2.3.2.2.1. Dodatki doglebowe obniżające biodostępność metali ciężkich

Poprawa jakości gleby poprzez wprowadzenie do gleby dodatków takich, jak materia organiczna, wapno czy związki fosforu, a co za tym idzie, poprawa warunków wzrostu roślin, jest stosowana w rolnictwie od stuleci.

W celu obniżenia mobilności i biodostępności metali ciężkich, najczęściej stosowanymi dodatkami doglebowymi są: związki fosforu, naturalne i syntetyczne glinokrzemiany, popioły, tlenki żelaza, manganu i glinu, związki wapnia oraz materia organiczna w różnej postaci (Cunningham i wsp., 1995; Flathman i Lanza, 1998; Schnoor 2000; Kumpiene, 2010).

##### *Tlenki żelaza*

W większości typów gleb żelazo występuje w postaci słabo krystalicznych tlenków oraz jako niekrystaliczne powłoki tlenkowe na cząstkach gleby, rzadko w postaci czystych kryształów żelaza. Utlenienie i hydroliza pierwotnych minerałów skutkuje tworzeniem tlenków i wodorotlenków żelaza w glebie, które są słabo rozpuszczalnymi produktami, takimi jak goetyty i hematyty (Schwertmann i Cornell, 2000). Goetyty (alfa- $\text{FeOOH}$ ) i hematyty (alfa- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) są najbardziej trwałymi tlenkami żelaza w warunkach aerobowych, w związku z czym są najbardziej powszechnymi formami występowania żelaza w glebie. Ferryhydryt ( $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) jest również szeroko rozpowszechniony w środowisku glebowym i odgrywa ważną rolę w aktywnej sorpcji dzięki swojej znacznej powierzchni ( $600 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Jest to metastabilny, słabo krystaliczny minerał, łatwo przekształcany w hematyt w glebach klimatu ciepłego lub goetyt w glebach klimatu umiarkowanego (Kabata Pendias i Pendias, 2001).

Tlenki żelaza zmniejszają mobilność arsenu, kadmu, miedzi, niklu, ołowiu i cynku poprzez ich sorpcję, wytrącanie lub formowanie minerałów zawierających wymienione pierwiastki (Berti i Cunningham, 2000). Powierzchnia cząstek tlenków żelaza może być modyfikowana w zależności od odczynu gleby, czyniąc je amfoterycznymi i zdolnymi do sorpcji zarówno anionów, jak i kationów (Cornell i Schwertmann, 2003).

Badania nad immobilizacją metali ciężkich przy użyciu naturalnych i syntetycznych tlenków żelaza wykazały również przydatność innych związków bogatych w ten pierwiastek, takich jak sole żelaza (Kim i wsp., 2003; Hartley i wsp., 2004), żelazo w postaci metalicznej (Mench i wsp., 2003; Hartley i wsp., 2004; Kumpiene i wsp., 2006; Mench i wsp., 2006; Bes i Mench, 2008).

Tlenki żelaza są szczególnie skuteczne w immobilizacji arsenu i mogą obniżyć zawartość rozpuszczalnego arsenu w glebie nawet do 90 % (Hartley i wsp., 2004; Kumpiene i wsp., 2006). Szereg metali równocześnie występujących w roztworze glebowym, jak to ma miejsce w przypadku gleb zanieczyszczonych działalnością przemysłową, może pozytywnie wpływać na swoją stabilizację poprzez strącanie na powierzchni tlenków żelaza. Dla przykładu, aniony arsenu zwiększają sorpcję na goetycie o rząd wielkości, podczas gdy obecność cynku zwiększa sorpcję arsenu pięciokrotnie (Grafe i wsp., 2004). Siarczany żelaza szczególnie skutecznie obniżają mobilność arsenu w glebie w porównaniu z innymi związkami żelaza (Kim i wsp., 2003; Hartley i wsp., 2004), podczas gdy żelazo metaliczne (Hartley i wsp., 2004; Kumpiene i wsp., 2006) jest wysoce skuteczne w immobilizacji miedzi, chromu i cynku. Żelazo metaliczne lub na zerowym stopniu utlenienia ( $Fe^0$ ) jest materiałem powszechnie dostępnym, jego wprowadzenie do gleby nie ma dużego wpływu na jej odczyn ponadto tworzy on w glebie tlenki żelaza o strukturze przydatnej w sorpcji metali ciężkich (Schwertmann i Cornell, 2000; Leupin i Hug, 2005).

Pomimo tego, że tlenki żelaza są związkami obniżającymi mobilność metali w glebie i ich dostępność dla roślin oraz mającymi niewielki negatywny wpływ na funkcjonalność gleby, koniecznym jest wprowadzanie ich łącznie z dodatkami bogatymi w substancje odżywcze (np. kompostem lub inną materią organiczną) w celu wspomaganie wegetacji roślin na glebie poddanej procesowi stabilizacji (Ruttens i wsp., 2006).

#### *Tlenki manganu i glinu*

Oprócz tlenków żelaza, innymi ważnymi stabilizatorami metali ciężkich w glebie są tlenki manganu i glinu (Cheng i Hseu, 2002). Tlenki manganu stanowią zazwyczaj mniej istotne składniki gleb, o szerokim zakresie powierzchni (od 5 do 360  $m^2/g$ ) i znacznym powinowactwie do wiązania metali ciężkich (Kumpiene, 2010). Tlenki manganu immobilizują metale ciężkie poprzez adsorpcję oraz formowanie wewnętrznych kompleksów (Davranche i Bollinger, 2000; O'Reilly i Hochella, 2003). Tlenki manganu, w szczególności syntetyczne (birnezyt i kryptomelan) są bardziej skutecznymi sorbentami ołowiu niż związki żelaza (O'Reilly i Hochella, 2003), a równocześnie obniżają pobór kadmu i ołowiu przez rośliny (Chen i wsp., 2000). Wprowadzenie do gleby syntetycznych tlenków manganu powoduje redukcję potencjalnie dostępnych frakcji cynku i ołowiu odpowiednio o 90 i 60%. Jako materiał



stabilizacyjny jest bardziej efektywny od syntetycznych tlenków żelaza (Yousfi i Bermond, 2000).

Tlenki glinu posiadają dużą powierzchnię sorpcyjną (od 100 do 220 m<sup>2</sup>/g) i potrafią sorbować zarówno kationy, jak i aniony. Związki te są stabilne w zakresie pH od 4 do 10, jednakże poza tymi wartościami mogą ulec rozpuszczaniu i uwalniać metale ciężkie do gleby (Kumpiene, 2010). Dla wielopierścieniowego kompleksu glinu [AlO<sub>4</sub>Al<sub>12</sub>(OH)<sub>24</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>]<sup>7+</sup> lub polimeru Al<sub>13</sub>, który częściowo przekształca się do Al(OH)<sub>3</sub> wykazana została efektywna sorpcja niklu, cynku i kadmu oraz w mniejszym stopniu miedzi i ołowiu z roztworu wodnego. Polimer Al<sub>13</sub> jest proponowany jako związek immobilizujący metale ciężkie w glebach zanieczyszczonych, niezależnie od ich odczynu (Potter i Yong, 1999).

#### *Naturalne i syntetyczne glinokrzemiany*

##### a) Iły

Iły stanowią minerały glinokrzemianowe, które tworzą się w glebie na skutek procesów wietrzenia i są klasyfikowane na podstawie wielkości cząstek. Są aktywnymi składnikami gleby, dzięki ujemnie naładowanej powierzchni i są zdolne do sorpcji kationów. Niektóre minerały ilaste, np. kaolinit, tworzą dodatnio naładowane struktury przy niskim odczynie gleby, w związku z czym są zdolne do adsorpcji anionów w kwaśnym środowisku glebowym. W zależności od stopnia usieciowania, powierzchnia sorpcyjna iłów może wahać się od 15-20 m<sup>2</sup>/g w przypadku kaolinitu do nawet 280-500 m<sup>2</sup>/g dla montmorylonitu (Bhattacharyya i Gupta, 2008; Kumpiene, 2010). Ostatnie badania nad sorpcją zanieczyszczeń przez materiały ilaste dotyczą w szczególności As, Pb, Cd, Cu, Zn, Ni i Mn (Lothenbach i wsp., 1997; Garcia-Sanchez i wsp., 1999; Abollino i wsp., 2008; Gupta i Bhattacharyya, 2008; Panuccio i wsp., 2009). Badania prowadzone przez Alvareza-Ayuso i Garcíę-Sancheza (2003; 2003a) wykazały, że wprowadzenie do silnie zanieczyszczonej gleby minerałów ilastych (palygorskitu i sepiolitu) spowodowało znaczne obniżenie biodostępnych i potencjalnie dostępnych form kadmu i cynku, ołowiu i miedzi. Garcia-Sanchez i wsp. (2002) wykazali w swoich badaniach immobilizację arsenu poprzez wprowadzenie do gleby minerałów ilastych w postaci bentonitu. Jednakże skuteczność tego dodatku była zależna od pH gleby – w środowisku kwaśnym bentonit nie wykazywał istotnego ograniczenia biodostępności tego pierwiastka.

Skuteczność materiałów ilastych w ograniczaniu mobilności metali ciężkich w glebach może być obniżona w przypadku ich łącznego stosowania z innymi dodatkami stabilizującymi, zwłaszcza materią organiczną. Związane jest to między innymi z oddziaływaniem z rozpuszczonymi kwasami humusowymi, pochodzącymi z materii organicznej (Wu i wsp., 2002).

#### b) Zeolity

Zeolity są to uwodnione minerały glinokrzemianowe, powstające naturalnie w wyniku reakcji pyłów wulkanicznych z wodami powierzchniowymi lub podziemnymi. Mogą również powstawać w środowisku niewulkanicznym, podczas interakcji pomiędzy zasolonymi cząstkami gleby z silnie zasadowymi roztworami (Gworek i Sucharda-Kozera, 1999; Kumpiene 2010). Zeolity wykazują podobieństwo do minerałów ilastych ze względu na zawartość związków krzemu i glinu, jednakże różnią się strukturą krystaliczną oraz właściwościami. Nazywane są również „sietami molekularnymi”, ze względu na zdolność do selektywnego sortowania molekuł na podstawie ich wielkości (Jamil i wsp., 2010; Blisset i Rowson, 2012). Zeolity mogą być również łatwo syntetyzowane z produktów odpadowych pochodzących z przemysłu, np. z popiołów lotnych (Rayalu i wsp., 2001; Belviso i wsp., 2010; Blisset i Rowson, 2012).

Naturalne i syntetyczne zeolity były testowane pod kątem ich przydatności w immobilizacji metali ciężkich w glebach zanieczyszczonych ze względu na ich wysoką pojemność sorpcyjną oraz powinowactwo zarówno do kationów, jak i anionów. Przeprowadzone badania pokazują wysoką wydajność zeolitów w sorbowaniu kadmu i ołowiu (Ponizovsky i Tsadilas, 2003; Panuccio i wsp., 2009; Huang-Ping i Shu-Hao, 2012), jak i innych pierwiastków: miedzi, cynku, arsenu (Garcia-Sanchez i wsp., 1999; Chen i wsp., 2000; Friesl i wsp., 2006). Wprowadzenie do gleby zeolitów wpływa na jej odczyn - wraz ze zwiększeniem ilości wprowadzanych zeolitów rośnie pH i jednocześnie zwiększa się immobilizacja metali (Querol i wsp., 2006; Mahabadi i wsp., 2007).

Właściwości zeolitów do zmniejszania biodostępności metali ciężkich są przedstawione w literaturze. Natomiast zagadnienie wpływu zeolitów na biologiczne właściwości gleby jest słabo poznane i wymaga dalszych badań (Kumpiene, 2010). Garau i wsp. (2007) nie zaobserwowali istotnych zmian liczby bakterii

heterotroficznych w glebie stabilizowanej zeolitami, pomimo znacznej redukcji stężenia rozpuszczalnych form Cd, Pb i Zn

### *Popioły lotne*

Na całym świecie, każdego roku produkowane są miliony ton popiołów w trakcie spalania paliw węglowych w elektrowniach. Skład chemiczny i właściwości fizyczne popiołów różnią się w zależności od rodzaju spalanego paliwa, czy też metody jego spalania. Popioły powstałe w wyniku spalania węgla i innych biopaliw składają się głównie z minerałów glinokrzemianowych i zawierają znaczne ilości Ca, Mg, Na i K oraz różne stężenia innych pierwiastków (np. Cd, Pb, Zn, As, Cr, Cu, B, Ba, itp.). Ich odczyn waha się od silnie kwaśnego do silnie zasadowego, w zależności od składu spalanego paliwa. Pomimo tego, iż popioły uważane są za niebezpieczny materiał odpadowy, to ich zastosowanie jako dodatków doglebowych w remediacji gleb jest przedmiotem badań (Jala i Goyal, 2006). Najczęstszym powodem aplikacji popiołów do gleb jest poprawa produkcji biomasy poprzez dostarczenie substancji odżywczych dla roślin oraz redukcja zakwaszenia gleby (Rautaray i wsp., 2003; Sajwan i wsp., 2003). Popioły o wysokim odczynie są stosowane w remediacji obszarów zdegradowanych przez przemysł (Vangronsveld i wsp., 1995; Gorman i wsp., 2000; Seoane i Leiros, 2001). Wprowadzenie do gleby piaszczystej popiołów poprawia jej strukturę oraz zwiększa pojemność wodną. Dodatkowo, popioły mogą w efektywny sposób ograniczyć mobilność metali ciężkich w glebie i obniżyć ich toksyczność (Gorman i wsp., 2000; Kumpiene i wsp., 2007).

Popioły lotne są najbardziej efektywne w przypadku zanieczyszczeń występujących w formie kationów, takich jak Cu, Pb, Zn i Ni, podczas gdy efekt stabilizacji może być osłabiony dla zanieczyszczeń występujących w formie anionów, np. arsenianów czy też chromianów. Mobilność oksyanionów wzrasta w odczynie zasadowym, który jest osiągnięty najczęściej w przypadku stosowania popiołów. Ponadto skuteczność tych samych popiołów może różnić się w zależności od rodzaju gleby. Mechanizm zatrzymywania zanieczyszczeń przez popioły lotne oparty jest głównie na podwyższaniu odczynu gleby i wytrącaniu zanieczyszczeń oraz ich sorpcji w postaci kompleksowania na powierzchni popiołów i reakcji wymiany kationów (Kumpiene, 2010). Najlepsza skuteczność w immobilizacji zanieczyszczeń przy użyciu popiołów lotnych była obserwowana dla gleb kwaśnych, o niskim poziomie materii organicznej (Nachtegaal i wsp., 2005).

Stosowanie popiołów lotnych w stabilizacji metali ciężkich może mieć również negatywny wpływ na glebę, głównie poprzez zwiększenie zasolenia gleby oraz zwiększenie stężenia pierwiastków śladowych do poziomów toksycznych. Przykładowo, bor i molibden, często obecne w popiołach lotnych mogą być fitotoksyczne już przy dawce 20 ton popiołów lotnych na hektar (Doran i Martens, 1972).

Skład popiołów lotnych jest bardzo zróżnicowany, w związku z tym przed ich zastosowaniem w remediacji gleb zanieczyszczonych wymagane są szczegółowe badania (Kumpiene, 2010).

### *Związki fosforu*

Stosowanie związków fosforu w immobilizacji metali ciężkich w glebach oparte jest głównie na zdolności fosforanów do strącania i tworzenia stabilnych form stałych. Apatyt  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F},\text{Cl},\text{OH})_2$  jest powszechnym minerałem zawierającym fosfor, rozpuszczalnym w warunkach kwaśnych i zdolnym do ponownego wytrącania się wraz z zaadsorbowanymi zanieczyszczeniami, np. Pb, Cu, Zn, Cd (Ma i wsp., 1993; Shi i Ericson, 2001; Raicevic i wsp., 2005; Cao i wsp., 2008). Oprócz apatytów, testowano szereg innych związków fosforowych, takich jak syntetyczne apatyty i hydroksyapatyty, sole fosforanowe –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgHPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , kwas fosforowy (McGowen i wsp., 2001; Geebelen i wsp., 2002; Chen i wsp., 2003; Cao i wsp., 2004; Brown i wsp., 2005; Impellitteri, 2005; Scheckel i wsp., 2005).

Stosowanie dodatków doglebowych zawierających fosfor jest szczególnie rekomendowane w przypadku immobilizacji ołowiu. Wprowadzenie hydroksyapatytów do gleby skutkuje wytrącaniem się trwałych związków – hydroksypiromorfitów, podobny mechanizm obserwowano podczas wprowadzania do gleby apatytów i innych związków fosforu (Ma i wsp., 1993; Cao i wsp., 2008). Rozpuszczalność związków ołowiu i fosforu determinuje wydajność stabilizacji ołowiu w glebie. Ołów może występować w różnych formach w glebie (np. tlenku ołowiu  $\text{PbO}$ , węglanu ołowiu  $\text{PbCO}_3$ , siarczanu ołowiu  $\text{PbSO}_4$ ), które ulegają rozpuszczaniu przy różnym odczynie. Sole fosforanowe i kwas fosforowy są bardziej rozpuszczalne, a co za tym idzie, bardziej wydajne w stabilizacji ołowiu (Brown i wsp., 2005; Cao i wsp., 2008).

Stosowanie dodatków fosforowych powinno być ograniczone w przypadku zanieczyszczeń w postaci anionów, takich jak arsen, selen czy wolfram. Konkurencja

między fosforanami a arsenianami o miejsca sorpcyjne może znacząco zwiększyć mobilność i biodostępność arsenu (Boisson wsp., 1999; Geebelen i wsp., 2002).

Efektywność dodatków fosforowych jest słaba w przypadku gleb zanieczyszczonych wieloma pierwiastkami śladowymi. Obserwowano obniżenie zdolności sorpcyjnej hydroksyapatytów w przypadku jednoczesnego występowania jonów kadmu, miedzi i cynku w roztworze glebowym, ze względu na zjawisko konkurowania pomiędzy nimi o miejsca sorpcyjne (Cao i wsp., 2004a; Corami i wsp., 2007).

Wyższe dawki związków fosforowych wprowadzane do gleby mogą wzmocnić efekt stabilizacji zanieczyszczeń, ale mogą również spowodować przekroczenie dopuszczalnych ilości fosforu w glebie. Skuteczne ograniczenie mobilności ołowiu poprzez formowanie piromorfitów wymaga niskiego odczynu gleby, wysokiej rozpuszczalności związków ołowiu i fosforu, co może spowodować znaczne zagrożenie środowiskowe. W związku z tym, ograniczanie biodostępności ołowiu przy użyciu związków fosforu w aplikacjach terenowych powinno być stosowane ze szczególną ostrożnością (Chrysochoou i wsp., 2007).

#### *Materia organiczna*

Materia organiczna jest istotnym składnikiem gleby, mającym znaczny wpływ na właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne oraz zawartość substancji odżywczych. Głównym jej składnikiem jest mieszanina kwasów humusowych i fulwowych. Wysoka zawartość grup funkcyjnych w substancjach humusowych, w szczególności karboksylowej -COOH i wodorotlenowej -OH pozwala na wymianę jonową, tworzenie kompleksów i adsorpcję z metalami ciężkimi. Brak materii organicznej jest częstym zjawiskiem w glebach silnie zanieczyszczonych, spowodowanym toksycznym wpływem zanieczyszczeń na aktywność biologiczną gleby oraz wzrost roślin. W związku z tym dodatki złożone z materii organicznej pozwalają na poprawę jakości gleby i zatrzymanie w niej substancji odżywczych (Kumpiene, 2010).

Metale ciężkie, silnie włączone w strukturę materii organicznej, poprzez np. tworzenie struktur chelatowych, wydają się być zablokowane tak długo, aż odczyn gleby nie obniży się do wartości pH 3. Wpływ materii organicznej na mobilność metali ciężkich w znacznym stopniu jest uzależniony od jej właściwości, m.in. stopnia humifikacji, stosunku pomiędzy rozpuszczalnymi małocząsteczkowymi kwasami organicznymi a wielkocząsteczkowymi składnikami. Warunki zasadowe mogą

prowadzić do rozpuszczania materii organicznej, co może prowadzić do zwiększenia mobilności zanieczyszczeń nieorganicznych. Natomiast, w warunkach kwaśnych, spada powinowactwo kwasów humusowych i fulwowych do kationów metali. W związku z tym, istotnym jest, aby w procesie stabilizacji zanieczyszczeń przy użyciu materii organicznej był utrzymywany obojętny odczyn gleby (Kumpiene, 2010).

#### a) Torf

Adsorpcja i wymiana jonowa przez materiały pochodzenia organicznego takie jak torf, mogą być przydatną opcją w usuwaniu koloidowych i rozpuszczonych form metali oraz mogą doprowadzić do ich trwałego unieruchomienia w glebie. Torf posiada wysokie powinowactwo do jonów cynku i kadmu, znacznie wyższe niż materiały ilaste (Ledin i wsp., 1996). Wprowadzenie torfu do gleby w ilości 5% (w stosunku wagowym) może znacznie obniżyć stężenia kadmu i cynku w roztworze glebowym, przy pH 5 (Bes i Mench, 2008). Z kolei łączne wprowadzanie torfu z popiołami lotnymi może rozszerzyć zakres jego skuteczności w glebach podatnych na zakwaszenie (Kumpiene i wsp., 2007). Niektóre właściwości torfu, takie jak podatność na wysychanie, słaba stabilność chemiczna i niski odczyn zmieniają niekorzystnie warunki dla wzrostu roślin i jednocześnie mogą ograniczać jego zastosowanie w procesie wspomaganej fitostabilizacji. W związku z tym stosowanie torfu, w większości przypadków wiąże się z koniecznością korekty odczynu stabilizowanej gleby (Jarvan, 2004).

#### b) Odpady biodegradowalne

Recykling odpadów organicznych czy biodegradowalnych (np. osady ściekowe, gnojowica, kompost) poprzez ich aplikację jako dodatki w procesie fitostabilizacji, obniżające mobilność metali ciężkich w glebach jest od wielu lat przedmiotem badań naukowych. Stosowanie osadów ściekowych w rolnictwie jest często związane z wprowadzaniem dodatkowych zanieczyszczeń w nich zawartych i może zwiększać całkowite ryzyko dla środowiska i człowieka (Harrison i wsp., 1999; McBride, 2003; Maddock i wsp., 2004). Pomimo szeregu wątpliwości, stosowanie odpadów biodegradowalnych pojedynczo lub w mieszance z innymi dodatkami nieorganicznymi jest rozpatrywane jako jedna z opcji przywracania wartości użytkowej terenom zanieczyszczonym na skutek działalności hutniczej czy wydobywczej (Caravaca i wsp., 2003; Maddocks i wsp., 2004). Podobnie jak w przypadku popiołów lotnych,

skuteczność odpadów organicznych w stabilizacji pierwiastków śladowych w glebie jest uzależniona od ich właściwości i powinna być poddana ocenie przed ich aplikacją w pracach terenowych (Calace i wsp., 2005).

### c) Węgiel brunatny

Na charakter węgla brunatnych wpływa szereg czynników towarzyszących ich przemianom, zachodzącym w procesie karbonizacji. Są to przede wszystkim warunki klimatyczne, typ roślinności itp. Stąd też właściwości fizykochemiczne i struktura węgla brunatnego mogą różnić się między sobą. Złóża węgla brunatnego w Polsce związane są z formacją trzeciorzędu, głównie miocenu (Maciejewska, 1998). Polskie węgle brunatne należą do węgla ksylicowego-ziemistych. Duża część, szczególnie odpadowych węgla ziemistych, może być z powodzeniem wykorzystywana jako źródło materii organicznej dla gleb.

Skład pierwiastkowy organicznej substancji węgla brunatnego jest zróżnicowany. Zawartość węgla organicznego może sięgać 80%. Zawartość azotu w organicznej substancji węgla brunatnego najczęściej wynosi 0,8% - 1,4%, a zawartość siarki wynosi przeciętnie 1 - 4% (Maciejewska, 1998).

Węgiel brunatny składa się z szeregu składników grupowych. Należą do nich przede wszystkim kwasy huminowe, hmatomelanowe, fulwowe oraz biuminy. Największe znaczenie z punktu widzenia przydatności rekultywacyjnej mają kwasy huminowe, główny składnik węgla brunatnych. Są to wielocząsteczkowe, polifunkcyjne, bezpostaciowe kwasy organiczne. Kwasy huminowe zbudowane są głównie z węgla, wodoru i tlenu oraz niewielkich ilości azotu i siarki. Podstawowym elementem struktury kwasów huminowych są pierścienie aromatyczne typu benzenu i pirydyny, pierścienie alicykliczne, łańcuchy alifatyczne i grupy funkcyjne. Grupy funkcyjne kwasów huminowych spełniają istotną rolę w środowisku glebowym. Warunkują szereg jego właściwości, takich jak hydrofilność, charakter kwasowy, zdolność wymiany jonowej. Do najważniejszych należą tlenowe grupy funkcyjne:  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $=\text{C}=\text{O}$  oraz  $-\text{OCH}_3$ . Grupa karboksylowa i wodorotlenkowa nadają jonowymienny charakter kwasom huminowym (Maciejewska, 1998; Vitkova i wsp., 2011),

Kwasy huminowe charakteryzują się zdolnościami jonowymiennymi. Jak stwierdzono, oprócz sodu i potasu, mogą również wymieniać glin, żelazo, miedź, kadm, czy też ołów (Maciejewska, 1998; Havelcova i wsp., 2009; Dorskocil i Pekar, 2012).

O wielkości zatrzymywania metali ciężkich przez glebę w głównej mierze decyduje jej pojemność sorpcyjna, determinowana ilością i jakością koloidów tworzących kompleks sorpcyjny. Grupy funkcyjne kwasów huminowych i fulwowych obecnych w węglu brunatnym mogą łączyć się z metalami jedno-, dwu- lub trójwartościowymi, a trwałość powstałych w ten sposób kompleksów chelatowych warunkowana jest odczynem gleby oraz stężeniem metalu w glebie (Maciejewska, 1998). Wraz ze wzrostem odczynu gleby rośnie powinowactwo kwasów humusowych do metali, np. w przypadku cynku przy wyższych wartościach pH tworzy się wodorotlenek cynku zamiast wolnych jonów  $Zn^{2+}$  i w związku z tym kwasy humusowe są w stanie związać znacznie większą ilość tego pierwiastka. Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego obniża stężenie biodostępnych form kadmu i cynku (Ociepa i wsp., 2011) oraz znacząco zmniejsza pobieranie kadmu, ołowiu i cynku przez rośliny (Maciejewska, 1998; Maciejewska i Kwiatkowska, 2003).

#### *Związki wapnia*

Wapno jest materiałem najczęściej stosowanym w rolnictwie do neutralizacji odczynu gleby, poprawy warunków wzrostu roślin oraz ograniczenia pobierania metali ciężkich przez rośliny.

Związki alkaliczne, takie jak węglan wapnia  $CaCO_3$ , wodorotlenek wapnia  $Ca(OH)_2$ , tlenek wapnia  $CaO$  i tlenek magnezu  $MgO$  były rozpatrywane pod kątem ich przydatności w remediacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi, a ich efektywność porównywano z innymi stosowanymi dodatkami doglebowymi (Bolan i wsp., 2003; Garau i wsp., 2007; Duskocil i Piekar, 2012).

Mechanizmy związane z immobilizacją metali ciężkich w glebach przy zastosowaniu związków wapnia są następujące: zwiększenie ujemnych ładunków cząstek gleby, tworzenie związków hydroksylowych o silnych właściwościach sorpcyjnych, strącanie metali w postaci wodorotlenków lub węglanów oraz sekwestracja metali dzięki wzmożonej aktywności mikrobiologicznej (Hamon i wsp., 2002; Bolan i wsp., 2003; Ruttens i wsp., 2010).

Związki alkaliczne mogą mieć zróżnicowany wpływ na mobilność arsenianów i chromianów, w zależności od wywoływanych zmian odczynu gleby. Wapnowanie gleby, a co za tym idzie podwyższanie jej odczynu powyżej wartości obojętnej może powodować utlenianie  $Cr^{3+}$  do bardziej mobilnego i toksycznego  $Cr^{6+}$  oraz zwiększenie jego pobierania przez rośliny (Seaman i wsp., 2001). Wysokie stężenia wapnia może



powodować wytrącanie się arsenu w postaci wodorarsenianu (IV) wapnia ( $\text{CaHAsO}_4$ ) lub arsenianu wapnia ( $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$ ) przy obojętnym odczynie gleby (Hartley i wsp., 2004; Kumpiene 2010).

Lombi i wsp. (2004) sugerowali, iż wprowadzenie wapna do gleby zwiększa sorpcję arsenu na węglanach, podczas gdy późniejsze badania nie wykazały znacznego efektu immobilizacji As przez związki wapnia, w glebach zanieczyszczonych wieloma metalami jednocześnie (Hartley i Lepp, 2004; 2008; Madejon i wsp., 2006).

Najczęściej stosowane dodatki glebowe i ich wpływ na immobilizację metali ciężkich przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Dodatki glebowe i ich wpływ na mobilność metali ciężkich, (za Kumpiene 2010, modyfikacje własne)

Dodatki	Wpływ na mobilność metali ciężkich			Komentarz
	Pozytywny	Zróznicowany	Negatywny	
Tlenki żelaza	As	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn		Immobilizacja zależna od odczynu gleby, zbyt wysokie stężenia manganu są toksyczne dla roślin
Tlenki manganu i glinu	As, Zn, Cd, Ni, Cu, Pb		Cr	
Iły	Pb, Cd, Cu, Zn	As		Mało wydajne w przypadku gleb silnie zanieczyszczonych, mogą ulegać wymywaniu przy niskim odczynie gleby
Zeolity		Cu, Zn, Mn, As		
Popioły lotne	Pb, Cd, Cu, Zn	As		
Związki fosforu	Pb, Cu, Zn, Cd		As	
Węgiel brunatny	Cu, Pb, Zn, Cd			
Torf	Cu, Pb, Zn, Cd			Słaba stabilność fizykochemiczna
Odpady biodegradowalne		Cu, Pb, Zn, Ni, Cd, As		Możliwość wprowadzania dodatkowych zanieczyszczeń do gleby
Związki wapnia	Cu, Zn, Cd, Pb	As, Cr		Wymagana kontrola odczynu gleby

### 2.3.2.2. Gatunki roślin stosowane we wspomaganej fitostabilizacji

Dobór odpowiednich gatunków roślin jest istotnym elementem skutecznie przeprowadzonego procesu wspomaganej fitostabilizacji. Jak stwierdzono, rośliny wykorzystywane w tym procesie powinny charakteryzować się następującymi cechami (Berti i wsp., 1998; Vangronsveld i Cunningham, 1998; Mench i wsp., 2010; Zou i wsp., 2012):

- wysoką tolerancją na wysokie stężenia zanieczyszczeń w glebie,
- zdolnością wytworzenia na powierzchni gleby zwartej okrywy roślinnej wraz z silnie rozwiniętym (gęstym), długim systemem korzeniowym,
- kumulacją zanieczyszczeń w korzeniach i niskim ich wynoszeniem do części nadziemnych,
- niskimi wymaganiami odnośnie warunków siedliskowych oraz odpornością na lokalne warunki klimatyczne.

Najbardziej przydatnymi w procesie wspomaganej fitostabilizacji metali ciężkich w glebach, okazały się różne gatunki traw, które posiadają większość w/w cech, przy czym w literaturze opisane są również przypadki stosowania roślin uprawnych, takich jak pszenica, owies, kukurydza (Knox i wsp., 2001). Spośród traw najczęściej stosowane są: kostrzewa czerwona (*Festuca rubra*), mietlica pospolita (*Agrostis capillaris*), życica trwała (*Lolium perenne*), śmiełek darniowy (*Deschampsia caespitosa*), spartyna gęstokwiatowa (*Spartina densiflora* i *Spartina maritima*) (Li i Chaney, 1998; Vangronsveld, 1998; Kucharski i wsp., 2005; Gucwa-Przepióra i wsp., 2007; Cambrolle i wsp., 2011).

## 2.4 METODY OCENY EFEKTYWNOŚCI PROCESU REMEDIACJI GLEB ZANIECZYSZCZONYCH METALAMI CIĘŻKIMI.

Przeprowadzenie oceny efektywności i oddziaływania na środowisko glebowe procesu wspomaganej fitostabilizacji metali ciężkich jest niezbędne, szczególnie ze względu na wprowadzenie do gleby różnych dodatków stabilizujących.

Do oceny procesu można zastosować zarówno metody fizykochemiczne, jak i biologiczne. Do metod fizykochemicznych należy określenie zmian biodostępności stabilizowanych metali dla roślin, przy pomocy ekstrakcji specyficznymi ekstrahentami. Natomiast metody biologiczne obejmują określenie zmian aktywności biologicznej oraz

pokrycia roślinnego wraz z analizą akumulacji metali ciężkich w różnych tkankach roślinnych.

#### 2.4.1. Metody fizykochemiczne

Do oznaczania dostępnych form metali ciężkich w osadach i glebach stosowane są różne procedury ekstrakcji – ekstrakcja pojedyncza, z użyciem różnych ekstrahentów, a także ekstrakcja sekwencyjna. Metody ekstrakcji sekwencyjnej opierają się na stopniowym uwalnianiu metali występujących w różnych, tzw. „formach specyjalnych” otrzymanych za pomocą ekstrakcji różnymi, specyficznymi ekstrahentami. Kolejne frakcje chemiczne uzyskiwane są przy użyciu coraz to silniejszych ekstrahentów, w coraz bardziej agresywnych warunkach ekstrakcji. Za frakcje biodostępne uznaje się frakcję rozpuszczalną w wodzie oraz wymienną (Tessier i wsp., 1979). Metoda ekstrakcji pojedynczej polega na poddawaniu próbki gleby działaniu jednego ekstrahenta w celu oznaczenia form metali rozpuszczalnych w roztworach ekstrakcyjnych dobranych tak, aby odzwierciedlały biologiczną przyswajalność danego metalu dla roślin lub organizmów (formy przyswajalne) oraz podatność metali na wymywanie (głównie gleb silnie zanieczyszczonych i odpadów) (Karczewska, 2002). Stanowi ona prostą i szybką metodę dostarczającą informacji o potencjalnym ryzyku środowiskowym (Cook i Parker, 2005). Stosuje się tu przede wszystkim tzw. „delikatne ekstrahenty”, do których zalicza się roztwory soli obojętnych (np. chlorek potasu (KCl), chlorek wapnia ( $\text{CaCl}_2$ ), azotan sodowy ( $\text{NaNO}_3$ ), kwasy o różnym stężeniu (np., 0,1 M lub 1 M kwas chlorowodorowy (HCl)) i roztwory związków kompleksujących, np. kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), kwas dietylenotriaminopentaoctowy (DTPA) (Quevauviller, 2002). Procedury ekstrakcji pojedynczej w porównaniu z ekstrakcją sekwencyjną redukują używanie agresywnych kwasów oraz możliwość popełnienia błędów podczas realizacji poszczególnych etapów ekstrakcji (Peijnenburg i wsp., 2007). Roztwory soli obojętnych uwalniają przede wszystkim kationy frakcji wymiennej. Rozcieńczone kwasy ekstrahują metale ciężkie, zawarte we frakcji wymiennej, węglanowej, związane z tlenkami żelaza i manganu oraz z substancją organiczną. Związki kompleksujące ekstrahują metale frakcji wymiennej oraz organicznej (Karczewska, 2002). Przyjmuje się, że formy metali uwalniane w czasie ekstrakcji  $\text{CaCl}_2$  odpowiadają niewielkim zmianom warunków

środowiskowych, dlatego zdolność do ekstrakcji roztworem chlorku wapnia jest miarą aktualnej dostępności metali.

## 2.4.2. Metody biologiczne

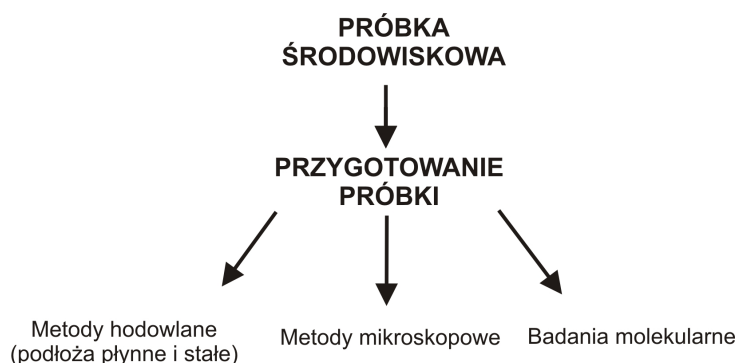
### 2.4.2.1. Aktywność biologiczna gleb

Metody remediacyjne mają na celu nie tylko oczyszczanie zanieczyszczonych gleb (detoksykacja), ale również uaktywnienie obszarów zdegradowanych, przywrócenie różnorodności i równowagi biologicznej na skażonych terenach oraz możliwości ponownego ich użytkowania. Istotne jest przywrócenie/zachowanie środowiska w stanie pozwalającym na jego odtworzenie i funkcjonowanie procesów przyrodniczych. Aktywność biologiczna gleby jest niezwykle wrażliwa na stres środowiskowy. W związku z czym, każda zmiana warunków środowiskowych może spowodować modyfikację składu mikroflory glebowej oraz jej aktywności. Ochrona różnorodności biologicznej i monitorowanie jej przemian na wszystkich poziomach organizacji przyrody, w tym mikroorganizmów, które stanowią najniższy poziom łańcucha pokarmowego, ma istotne znaczenie. Mikroorganizmy, pomimo swoich małych rozmiarów (<0,2 mm), są najliczniejszą grupą organizmów glebowych, posiadają duży stosunek powierzchni do objętości, odgrywają dużą rolę w obiegu węgla, azotu, siarki, fosforu, rozkładzie materii organicznej, przepływie energii, wpływają na parametry fizyczne gleb, biorą udział w budowie i utrzymaniu struktury gleb, zapewniają odpowiednie warunki wodne gleb (Nielsen i Winding, 2002; Bloem i Breure, 2003; Markert i wsp., 2003). Mikroorganizmy są bardzo wrażliwe, szybko reagują na wszelkiego rodzaju zmiany (naturalne i antropogeniczne) zachodzące w środowisku oraz szybko przystosowują się do nowych warunków. Adaptacja do nowych warunków może być monitorowana przez zmiany ilościowe, jak i jakościowe w populacji i aktywności mikrobiologicznej. Zmiany zachodzące w populacji mikroorganizmów stanowią sumę oddziaływań czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych na ekosystemy glebowe.

Obecnie, w badaniach dotyczących określenia struktury, dynamiki i funkcji populacji mikrobiologicznej, stosuje się:

- metody tradycyjne (liczebność, biomasa, aktywność enzymatyczna) oraz

- nowoczesne metody molekularne - analiza 16S rDNA, PCR-DGGE, PCR-TGGE, T-RFLP, analiza kwasów tłuszczowych – FAMEs, PLFAs, analiza mRNA, BIOLOG™ system, *in situ* hybrydyzacja – FISH, SIP - ang. stable isotope probing, metody „-omics” (Gupta i wsp., 2008; Desai i wsp., 2010) (Rysunek 2).



Rys. 2. Podział metod mikrobiologicznych stosowanych do oceny jakości gleb (Płaza i wsp., 2003)

W niektórych krajach europejskich opracowano programy monitorowania gleb (European Soil Monitoring Programmes), w których obok parametrów fizyczno-chemicznych wprowadzono różne wskaźniki oceny biologicznej gleb. Niemcy do swojego systemu monitoringu wprowadzili następujące parametry biologiczne: oddychanie, biomasę, aktywność enzymatyczną. Natomiast Holandia – biomasę, aktywność procesów C-mineralizacji i N-mineralizacji, DGGE, BIOLOG™. Wielka Brytania – biomasę, oddychanie, aktywność enzymatyczną (celulazy, katalazy), BIOLOG™, analizę kwasów tłuszczowych (PLFA), Austria – biomasę, aktywność enzymatyczną (dehydrogenazy, ksylazy, arylsulfatazy, proteazy), nityfikację (Nielsen i Winding, 2002).

#### 2.4.2.2. Testy ekotoksykologiczne

Innymi, istotnymi parametrami w ocenie efektywności procesów remediacyjnych i zanieczyszczenia gleb są testy ekotoksykologiczne. Bioindykacja jest metodą wykorzystującą jako wskaźnik organizm żywy, którego reakcja jest podstawą do oceny badanego układu. Pozwala to na poznanie sumarycznej toksyczności wszystkich szkodliwych substancji, w wielu przypadkach działających synergistycznie. W przypadku bioindykacji, istotą jest ocena ogólnej toksyczności badanego układu, nie

ma znaczenia, który związek jest toksyczny, ważny jest sumaryczny efekt ich działania. Organizmy stosowane w testach wybierane są pod kątem ich szczególnej wrażliwości na związki chemiczne szkodliwe dla człowieka. Zazwyczaj w badaniach stosuje się zestawy biotestów, w których organizmy testowane należą do różnych poziomów troficznych (producenci, konsumenci i destruenci).

Spośród testów ekotoksykologicznych, Mictrotox (wykorzystujący bakterie *Vibrio fischeri*) okazał się przydatnym narzędziem w ocenie toksyczności gleb zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi i metalami ciężkimi (Greene i wsp., 1988; Wang, 1991; Hund i Traunspurger, 1994; Keddy i wsp., 1995; Salanitro i wsp., 1997; Dorn i wsp., 1998; Saterbak i wsp., 1999; Juvonen i wsp., 2000; Płaza i wsp., 2005). Innymi testami wykorzystywanymi również do oceny toksykologicznej gleb są: test bezpośredniego kontaktu oceny toksyczności ostrej z wykorzystaniem skorupiaka *Heterocypris incongruens* (Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup>), test kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin (Phytotoxkit<sup>TM</sup>) oraz testy na dżdżownicach.

### 3. CEL I ZAKRES PRACY

Gleby silnie zanieczyszczone metalami ciężkimi stanowią duże zagrożenie dla otaczającego środowiska, a poszukiwanie atrakcyjnych ekonomicznie i przyjaznych dla środowiska rozwiązań technologicznych, ograniczających ich szkodliwy wpływ jest w pełni uzasadnione. Metoda wspomaganej fitostabilizacji metali ciężkich w glebach silnie zanieczyszczonych jest znana od wielu lat. Początkowo, prowadzone badania koncentrowały się głównie na immobilizacji jednego metalu, np. ołowiu, a obecnie większość prac dotyczy badania immobilizacji kilku metali jednocześnie, np. ołowiu, kadmu i cynku.

Celem pracy było opracowanie metody wspomaganej fitostabilizacji gleb silnie zanieczyszczonych metalami ciężkimi z wykorzystaniem dodatków stabilizujących – drobnoziarnistej frakcji odpadowej węgla brunatnego i wapna nawozowego.

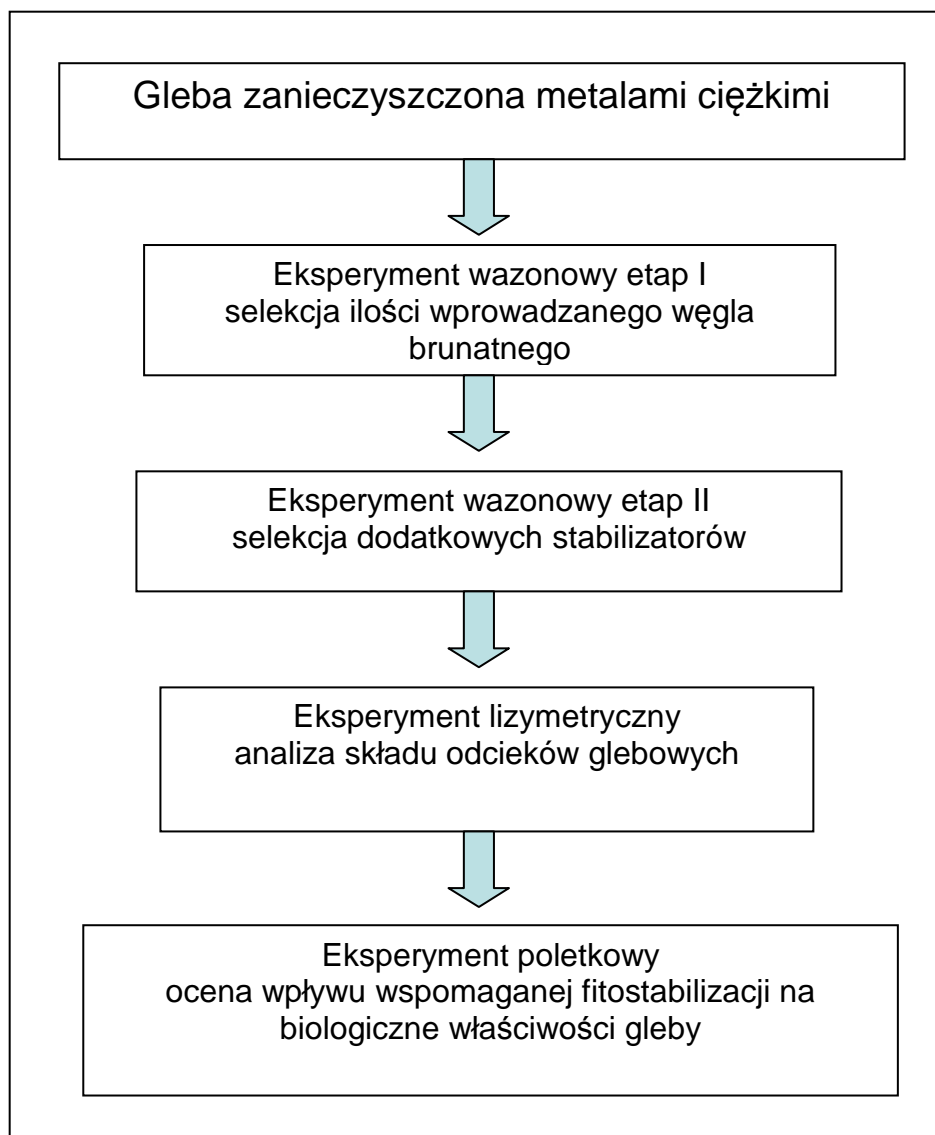
W pracy postawiono tezę:

Wprowadzenie do gleby dodatków stabilizujących powoduje zmniejszenie biodostępności metali, poprawia warunki wzrostu roślin oraz nie wpływa negatywnie na biologiczne właściwości gleby.

Zakres pracy obejmował:

1. Opracowanie doboru dawek związków stabilizujących zapewniających ograniczenie biodostępności ołowiu, kadmu i cynku.
2. Określenie wpływu dodatków obniżających biodostępność ołowiu, kadmu i cynku na produkcję biomasy oraz kumulację tych metali w tkankach roślinnych.
3. Określenie zmian stężenia metali ciężkich w odciekach glebowych pod wpływem dodatków stabilizujących.
4. Ocena efektywności procesu wspomaganej fitostabilizacji na podstawie zmian fizyko-chemicznych i biologicznych parametrów gleby.

Prace prowadzone były zarówno w skali laboratoryjnej (badania wazonowe), jak i półtechnicznej (badania lizymetryczne i poletkowe). Na Rysunku 3 przedstawiono schemat przeprowadzonych w pracy badań.



Rys. 3. Schemat przeprowadzonych badań

Badania wykonano w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach, a sfinansowano ze środków na dotację statutową oraz z projektu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „Wspomagana fitostabilizacja metali ciężkich w glebach” (N N523 742440, 2011-2013).



## 4. MATERIAŁY I METODY

### 4.1. CHARAKTERYSTYKA TERENU BADAŃ

Teren, z którego pobierano glebę do badań znajduje się na obszarze województwa śląskiego w Piekarach Śląskich. Jest to kilkuhektarowy obszar bezpośrednio sąsiadujący z nieistniejącą hutą cynku i ołowiu „Waryński”. Teren po dawnej hucie „Waryński” zajmuje powierzchnię 60 ha i jest zlokalizowany na terenie Gminy Piekary Śląskie. Huta prowadziła działalność począwszy od roku 1927, aż do chwili jej zamknięcia w roku 1990. Została zlokalizowana w miejscu występowania na głębokości 40 – 90 m rud cynkowo-ołowiowych oraz czynnie eksploatowanych pokładów węgla (od poziomu 300 m). Tereny te są zaliczone do IV klasy szkód górniczych (Kucharski i wsp., 2000). Wcześniejsze wyniki analiz gruntu wskazały, że najważniejszymi zagrożeniami środowiska, występującymi na danym obszarze są metale ciężkie Cd, Pb, i Zn. Wysokie stężenia tych metali w glebach (maksymalna zawartość Pb dochodziła do 30% masy próbki, Zn do 12%, zaś Cd do blisko 0,5%, tak z wierzchniej warstwy, jak również z odkrywek) w rejonie byłej huty „Waryński” świadczą o skażeniu tego terenu w trakcie działania zakładu.

Na początku XX wieku teren ten był jeszcze uprawiany rolniczo, ale od lat 70 ubiegłego wieku jest nieużytkiem, ze względu na słaby wzrost roślin, spowodowany najprawdopodobniej wysoką zawartością metali w podłożu. Ogólny widok miejsca poboru gleby przedstawiono na Rysunku 4.



Rys. 4. Ogólny widok miejsca poboru gleby

#### 4.2. CHARAKTERYSTYKA GLEBY WYKORZYSTANEJ W DOŚWIADCZENIACH

Glebę do badań pobrano z warstwy 0-30 cm, ze względu na potrzebę praktycznego zastosowania procesu wspomaganą fitostabilizacji w warstwie ornej. Następnie, pobraną glebę (około 2 t) suszono w temperaturze pokojowej i przesiano przez sito 4 mm.

W glebie oznaczono następujące parametry:

- pH w wodzie dejonizowanej i w 1 M KCl
- materię organiczną (OM)
- skład granulometryczny
- pojemność wymienną dla kationów (CEC)
- zawartość N, P, K
- całkowita zawartość metali (ekstrakcja w wodzie królewskiej)
- zawartość metali biodostępnych (ekstrakcja w 0,01 M CaCl<sub>2</sub>)

#### 4.3. CHARAKTERYSTYKA DODATKÓW STABILIZUJĄCYCH

W badaniach zastosowano następujące dodatki stabilizujące:

1. drobnoziarnistą frakcję odpadową węgla brunatnego pochodzącą z kopalni „Turoszów” w Bogatyni. Węgiel poddano procesowi suszenia, a następnie przesiano przez sito 2 mm. W badanym węglu brunatnym oznaczono pH w wodzie dejonizowanej i 1 M KCl oraz całkowitą zawartość metali (ekstrakcja w wodzie królewskiej),
2. wapno nawozowe dolomitowe, (PPHU DOLPOL, Kłodzko),
3. superfosfat potrójny ((CaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O), (Gdańskie Zakłady Nawozów Fosforowych „FOSFORY” Sp. z o.o.).

#### 4.4. NAWOŻENIE MINERALNE

Glebę przeznaczoną do badań wzbogacano w nawozy mineralne, Azofoskę (Inco VERITAS S.A.), zawierającą NO<sub>3</sub> – 5,5%, NH<sub>4</sub> – 8,1%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 6,4%, K<sub>2</sub>O – 19,1%,

MgO – 4,5% oraz saletrę amonową w ilościach odpowiednio 0,4 g oraz 0,2 g na kg powietrznie suchej gleby (Kucharski i wsp., 2005).

#### 4.5. EKSPERYMENT WAZONOWY

##### 4.5.1. Określenie dawki węgla brunatnego wprowadzanego do gleby w celu ograniczenia biodostępności Pb, Cd i Zn

W doświadczeniu wazonowym określono minimalną, skuteczną dawkę węgla brunatnego pozwalającą na uzyskanie efektu obniżenia biodostępności kadmu, ołowiu i cynku.

W doświadczeniu wykorzystano 30 kg zanieczyszczonej gleby, przygotowanej jak opisano w punkcie 4.2., do której dodano 12 g AZOFOSKI i 6,2 g saletry amonowej w celu wprowadzenia odpowiedniej ilości nawozów NPK. Następnie całość dokładnie wymieszano. Na dno każdego wazonu wsypano 30 g drenażu i napełnione je 300 g odpowiednio przygotowanej mieszanki. W eksperymencie wazonowym przetestowane zostały następujące warianty:

- 30% węgla brunatnego (w/w),
- 20% węgla brunatnego (w/w),
- 10% węgla brunatnego (w/w),
- 5% węgla brunatnego (w/w),
- 2,5% węgla brunatnego (w/w),
- gleba bez dodatku stabilizującego.

Każdy wariant wykonany został w 3 powtórzeniach.

Eksperyment przeprowadzono w pokoju hodowlanym, w kontrolowanych warunkach oświetlenia i temperatury. Wazony podlewano wodą, w celu uzyskania odpowiedniej wilgotności gleby. Po okresie sześciu tygodni pobrane zostały próbki glebowe w celu określenia zmian biodostępności metali w glebie, a na powierzchnię wazonu wysiano nasiona kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea*) „Asterix”, w ilości 1 g na każdy wazon. W trakcie wzrostu traw monitorowano następujące parametry: wysokość roślin, pokrycie powierzchni doniczki oraz ich morfologię w celu określenia stopnia chlorozy. Po 12 tygodniach wzrostu traw zebrano części nadziemne i korzenie w celu określenia masy roślin oraz kumulacji metali ciężkich w tkankach

roślinnych. Zebrany materiał rośliny wysuszono w temperaturze 70 °C i określono ich suchą masę. Następnie przygotowano do mineralizacji w celu określenia zawartości metali ciężkich w tkankach.

4.5.2. Wybór drugiego stabilizatora wprowadzanego łącznie z 10% węgla brunatnego, wspomagającego obniżenie biodostępności metali ciężkich w glebie zanieczyszczonej

W celu wykonania doświadczenia przygotowano 30 kg powietrznie suchej gleby „Waryński” (jak opisano w punkcie 4.2). Do gleby dodano 12 g AZOFOSKI i 6,2 g saletry amonowej w celu wprowadzenia odpowiedniej ilości nawozów NPK oraz 10% (w/w) węgla brunatnego. Następnie, do tak przygotowanej gleby dodawano różne kombinacje dodatków stabilizujących: superfosfatu potrójnego oraz wapna nawozowego, zmieszane w określonym stosunku wagowym. Na dno każdego wazonu wsypano 30 g drenażu i tak przygotowane wazonu napełniono 300 g odpowiedniej mieszanki.

W przeprowadzonym eksperymencie przetestowane zostały następujące warianty:

- Kontrola (gleba zanieczyszczona bez dodatków),
- 10% węgla brunatnego,
- 10% węgla brunatnego + 2,5% superfosfatu potrójnego,
- 10% węgla brunatnego + 5% superfosfatu potrójnego,
- 10% węgla brunatnego + 5% wapna nawozowego,
- 10% węgla brunatnego + 2,5% wapna nawozowego.

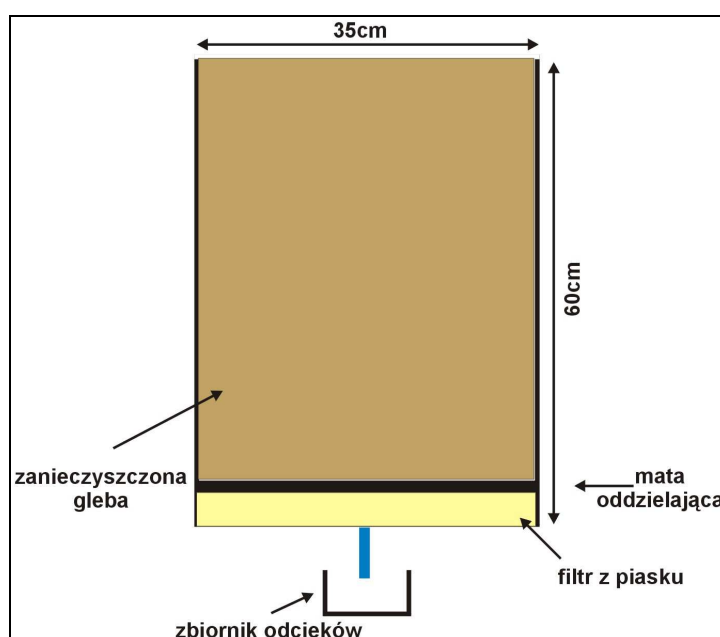
Każdy wariant wykonano w 3 powtórzeniach.

Aby uzyskać odpowiednią wilgotność gleby wazonu podlewano wodą. Po okresie sześciu tygodni pobrano próbki glebowe w celu oznaczenia zmian biodostępności metali w glebie. W tym samym czasie, na powierzchnię wazonu wysiano nasiona *F. arundinacea* „Asterix” w ilości 1 g na każdy wazon. W trakcie wzrostu traw monitorowano następujące parametry: wysokość roślin, pokrycie powierzchni doniczki oraz ich morfologię w celu określenia stopnia chlorozy. Po 12 tygodniach zebrano materiał roślinny by określić biomasę oraz kumulację metali ciężkich w tkankach. Zebrany materiał roślinny wysuszono w temperaturze 70 °C

i określono jego suchą masę. Następnie próbki roślin przygotowano do mineralizacji w celu określenia zawartości metali ciężkich w ich tkankach.

#### 4.6. EKSPERYMENT LIZYMETRYCZNY

Lizymetry, w których prowadzono proces stabilizacji stanowiły 35-cio litrowe wazony, wyposażone w dolnej części w otwór umożliwiający zbieranie odcieków. Na dnie lizymetrów wprowadzona została 1 cm warstwa piasku, która zapobiegała przechodzeniu cząstek gleby do odcieków. Schemat lizymetru przedstawiono na Rysunku 5.



Rys. 5. Schemat lizymetru

Lizymetry napełniono 26 kg gleby (wariant kontrolny) oraz glebą z dodatkiem 10% węgla brunatnego + 2,5% wapna nawozowego (wariant eksperymentalny). W trakcie trwania eksperymentu prowadzono pobory odcieków glebowych, w których oznaczano stężenie metali (Pb, Cd, Zn), odczyn i przewodnictwo elektryczne (EC).

Warianty doświadczenia lizymetrycznego:

- gleba bez dodatków (wariant kontrolny),
- 10% węgla brunatnego + 2,5% wapna nawozowego (wariant eksperymentalny).

Zastosowane w tym doświadczeniu dawki węgla brunatnego i wapna nawozowego wybrano na podstawie wyników eksperymentu wazonowego.

Wszystkie warianty doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach.

Badania prowadzono przez 4 miesiące. Pierwszy pobór odcieków przeprowadzono po 6 tygodniach od wprowadzenia do gleby dodatków stabilizujących, a kolejne pobory następowały w miesięcznych odstępach. W zależności od warunków atmosferycznych do gleby dodano od 3 do 4 litrów wody. W przefiltrowanych odciekach oznaczono następujące parametry: odczyn, przewodnictwo elektryczne oraz stężenie ołowiu, kadmu i cynku.

#### 4.7. EKSPERYMENT POLETKOWY

Doświadczenie poletkowe przygotowano w dwóch wariantach: kontrolnym – gleba zanieczyszczona metalami ciężkimi bez dodatków stabilizujących oraz eksperymentalnym, z wprowadzonymi dodatkami stabilizującymi. Każde poletko o powierzchni 2 m<sup>2</sup> wypełniono 500 kg zanieczyszczonej gleby. Gleba w wariacie eksperymentalnym została wymieszana z węglem brunatnym (10% w/w), wapnem nawozowym (2,5% w/w) oraz nawozami mineralnymi: Azofoską (0,2 g/kg gleby) i saletrą amonową (0,4 g/kg gleby). W wariacie kontrolnym do gleby wprowadzono tylko Azofoskę i saletrę amonową, w takich samych dawkach, jak w wariacie eksperymentalnym. Zastosowane dawki stabilizatorów wyznaczono we wcześniejszych badaniach, na podstawie eksperymentu wazonowego.

Po 6 tygodniach od wprowadzenia dodatków, na poletka wysiano 100 g nasion kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea* „Asterix”).

Zmiany stężenia biodostępnych form ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w glebie monitorowano w 0, 6, 12, 20, 28, 52, 60, 85 tygodniu od momentu wprowadzenia węgla brunatnego i wapna nawozowego.

Ponadto, w kolejnych tygodniach trwania eksperymentu (0, 3, 6, 9, 20, 28, 58, 85 tygodniu) w glebie kontrolnej i stabilizowanej oznaczano:

- liczbę bakterii, grzybów i promieniowców,
- aktywność enzymów glebowych: dehydrogenazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej, proteazy i ureazy,

- aktywność enzymów glebowych przy użyciu testu API<sup>®</sup>ZYM,
- toksyczność gleby testem Microtox-SPT<sup>®</sup>.

W trakcie każdego z dwóch sezonów wegetacyjnych wykonano dwa zbiory części nadziemnych traw w celu określenia zmian w biodostępności metali ciężkich w trakcie sezonu wegetacyjnego. Oznaczono również produkcję biomasy (sucha masa roślin) z plotka kontrolnego i eksperymentalnego oraz kumulację metali ciężkich w tkankach roślin.

#### 4.8. PROCEDURY ANALITYCZNE

##### 4.8.1. Analizy fizyczno-chemiczne

Oznaczenia odczynu gleby w wodzie dejonizowanej i 1 M KCl wykonano przy pomocy pehametru (CPC-551, Elmetron, Polska) i kombinowanych elektrod pH (OSH 10-10, METRON, Polska). Do oznaczeń pH w wodzie dejonizowanej, jak i w mieszaninie gleby i 1M KCl zachowano stosunek 1:2,5. Tak przygotowane roztwory pozostawiono na 24 godziny, a następnie dokonano oznaczeń pH. W ekstraktach wodnych oznaczono również przewodnictwo elektryczne przy pomocy elektrody (ESP 2ZM, EUROSENSOR, Polska).

Zawartość materii organicznej oznaczono wg. Houba i wsp. (1995). Zawartość azotu amonowego i azotanowego wykonano zgodnie z PN-ISO 14255:2001, a zawartość P i K odpowiednio według PN-R-04023:1996 oraz PN-R-04024:1997.

Skład granulometryczny określono metodą hydrometryczną wg Pruszyńskiego, zgodnie z PN-R-04032:1998.

W celu określenia całkowitego stężenia metali, próbki gleby utartej do ziarna 0,25 mm, mineralizowano w wodzie królewskiej w mineralizatorze mikrofalowym (MDS 2000, CEM USA).

Dla określenia zawartości metali biodostępnych odważano 5 g gleby utartej do ziarna 0,25 mm, którą wprowadzano do kolb stożkowych o pojemności 200 ml. Następnie glebę ekstrahowano 50 ml 0,01 M CaCl<sub>2</sub> przez 5 godzin, po czym odwirowywano, a uzyskany supernatant filtrowano przez filtr 0,45 μm (Nagle Nuc International, USA). W supernatancie oznaczano zawartość Pb, Cd, Zn i As.

Zebrany materiał roślinny (części nadziemne i korzenie) umyto w wodzie destylowanej, poddano suszeniu w temperaturze 70 °C przez 72 godziny, a następnie zmielono.

W celu określenia zawartości badanych pierwiastków, zmielony materiał roślinny naważono w ilości 1 g do kolbek Erlenmeyera o objętości 50 ml i zalano 20 ml mieszaniny kwasów azotowego i nadchlorowego w stosunku 4:1. W ten sposób przygotowane próbki mineralizowano na płytach grzewczych. Po mineralizacji wykonano ekstrakty do kolb miarowych o objętości 25 ml.

Oznaczenie metali ciężkich wykonywano według akredytowanej metody absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) lub atomowej spektrometrii emisji z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP, Liberty 220, Varian). Oznaczenie As wykonano według akredytowanej metody absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS) techniką wytwarzania wodorków (SAA, SpectrAA 300) z przystawką do generowania wodorków i zimnych par rtęci (VGA-76).

#### 4.8.2. Analizy mikrobiologiczne

##### Test API<sup>®</sup>ZYM

Test API<sup>®</sup>ZYM przeprowadzano w dniu założenia układu badawczego oraz po 3, 6, 9, 20, 28, 58 i 85 tygodniach trwania eksperymentu dla gleby stabilizowanej i kontrolnej.

Jest to półilościowa mikrometoda pozwalająca na określenie aktywności 19 zewnątrzkomórkowych enzymów: 3 fosfataz, 3 esteraz, 3 aminopeptydaz, 2 proteaz i 8 hydrolaz glikozydowych w złożonych, nieoczyszczonych próbkach. Glebę do badań z każdego poletka pobierano z pięciu losowo wybranych miejsc. 2 g gleby dokładnie wymieszano z 5 ml 0,85% sterylnego roztworu NaCl i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 godz. Przygotowanie testu polegało na wprowadzeniu na dno komory inkubacyjnej sterylnej wody destylowanej w celu utrzymania odpowiedniej wilgotności i umieszczeniu w niej paska API<sup>®</sup>ZYM. Następnie, 65 µl zawiesiny glebowej umieszczano w kolejnych studzienkach na pasku API<sup>®</sup>ZYM, zabezpieczono przed wyschnięciem i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 4 godz. Po inkubacji do każdej studzienki dodawano po jednej kropli odczynnik ZYM A (Tris, 37% kwas solny, laurynowy siarczan sodu, woda) i ZYM B (Fast blue BB – aktywny składnik, metanol, DMSO) według zaleceń producenta. Po upływie 5 minut, które niezbędne były do wywołania barwnej reakcji, odczytywano wyniki według tabeli dostarczonej przez producenta. Aktywność enzymów oznaczano jakościowo określając intensywność zabarwienia według skali od 0 (brak aktywności) do 4 (największa aktywność).



### Oznaczenie liczby bakterii

W celu oznaczenia liczby bakterii 10 g gleby zawieszano w 90 ml 0,85% jałowego roztworu NaCl, a następnie intensywnie wytrząsano przez 2 – 3 minuty. W ten sposób, po sedymentacji cząstek stałych gleby, otrzymana zawiesina stanowiła rozcieńczenie  $10^{-1}$ . Dla oznaczenia ogólnej liczebności bakterii przygotowywano szereg rozcieńczeń w soli fizjologicznej od  $10^{-2}$  do  $10^{-7}$ . Z rozcieńczeń od  $10^{-4}$  do  $10^{-7}$  pobierano 0,1 ml zawiesiny i przenoszono na płytki Petriego z podłożem stałym Nutrient Agar (NA). Następnie przy użyciu głaszczki rozprowadzono równomiernie zawiesinę na całej powierzchni płytki (posiew powierzchniowy) (Pepper i Gerba, 2004; Hallmann i wsp., 2006).

Przygotowanie podłoża: 25 g podłoża Nutrient Broth (BioMerieux) rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej, a następnie dodano 15 g agaru (BioMerieux). Całość autoklawowano w temperaturze 121 °C, przez 15 minut, pod ciśnieniem 1 atmosfery. Po schłodzeniu do temperatury około 35 °C dodawano antybiotyk aktidion (cykloheksimid) w stężeniu 500 mg/l (Sigma-Aldrich). Tak przygotowane podłoże rozlewano po 15 ml do płytek Petriego i pozostawiano do zestalenia.

Posiane płytki inkubowano w temperaturze 23 °C przez 72 godz. Po tym czasie liczono ilość wyrosłych kolonii, przy założeniu, że jedna kolonia odpowiada jednej komórce bakteryjnej. Ilość bakterii w 1 g wilgotnej gleby obliczano ze wzoru (Pepper i Gerba, 2004):

$$A = a \cdot b \cdot 10$$

gdzie:

a - średnia liczba kolonii wyrosłych na płytce

b - krotność rozcieńczenia

10 – przeliczenie na 1 ml zawiesiny

Ogólną liczbę bakterii przedstawiono jako logarytm dziesiętny jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) w przeliczeniu na 1 g suchej masy gleby.

### Oznaczenie liczby promieniowców

W celu oznaczenia ogólnej liczby promieniowców 10 g gleby zawieszano w 90 ml 0,85% jałowego roztworu NaCl, a następnie mocno wytrząsano przez 2-3 minuty. W ten sposób, po sedymentacji cząstek stałych gleby, otrzymana zawiesina stanowiła rozcieńczenie  $10^{-1}$ . Dla oznaczenia liczebności promieniowców przygotowywano szereg rozcieńczeń w soli fizjologicznej od  $10^{-2}$  do  $10^{-3}$ . Posiewów badanego materiału na

podłoże stałe Difco™ Actinomycete Isolation Agar dokonywano metodą „płytek tartych” (posiew powierzchniowy). Z każdego rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-3}$ ) pobierano 0,1 ml zawiesiny i wprowadzano na płytki Petriego z podłożem stałym, a następnie przy użyciu głaszczki rozprowadzono równomiernie zawiesinę na całej powierzchni płytki (Pepper i Gerba, 2004).

Przygotowanie podłoża: 22 g Difco™ Actinomycetes Isolation Agar rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej i dodano glicerynę w stężeniu 5 g/l. Podłoże autoklawowano w temperaturze 121 °C, przez 15 minut, pod ciśnieniem 1 atmosfery. Po schłodzeniu do temperatury około 35 °C dodawano dwa antybiotyki: aktidion (cykloheksimid) w stężeniu 50 mg/l (rozpuszczono 50 mg antybiotyku w 1 ml acetonu) i nystatynę w stężeniu 50 mg/l (rozpuszczono 50 mg antybiotyku w 1 ml dimetylosulfotlenku (DMSO)). 15 ml podłoża rozlewano do płytek Petriego i pozostawiano do zestalenia.

Posiane płytki inkubowano w temperaturze 23 °C przez 7 dni. Po tym czasie liczono ilość wyrosłych kolonii, przy założeniu, że jedna kolonia odpowiada jednej komórce bakteryjnej. Ilość promieniowców w 1 g wilgotnej gleby obliczano ze wzoru (Pepper i Gerba, 2004):

$$A = a \cdot b \cdot 10$$

gdzie:

a - średnia liczba kolonii wyrosłych na płytce

b - krotność rozcieńczenia

10 – przeliczenie na 1 ml zawiesiny

Ogólną liczbę promieniowców przedstawiono jako logarytm dziesiętny jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) w przeliczeniu na 1 g suchej masy gleby.

#### Oznaczenie liczby grzybów mikroskopowych

W celu oznaczenia ogólnej liczby grzybów mikroskopowych 10 g gleby zawieszano w 90 ml 0,85% jałowego roztworu NaCl, a następnie intensywnie wytrząsano przez 2-3 minuty. W ten sposób, po sedymentacji cząstek stałych gleby, otrzymana zawiesina stanowiła rozcieńczenie  $10^{-1}$ . Dla oznaczenia liczebności grzybów przygotowywano szereg rozcieńczeń w soli fizjologicznej od  $10^{-2}$  do  $10^{-4}$ . Posiewów badanego materiału na podłoże stałe Malt Extract Agar (MEA) dokonywano metodą „płytek tartych” (posiew powierzchniowy). Z każdego rozcieńczenia (od  $10^{-1}$  do  $10^{-4}$ ) pobierano 0,1 ml

zawiesiny i wprowadzano na płytki Petriego z podłożem stałym, a następnie przy użyciu głaszczki rozprowadzono równomiernie zawiesinę na całej powierzchni płytki (Pepper i Gerba, 2004).

Przygotowanie podłoża: 33,6 g MEA (BIOCORP, Polska) rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej, a następnie całość autoklawowano w temperaturze 121 °C, przez 15 minut, pod ciśnieniem 1 atmosfery. Po schłodzeniu do temperatury około 35 °C, dodawano chloramfenikol w stężeniu 100 mg/l (Sigma-Aldrich). Tak przygotowane podłoże rozlewano do płytek Petriego i pozostawiano do zestalenia.

Posiane podłoża inkubowano w temperaturze 23°C przez 7 dni. Po tym czasie liczono ilość wyrosłych kolonii, przy założeniu, że jedna kolonia odpowiada jednej komórce grzyba. Ilość grzybów mikroskopowych w 1 g wilgotnej gleby obliczano ze wzoru (Pepper i Gerba, 2004):

$$A = a \cdot b \cdot 10$$

gdzie:

a - średnia liczba kolonii wyrosłych na płytce

b – krotność rozcieńczenia

10 – przeliczenie na 1 ml zawiesiny

Liczbę grzybów mikroskopowych przedstawiano jako logarytm dziesiętny jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) w przeliczeniu na 1 gram suchej masy gleby.

#### Oznaczanie aktywności wybranych enzymów glebowych

W glebie poddanej fitostabilizacji wspomaganiej oraz glebie kontrolnej oznaczano aktywność następujących enzymów glebowych: dehydrogenazy, fosfatazy kwaśnej i fosfatazy zasadowej oraz ureazy. Aktywność enzymów oznaczano w dniu założenia układu badawczego, a następnie w 3, 6, 9, 20, 28, 58 i 85 tygodniu trwania eksperymentu.

##### Aktywność dehydrogenazy

Aktywność dehydrogenazy w glebie oznaczano metodą kolorymetryczną (Alef i Nannipieri, 1996), opartą na ilościowej ocenie redukcji TTC (chlorku 2,3,5-trifenyloctetrazoliowego), który stanowi sztuczny akceptor elektronów w reakcjach utleniania substratu organicznego przez mikroorganizmy do TPF (formazanu 1,3,5-trifenyloctetrazoliowego).

W celu wykonania oznaczenia do trzech kolbek wprowadzono po 5 g wilgotnej gleby przesianej przez sito o średnicy 2 mm. Do dwóch kolbek dodawano 5 ml 1% roztworu TTC w 0,1 M Tris (pH 7,6), a do trzeciej kolbki stanowiącej kontrolę wprowadzono 5 ml 0,1 M roztworu Tris (hydroksymetylo)aminometanu, którego pH ustalano stężonym HCl do wartości 7,6. Zawartość kolbek mieszano i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 24 godz. Po tym czasie do każdej kolbki dodawano 25 ml acetonu i wytrząsano przez 2 godz. bez dostępu światła, celem ekstrakcji wyprodukowanego TPF. Następnie mieszaniny sączono przez sączki bibułowe w przyciemnionym pomieszczeniu i mierzono absorbancję otrzymanych przesączów przy użyciu spektrofotometru Genesys 20 firmy Thermo Spectronic przy długości fali 546 nm wobec acetonu jako próby ślepej.

Jednocześnie przygotowywano serię roztworów wzorcowych w celu sporządzenia krzywej wzorcowej, pozwalającej na odczytanie zawartości TPF w badanych próbkach. Do 6 kolb miarowych o objętości 50 ml odmierzano 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 3,5 i 5,0 ml roboczego roztworu wzorcowego TPF (0,1 mg/ml), otrzymanego poprzez rozcieńczenie 1 ml roztworu podstawowego TPF (10 mg/ml) w 100 ml acetonu. Następnie każdą kolbkę uzupełniano do 50 ml acetonem, uzyskując stężenia 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 7,0 i 10 µg TPF/ml.

Aktywność enzymu w próbce obliczano stosując wzór (Brzezińska i Włodarczyk, 2005):

$$C_{\text{TPF}} (\mu\text{g/g s.m. gleby}/24 \text{ godz.}) = (S - C) \cdot V \cdot 100/m \cdot \% \text{ s.m.}$$

gdzie:

S – stężenie TPF w badanej próbce odczytane z krzywej wzorcowej (µg/ml)

C – stężenie TPF w kontroli odczytane z krzywej wzorcowej (µg/ml)

V – łączna objętość dodanych roztworów (ml)

m – naważka gleby (g)

100 · % s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę gleby

#### Aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej

Metoda pomiaru aktywności fosfatazy kwaśnej i fosfatazy zasadowej opiera się na kolorymetrycznym oznaczeniu *p*-nitrofenolu (*p*-NP) powstałego z fosforanu *p*-nitrofenylu (PNP) (Tabatabai i Bremner, 1969).

W pierwszym etapie wprowadzano do trzech kolbek po 1 g wilgotnej gleby przesianej przez sito o średnicy 2 mm. W dalszym postępowaniu stosowano zmodyfikowany bufor uniwersalny MUB o pH 6,5 dla oznaczenia aktywności fosfatazy kwaśnej i MUB o pH 11,0 dla fosfatazy zasadowej. Bufor uniwersalny MUB sporządzano poprzez rozpuszczenie w 500 ml 1 M NaOH: Tris(hydroksymetylo)aminometanu (12,1 g), kwasu maleinowego (11,6 g), kwasu borowego (6,3 g) i monohydratu kwasu cytrynowego (14,0 g), a następnie uzupełnienie wodą destylowaną do 1000 ml. Zmodyfikowany bufor MUB o pH 6,5 dla fosfatazy kwaśnej przygotowywano dodając 500 ml wody destylowanej do 200 ml buforu uniwersalnego MUB, ustalając pH 0,1 M roztworem HCl i uzupełniając do 1000 ml wodą destylowaną. Analogicznie przygotowywano zmodyfikowany bufor uniwersalny MUB o pH 11,0 dla fosfatazy alkalicznej, ale pH tego buforu ustalano 0,1 M NaOH. Do dwóch kolbek zawierających naważki gleby dodawano po 1 ml roztworu fosforanu *p*-nitrofenylu (10 mg/ml) w zmodyfikowanym MUB o pH 6,5 dla fosfatazy kwaśnej i pH 11,0 dla fosfatazy zasadowej. Trzecia kolbka stanowiła kontrolę. Do każdej kolbki wprowadzano 4 ml modyfikowanego buforu uniwersalnego MUB o pH 6,5 lub pH 11. Zawartość kolbek mieszano przez godzinę w temperaturze 37 °C. Po zakończeniu inkubacji do kolbki kontrolnej wprowadzano 1 ml roztworu PNP (10 mg/ml) w zmodyfikowanym buforze MUB o pH 6,5 lub pH 11. Następnie do każdej kolbki dodawano 1 ml 0,5 M CaCl<sub>2</sub>, 4 ml 0,5 M NaOH i 90 ml wody destylowanej. Zawartość kolbek mieszano i sączono przez bibułę filtracyjną. Absorbancję otrzymanych przesączów mierzono przy użyciu spektrofotometru Genesys 20 firmy Thermo Spectronic przy długości fali 400 nm wobec próby ślepej, którą stanowiła mieszanina 95 ml wody destylowanej, 1 ml 0,5 M CaCl<sub>2</sub> i 4 ml 0,5 M NaOH.

W celu sporządzenia krzywej wzorcowej do oznaczenia stężenia *p*-nitrofenolu w badanych próbach przygotowywano serię roztworów wzorcowych. W tym celu do kolby miarowej o objętości 100 ml odmierzano 2 ml roztworu wzorcowego *p*-nitrofenolu o stężeniu 10 mg/ml i uzupełniano wodą destylowaną do kreski. Z tak przygotowanego roztworu pobierano do 6 kolbek kolejno 0; 1; 2; 3; 4 i 5 ml i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 5 ml. Do każdej kolbki dodawano 1 ml 0,5 M CaCl<sub>2</sub>, 4 ml 0,5 M NaOH i 90 ml wody destylowanej, mieszano i sączono przez bibułę filtracyjną. Absorbancję otrzymanych przesączów mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 400 nm wobec pierwszego przesącza,

stanowiącego próbę zerową. Aktywność enzymu w próbce obliczano na podstawie następującego wzoru (Alef i Nannipieri, 1996):

$$C_{p\text{-NP}} (\mu\text{g/g s.m. gleby} \cdot \text{godz.}) = (S - C) \cdot V \cdot 100/m \cdot \% \text{ s.m.} \cdot t$$

gdzie:

S – stężenie *p*-nitrofenolu w badanej próbce odczytane z krzywej wzorcowej ( $\mu\text{g/ml}$ )

C – stężenie *p*-nitrofenolu w kontroli odczytane z krzywej wzorcowej ( $\mu\text{g/ml}$ )

V – łączna objętość dodanych roztworów (ml)

m – naważka gleby (g)

100 · % s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę gleby

t – czas inkubacji (godz.)

#### Aktywność ureazy

Aktywność ureazy w próbach gleb oznaczano stosując metodę Gianfreda i wsp. (1994), opartą na kolorymetrycznym oznaczeniu amoniaku powstałego podczas enzymatycznej hydrolizy mocznika.

W tym celu do kolbki miarowej o objętości 100 ml odważano 10 g wilgotnej gleby, przesianej przez sito o średnicy 2 mm i dodawano 1,5 ml toluenu. Po upływie 15 minut wprowadzano 10 ml 10% roztworu mocznika (do kontroli 10 ml wody destylowanej) i 20 ml buforu cytrynianowego o pH 6,7. Bufor przygotowywano poprzez rozpuszczenie 295 g KOH i 368 g kwasu cytrynowego w 1000 ml wody destylowanej. Odczyn buforu ustalano 1 N KOH do pH 6,7. Po ustaleniu pH dopełniano wodą destylowaną do objętości 2000 ml. Zawartość kolbki mieszano i inkubowano 3 godz. w temperaturze 37°C. Po tym czasie zawartość kolbki uzupełniano do 100 ml wodą destylowaną, dokładnie mieszano i sączono przez sączek bibułowy o średniej szybkości sączenia. Następnie przenoszono 1 ml otrzymanego przesączu do kolbki miarowej o objętości 50 ml, dodawano 9 ml wody destylowanej, 4 ml świeżo przygotowanego 12,5% fenolanu sodu i 3 ml 1% roztworu wybielacza ACE firmy Procter & Gamble. Fenolan sodu sporządzano mieszając 20 ml roztworu A (w kolbie miarowej o objętości 100 ml rozpuszczano w małej ilości etanolu 62,5 g fenolu, dodawano 2 ml metanolu, 18,5 ml acetonu i uzupełniano etanolem do 100 ml) z 20 ml roztworu B (27 g NaOH rozpuszczano w 100 ml wody destylowanej) i uzupełniono wodą destylowaną do 100 ml. Po 20 minutach zawartość kolbki uzupełniano wodą destylowaną do 50 ml i ponownie mieszano. Absorbancję otrzymanych przesączów mierzono przy użyciu

spektrofotometru Genesys 20 firmy Thermo Spectronic przy długości fali 630 nm. Próbę zerową stanowiła mieszanina przygotowywana w analogiczny sposób jak w postępowaniu z przesączem, z tą różnicą, że zamiast przesączu dodawano 1 ml wody destylowanej.

Krzywą wzorcową wykonywano poprzez sporządzenie serii roztworów wzorcowych, odmierzając do kolb miarowych o objętości 50 ml kolejno od 1 do 10 ml 0,36 mM roztworu wzorcowego  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 ml zawierał 100  $\mu\text{g}$  N- $\text{NH}_4$ ) i postępując jak z przesączem glebowym.

Aktywność enzymu w próbce obliczano na podstawie następującego wzoru (Wyczółkowski i Dąbek-Szreniawska, 2005):

$$C_{\text{N-NH}_4} (\mu\text{g/g s.m. gleby} \cdot \text{godz.}) = (S-C) \cdot V \cdot 100/m \cdot \% \text{ s.m.} \cdot t$$

gdzie:

S – stężenie N- $\text{NH}_4$  w badanej próbce odczytane z krzywej wzorcowej ( $\mu\text{g/ml}$ )

C – stężenie N- $\text{NH}_4$  w kontroli odczytane z krzywej wzorcowej ( $\mu\text{g/ml}$ )

V – łączna objętość dodanych roztworów do przesączu (ml)

m – naważka gleby (g)

100 · % s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę gleby

t – czas inkubacji (godz.)

#### Aktywność proteazy

W celu oznaczenia aktywności proteaz, 1 g gleby przesianej przez sito 2 mm umieszczono w próbówce a następnie wprowadzono 5 ml buforu Tris-HCl oraz 5 ml roztworu kazeinianu sodu. Bufor Tris-HCl (50 mM, pH 8.1) przygotowano poprzez rozpuszczenie 6,05 g Tris w 700 ml wody destylowanej, skorygowano pH do wartości 8,1 za pomocą HCl i uzupełniono do końcowej objętości 1000 ml wodą destylowaną. Roztwór kazeinianu sodu przygotowano poprzez zawieszenie 10 g substratu w gorącej wodzie destylowanej (50 °C) i dopełniono wodą destylowaną do objętości 500 ml.

Po wymieszaniu próbkę inkubowano w łaźni wodnej z wytrząsaniem przez 2 godz. w temperaturze 50 °C. Pod koniec inkubacji do próbki wprowadzono 5 ml 15% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wymieszano. W próbce kontrolnej pod koniec inkubacji wprowadzono 5 ml roztworu kazeinianu sodu, bezpośrednio przed dodaniem TCA. Powstałą zawiesinę glebową zworteksowano i odwirowano przez 10 min (10000

– 12000 obr./min). Następnie do próbówki odpipetowano 5 ml supernatantu, zmieszano z 7,5 ml odczynnik zasadowego i pozostawiono do inkubacji przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Następnie wprowadzono 5 ml odczynnika Folina i Ciocalteua, mieszaninę przefiltrowano przez sączi papierowe, a następnie po upływie 1 godz. dokonano pomiaru absorbancji przy użyciu spektrofotometru Genesys 20 firmy Thermo Spectronic przy długości fali 700 nm. Krzywą wzorcową skalibrowano w następujący sposób: odpipetowano 0, 1, 2, 3, 4 i 5 ml roztworu tyrozyny (500 µg/ml) do szklanych probówek, dodano 5 ml 2% roztworu kazeinianu sodu i dopełniono do 10 ml buforem Tris-HCl. Następnie dodano 5 ml roztworu TCA i postępowano analogicznie jak dla próby badanej.

Aktywność enzymu obliczono z wzoru:

aktywność proteaz ( $\mu\text{g}$  tyrozyny/g s.m. gleby  $\cdot$  2 h) =  $(S - C) \cdot V \cdot 100 / m \cdot \% \text{ s.m.} \cdot t$   
gdzie:

S – stężenie tyrozyny w badanej próbce odczytane z krzywej wzorcowej ( $\mu\text{g/ml}$ )

C – stężenie tyrozyny w kontroli odczytane z krzywej wzorcowej ( $\mu\text{g/ml}$ )

V – łączna objętość dodanych roztworów do przesącza, 15 (ml)

m – naważka gleby (g)

$100 \cdot \%^{-1}$  s.m. – współczynnik przeliczeniowy na suchą masę gleby

t – czas inkubacji (h)

#### Oznaczanie Indeksu enzymatycznego (ESI) i biochemicznego ( $M_w$ ) jakości gleby

Indeks enzymatyczny gleby (ESI) wyznaczono wg. Januszka (1999) i obliczono na podstawie równania:

$$ESI = Deh + P + Ure$$

Natomiast indeks biochemicznej jakości gleby ( $M_w$ ) obliczono wg Wyszukowskiej i Wyszukowskiego (2003) na podstawie równania:

$$M_w = (Ure + Deh + Pal + Pac) \cdot C$$

gdzie: *Deh* – aktywność dehydrogenazy, *P* – aktywność proteazy, *Ure* – aktywność ureazy, *Pal* – aktywność fosfatazy zasadowej, *Pac* – aktywność fosfatazy kwaśnej, *C* – zawartość węgla organicznego.



#### 4.8.3. Analizy toksykologiczne

##### Test Microtox-SPT<sup>®</sup>

Do oceny toksyczności gleby, wykorzystano test bezpośredniego kontaktu oceny toksyczności ostrej z wykorzystaniem bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischeri* (Microtox-SPT<sup>®</sup>). Test wykonano przy użyciu analizatora Microtox M500, zintegrowanego z inkubatorem zapewniającym stałe warunki testu (temperatura - 15°C) oraz z komputerem zawierającym oprogramowanie Microtox Omni sterujące wykonaniem testu oraz umożliwiające generowanie raportów. Reakcją testową było obniżenie luminescencji zawiesiny bakterii. Bakterie inkubowano z próbką gleby w polistyrenowych probówkach (kuwetach SPT) przez 20 minut w temperaturze 15°C. Z uwagi na to, iż wszystkie próbki gleby obniżają luminescencję zawiesiny bakterii, nie wykonywano testu skriningowego, lecz podstawowy, z rozcieńczeniami. Wynikiem testu były wartości EC50 czyli stężenie próbki powodujące obniżenie luminescencji o 50%. Następnie wartości EC50 przeliczano na jednostki toksyczności (TU50).

#### 4.8.4. Analizy statystyczne

Dane przedstawiane w pracy zostały opracowane przy użyciu programu Statistica 10 (StatSoft, Inc. 2011) oraz Microsoft<sup>®</sup> Excell 2002, a wszystkie przedstawione na wykresach i w tabelach dane są średnimi z 3 powtórzeń  $\pm$  błąd standardowy (BS) (dla eksperymentu wazonowego i lizymetrycznego), a dla eksperymentu poletkowego średnimi z 5 powtórzeń  $\pm$  błąd standardowy (BS). Do oznaczenia korelacji pomiędzy aktywnością enzymatyczną w glebie kontrolnej i stabilizowanej w doświadczeniu poletkowym zastosowano analizę PCA (ang. Principal Component Analysis).

## 5. WYNIKI BADAŃ

### 5.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYCZNE I CHEMICZNE GLEBY ORAZ DODATKÓW STABILIZUJĄCYCH

W Tabeli 2 przedstawiono parametry fizyczne i chemiczne gleby wykorzystanej w doświadczeniach.

Tabela 2. Właściwości fizyczne i chemiczne gleby wykorzystanej w doświadczeniach

Parametr	Wartość
pH (1 : 2,5 gleba/KCl)	6,38 - 6,98 ± 0,02
pH (1 : 2,5 gleba/woda)	6,62 - 6,88 ± 0,16
Zawartość materii organicznej (%)	4,76 - 6,52 ± 0,73
Skład granulometryczny (%)	
Fracja piaszkowa (1 – 0,05 mm)	37,3
Fracja pyłowa (0,05 – 0,002 mm)	56,3
Fracja ilowa (< 0,002 mm)	6,8
Całkowita zawartość metali (ekstrakcja woda królewska)	
Pb (mg/kg)	1291 - 7679 ± 562
Cd (mg/kg)	85 - 426,5 ± 23
Zn (mg/kg)	4506 - 9879 ± 417
As (mg/kg)	36 - 80,52 ± 2,74
Zawartość metali biodostępnych (ekstrakcja 0,01 M CaCl <sub>2</sub> )	
Pb (mg/kg)	0,85 - 4,42 ± 0,86
Cd (mg/kg)	12,35 - 79,31 ± 0,83
Zn (mg/kg)	278,48 - 458,30 ± 5,31
As (mg/kg)	0,05 - 0,147 ± 0,13

Zawartości ołowiu, kadmu, cynku i arsenu przekraczały graniczne wartości określone rozporządzeniem w sprawie standardów jakości gleby i standardów jakości ziemi (Dz U. 2002, Nr 135, Poz. 1359). Stwierdzono również wysokie stężenia biodostępnych form cynku i kadmu, podczas gdy stężenia biodostępnych form ołowiu i arsenu były niskie (Tabela 2). Gleba charakteryzowała się obojętnym pH oraz wysoką zawartością materii organicznej. Na podstawie analizy granulometrycznej gleba została zaklasyfikowana jako glina piaszczysta, ze względu na dominujący udział frakcji pyłowej i piaskowej oraz nieznaczny udział najdrobniejszej frakcji ilowej.

Spośród dodatków doglebowych zastosowanych w doświadczeniach w drobnoziarnistej frakcji odpadowej węgla brunatnego określono zawartości metali ciężkich, aby stwierdzić, czy nie wniesie on dodatkowego ładunku zanieczyszczeń do

podłoża. Charakterystykę węgla brunatnego przedstawiono w Tabeli 3. Pozostałe dodatki (superfosfat potrójny i wapno nawozowe) zgodnie z informacjami producentów spełniały wymagane normy i posiadały zgodę Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej na dopuszczenie do obrotu i stosowania w rolnictwie.

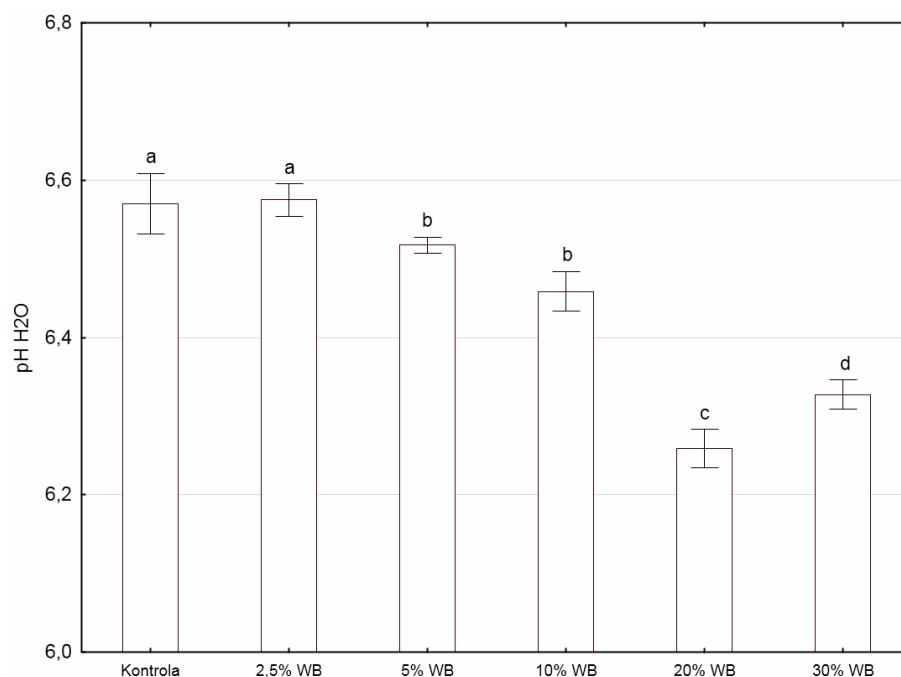
Tabela 3. Charakterystyka drobnoziarnistej frakcji węgla brunatnego wykorzystanego w doświadczeniach (n=3, ± BS)

<b>Parametr</b>	<b>Wartość</b>
pH (1 : 2,5 WB/KCl)	5,47 ± 0, 03
pH (1 : 2,5 WB/woda)	5,93 ± 0, 05
Całkowita zawartość metali	
Pb (mg/kg)	0,03 ± 0,01
Cd (mg/kg)	0,00
Zn (mg/kg)	0,143 ± 0,23

Stężenia wszystkich badanych metali w węglu brunatnym były niskie. Wprowadzenie węgla brunatnego nie spowodowało zmian stężenia metali w zanieczyszczonej glebie.

## 5.2. EKSPERYMENT WAZONOWY: ETAP I

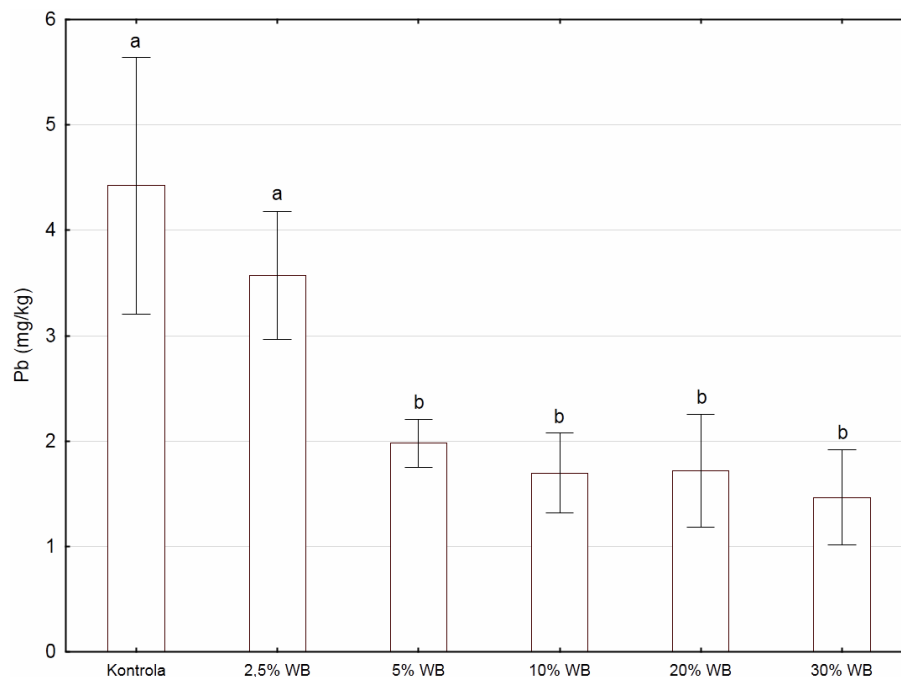
Badania prowadzone w tym etapie miały na celu wyznaczenie minimalnej skutecznej dawki węgla brunatnego umożliwiającej stabilizację metali i wzrost roślin. Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego w ilości od 2,5% do 30% spowodowało w większości przypadków istotną statystycznie zmianę odczynu gleby. Wraz ze zwiększeniem ilości wprowadzanego dodatku, pH gleby obniżało się, a największy spadek zaobserwowano dla 20 i 30%, z wartości 6,57 do odpowiednio wartości 6,25 oraz 6,32. Zmiany odczynu gleby po wprowadzeniu węgla brunatnego przedstawiono na Rysunku 6.



Rys. 6. Zmiany odczynu gleby po sześciu tygodniach od wprowadzeniu węgla brunatnego (WB). Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)

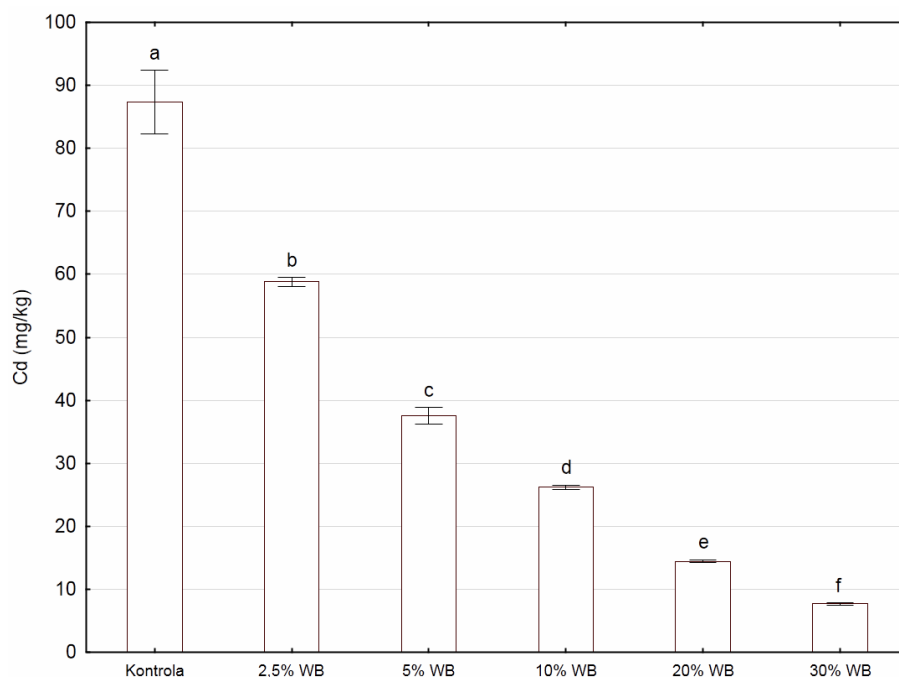
Przeprowadzone badania wykazały, iż nawet najmniejsza dawka węgla brunatnego wprowadzona do gleby powoduje zmniejszenie biodostępności metali ciężkich w glebie.

W przypadku ołowiu, dla każdej ilości wprowadzonego węgla brunatnego, z wyjątkiem 2,5%, zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie biodostępności tego metalu w stosunku do kontroli, podczas gdy istotnych statystycznie różnic nie zaobserwowano przy wprowadzeniu od 5 do 30% węgla brunatnego. Dla najbardziej efektywnej ilości węgla brunatnego zaobserwowano 3-krotne obniżenie biodostępności Pb, z wartości 4,42 mg/kg w glebie kontrolnej, do 1,69 mg/kg w przypadku wprowadzenia 10% węgla brunatnego i 1,42 mg/kg dla 30% węgla brunatnego. Zmiany biodostępności ołowiu w glebie stabilizowanej węglem brunatnym przedstawiono na Rysunku 7.



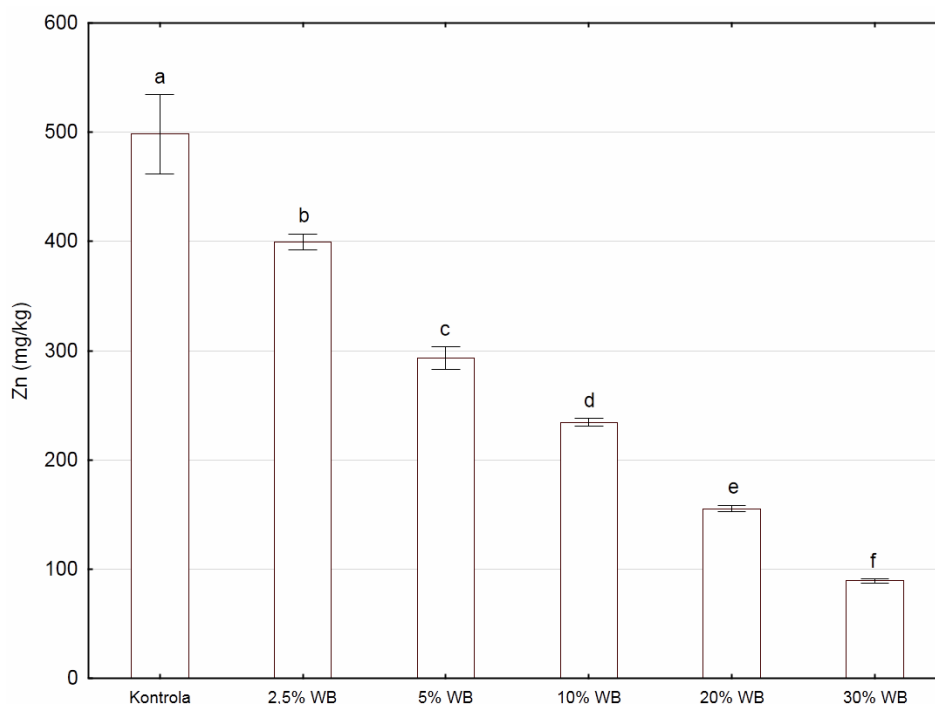
Rys. 7. Zmiany biodostępności ołowiu po sześciu tygodniach od wprowadzenia węgla brunatnego (WB). Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)

W przypadku kadmu, dla każdej ilości wprowadzonego węgla brunatnego zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie biodostępności tego metalu w stosunku do kontroli. W glebie kontrolnej stwierdzono 87,3 mg/kg biodostępnego kadmu, a wprowadzenie węgla brunatnego spowodowało obniżenie biodostępności tego pierwiastka do 7,7 mg/kg w przypadku dawki w ilości 30%. Dla najbardziej efektywnej ilości węgla brunatnego zaobserwowano ponad jedenastokrotne obniżenie biodostępności Cd. Zmiany biodostępności kadmu w glebie stabilizowanej węglem brunatnym przedstawiono na Rysunku 8.



Rys. 8. Zmiany biodostępności kadmu po sześciu tygodniach od wprowadzenia węgla brunatnego (WB). Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR).

Podobnie, jak w przypadku kadmu, dla każdej ilości wprowadzonego węgla brunatnego zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie biodostępności cynku w stosunku do kontroli, jak i pomiędzy poszczególnymi wariantami. W glebie kontrolnej stwierdzono 498 mg/kg cynku, a wprowadzenie poszczególnych dawek węgla brunatnego spowodowało obniżenie zawartości frakcji biodostępnej aż do 90 mg/kg dla wariantu, w którym wprowadzono 30% stabilizatora. Dla najbardziej efektywnej ilości węgla brunatnego zaobserwowano ponad pięciokrotne obniżenie biodostępności Zn. Zmiany biodostępności cynku w glebie stabilizowanej węglem brunatnym przedstawiono na Rysunku 9.



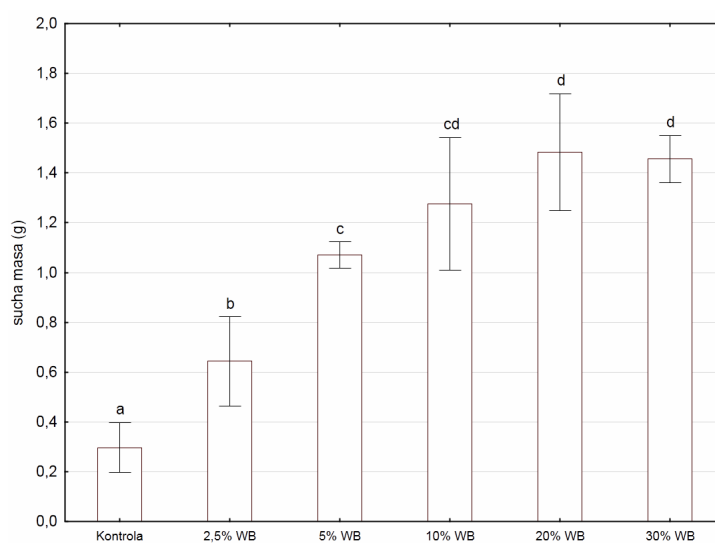
Rys. 9. Zmiany biodostępności cynku po sześciu tygodniach od wprowadzenia węgla brunatnego (WB). Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR).

W trakcie doświadczenia prowadzono obserwacje wzrostu kostrzewy trzcinowej „Asterix” na glebie poddanej stabilizacji węglem brunatnym. Obserwacje wzrostu roślin wykazały, iż wraz ze wzrostem dodatku węgla brunatnego w glebie wzrost roślin był intensywniejszy, wysokość trawy i stopień pokrycia powierzchni były większe niż w wariancie kontrolnym. Zaobserwowano tylko nieznaczne ślady chlorozy. Natomiast, w glebie bez dodatku węgla brunatnego lub z jego dodatkiem w ilości 2,5% i 5% obserwowano toksyczny wpływ metali ciężkich na rośliny (słabe pokrycie powierzchni wazonu, chloroza i obumieranie roślin). Istotnych różnic nie zaobserwowano przy dawkach 10%, 20% i 30% węgla brunatnego. Rośliny rosnące na takim podłożu były żywozielone, chloroza występowała w niewielkim stopniu, a pokrycie powierzchni wazonu sięgało 90% (Rysunek 10).



Rys. 10. Wzrost i morfologia kostrzewy trzcinowej „Asterix” w zależności od dawki wprowadzonego węgla brunatnego

Poprawa warunków wzrostu roślin miała bezpośrednie przełożenie na produkcję biomasy kostrzewy w poszczególnych wariantach doświadczenia. Oznaczona ilość suchej masy traw z wazonów z glebą kontrolną różniła się istotnie statystycznie od zebranej z wazonów z wprowadzonym węglem brunatnym. Podczas gdy istotnych statystycznie różnic nie obserwowano pomiędzy wariantami z wprowadzonym stabilizatorem w ilości od 10 do 30%. Najwyższą suchą masę kostrzewy oznaczono dla wariantu z dawką 20% węgla brunatnego (1,5 g) i była ona ponad pięciokrotnie wyższa, w porównaniu z wariantem kontrolnym (0,3 g). Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na przyrost biomasy *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunku 11.

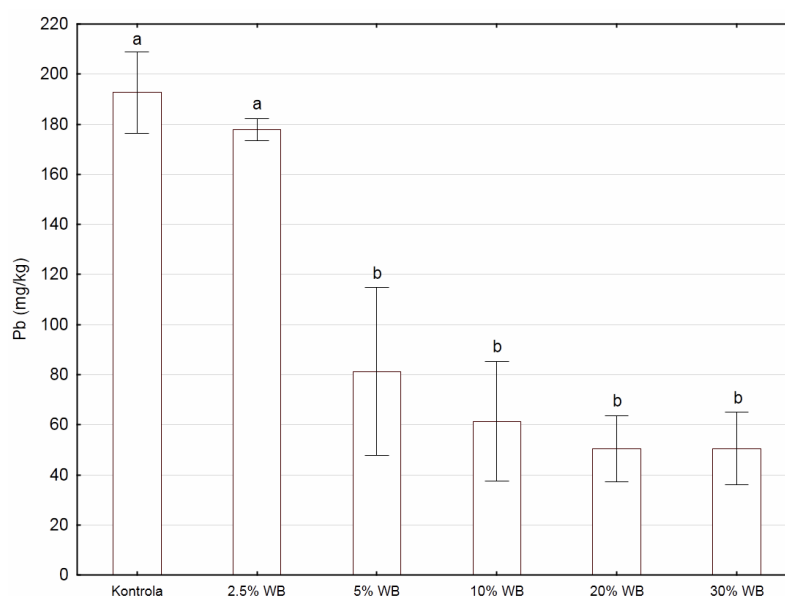


Rys 11. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego (WB) na przyrost biomasy *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)



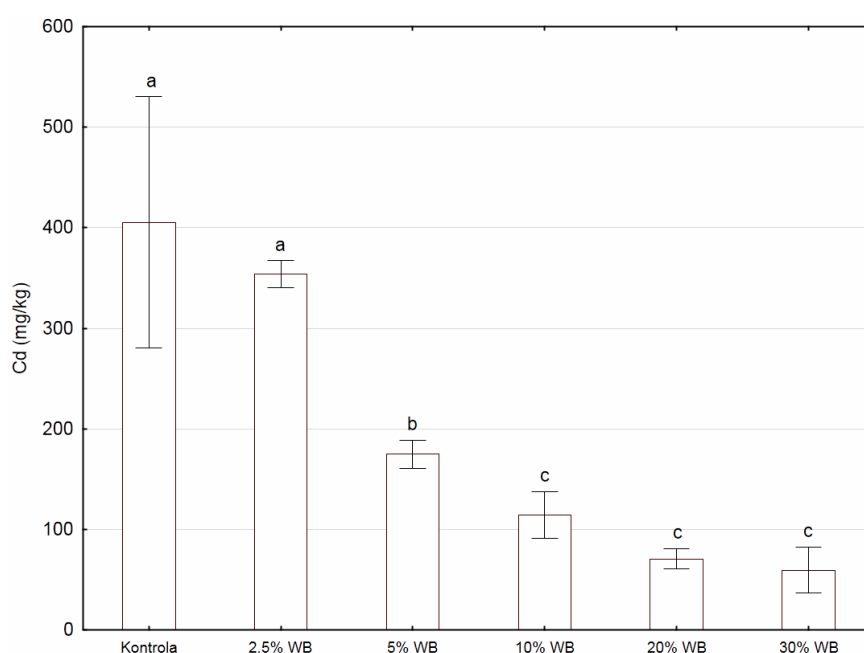
Ograniczenie biodostępności metali ciężkich w glebie poprzez zastosowanie węgla brunatnego spowodowało istotne statystycznie obniżenie ich kumulacji w częściach nadziemnych kostrzewy trzcinowej „Asterix”, za wyjątkiem wariantu z 2,5% wprowadzonego stabilizatora. Wraz ze wzrostem zawartości węgla brunatnego w glebie nastąpiło ograniczenie mobilności metali do części nadziemnych. Znaczny spadek zawartości metali w tkankach roślin obserwowano przy porównaniu wzrostu na glebie bez dodatku węgla brunatnego z wariantami od 5% wprowadzonego stabilizatora. W przypadku wyższych ilości wprowadzonego węgla brunatnego obniżenie kumulacji metali ciężkich w częściach nadziemnych nie było istotne statystycznie.

Dla ołowiu zaobserwowano istotnie statystycznie obniżenie kumulacji w częściach nadziemnych dla wszystkich wariantów za wyjątkiem 2,5%, w porównaniu z wariantem kontrolnym. Pomiędzy wariantami dodatku od 5 do 30% węgla brunatnego nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Wprowadzenie węgla brunatnego do gleby spowodowało obniżenie kumulacji ołowiu w częściach nadziemnych kostrzewy do około 50 mg/kg w wariantach od 5 do 30% węgla brunatnego. Porównując z wariantem kontrolnym, gdzie kumulacja ołowiu w częściach nadziemnych wyniosła 192 mg/kg, stwierdzono niemal czterokrotne obniżenie jego zawartości. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na kumulację ołowiu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunek 12.



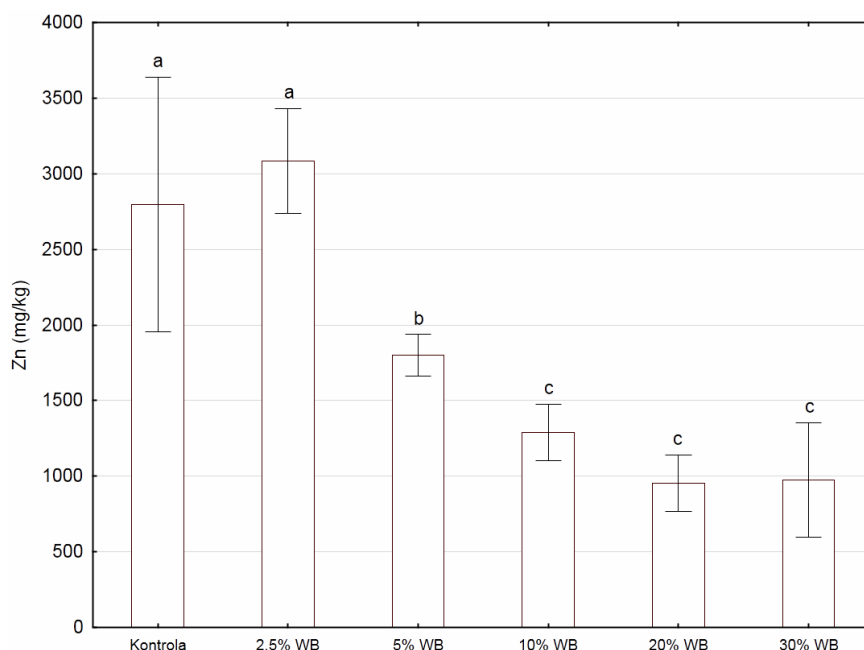
Rys. 12. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego (WB) na kumulację ołowiu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystycznie sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)

Podobnie jak w przypadku ołowiu, istotne statystycznie obniżenie kumulacji kadmu w porównaniu z wariantem kontrolnym zaobserwowano w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix” rosnącej na glebie z wprowadzonym węglem brunatnym w ilości od 5 do 30%. Pomiędzy wariantami od 10 do 30% węgla brunatnego nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. Wprowadzenie węgla brunatnego do gleby zanieczyszczonej w najlepszych wariantach spowodowało ponad sześciokrotne obniżenie kumulacji kadmu w częściach nadziemnych traw (60 mg/kg), porównując do wariantu kontrolnego (405 mg/kg). Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na kumulację kadmu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunku 13.



Rys. 13. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego (WB) na kumulację kadmu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystycznie sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)

Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego w istotny sposób ograniczyło pobieranie i kumulację cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”. W porównaniu z wariantem kontrolnym (2800 mg/kg) uzyskano niemal trzykrotne obniżenie kumulacji tego metalu (950 mg/kg), przy czym dla dodatku od 10 do 30% węgla brunatnego zmiany te nie były istotne statystycznie. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego na kumulację cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunku 14.



Rys. 14. Wpływ różnych dawek węgla brunatnego (WB) na kumulację cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi (n=3, ± BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystycznie sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

Wprowadzenie węgla brunatnego do gleby silnie zanieczyszczonej metalami ciężkimi w znacznym stopniu ograniczyło ich biodostępność. Istotne statystycznie zmiany w biodostępności metali zaobserwowano przy wprowadzaniu każdej ilości węgla brunatnego za wyjątkiem ołowiu, gdzie 2,5% dodatek tego stabilizatora nie był istotny statystycznie porównując z wariantem kontrolnym. W większości przypadków, przy wprowadzeniu dawek 10, 20 i 30% zmiany biodostępności Cd, Pb, Zn nie były istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi wariantami. Oprócz zmniejszenia biodostępności metali ciężkich wprowadzenie dodatku węgla brunatnego w wyraźny sposób poprawiło wzrost roślin na zanieczyszczonej glebie. Rośliny wykazywały lepsze kiełkowanie, pokrywa roślinna była bardziej zwarta, a wraz ze zwiększeniem zawartości węgla brunatnego, wprowadzanego do gleby, morfologia roślin poprawiła się. Największe różnice w morfologii roślin zaobserwowano przy niższych ilościach wprowadzonego węgla brunatnego, natomiast różnice pomiędzy dawkami 10, 20 i 30% węgla brunatnego nie były duże. Obniżenie biodostępności metali ciężkich w glebie w sposób bezpośredni przełożyło się na zmniejszenie kumulacji metali ciężkich w częściach nadziemnych trawy.

**Na podstawie przeprowadzonych obserwacji i badań analitycznych stwierdzono, iż optymalne rezultaty uzyskano dla dawki węgla brunatnego - 10%.**

Przy wyższych ilościach (20 i 30%) wprowadzanego węgla, różnice w zmniejszeniu biodostępności metali w glebie oraz wzroście roślin i kumulacji metali w częściach roślinnych nie były istotne statystycznie.

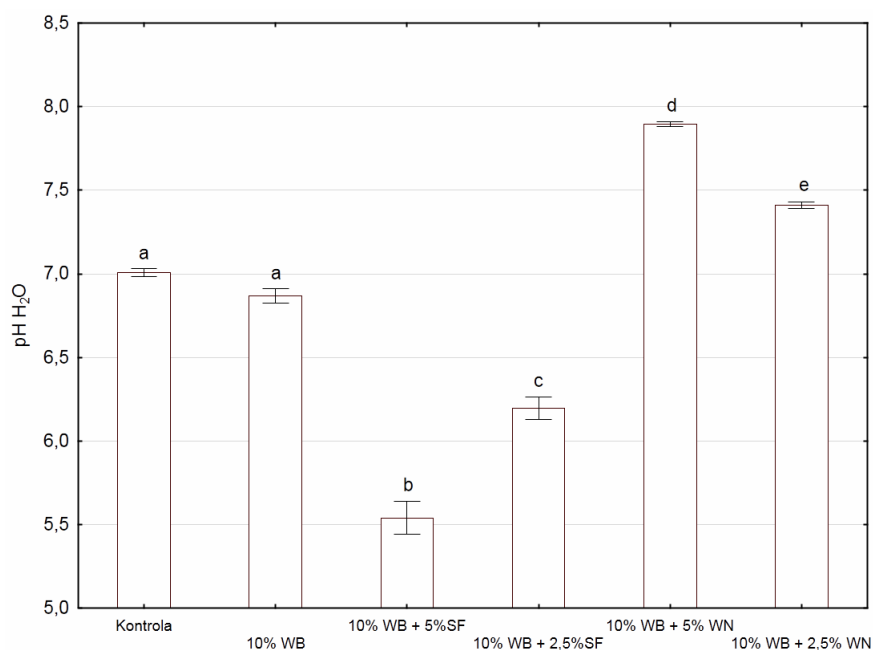
Na podstawie wyników uzyskanych w I etapie doświadczeń wazonowych (wyznaczenie minimalnej skutecznej dawki węgla brunatnego umożliwiającej stabilizację metali i wzrost roślin, oraz oceny wzrostu i kumulacji ołowiu, kadmu i cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”), do dalszych badań wybrano dawkę z 10% węgla brunatnego jako najbardziej optymalną.

### 5.3. EKSPERYMENT WAZONOWY: ETAP II

Celem tego etapu badań był wybór drugiego stabilizatora, który wraz z 10% frakcją drobnoziarnistą węgla brunatnego dodatkowo obniżyłby biodostępność ołowiu, kadmu i cynku w glebie oraz kumulację tych metali w tkankach trawy.

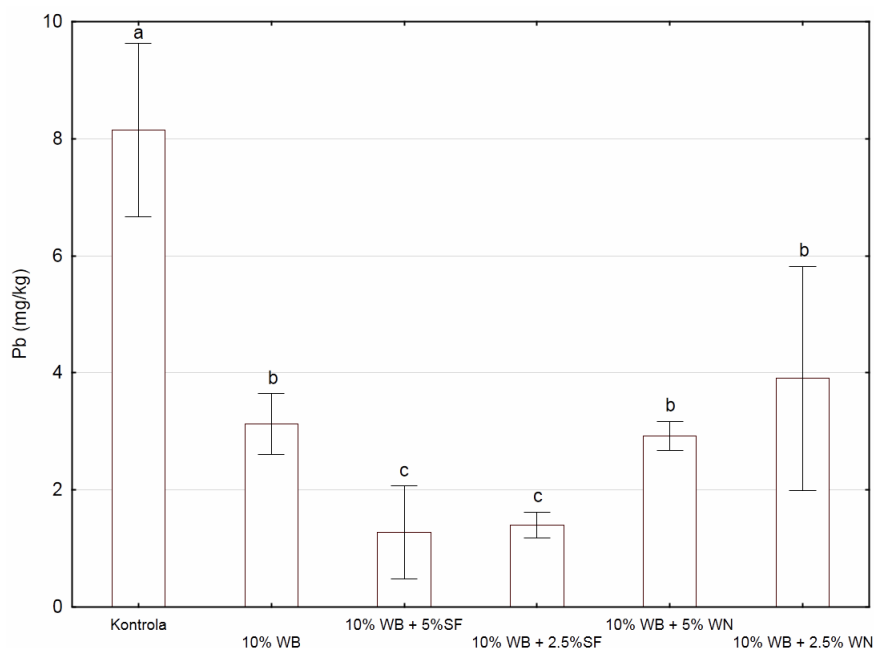
Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego (WB) łącznie z superfosfatem potrójnym (SF) lub wapnem nawozowym (WN) miało istotny statystycznie wpływ na odczyn stabilizowanej gleby. Wprowadzenie superfosfatu potrójnego obniżyło pH gleby z wartości 7,0 do 5,5 oraz 6,2 odpowiednio dla 5% i 2,5% wprowadzonego superfosfatu łącznie z dawką 10% węgla brunatnego. Z kolei wprowadzenie do gleby wapna nawozowego jako związku alkalicznego, spowodowało wzrost odczynu gleby do wartości 7,9 oraz 7,4 odpowiednio dla 5% i 2,5% wapna nawozowego wprowadzonego łącznie z tą samą dawką węgla brunatnego. Odczyn gleby stabilizowanej węglem brunatnym z dodatkiem wapna nawozowego mieścił się w granicach przyjętych dla gleb zasadowych (pH 7 do 9).

Zmiany odczynu gleby po wprowadzeniu dodatkowych stabilizatorów wraz z węglem brunatnym przedstawiono na Rysunku 15.



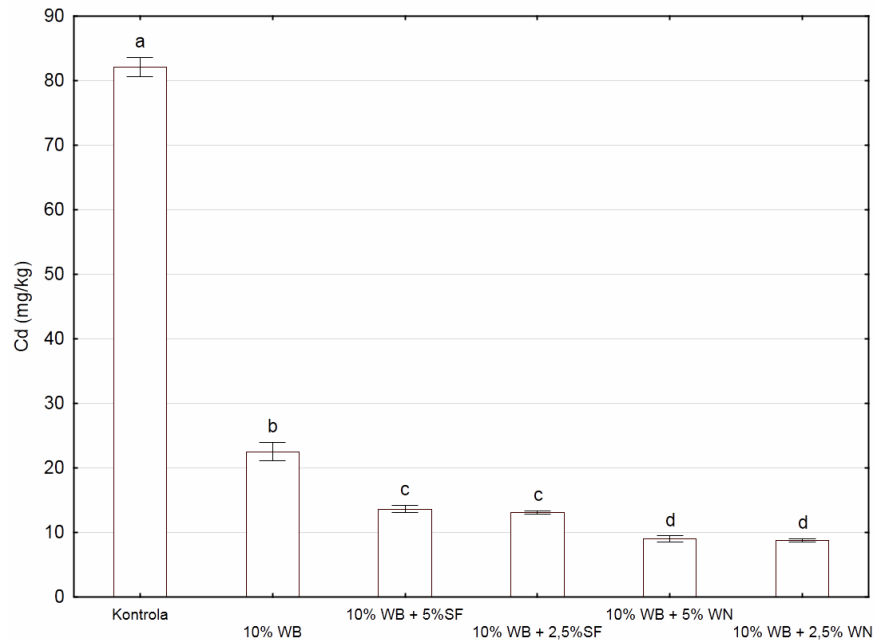
Rys. 15. Zmiany odczynu gleby po sześciu tygodniach od wprowadzeniu węgla brunatnego (WB) wraz z superfosfatem potrójnym (SF) lub wapnem nawozowym (WN). Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm$ BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)

Wprowadzenie do gleby superfosfatu potrójnego lub wapna nawozowego wraz z węglem brunatnym w istotny statystyczny sposób obniżyło biodostępność ołowiu w porównaniu z glebą kontrolną. Wprowadzenie dodatkowego stabilizatora w postaci superfosfatu potrójnego spowodowało istotne statystycznie obniżenie biodostępności ołowiu w porównaniu zarówno z wariantem kontrolnym, jak i z wariantem z dawką 10% węgla brunatnego. Biodostępność ołowiu po wprowadzeniu węgla brunatnego łącznie z superfosfatem potrójnym została obniżona do 1,3 mg/kg i była sześciokrotnie niższa w porównaniu z wariantem kontrolnym (8,1 mg/kg). Istotnych statystycznie zmian nie zaobserwowano, porównując wprowadzenie dodatkowego stabilizatora w postaci wapna nawozowego z dodatkiem węgla brunatnego. Zmiany w biodostępności ołowiu przedstawiono na Rysunku 16.



Rys. 16. Wpływ dodatków stabilizujących na zmianę biodostępności ołowiu w glebie. Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm BS$ ). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p<0,05$  (test NIR)

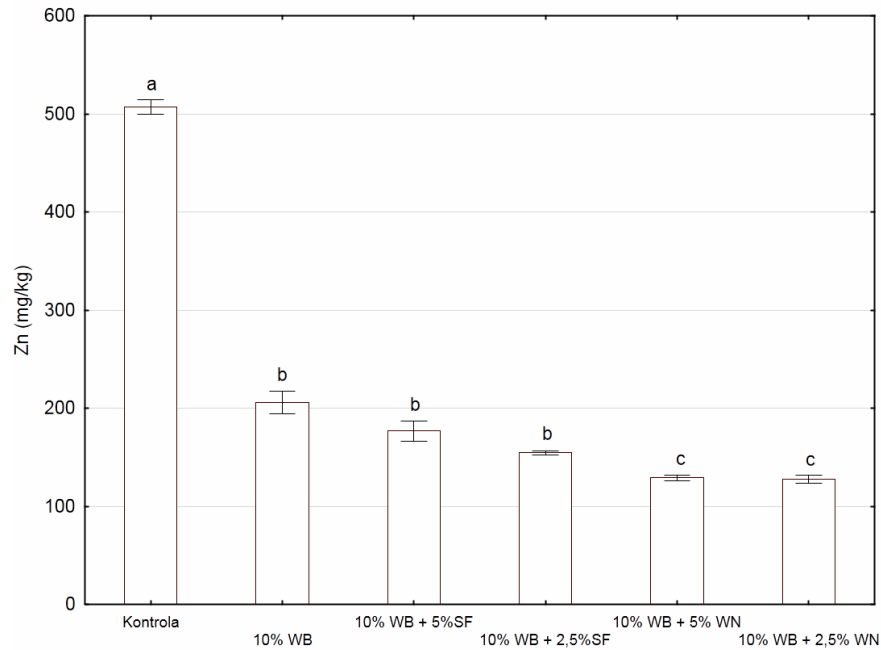
Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego łącznie z superfosfatem potrójnym lub wapnem nawozowym miało istotny statystycznie wpływ na obniżenie biodostępności kadmu w stabilizowanej glebie. Największe, dziewięciokrotne obniżenie biodostępności tego metalu zaobserwowano dla dodatku węgla brunatnego łącznie z wapnem nawozowym w porównaniu z wariantem kontrolnym oraz ponad dwukrotnie w porównaniu z dodatkiem tylko 10% węgla brunatnego. Biodostępność kadmu w glebie stabilizowanej węglem brunatnym wraz z wapnem nawozowym wyniosła 9 mg/kg, podczas gdy biodostępność w glebie kontrolnej wyniosła 82 mg/kg, a w glebie stabilizowanej tylko węglem brunatnym 22,5 mg/kg. Uzyskane wyniki sugerują największą skuteczność kombinacji węgla brunatnego z wapnem nawozowym, jako dodatku stabilizującego kadm w zanieczyszczonej glebie. Zmiany biodostępności kadmu przedstawiono na Rysunku 17.



Rys. 17. Wpływ dodatków stabilizujących na zmianę biodostępności kadmu w glebie. Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm BS$ ). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

Zmiany w biodostępności cynku w glebie stabilizowanej były istotne statystycznie dla wszystkich wariantów w porównaniu z glebą kontrolną. Największe, istotne statystycznie, obniżenie biodostępności zaobserwowano dla łącznego wprowadzenia węgla brunatnego wraz z wapnem nawozowym. Łączne wprowadzenie węgla brunatnego z superfosfatem potrójnym spowodowało istotne statystycznie zmiany w porównaniu z wariantem kontrolnym, natomiast w porównaniu z dodatkiem samego węgla brunatnego obniżenie biodostępności cynku nie było statystycznie istotne. Wprowadzenie węgla brunatnego wraz z wapnem nawozowym obniżyło ponad czterokrotnie biodostępności Zn w porównaniu z wariantem kontrolnym i niemal dwukrotnie w porównaniu z dodatkiem tylko węgla brunatnego. Zawartość biodostępnego cynku w glebie kontrolnej wyniosła 507 mg/kg, podczas gdy łączne wprowadzenie węgla brunatnego i wapna nawozowego obniżyło biodostępność tego pierwiastka do 129 mg/kg.

Uzyskane wyniki, podobnie jak w przypadku kadmu, wskazują największą skuteczność kombinacji węgla brunatnego z wapnem nawozowym jako dodatku stabilizującego cynk w zanieczyszczonej glebie. Zmiany biodostępności cynku po wprowadzeniu dodatków stabilizujących przedstawiono na Rysunku 18.

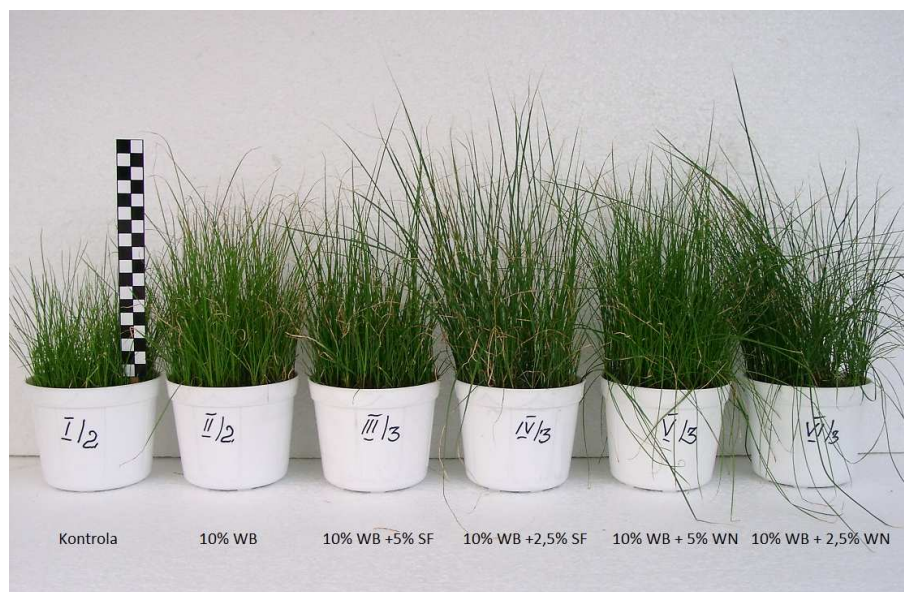


Rys. 18. Wpływ dodatków stabilizujących na zmianę biodostępności cynku w glebie. Wyniki są średnimi ( $n=3$ ,  $\pm BS$ ). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

Biorąc pod uwagę czynniki takie jak zmiana odczynu stabilizowanej gleby oraz obniżenie biodostępności ołowiu, kadmu i cynku, najlepszy efekt stabilizacji uzyskano w przypadku zastosowania 10% węgla brunatnego wprowadzanego łącznie z 2,5% dodatkiem wapna nawozowego. Przy wyborze tego wariantu uwzględniona została także ilość oraz przewidywany koszt wprowadzenia stabilizatorów do gleby.

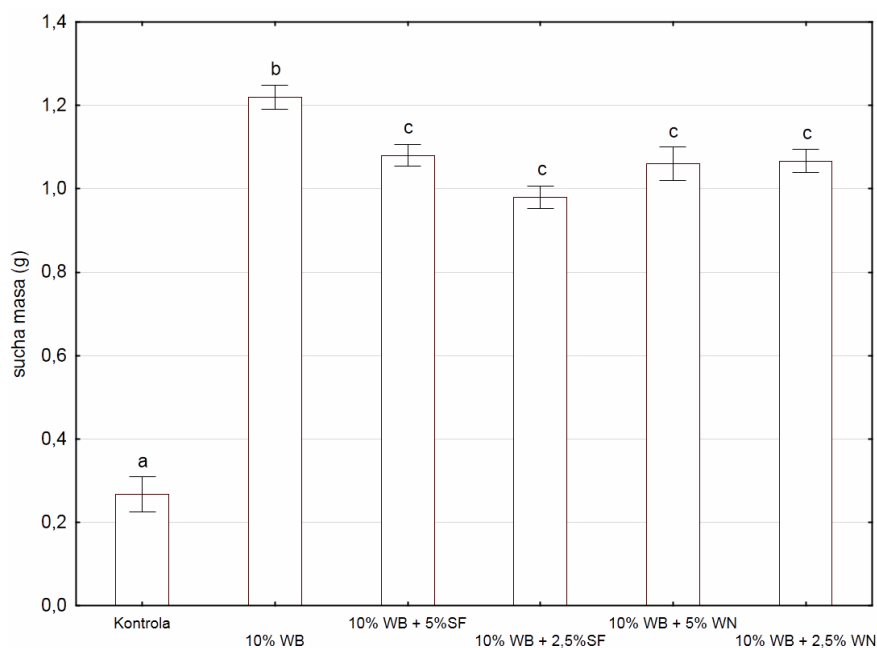
W trakcie doświadczenia prowadzone były obserwacje wzrostu *F. arundinacea* „Asterix” na glebie poddanej uprzednio stabilizacji węglem brunatnym łącznie z superfosfatem potrójnym lub wapnem nawozowym. Obserwacje wykazały, iż wraz z wprowadzeniem dodatku węgla brunatnego do gleby warunki wzrostu roślin uległy poprawie. Toksyczny wpływ metali ciężkich na rośliny (słabe pokrycie powierzchni wazonu, chloroza i obumieranie roślin) zaobserwowano na glebie kontrolnej, natomiast znaczących różnic nie zaobserwowano pomiędzy wariantami z węglem brunatnym oraz węglem brunatnym wprowadzonym łącznie z superfosfatem potrójnym lub wapnem nawozowym. Rośliny rosnące na takim podłożu były żywozielone, chloroza występowała w niewielkim stopniu, a pokrycie powierzchni wazonu sięgało 100% (Rysunek 19).





Rys. 19. Wzrost i morfologia kostrzewy trzcinowej „Asterix” w zależności od ilości wprowadzonych stabilizatorów

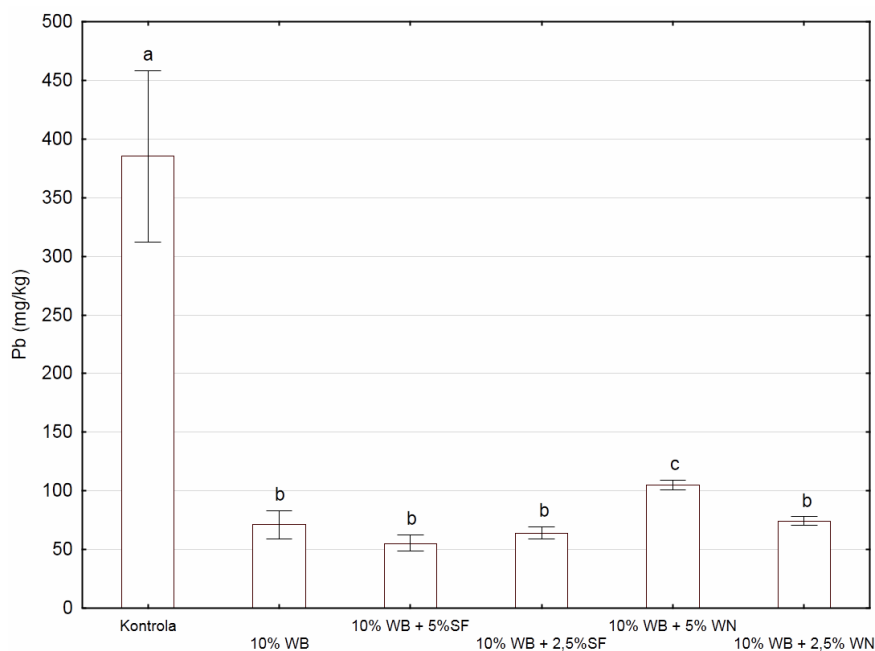
Istotne statystycznie zmiany w przyroście masy *F. arundinacea* „Asterix” zaobserwowano porównując wariant kontrolny z wariantami z dodatkiem stabilizatorów, ponadto w wariantach, w których łącznie wprowadzano węgiel brunatny z superfosfatem potrójnym lub wapnem nawozowym zaobserwowano niewielkie, lecz istotne statystycznie obniżenie ilości masy zebranych części nadziemnych traw w porównaniu z wariantem z samym dodatkiem węgla brunatnego. Zebrana sucha masa z wazonów kontrolnych wyniosła 0,25 g, podczas gdy w wariantach z dodatkiem tylko węgla brunatnego 1,2 g, a w wariantach z łącznym wprowadzeniem węgla brunatnego i superfosfatu potrójnego lub wapna nawozowego od 1 g do 1,1 g i była czterokrotnie wyższa. Wpływ różnych dawek stabilizatorów na przyrost biomasy *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunku 20.



Rys. 20. Wpływ różnych dawek stabilizatorów na przyrost biomasy *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi (n=3, ± BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

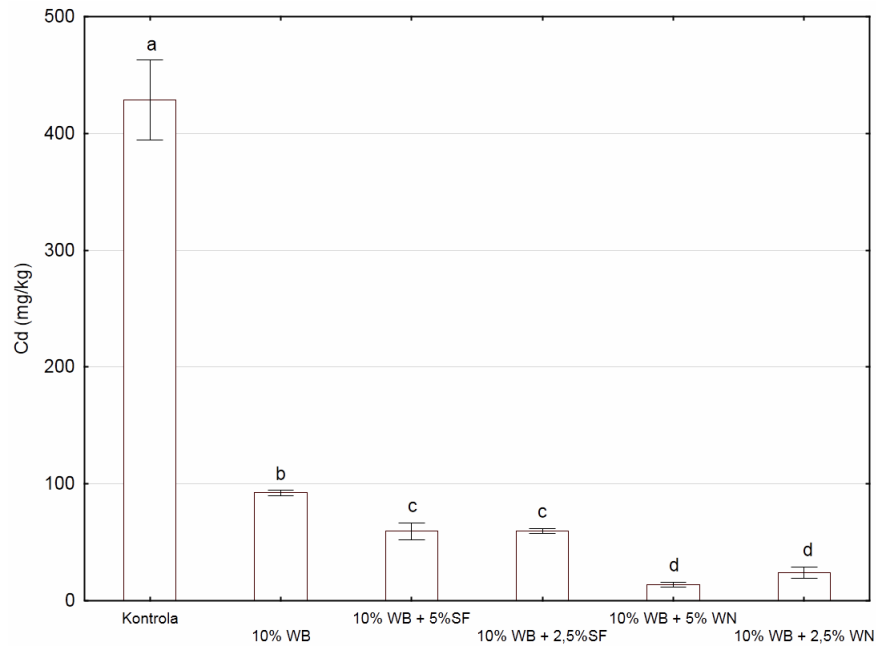
Obniżenie biodostępności badanych metali ciężkich w glebie przyczyniło się do intensywniejszego wzrostu roślin na glebie stabilizowanej, a jednocześnie wpłynęło na obniżenie ich kumulacji w nadziemnych częściach roślin.

Dla ołowiu zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie kumulacji w częściach nadziemnych w porównaniu z wariantem kontrolnym, natomiast istotnych statystycznie różnic nie zaobserwowano, porównując wprowadzane łącznie z węglem brunatnym superfosfat potrójny oraz wapno nawozowe w ilości 2,5%. Dodatek węgla brunatnego, węgla brunatnego z superfosfatem potrójnym lub wapnem nawozowym w ilości 2,5% spowodował ponad sześciokrotne zmniejszenie kumulacji ołowiu w częściach nadziemnych traw, do około 60 mg/kg. Łączne wprowadzenie węgla brunatnego z wapnem nawozowym w ilości 5% spowodowało istotny statystycznie wzrost kumulacji ołowiu w częściach nadziemnych kostrzewy trzcinowej, w porównaniu z wariantem, w którym do gleby wprowadzono tylko węgiel brunatny. Wpływ różnych dawek stabilizatorów na kumulację ołowiu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunku 21.



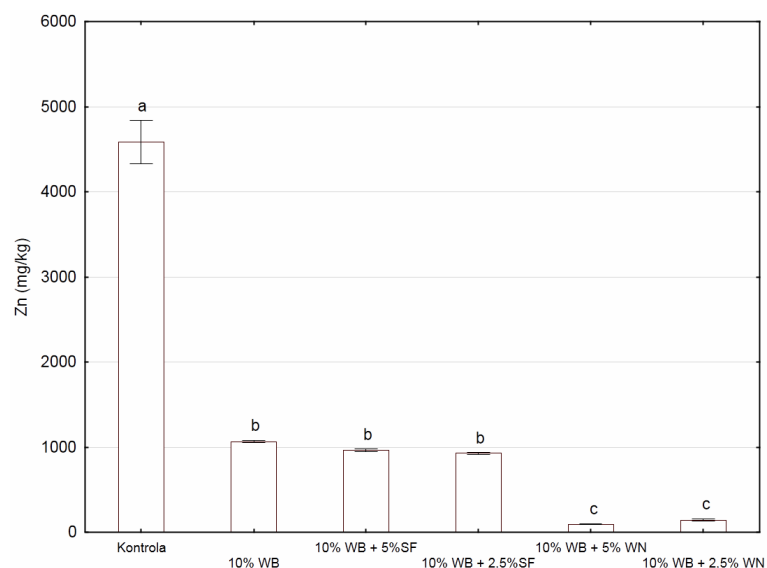
Rys. 21. Wpływ różnych dawek stabilizatorów na kumulację ołowiu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi (n=3,  $\pm$  BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

Dla wszystkich wariantów eksperymentu zaobserwowano istotne statystycznie zmiany w kumulacji kadmu w częściach nadziemnych, w porównaniu z wariantem kontrolnym. W porównaniu z wariantem z dodatkiem 10% węgla brunatnego istotne statystycznie różnice zaobserwowano dla łącznego wprowadzenia węgla brunatnego i wapna nawozowego, różnic tych nie obserwowano dla łącznego wprowadzenia węgla brunatnego i superfosfatu potrójnego. Obniżenie kumulacji kadmu w wariantcie z dodatkiem węgla brunatnego i wapna nawozowego było 33-krotne (13 mg/kg), porównując z wariantem kontrolnym (428 mg/kg) i około 7-krotne, w porównaniu z dodatkiem tylko 10% węgla brunatnego (92 mg/kg). Wpływ różnych dawek stabilizatorów na kumulację kadmu w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix” przedstawiono na Rysunku 22.



Rys. 22. Wpływ dodatków stabilizujących na kumulację kadmu w częściach nadziemnych *F. arundinacea Asterix*". Wyniki są średnimi (n=3, ±BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystyczny sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

Podobnie, jak w przypadku kadmu, obniżenie kumulacji cynku w częściach nadziemnych było istotne statystycznie w porównaniu z wariantem kontrolnym. Natomiast porównując z wariantem z dodatkiem 10% węgla brunatnego istotne statystycznie różnice zaobserwowano dla łącznego wprowadzenia węgla brunatnego i wapna nawozowego, a różnic tych nie obserwowano dla łącznego wprowadzenia węgla brunatnego i superfosfatu potrójnego. Po wprowadzeniu do gleby łącznie 10% węgla brunatnego i wapna nawozowego zaobserwowano obniżenie kumulacji cynku z poziomu 4500 mg/kg w wariantcie kontrolnym do 92 mg/kg w wariantcie doświadczalnym. Wpływ dodatków stabilizujących na kumulację cynku w częściach nadziemnych kostrzewy trzcinowej przedstawiono na Rysunku 23.



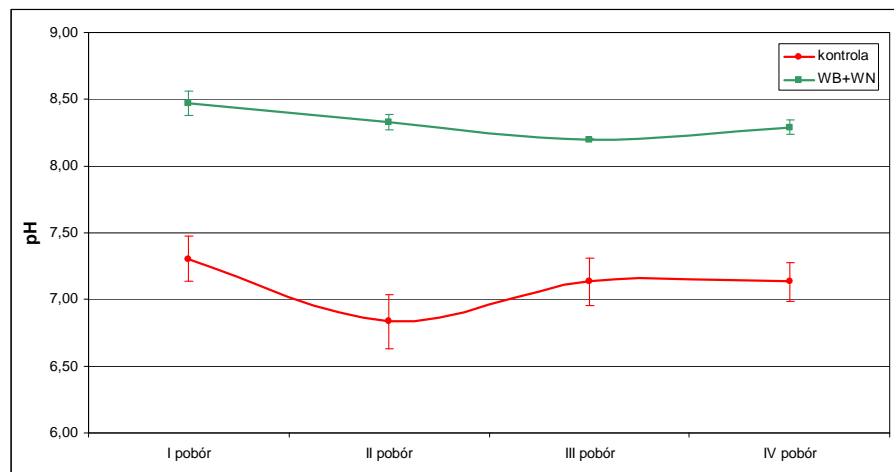
Rys. 23. Wpływ dodatków stabilizujących na kumulację cynku w częściach nadziemnych *F. arundinacea* „Asterix”. Wyniki są średnimi (n=3, ±BS). Średnie, przy których występują takie same litery, nie różnią się w istotny statystycznie sposób przy  $p < 0,05$  (test NIR)

Biorąc pod uwagę kumulację ołowiu, kadmu i cynku w częściach nadziemnych kostrzewy trzcinowej, **do dalszych badań jako najbardziej efektywną kombinację dodatków stabilizujących, wybrano kombinację: 10% węgla brunatnego i 2,5% wapna nawozowego.**

#### 5.4. EKSPERYMENT LIZYMETRYCZNY

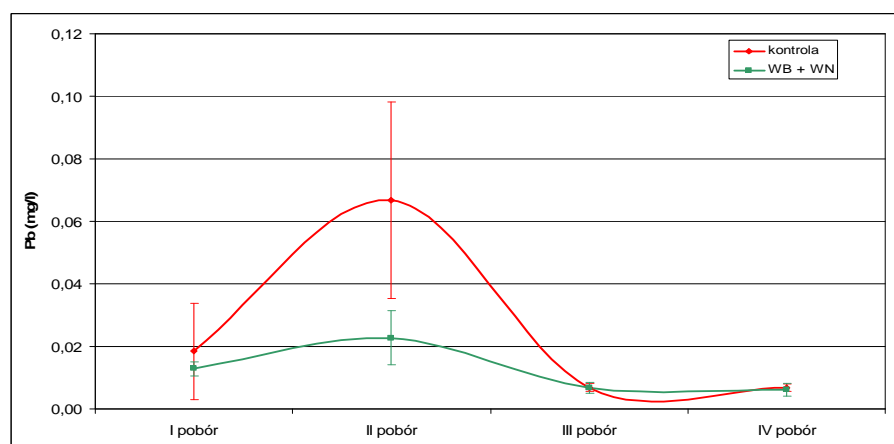
Celem doświadczenia lizymetrycznego było określenie, w jaki sposób wyselekcjonowana w trakcie doświadczeń wazonowych kombinacja 10% węgla brunatnego i 2,5% wapna nawozowego ogranicza wymywanie ołowiu, kadmu i cynku do powstających odcieków glebowych, a co za tym idzie, zmniejsza migrację metali ciężkich do wód podziemnych. W odciekach, zarówno z gleby kontrolnej (bez dodatków stabilizujących), jak i z gleby zawierającej węgiel brunatny i wapno nawozowe, oznaczono odczyn oraz stężenie metali ciężkich. Wprowadzenie dodatków doglebowych miało znaczny wpływ na zmianę odczynu powstających odcieków. Wprowadzenie węgla brunatnego wraz z wapnem nawozowym skutkowało wzrostem odczynu gleby o 1,1 jednostki, z wartości 7,3 do 8,4. W trakcie kolejnych poborów nie stwierdzono istotnych wahań w odczynie pobieranych odcieków, a niewielki spadek odczynu w wariancie eksperymentalnym świadczy o stopniowym wymywaniu wapna z gleby. Wynik ten może sugerować konieczność korygowania pH w kolejnych latach

stabilizacji gleby węglem brunatnym, poprzez odpowiednie dawkowanie wapna nawozowego. Zmiany odczynu odcieków w kolejnych poborach przedstawiono na Rysunku 24.



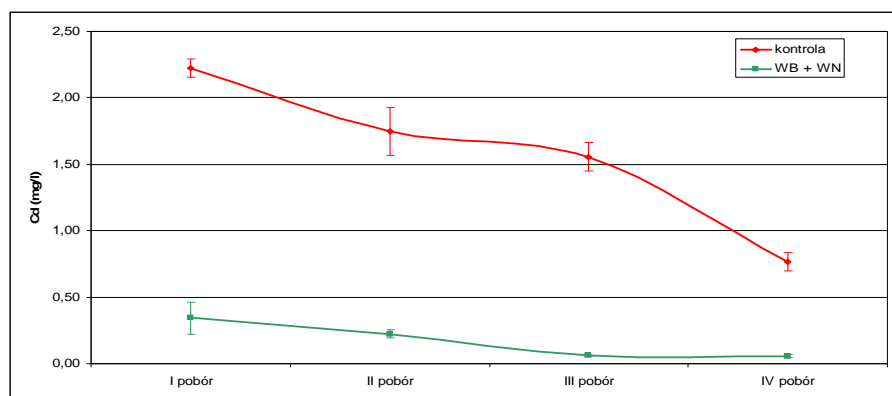
Rys. 24. Zmiana odczynu odcieków pobranych w trakcie eksperymentu lizymetrycznego ( $n=3, \pm BS$ )

Wprowadzenie do gleby dodatku węgla brunatnego łącznie z wapnem nawozowym nie wpłynęło w istotny statystycznie sposób na zawartość Pb w odciekach, w porównaniu z wariantem kontrolnym, ponadto w trakcie kolejnych poborów nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości Pb w odciekach. Związane było to przede wszystkim z niską zawartością tego pierwiastka w powstających odciekach, na co wpływ miało niskie stężenie formy biodostępnej ołowiu w glebie. Zmiany stężenia Pb w powstających odciekach po wprowadzeniu dodatków stabilizujących oraz w kolejnych poborach przedstawiono na Rysunku 25.



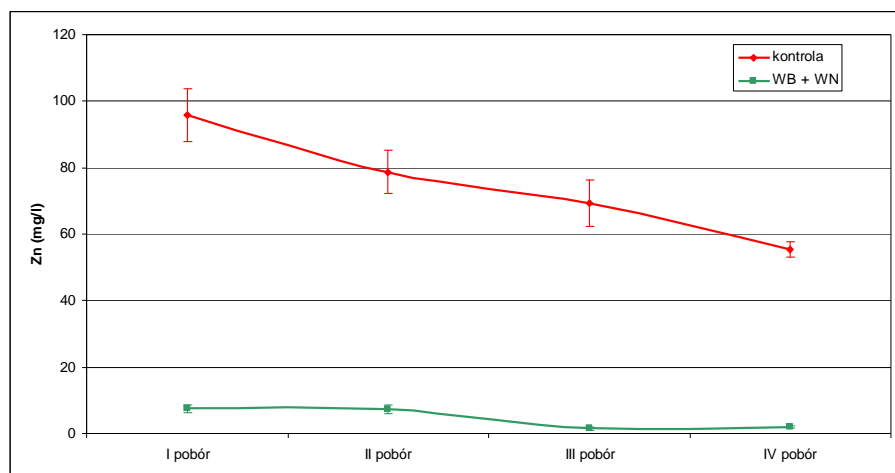
Rys. 25. Zmiany zawartości ołowiu w powstających odciekach w trakcie eksperymentu lizymetrycznego ( $n=3, \pm BS$ )

W przypadku kadmu zaobserwowano znaczne obniżenie zawartości tego metalu, zarówno w odciekach pobranych w kolejnych poborach, jak i w odciekach z gleby stabilizowanej w porównaniu do odcieków z gleby kontrolnej. W przypadku wariantu kontrolnego, zaobserwowano obniżenie zawartości kadmu w odciekach z kolejnych poborów, które wyniosło z 2,2 mg/l w poborze pierwszym do 0,7 mg/l w odciekach z poboru czwartego. Dla gleby stabilizowanej, początkowa zawartość kadmu w odciekach wynosiła 0,34 mg/l i była ponad sześciokrotnie niższa w porównaniu z wariantem kontrolnym. W trakcie kolejnych poborów następowało dalsze obniżenie zawartości kadmu w odciekach, osiągając stężenie 0,05 mg/l w poborze czwartym. Zmiana zawartości kadmu w powstających odciekach po wprowadzeniu dodatków stabilizujących oraz w kolejnych poborach przedstawiono na Rysunku 26.



Rys. 26. Zmiany zawartości kadmu w powstających odciekach w trakcie eksperymentu lizymetrycznego (n=3,  $\pm$  BS)

W przypadku cynku zaobserwowano znaczne obniżenie zawartości tego metalu w odciekach, porównując kontrolę z wariantem z dodatkami stabilizującymi. W trakcie kolejnych poborów obserwowano obniżenie zawartości Zn zarówno w glebie kontrolnej, jak i stabilizowanej węglem brunatnym wraz z wapnem nawozowym. Wprowadzenie stabilizatorów do gleby spowodowało obniżenie zawartości cynku w odciekach, odpowiednio trzynastokrotne w poborze pierwszym do 28-krotnego w poborze czwartym. W trakcie sezonu wegetacyjnego uzyskano obniżenie zawartości cynku w odciekach z 95,86 mg/l w odciekach z lizymetrów wariantu kontrolnego w poborze pierwszym do 1,94 mg/l w odciekach z lizymetrów z glebą stabilizowaną w poborze czwartym. Zmiany stężenia cynku w powstających odciekach po wprowadzeniu dodatków stabilizujących oraz w kolejnych poborach przedstawiono na Rysunku 27.



Rys. 27. Zmiany zawartości cynku w powstających odciekach w trakcie eksperymentu lizymetrycznego (n=3,  $\pm$  BS)

Wprowadzenie do gleby silnie zanieczyszczonej metalami ciężkimi 10% dodatku węgla brunatnego i 2,5% wapna nawozowego w znacznym stopniu obniżyło stężenie kadmu, cynku i ołowiu w powstających odciekach. W porównaniu z glebą kontrolną uzyskano odpowiednio: 6-krotne obniżenie stężenia kadmu oraz 28-krotne obniżenie stężenia cynku w odciekach z gleby stabilizowanej. Natomiast, zmiany stężenia ołowiu w powstających odciekach z gleby kontrolnej i stabilizowanej nie były statystycznie istotne.

## 5.5 EKSPERYMENT POLETKOWY

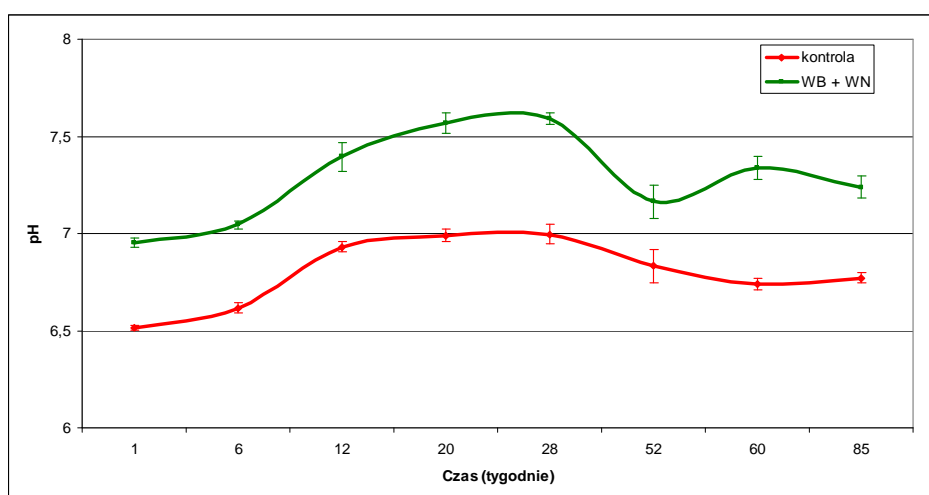
### 5.5.1. Zmiany odczynu gleby oraz biodostępności metali ciężkich i arsenu w glebie po wprowadzeniu dodatków stabilizujących

Zmiany odczynu gleby oraz biodostępności ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w glebie monitorowano w trakcie kolejnych poborów próbek, które miały miejsce w 1, 6, 12, 20, 28, 52, 60, oraz 85 tygodniu od momentu łącznego wprowadzenia węgla brunatnego i wapna nawozowego.

Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego wraz z wapnem nawozowym spowodowało wzrost odczynu gleby stabilizowanej do wartości pH=6,95 w pierwszym tygodniu eksperymentu. W trakcie kolejnych poborów próbek glebowych stwierdzono wzrost odczynu gleby, aż do wartości pH=7,6 w 28 tygodniu trwania eksperymentu, który związany był ze stopniowym rozpuszczaniem się wapna nawozowego wprowadzonego do gleby. Pomiędzy 28 a 52 tygodniem eksperymentu nastąpiło



nieznaczne obniżenie odczynu gleby stabilizowanej do wartości  $\text{pH}=7,2$ . W ostatnich poborach próbek glebowych wartość odczynu gleby wyniosła  $\text{pH}=7,3$ . W porównaniu z wariantem kontrolnym, w trakcie trwania całego eksperymentu poletkowego w glebie stabilizowanej obserwowano wyższy jej odczyn, o około 0,5 jednostki. Zmiany odczynu gleby w eksperymencie poletkowym dla obu gleb przedstawiono na Rysunku 28.



Rys. 28. Zmiany odczynu gleby w trakcie eksperymentu poletkowego ( $n=5$ ,  $\pm$  BS)

Wprowadzenie do gleby zanieczyszczonej dodatków stabilizujących w postaci węgla brunatnego i wapna nawozowego spowodowało zmiany w biodostępności ołowiu, kadmu, cynku. Natomiast, nie zaobserwowano zmian w biodostępności arsenu w glebie stabilizowanej. Stężenie biodostępne frakcji arsenu w glebie zanieczyszczonej było niskie, rzędu 0,05-0,08 mg/kg.

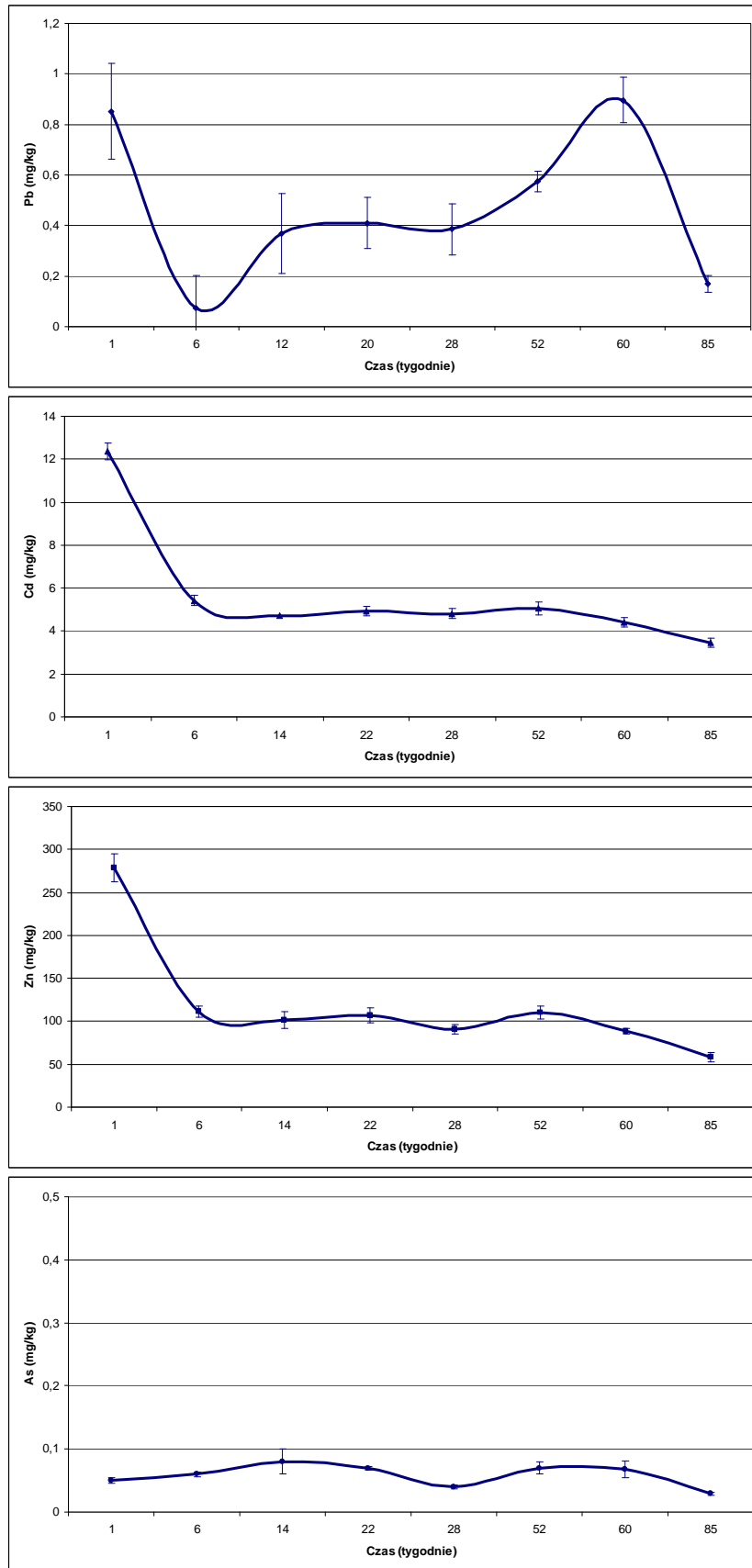
W trakcie trwania eksperymentu poletkowego obserwowano znaczne wahania w biodostępności ołowiu w glebie stabilizowanej. Biodostępność ołowiu na początku eksperymentu wynosił 0,8 mg/kg, a po sześciu tygodniach od wprowadzenia dodatków stabilizujących nastąpiło jej obniżenie do 0,07 mg/kg, a w trakcie kolejnych poborów próbek gleby (12, 20 i 28 tydzień) obserwowano jej wzrost do wartości 0,4 mg/kg. W kolejnych poborach obserwowano dalszy wzrost biodostępności tego pierwiastka do 0,9 mg/kg. W ostatnim poborze gleby stwierdzono obniżenie biodostępności ołowiu do 0,2 mg/kg.

Wprowadzenie węgla brunatnego i wapna nawozowego do gleby spowodowało znaczne obniżenie biodostępności kadmu w glebie. Już po sześciu tygodniach trwania eksperymentu stężenie frakcji biodostępnej kadmu zostało obniżone prawie trzykrotnie,

z wartości 12 mg/kg w pierwszym tygodniu eksperymentu do wartości 5 mg/kg. W trakcie kolejnych analiz próbek gleby, pobranych między 6 a 60 tygodniem eksperymentu, biodostępność kadmu obserwowana była na podobnym poziomie. Dalszy spadek biodostępności tego pierwiastka stwierdzono w 85 tygodniu eksperymentu poletkowego, do wartości 3,5 mg/kg. Stopniowe obniżenie stężenia biodostępnej frakcji świadczy o skuteczności wyselekcjonowanych dodatków doglebowych.

W przypadku cynku również zaobserwowano znaczny spadek biodostępności tego pierwiastka, począwszy od szóstego tygodnia od wprowadzenia stabilizatorów do gleby zanieczyszczonej. Biodostępność cynku została obniżona ponad trzykrotnie, z 288 mg/kg w pierwszym tygodniu eksperymentu do 88 mg/kg w tygodniu sześćdziesiątym, a w ostatnim tygodniu monitorowania badań stężenie biodostępnej frakcji cynku spadło do 58 mg/kg.

Zmiany stężenia form biodostępnych analizowanych pierwiastków w czasie przedstawiono na Rysunku 29.



Rys. 29. Zmiany biodostępności ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w trakcie trwania eksperymentu poletkowego (n=5,  $\pm$  BS)

### 5.5.2. Wzrost roślin i kumulacja metali ciężkich w częściach nadziemnych i korzeniach kostrzewy trzcinowej

W procesie wspomaganej fitostabilizacji istotnym jest, oprócz uzyskania obniżenia biodostępności pierwiastków toksycznych, wytworzenie na powierzchni stabilizowanej gleby odpowiednio gęstej i zwartej pokrywy roślinnej, która to z jednej strony zapobiega pyleniu wtórnemu gleby, a z drugiej, poprzez system korzeniowy, ogranicza migrację zanieczyszczeń do wód podziemnych. Wzrost kostrzewy na poletku z glebą kontrolną był ograniczony, pokrycie powierzchni przez rośliny wynosiło około 30%. Na poletku z glebą stabilizowaną węglem brunatnym i wapnem nawozowym zaobserwowano bardzo bujny wzrost wysianej trawy. Pokrycie powierzchni wynosiło 100%, kostrzewa trzcinowa tworzyła gęstą i zwartą pokrywę (Rysunek 30).



Rys. 30. Wzrost kostrzewy trzcinowej na poletku kontrolnym oraz z wprowadzonym dodatkiem węgla brunatnego i wapna nawozowego

Konsekwencją stopnia pokrycia poletek przez rośliny i intensywności ich wzrostu było uzyskanie dużej ilości suchej masy traw. Łączna produkcja biomasy na poletku z glebą stabilizowaną w trakcie całego eksperymentu poletkowego była czterokrotnie większa niż na glebie kontrolnej (Tabela 4). Największe różnice zaobserwowano w pierwszym pokosie, gdzie zebrana biomasa z poletka z glebą stabilizowaną była ponad ośmiokrotnie wyższa w porównaniu z poletkiem kontrolnym.

Tabela 4. Produkcja biomasy na poletkach badawczych w dwóch sezonach wegetacyjnych (g s.m.)

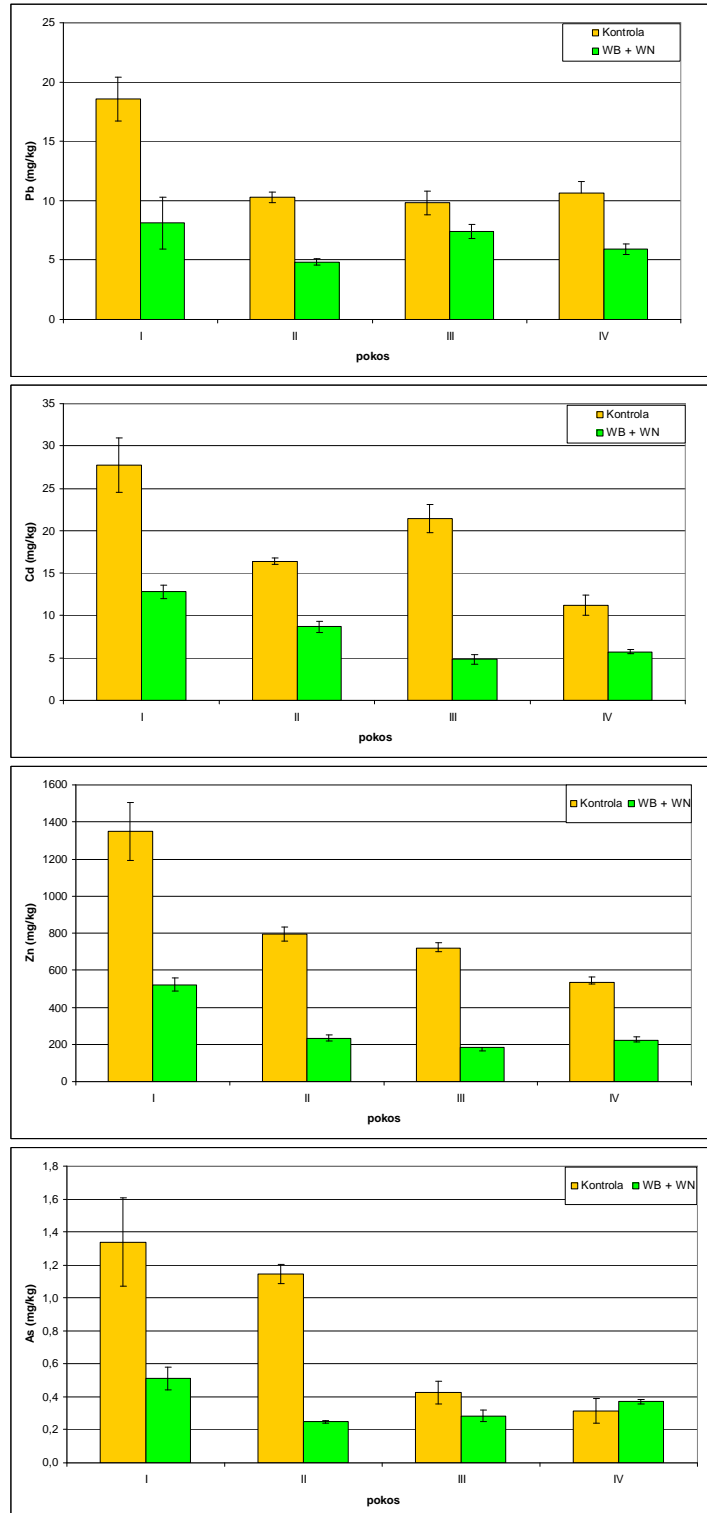
<b>Wariant doświadczenia</b>	<b>Pokos I</b>	<b>Pokos II</b>	<b>Pokos III</b>	<b>Pokos IV</b>	<b>Łącznie w dwóch sezonach wegetacyjnych</b>
Kontrola (GK)	59,43	270,8	83,5	186,42	600,15
Gleba stabilizowana (GF)	503,63	1117,18	350	673,54	2644,35
GF/GK	8,47	4,13	4,19	3,61	4,41

W zebranych materiale roślinnym określono również stężenie kadmu, ołowiu, cynku i arsenu. Wraz z wprowadzeniem dodatków doglebowych obniżona została biodostępność kadmu, ołowiu oraz cynku w glebie oraz pobieranie ich przez rośliny do części nadziemnych. Zmiany w kumulacji ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w trakcie kolejnych zbiorów, w częściach nadziemnych traw przedstawiono na Rysunku 31. Wprowadzenie do gleby węgla brunatnego i wapna nawozowego spowodowało obniżenie pobierania ołowiu do części nadziemnych. Zawartość ołowiu w roślinach z poletka kontrolnego wahała się od 18 mg/kg do 10 mg/kg i była około dwukrotnie wyższa, w porównaniu ze stężeniami metalu w roślinach zebranych z poletka z glebą stabilizowaną.

Kumulacja kadmu w roślinach zebranych z poletka kontrolnego wykazywała znaczną zmienność w poszczególnych pokosach, od 27 mg/kg do 11 mg/kg i była zawsze wyższa, porównując z kumulacją w roślinach z poletka stabilizowanego (od 12 mg/kg do 5 mg/kg). Wprowadzenie do gleby zanieczyszczonej węgla brunatnego i wapna nawozowego spowodowało od dwukrotnego do czterokrotnego obniżenia kumulacji tego pierwiastka w częściach nadziemnych roślin.

Istotne obniżenie kumulacji w częściach nadziemnych kostrzewy trzinowej zaobserwowano również w przypadku cynku. Zawartość tego pierwiastka w roślinach zebranych z poletka kontrolnego wynosiła od 1350 mg/kg w pokosie pierwszym do 535 mg/kg w pokosie czwartym. Kumulacja cynku w częściach nadziemnych roślin zebranych z poletka stabilizowanego węglem brunatnym i wapnem nawozowym wyniosła od 520 mg/kg w pokosie pierwszym do 220 mg/kg w pokosie czwartym. Wprowadzenie dodatków stabilizujących do gleby zanieczyszczonej spowodowało ponad trzykrotne obniżenie kumulacji cynku w częściach nadziemnych kostrzewy trzinowej. Ponadto, pomimo braku zmian w biodostępności arsenu po wprowadzeniu dodatków doglebowych, zaobserwowano obniżenie jego kumulacji w częściach

nadziemnych roślin w pierwszych dwóch pokosach, natomiast w zbiorze trzecim i czwartym kumulacja arsenu w częściach nadziemnych kostrzewy była na takim samym poziomie zarówno w przypadku poletka kontrolnego, jak i poddanego fitostabilizacji.



Rys. 31. Kumulacja ołowiu, kadmu, cynku i arsenu w częściach nadziemnych kostrzewy trzcinowej w poszczególnych pokosach (n=5, ± BS)

W ostatnim zbiorze roślin oprócz części nadziemnych kostrzewy trzcinowej pobrano korzenie w celu określenia w nich stężenia ołowiu, kadmu, cynku i arsenu. W Tabeli 5 przedstawiono porównanie zawartości badanych pierwiastków w częściach nadziemnych i korzeniach oraz określono stosunek ich kumulacji w korzeniach do wynoszenia zanieczyszczeń do części nadziemnych zarówno dla gleby kontrolnej, jak i stabilizowanej węglem brunatnym i wapnem nawozowym. Kumulacja badanych pierwiastków w korzeniach kostrzewy trzcinowej była znacznie wyższa niż w częściach nadziemnych, co świadczy o przydatności tego gatunku w fitostabilizacji gleb zanieczyszczonych. Dodatkowo, wprowadzenie do gleby dodatków stabilizujących spowodowało poprawę warunków wzrostu, wpłynęło na zwiększenie kumulacji metali w korzeniach i ograniczyło ich wynoszenie do części nadziemnych, co w szczególności widoczne jest w przypadku kadmu, dla którego współczynnik kumulacji w korzeniach do kumulacji w częściach nadziemnych zwiększył się ponad 2,5-krotnie.

Tabela 5. Porównanie kumulacji badanych pierwiastków w częściach nadziemnych i korzeniach kostrzewy trzcinowej (n=5, ± BS)

	<b>Gleba kontrolna</b>			
	Pb	Cd	Zn	As
	(mg/kg)			
część nadziemna (N)	10,62 ± 0,98	11,23 ± 1,20	535,65 ± 25,56	0,31 ± 0,07
korzenie (K)	261,97 ± 43,15	154,08 ± 18,56	2382,17 ± 273,41	4,87 ± 1,23
<b>K/N</b>	<b>24,66</b>	<b>13,72</b>	<b>4,45</b>	<b>15,70</b>
	<b>Gleba stabilizowana</b>			
	Pb	Cd	Zn	As
	(mg/kg)			
część nadziemna (N)	5,92 ± 0,44	5,72 ± 0,28	221,95 ± 9,68	0,37 ± 0,01
korzenie (K)	216,48 ± 17,60	184,37 ± 14,39	2379,50 ± 176,38	4,08 ± 0,50
<b>K/N</b>	<b>36,56</b>	<b>32,23</b>	<b>10,72</b>	<b>11,02</b>

### 5.5.3. Analiza toksyczności gleby

W Tabeli 6 przedstawiono zmiany toksyczności próbek gleby kontrolnej i stabilizowanej, wyrażone w jednostkach toksyczności (TU). Podczas trwania eksperymentu zaobserwowano spadek toksyczności, zarówno w glebie kontrolnej, jak i stabilizowanej węglem brunatnym, wprowadzonym łącznie z wapnem nawozowym. Wartości TU dla gleby stabilizowanej były znacznie niższe niż dla gleby

kontrolnej. Po pierwszym tygodniu doświadczenia zaobserwowano znaczne różnice w toksyczności pomiędzy glebą kontrolną i stabilizowaną. Dla gleby kontrolnej wartość TU wynosiła 130, a dla gleby stabilizowanej 14,2. Podczas trwania eksperymentu średnia wartość TU dla gleby stabilizowanej wynosiła 9,95, a dla gleby kontrolnej 73,56. Po 85 tygodniach prowadzenia eksperymentu w glebie stabilizowanej stwierdzono 60% spadek toksyczności. W 20-tym tygodniu doświadczenia zaobserwowano wzrost toksyczności gleby, zarówno kontrolnej, jak i stabilizowanej. W 16-tym tygodniu trwania eksperymentu dokonano zbiorów części nadziemnych (pokos II) i najprawdopodobniej proces ten przyczynił się do wzrostu toksyczności gleb w tym czasie. Przy czym, takiej zależności nie zaobserwowano podczas zbioru pierwszego (8 tydzień trwania eksperymentu). Podsumowując, gleba z dodatkami stabilizującymi była mniej toksyczna niż gleba kontrolna i zaobserwowano 40% spadek toksyczności gleby poddanej fitostabilizacji wspomaganiej.

Tabela 6. Zmiany toksyczności w glebie kontrolnej i badanej podczas trwania doświadczenia (średnia  $\pm$  odchylenie standardowe)

<b>Czas (tygodnie)</b>	<b>Gleba kontrolna (K) (15 min-TU)</b>	<b>Gleba stabilizowana (B) (15 min-TU)</b>	<b>K/B</b>
1	129,9 $\pm$ 39,8	14,2 $\pm$ 5,11	9,1
3	95,8 $\pm$ 22	11,6 $\pm$ 4,25	8,3
6	103,1 $\pm$ 29	12,2 $\pm$ 3,01	8,4
9	39,6 $\pm$ 8,4	11,1 $\pm$ 2,41	3,6
12	49,9 $\pm$ 12,7	4,0 $\pm$ 1,40	12,3
20	70,6 $\pm$ 20,5	17,7 $\pm$ 3,32	4
28	68,1 $\pm$ 27,9	5,2 $\pm$ 1,32	13,2
58	74,4 $\pm$ 11,56	7,9 $\pm$ 2,05	9,4
85	30,7 $\pm$ 5,61	5,7 $\pm$ 1,41	5,4



#### 5.5.4. Aktywność enzymatyczna wyznaczona testem API<sup>®</sup>ZYM

Po upływie 85 tygodni prowadzenia badań w warunkach polowych aktywność enzymatyczna w glebie poddanej fitostabilizacji wspomaganej w porównaniu do kontroli była wyraźnie wyższa, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, przy czym najwyższą aktywność enzymatyczną stwierdzono w 28 tygodniu doświadczeń, pod koniec pierwszego sezonu wegetacyjnego. W glebie stabilizowanej w 28 tygodniu trwania eksperymentu liczba oznaczonych enzymów wzrosła z wyjściowej 9 do 13. Natomiast w kontroli, w tym samym czasie, stwierdzono zmniejszenie liczby aktywnych enzymów do sześciu. Odczyty testu dla obu gleb zestawiono w Tabeli 7.

W czasie 85 tygodni badań największe zmiany aktywności w stabilizowanej glebie stwierdzono dla fosfatazy alkalicznej, esterazy (C 4), fosfatazy kwaśnej i fosfohydrolazy naftylo-AS-BI. Po 6 tygodniach wstępnej chemicznej stabilizacji aktywność esterazy (C 4) wzrosła z 7,5 do 15 nM zhydrolizowanego substratu, podczas gdy fosfatazy alkalicznej i fosfohydrolazy z 5 do 15 nM zhydrolizowanego substratu. W 28 tygodniu trwania eksperymentu aktywność esterazy wzrosła do ponad 20 nM, natomiast obu fosfataz spadła poniżej 10 nM zhydrolizowanego substratu. Podobne zmiany w aktywności w glebie stabilizowanej oznaczono dla esterazy lipazy (C 8) i aryamidazy leucyny, dla których odczyty wzrosły z 5 nM (w dniu założenia układu doświadczalnego) do niespełna 10 nM zhydrolizowanego substratu. Zbliżone aktywności zaobserwowano dla dwóch enzymów:  $\alpha$ -glukozydazy i  $\beta$ -glukozydazy, które wynosiły odpowiednio 5 nM (na początku doświadczenia) i 10 nM (po 28 tygodniach) zhydrolizowanego substratu. Podobną aktywność zaobserwowano dla dwóch innych enzymów, tj:  $\beta$ -galaktozydazy i N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidaza po 3 tygodniach i w 28 tygodniu trwania eksperymentu. Niewielką aktywność stwierdzono w glebie stabilizowanej dla trypsyny w 6 tygodniu prowadzenia doświadczenia, która mieściła się w przedziale od 5 do 10 nM.

Tabela 7. Zestawienie odczytów intensywności zabarwienia w poszczególnych studzienkach paska testu API<sup>®</sup>ZYM zgodnie z tabelą porównawczą producenta dla gleby kontrolnej (GK) i stabilizowanej (GF)

Badana gleba	ENZYMY																			
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>
GK <sub>0</sub>	1	2	2	0	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0
GF <sub>0</sub>	1	2	2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
GK <sub>3</sub>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>3</sub>	1	2	2	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0	1	0	0	0	1	0	0
GK <sub>6</sub>	1	2	1	0	1	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>6</sub>	3	3	2	0	2	1	2	2	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0
GK <sub>9</sub>	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>9</sub>	2	2	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GK <sub>12</sub>	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>12</sub>	2	3	2	0	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GK <sub>20</sub>	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>20</sub>	2	2	1	0	1	1	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GK <sub>28</sub>	2	3	0	0	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0
GF <sub>28</sub>	2	4	2	0	2	2	1	0	0	0	2	2	1	1	0	2	2	1	0	0
GK <sub>58</sub>	3	2	3	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>58</sub>	3	2	3	0	2	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GK <sub>85</sub>	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
GF <sub>85</sub>	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0	3	4	0	1	0	0	3	0	0	0

GF – gleba poddawana fitostabilizacji wspomaganiej, GK – gleba kontrolna; 0-28 – tydzień poboru gleby; 4 ≥ 30 nM zhydrolizowanego substratu; 3 ≥ 10 nM zhydrolizowanego substratu; 2 ≥ 5 nM zhydrolizowanego substratu; 1 < 5 nM zhydrolizowanego substratu; 0 brak rozkładu substratu.

Enzymy: 2) fosfatasa alkaliczna, 3) esteraza (C 4), 4) esteraza lipaza (C 8), 5) lipaza (C 14), 6) arylamidaza leucyny, 7) arylamidaza waliny, 8) aryl amidaza cystyny, 9) tripsyna, 10) α-chymotrypsyna, 11) kwaśna fosfatasa, 12) fosfohydrolaza naftylo-AS-BI, 13) α-galaktozydaza, 14) β-galaktozydaza, 15) β-glukuronidaza, 16) α-glukozydaza, 17) β-glukozydaza, 18) N-acetylo-β-glukozaminidaza, 19) α-mannozydaza, 20) α-fukozydaza.

Wykonane odczyty potwierdzają aktywność fosfatasy zasadowej, fosfatasy kwaśnej i fosfohydrolazy naftylo-AS-BI w obydwu badanych glebach. Na podstawie intensywności zabarwienia stwierdzono w glebie stabilizowanej wzrost ich aktywności już po zakończeniu wstępnej chemicznej stabilizacji. W tym czasie w kontroli nieznacznie wzrosła aktywność jedynie fosfatasy kwaśnej. W ostatnim tygodniu monitorowania procesu, aktywności fosfatyz były porównywalne w obydwu wariantach doświadczenia. W stabilizowanej glebie test wykazał również wzrost aktywności dwóch esteraz: C 4 i esteraza lipaza (C 8) oraz dwóch aminopeptydaz: arylamidazy leucyny i waliny. Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI odznaczała się najwyższą aktywnością spośród wszystkich enzymów. W ostatnim tygodniu analiz aktywność tego enzymu była wyższa w glebie stabilizowanej w porównaniu do gleby kontrolnej i wynosiła odpowiednio

20 nM i 10 nM zhydrolizowanego substratu. Na początku doświadczenia w obydwu glebach aktywne były  $\alpha$ -glukozydaza i  $\beta$ -glukozydaza, lecz w ostatnim tygodniu doświadczenia nie stwierdzono aktywności  $\alpha$ -glukozydazy w glebie kontrolnej. Po upływie 21 miesięcy w glebie poddanej fitostabilizacji wspomaganej stwierdzono aktywność fosfatazy alkalicznej, esterazy (C4), esterazy lipazy (C 8), aryamidazy leucyny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI,  $\beta$ -galaktozydazy oraz  $\beta$ -glukozydazy.

#### 5.5.5. Aktywność wybranych enzymów glebowych

Na Rysunku 32 przedstawiono zmiany aktywności następujących enzymów glebowych: proteazy, dehydrogenazy, ureazy, fosfatazy kwaśnej i fosfatazy zasadowej podczas monitorowania eksperymentu w glebie kontrolnej i stabilizowanej.

Aktywność dehydrogenazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz ureazy była wyższa w glebie stabilizowanej w porównaniu z wariantem kontrolnym, w trakcie trwania całego eksperymentu. W ciągu 85 tygodni trwania eksperymentu aktywność dehydrogenazy w glebie stabilizowanej wzrosła 17-krotnie, porównując z wartością początkową, od wartości 1,93  $\mu\text{g TPF/g s.m. 24h}$  do 37,02  $\mu\text{g TPF/g s.m. 24h}$ . Aktywność dehydrogenazy w glebie kontrolnej wzrosła 5-krotnie, od wartości 3,56  $\mu\text{g TPF/g s.m. 24h}$  do 16,15  $\mu\text{g TPF/g s.m. 24h}$  i była trzykrotnie wyższa w glebie stabilizowanej. W ostatnim tygodniu prowadzonych badań aktywność dehydrogenazy była ponad dwukrotnie wyższa w glebie stabilizowanej.

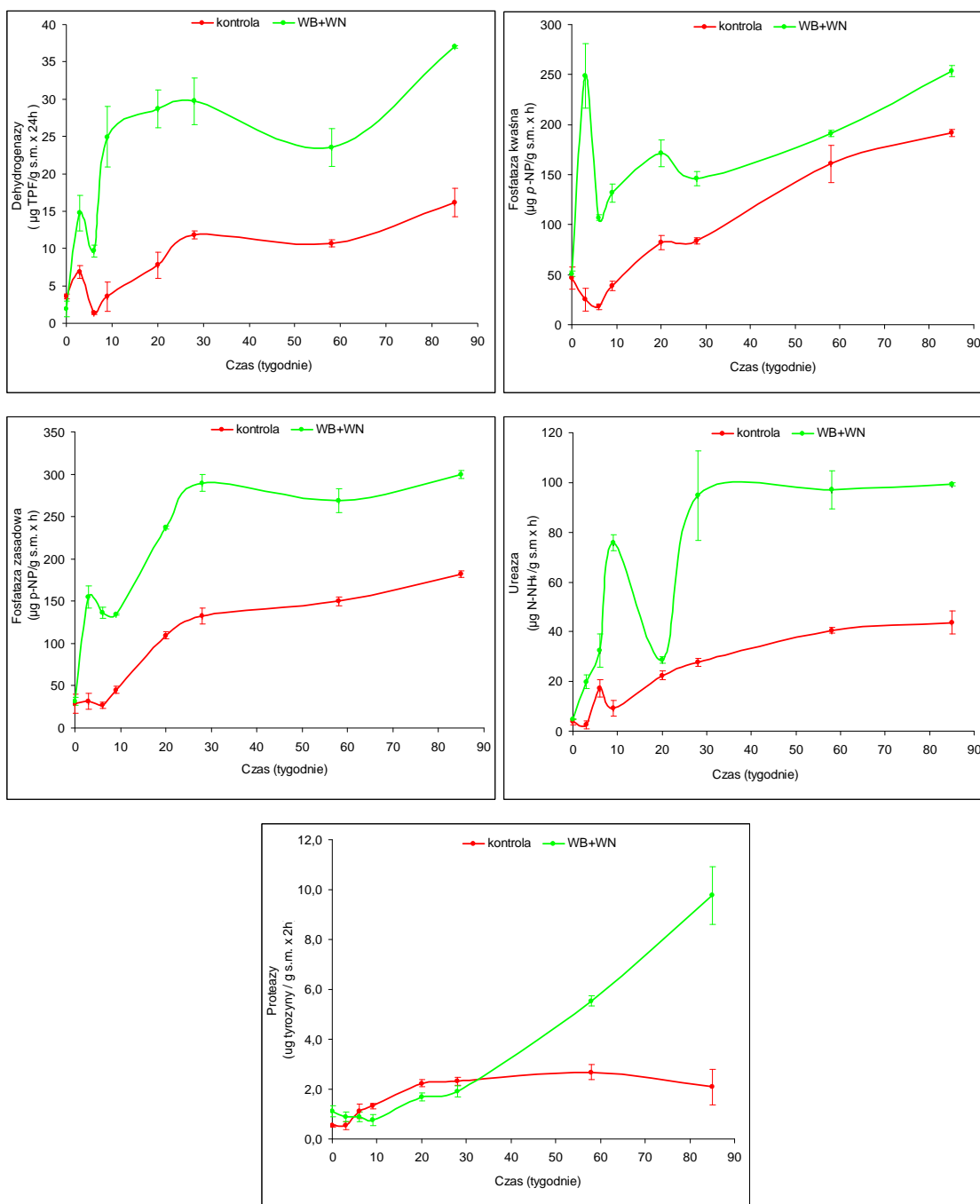
Aktywność fosfatazy kwaśnej również była wyższa w glebie stabilizowanej, obserwowano jednak znaczne wahania aktywności tego enzymu w trakcie trwania eksperymentu. Pomiędzy tygodniem pierwszym i trzecim obserwowano gwałtowny wzrost aktywności, z wartości 50,88  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$  do 248,72  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$ , a następnie jej spadek do poziomu 106,77  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$ . W kolejnych tygodniach obserwowano wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej do wartości 253,52  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$  w ostatnim tygodniu obserwacji. Podobny trend w aktywności fosfatazy kwaśnej obserwowano w glebie kontrolnej, jednakże aktywność tego enzymu była znacznie niższa, osiągając 191,63  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$  w ostatnim tygodniu obserwacji.

W trakcie trwania eksperymentu, zarówno w glebie kontrolnej, jak i stabilizowanej węglem brunatnym i wapnem nawozowym obserwowano wzrost aktywności fosfatazy

zasadowej. W glebie stabilizowanej aktywności tego enzymu w trakcie pierwszego sezonu wegetacyjnego (tygodnie 1-28) wzrosła 9-krotnie z wartości 31,58  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$  do 289,78  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$ , a następnie utrzymywała się na podobnym poziomie w trakcie drugiego sezonu wegetacyjnego. W przypadku gleby kontrolnej aktywność fosfatazy zasadowej wzrosła z wartości 29,05  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$  do 132,34  $\mu\text{g p-NP/g s.m. h}$  w pierwszym sezonie wegetacyjnym, a następnie utrzymywała się na podobnym poziomie w trakcie drugiego roku prowadzenia eksperymentu. W ostatnim tygodniu obserwacji stwierdzono niemal dwukrotnie wyższą aktywność fosfatazy zasadowej w glebie stabilizowanej.

Podobnie, jak w przypadku dehydrogenazy i fosfatazy kwaśnej oraz zasadowej, aktywność ureazy była wyższa w glebie stabilizowanej niż w glebie kontrolnej, podczas trwania eksperymentu poletkowego. W pierwszych dziewięciu tygodniach eksperymentu w glebie stabilizowanej obserwowano gwałtowny wzrost aktywności ureazy, z wartości początkowej 4,68  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$  do 75,76  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$ . W tygodniu 20 aktywność ureazy spadła do wartości 28,61  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$ , by następnie wzrosnąć, osiągając na koniec pierwszego sezonu wegetacyjnego 94,73  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$ . W drugim sezonie wegetacyjnym aktywność ureazy w glebie utrzymywała się na podobnym poziomie jak pod koniec pierwszego roku prowadzenia eksperymentu. W glebie kontrolnej również obserwowano zwiększenie aktywności ureazy, była ona jednak kilkakrotnie niższa niż w glebie stabilizowanej. Aktywność tego enzymu w pierwszym roku prowadzenia doświadczeń wzrosła z 3,73  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$  do 27,57  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$ . W drugim sezonie wegetacyjnym obserwowano dalszy wzrost aktywności ureazy, do 43,71  $\mu\text{g N-NH}_4/\text{g s.m. h}$  w 85 tygodniu eksperymentu. Aktywność ureazy w glebie kontrolnej była ponad dwukrotnie niższa w porównaniu do gleby stabilizowanej.

W przeciwieństwie do wyżej omawianych aktywności enzymów glebowych, aktywność proteazy w pierwszym roku prowadzenia doświadczenia (tygodnie 1-28) była nieznacznie wyższa w glebie kontrolnej. W drugim roku badań obserwowano znaczny wzrost aktywności tego enzymu w glebie stabilizowanej, natomiast w glebie kontrolnej aktywność proteazy utrzymywała się na poziomie podobnym do roku pierwszego. W ostatnim tygodniu badań, aktywność proteazy w glebie stabilizowanej wynosiła 9,77  $\mu\text{g tyrozyny/g s.m. 2h}$  i była niemal pięciokrotnie wyższa niż w glebie kontrolnej (2,09  $\mu\text{g tyrozyny/g s.m. 2h}$ ).

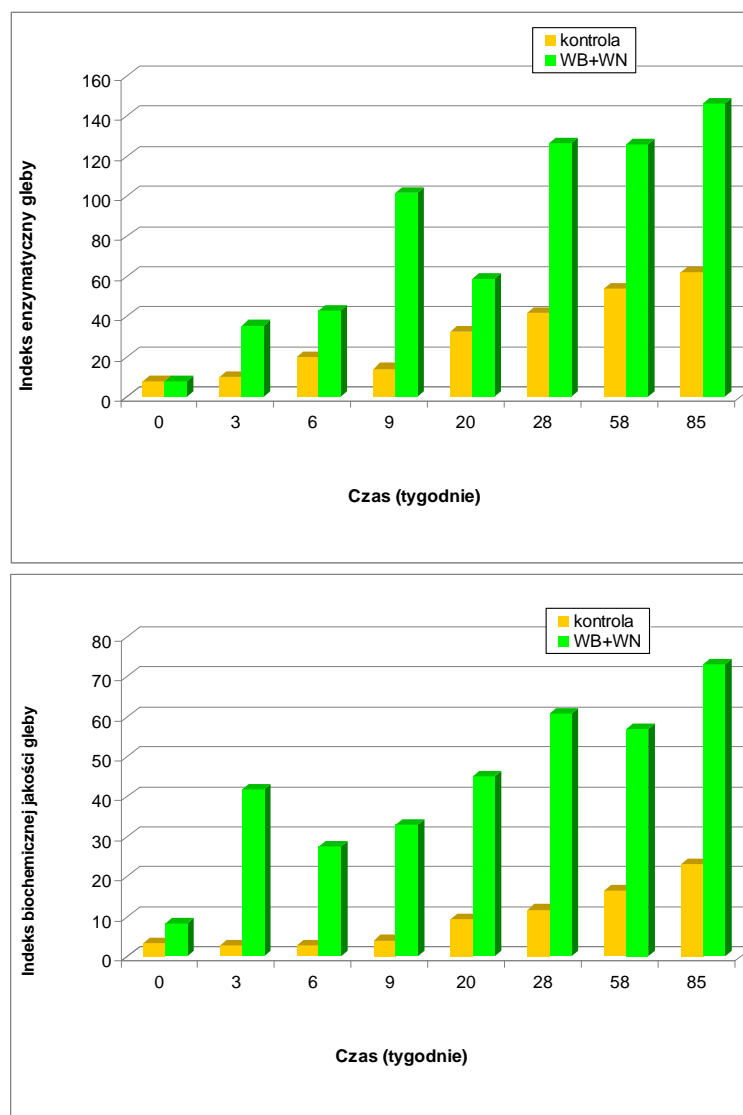


Rys. 32. Wpływ wspomagannej fitostabilizacji na aktywność wybranych enzymów glebowych (n=5,  $\pm$ BS).

### 5.5.6. Indeks enzymatyczny oraz indeks biochemicznej jakości gleby

Na Rysunku 33 przedstawiono zmiany wartości indeksu enzymatycznego oraz indeksu biochemicznego podczas trwania eksperymentu dla obu gleb: kontrolnej i stabilizowanej. Średnia wartość indeksu enzymatycznego w trakcie prowadzenia badań wyniosła 80,65 dla gleby stabilizowanej i była niemal trzykrotnie wyższa, w porównaniu z glebą kontrolną. W trakcie prowadzenia eksperymentu obserwowano

19-krotny wzrost wartości indeksu enzymatycznego w glebie stabilizowanej. Również stwierdzono wzrost średniej wartości indeksu biochemicznego gleby, prawie 5-krotnie wyższy w glebie stabilizowanej, w porównaniu do gleby kontrolnej. Wartość tego indeksu wzrosła 9-krotnie w glebie stabilizowanej pod koniec eksperymentu.

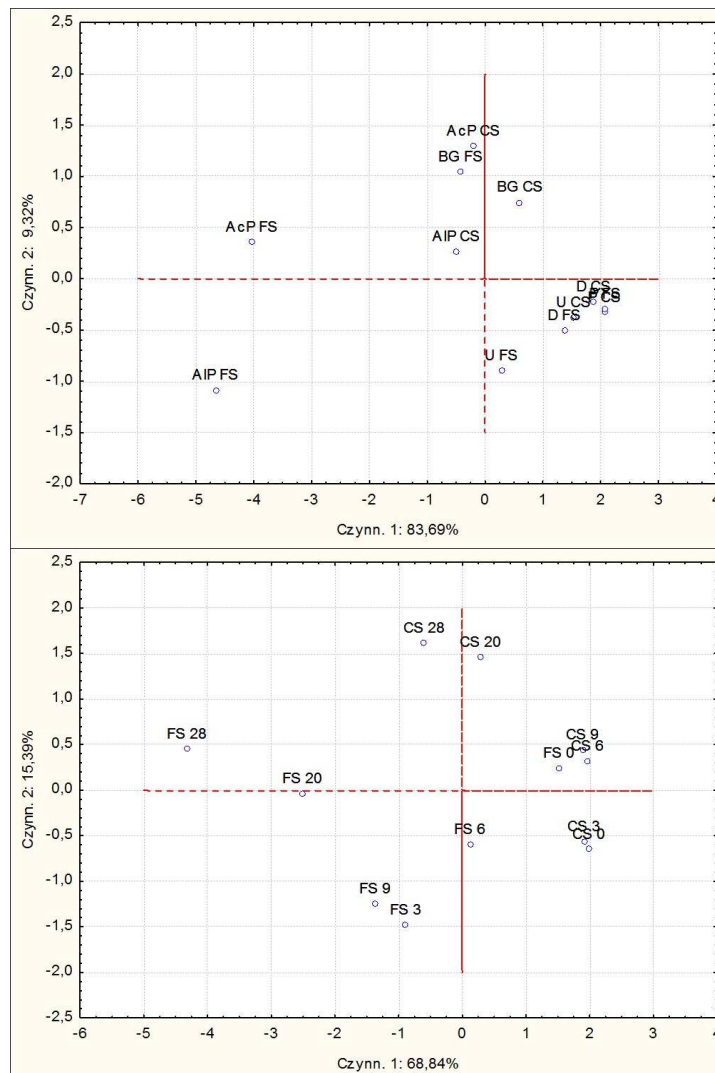


Rys. 33. Zmiany indeksu enzymatycznego i biochemicznej jakości gleby w trakcie monitorowania procesu

#### 5.5.7. Korelacje pomiędzy aktywnością oznaczanych enzymów – analiza głównych składowych (PCA)

Na Rysunku 34 przedstawiono analizę głównych składowych (PCA) aktywności enzymów w glebie kontrolnej i stabilizowanej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono różnice w aktywności enzymatycznej pomiędzy glebą poddaną stabilizacji

i kontrolną w czasie prowadzenia analiz. Wzrost aktywności oznaczanych enzymów w glebie stabilizowanej obserwowano od 6 tygodnia trwania eksperymentu. Natomiast w glebie kontrolnej wzrost aktywności enzymatycznej nastąpił dopiero od 20 tygodnia prowadzenia badań, jednakże była ona znacznie mniejsza w porównaniu z glebą stabilizowaną. W czasie 28 tygodni trwania doświadczenia największy wzrost aktywności w glebie, do której wprowadzono węgiel brunatny i wapno nawozowe, stwierdzono dla fosfomonoesterazy (fosfatazy) kwaśnej i zasadowej a najmniejsze zmiany aktywności w tym czasie zaobserwowano dla dehydrogenaz. W oparciu o wyniki uzyskane w trakcie analizy PCA wytypowano fosfatazy jako najbardziej czułe bioindykatory poprawy jakości gleby skażonej metalami ciężkimi i poddanej wspomaganą fitostabilizacji.



Rys. 34. Analiza głównych składowych (PCA) aktywności enzymów w glebie kontrolnej i stabilizowanej

(CS – gleba kontrolna, FS – gleba stabilizowana, AcP – fosfataza kwaśna, AIP – fosfataza zasadowa, BG-β-glukozydaza, D – dehydrogenaza, U-ureaza, P – proteaza)

#### 5.5.8. Liczba bakterii, promieniowców i grzybów

Różnice w liczbie bakterii heterotroficznych, promieniowców i grzybów przedstawiono na Rysunku 35. Zarówno w glebie kontrolnej, jak i poddanej wspomaganej fitostabilizacji, zaobserwowano wzrost ich liczby w trakcie pierwszego roku (0-28 tygodni) trwania eksperymentu. Na początku trwania eksperymentu liczba bakterii heterotroficznych w glebie stabilizowanej wynosiła  $1,35 \cdot 10^7$  j.t.k/g s.m. gleby i w trakcie pierwszych trzech tygodni spadła o około 60%. W trakcie następnych tygodni liczba bakterii wzrosła, osiągając wartość  $2,82 \cdot 10^8$  j.t.k/g s.m. gleby w 28 tygodniu pomiarów. Na koniec pierwszego roku eksperymentu poletkowego liczba bakterii w glebie poddanej fitostabilizacji wspomaganej wzrosła o 95% w porównaniu do stanu początkowego. Natomiast na koniec pierwszego roku eksperymentu w glebie kontrolnej liczebność bakterii heterotroficznych była o około 60% niższa w porównaniu z glebą poddanej wspomaganej fitostabilizacji. W drugim roku eksperymentu liczbę bakterii heterotroficznych określono na początku (tydzień 58) i na końcu sezonu wegetacyjnego (tydzień 85). Zarówno w glebie kontrolnej jak i poddanej fitostabilizacji zaobserwowano spadek liczby bakterii w porównaniu do pierwszego roku eksperymentu.

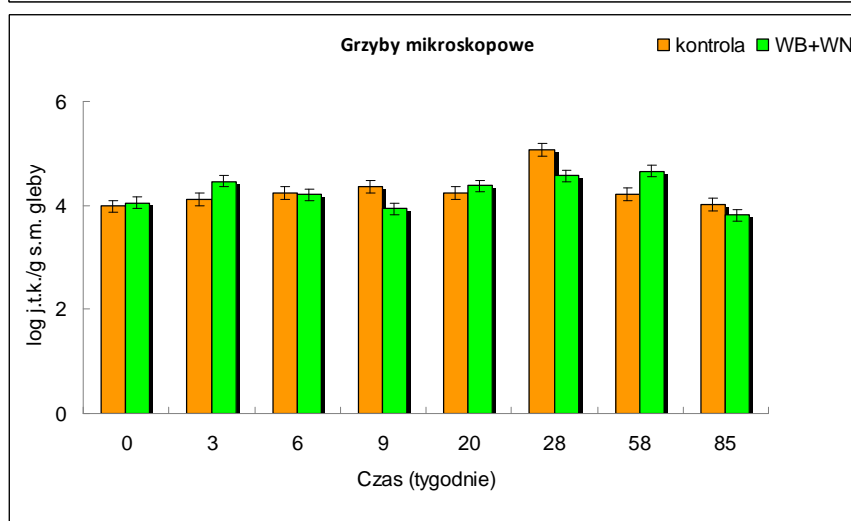
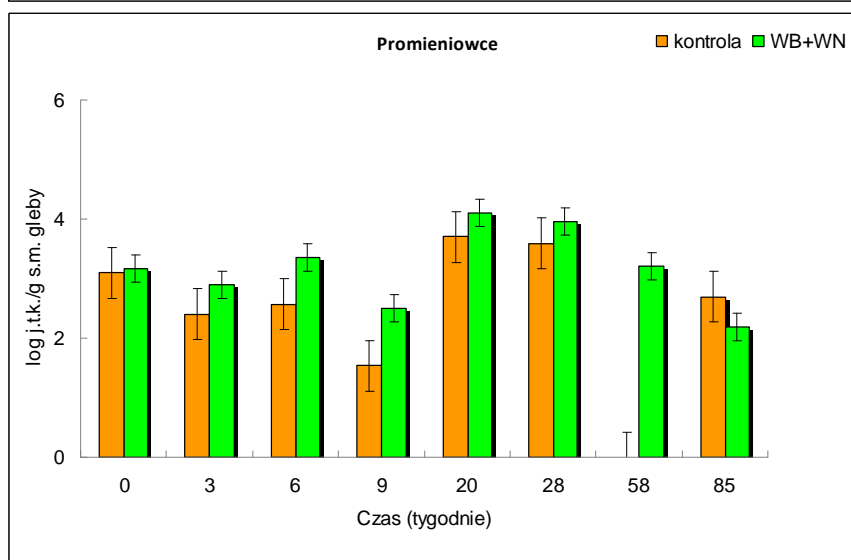
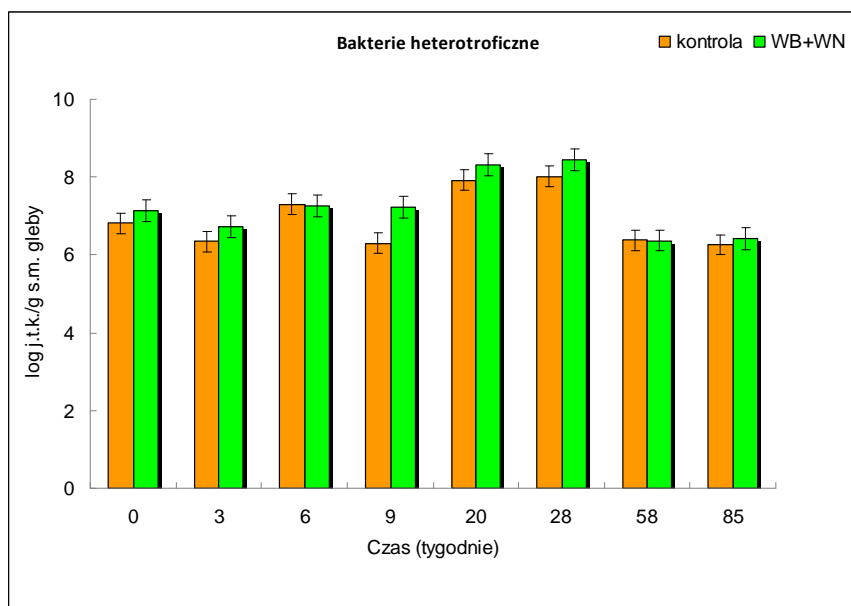
Znaczne różnice zaobserwowano również w liczbie promieniowców. W pierwszych tygodniach badań liczba promieniowców w glebie stabilizowanej spadła z wartości  $1,44 \cdot 10^3$  j.t.k/g s.m. gleby do  $7,69 \cdot 10^2$  j.t.k/g s.m. gleby (około 47%). Jednakże w kolejnych tygodniach obserwowano wzrost ich liczby, aż do  $9,22 \cdot 10^3$  j.t.k/g s.m. gleby w 28 tygodniu badań (wzrost o 89% w porównaniu do początku doświadczenia). W glebie poddanej fitostabilizacji wspomaganej liczba promieniowców była wyższa od 40 do 60% w pierwszym roku prowadzenia doświadczenia. W drugim roku badań, podobnie jak w przypadku bakterii heterotroficznych, stwierdzono spadek liczby promieniowców, zarówno w glebie kontrolnej jak i stabilizowanej.

Trzecią badaną grupą mikroorganizmów były grzyby. Na początku badań liczba grzybów w glebie stabilizowanej wynosiła  $1,13 \cdot 10^4$  j.t.k/g s.m. gleby i wzrosła do  $1,86 \cdot 10^4$  j.t.k/g s.m. gleby w 20 tygodniu badań. Liczba grzybów była na dość niskim poziomie, w porównaniu do liczby bakterii. W 28 tygodniu badań ich liczba wzrosła do  $3,74 \cdot 10^4$  j.t.k/g s.m. gleby w glebie stabilizowanej oraz  $1,16 \cdot 10^5$  j.t.k/g s.m. gleby w glebie kontrolnej. W drugim roku badań zaobserwowano spadek liczby grzybów,



zarówno w glebie kontrolnej ( $1,04 \cdot 10^4$  j.t.k/g s.m. gleby) jak i stabilizowanej ( $6,45 \cdot 10^3$  j.t.k/g s.m. gleby). Liczba grzybów mikroskopowych była wyższa w glebie kontrolnej.

Wspomagana fitostabilizacja wpłynęła w istotny sposób na wzrost liczby mikroorganizmów glebowych takich, jak bakterie heterotroficzne, promieniowce oraz grzyby mikroskopowe w pierwszym roku prowadzenia eksperymentu poletkowego. W drugim roku prowadzenia doświadczeń zaobserwowano spadek liczby badanych mikroorganizmów, zarówno w glebie kontrolnej, jak i stabilizowanej. Bakterie heterotroficzne stanowiły największą i najbardziej aktywną grupę mikroflory w glebie stabilizowanej. Różnice w liczbie mikroorganizmów pomiędzy pierwszym a drugim rokiem prowadzenia eksperymentu najprawdopodobniej były wynikiem zmian pogodowych (temperatura, wilgotność) w okresie poboru próbek gleb. Badania w dalszym ciągu są kontynuowane i przy dłuższym czasie monitorowania procesu będzie łatwiej określić zależności pomiędzy liczbą mikroorganizmów a zmianami pogodowymi.



Rys. 35. Liczba bakterii heterotroficznych, promieniowców i grzybów mikroskopowych w trakcie trwania eksperymentu (n=5, ± BS)

## 6. DYSKUSJA WYNIKÓW

Wykorzystana w doświadczeniach gleba, pochodząca z terenu sąsiadującego ze zlikwidowaną hutą ołowiu i cynku „Waryński” w Piekarach Śląskich, charakteryzowała się bardzo wysokimi stężeniami metali ciężkich (ołów, kadm, cynk) oraz arsenu (Kucharski i wsp., 2005; Gucwa-Przepióra i wsp., 2007; Płaza i wsp., 2010), które znacznie przekraczały poziomy spotykane zarówno w glebach czystych (Kabata-Pendias, 2001), jak i dopuszczalne stężenia dla terenów przemysłowych określone w rozporządzeniu Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby i standardów jakości ziemi (Dz U. 2002, Nr 135, Poz. 1359). W glebie tej stwierdzono następujące przekroczenia dopuszczalnych stężeń: dla ołowiu ponad 12-krotne, kadmu 28-krotne, cynku niemal 10-krotne, arsenu 2-krotne.

W literaturze dostępnych jest szereg danych dotyczących poziomów zanieczyszczeń gleb metalami ciężkimi na obszarach oddziaływania hut ołowiu i cynku. Dla obszaru Polski, oprócz Górnego Śląska (Helios Rybicka, 1996; Ullrich i wsp., 1999, Kucharski i wsp., 2005; Piotrowska-Seget i wsp. 2005, Gucwa-Przepióra i wsp., 2007) dane dotyczące obszarów zanieczyszczonych działalnością hut ołowiu i cynku dotyczą przede wszystkim rejonu Bukowna i Olkusza (Verner i Ramsey, 1996; Łaszczyca i wsp., 2004; Augustyniak i wsp. 2006; Przedpełska i Wierzbicka 2007; Tosza i wsp., 2010).

Na obszarze Górnos Śląskiego Okręgu Przemysłowego, w szczególności w rejonie Piekar Śląskich, Bytomia i Miasteczka Śląskiego stwierdzono znaczne zróżnicowanie stężenia metali ciężkich w warstwie ornej gleby, w zależności od odległości od emitorów zanieczyszczeń, jakimi są huty cynku i ołowiu. Helios-Rybicka (1996) podaje, iż w rejonie Bytomia zanieczyszczenie gleb ołowiem osiąga wartość 2290 mg/kg, kadmem - 85 mg/kg, a cynkiem nawet do 12592 mg/kg. Natomiast w rejonie Tarnowskich Gór, stężenie ołowiu wyniosło do 8200 mg/kg, kadmu 143 mg/kg oraz cynku 13250 mg/kg. Podobne wartości stężeń ołowiu i cynku w glebie na tym terenie przedstawili Kucharski i wsp. (2005) i Gucwa-Przepióra i wsp. (2007). Z kolei w przypadku kadmu całkowite stężenie w glebie było na poziomie 537 mg/kg.

Stwierdzone przez Venera i Ramsey'a (1996) poziomy zanieczyszczeń gleb w rejonie Olkusza i Bukowna wynosiły dla ołowiu od 42 mg/kg do 3570 mg/kg, dla kadmu od 2 do 73,2, dla cynku od 234 mg/kg do 12400 mg/kg, a dla arsenu 25,4 mg/kg

do 133 mg/kg. Natomiast Łaszczyca i wsp. (2004) w warstwie humusowej gleby, pobranej w bezpośrednim sąsiedztwie hut metali nieżelaznych w Olkuszu i Bukownie stwierdzili zanieczyszczenie ołowiem, kadmem i cynkiem odpowiednio na poziomie 2635 mg/kg, 82 mg/kg oraz 10454 mg/kg.

Odczyn jest czynnikiem decydującym o wielu biologicznych i fizykochemicznych procesach zachodzących w glebach. Z fizyko-chemicznego punktu widzenia odczyn gleb jest miarą obecności jonów wodorowych w glebach wyrażoną w jednostkach pH jako ujemny logarytm z ich stężenia w roztworze glebowym. Kształtowanie wartości odczynu gleb związane jest głównie z ich składem mineralogicznym (kwaśnym bądź zasadowym charakterem skał macierzystych), przemianami i zawartością materii organicznej oraz warunkami klimatycznymi decydującymi o wymyciu składników zasadowych. Jako przedział optymalny dla procesów biologicznych, związanych z metabolizmem większości gatunków roślin i mikroorganizmów glebowych przyjmuje się wartości pH od 5,5 do 7,2. Odczyn gleby ma podstawowe znaczenie dla procesów uruchamiania lub immobilizacji pierwiastków śladowych. Mobilność potencjalnie toksycznych metali, takich jak kadm, ołów, nikiel, zmniejsza się wraz ze wzrostem pH gleby na skutek reakcji adsorpcji, okluzji lub wytrącania trudno rozpuszczalnych soli metalu (Siebielec i wsp., 2012).

Zgodne z przyjętą klasyfikacją odczynu, gleba wykorzystana w doświadczeniach charakteryzowała się odczynem lekko kwaśnym (pH 5,6-6,5) lub obojętnym (pH 6,6-7,2). Jak podają Siebielec i wsp. (2012) w województwie śląskim w glebach o podwyższonym udziale pierwiastków toksycznych obserwuje się spadek odczynu gleby, a w połowie analizowanych przez nich profili glebowych obserwowali pH poniżej 5,4. Ullrich i wsp. (1999), w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi, pobranych z okolic Bytomia, stwierdzili odczyn gleby w zakresie od 3,3 do 7,7, przy czym w ponad 70% badanych gleb odczyn kształtował się w zakresie lekko kwaśnym lub obojętnym (pH 6,0-7,4). Podobne wartości odczynu gleby podają również w swoich pracach między innymi Kucharski i wsp. (2005) oraz Płaza i wsp. (2010). Odczyn gleb znajdujących się w rejonie oddziaływania hut ołowiu i cynku w rejonie Olkusza i Bukowna również kształtował się w zakresie przyjętym dla gleb lekko kwaśnych lub obojętnych, i wynosił 7,3 (Przedpeńska i Wierzbicka, 2007) oraz 6,5-7,5 (Łaszczyca i wsp., 2004).

Mimo obojętnego odczynu, badana gleba charakteryzowała się bardzo wysokimi stężeniami biodostępnych form kadmu i cynku (ekstrahowanymi 0,01 M CaCl<sub>2</sub>),

odpowiednio 20% i 5% całkowitej zawartości tych pierwiastków w glebie. Natomiast w badanej glebie biodostępność ołowiu była na bardzo niskim poziomie, około 0,001%. Chłopecka (1996), porównując stężenie frakcji wymiennej kadmu i cynku w glebie zanieczyszczonej z rejonu Tarnowskich Gór ze stężeniami całkowitymi, stwierdziła udział frakcji wymiennej w całkowitej zawartości tych pierwiastków na poziomie odpowiednio 26,8% i 1%. Udział procentowy stężenia frakcji wymiennej ołowiu kształtował się na poziomie 0,001%. Tica i wsp. (2011) stwierdzili w glebie zanieczyszczonej, pochodzącej z terenu przyległego do huty cynku i ołowiu w Austrii, udział frakcji biodostępnych ołowiu, kadmu i cynku odpowiednio na poziomie 1,5%, 33% i 15%. Ruttens i wsp. (2006) podają biodostępność metali ciężkich w glebie zanieczyszczonej na znacznie wyższym poziomie, 2,64% całkowitej zawartości dla ołowiu, 46,5% dla kadmu i 38% dla cynku.

Zawartość form biodostępnych pierwiastków może być różna i nie zależy od całkowitej ich zawartości w glebie zanieczyszczonej. Wielu autorów podkreśla, że ilość form biodostępnych zależy przede wszystkim od odczynu gleby, zawartości materii organicznej, czy też pojemności sorpcyjnej gleby (McBride 1997; Kabata-Pendias i Pendias 2001; Van Gestel 2008).

Charakterystyczną cechą badanej gleby była wysoka zawartość materii organicznej, (od 4,7% do 6,5%), co nie jest częstym zjawiskiem na terenach silnie zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Dane literaturowe podają, iż zawartość materii organicznej w glebach zanieczyszczonych wynosiła maksymalnie do 4% (Chłopecka, 1996; Gray i wsp., 2006; Tica i wsp., 2011). Wysoką zawartość materii organicznej w badanej glebie można tłumaczyć rozkładem obumarłych części roślin, w szczególności śmiałka darniowego i rzeżusznika piaskowego powszechnie występujących na badanym obszarze.

W literaturze szeroko opisywana jest problematyka stabilizacji (ograniczania biodostępności) metali ciężkich w glebach zanieczyszczonych przy pomocy różnych stabilizatorów, nieorganicznych i organicznych. Stosowane są zarówno dodatki w postaci tlenków żelaza, manganu i glinu (Berti i Cunningham, 2000; Davranche i Bollinger, 2000; Cheng i Hseu, 2002; Cornell i Schwertmann, 2003; Grafe i wsp., 2004), naturalne i syntetyczne glinokrzemiany (Garcia-Sanchez i wsp., 2002; Ponizovsky i Tsadilas, 2003; Kumpiene i wsp., 2007; Gupta i Bhattacharyya, 2008; Panuccio i wsp., 2009; Huan-Ping i Shu-Hao, 2012), jak i związki fosforu (Brown i wsp., 2005; Impellitteri, 2005; Scheckel i wsp., 2005; Cao i wsp., 2008).

Wielu autorów podaje, iż dodatek materii organicznej do gleby zanieczyszczonej powoduje obniżenie mobilności pierwiastków toksycznych (Kiikkilä i wsp., 2002, Misra i Chaturvedi, 2007; Tandy i wsp., 2009). Przykładowo, Misra i Chaturvedi (2007) po wprowadzeniu do gleby humusu uzyskali ograniczenie biodostępności metali dla roślin. Ponadto, Van Herwijnen i wsp. (2007) czy Tandy i wsp. (2009) uzyskali bardzo dobrą redukcję biodostępnych form metali po wprowadzeniu do gleby kompostu w dawce od 20% do 30%.

Wprowadzenie materii organicznej w postaci węgla brunatnego powoduje obniżenie biodostępności zanieczyszczeń, na co zwraca uwagę szereg autorów. Karczewska i wsp. (1996) podają, że wprowadzenie do gleby węgla brunatnego i wapna nawozowego powoduje skuteczną immobilizację ołowiu i miedzi w glebie zanieczyszczonej. Natomiast słabą immobilizację badanych pierwiastków uzyskali w wariacie tylko z wprowadzonym węglem brunatnym, postulując, iż związane było to z obniżeniem odczynu gleby. Również Ciećko i wsp. (2001) w glebie sztucznie zanieczyszczonej kadmem, po wprowadzeniu węgla brunatnego i wapna uzyskali obniżenie pobierania tego pierwiastka przez rośliny. Janoš i wsp. (2010) badali wpływ między innymi węgla brunatnego na mobilność kadmu, ołowiu i cynku w glebie zanieczyszczonej, z rejonu oddziaływania hutnictwa metali nieżelaznych. Po wprowadzeniu do gleby węgla brunatnego w ilości 5%, uzyskali obniżenie zawartości ołowiu, kadmu i cynku w glebie odpowiednio 6 %, 20% i 14%. Porównując uzyskane przez nich rezultaty z wynikami badań własnych, po wprowadzeniu węgla brunatnego w ilości 5% do zanieczyszczonej gleby (eksperyment wazonowy, etap I) uzyskano znacznie wyższe ograniczenie mobilności. Jednakże istotnym może być fakt, iż w badanej przez nich glebie całkowita zawartość oraz biodostępność badanych metali ciężkich była znacznie niższa, niż w przypadku gleby z okolic huty „Waryński”. W badaniach nad określeniem ilości wprowadzanego węgla brunatnego skutecznie ograniczającej biodostępne i potencjalnie dostępne formy Pb, Cd, Zn i Cu w glebie zanieczyszczonej w wyniku hutnictwa miedzi stwierdzono, iż najbardziej efektywną dawką jest 5% węgla brunatnego (Pusz, 2007). Autorka podaje, że wprowadzenie węgla brunatnego obniża biodostępność metali w glebie i ich pobieranie przez rośliny. Przy zastosowanej dawce uzyskała ona obniżenie biodostępności ołowiu o 91%, kadmu o 83%, a cynku o 94%. Zastosowana dawka jest wprawdzie o połowę niższa, niż proponowana w niniejszej pracy, jednakże zawartość badanych metali, zwłaszcza kadmu i cynku była znacznie wyższa.

Wyselekcjonowane w trakcie eksperymentu wazonowego dodatki stabilizujące, tj. drobnoziarnista frakcja odpadowa węgla brunatnego i wapno nawozowe, w istotny sposób wpłynęły na obniżenie biodostępności ołowiu, kadmu i cynku w badanej glebie. Biodostępność tych pierwiastków po wprowadzeniu do gleby dodatków stabilizujących obniżyła się w przypadku kadmu dziewięciokrotnie, cynku - ponad czterokrotnie, a ołowiu tylko dwukrotnie.

Obszary silnie zanieczyszczone metalami ciężkimi, głównie ze względu na dużą biodostępność pierwiastków toksycznych są słabo pokryte roślinnością (Kucharski i wsp., 2005). W procesie wspomaganej fitostabilizacji istotnym czynnikiem, warunkującym skuteczność metody, oprócz obniżenia biodostępności zanieczyszczeń w glebie, jest utworzenie na powierzchni gleby zwartej pokrywy roślinnej, która z jednej strony zapobiega pyleniu gleby, a z drugiej, poprzez gęsty system korzeniowy ograniczy migrację zanieczyszczeń w głąb profilu glebowego. Wykorzystana w badaniach kostrzewa trzcinowa (*Festuca arundinacea*) „Asterix” spełniła wszystkie te warunki. Pokrycie powierzchni gleby stabilizowanej sięgało 100%, a rośliny wytworzyły zwarty i gęsty system korzeniowy. Ponadto badany gatunek charakteryzował się kumulacją zanieczyszczeń w korzeniach, przy ich stosunkowo niewielkim wynoszeniu do części nadziemnych. Porównując z poletkiem kontrolnym, na którym pokrycie powierzchni sięgało zaledwie 30%, uzyskano ponad 4-krotnie wyższy przyrost biomasy traw.

W literaturze można odszukać szereg prac, w których w procesie wspomaganej fitostabilizacji wykorzystywane są różne gatunki roślin, przy czym najczęściej są to trawy. Badania obejmowały między innymi życicę trwałą i wielokwiatową (*Lolium perenne* i *L. multiflorum*), kostrzewę czerwoną (*Festuca rubra*), wiechlinę łąkową (*Poa pratensis*), kostrzewę owczą (*Festuca ovina*), kłosówkę wełnistą (*Holcus lanatus*), (Renella i wsp., 2008; Lopareva-Pohu i wsp., 2011; Padmavathiamma i Li, 2012).

Prace dotyczące wykorzystania kostrzewy trzcinowej w kreowaniu pokrywy roślinnej na glebie zanieczyszczonej są mniej liczne (Pierzynski i wsp., 2002, Brown i wsp., 2005; Civeira i Lavado, 2008; Smith i wsp., 2011; Siebielec i Chaney, 2012). Przykładowo, Siebielec i Chaney (2012) wykorzystali kostrzewę trzcinową w remediacji gleby zanieczyszczonej głównie ołowiem (10300 mg/kg), cynkiem (7200 mg/kg) i miedzią (910 mg/kg), pochodzącej z poligonu wojskowego. Spośród szeregu testowanych dodatków doglebowych, jako optymalny zestaw, Autorzy wybrali kompost wprowadzany do gleby w ilości 11,5% wraz z wapnem w ilości 2,5%.

Uzyskane przez nich wyniki, podobnie jak w niniejszej pracy, wskazują na pozytywny wpływ wprowadzenia do gleby materii organicznej wraz z wapnem, zarówno na wzrost kostrzewy trzcinowej, jak i ograniczenie pobierania zanieczyszczeń do części nadziemnych.

Ten sam gatunek trawy był również wykorzystany przez Gray'a i wsp. (2006) do fitostabilizacji gleby zanieczyszczonej ołowiem, kadmem i cynkiem. Jako dodatki doglebowe zastosowali oni superfosfat potrójny wraz z wapnem i uzyskali 55-krotnie wyższy plon kostrzewy w porównaniu z wariantem kontrolnym. Brown i wsp. (2005) stosowali kostrzewę trzcinową na glebie zanieczyszczonej stabilizowanej tylko superfosfatem potrójnym, jednakże nie podają różnic w przyroście biomasy roślin pomiędzy glebą kontrolną i stabilizowaną.

Wartym uwagi jest także fakt, że kostrzewa trzcinowa była stosowana nie tylko w remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi, ale też związkami organicznymi. Przykładowo, Robinson i wsp. (2003) oraz Smith i wsp. (2011) badali przydatność tego gatunku w oczyszczaniu gleb zawierających wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

Mikroorganizmy luminescencyjne są wykorzystywane w kilku rodzajach testów toksykologicznych, między innymi w teście Microtox<sup>®</sup>. Jest to szybki test przesiewowy, wykorzystujący bioluminescencję bakterii *Vibrio fischeri*. Intensywność świecenia odzwierciedla szybkość, z jaką zachodzi złożony ciąg reakcji przemian metabolicznych prowadzących do uzyskania energii. Chemiczna inhibicja jakiegokolwiek enzymu zmienia tę szybkość i w wyniku tego również ilość wyemitowanego światła (Traczewska 2011, Trusz-Zdybek i wsp., 2012). Test Microtox<sup>®</sup> jest stosowny do oceny toksyczności próbek wód, ścieków i odcieków, natomiast odmianą testu Microtox<sup>®</sup> używaną do określania toksyczności próbek stałych, np. gleby czy osadów dennych jest Microtox-SPT<sup>®</sup> (Kołwzan, 2005; Loureiro i wsp., 2005; Płaza i wsp., 2010; Traczewska 2011).

W niniejszej pracy, test Microtox-SPT<sup>®</sup> został wykorzystany do oceny zmian toksyczności gleby poddanej wspomaganej fitostabilizacji. Podczas trwania eksperymentu obserwowano spadek toksyczności zarówno w glebie kontrolnej, jak i stabilizowanej węglem brunatnym i wapnem nawozowym. Średnia wartość TU dla gleby kontrolnej wyniosła 73,56, dla gleby stabilizowanej 9,95, a toksyczność gleby stabilizowanej w ostatnim tygodniu eksperymentu była o około 60% niższa, w porównaniu do tygodnia pierwszego. Zdaniem autora pracy, test ten powinien być



stosowany jako narzędzie wspomagające monitoring procesu remediacji gleby zanieczyszczonej, jednakże jednocześnie z oceną zmian biodostępności zanieczyszczeń w glebie, czy też ich kumulacji w częściach nadziemnych roślin. Loureiro i wsp. (2005) w swoich badaniach stosowali szereg biotestów, między innymi Microtox-SPT<sup>®</sup> do oceny toksyczności gleby zanieczyszczonej. Jak podają, zastosowany test Microtox-SPT<sup>®</sup> okazał się bardziej czuły w ocenie toksyczności gleby w porównaniu z innymi biotestami, np. *Daphnia magna*. Autorzy podkreślają konieczność zastosowania biotestów w ocenie zanieczyszczenia gleby jako uzupełnienia dla metod klasycznych, takich jak analizy chemiczne. Przydatność testu Microtox<sup>®</sup> do oceny toksyczności podkreślają również w swoich badaniach Aelion i Davis (2007). Porównując wyniki analiz chemicznych stężenia arsenu, chromu i ołowiu w glebach pochodzących z obszarów miejskich, z wynikami uzyskanymi przy użyciu testu Microtox<sup>®</sup> stwierdzili w części próbek gleby, pomimo oznaczenia niskich stężeń badanych pierwiastków, wysoką ich toksyczność. Autorzy sugerują, iż w przypadku jednoczesnego niskiego stężenia badanych metali w glebie i wysokiej toksyczności, istnieje prawdopodobieństwo występowania innych substancji toksycznych, które nie zostały oznaczone w analizach chemicznych, w związku z tym przeprowadzenie biotestów w znaczący sposób wspomaga proces oceny jakości gleby. Lors i wsp. (2011) ocenili przydatność szeregu biotestów do oceny toksyczności gleby zanieczyszczonej wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi oraz metalami ciężkimi. W swoich badaniach wykazali, że test Microtox<sup>®</sup> jest przydatny w ocenie toksyczności gleby i stanowi szybkie, a jednocześnie tanie narzędzie w ocenie zanieczyszczenia i efektywności remediacji gleb zanieczyszczonych.

Dopiero w ostatnich latach zaczęły pojawiać się prace, w których do oceny efektywności fitotechnologii, ze szczególnym uwzględnieniem fitostabilizacji wspomaganiej, oprócz parametrów fizyczno-chemicznych, zastosowano również parametry określające właściwości biologiczne gleby. Monitoring mikroorganizmów glebowych oraz ich aktywności stanowi istotne narzędzie w ocenie skuteczności zastosowanego sposobu remediacji, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z badaniami polowymi (Kołwzan, 2005; Mench i wsp., 2006a; Renella i wsp., 2008; Ascher i wsp., 2009; Kumpiene i wsp., 2009; Traczewska, 2011).

W niniejszej pracy do określenia zmian biologicznych właściwości gleby zastosowano ocenę aktywności wybranych enzymów glebowych: dehydrogenazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej, ureazy i proteazy, test API<sup>®</sup>ZYM oraz ogólną liczbę

bakterii heterotroficznych, promieniowców i grzybów. Wyżej wymienione parametry monitorowano zarówno w glebie kontrolnej, jak i stabilizowanej, w trakcie dwuletniego doświadczenia poletkowego. Aktywność dehydrogenazy, fosfatazy kwaśnej i zasadowej oraz ureazy była wyższa w glebie stabilizowanej w porównaniu z wariantem kontrolnym, w trakcie trwania całego eksperymentu, natomiast aktywność proteazy w pierwszym roku prowadzenia badań była wyższa w glebie kontrolnej, podczas gdy w drugim roku zaobserwowano wyższą aktywność tego enzymu w glebie stabilizowanej.

Mench i wsp. (2006) stwierdzili, że w glebie zanieczyszczonej kadmem i niklem, stabilizowanej osadem ściekowym wraz popiołami lotnymi lub żelazem  $Fe^0$ , następuje wzrost aktywności kluczowych enzymów glebowych, takich jak fosfataza kwaśna i zasadowa, proteaza i  $\beta$ -glukozydaza, odpowiednio o 32%, 40%, 11% i 19%, podczas gdy w przypadku aktywności ureazy zaobserwowano spadek o 15%. W badaniach prowadzonych przez Kumpiene i wsp. (2009), na glebie zanieczyszczonej ołowiem i miedzią, a stabilizowanej popiołami lotnymi i torfem, również stwierdzono znaczny wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, zasadowej, ureazy oraz proteazy. Autorzy podają, że wzrost aktywności enzymatycznej gleby może być związany zarówno ze zwiększonym wydzielaniem enzymów przez system korzeniowy roślin, jak i zwiększeniem ich syntezy przez mikroorganizmy glebowe. Renella i wsp. (2008), potwierdzającą pozytywny wpływ wspomaganą fitostabilizacji na aktywność biologiczną gleby. W glebie zanieczyszczonej głównie arsenem, stabilizowanej kompostem i popiołami lotnymi, autorzy stwierdzili zwiększenie aktywności fosfatazy zasadowej, ureazy oraz  $\beta$ -glukozydazy, podczas gdy nie zaobserwowali różnic w aktywności fosfatazy kwaśnej, w porównaniu z glebą kontrolną. Wyniki aktywności enzymatycznej gleby przedstawione w niniejszej pracy potwierdzają doniesienia literaturowe, a wyższa aktywność enzymów w glebie stabilizowanej (dehydrogenazy i ureazy o 57%, fosfatazy kwaśnej o 25%, fosfatazy zasadowej o 40%, proteazy o 80%) świadczy o pozytywnym wpływie zastosowanej metody fitostabilizacji na parametry biologiczne gleby.

Porównanie aktywności enzymów w glebie kontrolnej i stabilizowanej za pomocą testu API<sup>®</sup>ZYM również wykazało pozytywny wpływ wspomaganą stabilizacji na biologiczną jakość gleby. Pod koniec drugiego sezonu badań 8 enzymów wykazało aktywność w glebie stabilizowanej, podczas gdy w glebie kontrolnej 6 enzymów było aktywnych. W glebie kontrolnej i stabilizowanej oznaczono aktywność fosfatazy

alkalicznej, esterazy, esterazy lipazy, arylamidazy leucyny, fosfatazy kwaśnej i fosfohydrolazy naftylo-AS-BI. Ponadto w glebie stabilizowanej stwierdzono aktywność  $\beta$ -galaktozydazy i  $\beta$ -glukozydazy. Aktywność arylamidazy leucyny, fosfatazy kwaśnej i fosfohydrolazy naftylo-AS-BI była wyższa w glebie stabilizowanej. W dostępnej literaturze nie udało się odszukać prac, w których test API<sup>®</sup>ZYM byłyby wykorzystywane do oceny aktywności enzymatycznej w remediacji gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi, za wyjątkiem jednej pracy Wasilkowskiego i wsp. (2012). Natomiast Pasternak i wsp. (2008) zastosowali ten test do oceny gleb zanieczyszczonych trinitrotoluenem i innymi związkami nitroaromatycznymi.

Istotnym parametrem charakteryzującym biologiczną jakość gleby jest również liczba mikroorganizmów glebowych. W niniejszej pracy po wprowadzeniu do gleby dodatków stabilizujących w postaci węgla brunatnego i wapna nawozowego obserwowano znaczny wzrost liczby bakterii, promieniowców i grzybów, szczególnie w pierwszym roku prowadzenia badań. Stwierdzono, iż w glebie kontrolnej, liczba bakterii była niższa o 60%, promieniowców od 40 do 60%, a grzybów o 70%. W drugim roku badań stwierdzono spadek liczebności mikroorganizmów glebowych, co było najprawdopodobniej spowodowane warunkami pogodowymi (temperatura, wilgotność) w okresie poboru próbek gleby.

Wzrost liczby mikroorganizmów w glebach stabilizowanych różnymi dodatkami obniżającymi biodostępność zanieczyszczeń jest przedstawiany przez kilku autorów. Przykładowo, Renella i wsp. (2008) wykazali, iż wprowadzenie do gleby zanieczyszczonej kompostu jako dodatku stabilizującego spowodowało wzrost liczby bakterii i grzybów, w porównaniu z glebą kontrolną. Podobną zależność w swoich badaniach zaobserwowali Seaker i Sopper (1988) czy też Baker i wsp. (2011). Pozytywny wpływ wprowadzenia kompostu wraz z węglanem wapnia na zwiększenie biomasy organizmów glebowych został stwierdzony przez Alburquerque i wsp. (2011). Autorzy udowodnili iż istotnymi czynnikami wpływającymi na wzrost liczby mikroorganizmów glebowych były zwiększenie zawartości materii organicznej, podwyższenie odczynu gleby oraz ograniczenie biodostępności metali ciężkich. Podobne zależności zostały wykazane przez Kumpiene i wsp. (2009), gdzie wzrost liczby mikroorganizmów obserwowano w glebie stabilizowanej popiołami lotnymi i torfem oraz przez Pereza de Mora i wsp. (2005), którzy wykorzystali kompost jako dodatek stabilizujący. Wyniki badań dotyczących liczby mikroorganizmów glebowych uzyskane w niniejszej pracy są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi.

Szczególną uwagę należy jednak zwrócić, podczas prowadzenia badań polowych, na warunki pogodowe, które mogą istotnie wpływać na uzyskane rezultaty.

## 7. WNIOSKI

W pracy przedstawiono fitotechnologię oczyszczania gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi - fitostabilizację wspomaganą z uwzględnieniem aspektów mikrobiologicznych i toksykologicznych. Istotnym wkładem naukowym tej pracy jest opracowanie metodyki implementacji przedstawionej fitostabilizacji wspomaganiej, od badań laboratoryjnych (badania wazonowe), poprzez badania lizymetryczne i badania poletkowe, w skali półtechnicznej.

Tak zaplanowana realizacja poszczególnych etapów pracy umożliwiła osiągnięcie założonego na wstępie celu, udowodnienie postawionej tezy oraz sformułowanie następujących wniosków:

1. Wprowadzenie do gleby zanieczyszczonej, dodatków stabilizujących w postaci drobnoziarnistej frakcji odpadowej węgla brunatnego wraz z wapnem nawozowym w istotny sposób ograniczyło biodostępność metali ciężkich oraz ograniczyło ich przechodzenie do odcieków glebowych.
2. Zastosowanie dodatków doglebowych poprawiło warunki wzrostu kostrzewy trzcinowej i jednocześnie ograniczyło pobieranie metali ciężkich do części nadziemnych. Na powierzchni stabilizowanej gleby wytworzona została zwarta pokrywa roślinna, o gęstym systemie korzeniowym, zabezpieczająca z jednej strony przed pyleniem gleby a z drugiej przed migracją zanieczyszczeń do jej głębszych warstw.
3. Kostrzewa trzcinowa okazała się przydatną rośliną w procesie wspomaganiej fitostabilizacji; zaobserwowano znaczną kumulację metali w korzeniach, co jest istotną cechą roślin stosowanych w tej metodzie.
4. Wprowadzone do gleby stabilizatory dodatkowo zwiększyły kumulację metali w korzeniach trawy, jednocześnie zmniejszając wynoszenie zanieczyszczeń do części nadziemnych.
5. Przeprowadzona analiza toksyczności (Microtox-SPT<sup>®</sup>) wykazała obniżenie toksyczności gleby stabilizowanej w porównaniu do gleby kontrolnej. Test ten może być stosowany jako narzędzie wspomagające monitoring procesu

remediacji gleby zanieczyszczonej, jednakże jednocześnie z oceną zmian biodostępności zanieczyszczeń w glebie czy też ich kumulacji w częściach nadziemnych roślin.

6. Wprowadzenie dodatków stabilizujących do gleby nie zakłóciło jej właściwości biologicznych.
7. Zastosowana metoda wspomaganey fitostabilizacji w znaczący sposób wpłynęła na poprawę biologicznej jakości gleby, poprzez wzrost liczby mikroorganizmów glebowych oraz zwiększenie aktywności enzymatycznej gleby.
8. Monitoring biologicznej jakości gleby (liczba mikroorganizmów glebowych, aktywność enzymatyczna gleby, test API<sup>®</sup>ZYM) stanowi istotne i niezbędne narzędzie w ocenie skuteczności remediacji gleb zanieczyszczonych i powinien być obligatoryjnie stosowany podczas prowadzenia prac remediacyjnych.

## 8. LITERATURA

1. Abollino O., Giacomino A., Malandrino M., Mentasti E., 2008. Interactions of metal ions with montmorillonite and vermiculite. *Applied Clay Science*, 38, str. 227-236.
2. Adamski W., 1993. Nowoczesne technologie rekultywacji skażonych gleb. *Ochrona Środowiska*, 1-2 (48-49), str. 1-17.
3. Aelion C., Davis H., 2007. Use of a general toxicity test to predict heavy metal concentrations in residential soils. *Chemosphere*, 67, str. 1043-1049.
4. Albuquerque J.A., Fuente C., Bernal M.P., 2011. Improvement of soil quality after "alperujo" compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *Journal of Environmental Management*, 92, str. 733-741.
5. Alcorta I., Hernandez-Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu I., Onaindia M., Garbisu C., 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of silos polluted with heavy metals. *Reviews in Environmental Sciences and Biotechnology*, 3, str. 55-70.
6. Alef K., Nannipieri P., 1996. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London.
7. Alloway B.J., 1995. Soil processes and the behaviour of metals. (w:) Alloway B.J. (red.) *Heavy metals in soils*. 2nd ed., Blackie, Glasgow, str. 7-28.
8. Alvarez-Ayuso E., Garcia-Sanchez A., 2003. Sepiolite as a feasible soil additive for the immobilization of cadmium and zinc. *Science of the Total Environment*, 305, str. 1-12.
9. Alvarez-Ayuso E., Garcia-Sanchez A., 2003a. Palygorskite as a feasible amendment to stabilize heavy metal polluted soils. *Environmental Pollution*, 125, str. 337-344.
10. Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Mench M., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G., 2009. Composition, biomass and activity of microflora, and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce, after in situ stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 41, str. 351-359.
11. Augustyniak M., Juchimiuk J., Przybyłowicz W., Mesjasz-Przybyłowicz J., Babczyńska A., Migula P., 2006. Zinc-induced DNA damage and the distribution of metals in the brain of grasshoppers by the comet assay and micro-PIXE. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 144, str. 242-251.
12. Baker L., White P., Pierzynski G., 2011. Changes in microbial properties after manure, lime, and bentonite application to a heavy metal-contaminated mine waste. *Applied Soil Ecology*, 48, str. 1-10.
13. Belviso C., Cavalcante F., Fiore S., 2010. Synthesis of zeolite from Italian coal fly ash: Differences in crystallization temperature using seawater instead of distilled water. *Waste Management*, 30, str. 839-847.

14. Berti W.R., Cunningham S.D., Cooper E.M., 1998. Case studies in the field – in-place inactivation and phytoremediation of Pb-contaminated sites. (W:) Vangronsveld J., and Cunningham S.D. (red.), *Metal-contaminated Soils in situ Inactivation and Phytoremediation*, str. 235–248. Springer-Verlag Berlin Heidelberg and R.G. Landes Company, Georgetown, TX, U.S.A
15. Berti W.R., Cunningham S.D., 2000. Phytostabilization of metals (w:) Raskin I., Ensley, B.D. (red.) *Phytoremediation of toxic metals, using plants to clean up the environment*. John Wiley & sons, INC., New York, str. 71-88.
16. Bes C., Mench M., 2008. Remediation of copper-contaminated topsoils from a wood treatment facility using in situ stabilisation. *Environmental Pollution*, 156, str. 1128-1138.
17. Bhattacharyya K.G., Gupta S.S., 2008. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 140, str 114-131.
18. Bianchi V., Masciandaro G., Giraldo D., Ceccanti B., Iannelli R., 2008. Enhanced heavy metal phytoextraction from marine dredged sediments comparing conventional chelating agents (citric acid and EDTA) with humic substances. *Water Air Soil Pollution*, 193, str 223-233.
19. Blisset R.S., Rowson N.A., 2012. A review of the multi-component utilisation of coal fly ash. *Fuel*, 97, str. 1-23.
20. Bloem J., Breure A.M., 2003. Microbial indicators. In: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. (Eds.), *Bioindicators and Biomonitors. Principles, concepts and applications*. Elsevier Science Ltd, , str. 259-282.
21. Boisson J., Ruttens A., Mench M., Vangronsveld J., 1999. Evaluation of hydroxyapatite as a metal immobilizing soil additive for the remediation of polluted soils. Part 1. Influence of hydroxyapatite on metal exchangeability in soil, plant growth and plant metal accumulation. *Environmental Pollution*, 104, str. 225-233.
22. Bolan, N.S., Adriano, D.C., Mani, P.A., Duraisamy, A., 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. II. Effect of lime addition. *Plant and Soil* 251, str. 187–198.
23. Brown S., Christensen B., Lombi E., McLaughlin M., McGrath S., Colpaert J., Vangronsveld J., 2005. An inter-laboratory study to test the ability of amendments to reduce the availability of Cd, Pb, and Zn in situ. *Environmental Pollution*, 138, str. 34-45.
24. Brzezińska M., Włodarczyk T., 2005. Enzymy wewnątrzkomórkowych przemian redoks (oksydoreduktazy). *Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie* 3, str. 11-26.



25. Cambrolle J, Mateos-Naranjo E., Redondo-Gomez S., Luque T, Figueroa M.E., 2011. The role of two *Spartina* species in phytostabilization and bioaccumulation of Co, Cr, and Ni in the Tinto–Odiel estuary (SW Spain). *Hydrobiologia*, 671, str. 95-103.
26. Calace N. Campisi T., Iacondini A., Leoni M., Petronio B.M., Pietroletti M., 2005. Metal-contaminated soil remediation by means of paper mill sludge addition: chemical and ecotoxicological evaluation. *Environmental Pollution*, 136, str. 485-492.
27. Cao X., Ma L.Q., Singh S.P., Zhou Q., 2008. Phosphate-induced lead immobilization from different lead minerals in soil under varying pH conditions. *Environmental Pollution*, 152, str. 184-192.
28. Cao, X., Ma, L.Q., 2004. Effects of compost and phosphate on plant arsenic accumulation from soils near pressure-treated wood. *Environmental Pollution* 132 (3), str. 435–442.
29. Cao X., Ma L.Q., Rhue D.R., Appel C.S., 2004a. Mechanisms of lead, copper and zinc retention by phosphate rock. *Environmental Pollution*, 131, str. 435-444.
30. Caravaca F., Alguacil M.M., Figueroa D., Barea J.M., Roldan A., 2003. Re-establishment of *Retama Sphaerocarpa* as a target species for reclamation of soil physical and biological properties in semi-arid Mediterranean area. *Forrest ecology management*, 182, str. 49-58.
31. Chen M., Ma L.Q., Singh S.P., Cao R.X., Melamed R., 2003. Field demonstration of in situ immobilization of soil Pb using P amendments. *Advances in Environmental Research* 8 (1), str. 93–102.
32. Chłopecka A., 1996. Assesment of form of Cd, Zn and Pb in contaminated calcareous and gleyed soils in Southwest Poland. *The Science of the Total Environment*, 188, str. 253-262.
33. Chen Z.S., Lee G.J., Liu J.C., 2000. The effects of chemical remediation treatments on the extractability and speciation of cadmium and lead in contaminated soils. *Chemosphere*, 41, str. 235-242.
34. Cheng S, Hseu Z., 2002. In-situ immobilization of cadmium and lead by different amendments in two contaminated soils. *Water, Air nad Soil Pollution*, 140, str. 73-84.
35. Chrysochoou M., Dermatas D., Grubb D.G., 2007. Phosphate application to firing range soils for Pb immobilization: the unclear role of phosphate. *Journal of Hazardous Material*, 144, str. 1-14.
36. Ciećko Z., Wyszowski M., Krajewski W., Zabielska J., 2001. Effect of organic matter and liming on the reduction of cadmium uptake from soil by triticale and spring oilseed rape. *The Science of the Total Environment*, 281, str. 37-45.
37. Civeira G., Lavado R.S., 2008. Nitrate losses, nutrients and heavy metal accumulation from substrates assembled for urban soils reconstruction. *Journal of Environmnetal Management*, 88, str. 1619-1623.

38. Cook S.R., Parker A., 2005. Sequential extraction and single – step cold – acid extraction, A feasibility study for use with freshwater – canal sediments. *Water, Air and Soil Pollution*, 170, str. 95–105.
39. Corami A, Mignardi S., Ferrini V., 2007. Copper and zinc decontamination from single- and binary-metal solution using hydroxyapatite. *Journal of Hazardous materials*, 146, str. 164-170.
40. Cornell R.M., Schwertmann U., 2003. *The iron oxides: structure, properties, reaction, occurrence and uses*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
41. Cunningham S.D., Berti W.R., Huang J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, 13, str. 293-397.
42. Davranche M., Bollinger J-C., 2000. Heavy Metals Desorption from Synthesized and Natural Iron and Manganese Oxyhydroxides: Effect of Reductive Conditions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 227, str. 531-539.
43. Dermont G., Bergeron M., Mercier G., Richer-Lafleche M., 2008. Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications. *Journal of Hazardous Materials*, 152, str. 1-31.
44. Desai C., Pathak H., Madamwar D., 2010. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *BioresourceTechnology*, 101, str 1558-1569.
45. Doran J.W., Martens D.C., 1972. Molybdenum availability as influenced by the application of fly ash to the soil. *Journal of Environmental Quality*, 1, str. 186-189
46. Dorn P.B., Vipond T.E., Salanitro J.P., Wisniewski H.L., 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox®, and plants. *Chemosphere*, 37, str. 845-860.
47. Doskocil L., Pekar M., 2012. Removal of metal ions from multi-component mixture using natural lignite. *Fuel Processing Technology*, 101, str. 29-34.
48. Ebbs S.D., Kochian L.V., 1998. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*) and indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental Science and Technology*, 32, str. 802-806.
49. Flathman P.E., Lanza G.R., 1998. Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *Journal of Soil Contamination*, 7, str. 415- 432.
50. Friesl W., Friedl J., Plater K., Horak O., Gerzabek M.H., 2006. Remediation of contaminated agricultural silos nar. a former Pb/Zn smelter in Austria: Batch, pot and field experiments. *Environmental Pollution*, 144, str. 40-50.

51. Garau G., Castaldi P., Santona L., Deiana P., Melis P., 2007. Influence of red mud, zeolite and lime on heavy metal immobilization, culturable heterotrophic microbial populations and enzyme activities in contaminated soil. *Geoderma*, 142, str. 47-57.
52. Garcia-Sanchez A., Alastuey A., Querol X., 1999. Heavy metals adsorption by different minerals: application to the remediation of polluted soils. *Science of the Total Environment*, 242, str. 179-188.
53. Garcia-Sanchez A., Alvarez-Ayuso E, Rodriguez-Martin F., 2002. Sorption of As(V) by some oxyhydroxides and clay minerals : Application to its immobilisation in two polluted mining soils. *Clay Minerals*, 37, str. 187-194.
54. Geebelen, W., Adriano, D.C., van der Lelie, D., Mench, M., Carleer, R., Clijsters, H., Vangronsveld, J., 2002. Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilisation of lead in soils. *Plant and Soil*, 249, str. 217–228.
55. Gianfreda L., Sannino F., Ortega N., Nannipieri P., 1994. Activity of free and immobilized urease in soil: effects of pesticides. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, str. 777–784.
56. Gorman J.M., Sencidiver J.C., Horvath D.J., Singh R.N., Keefer R.F., 2000. Erodibility of fly ash used as a topsoil substitute in mineland reclamation. *Journal of Environmental Quality*, 29, str. 805-811.
57. Grafe M., Nachtegaal M., Sparks D.L., 2004. Formation of Metal–Arsenate Precipitates at the Goethite–Water Interface. *Environmental Science and Technology*, 38, str. 6561-6570.
58. Gray C.W., Dunham S.J., Dennis P.G., Zhao F.J., McGrath S.P., 2006. Field evaluation of in situ remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. *Environmental Pollution*, 142, str. 530-539.
59. Greene J.C., Bartels C.L., Warren-Hicks W.J., Parkhurst B.R., Linder G.L., Peterson S.A., Miller W.E., 1988. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. EPA/600/3-88/029. U.S.EPA, Corvallis, OR.
60. Gucwa-Przepióra E., Małkowski E., Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Krzyżak J., Kita A., Romkens P., 2007. Effect of chemophytostabilization practices on arbuscular mycorrhiza colonization of *Deschampsia cespitosa* ecotype Waryński at different soil depths. *Environmental Pollution*, 150, 3str. 38-346.
61. Gunawardana B., Singhal N., Johnson A., 2010. Amendments and their combined application for enhanced copper, cadmium, lead uptake by *Lolium perenne*. *Plant Soil*, 329, str. 283-294.
62. Gupta S.S., Bhattacharyya K.G., 2008. Immobilization of Pb(II), Cd(II) and Ni(II) ions on kaolinite and montmorillonite surface from aqueous medium. *Journal of Environmental Management*, 87, str. 46-58.

63. Gupta V.V.S.R., Dick R.P., Coleman D.C., 2008. Functional microbial ecology: Molecular approaches to microbial ecology and microbial habitats. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, str. 1269-1271.
64. Gworek B., Sucharda-Kozera B., 1999. Zeolity – geneza, budowa i podstawowe właściwości fizyczne. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 17, str. 157–169.
65. Hallman J., Berg G., Schulz B., 2006. Isolation procedures for endophytic microorganisms. *Microbial root endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
66. Hamby D.M., 1996. Site remediation techniques supporting environmental restoration activities – a review. *Science of the Total Environment*, 191, str. 203-224.
67. Hamon, R.E., McLaughlin, M.J., Cozens, G., 2002. Mechanisms of attenuation of metal availability in in situ remediation treatments. *Environmental Science & Technology* 36, str. 3991–3996.
68. Harrison E.Z., McBride M.B., Bouldin D.R., 1999. Land application of sewage sludges: an appraisal of the US regulations. *International Journal of Environmental Protection*, 11, str. 1-36.
69. Hartley W., Edwards R., Lepp N.W., 2004. Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soils as evaluated by short- and long-term leaching tests. *Environmental Pollution*, 131, str. 495-504.
70. Hartley W., Lepp N.W., 2004. Remediation of arsenic contaminated soils by iron-oxide application, evaluated in terms of plant productivity, arsenic and phytotoxic metal uptake. *Science of the Total Environment*, 90, str. 35-40.
71. Hartley W., Lepp N.W., 2008. Effect of in situ soil amendments on arsenic uptake in successive harvest of ryegrass (*Lolium perenne* cv Elka) grown in amended As-polluted soils. *Environmental Pollution*, 157, str. 1030-1040
72. Havelcova M. Mizera J., Sykorova I., Pekar M., 2009. Sorption of metal ions on lignite and the derived humic substances. *Journal of Hazardous Materials*, 161, str. 559-564.
73. Helios Rybicka E., 1996. Impact of mining and metallurgical industries on the environment in Poland. *Applied Geochemistry*, 11, str. 3-9.
74. Houba V.J., Van der Lee J.J., Novozamsky I., 1995. Soil analysis procedures, other procedures (Soil and plant analysis Part B). Department of Soil Science and Plant Analysis, Wageningen Agricultural University, 217.
75. Huang-Ping C., Shu-Hao C., 2012. Adsorption characteristics of both cationic and oxyanionic metal ions on hexadecyltrimethylammonium bromide-modified NaY zeolite. *Chemical Engineering Journal*, 193-194, str. 283-289.
76. Hund K., Traunspurger W., 1994. ECTOX-evaluation strategy for soil bioremediation exemplified for a PAH-contaminated site. *Chemosphere*, 29, 371-390.

77. Impellitteri, C.A., 2005. Effects of pH and phosphate on metal distribution with emphasis on As speciation and mobilization in soils from a lead smelting site. *Science of the Total Environment* 345 (1–3), str. 175–190.
78. Jala S., Goyal D., 2006. Fly ash as a soil meliorant for improving crop production – a review. *Bioresource Technology*, 97, str. 1136-1147.
79. Jamil T. S., Ibrahim H.S., El-Maksoud I.H., El-Wakeel S.T., 2010. Application of zeolite prepared from Egyptian kaolin for removal of heavy metals: I. Optimum conditions. *Desalination*, 258, str. 34-40.
80. Janos P., Vavrova J., Herzogova L., Pilarova V., 2010. Effects of inorganic and organic amendments on the mobility (leachability) of heavy metals in contaminated soil: A sequential extraction study. *Geoderma*, 159, str. 335-341.
81. Januszek K., 1999. Aktywność enzymatyczna wybranych gleb leśnych Polski południowej w świetle badań polowych i laboratoryjnych. *Zeszyty Naukowe AR Kraków, Rozprawa* 250.
82. Jarvan M., 2004. Available plant nutrients in growth substrate depending on various lime materials used for neutralising bog peat. *Agricultural Research*, 2, str. 29-37.
83. Juvonen R., Martikainen E., Schultz E., Joutti A., Ahtiainen J., Lehtokaris M., 2000. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, str. 156-166.
84. Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001. Trace elements in soil and plants, 3<sup>rd</sup> edn, CRC Press, Boca Raton, Fl.
85. Karczewska A., 2002. Metale ciężkie w glebach zanieczyszczonych emisjami hut miedzi- formy i rozpuszczalność. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu*, 432, str. 1-159.
86. Karczewska A., 2008. Ochrona gleb i rekultywacja terenów zdegradowanych. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
87. Karczewska A., Chodak T., Kaszubkiewicz J., 1996. The suitability of bron coal as a sorbent for heavy metals in polluted silos. *Applied geochemistry*, 11, str. 343-346.
88. Karczewska A., Kabała C., 2010. Gleby zanieczyszczone metalami ciężkimi i arsenem na Dolnym Śląsku – potrzeby i metody rekultywacji. *Zesz. Nauk. UP Wrocław, Rol.*, XCVI, Nr 576, str. 59-80.
89. Keddy C.J., Greene J.C., Bonnell M.A., 1995. Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, str. 221-251.

90. Kikkila O., Pennanen T, Perkiomaki J., Derome J., Fritze H., 2002. Organic material as a copper immobilizing agent: a microcosm study on remediation. *Basic and Applied Ecology*, 3, str. 245-253.
91. Kim J.-Y., Davis A.P., Kim K.-W., 2003. Stabilization of available arsenic in highly contaminated mine tailings using iron. *ENVIRONMENTAL Science and Technology*, 37, str. 189-195.
92. Knox A. S., Seaman J C, Mench M J, Vangronsveld J., 2001. Remediation of metal- and radionuclides- contaminated soils by in situ stabilization technics. W: *Environmental restoration of metals-contaminated soils*. Iskandar I K (red.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA, str. 21-60.
93. Kołwzan B., 2005. Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną. *Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej. Seria: Monografie*. ISSN 0084-2869. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
94. Kucharski R., Dobrowolski G., Jarosz W., Szduj J., Weisło E., Sas-Nowosielska A., Krasucki W., Lipiński A., 2000. Przygotowanie wariantowych scenariuszy rewitalizacji dla obszaru pilotowego zlokalizowanego na terenie zlikwidowanej huty Waryński w Piekarach Śląskich. Praca niepublikowana, Biblioteka IETU, Katowice.
95. Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E., Japenga J., Kuperberg J.M., Pogrzeba M., Krzyżak J., 2005. The use of indigenous plant species and calcium phosphate for the stabilization of highly metal polluted sites in southern Poland. *Plant and Soil*, 273, str. 291-305.
96. Kumpiene J., 2010. Trace elements immobilization in soil using amendments. W: Hooda (red). *Trace elements in soil*, str 353-379, John Wiley and Sons, Ltd., United Kingdom.
97. Kumpiene J., Ore S., Lagerkvist A., Maurice C., 2007. Stabilization of Pb- and Cu-contaminated soil using coal fly ash and peat. *Environmental Pollution*, 145, str. 365-375.
98. Kumpiene J., Ore S., Renella G., Mench M., Lagerkvist A., Maurice C., 2006. Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper, and arsenic in soil. *Environmental Pollution*, 144, str. 62-69.
99. Kumpiene J., Guerri G., Landi L., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G., 2009. Microbial biomass, respiration and enzyme activities after in situ aided phytostabilization of a Pb- and Cu- contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, str. 115-119.
100. Ledin M., Kranz-Rulcker C., Allard B., 1996. Zn, Cd and Hg accumulation by microorganisms, organic and inorganic soil components in multi-compartment systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 28, str. 791-799.

101. Leupin O.X., Hug S.J., 2005. Oxidation and removal of arsenic (III) from aerated groundwater by filtration through sand and zero-valent iron. *Water Research*, 39, str. 1729-1740.
102. Li Y.M i Chaney L., 1998. Case studies in the field – industrial sites: phytostabilization of zinc smelter-contaminated sites: the Palmerton case. [W:] *Metal-contaminated Soils: in situ Inactivation and Phytorestoration*. Eds. J. Vangronsveld and S D Cunningham. str. 197–210. Springer-Verlag Berlin Heidelberg and R.G. Landes Company, Georgetown, TX, U.S.A.
103. Lombi E., Hamon R.E., Wieshammer G., McLaughlin M.J., McGrath S.P., 2004. Assessment of the use of industrial by-products to remediate a copper- and arsenic-contaminated soil. *Journl of Environmental Quality*, 33, str. 902-910.
104. Lopareva-Pohu A., Pourrut B., Waterlot C., Garcon G., Bidar G., Pruvot C., Shirali P., Douajy F., 2011. Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial Part 1. Influence on soil parameters and metal extractability. *Science of The Total Environment*, 409, str. 647-654.
105. Lors C., Ponge J-F., Aldaya M., Damidot D., 2011. Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils. *Environmental Pollution*, 159, str. 2974-2981.
106. Lothenbach B., Furrer G., Schulin R., 1997. Immobilization of heavy metals by polynuclear aluminium and montmorillonite compounds. *Environmental Science and Technology*, 31, str. 1452-1462.
107. Loureiro S., Ferreira A., Soares A., Nogueira A., 2005. Evaluation of the toxicity of two soils from Jales Mine (Portugal) using aquatic bioassays. *Chemosphere*, 61, str. 168-177.
108. Łaszczycza P., Augustyniak M., Babczyńska A., Bednarska K., Kafel A., Migula P., Wilczek G., Witas I., 2004. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environment International*, 30, str 901-910.
109. Ma Q.Y., Tralna S.J., Logan T.J., 1993. In situ lead immobilization by apatie. *Environmental Science and Technology*, 27, str. 1803-1810.
110. Maciejewska A., 1998. Węgiel brunatny jako źródło substancji organicznej i jego wpływ na właściwości gleb. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
111. Maciejewska A., Kwiatkowska J., 2003. Heavy metals accumulation by plants for soils treated by the brown coal derived preparation. W: *Obieg pierwiastków w przyrodzie*. Red. B. Gworek, J. Misiaka. T. 2. Wyd. Naukowe Gabriel Borowski, Lublin, str. 594-600.

112. Maddocks G., Lin C., McConchie D., 2004. Effect of Bauxsol<sup>TM</sup> and biosolids on soil conditions of acid-generating mine spoil for plant growth. *Environmental Pollution*, 127, str. 157-167.
113. Madejon E., Perez de Mora A., Felipe E., Burgos P., Cabrera F., 2006. Soil amendments reduce trace elements solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution*, 139, str 40-52.
114. Mahabadi A.A., Hajabbasi M.A., Khademi H., Kazemian H., 2007. Soil cadmium stabilization using an uranian natural zeolite. *Geoderma*, 137, str. 388-393.
115. Marchwińska E., Kucharski R., 1990. Stan i prognoza zanieczyszczenia metalami gleb uprawnych województwa katowickiego. *Ochrona Środowiska*, 1, str. 115-124.
116. Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G., 2003. *Bioindicators and Biomonitors. Principles, concepts and applications.* Elsevier Science Ltd.
117. Marmiroli N., McCutcheon S.C., 2003. Making phytoremediation a successful technology. (W:) McCutcheon S., Schnoor J (red.), *Phytoremediation. Transformation and Control of Contaminants.* Jon Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.
118. McBride M.B., Sauve S., Hendershot W., 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant and Soil*, 188, str. 153-159.
119. McBride M.B., 2003. Toxic elements in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Advances in Environmental Research*, 8, str. 5-19.
120. McGowen, S.L., Basta, N.T., Brown, G.O., 2001. Use of diammonium phosphate to reduce heavy metal solubility and transport in smelter-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 30, str. 493–500.
121. Mench M., Bussiere S., Boisson J., Castaing E., Vangronsveld J., Ruttens A., De Koe T., Bleeker P., Assunção A., Manceau A., 2003. Progress in remediation and revegetation of the barren Jales gold mine spoil after in situ treatments. *Plant and Soil*, 249, str. 187-202.
122. Mench M., Vangronsveld J., Beckx C., Ruttens A., 2006. Progress in assisted natural remediation of an arsenic contaminated agricultural soil. *Environmental Pollution*, 144, str. 51-61.
123. Mench M., Renella G., Gelsomino A., Landi L., Nannipieri P., 2006a. Biochemical parameters and bacterial species richness in soils contaminated by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. *Environmental Pollution*, 144, str. 24-31.
124. Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguebel J-P., Gawroński S., Schroder P., Vangronsveld J., 2010. Successes and limitations of phytotechnologies at field scale:



outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments*, 10, str. 1039-1070.

125. Misra V., Chaturvedi K., 2007. Plant uptake/bioavailability of heavy metals from the contaminated soil after treatment with humus soil and hydroxyapatite. *Environmental Monitoring and Assessment*, 133, str. 169-176.

126. Nachtegaal M., Marcus M.A., Sonke J.E., Vangronsveld J., Livi K.J.T., Van Der Leile D., Sparks D.L., 2005. Effects of in situ remediation on the speciation and bioavailability of zinc in a smelter contaminated soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, str. 4649-4664.

127. Nielsen M.N., Winding A., 2002. Microorganisms as indicators of soil health. NERI Technical Report No. 388, Ministry of the Environment, National Environmental Research Institute, Denmark.

128. Nouri J., Khorasani N., Lorestani B., Karami M., Hassani A.H., Yousefi N., 2010. Accumulation of heavy metals in soil and uptake by plant species with phytoremediation potential. *Environmental Earth Sciences*, 59, str. 315-323.

129. Ociepa E., Lach J., Ociepa A., 2011. Wpływ nawożenia gleb węglem brunatnym i preparatami wykonanymi na bazie węgla brunatnego na zmianę rozpuszczalności ołowiu i cynku w glebach. *Nauka Przyroda Technologie*, 41, str. 1-8.

130. O'Reilly S.E., Hochella M.F. Jr., 2003. Lead sorption efficiencies of natural and synthetic Mn and Fe-oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67, str. 4471-4487.

131. Padmavathiamma P., Li L., 2012. Rhizosphere influence and seasonal impact on phytostabilisation of metals - a field study. *Water Air and Soil Pollution*, 223, str. 107-124.

132. Panuccio M.R., Sorgona A., Rizzo M., Cacco G., 2009. Cadmium adsorption on vermiculite, zeolite and pumice: batch experimental studies. *Journal of Environmental Management*, 90, str. 364-374.

133. Pasternak G, Kołwzan B., Rybak J., Płaza G., 2008. Extracellular enzymes Activities as a response to biodegradation of nitroaromatic compounds. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17, str. 455-460.

134. Peijnenburg W., Zablotskaja M., Vijver M.G., 2007. Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67 (2), str. 163-179.

135. Pepper I.L., Gerba C.P., 2004. *Environmental microbiology – a laboratory manual*. Elsevier Academic Press.

136. Perez de Mora A., Julio Ortega-Carvo J., Cabrera F., Madejon E., 2005. Changes in enzyme activities and microbial biomass after “in situ” remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, 28, str. 125-137.

137. Pierzynski, G.M., 1997. Strategies for remediating trace element contaminated sites. (w:) I.K. Iskander i D.C. Adriano (red.), Remediation of Soils Contaminated with metals. Science Reviews, Middlesex, UK, 67-84.
138. Pierzynski G., Lambert M., Hetrick B., Sweeney D., Erickson, L., 2002. Phytostabilization of Metal Mine Tailings Using Tall Fescue. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, Radioactive Waste Management, 6, str. 212–217.
139. Piotrowska-Seget Z., Cycoń M., Kozdrój J., 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. Applied Soil Ecology, 28, str. 237-246.
140. Płaza G., Nałęcz-Jawecki G., Ulfig K., Brigmon R.L., 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. Chemosphere, 59, str. 289-296.
141. Płaza G., Ulfig K., Brigmon R., 2003. Relationship between soil microbial diversity and bioremediation process at an oil refinery. Acta Microbiologica Polonica, 52, str. 173-182.
142. Płaza G., Nałęcz-Jawecki G., Pinyakong O., Illmer P., Margesin R., 2010. Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal and hydrocarbon contaminated sites. Environmental Monitoring and Assessment, 163, str. 477-488.
143. PN-ISO 14255:2001. Jakość gleby. Oznaczanie azotu azotanowego, amonowego i całkowitego azotu rozpuszczalnego w powietrzu suchych glebach z zastosowaniem roztworu chlorku wapnia jako ekstrahenta.
144. PN-R-04023:1996. Analiza chemiczno-rolnicza gleby. Oznaczanie zawartości przyswajalnego fosforu w glebach mineralnych.
145. PN-R-04024:1997. Analiza chemiczno-rolnicza gleby. Oznaczanie zawartości przyswajalnego fosforu, potasu, magnezu i manganu w glebach organicznych.
146. PN-R-04032:1998. Gleby i utwory mineralne. Pobieranie próbek i oznaczanie składu granulometrycznego.
147. Poggio L., Vrscaj B., Schulin R., Hepperle E., Marsan F.A., 2009. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). Environmental Pollution, 157, str. 680-689.
148. Ponizovsky A.A., Tsadilas C.D., 2003. Lead(II) retention by alfisol and clinoptilolite: cation balance and pH effect. Geoderma, 115, str. 303-312.
149. Potter H.A.B., Yong R.N., 1999. Influence of iron-aluminium ratio on the retention of lead and copper by amorphous iron-aluminium oxides. Applied Clay Science, 14, str. 1-26.

150. Pruvot C., Douay F., Herve F., Waterlot C., 2006. Heavy metals in soil, crops and grass as a source of human exposure in the former mining areas. *Journal of Soils and Sediments*, 6(4), str. 215-220.
151. Przedpeńska E., Wierzbicka M., 2007. *Arabidopsis arenosa* (*Brassicaceae*) from a lead–zinc waste heap in southern Poland – a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant and Soil*, 299, str. 43-53.
152. Pusz A., 2007. Influence of brown coal on limit of phytotoxicity of soils contaminated with heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, 149, str. 590-597.
153. Querol X., Alastuey A., Moreno N., Alvarez-Ayuso E., Garcia-Sanchez A., Cama J., Ayora C., Simon M., 2006. Immobilization of heavy metals in polluted soils by the addition of zeolitic material synthesized from coal fly ash. *Chemosphere*, 62, str. 171-180.
154. Quevauviller P., 2002. *Methodologies for Soil and Sediment Fractionation Studies*, str. 1-194, Royal Society of Chemistry, ISBN 978-0-85-404453-5.
155. Raicevic S., Kaludjerovic-Radoicic T., Zouboulis A.I., 2005. In situ stabilization of toxic metals in polluted soils using phosphates: theoretical prediction and experimental verification. *Journal of Hazardous Materials* 117, str. 41–53.
156. Rautaray S.K., Ghosh B.C., Mitra B.N., 2003. Effect of fly ash, organic wastes and chemical fertilizers on yield, nutrient uptake, heavy metal content and residual fertility in a rice–mustard cropping sequence under acid lateritic soils. *Bioresource Technology*, 90, str. 275-283.
157. Rayalu S.S., Udhoji J.S., Munshi K.N., Hasan M.Z., 2001. Highly crystalline Zeolite-A from flyash of bituminous and lignite coal combustion. *Journal of Hazardous Materials*, 88, str. 107-121.
158. Renella G., Landi L., Ascher J., Ceccherini M., Pietramellara G., Mench M., Nannipieri P., 2008. Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environmental Pollution*, 152, str. 702-712.
159. Robinson S.L., Novak J.T., Widdowson M.A., Crosswell S.B., Fetterolf G.J., 2003. Field and laboratory evaluation of the impact of tall fescue on polyaromatic hydrocarbon degradation in an aged creosote-contaminated surface soil. *Journal of Environmental Engineering*, 129, str. 232-240.
160. Ruttens A., Mench M., Colpaert J.V., Boisson J., Carleer R., Vangronsveld J., 2006. Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environmental Pollution*, 144, str. 524-532.
161. Ruttens A., Adriaensen K., Meers E., De Vocht A., Gebelen W., Carleer R., Mench M., Vangronsveld J., 2010. Long-term sustainability of metal immobilization by

soil amendments: Cyclonic ashes versus lime addition, *Environmental Pollution*, 158, str. 1428–1434.

162. Rozporządzenie Ministra Środowiska, 2002. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleb oraz standardów jakości ziem (Dz. U. 2002, Nr 165, Poz. 1359).

163. Sajwan K.S., Paramasivam S., Alva A.K., Adriano D.C., Hooda P.S. 2003., Assessing the feasibility of land application of fly ash, sewage sludge and their mixtures. *Advances in Environmental Research*, 8, str. 77-91.

164. Salanitro J.P., Dorn P.B., Huesemann M.H., Moore K.O., Rhodes I.A., Jackson L.M., Vipond T.E., Western M.M., Wisniewski H.L., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*, 31, str. 1769-1776.

165. Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I., 1995. Phytoremediation: a novel strategy for removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13, str. 468–474.

166. Sas-Nowosielska A., Kucharski R., Kuperberg J.M., Japenga J., Pogrzeba M., Krzyżak J., 2008. Phytoremediation technologies used to reduce environmental threat posed by metal-contaminated soils. *Theory and Reality. NATO Science Conference*, str. 285-297, Wyd. Springer, ISBN 978-1-4020-8845-2

167. Saterbak A., Toy R.J., Wong D.C.L., McMains B.J., Williams M.P., Dorn P.B., Brzuzy L.P., Chai E.Y., Salanitro J.P., 1999. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, str. 1591-1607.

168. Scheckel, K.G., Ryan, J.A., 2005. In vitro formation of pyromorphite via reaction of Pb sources with soft-drink phosphoric acid. *Science of the Total Environment* 302, str. 253–265.

169. Schnoor J.L., 2000. Phytostabilization of metals using hybrid poplar trees. W: Raskin I. i Ensley B.D (red.), *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment*, New York, John Wiley & Sons Inc., str. 133-150.

170. Schwertmann U, Cornell R. M., 2000. Iron oxides in the laboratory; preparation and characterisation. *Villey-VCH Verlag GmbH, Weinheim*.

171. Seaker, E.M., Sopper, W.E., 1988. Municipal sludge for minespoil reclamation: I. Effects on microbial populations and activity. *Journal of Environmental Quality*, 17, str. 591-597.

172. Seoane S., Leiros M.C., 2001. Acidification–neutralization processes in a lignite mine spoil amended with fly ash or limestone. *Journal of Environmental Quality*, 30, str. 1420-1431.

173. Seaman J.C., Arey J.S., Bertsch P.M., 2001. Immobilization of nickel and other metals in contaminated sediments by hydroxyapatite addition. *Journal of Environmental Quality*, 30, str. 460-469.
174. Shams K.M., Tichy G., Fischer A., Sager M., Peer T., Bashar A., Filip K., 2010. Aspects of phytoremediation of chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica*, *Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant Soil*, 328, str. 175-189.
175. Shi, Z., Erickson, L.E., 2001. Mathematical model development and simulation of in situ stabilization in lead-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 87, str. 99-116.
176. Shibata M., Konno T., Akaike R., Xu Y., Shen R., Ma J.F., 2007. Phytoremediation of Pb contaminated soil with polymer-coated EDTA. *Plant Soil*, 290, str. 201-208.
177. Siebielec G., Chaney R., 2012. Testing amendments for remediation of military range contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 108, str. 8-13.
178. Siebielec G., Smreczek B., Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B., Terelak H., Koza P., Hryńczuk B., Łysiak M., Miturski T., Gałązka R., Suszek B., 2012. Monitoring chemizmu gleb ornych w Polsce w latach 2010-2012. Instytut Nawożenia Gleboznawstwa, Państwowy instytut Badawczy w Puławach.
179. Smith M.J., Flowers T.H., Duncan H.J., Saito H., 2011. Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: Comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works. *Journal of Hazardous Materials*, 192, str. 1219-1225.
180. Strategia tematyczna Unii Europejskiej w dziedzinie ochrony gleby, 2006. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0231:FIN:EN:PDF> (dostęp: 08.03.2013).
181. Stuczyński T., Siebielec G., Maliszewska-Kordybach B., Smreczek B., Gawrysiak L., 2004. Wyznaczanie obszarów na których przekraczane są standardy jakości gleb. Poradnik metodyczny dla administracji. Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa, ISBN 83-7217-228-5, str. 1-103.
182. Tabatabai M.A., Bremner J.M., 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1, 301-307.
183. Tandy S., Healer J.R., Nason M.A., Williamson J.C., Jonem D.L., 2009. Remediation of metal polluted mine soil with compost: Co-composting versus incorporation, *Environmental Pollution*, 113, str. 35-40.
184. Tessier A., Campbell P.G., Bisson M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51, str. 844-851.
185. Tica D., Udovic M., Lestan D., 2011. Immobilization of potentially toxic metals using different soil amendments. *Chemosphere*, 85, str. 577-583.

186. Tosza E., Dumnicka E., Niklińska M., Rożen A., 2010. Enchytraeid and earthworm communities along a pollution gradient near Olkusz (southern Poland). *European Journal of Soil Biology*, 46, str. 218-224.
187. Traczewska T., 2011. *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*. ISBN 978-83-7493-597-5, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
188. Trusz-Zdybek A., Szymczycha-Madeja A., Traczewska T., Piekarska K., 2012. Zastosowanie systemu Microtox w bioindykacji próbek środowiskowych. *Kosmos*, 296, str. 417-423.
189. Ullrich S., Ramsey M., Helios-Rybicka E., 1999. Total and exchangeable concentrations of heavy metals in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in Upper Silesia, Poland. *Applied Geochemistry*, 14, str. 187-196.
190. Van Gestel C.A.M., 2008. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of the Total Environment*, 406, str. 385-395.
191. Van Herwijnen R., Hutchings T., Al-Tabbaa A., Moffat A., Johns M., Ouki S., 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. *Environmental Pollution*, 150, str. 347-354.
192. Van Nevel L., Mertens J., Oorts K., Verheyen K., 2007. Phytoextraction of metals from soils: how far is from practise? *Environmental Pollution*, 150, str. 34-40.
193. Vangronsveld J., Van Assche F., Clijsters H., 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution*, 87, str. 51-59.
194. Vangronsveld J., 1998. Case studies in the field-industrial sites: Phytostabilization of zinc-smelter contaminated site: the Lommel-Maathied case. W: *Metal contaminated soil: In situ inactivation and phytorestoration*. Vangronsveld J., Cunningham S. D., (red.), Springer-Verlag, Georgetown, USA, str. 211-216.
195. Vangronsveld J., Cunningham S.D., 1998. Introduction to the concept. (w:) *Metal contaminated soils: in situ inactivation and phytorestoration*. Vangronsveld J., Cunningham S.D., (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and Landes Company, Georgetown, str. 1-15.
196. Verner F., Ramsey M., 1996. Heavy metal contamination of soils around a Pb-Zn smelter in Bukowno, Poland. *Applied Geochemistry*, 11, str. 11-16.
197. Vitkova M., Dercova K., Molnarova J., Tothova L., Polek B., Godocikova J., 2011. The Effect of Lignite and *Comamonas testosteroni* on Pentachlorophenol Biodegradation and Soil Ecotoxicity. *Water Air Soil Pollution*, 218, str. 145-155.
198. Wang W., 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air & Soil Pollution*, 59, 381-400.

199. Wasilkowski D., Krzyżak J., Płaza G., Mroziak A., 2012. Ocena aktywności enzymatycznej w glebie skażonej metalami ciężkimi i poddanej rekultywacji technik fitostabilizacji wspomaganej, przy zastosowaniu testu API<sup>®</sup>ZYM. (W:) Traczewska T. (red.), *Interdyscyplinarne Zagadnienia w Inżynierii i Ochronie Środowiska* 2, str. 509-514.
200. Wu J., West L.J., Steward D.I., 2002. Effect of humin substances on Cu(II) solubility in kaolin-sand soil. *Journal of Hazardous Materials*, 94, str. 223-238.
201. Wu L.H., Luo Y.M., Xing X.R., Christie P., 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 102, str. 307-318.
2002. Wyczółkowski M., Dąbek-Szreniawska A., Enzymy biorące udział w mineralizacji azotu organicznego. *Acta Agrophysica*, 120, str. 37-61
203. Wyszowska J., Wyszowski M., 2003. Effect of cadmium and magnesium on enzymatic activity in soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 473-479.
204. Yousfi I, Bermond A., 2000. Physical-chemical approach to assess the effectiveness of several amendments used for in situ remediation of trace metals-contaminated soils by adding solid phases (W:) Iskander I.K. (red.), *Environmental restoration of metals-contaminated soils*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, str. 3-20.
205. Zaccheo P., Crippa L., Di Muzio Pasta V., 2006. Ammonium nutrition as a strategy for cadmium mobilisation in the rhizosphere of sunflower. *Plant and Soil*, 283, str. 43-56.
206. Zou T., Li T., Zhang X., Yu H., Huang H., 2012. Lead accumulation and phytostabilization potential of dominant plant species growing in a lead-zinc mine tailing. *Environmental Earth Science*, 65, str. 621-630.

Politechnika Wroclawska  
Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska

Jacek Krzyżak

Wspomagana fitostabilizacja metali ciężkich w glebach  
(*tytuł pracy*)

### OŚWIADCZENIE

Wyrażam zgodę (~~nie wyrażam zgody~~)\* na udostępnianie mojej pracy doktorskiej.

Również wyrażam zgodę (~~nie wyrażam zgody~~)\* na opublikowanie mojej pracy doktorskiej za pośrednictwem Internetu na stronach Biblioteki Głównej Politechniki Wrocławskiej.

.....  
(podpis)

Wrocław, dnia 19 marca 2013.

\*niepotrzebne skreślić