



Zachodniopomorski
Uniwersytet
Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Kształtowania
Środowiska i Rolnictwa

Dorota Małgorzata Baszak

**Wykorzystanie aktywności fosfataz w ocenie
oddziaływania wybranych niesteroidowych leków
przeciwzapalnych na środowisko glebowe**

**Use of phosphatase activity in assessing
the effect of selected non-steroidal
anti-inflammatory drugs on the soil environment**

Rozprawa doktorska
wykonana w Katedrze Bioinżynierii
pod kierunkiem
prof. dr. hab. inż. Arkadiusza Telesińskiego

Szczecin 2025

Oświadczam, świadoma odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę dyplomową wykonałam osobiście i samodzielnie i że nie korzystałam ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

.....

podpis autorki pracy

Serdeczne podziękowania dla

prof. dr. hab. inż. Arkadiusza Telesińskiego

*za nieocenione wsparcie, poświęcony czas oraz
merytoryczne doradztwo podczas przygotowania
rozprawy doktorskiej.*

Spis treści

Streszczenie	6
Summary	9
1. Wstęp i cel badań	11
2. Przegląd literatury.....	14
2.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)	14
2.2. Gleba jako twór ożywiony	16
2.3. Aktywność enzymatyczna gleb	19
2.4. Fosfatazy glebowe	22
2.5. Losy NLPZ w środowisku	24
3. Materiał i metody badań	27
3.1. Charakterystyka niesteroidowych leków przeciwzapalnych użytych w badaniach	27
3.2. Charakterystyka gleby wykorzystanej w badaniach	28
3.3. Schemat doświadczenia.....	28
3.3.1. Doświadczenie laboratoryjne.....	29
3.3.2. Doświadczenie wazonowe	29
3.4. Metodyka oznaczania aktywności fosfataz w glebie.....	30
3.4.1. Oznaczanie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej i fosfomonoesterazy zasadowej.....	30
3.4.2. Oznaczanie aktywności fosfotriesteraz	30
3.4.3. Oznaczanie aktywności pirofosfatazy nieorganicznej	30
3.5. Analiza danych	31
4. Wyniki badań.....	33
4.1. Doświadczenie laboratoryjne.....	33
4.1.1. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym	33
4.1.2. Oddziaływanie flurbiprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym	35
4.1.3. Oddziaływanie ketoprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym	38
4.1.4. Oddziaływanie naproksenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym	40
4.1.5. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym	43
4.1.6. Porównanie współczynników oporności fosfataz glebowych na obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu laboratoryjnym.....	46
4.2. Doświadczenie wazonowe	51
4.2.1. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym	51

4.2.2. Oddziaływanie naproksenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym	54
4.2.3. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym	56
4.2.4. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i naproksenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym	58
4.2.5. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym	61
4.2.6. Oddziaływanie mieszaniny naproksenu i diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym	63
4.2.7. Porównanie współczynników oporności fosfataz glebowych na obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu wazonowym	66
5. Dyskusja	70
6. Wnioski i stwierdzenia.....	75
Bibliografia	77
Aneks	88
Spis tabel.....	88
Spis rysunków	89

Streszczenie

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), ze względu na powszechność stosowania stanowią potencjalne ryzyko ekotoksykologiczne. Ponieważ większość tych związków nie jest w pełni usuwana ze ścieków, dostają się one do środowiska. Konieczne jest zatem prowadzenie badań nad zachowaniem się tych substancji w środowisku. Niestety aktualnie najwięcej badań dotyczy środowiska wodnego, z niewielkim uwzględnieniem gleby.

Zawartość w glebie przyswajalnych form fosforu jest jednym z czynników limitujących wzrost i rozwój roślin. Większość fosforu występuje w glebie w połączeniach organicznych, które nie są dostępne dla roślin. Hydroliza organicznych połączeń fosforu katalizowana jest przez fosfatazy.

Dlatego też celem podjętych badań była ocena oddziaływania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku na aktywność fosfataz glebowych: fosfomonoesterazy zasadowej [EC 3.1.3.1], fosfomonoesterazy kwaśnej [EC 3.1.3.2], fosfotriesteraz [EC 3.1.5] oraz pirofosfatazy nieorganicznej [EC 3.6.1.1].

Badania przeprowadzono w dwóch etapach: jako doświadczenie laboratoryjne (ocena długotrwałego oddziaływania NLPZ) oraz jako doświadczenie wazonowe (ocena krótkotrwałego oddziaływania NLPZ). Oba doświadczenia przeprowadzono na próbkach gleby pobranych z poziomu orno-próchniczego gleb rdzawych Rolniczej Stacji Doświadczalnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Był to piasek gliniasty o zawartości węgla organicznego $8,71 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

W doświadczeniu laboratoryjnym do części ziemistych materiału glebowego wprowadzono wszystkie analizowane związki w dawkach: 0(kontrola), 1, 10 i $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. gleby. Wilgotność próbek gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i przechowywano w szczelnie zamkniętych workach poliestrowych w ciemności w temperaturze 20°C . W kolejnych terminach pomiarów, czyli: 1., 30., 60., 90. oraz 120. dniu w próbkach oznaczono aktywność wszystkich fosfataz.

W doświadczeniu wazonowym zastosowano takie same dawki NLPZ, jak w doświadczeniu laboratoryjnym. Jednak w tym etapie badań oceniano wpływ ibuprofenu, naproksenu i diklofenaku wprowadzonych do gleby oddzielnie i w mieszaninach, na aktywność fosfomonoesterazy zasadowej, fosfomonoesterazy kwaśnej i pirofosfatazy nieorganicznej. W przypadku mieszanin leków stosunek masy poszczególnych związków wynosił 1:1. Wilgotność gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Tak przygotowanymi próbkami gleby napełniano doniczki, do których wysiano po 20

identycznych ziarniaków jęczmienia zwyczajnego odmiany 'Suweren' (*Hordeum vulgare* L. cv. Suweren). Przez cały okres doświadczenia utrzymywano stałą wilgotność gleby oraz stałą temperaturę $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Odpowiednio w 1., 7., 14. i 21. dniu doświadczenia pobierano próbki glebowe i oznaczano w nich aktywność wymienionych wcześniej enzymów.

Na podstawie wyników badań obliczono wskaźniki oporności oznaczanych enzymów. Otrzymane wyniki opracowano statystycznie wykorzystując analizę wariancji jednoczynnikową, a także analizę η^2 oraz analizę skupień z aglomeracją Warda i odległością euklidesową.

Na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdzono, że najczęściej obserwowanym efektem oddziaływania NLPZ była inhibicja aktywności fosfataz glebowych. Wprowadzenie do gleby NLPZ w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. gleby bardzo często nie wpływało istotnie na lub spowodowało niewielkie podwyższenie aktywności fosfataz. Natomiast dla dawek 10 oraz $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. gleby najczęściej wykazane obniżenie aktywności fosfataz glebowych zwiększało się wraz ze wzrostem dawki NLPZ. Najbardziej wrażliwymi fosfatazami glebowymi na obecność NLPZ, zarówno w doświadczeniu laboratoryjnym, jak i wazonowym okazały się fosfomonoesteraza zasadowa oraz pirofosfataza nieorganiczna. Trudno jednoznacznie wskazać, który z badanych związków w największym stopniu oddziaływał na aktywność fosfataz glebowych. Można jednak stwierdzić, że w wielu przypadkach największy wpływ na aktywność fosfatazową gleby stwierdzono dla diklofenaku, a najmniejszy dla ibuprofenu. Współczynniki oporności fosfataz glebowych w bardzo dobry sposób zobrazowały zaburzenia w homeostazie gleby pod wpływem NLPZ. Stwierdzone dysfunkcje w metabolizmie związków fosforowych pogłębiały się wraz ze wzrostem dawki leku. Przeprowadzona analiza η^2 wykazała, że czynnikiem doświadczalnym, w największym stopniu wpływającym na aktywność fosfataz glebowych, zarówno w badaniach laboratoryjnych, a także wazonowych, była dawka niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W ocenie krótkotrwałego wpływu NLPZ: ibuprofenu, naproksenu i diklofenaku oraz ich mieszanin, trudno jednoznacznie określić czy wystąpiły synergistyczne, czy antagonistyczne interakcje w oddziaływaniu tych związków na aktywność fosfataz w glebie.

Porównując otrzymane wyniki z danymi literaturowymi należy stwierdzić, że konieczna jest dalsza analiza oddziaływania NLPZ na metabolizm związków fosforowych w glebie, uwzględniająca również możliwości ograniczenia działania tych związków na środowisko glebowe.

Słowa kluczowe: fosfomonoesterazy, fosfotriesterazy, gleba, niesteroidowe leki przeciwzapalne, pirofosfataza nieorganiczna, współczynniki oporności

Summary

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), due to their widespread use, pose a potential ecotoxicological risk. Since most of these compounds are not fully removed from sewage, they enter the environment. It is therefore necessary to conduct research on the behavior of these substances in the environment. Unfortunately, most research currently concerns the aquatic environment, with little consideration of soil.

The content of available forms of phosphorus in the soil is one of the factors limiting the growth and development of plants. Most phosphorus occurs in the soil in organic compounds that are not available to plants. The hydrolysis of organic phosphorus compounds is catalyzed by phosphatases.

Therefore, the aim of the study was to assess the effect of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs: ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproxen and diclofenac on the activity of soil phosphatases: alkaline phosphomonoesterase [EC 3.1.3.1], acid phosphomonoesterase [EC 3.1.3.2], phosphotriesterase [EC 3.1.5] and inorganic pyrophosphatase [EC 3.6.1.1].

The study was conducted in two stages: as a laboratory experiment (assessment of the long-term effect of NSAIDs) and as a pot experiment (assessment of the short-term effect of NSAIDs). Both experiments were carried out on soil samples from the arable-humus horizon of rusty soils of the Agricultural Experimental Station of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin. It was loamy sand with an organic carbon content of 8.71 g·kg⁻¹. In the laboratory experiment, all the analyzed compounds were added into the soil material at doses of: 0 (control), 1, 10 and 100 mg·kg⁻¹ d.m. of soil. The moisture content of the soil samples was adjusted to 60% of the maximum water capacity and stored in tightly closed polyester bags in the dark at 20°C. At the subsequent measurement dates, i.e.: 1, 30, 60, 90 and 120 days, the activity of all phosphatases was determined in the samples.

In the pot experiment, the same doses of NSAIDs were used as in the laboratory experiment. However, at this stage of the study, the effect of ibuprofen, naproxen and diclofenac applied into the soil separately and in mixtures on the activity of alkaline phosphomonoesterase, acid phosphomonoesterase and inorganic pyrophosphatase was assessed. In the case of drug mixtures, the mass ratio of the individual compounds was 1:1. Soil moisture was adjusted to 60% of the maximum water capacity. Pots were filled with soil samples prepared in this way, and then 20 identical grains of common barley cultivar 'Suweren' (*Hordeum vulgare* L. cv. Suweren) were sown into each pot. Constant soil moisture and temperature of 20±2°C were maintained throughout the experiment. Soil

samples were taken on the days: 1, 7, 14 and 21, respectively, and the activity of the previously mentioned enzymes was determined.

Based on the results of the studies, resistance indices of the determined enzymes were calculated. The obtained results were statistically processed using single-factor variance analysis, as well as η^2 analysis and cluster analysis with Ward agglomeration and Euclidean distance.

Based on the conducted studies, it was found that the most frequently observed effect of NSAIDs was the inhibition of soil phosphatase activity. Introduction of NSAIDs to the soil at a dose of 1 mg·kg⁻¹ d.m. soil very often did not significantly affect or caused a slight increase in the activity of phosphatases. On the other hand, for doses of 10 and 100 mg kg⁻¹ d.m. of soil, the most frequently observed decrease in the activity of soil phosphatases increased with the increase in the dose of NSAIDs. The most sensitive soil phosphatases to the presence of NSAIDs, both in the laboratory and pot experiments, were alkaline phosphomonoesterase and inorganic pyrophosphatase. It is difficult to clearly indicate which of the tested compounds had the greatest effect on the activity of soil phosphatases. However, it can be stated that in many cases the greatest effect on the phosphatase activity of soil was found for diclofenac, and the smallest for ibuprofen. The resistance coefficients of soil phosphatases very well demonstrated disturbances in soil homeostasis under the influence of NSAIDs. The observed dysfunctions in the metabolism of phosphorus compounds deepened with the increase in the dose of the drug. The η^2 analysis showed that the experimental factor that had the greatest impact on the activity of soil phosphatases, both in laboratory and pot studies, was the dose of non-steroidal anti-inflammatory drugs. In the assessment of the short-term effect of NSAIDs: ibuprofen, naproxen and diclofenac and their mixtures, it is difficult to clearly determine whether synergistic or antagonistic interactions occurred in the effect of these compounds on the activity of phosphatases in soil.

Comparing the obtained results with literature data, it should be stated that further analysis of the effect of NSAIDs on the metabolism of phosphorus compounds in the soil is necessary, also taking into account the possibilities of limiting the effect of these compounds on the soil environment.

Key words: phosphomonoesterase, phosphotriesterase, soil, Non-steroidal anti-inflammatory drugs, inorganic pyrophosphatase, resistance indices

1. Wstęp i cel badań

Rozwój przemysłu chemicznego jest jednym z głównych czynników postępu cywilizacyjnego, jednocześnie ma on największy udział w degradacji środowiska naturalnego (Paśmionka i Gospodarek 2022). Jedną z gałęzi przemysłu chemicznego są koncerny farmaceutyczne. Ich dynamiczny rozwój, jak również rozwój medycyny umożliwia powstawanie nowych preparatów, których zadaniem jest diagnoza, profilaktyka oraz leczenie szeregu dolegliwości. Jednak nadmierne stosowanie farmaceutyków nie tylko do celów leczniczych doprowadziło do wielu zanieczyszczeń środowiska (Rezka i Balcerzak 2015).

Leki można podzielić na takie, które są stosowane w medycynie oraz w weterynarii. Preparaty stosowane do leczenia ludzi w większości przedostają się do środowiska przez niepoprawne zabezpieczanie przydomowych szamb. Większość przeterminowanych farmaceutyków wraz z odpadami i ze ściekami dostaje się do środowiska. Leki stosowane w weterynarii bardzo często dodawane są do pasz zwierzęcych. Preparaty niewchłonięte przez organizmy zwierzęce wydalane są wraz z odchodami, a następnie są rozprowadzane w postaci obornika na glebach. Są to tylko nieliczne przykłady zastosowania oraz przedostawania się środków farmaceutycznych do środowiska (Żur i in. 2016).

Jednym z rodzajów stosowanych środków farmaceutycznych są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Jest to zróżnicowana grupa aktywnych biologicznie substancji o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwgorączkowych oraz przeciwbólowych. Do najczęściej stosowanych NLPZ zalicza się ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproksen oraz diklofenak. Ilość tych preparatów w środowisku glebowym jest szczególnie istotna, ponieważ gleba jest jednym z ważniejszych elementów środowiska przyrodniczego. Jest ona miejscem, w którym występują czynniki abiotyczne i biotyczne, mające na celu kształtowanie składu, właściwości oraz liczebności mikroorganizmów. W związku z tym zanieczyszczenia środowiska związane z działalnością człowieka mogą prowadzić do nieodwracalnych zmian w środowisku glebowym (Rydzyński 2016). Nagromadzenie się w glebie różnego rodzaju substancji pochodzących z farmaceutyków może mieć wpływ na zmianę w składzie mikroflory, a także może zakłócać homeostazę mikroorganizmów. Wynikiem tego mogą być zaburzenia w procesach przemiany pierwiastków biogennych takich jak węgiel, fosfor i azot. Znaczne zanieczyszczenie środowiska pozostałościami substancji farmaceutycznych może prowadzić również do zahamowania procesu samooczyszczania zbiorowisk wodnych oraz gleby. Nadmierna ilość leków w środowisku

może także doprowadzić do powstania zjawiska lekooporności. Oznacza to, że mikroorganizmy uodparniają się na działanie farmaceutyków (Wydro i in. 2016).

Aktualnie ciągle poszukuje się markerów zmian w środowisku glebowym wywołanych różnymi ksenobiotykami. Jest to na tyle istotne, że gleba jest układem heterogenicznym, w którym stale zachodzą przemiany mikrobiologiczne i biochemiczne, kształtującej jej żyzność i produktywność. Jednym z najlepszych indykatorów zmian w środowisku glebowym jest aktywność enzymatyczna (Lee i in. 2020). Enzymy glebowe to naturalne katalizatory przemian biochemicznych zachodzących w glebie, związanych z rozkładem substancji organicznej. Uczestniczą one zatem w procesach uwalniania i udostępniania organizmom roślinnym różnych składników mineralnych. Aktywność enzymatyczna jest wczesnym wskaźnikiem zmian poziomu intensywności procesów życiowych oraz poziomu degradacji, a także zazwyczaj jest skorelowana z właściwościami fizycznymi i chemicznymi gleby (Lemanowicz i Bartkowiak 2015).

Ze względu na niewielką rozpuszczalność naturalnie występujących związków fosforu, dostępność tego pierwiastka dla organizmów żywych jest niewielka. Ponadto nawet 50% jego zawartości w glebie stanowią połączenia organiczne. Na tę ilość mają wpływ liczne czynniki środowiskowe, zarówno naturalne, jak i antropogeniczne. Dostępność dla roślin fosforu występującego w połączeniach organicznych zależy od tempa mineralizacji, a nie od ogólnej zawartości tych związków (Bielińska 2005). Kluczową rolę w procesie biochemicznej mineralizacji organicznych połączeń fosforu odgrywają fosfatazy, które mogą być dobrym wskaźnikiem potencjału mineralizacji fosforu organicznego oraz aktywności biologicznej, a co za tym idzie markerem oddziaływania czynników stresowych na środowisko glebowe.

Dlatego też celem niniejszej rozprawy doktorskiej była próba znalezienia odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy i w jaki sposób obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych oddziałuje na aktywność fosfataz glebowych?
2. W jaki sposób poziom skażenia gleby niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi wpływa na zmiany aktywności fosfatazowej gleby?
3. Który z analizowanych leków przeciwzapalnych: ibuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, naproksen, diklofenak w największym stopniu oddziałuje na aktywność fosfataz glebowych?
4. Czy istnieją różnice w reakcji różnych fosfataz: fosfomonoesterazy kwaśnej, fosfomonoesterazy zasadowej, fosfotriesteraz, pirofosfatazy nieorganicznej na obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych?

5. Czy występują synergistyczne lub antagonistyczne interakcje pomiędzy oddziaływaniem niesteroidowych leków przeciwzapalnych na aktywność fosfataz w glebie?
6. Który z analizowanych czynników doświadczalnych: dawka leku, rodzaj leku, czas ekspozycji w największym stopniu wpływa na aktywność fosfataz glebowych?
7. Czy na podstawie aktywności fosfataz, można stwierdzić, że obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych zaburza homeostazę środowiska glebowego?

2. Przegląd literatury

2.1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to grupa leków przeciwbólowych, przeciwzapalnych i przeciwgorączkowych. Nazywane są niesteroidowymi ze względu na swoją budowę chemiczną, inną niż kortykosteroidy oraz inne leki przeciwzapalne (Buer 2014). Produkty farmaceutyczne z tej grupy są zróżnicowane zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i zastosowania. NLPZ można podzielić na pochodne kwasu salicylowego, arylopropionowego, arylooctowego, *p*-aminofenolowego oraz pirazolonu (Gacki 2015).

Obecnie ze względu na swoje działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwgorączkowe NLPZ należą do najczęściej stosowanych leków (Bacsi i in. 2016). Niesteroidowe leki przeciwzapalne charakteryzuje również fakt, że dostępne są na rynku bez recepty, co skutkuje coraz częstszym stosowaniem tych środków farmaceutycznych (Koszowska i in. 2015). Obecnie leki tego typu sprzedawane są nie tylko w aptekach, ale również w osiedlowych sklepach, na stacjach benzynowych oraz w supermarketach. Ich ogólnodostępność i powszechne stosowanie zarówno w medycynie, jak i weterynarii prowadzi do zanieczyszczeń środowiska naturalnego. Najczęściej stosowane NLPZ to naproksen, diklofenak, ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, piroksykam oraz kwas acetylosalicylowy (Woroń i in. 2011).

NLPZ to substancje chemiczne, biologicznie aktywne, modyfikujące procesy biochemiczne zachodzące w organizmach zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych (Guzik i in. 2013). Podstawowy mechanizm działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych opiera się na hamowaniu dwóch enzymów cyklooksygenazy (COX), które są kluczowe w syntezie prostaglandyn odpowiedzialnych za stan zapalny, ból i gorączkę (Batucan i in. 2022). Można wyróżnić dwie izoformy cyklooksygenazy – konstytutywna (COX-1) oraz indukowana (COX-2). Pierwsza z nich występuje w organizmie w warunkach normalnych (błona śluzowa żołądka, płytki krwi, nerki oraz śródbłonek). Cyklooksygenaza indukowana (COX-2) pojawia się w odpowiedzi na stany zapalne. Jednakże COX-2 występuje również w organizmie w warunkach fizjologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym, komórkach kanalików nerwowych układu rozrodczego, śródbłonek oraz oskrzeli (Woroń i in. 2011).

Pod względem ekotoksykologicznym niesteroidowe leki przeciwzapalne zaliczane są do grupy związków biologicznie aktywnych pochodzenia antropogenicznego –

ksenobiotyków. W literaturze zwane są jako *Pharmaceuticals and Personal Care Products* (PPCPs) (Koszkowska i in. 2015).

Preparaty farmaceutyczne ulegają w organizmie licznym przemianom chemicznym oraz strukturalnym, przez co mogą być wydalone do środowiska w postaci niezmienionej jak i w postaci metabolitów (Koszkowska i in. 2015).

Niesteroidowe leki przeciwzapalne dostają się do środowiska z różnych źródeł, takich jak: ścieki komunalne z gospodarstw domowych, przychodni, szpitali oraz lecznic weterynaryjnych, ale również z fabryk produkujących farmaceutyki (Harshkova i Aksmann 2019). Diklofenak i ibuprofen mają zdolność do biodegradacji, lecz nie są w pełni eliminowane podczas nowoczesnego oczyszczania ścieków. Określa się je jako „pseudotrwałe”, ponieważ ich regularne stosowanie powoduje, że ciągle trafiają do środowisk odbiorczych (Batucan i in. 2022).

Właściwości fizykochemiczne wielu farmaceutycznych substancji czynnych sprawiają, że trudności w ich usunięciu za pomocą konwencjonalnych procesów uzdatniania wody, prowadzą do ich obecności w wodzie pitnej. Niewystarczająca eliminacja NLPZ z oczyszczalni ścieków stwarza potencjalne zagrożenie dla organizmów wodnych oraz zdrowia publicznego (Ebele i in. 2017). Większość oczyszczalni ścieków korzysta z metod biologicznych, fizycznych oraz chemicznych, jednak skuteczność usuwania tego typu zanieczyszczeń uzależniona jest w głównej mierze od zastosowanego procesu, charakteru zanieczyszczeń, jak i wpływu czynników zewnętrznych (Harshkova i Aksmann 2019).

NLPZ mogą również przenikać do gleby w wyniku odprowadzania oczyszczonych ścieków do zbiorników wodnych, ponowne wykorzystanie wody do nawadniania, stosowania osadów ściekowych jako nawozu oraz używanie obornika na terenach rolnych. Składniki aktywne niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykazują dużą mobilność, co umożliwia im szybkie przemieszczanie się przez glebę i dotarcie do wód gruntowych. Inne składniki natomiast są silnie adsorbowane na cząstkach gleby i pozostają tam przez dłuższy czas. Wiele procesów, takich jak hydroliza, biodegradacja, adsorpcja i bioakumulacja, wpływa na złożoność losu pozostałości NLPZ w glebie. Istotne są także warunki oksydoredukcyjne gleby oraz zawartość materii organicznej, które mogą mieć znaczący wpływ na ich transport (Kovacs i in. 2024).

Nieprawidłowa utylizacja przeterminowanych lub niewykorzystanych leków np. poprzez wyrzucanie ich do kosza lub spłukiwanie w toalecie, również przyczynia się do obecności NLPZ w środowisku (Pawłowska i in. 2021). Farmaceutyki, choć zwykle występują w środowisku w śladowych ilościach mogą stanowić zagrożenie w przypadku długotrwałej

ekspozycji, szczególnie we wrażliwych okresach życia, takich jak rozwój płodu czy wczesne dzieciństwo (Batucan i in. 2022).

Niesteroidowe leki przeciwzapalne mogą być adsorbowane na cząstkach gleby lub osadu dennego, co prowadzi do ich akumulacji i powolnego uwalniania do ekosystemu. Stosowanie osadów ściekowych w rolnictwie sprzyja rozprzestrzenianiu tych związków w środowisku, a to z kolei powoduje ich wchłanianie przez rośliny. Rośliny mogą gromadzić NLPZ w swoich tkankach, co w zależności od gatunku, rodzaju leku, stężenia, czasu ekspozycji i etapu rozwoju, może powodować stres oksydacyjny. Następnie rośliny te są konsumowane przez zwierzęta i ludzi, co może prowadzić do potencjalnych skutków zdrowotnych (Pawłowska i in. 2023). Również korzystanie z wody zanieczyszczonej pozostałościami farmaceutyków zaburza równowagę w organizmie, a co za tym idzie poszerza zjawisko lekooporności (Wydro i in. 2016).

Mimo tego, że wiadomo, iż NLPZ mogą negatywnie oddziaływać na różne aspekty środowiska naturalnego, dokładny mechanizm ich działania, zakres oddziaływania oraz wynikające z tego konsekwencje dla środowiska i ludzi pozostają wciąż niejasne (Pawłowska i in. 2021). W wyniku działania czynników zarówno biotycznych (grzyby i bakterie), jak i abiotycznych (np. promieniowanie słoneczne) NLPZ mogą ulegać przekształceniom w różnego rodzaju pochodne. Znaczącym elementem zanieczyszczeń środowiska są zatem zarówno leki jak i produkty ich przemian. Niejednokrotnie wykazywano jednak, że produkty pośrednie rozkładu NLPZ stanowią większe zagrożenie dla środowiska ze względu na wyższą toksyczność (Harshkova i Aksmann 2019).

2.2. Gleba jako twór ożywiony

Pojęcie "gleba" bywa nieprecyzyjne, ponieważ nie odnosi się do jednorodnego systemu, lecz do zbioru różnorodnych ekosystemów, które razem tworzą złożoną, porowatą warstwę Ziemi (Williamson i in. 2017). Gleba tworzy spoiwo pomiędzy litosferą, biosferą, atmosferą oraz hydrosferą, w związku z czym pełni zasadniczą rolę użytkową oraz ekologiczną (Kabała i in. 2014).

Powstawanie gleby to złożony proces zachodzący w górnych partiach litosfery, będący wynikiem działania różnych czynników glebotwórczych, które prowadzą do formowania i rozwoju gleby. Kluczowym aspektem tych procesów jest przekształcanie pierwotnie nieożywionych minerałów w żyzną glebę. Na przebieg procesów glebotwórczych wpływa wiele elementów, takich jak obecność organizmów, typ skały macierzystej,

uksztaltowanie terenu, warunki hydrologiczne, działalność człowieka oraz czas (Handzel i in. 2017).

Gleba to heterogeniczny system złożony z fazy stałej, ciekłej i gazowej, których proporcje oraz skład mogą znacznie się zmieniać w zależności od miejsca i czasu. Faza stała gleby to mieszanina żwiru, piasku, mułu, łu oraz materii organicznej, czyli związków pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w różnych stadiach rozkładu. Stała część gleby stanowi zwykle około połowę jej objętości, a resztę zajmują przestrzenie porowe, wypełnione cieczami, gazami lub ich kombinacją (Williamson i in. 2017). Trzy fazy gleby pozostają w stałej interakcji, próbując osiągnąć równowagę. Jednak obecność organizmów żywych sprawia, że taka równowaga nie jest możliwa. Wzajemne oddziaływania między tymi fazami mają kluczowe znaczenie dla kształtowania cech gleby (Handzel i in. 2017).

Gleba pełni kluczową rolę w ekosystemach, dostarczając niezbędnych składników odżywczych roślinom oraz organizmom glebowym. Chroni również wody gruntowe i rośliny przed zanieczyszczeniami, ograniczając ich przemieszczanie się. Oprócz funkcji odżywczej, gleba działa jako przestrzeń życiowa dla organizmów i siedlisk roślin, wspomaga produkcję biomasy, pełni rolę filtra i buforu, a także bierze udział w transformacji związków chemicznych oraz regulacji gospodarki wodnej w glebie i krajobrazie, co czyni ją fundamentalnym elementem ekosystemów (Baćmaga i in. 2014, Gavrilescu 2021). Gleby różnią się znacznie pod względem swoich cech genetycznych oraz warunków środowiskowych, jednak w swojej istocie pełnią funkcję zbiorników dla wody i składników odżywczych, które są niezbędne do wzrostu roślin i mikroorganizmów. Jakość gleby można rozumieć jako jej zdolność do efektywnego spełniania specyficznych funkcji, co jest ściśle związane z jej produktywnością oraz trwałością (Lee i in. 2020).

Mikroorganizmy odgrywają kluczową rolę w biogeochemicznych procesach gleby, takich jak obieg węgla, azotu, fosforu, czy żelaza. Stanowią one integralną część gleby i są podstawą jej funkcjonowania, wpływając na mineralizację materii organicznej, dostępność składników odżywczych oraz kształtowanie struktury gleby (Paśmionka i in. 2021). Kluczowe czynniki kształtujące skład mikroorganizmów glebowych to wilgotność gleby, jakość materii organicznej i pH (He i in. 2020). Aktywność drobnoustrojów jest niezbędna do utrzymania żyzności oraz jakości gleby, a także dla realizacji istotnych funkcji ekosystemowych. Procesy te mają znaczenie dla dostarczania zasobów, takich jak żywność, drewno i włókna, oraz dla usług, takich jak regulacja emisji gazów cieplarnianych, sekwestracja węgla, poprawa jakości wody, ochrona przed erozją, eliminacja zanieczyszczeń i tłumienie patogenów.

Dlatego aktywność mikroorganizmów jest kluczowa dla jakości i żyzności gleby (Tecon i Or 2017, Jezierska-Tys i in. 2020).

Zarówno właściwości biochemiczne, jak i mikrobiologiczne gleby reagują bardzo szybko na nawet niewielkie zmiany środowiskowe, takie jak temperatura czy wilgotność (Gałązka i Grządziel 2018). Zmienność kluczowych parametrów, takich jak pH, zawartość węgla organicznego, dostępność składników pokarmowych oraz aktywność biologiczna, wpływa na zdolność gleby do reagowania na zmiany w otoczeniu. Te dynamiczne reakcje bezpośrednio oddziałują na jej funkcjonowanie oraz stabilność ekosystemu, w którym gleba odgrywa istotną rolę (Bielińska i in. 2017).

Jak podaje Futa (2015) wykorzystanie analiz biochemicznych oraz wskaźników chemicznych w monitoringu gleb pozwala na kompleksową ocenę zmian zachodzących w środowisku glebowym pod wpływem czynników antropogenicznych. Ocena jakości gleby jest skomplikowana z powodu jej złożonej struktury oraz zmiennych warunków chemicznych, fizycznych i biologicznych. Kluczowe znaczenie mają zdolności sorpcyjne gleby, które determinują jej pojemność buforową oraz zdolność do zatrzymywania i kumulowania składników odżywczych.

Aby ocenić jakość gleby, można zastosować różnorodne wskaźniki, które umożliwiają monitorowanie zmian w czasie, w tym porównanie z warunkami sprzed wystąpienia zakłóceń. Homeostaza gleby oznacza zrównoważoną interakcję między organizmami a ich środowiskiem w ekosystemie glebowym. Zakłócenia spowodowane negatywnym wpływem zanieczyszczeń mają destrukcyjny wpływ na jakość oraz podstawowe funkcje gleby. Zmiany, które są nieodwracalne i wynikają z zanieczyszczeń, prowadzą do pogorszenia jakości gleby, obniżenia jej produktywności oraz niekorzystnych konsekwencji dla całego ekosystemu. W przypadku, gdy środowisko wykazuje oznaki zanieczyszczenia, niezbędna jest ocena poziomu zanieczyszczeń oraz funkcji, struktury i składu systemu glebowego, co jest kluczowe dla poprawy jakości gleby i procesu jej regeneracji (Lee i in. 2020).

Gleby regenerują się w bardzo powolnym tempie, a negatywne konsekwencje zakłócenia ich równowagi chemicznej i biologicznej często mają długotrwały charakter. Dlatego ochrona gleb powinna być jednym z kluczowych elementów strategii ochrony środowiska (Bielińska i in. 2017). Goździewicz-Biechońska (2018) zwraca uwagę, że gleba jest zasobem nieodnawialnym, gdyż jej formowanie, na przykład w wyniku procesów wietrzenia, może trwać tysiące lat, podczas gdy jej zniszczenie może nastąpić w krótkim czasie, często prowadząc do nieodwracalnych skutków.

2.3. Aktywność enzymatyczna gleb

Aktywność enzymatyczna w glebach odgrywa kluczową rolę w biochemicznych procesach, ponieważ wszystkie te przemiany są związane z obecnością enzymów. Aktywność enzymów jest ściśle powiązana z żyznością gleby, co może wpływać na jej produktywność (Oleszczuk i in. 2014). Ponadto enzymy glebowe pełnią funkcję wskaźnika stabilności oraz jakości środowiska glebowego, reagując na zmiany spowodowane zarówno czynnikami naturalnymi, jak i antropogenicznymi (Woźniak i in. 2024). Ich aktywność odzwierciedla funkcje mikrobiologiczne oraz zmiany zachodzące w glebie (Lee i in. 2020). Analiza aktywności enzymów pozwala również na wczesne wykrywanie subtelnych zmian w środowisku glebowym, zanim wystąpią istotne modyfikacje w składzie chemicznym i właściwościach fizycznych gleby (Bielińska i in. 2017).

Enzymy obecne w glebie są wytwarzane przez organizmy takie jak zwierzęta, rośliny oraz mikroorganizmy, które odgrywają główną rolę w ich wydzielaniu, odzwierciedlając tym samym aktywność biologiczną gleby. Mikroorganizmy syntetyzują głównie zewnątrzkomórkowe enzymy, takie jak β -glukozydaza, ureaza, fosfataza, celulaza, amylaza, chitynaza, oraz inne enzymy zaangażowane w procesy hydrolizy. Natomiast enzymy wewnątrzkomórkowe, jak dehydrogenazy i katalaza, działają bezpośrednio wewnątrz komórek. Enzymy te mają kluczowe znaczenie dla rozkładu związków organicznych, co czyni je wyjątkowo wrażliwymi wskaźnikami zmian aktywności mikrobiologicznej w glebie, reagującymi na różnorodne warunki środowiskowe, takie jak np. susza (Bogati i Walczak 2022).

Według Kaczyńskiej i in. (2015) aktywność enzymatyczna oraz liczebność mikroorganizmów glebowych stanowią najlepsze wskaźniki stabilności i żyzności ekosystemów glebowych, ponieważ reakcje biochemiczne zachodzą w glebie bardzo szybko w odpowiedzi na zmiany środowiskowe. Aktywność enzymatyczna jest więc niezastąpionym narzędziem oceny jakości gleby (Gałązka i in. 2017). Z badań wynika, że enzymy te są efektywnym i wrażliwym wskaźnikiem jakości, co sprawia, że są użyteczne w monitorowaniu cykli biogeochemicznych, degradacji materii organicznej oraz procesów remediacji gleby (Lee i in. 2020).

W kontekście globalnych zmian klimatycznych i zanieczyszczenia gleby, enzymy takie jak oksydoreduktazy (dehydrogenazy, katalaza, oksydaza *p*-difenolowa) oraz hydrolazy (fosfatazy, ureaza, arylosulfataza, β -glukozydaza) odgrywają kluczową rolę w biogeochemicznych cyklach węgla, azotu, fosforu i siarki w glebie (Tomkowiak i in. 2017). Enzymy te pełnią funkcje katalizatorów wielu istotnych procesów glebowych, takich jak:

- wiązanie azotu,
- rozkład substancji organicznej,
- uwalnianie substancji mineralnych dla roślin
- procesy związane z powstawaniem i rozkładem próchnicy glebowej (Błońska 2011).

Tym samym enzymy glebowe, ze względu na swoją stabilność i wrażliwość, stanowią istotne biologiczne wskaźniki jakości gleby, umożliwiając monitorowanie jej funkcjonowania w obliczu zanieczyszczeń i zmian klimatycznych (Lee i in. 2020).

Należy również wskazać, że do kluczowych funkcji enzymów w środowisku należą m.in.:

- wspomaganie procesów przenoszenia protonów, elektronów i tlenu,
- rozbijanie wiązań z udziałem cząsteczek wody lub odłączanie grup od substratów bez jej obecności,
- przeprowadzanie reakcji oksydoredukcyjnych wewnątrz cząsteczek,
- przenoszenie grup chemicznych
- tworzenie nowych wiązań między związkami (Tomkowiak i in. 2017).

Dehydrogenazy pełnią najistotniejszą rolę w transformacji organicznych związków węgla, a ich aktywność służy jako ważny wskaźnik ekotoksykologiczny (Tomkowiak i in. 2017). Katalizują one procesy oksydoredukcyjne i są aktywne wyłącznie wewnątrz żywych komórek (Mocek-Płóćiniak 2010). W przeciwieństwie do innych enzymów, które mogą funkcjonować także po śmierci komórki lub poza jej strukturalnymi granicami, dehydrogenazy są ściśle związane z życiem komórkowym (Bandyopadhyay i Maiti 2021). Ich aktywność wskazuje na obecność fizjologicznie aktywnych drobnoustrojów (Mocek-Płóćiniak 2010). Enzymy te są zlokalizowane w cytoplazmie oraz strukturach cytoplazmatycznych, gdzie odpowiadają za utlenianie substratu w procesach oddechowych (Telesiński i in. 2021).

Pomiar aktywności ureazy jest istotnym narzędziem do oceny stopnia antropogenizacji gleby (Tomkowiak i in. 2017). Ureaza występuje w drobnoustrojach w szczególności w bakteriach oraz w komórkach wielu roślin. Enzym ten odgrywa kluczową rolę w procesie hydrolizy mocznika, przekształcając go w dwutlenek węgla i amoniak. Od pH zależna jest szybkość rozkładu mocznika. W zależności od rodzaju buforu i stężenia substratu optymalna wartość pH dla ureazy wynosi od 6 do 7. Przy zbyt niskiej wartości pH bakterie mocznikowe rozwijają się w znikomych ilościach lub wcale (Mocek-Płóćiniak 2010).

Dodatkowo, ureaza wpływa na dynamikę przemian związków azotu w glebie, co ma istotne znaczenie dla zdrowia ekosystemów glebowych (Tomkowiak i in. 2017).

Proteazy, należące do grupy enzymów trawiennych, wykazując zdolność hydrolizy wiązań peptydowych, odgrywają istotną rolę w przekształcaniu organicznych związków azotu w glebie i są wykorzystywane w ocenie potencjalnego tempa mineralizacji tych związków (Bielińska i in. 2013, Tomkowiak i in. 2017).

Ocenę aktywności enzymatycznej można określać na podstawie ilościowego pomiaru produktów reakcji enzymatycznej, takich jak jony azotanowe, lub przez analizę spadku dostępności substratu, na który dany enzym działa. Istnieje wiele metod służących do oznaczania tej aktywności, w tym:

- metody radiometryczne,
- metody kolorymetryczne,
- metody spektrofotometryczne,
- metody chemiluminescencyjne,
- metody fluorometryczne,
- metody chromatograficzne.

W praktyce najczęściej wykorzystuje się kombinacje technik kolorymetrycznych i spektrofotometrycznych. Metody spektrofotometryczne pozwalają na śledzenie reakcji biochemicznych poprzez pomiar zmian w absorpcji światła przez badany roztwór. W przypadku, gdy światło mieści się w zakresie fal widzialnych, można empirycznie zaobserwować zmiany barwy roztworu, co wskazuje na zastosowanie testu kolorymetrycznego (Furtak i Gajda 2018).

Aktywność enzymatyczna w glebie, w połączeniu z innymi właściwościami biologicznymi i chemicznymi, może dostarczać istotnych informacji na temat reakcji gleby na różnorodne zanieczyszczenia (Borowik i in. 2024). Aktywność enzymatyczna gleb umożliwia najszybsze zaobserwowanie zachodzących zmian w procesach życiowych środowiska. Dzięki swojej stabilności i wrażliwości, enzymy skutecznie ilustrują, czy reakcje biochemiczne w glebie przebiegają prawidłowo (Lee i in. 2020). Liczne badania wskazują, że enzymy z grupy oksydoreduktaz są bardziej wrażliwe na zmiany środowiskowe w porównaniu do hydrolaz. W związku z tym, oksydoreduktazy są wykorzystywane jako główne bioindykatory stanu gleby, natomiast hydrolazy odgrywają rolę enzymów pomocniczych, związanych z cyklami pierwiastków, takich jak węgiel, azot, siarka i fosfor (Borowik in. 2024). Oleszczuk i in. (2014) wskazują, że wysokie wartości aktywności enzymatycznej świadczą

o dobrej jakości gleby, natomiast niskie informują o nieprawidłowym przebiegu procesów biologicznych w glebie. Do badań jakości gleby stosuje się enzymy, które reagują wyraźnie na działanie czynników stresowych.

2.4. Fosfatazy glebowe

Fosfatazy to enzymy z klasy hydrolaz, które mają kluczowy udział w obiegu fosforu (Bielińska 2005). Mikroorganizmy stanowią główne źródło enzymów glebowych, podczas gdy rośliny i inne organizmy mają mniejsze znaczenie w tym kontekście. Aktywność enzymatyczna jest pozytywnie związana z liczebnością oraz strukturą mikroorganizmów. W związku z tym, enzymy glebowe nie tylko odzwierciedlają aktywność biologiczną, ale również pełnią rolę wrażliwych biomarkerów, które mogą być używane do oceny stanu środowiska glebowego (Borowik i in. 2020). Aktywność fosfataz w glebie zależy od liczebności drobnoustrojów oraz od ilości materii organicznej, stosowania nawozów mineralnych i organicznych, rodzaju upraw, a także innych zabiegów rolniczych (Adetunji i in. 2017). Bardzo ważną rolę odgrywają również właściwości gleby, na których zmiany reagują fosfatazy. Są to między innymi temperatura, porowatość gleb, wilgotność oraz właściwości sorpcyjne gleby (Qu i in. 2024). Każdy z tych czynników wpływa na tempo i intensywność przemian enzymatycznych zachodzących w glebie (Gibczyńska i Lewandowska 2005). Stres związany z niedoborem wody może także stymulować aktywność fosfataz. Na przykład w regionach śródziemnomorskich, gdzie dostępność wody zmniejszyła się o 21%, zaobserwowano spadek aktywności fosfatazy o 31-40% (Margalef i in. 2017).

Gleba zawiera zarówno fosfatazy wewnątrzkomórkowe, obecne w żywych komórkach mikroorganizmów, jak i zewnątrzkomórkowe, które pochodzą z wydzielin komórek lub z resztek martwych drobnoustrojów. Ponadto te enzymy mogą być stabilizowane na powierzchni cząstek glebowych, takich jak minerały ilaste oraz tlenki żelaza i glinu. Tego rodzaju frakcja, która jest geochemicznie unieruchomiona, ale jednocześnie aktywna enzymatycznie, przyczynia się do ogólnej aktywności enzymatycznej gleby, nawet w sytuacjach, gdy nie ma żywych organizmów (Margalef i in. 2017).

Działalność fosfataz umożliwia przemiany organicznych związków fosforu w nieorganiczne fosforany, z których bezpośrednio mogą korzystać organizmy glebowe oraz rośliny (Bielińska 2005). Należy jednak zaznaczyć, że jedynie niewielka część fosforu dostępnego w glebie, zaledwie 0,1%, występuje w formie nieorganicznej, co czyni go przyswajalnym dla roślin (Rocabruna i in. 2024).

Wzrost oraz rozwój roślin zależy jest od występowania w glebie rozpuszczalnych w wodzie form fosforu w szczególności jonów fosforanowych (Płatkowski i Telesiński 2015a). W warunkach niedoboru fosforu korzenie roślin i mikroorganizmy intensyfikują wydzielanie fosfatazy, co sprzyja solubilizacji oraz remobilizacji fosforanów, a tym samym poprawia zdolność roślin do radzenia sobie w warunkach stresu fosforowego. Zależność między zapotrzebowaniem na fosfor a wydzielaniem fosfataz przez rośliny i mikroorganizmy sugeruje, że aktywność fosfataz glebowych może być używana jako wskaźnik dostępności nieorganicznego fosforu w glebie (Adetunji i in. 2017).

W cyklu biogeochemicznym fosforu fosfatazy glebowe uwalniają fosfor z materii organicznej, umożliwiając jego ponowne przyswojenie przez organizmy żywe. Proces ten polega na hydrolizie różnych estrów fosforanowych, co prowadzi do powstawania rozpuszczalnych jonów fosforanowych, dostępnych i przyswajalnych dla roślin, wzbogacając tym samym glebę w niezbędne składniki odżywcze (Rocabrana i in. 2024).

Fosfatazy dzielimy w zależności od liczby wiązań estrowych w substracie na:

- fosfomonoesterazy – hydrolazy monoestrów fosforanowych
- fosfodiesterazy – hydrolazy diestrów fosforanowych
- fosfotriesterazy – hydrolazy triestrów fosforanowych (Płatkowski i Telesiński 2015b).

Wśród fosfataz glebowych szczególnie wyróżniają się fosfomonoesterazy, które mają zdolność do działania na związki fosforu o niskiej masie cząsteczkowej. Enzymy te wykazują aktywność w różnych warunkach pH, zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym. Z kolei fosfodiesterazy i fosfotriesterazy, które odgrywają rolę w wczesnych etapach degradacji fosfolipidów oraz kwasów nukleinowych, są mniej poznane i wymagają dalszych badań (Kashirskaya i in. 2020).

Fosfomonoesteraza kwaśna i zasadowa należą do najczęściej analizowanych enzymów w glebie, ponieważ ich aktywność jest szczególnie czuła na zmieniające się warunki środowiskowe, zwłaszcza te spowodowane czynnikami naturalnymi oraz antropogenicznymi. Ich wrażliwość na zmiany pH gleby sprawia, że stanowią one cenne wskaźniki stanu gleby. fosfomonoesteraza kwaśna osiąga najwyższą aktywność w środowisku o pH 4-6, natomiast fosfomonoesteraza alkaliczna funkcjonuje najlepiej w glebach zasadowych, przy pH 8-10 (Wojewódzki i in. 2022). Odczyn gleby istotnie wpływa na tempo syntezy, uwalniania oraz stabilność tych enzymów. Wraz ze wzrostem pH gleby rośnie aktywność fosfomonoesterazy zasadowej, natomiast aktywność fosfomonoesterazy kwaśnej maleje. Z tego względu pomiar aktywności obu typów fosfomonoesteraz może być

użyteczny do określenia optymalnego pH gleby dla rozwoju roślin oraz do oszacowania ilości wapna potrzebnej do jego uzyskania (Adetunji i in. 2017).

Jednak w glebie oprócz wymienionych już enzymów występuje równie ważna pirofosfataza nieroganiczna, która odpowiada za rozkład pirofosforanu do ortofosforanów (Płatkowski i Telesiński 2016a). Enzym ten odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych, wszędzie tam, gdzie konieczna jest regulacja stężenia pirofosforanu. Ma to istotne znaczenie w metabolizmie energetycznym oraz syntezie kwasów nukleinowych i lipidów (Baykov i in. 2021).

W warunkach normalnych gleba pełni funkcję ochronną przed nadmiernym przemieszczaniem związków pochodzenia antropogenicznego do roślin oraz wód gruntowych (Hawrot i Nowak 2004). Pestycydy, metale ciężkie czy też zanieczyszczenia ropopochodne mogą mieć negatywny wpływ na procesy biochemiczne w ekosystemie glebowym, przez co zmniejsza się aktywność enzymów (Wyszkowska 2004). Zmiany w aktywności fosfataz mogą sygnalizować zakłócenia w cyklu związków fosforowych w glebie, co stanowi istotny problem, gdyż cykl biogeochemiczny fosforu jest szczególnie wrażliwy na wpływy działalności antropogenicznej. Dodatkowo, wahania stężenia tego pierwiastka w glebie mają znaczący wpływ na aktywność mikrobiologiczną oraz biochemiczną gleby (Telesiński i in. 2018). Wspomniane zanieczyszczenia zakłócają aktywność metaboliczną gleb, ograniczają ich ochronną rolę, zmniejszają żyzność, a co za tym idzie negatywnie wpływają na produkcję roślinną (Hawrot i Nowak 2004).

2.5. Losy NLPZ w środowisku

Farmaceutyki wykryto po raz pierwszy w środowisku wodnym pod koniec lat siedemdziesiątych XX wieku. Świadczy to o tym, że obecne procesy oczyszczania ścieków nie są skuteczne w stosunku do tych związków (Cunha i in. 2017). Narastające zainteresowanie oraz popyt na produkty farmaceutyczne zmusza przemysł do sprostania oczekiwaniom konsumentów, tworząc coraz to nowsze i skuteczniejsze aktywne substancje farmaceutyczne, które są bardziej odporne na degradację (Khetan i Collins 2007). Według Koszowskiej i in. (2015) część substancji przynależących do *Pharmaceuticals and Personal Care Products* (PPCPs) jest bardzo trwała w środowisku, w związku z czym może w szkodliwy sposób oddziaływać na organizmy żywe. Istotne jest również to, że substancje te mają zdolność akumulacji w roślinach i zwierzętach co stanowi zagrożenie dla ekosystemów w związku z tym także dla człowieka. Badania Gworek i in. (2021) wykazały, że farmaceutyki kumulują się przede wszystkim w częściach wegetatywnych roślin, gdzie ich stężenia

układają się w następującej kolejności: korzenie > liście > łodygi. Natomiast najniższe poziomy tych substancji odnotowano w częściach generatywnych, takich jak nasiona zbóż. W związku z powszechnym zanieczyszczeniem środowiska substancjami o zastosowaniach farmakologicznych, istnieje potrzeba opracowania skutecznych i bezpiecznych metod jego oczyszczania (Kózka i Bębas 2021).

Niesteroidowe leki przeciwzapalne są substancjami biologicznie aktywnymi zaprojektowanymi do działania w niskich stężeniach. Farmaceutyki mogą mieć niekorzystny wpływ na organizmy „niedocelowe” w związku z długotrwałym narażeniem na określoną substancję. Skutkiem czego mogą być: zaburzenia metaboliczne (także endokrynologiczne), anomalie rozwojowe, zaburzenia funkcji rozrodczych organizmów lądowych i wodnych (Santos i in. 2010). Cunha i in. (2017) zauważają, że niewykluczonym jest fakt, iż produkty przemian mogą wykazywać inne właściwości i działania niż związki macierzyste. Aktywne substancje leków mogą ulegać rozkładowi zarówno podczas biologicznych procesów oczyszczania ścieków, jak i w naturalnych zbiornikach wodnych, glebie oraz w trakcie reakcji abiotycznych. Choć procesy te częściowo ograniczają potencjalne szkodliwe działanie farmaceutyków, niektóre produkty ich rozpadu mogą wykazywać zbliżony poziom toksyczności do związków macierzystych (Gworek i in. 2021). Oznacza to, że mogą wykazywać większą toksyczność wobec organizmów wodnych. Dowody na to dostarczają np. badania nad ryżanką japońską (*Oryzias latipes*), w których stwierdzono, że stężenie diklofenaku wynoszące $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ powodowało spowolnienie rozwoju jaj oraz opóźnienie w wykluwaniu się młodych osobników. Warto podkreślić, że takie opóźnienia w wykluwaniu może prowadzić do zwiększonego ryzyka ataków ze strony drapieżników (Lee i in. 2011).

Badania wskazują, że diklofenak, który jest jednym z najsilniej działających przeciwbólowo niesteroidowych leków przeciwzapalnych po przedostaniu się do środowiska charakteryzuje się dużą trwałością i toksycznością (Schwaiger i in. 2004, Quintana i in. 2005). Oprócz diklofenaku, wśród pięciu najczęściej wykrywanych związków znalazły się również karbamazepina, sulfametoksazol, ibuprofen i naproksen (Kózka i Bębas 2021).

Pomimo, że środki farmaceutyczne w środowisku występują w stężeniach $\text{ng}\cdot\text{dm}^{-3}$ ich szkodliwy wpływ oddziałuje na żywe organizmy, które są bezpośrednio narażone na kontakt z nimi. Niewielki poziom stężenia, graniczący czasem czułością urządzenia pomiarowego, zmniejsza szanse na oznaczenie ich obecności przy pomocy analizy chemicznej lub wiąże się to z wysokimi kosztami (Hoeger i in. 2005). Pojedyncze farmaceutyki z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych poddawane badaniom toksyczności w stężeniach

obserwowanych w środowisku naturalnym nie wywołują skutków. Jednakże naukowcy podkreślają, że leki z tej samej grupy występujące w postaci mieszaniny mogą prowadzić do poważnych skutków zanieczyszczenia środowiska (Rizzo i in. 2015).

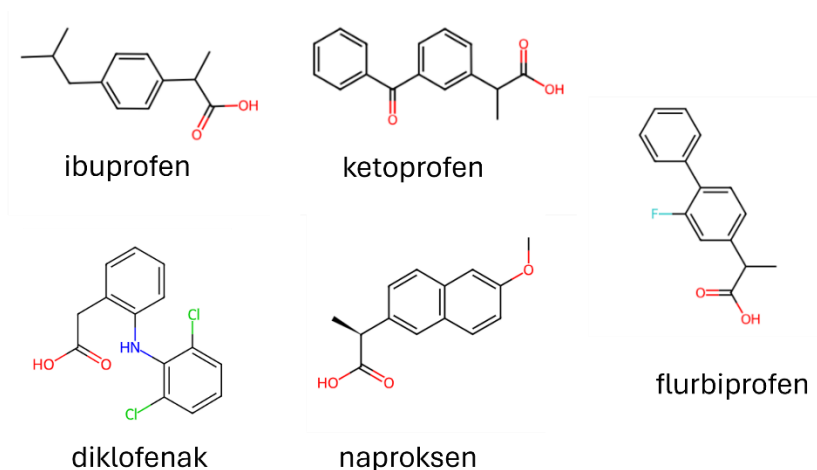
Struktura leku składa się z aktywnych składników farmaceutycznych, substancji pomocniczych oraz dodatkowych związków jak sole i cukry, pigmenty oraz substancje zapachowe (Kummerer 2010). Po przedostaniu się do środowiska naturalnego aktywne postaci środków farmaceutycznych ulegają transformacjom do prostszych form. Szybkość ich rozkładu zależy od warunków środowiskowych oraz budowy i właściwości chemicznych leku. Związki obecne w macierzystych substancjach i mieszaninach metabolitów mogą podlegać zarówno procesom abiotycznym (np. fotodegradacji, fototransformacji), jak i biotycznym (np. biotransformacji, biodegradacji) (Bavumiragira i in. 2022). Coraz większe zainteresowanie wzbudzają przyjazne środowisku metody oczyszczania, takie jak biodegradacja i fitostabilizacja. Badania nad roślinami zdolnymi do przetrwania w warunkach skażenia są zatem nie tylko uzasadnione, ale i konieczne. Kluczową rolę w fitoremediacji odgrywają procesy absorpcji, translokacji i akumulacji zanieczyszczeń przez rośliny i ich stabilizacja w obszarze korzeniowym, a także biotransformacja zanieczyszczeń przez drobnoustroje glebowe w ryzosferze (Borowik i in. 2020).

W obliczu rosnącego zanieczyszczenia gleb, intensywnie poszukuje się efektywnych i niedrogich metod, które mogłyby wspierać degradację toksycznych substancji w środowisku. Bioremediacja, jako jedna z najskuteczniejszych strategii, stanowi odpowiedź na ten problem, a w ramach jej działań wyróżnia się fitoremediację jako kluczową technikę. Obecnie zyskuje ona na znaczeniu dzięki swojej niskokosztowej i efektywnej naturze w remediacji zanieczyszczonych terenów (Borowik i in. 2020). Jednakże po wielu przeprowadzonych badaniach nad biodegradacją leków w środowisku w dalszym ciągu niewiele wiadomo odnośnie dróg całkowitej degradacji. Jest to spowodowane trudnościami pozyskania drobnoustrojów zdolnych do pełnego metabolizowania środków farmaceutycznych (Schwaiger i in. 2004, Quintana i in. 2005).

3. Materiał i metody badań

3.1. Charakterystyka niesteroidowych leków przeciwzapalnych użytych w badaniach

W niniejszej pracy doktorskiej przeanalizowano oddziaływanie pięciu niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu, naproksenu oraz diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz glebowych. Strukturę chemiczną użytych w doświadczeniu związków przedstawiono na rys. 1, a ich podstawowe właściwości fizyczno-chemiczne zestawiono w tab. 1.



Rys. 1. Wzory chemiczne niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykorzystanych w badaniach (opracowanie własne na podstawie <https://www.chemspider.com>)

Tab. 1. Podstawowe właściwości fizyczno-chemiczne niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykorzystanych w badaniach (na podstawie <https://www.chemspider.com> oraz <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Nazwa zwyczajowa	Nazwa chemiczna	Wzór sumaryczny	Masa molowa [g·mol ⁻¹]	pK _a	Rozpuszczalność w wodzie [mg dm ⁻³]	Temperatura topnienia (°C)
Ibuprofen	kwask 2-[4-(2-metylopropylo)-fenylo]-propionowy	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,29	4,91	21,00	75-77,5
Flurbiprofen	kwask 2-(3-fluoro-4-fenylofenylo)-propionowy	C ₁₅ H ₁₃ FO ₂	244,27	4,30	8,00	110-111
Ketoprofen	kwask 2-(3-benzoilo fenylo)-propionowy	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,29	4,45	51,00	94
Naproksen	kwask (2S)-2-(6-metoksy-naftalen-2-ylo)-propionowy	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,26	4,15	15,90	152-153
Diklofenak	kwask 2-[2-(2,6-dichloroanilino)-fenylo]-octowy	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	4,15	2,37	157

Wszystkie wykorzystane w badaniach leki są inhibitorami dwóch cyklooksygenaz: COX-1 i COX-2. Każdy z nich wykazuje działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe. Ponadto ibuprofen, flurbiprofen oraz diklofenak są lekami przeciwgorączkowymi, a ketoprofen oraz naproksen – przeciwreumatycznymi (Zaremba i in. 2012).

3.2. Charakterystyka gleby wykorzystanej w badaniach

Doświadczenie laboratoryjne oraz doświadczenia wazonowe przeprowadzono na próbkach gleby pobranej z poziomu ornopróchniczego gleb brunatno-rdzawych Rolniczej Stacji Doświadczalnej w Lipniku Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Jest to piasek gliniasty, którego podstawowe właściwości fizyczno-chemiczne przedstawiono w tab. 2.

Tab. 2. Podstawowe właściwości fizyczno-chemiczne gleby użytej w badaniach (Telesiński 2012)

Właściwość		Wartość
Procentowa zawartość frakcji (d)	piasek $2,00 \geq d > 0,05$ mm	75
	pył $0,05 \geq d > 0,002$ mm	23
	ił $d \leq 0,002$ mm	2
pH	H ₂ O	6,59
	1 M KCl	6,36
Zawartość węgla organicznego [g · kg ⁻¹]		8,71
Zawartość azotu ogółem [g · kg ⁻¹]		0,73
C:N		12:1

Pobraną z pola glebę doprowadzono do stanu powietrznie suchego, a następnie przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm.

3.3. Schemat doświadczenia

Badania przeprowadzono dwuetapowo. Pierwszym etapem było doświadczenie laboratoryjne, w którym oceniano kilkumiesięczny wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na aktywność wybranych fosfataz w glebie. Drugi etap to ocena krótkotrwałego oddziaływania NLPZ oraz ich mieszanin na aktywność fosfataz glebowych w doświadczeniu wazonowym w warunkach kontrolowanych.

Zarówno w doświadczeniu laboratoryjnym, jak i w wazonowym, NLPZ rozpuszczano w acetonie, a następnie objętości acetonowych roztworów, odpowiadające dawkom 1, 10 i 100 mg wprowadzano do naważki 5 g piasku kwarcowego. Tak przygotowane kombinacje umieszczano na 24 godziny, na szalkach Petriego w cieplarni w temperaturze 25°C, w celu odparowania acetonu. Dla kontroli do piasku wprowadzano sam aceton. Tak przygotowane

naważki piasku zawierające NLPZ wprowadzano do gleby, zgodnie z procedurą opisaną w kolejnych podrozdziałach.

3.3.1. Doświadczenie laboratoryjne

W doświadczeniu laboratoryjnym oceniano długotrwałe oddziaływanie następujących niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproksen oraz diklofenak. Przesianą glebę podzielono na naważki o masie 245 g, do których dodano 5 g piasku kwarcowego zawierającego NLPZ, tak aby w kolejnych próbkach znajdowały się następujące dawki analizowanych NLPZ: 0 (kontrola), 1, 10 i 100 mg·kg⁻¹ s.m. gleby. Wilgotność gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Tak przygotowane próbki przechowywano w szczelnie zamkniętych workach poliestrowych w ciemności w temperaturze 20°C. W kolejnych terminach pomiarów, czyli: 1., 30., 60., 90. oraz 120. dniu w próbkach oznaczono aktywność następujących fosfataz: fosfomonoesteraza kwaśna, fosfomonoesteraza zasadowa, fosfotriesterazy, pirofosfataza nieorganiczna.

3.3.2. Doświadczenie wazonowe

W doświadczeniu wazonowym oceniano krótkotrwały wpływ następujących NLPZ: ibuprofen, naproksen i diklofenak, wprowadzonych do gleby osobno oraz w mieszaninach na aktywność następujących fosfataz: fosfomonoesterazy kwaśnej, fosfomonoesterazy zasadowej i pirofosfatazy nieorganicznej. Podobnie jak w doświadczeniu laboratoryjnym, przesianą glebę podzielono na naważki o masie 245 g, do których dodano 5 g piasku kwarcowego zawierającego NLPZ, tak aby w kolejnych próbkach znajdowały się następujące dawki analizowanych NLPZ: 0 (kontrola), 1, 10 i 100 mg·kg⁻¹ s.m. gleby. W przypadku mieszanin leków stosunek masy poszczególnych związków wynosił 1:1. Wilgotność gleby doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Tak przygotowanymi próbkami gleby napełniano doniczki, a następnie wysiano do nich po 20 identycznych ziarniaków jęczmienia zwyczajnego odmiany 'Suweren' (*Hordeum vulgare* L. cv. Suweren). Przez cały okres doświadczenia utrzymywano stałą wilgotność gleby oraz stałą temperaturę 20±2°C, a także stałe oświetlenie na poziomie 170 μmol·m⁻²·s⁻¹ w cyklu 16 h dzień/8 h noc. Odpowiednio w 1., 7., 14. i 21. dniu doświadczenia pobierano próbki glebowe i oznaczano w nich aktywność wymienionych wcześniej enzymów.

W doświadczeniu wazonowym nie stwierdzono zahamowania kiełkowania ziarniaków oraz zmian w wyglądzie morfologicznym siewek jęczmienia, dlatego też nie uwzględniano tego aspektu w opisie wyników.

3.4. Metodyka oznaczania aktywności fosfataz w glebie

3.4.1. Oznaczanie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej i fosfomonoesterazy zasadowej

Aktywność fosfomonoesteraz: kwaśnej [EC 3.1.3.2] oraz zasadowej [EC 3.1.3.1] oznaczono spektrofotometrycznie za pomocą metody Tabatabai i Bremnera (1969). Po dodaniu do próbek glebowych buforowanego roztworu substratu – fosforanu *p*-nitrofenylu (pH buforu dla fosfomonoesterazy kwaśnej 6,5, a dla fosfomonoesterazy zasadowej 11), inkubowano je przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Uwolniony w wyniku działania fosfomonoesteraz *p*-nitrofenol był ekstrahowany i barwiony wodorotlenkiem sodu, a następnie oznaczany za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV-1800, przy długości fali 400 nm. Aktywność fosfomonoesteraz wyrażono jako mg *p*-nitrofenolu (*p*-NP) na kilogram suchej masy i czas inkubacji 1 h. Stężenie *p*-NP obliczono z krzywej wzorcowej.

3.4.2. Oznaczanie aktywności fosfotriesteraz

Aktywność fosfotriesteraz [EC. 3.1.5] oznaczono spektrofotometrycznie za pomocą metody Eivazi i Tabatabai (1977). Do próbek glebowych dodano substratu – fosforanu tris(*p*-nitrofenylu) (substrat jest nierozpuszczalny w wodzie i dodawano go w postaci stałej) oraz buforu o pH 10. Następnie próbki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Uwolniony w wyniku działania fosfotriesteraz *p*-nitrofenol był ekstrahowany i barwiony wodorotlenkiem sodu, a następnie oznaczany za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV-1800, przy długości fali 400 nm. Aktywność fosfotriesterazy wyrażono jako mg *p*-nitrofenolu (*p*-NP) na kilogram suchej masy i czas inkubacji 1 h. Stężenie *p*-NP obliczono z krzywej wzorcowej.

3.4.3. Oznaczanie aktywności pirofosfatazy nieorganicznej

Do oznaczenia aktywności pirofosfatazy nieorganicznej [EC 3.6.1.1] wykorzystano metodę Dicka i Tabatabai (1978). Po dodaniu buforowanego roztworu pirofosforanu (pH 8), próbki gleby inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Uwolniony w wyniku działania pirofosfatazy nieorganicznej ortofosforan był ekstrahowany kwasem siarkowym i oznaczany za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV-1800, przy długości fali 700 nm po zabarwieniu molibdenianem amonu. Aktywność pirofosfatazy nieorganicznej wyrażono jako mg $P-PO_4^{3-}$ na kilogram suchej masy i czas inkubacji 1 h. Stężenie $P-PO_4^{3-}$ obliczono z krzywej wzorcowej.

3.5. Analiza danych

Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki aktywności rzeczywistej fosfataz opracowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji, niezależnie dla każdego terminu pomiaru oraz oznaczanego enzymu. Analizowanym czynnikiem doświadczalnym była zastosowana dawka leku. Istotność różnic określono testem Tukey'a na poziomie istotności $p < 0,05$. Aktywność rzeczywistą przeliczono procentowo w stosunku do aktywności enzymu w glebie kontrolnej (niezawierającej NLPZ), przyjmując ją jako 100% – takie dane przedstawiono na wykresach jako % kontroli.

Na podstawie otrzymanych wyników obliczono także współczynniki oporności fosfataz glebowych RS za pomocą wzoru podanego przez Orwina i Wardle'a (2004):

$$RS = 1 - \frac{2|D_0|}{(C_0 + |D_0|)}$$

W powyższym wzorze C_0 oznacza aktywność fosfataz w glebie kontrolnej, a D_0 różnicę między aktywnością enzymów w glebie kontrolnej i glebie z dodatkiem NLPZ. Jak podają autorzy wartości RS wahają się od -1 do 1, przy czym wartość 1 oznacza, że NLPZ nie miały wpływu na aktywność fosfataz (maksymalna oporność), a im niższe wartości tym silniejsze oddziaływanie NLPZ na oznaczane enzymy. Jeśli aktywność fosfataz w glebie z dodatkiem NLPZ mieści się w przedziale od 0 do $2C_0$, wartość RS będzie wynosiła od 0 do 1. Wartość RS równa 0 oznacza 100% zahamowanie aktywności enzymu. Jeśli jednak aktywność fosfataz w glebie jest wyższa niż dwukrotność aktywności w glebie kontrolnej, wskaźnik ten będzie przyjmował wartość ujemną.

Na wykresach przedstawiono wartości średnie RS ze wszystkich terminów pomiarów wraz z odchyleniem standardowym i błędem standardowym.

Wartości RS wykorzystano również w analizie η^2 , która opisuje stosunek wariancji zmiennej zależnej wyjaśnioną (w sensie czysto korelacyjnym) przez zmienną niezależną (predyktor), przy stałych wartościach pozostałych zmiennych niezależnych (predyktorów). Otrzymujemy zatem informację o tym, w jakim procencie zróżnicowanie wyników zmiennej zależnej jest wyjaśnione wpływem zmiennej niezależnej (Januszewski 2011).

Wartości RS użyto również w analizie skupień. W badaniach wykorzystano technikę aglomeracyjną, będącą jedną z metod hierarchicznych, wraz z pomiarem odległości metryką euklidesową. Do oszacowania odległości pomiędzy skupieniami wykorzystano metodę

Warda, która wykorzystuje podejście analizy wariancji, dąży do minimalizacji sumy kwadratów odchyleń wewnątrz skupień (Zalewska 2017).

4. Wyniki badań

4.1. Doświadczenie laboratoryjne

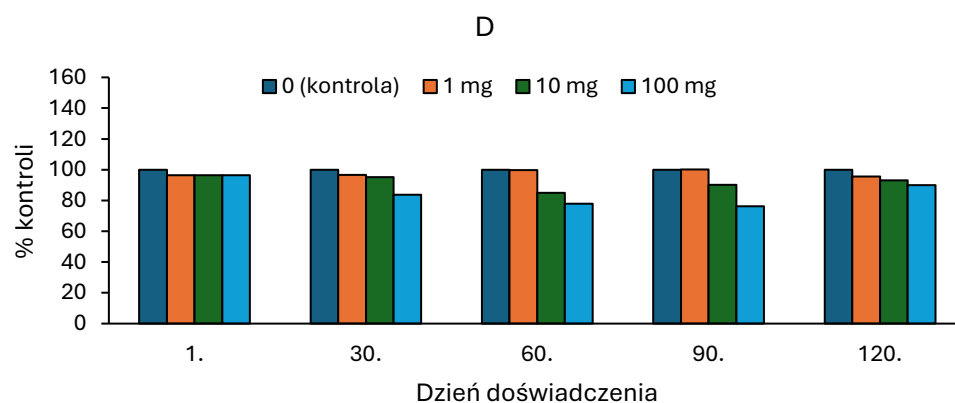
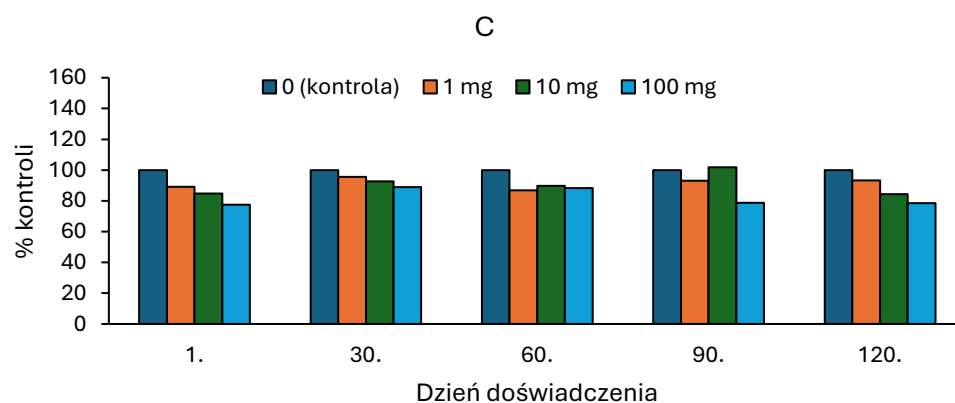
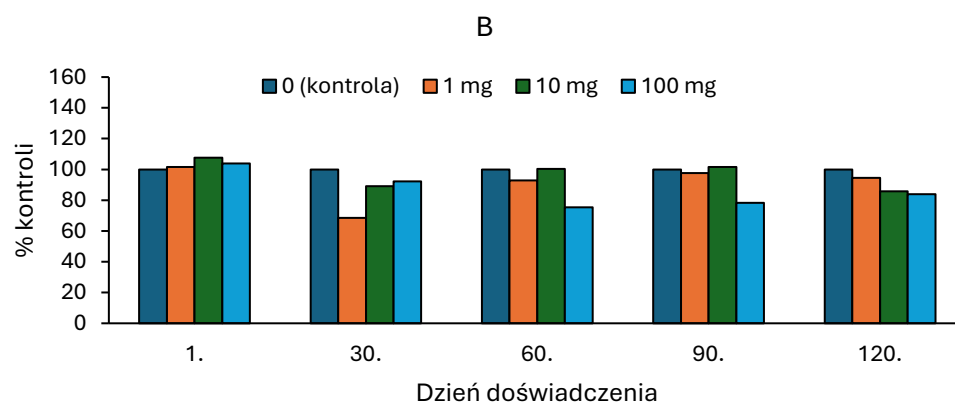
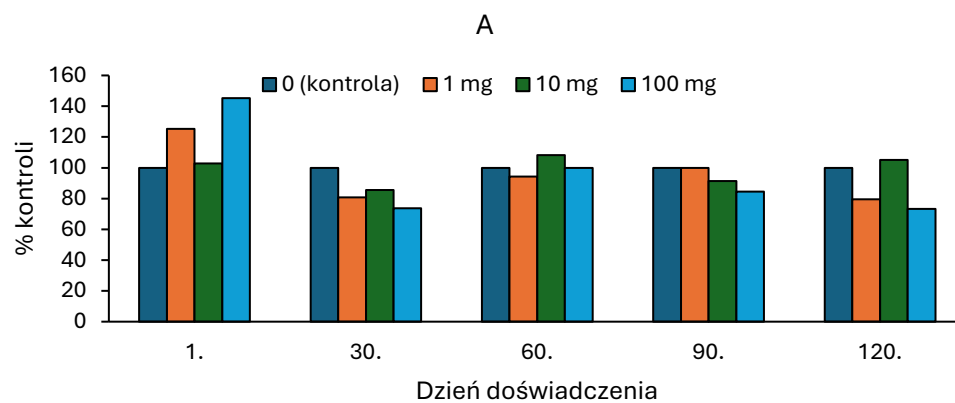
4.1.1. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Wprowadzenie do gleby ibuprofenu (IBU) w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. spowodowało w 1. dniu doświadczenia istotną statystycznie stymulację aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (o 25,27% w stosunku do gleby kontrolnej), a w 30. dniu doświadczenia istotną inhibicję aktywności tego enzymu (o 19,20% w odniesieniu do gleby kontrolnej) (tab. 3, rys. 2A). Podobne zależności zaobserwowano po aplikacji IBU w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m.: stymulację aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej w 1. dniu doświadczenia (o 45,23% w odniesieniu do kontroli) oraz inhibicję aktywności enzymu w 30. dniu doświadczenia (o 26,33% w stosunku do gleby kontrolnej). Dodatkowo dla IBU w tej dawce wykazano także

Tab. 3. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Dawka [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m.]	Dzień doświadczenia				
	1.	30.	60.	90.	120.
Fosfomonoesteraza kwaśna [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	89,72±8,65 ^c	78,87±5,21 ^a	73,34±6,89 ^a	83,15±9,89 ^a	78,29±7,29 ^{ab}
1	112,39±5,79 ^b	63,72±5,71 ^b	69,15±6,32 ^a	83,15±2,57 ^a	62,29±3,0 ^{bc}
10	92,30±3,16 ^c	67,53±2,58 ^{ab}	79,44±7,19 ^a	75,91±4,39 ^a	82,29±9,02 ^a
100	130,30±6,05 ^a	58,10±3,62 ^b	73,25±5,73 ^a	70,29±9,89 ^a	57,43±4,37 ^{cd}
Fosfomonoesteraza zasadowa [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	155,16±12,63 ^a	98,87±7,73 ^a	141,73±2,62 ^a	143,16±5,94 ^a	126,01±10,53 ^a
1	157,73±16,01 ^a	67,72±4,77 ^b	131,44±9,44 ^a	139,73±7,62 ^a	119,16±4,54 ^{ab}
10	166,88±10,72 ^a	88,01±7,97 ^a	142,30±9,66 ^a	145,45±7,73 ^a	108,20±2,29 ^b
100	161,16±4,77 ^a	91,15±7,29 ^a	106,87±4,05 ^b	112,01±4,87 ^b	105,63±4,43 ^b
Fosfotriesterazy [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	18,60±1,29 ^a	13,59±1,58 ^a	13,57±0,94 ^a	14,75±1,46 ^a	15,03±0,78 ^a
1	16,58±1,53 ^{ab}	12,98±0,97 ^a	11,80±0,53 ^a	13,71±0,09 ^{ab}	14,02±1,75 ^a
10	15,78±1,32 ^{ab}	12,58±1,49 ^a	12,18±1,08 ^a	15,00±0,78 ^a	12,68±1,21 ^{ab}
100	14,40±2,04 ^b	12,08±0,44 ^a	11,98±0,65 ^a	11,60±1,02 ^b	11,81±1,43 ^b
Piروفosfataza nieorganiczna [$\text{mg } \text{P-PO}_4^{3-} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	156,72±6,66 ^a	159,91±8,92 ^a	160,24±6,77 ^a	148,24±8,55 ^a	148,71±4,62 ^a
1	151,17±3,01 ^a	154,49±8,35 ^a	159,81±3,52 ^a	148,37±9,99 ^a	142,71±8,64 ^a
10	151,19±7,64 ^a	152,21±6,87 ^a	136,02±5,59 ^b	133,59±8,09 ^{ab}	138,30±9,33 ^a
100	151,13±4,98 ^a	133,97±7,87 ^b	124,67±5,60 ^b	113,16±4,16 ^b	133,76±8,87 ^a

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$



Rys. 2. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem ibuprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne)

istotne statystycznie obniżenie aktywności tego enzymu w 120. dniu doświadczenia (o 26,64% w odniesieniu do kontroli). Natomiast po zastosowaniu IBU w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. nie wykazano istotnych zmian aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej we wszystkich terminach pomiarów.

W przypadku aktywności fosfomonoesterazy zasadowej aplikacja IBU w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. spowodowała istotny statystycznie spadek aktywności enzymu w 30. dniu doświadczenia (o 31,50% w porównaniu do gleby kontrolnej), podczas gdy przy dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. istotne obniżenie aktywności zostało wykazane w 120. dniu doświadczenia (o 14,13% w stosunku do kontroli). Natomiast wprowadzenie IBU w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. wywołało istotną inhibicję aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w trzech ostatnich terminach pomiarów – od 60. do 120. dnia doświadczenia, która kształtowała się na poziomie 16,17-24,60% w porównaniu do kontroli (tab. 3, rys. 2B).

Aktywność fosfotriesteraz po dodaniu do gleby IBU w dawkach 1 oraz 10 mg·kg⁻¹ s.m. w trakcie trwania całego doświadczenia nie uległa istotnym zmianom. Jednakże wprowadzenie IBU w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. wywołało istotny statystycznie spadek aktywności tej grupy enzymów w 1., 90. i 120. dniu doświadczenia, odpowiednio o 22,61%, 21,31% oraz 21,43% w odniesieniu do gleby kontrolnej (tab. 3, rys. 2C).

Podobnie jak w przypadku fosfotriesteraz aplikacja IBU w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. nie wywołała istotnych zmian aktywności pirofosfatazy nieorganicznej. Natomiast po zastosowaniu dawki 10 mg·kg⁻¹ s.m. stwierdzono istotne statystycznie obniżenie aktywności tego enzymu w 60. dniu doświadczenia (15,12% w stosunku do kontroli). Dla dawki 100 mg·kg⁻¹ s.m. istotną inhibicję aktywności pirofosfatazy nieorganicznej wykazano od 30. do 90. dnia doświadczenia i kształtowała się ona na poziomie od 16,22% do 23,67% (tab. 3, rys. 2D).

4.1.2. Oddziaływanie flurbiprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Aktywność fosfomonoesterazy kwaśnej po wprowadzeniu do gleby flurbiprofenu (FLU) w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. uległa istotnej stymulacji w 1. dniu doświadczenia (o 39,49% w porównaniu do kontroli) oraz istotnemu obniżeniu w ostatnim terminie pomiaru (o 29,56% w odniesieniu do kontroli). W pozostałych dniach doświadczenia nie wykazano istotnego oddziaływania FLU na aktywność tego enzymu (tab. 4, rys. 3A). Zastosowanie FLU w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. wywołało również podwyższenie aktywności enzymu w 1. dniu doświadczenia (o 35,67% w stosunku do gleby kontrolnej), jednakże stwierdzona istotna

inhibicja aktywności wystąpiła w 30. dniu doświadczenia (o 31,88% w porównaniu do kontroli). Natomiast po wprowadzeniu FLU w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. wykazano istotne obniżenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej w 30. i 90. dniu doświadczenia, odpowiednio o 32,97% oraz 26,46% w stosunku do kontroli.

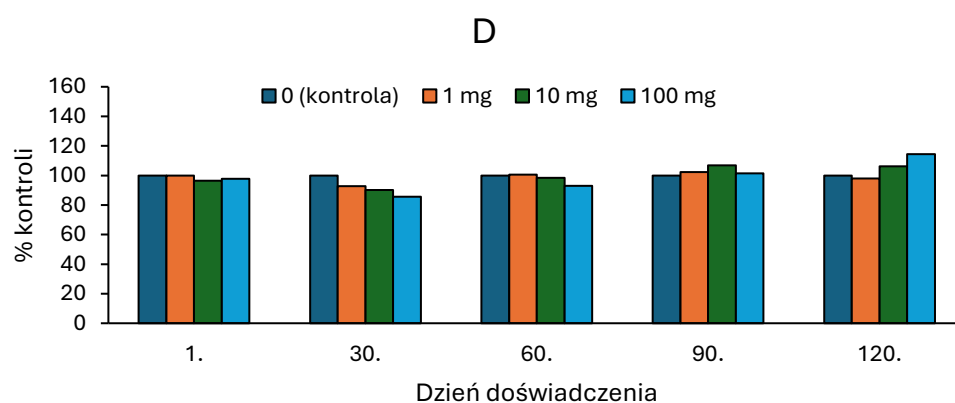
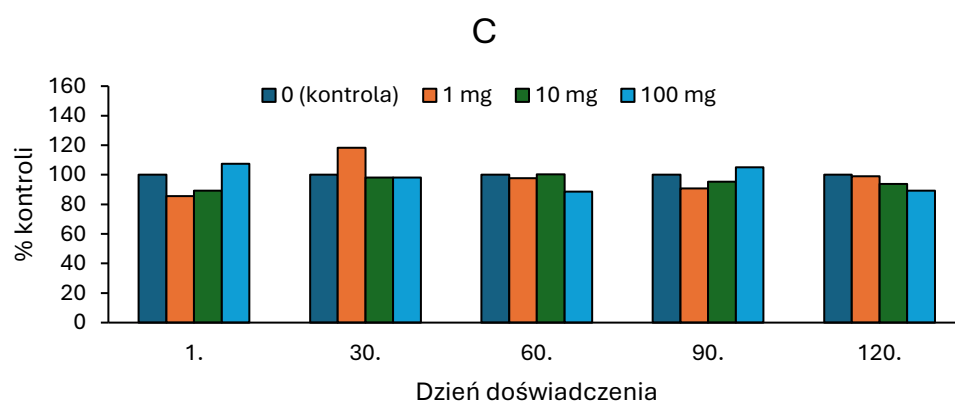
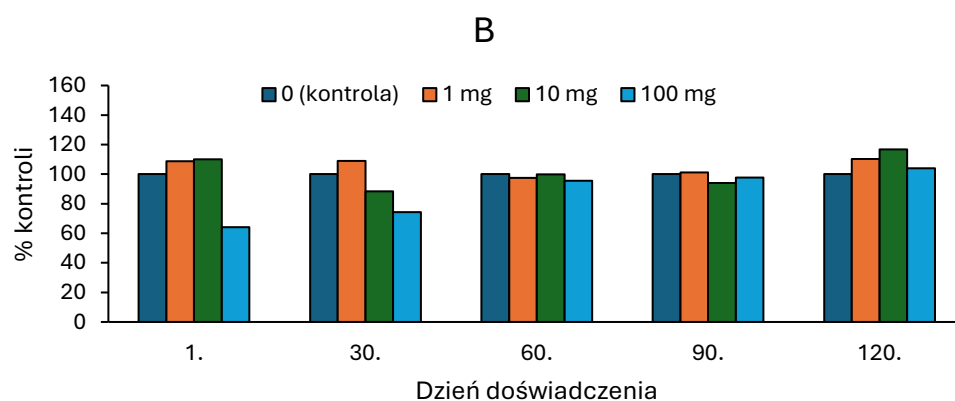
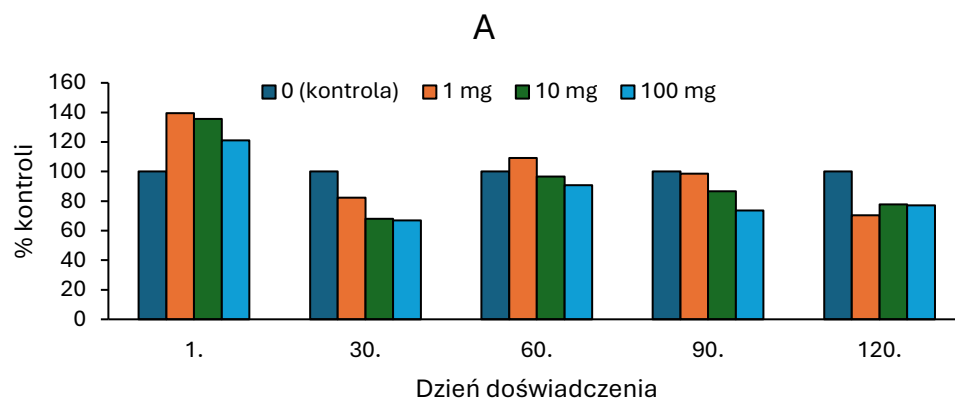
Tab. 4. Oddziaływanie flurbiprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia				
	1.	30.	60.	90.	120.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg p-NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	89,72±8,65 ^b	78,87±5,21 ^a	73,34±6,89 ^a	83,15±9,89 ^a	78,29±7,29 ^a
1	125,16±13,31 ^a	64,86±9,25 ^{ab}	80,01±5,58 ^a	82,01±7,19 ^a	55,15±3,57 ^b
10	121,73±14,57 ^a	53,72±5,51 ^b	70,87±10,01 ^a	72,01±5,35 ^{ab}	60,86±9,03 ^{ab}
100	108,58±6,32 ^{ab}	52,86±6,55 ^b	66,58±6,54 ^a	61,15±6,88 ^b	60,29±7,29 ^{ab}
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg p-NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	155,16±12,63 ^a	98,87±7,73 ^{ab}	141,73±2,62 ^a	143,16±5,94 ^a	126,01±10,53 ^a
1	168,88±14,65 ^a	107,73±3,96 ^a	138,30±14,66 ^a	144,87±9,15 ^a	138,87±8,19 ^a
10	170,88±12,40 ^a	87,44±4,29 ^{bc}	141,44±13,48 ^a	134,59±6,47 ^a	147,16±6,93 ^a
100	99,44±6,81 ^b	73,44±7,14 ^c	135,44±8,69 ^a	139,73±3,74 ^a	131,16±7,86 ^a
Fosfotriesterazy [mg p-NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	18,60±1,29 ^a	13,59±1,58 ^a	13,57±0,94 ^a	14,75±1,46 ^a	15,03±0,78 ^a
1	15,94±1,82 ^a	16,06±1,38 ^a	13,27±0,51 ^a	13,40±1,67 ^a	14,89±1,08 ^a
10	16,59±1,64 ^a	13,42±1,02 ^a	13,62±0,78 ^a	14,06±0,63 ^a	14,11±1,34 ^a
100	19,99±3,17 ^a	13,32±1,51 ^a	12,02±1,21 ^a	15,49±1,37 ^a	13,41±0,71 ^a
Pirofosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	156,72±6,66 ^a	159,91±8,92 ^a	160,24±6,77 ^a	148,24±8,55 ^a	148,71±4,62 ^b
1	156,70±5,69 ^a	148,33±3,84 ^{ab}	161,24±5,51 ^a	151,76±8,59 ^a	145,79±4,66 ^b
10	151,32±3,55 ^a	144,01±7,43 ^{ab}	157,64±5,11 ^a	158,42±7,69 ^a	157,76±4,24 ^{ab}
100	153,19±3,56 ^a	137,06±4,71 ^b	149,03±9,55 ^a	150,36±5,67 ^a	170,23±6,63 ^a

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$

Analizując zmiany aktywności fosfomonoesterazy zasadowej stwierdzono, że jedynie po wprowadzeniu FLU w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. nastąpił istotny spadek aktywności tego enzymu w 1. oraz 30. dniu doświadczenia, odpowiednio o 35,91% i 25,72% w porównaniu do kontroli. W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnego wpływu FLU na aktywność fosfomonoesterazy zasadowej (tab. 4, rys. 3B).

Flurbiprofen wprowadzony w każdej z zastosowanych dawek, we wszystkich terminach pomiarów nie wpłynął istotnie na aktywność fosfotrieteraz w glebie (tab. 4, rys. 3C).



Rys. 3. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem flurbiprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne)

Natomiast w przypadku pirofosfatazy nieorganicznej odnotowano istotne zmiany aktywności tego enzymu jedynie po aplikacji FLU w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. i była to inhibicja (14,29% w porównaniu do kontroli) w 30. dniu doświadczenia oraz stymulacja aktywności (14,47% w odniesieniu do kontroli) w 120. dniu doświadczenia (tab. 4, rys. 3D).

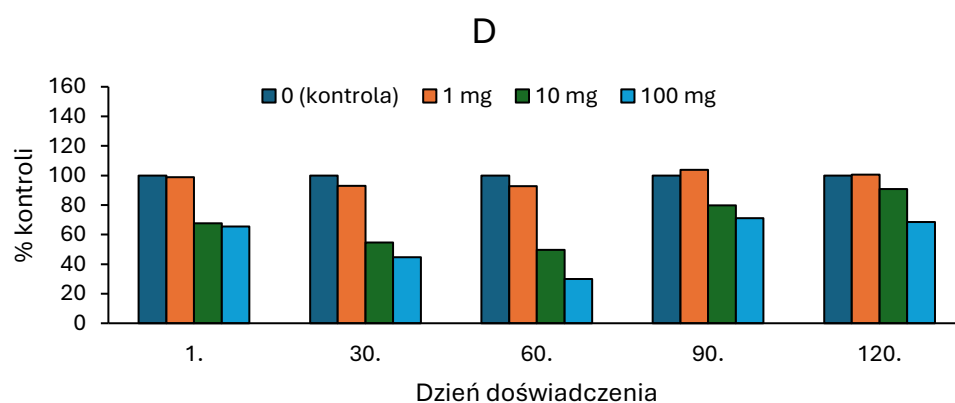
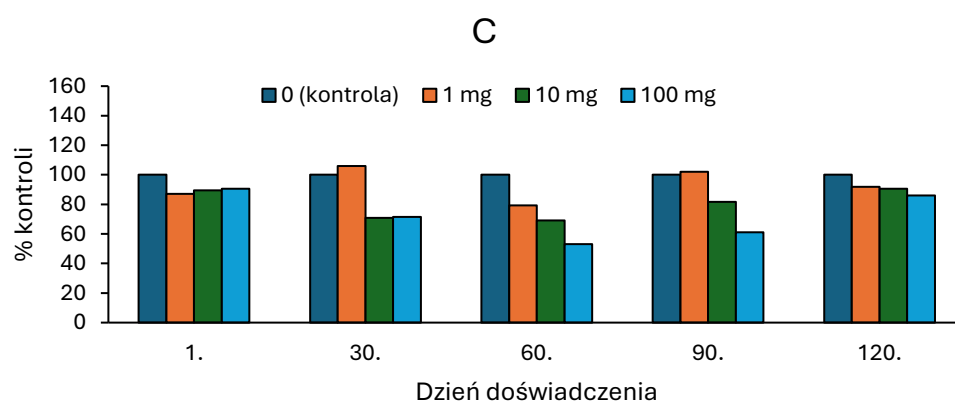
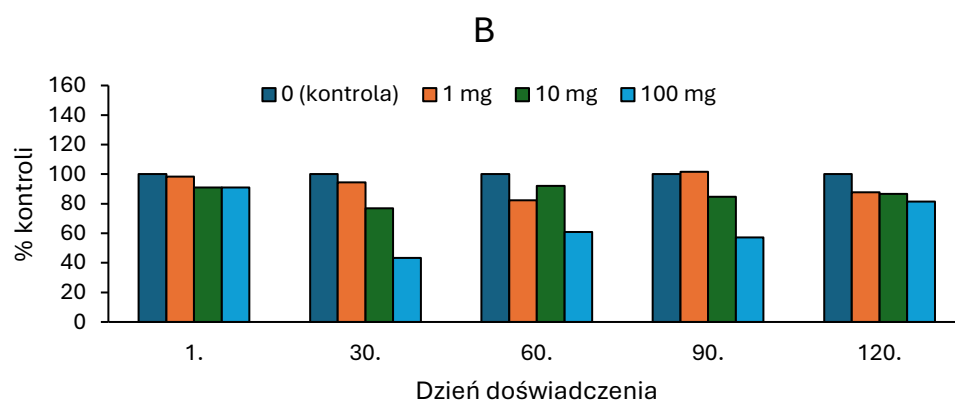
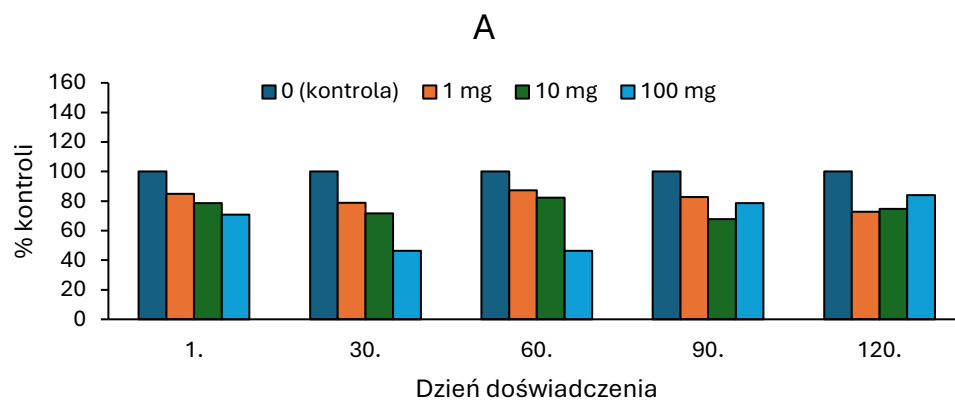
4.1.3. Oddziaływanie ketoprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Zastosowanie ketoprofenu (KET) w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. nie spowodowało istotnych zmian aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (tab. 5). Natomiast po wprowadzeniu KET w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. odnotowano w 1., 30. i 90. dniu doświadczenia, a w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. we wszystkich terminach pomiarów istotny spadek aktywności enzymu. Zaobserwowana inhibicja aktywności kształtowała się dla dawki 10 mg·kg⁻¹ s.m. na poziomie 21,36%-32,30%, a dla dawki 100 mg·kg⁻¹ s.m. na poziomie 15,91%-53,59% w porównaniu do gleby kontrolnej (rys. 4A).

Tab. 5. Oddziaływanie ketoprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia				
	1.	30.	60.	90.	120.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	90,76±4,81 ^a	89,64±6,92 ^a	89,10±3,64 ^a	86,42±4,53 ^a	81,67±6,53 ^a
1	84,99±5,34 ^{ab}	78,91±8,51 ^{ab}	87,42±6,15 ^a	82,68±6,49 ^a	72,70±4,72 ^{ab}
10	76,84±2,37 ^b	71,70±3,21 ^b	82,36±4,51 ^a	67,70±5,51 ^b	74,78±3,88 ^{ab}
100	64,30±4,11 ^c	41,62±4,06 ^c	41,36±5,03 ^b	68,03±4,00 ^b	68,69±2,98 ^b
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	168,83±5,79 ^a	178,87±7,73 ^a	175,06±12,66 ^a	166,49±9,86 ^a	172,68±10,07 ^a
1	166,21±5,54 ^a	169,06±3,51 ^a	143,97±12,26 ^b	169,21±3,35 ^a	151,54±3,82 ^b
10	153,54±9,73 ^a	137,44±5,71 ^b	161,11±5,82 ^{ab}	140,92±6,80 ^b	149,837,57 ^b
100	153,77±8,64 ^a	77,44±4,78 ^c	106,44±6,10 ^c	95,40±7,15 ^c	151,16±1,65 ^b
Fosfotriesterazy [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	17,65±1,27 ^a	16,36±1,12 ^a	18,05±0,15 ^a	15,78±0,68 ^a	15,45±0,53 ^a
1	15,36±1,16 ^a	17,31±0,59 ^a	14,32±1,13 ^b	16,12±0,84 ^a	14,20±1,04 ^{ab}
10	15,79±0,50 ^a	11,69±1,23 ^b	12,47±0,81 ^b	12,90±1,01 ^b	13,99±0,22 ^{ab}
100	15,97±0,82 ^a	11,71±0,42 ^b	9,58±0,64 ^c	9,64±0,66 ^c	13,29±0,49 ^b
Pirofosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	156,72±6,06 ^a	159,91±8,92 ^a	160,24±6,77 ^a	148,24±8,56 ^a	148,71±4,62 ^a
1	155,03±6,56 ^a	148,56±5,11 ^a	148,17±5,49 ^a	153,79±6,92 ^a	149,54±5,19 ^a
10	106,03±5,29 ^b	87,28±4,65 ^b	79,69±2,05 ^b	118,36±7,03 ^b	134,86±4,91 ^b
100	102,65±4,59 ^b	71,65±5,46 ^b	48,03±5,66 ^c	105,35±5,52 ^b	101,82±5,76 ^c

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$



Rys. 4. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem ketoprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne)

Aplikacja KET w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. spowodowała istotne obniżenie aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w 60. i 120. dniu doświadczenia, odpowiednio o 17,76% oraz 12,21% w stosunku do kontroli. Po wprowadzeniu KET w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono w 30., 90. i 120. dniu doświadczenia, a w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. od 30. dnia do końca trwania doświadczenia istotną inhibicję aktywności enzymu, która dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wahała się od 13,24% do 23,16%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. – od 18,46% do 56,71% (tab. 5, rys. 4B).

W przypadku fosfotriesteraz, po wprowadzeniu KET w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m., istotne obniżenie aktywności wykazano jedynie w 60. dniu doświadczenia (o 20,66% w porównaniu do gleby kontrolnej). Aplikacja KET w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. spowodowała istotną inhibicję aktywności tej grupy enzymów w 30., 60. i 90. dniu doświadczenia (odpowiednio o 28,46%, 46,94% oraz 38,91% w odniesieniu do kontroli). Natomiast po zastosowaniu KET w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono spadek aktywności fosfotriesterazy od 30. dnia do końca trwania doświadczenia, który wynosił od 13,95% do 46,94% w stosunku do kontroli (tab. 5, rys. 4C).

Aktywność pirofosfatazy nieorganicznej w glebie z dodatkiem KET w dawkach 10 oraz $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. w trakcie trwania całego doświadczenia była istotnie niższa niż aktywność enzymu w glebie kontrolnej. Wykazana inhibicja aktywności dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wynosiła od 9,32% do 50,27%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. – od 31,53% do 69,99% w odniesieniu do gleby kontrolnej (tab. 5, rys. 4D).

4.1.4. Oddziaływanie naproksenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Wprowadzenie do gleby naproksenu (NAP) w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. spowodowało istotne obniżenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej tylko w 90. dniu doświadczenia (o 25,69% w stosunku do kontroli). Po zastosowaniu NAP w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono spadek aktywności enzymu od 30. dnia do końca trwania doświadczenia, który kształtował się na poziomie od 17,97% do 22,90% w odniesieniu do gleby kontrolnej, podczas gdy dodatek NAP w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. działał inhibująco na aktywność fosfomonoesterazy kwaśnej we wszystkich terminach pomiarów – wykazane obniżenie aktywności wynosiło od 19,09% do 50,69% w porównaniu do kontroli (tab. 6, rys. 5A).

Aktywność fosfomonoesterazy zasadowej w glebie z dodatkiem NAP w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. uległa istotnemu obniżeniu w stosunku do gleby kontrolnej w 30. i 60. dniu

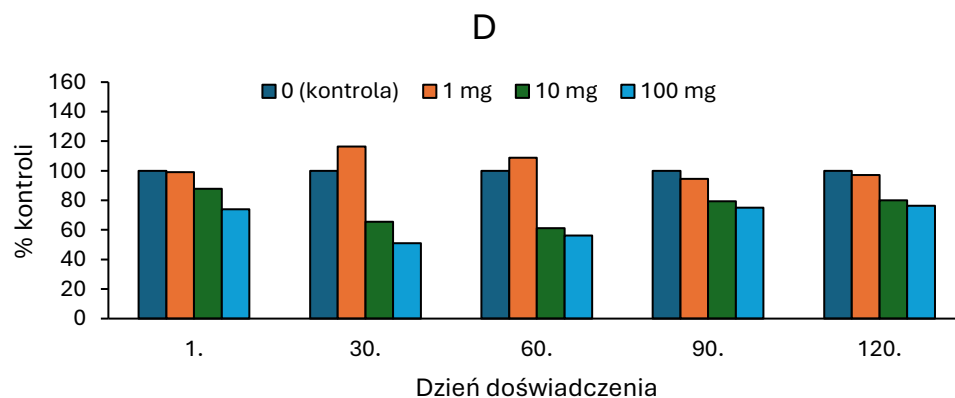
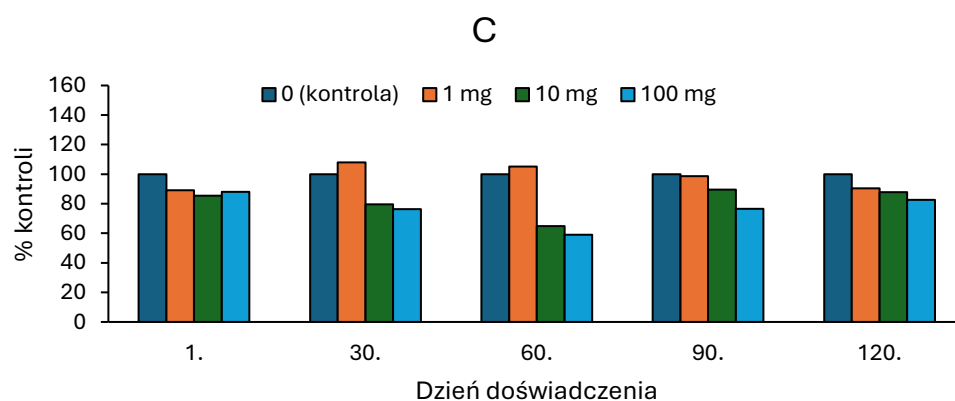
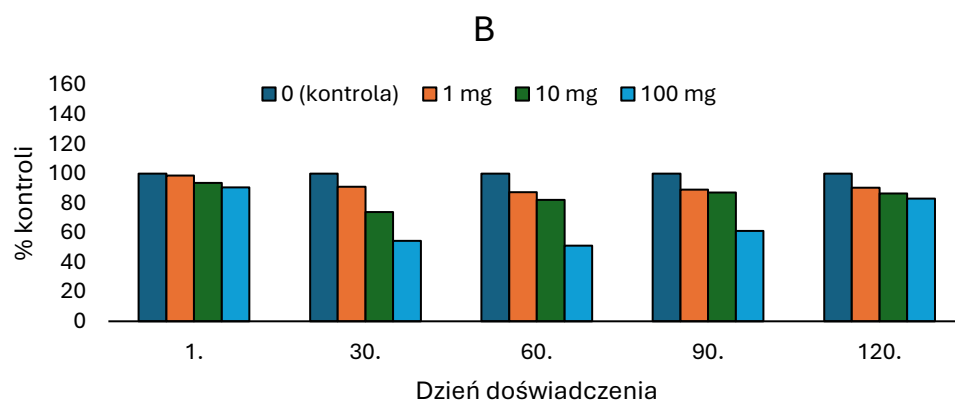
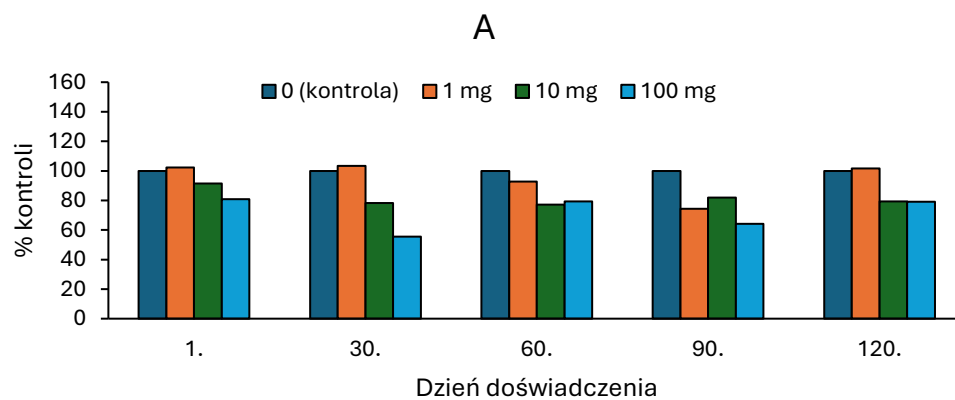
doświadczenia, odpowiednio o 8,92% oraz 12,70%. Po aplikacji NAP w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. stwierdzono natomiast istotną inhibicję aktywności enzymu w 30., 60. i 120. dniu doświadczenia, która wynosiła odpowiednio 26,08%, 12,78% oraz 13,48% w porównaniu do kontroli. Natomiast zastosowanie NAP w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. wywołało spadek aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w trakcie trwania całego doświadczenia, który wahał się w przedziale od 9,39% do 48,89% w odniesieniu do gleby kontrolnej (tab. 6, rys. 5B).

Tab. 6. Oddziaływanie naproksenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia				
	1.	30.	60.	90.	120.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	90,76±4,81 ^a	89,64±6,92 ^a	89,10±3,64 ^a	86,42±4,53 ^a	81,67±6,53 ^a
1	92,81±1,52 ^a	92,56±7,64 ^a	82,72±6,03 ^a	64,21±1,92 ^{bc}	83,09±4,49 ^a
10	82,96±3,34 ^{ab}	70,11±4,49 ^b	68,69±3,50 ^b	70,88±8,14 ^b	64,84±3,77 ^b
100	73,44±5,85 ^b	49,73±4,99 ^c	43,94±3,88 ^c	55,36±5,58 ^c	64,60±6,45 ^b
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	168,83±5,79 ^a	178,87±7,73 ^a	175,06±12,66 ^a	166,49±9,86 ^a	172,68±10,07 ^a
1	166,57±4,83 ^{ab}	162,92±4,14 ^b	152,83±3,40 ^b	148,42±11,69 ^a	156,17±7,96 ^{ab}
10	157,98±6,58 ^{ab}	132,22±2,95 ^c	144,01±4,88 ^b	145,22±6,31 ^a	149,41±11,03 ^b
100	152,98±3,17 ^b	97,14±4,69 ^d	89,48±6,25 ^c	101,98±3,94 ^b	143,50±4,68 ^b
Fosfotriesterazy [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	17,65±1,27 ^a	16,36±1,12 ^a	18,05±0,15 ^a	15,78±0,68 ^a	15,45±0,53 ^a
1	15,71±0,95 ^{ab}	17,64±0,60 ^a	18,99±0,23 ^a	15,56±0,69 ^a	13,97±0,94 ^b
10	15,07±0,75 ^b	13,01±0,02 ^b	11,70±1,47 ^b	14,11±0,18 ^b	13,56±0,42 ^b
100	15,55±0,71 ^{ab}	12,48±1,30 ^b	10,63±0,59 ^b	12,06±0,23 ^c	12,77±0,63 ^b
Pirosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]					
0 (kontrola)	156,72±6,06 ^a	159,91±8,92 ^b	160,24±6,77 ^a	148,24±8,56 ^a	148,71±4,62 ^a
1	155,23±4,17 ^a	186,23±5,96 ^a	174,46±5,81 ^a	140,20±8,09 ^a	144,45±6,51 ^a
10	137,52±6,03 ^b	104,87±6,24 ^c	97,93±7,05 ^b	117,77±4,26 ^b	118,95±2,56 ^b
100	118,93±6,22 ^c	81,65±3,60 ^c	89,90±2,97 ^b	111,18±8,70 ^b	113,66±5,36 ^b

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$

W przypadku fosfotriesteraz dodatek NAP w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. spowodował istotne obniżenie aktywności enzymów w stosunku do kontroli jedynie w ostatnim dniu doświadczenia (o 9,59%). Wprowadzenie NAP w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. działało inhibująco na aktywność fosfotriesteraz we wszystkich terminach pomiarów, a stwierdzona inhibicja wynosiła od 10,53% do 35,21% w odniesieniu do gleby kontrolnej. Natomiast po aplikacji NAP w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. aktywność enzymu w glebie zawierającej lek była, od 30. dnia



Rys. 5. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesterazy (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem naproksenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne)

do końca trwania doświadczenia, istotnie niższa niż aktywność w glebie kontrolnej. Wykazany spadek aktywności kształtował się na poziomie od 11,87% do 41,10% (tab. 6, rys. 5C).

Aktywność pirofosfatazy nieorganicznej po wprowadzeniu NAP w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. uległa istotnej statystycznie stymulacji w 30. dniu doświadczenia (o 16,46% w porównaniu do kontroli). Natomiast aplikacja NAP w wyższych dawkach wywołała istotne obniżenie aktywności enzymu w trakcie trwania całego doświadczenia. Dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. inhibicja ta wynosiła od 12,25% do 38,89%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. – od 23,57% do 48,97% w stosunku do gleby kontrolnej (tab. 6, rys. 5D).

4.1.5. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Aktywność fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie z dodatkiem diklofenaku (DIC) w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. w trakcie trwania całego doświadczenia nie różniła się istotnie od aktywności tego enzymu w glebie kontrolnej. Wprowadzenie DIC w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wywołało obniżenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej od 1. do 60. dnia doświadczenia na poziomie od 15,13% do 38,41% w odniesieniu do kontroli (tab 7, rys. 6A). Natomiast po zastosowaniu DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono we wszystkich terminach pomiarów inhibicję aktywności enzymu, która wahała się od 19,53% do 60,64% w porównaniu do gleby kontrolnej.

Analizując zmiany aktywności fosfomonoesterazy zasadowej pod wpływem DIC, wykazano, że dawka $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. inhibowała istotnie aktywności tego enzymu jedynie w 30. dniu doświadczenia (o 7,22% w stosunku do kontroli). Natomiast wyższe dawki DIC spowodowały istotne obniżenie aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w trakcie trwania całego doświadczenia. Zaobserwowana inhibicja aktywności dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. kształtowała się na poziomie od 9,65% do 26,90%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. – od 19,35% do 36,12% w odniesieniu do kontroli (tab. 7, rys. 6B).

Aktywność fosfotriesteraz w glebie z dodatkiem DIC w dawkach 1 oraz $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. tylko w 120. dniu doświadczenia różniła się istotnie od aktywności w glebie kontrolnej. W przypadku dawki $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wykazano obniżenie aktywności tej grupy enzymów o 17,41%, podczas gdy dawka $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stymulowała aktywność fosfotriesteraz na poziomie 37,25% w stosunku do kontroli (tab. 7, rys. 6C). Po aplikacji DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono w 60. dniu doświadczenia istotne obniżenie aktywności

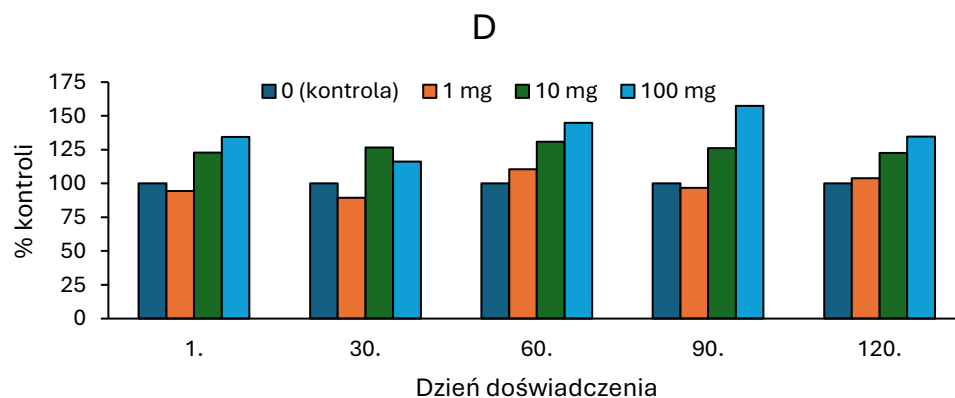
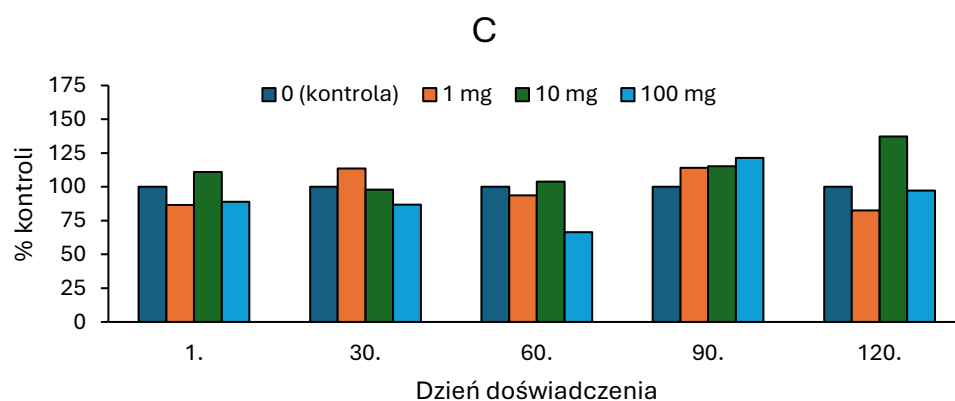
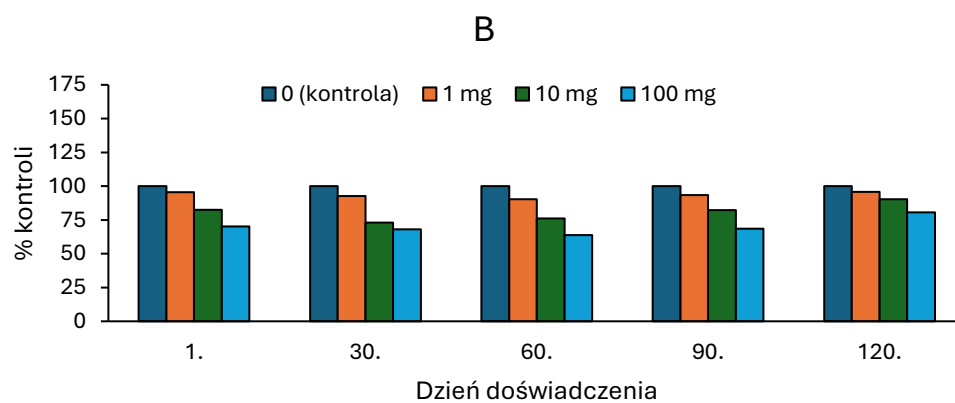
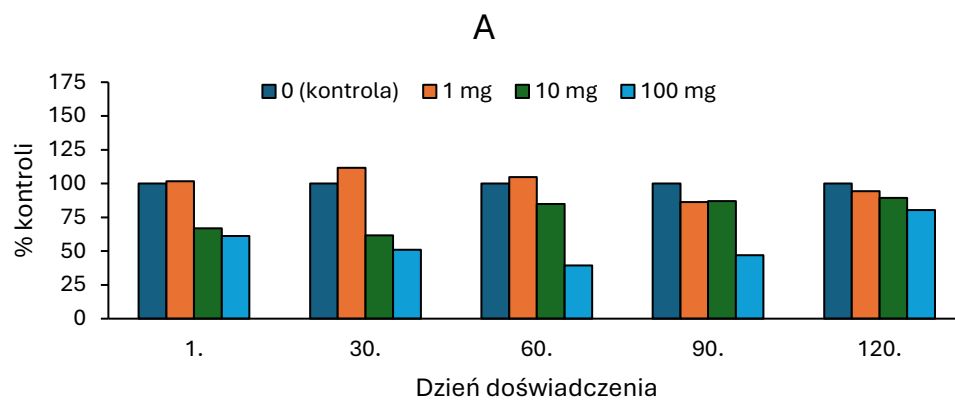
enzymów (o 33,62% w odniesieniu do kontroli), a w 90. dniu doświadczenia – podwyższenie aktywności (o 21,28 w porównaniu do kontroli).

Wprowadzenie DIC w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. nie spowodowało istotnych zmian aktywności pirofosfatazy nieorganicznej. Natomiast w glebie zawierającej DIC w większych dawkach aktywność enzymu w trakcie trwania całego doświadczenia była wyższa niż w glebie kontrolnej. Wykazana stymulacja aktywności pirofosfatazy nieorganicznej, po zastosowaniu DIC w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wynosiła od 22,60% do 31,01%, a po aplikacji DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. – od 16,31% do 57,36% w porównaniu do kontroli (tab. 7, rys. 6D).

Tab. 7. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym

Dawka [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m.]	Dzień doświadczenia				
	1.	30.	60.	90.	120.
Fosfomonoesteraza kwaśna [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	90,82±4,98 ^a	91,97±2,89 ^a	88,80±4,86 ^a	89,08±5,60 ^a	80,69±7,49 ^a
1	92,40±1,04 ^a	102,56±7,64 ^a	92,97±6,13 ^a	76,83±6,62 ^a	76,09±4,48 ^{ab}
10	60,48±6,62 ^b	56,64±6,96 ^b	75,36±2,57 ^b	77,41±4,87 ^a	72,19±3,43 ^{ab}
100	55,54±5,86 ^b	46,99±2,52 ^b	34,95±4,04 ^c	41,92±2,06 ^b	64,93±3,97 ^b
Fosfomonoesteraza zasadowa [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	169,49±4,73 ^a	179,53±6,72 ^a	176,06±9,40 ^a	173,16±5,69 ^a	176,01±6,93 ^a
1	162,56±6,84 ^a	166,57±4,30 ^b	159,01±2,59 ^a	161,84±4,23 ^a	168,68±1,66 ^{ab}
10	139,78±5,77 ^b	131,23±3,90 ^c	134,01±5,18 ^b	142,53±1,45 ^b	159,02±2,01 ^b
100	119,11±4,98 ^c	122,38±2,74 ^c	112,47±4,47 ^c	118,69±5,50 ^c	141,96±3,56 ^c
Fosfotriesteraza [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	17,31±0,94 ^{ab}	16,69±0,54 ^{ab}	18,72±1,10 ^a	15,44±1,24 ^b	16,19±0,95 ^b
1	15,00±0,98 ^b	18,97±0,75 ^a	17,53±0,52 ^a	17,60±0,62 ^{ab}	13,37±0,43 ^c
10	19,21±0,76 ^a	16,34±1,10 ^b	19,43±0,93 ^a	17,78±1,06 ^{ab}	22,22±1,11 ^a
100	15,55±1,21 ^b	14,48±1,03 ^b	12,43±0,57 ^b	18,73±0,68 ^a	15,77±1,07 ^{bc}
Pirofosfataza nieorganiczna [$\text{mg } \text{P-PO}_4^{3-} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]					
0 (kontrola)	160,72±2,34 ^c	161,91±5,59 ^b	160,92±6,53 ^c	151,57±6,56 ^c	148,69±4,65 ^c
1	151,56±4,12 ^c	144,89±6,33 ^b	177,79±6,78 ^c	146,86±5,54 ^c	154,45±6,51 ^c
10	197,52±6,03 ^b	204,87±6,24 ^a	210,80±7,53 ^b	191,10±2,02 ^b	182,29±6,07 ^b
100	215,93±6,21 ^a	188,32±8,03 ^a	233,24±8,92 ^a	238,51±6,39 ^a	200,33±7,87 ^a

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$

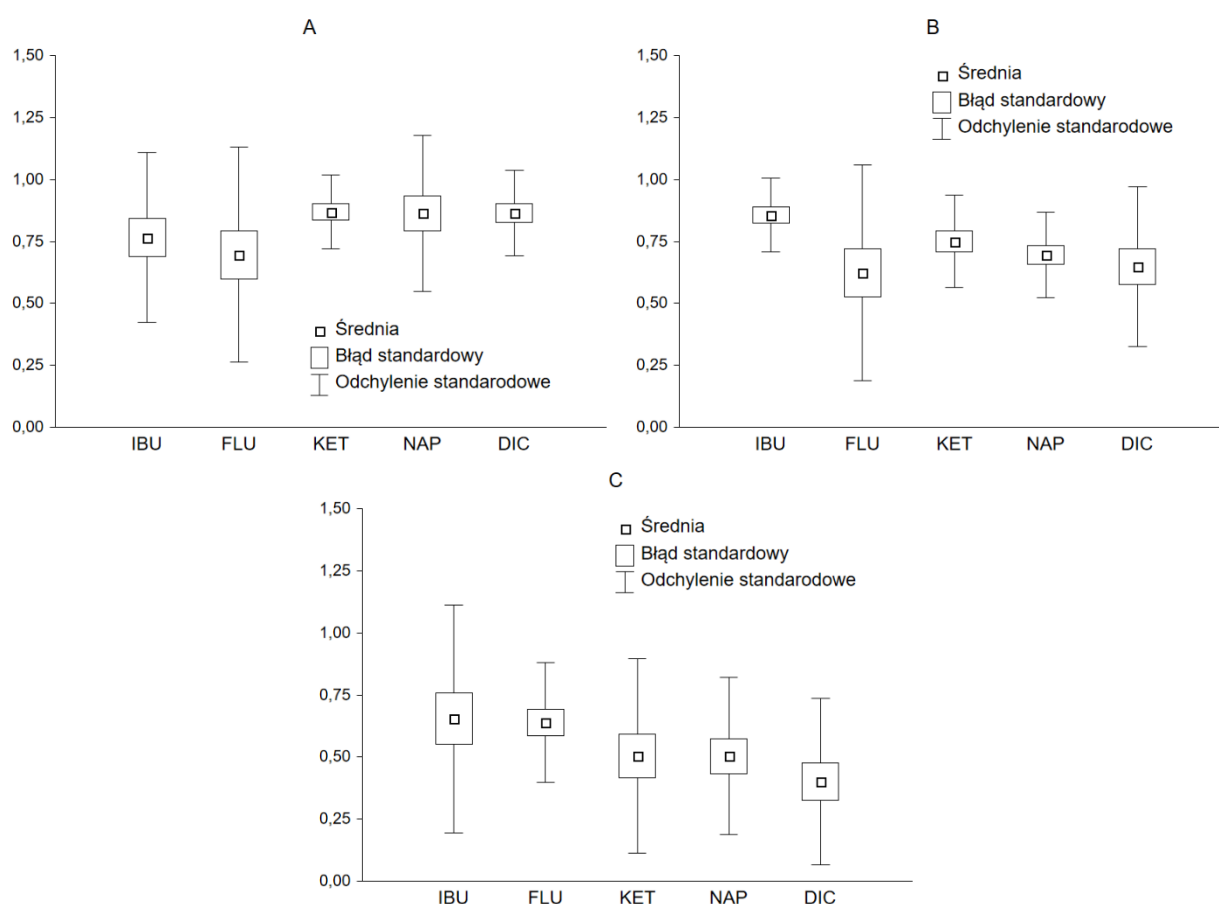


Rys. 6. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne)

4.1.6. Porównanie współczynników oporności fosfataz glebowych na obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu laboratoryjnym

Analizując oddziaływanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych na aktywność fosfataz glebowych wykorzystano współczynniki oporności (RS), które obliczono zgodnie ze wzorem, zaproponowanym przez Orwina i Wardle'a (2004), podanym w rozdziale 3.5. Do porównania wpływu poszczególnych NLPZ wzięto pod uwagę wartości średnie RS ze wszystkich terminów pomiarów.

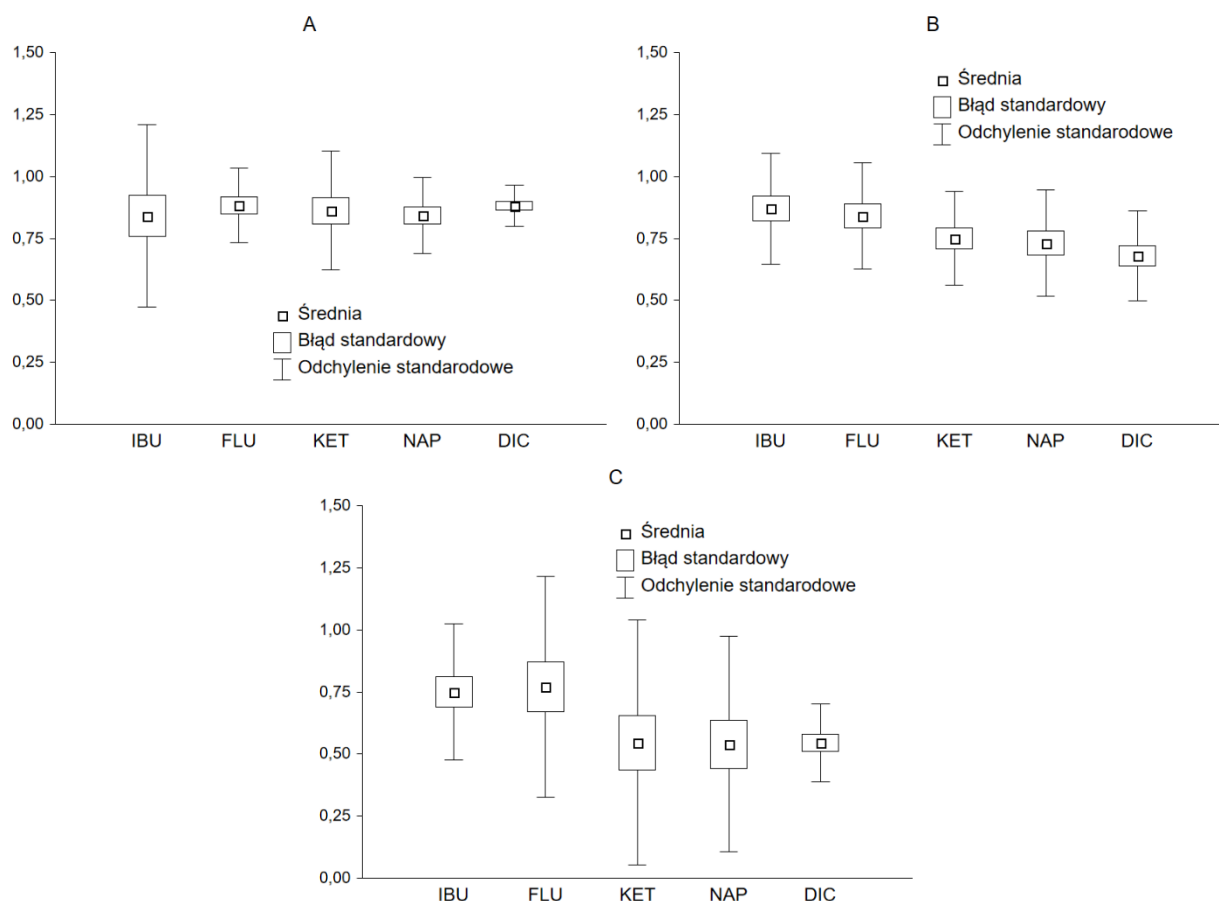
Średnie wartości współczynnika oporności fosfomonoesterazy kwaśnej po wprowadzeniu NLPZ w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. kształtowały się na poziomie od 0,70 do 0,87. Najniższą wartość RS wykazano dla flurbiprofenu, a najwyższą dla ketoprofenu (rys. 7A). W glebie, do której dodano NLPZ w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono najniższą średnią wartość RS dla flurbiprofenu (0,62), a najwyższą dla ibuprofenu (0,86). Należy też zauważyć bardzo duże odchylenie standardowe w glebie z flurbiprofenem, co świadczy o znacznej



Rys. 7. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. (A), $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. (B), $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

zmienności wartości *RS* w trakcie trwania doświadczenia (rys. 7B). Natomiast średnie wartości *RS* fosfomonoesterazy kwaśnej po aplikacji NLPZ w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. wahały się od 0,40 (diklofenak) do 0,65 (ibuprofen) (rys. 7C).

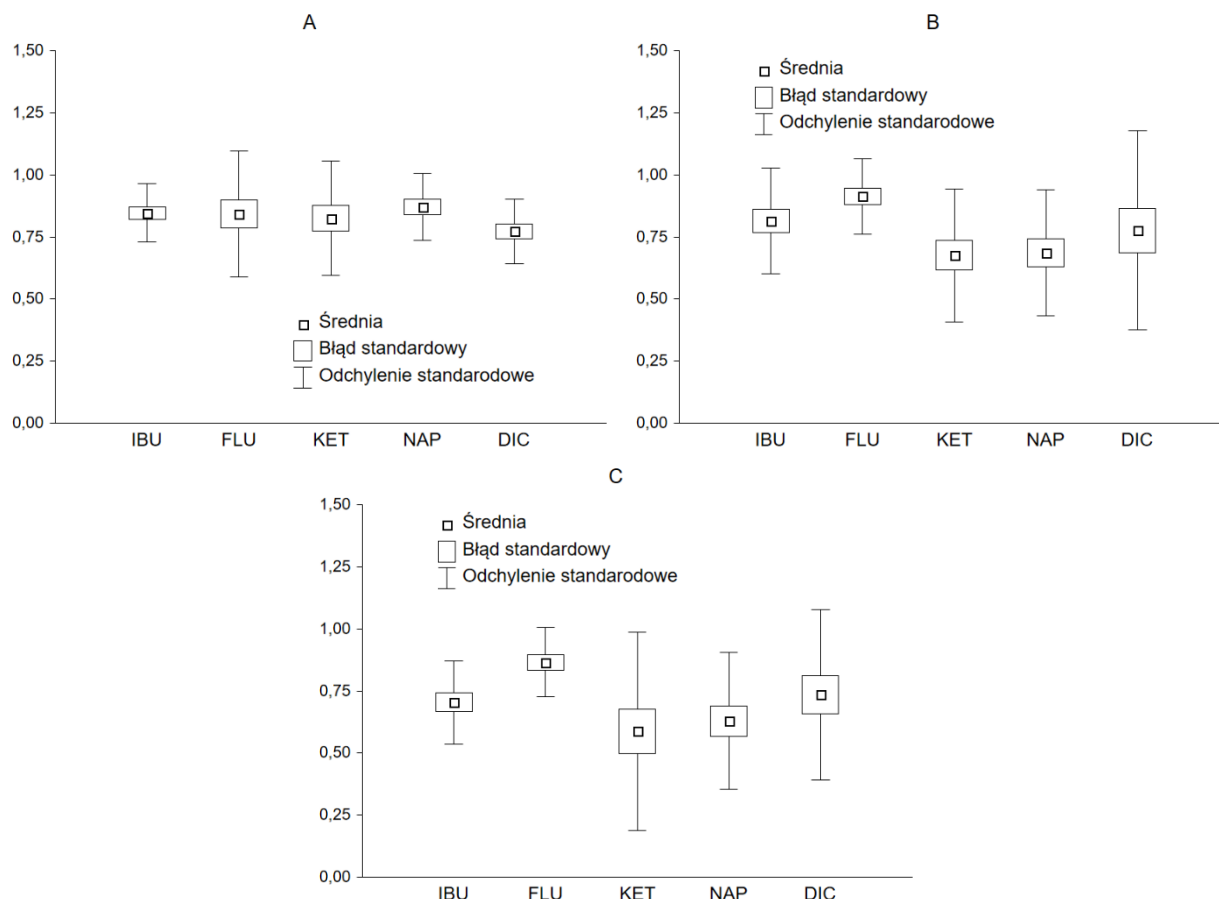
Średnie wartości *RS* fosfomonoesterazy zasadowej po aplikacji NLPZ w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. wynosiły od 0,84 dla ibuprofenu i naproksenu do 0,88 dla flurbiprofenu i diklofenaku (rys. 8A). W glebie zawierającej NLPZ w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. średnie wartości *RS* kształtowały się na poziomie od 0,68 dla diklofenaku do 0,87 dla ibuprofenu (rys. 8B). Po wprowadzeniu NLPZ w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. stwierdzono najniższe wartości współczynników oporności fosfomonoesterazy zasadowej – od 0,54 dla naproksenu do 0,77 dla flurbiprofenu (rys. 8C).



Rys. 8. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy zasadowej w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

W przypadku fosfotrieteraz średnie wartości *RS* po dodaniu NLPZ w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. kształtowały się na poziomie od 0,77 dla diklofenaku do 0,87 dla naproksenu (rys. 9A). Natomiast w glebie zawierającej NLPZ w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. średnie wartości *RS* wynosiły

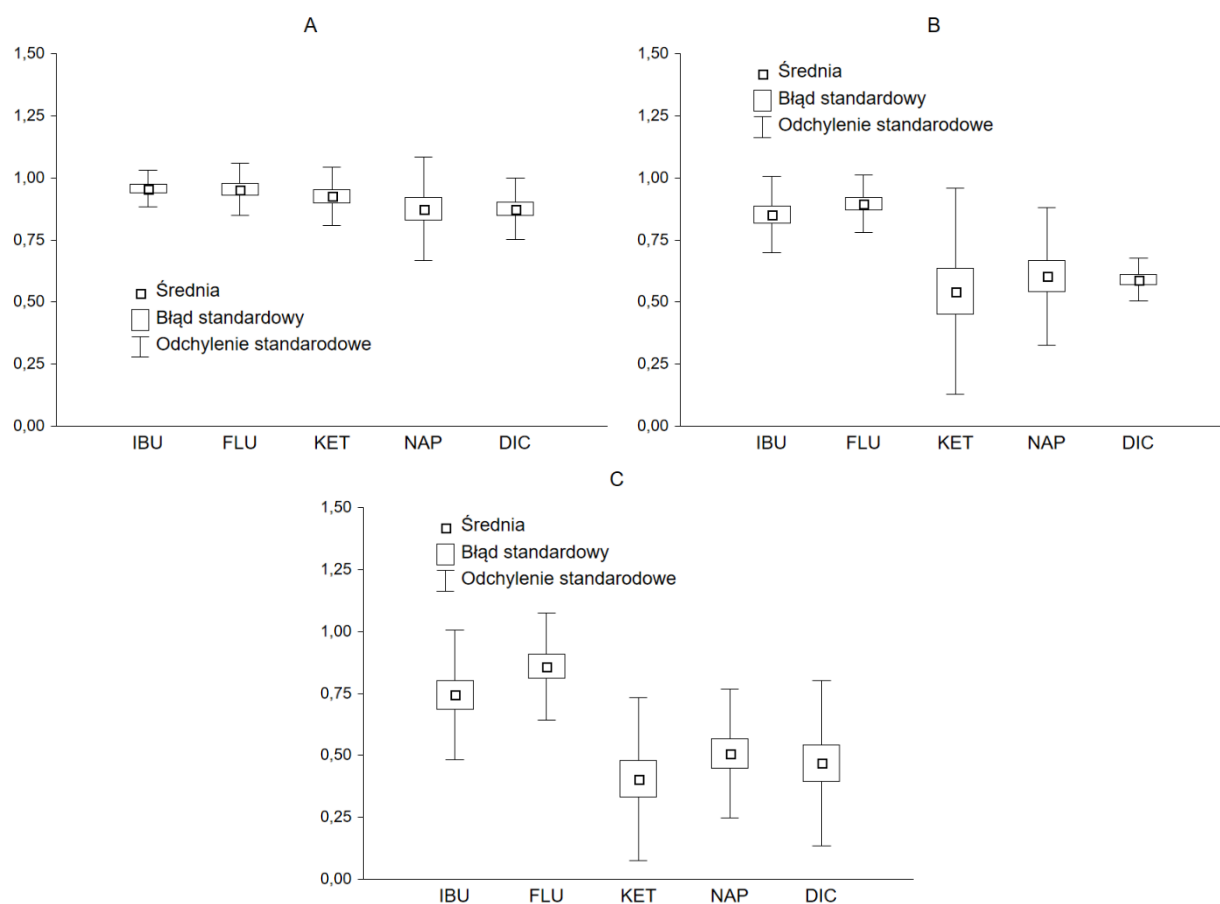
od 0,77 dla ketoprofenu do 0,91 dla naproksenu (rys. 9B). Po aplikacji NLPZ w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. średnie wartości *RS* fosfotriesteraz charakteryzowały się największą rozpiętością. Najniższą średnią wartość *RS*, wynoszącą 0,59, stwierdzono w glebie zawierającej ketoprofen, podczas gdy wartość najwyższa, na poziomie 0,87, została wykazana w glebie z dodatkiem flurbiprofenu (rys. 9C).



Rys. 9. Zmiany współczynnika oporności fosfotriesteraz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

Średnie wartości współczynników oporności pirofosfatazy nieorganicznej w glebie, do której wprowadzono NLPZ w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. kształtowały się podobnie dla wszystkich analizowanych związków: wartość najniższą 0,88 stwierdzono dla diklofenaku i naproksenu, a wartość najwyższą 0,96 dla ibuprofenu (rys. 10A). Natomiast po aplikacji NLPZ w dawkach 10 oraz 100 mg·kg⁻¹ s.m. średnie wartości *RS* dla ibuprofenu i flurbiprofenu były wyraźnie wyższe niż dla pozostałych związków. W glebie zawierającej ibuprofen wynosiły one odpowiednio dla kolejnych tych dawek 0,85 i 0,76, a w glebie z dodatkiem flurbiprofenu 0,90 i 0,86. Zastosowanie ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. spowodowało obniżenie średnich wartości współczynnika oporności

pirofosfatazy nieorganicznej, odpowiednio do 0,55, 0,60 oraz 0,59 (rys. 10B), podczas gdy po wprowadzeniu tych związków w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. wykazano, że średnie wartości *RS* wynosiły dla ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku odpowiednio 0,41, 0,51 oraz 0,47 (rys. 10C).



Rys. 10. Zmiany współczynnika oporności pirofosfatazy nieorganicznej w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

Biorąc pod uwagę analizę η^2 należy zauważyć, że w kształtowaniu wartości współczynnika oporności fosfomonoesteraz glebowych na obecność NLPZ największy procentowy udział miała dawka zastosowanego związku. W przypadku fosfomonoesterazy kwaśnej znaczący wpływ na wartości *RS* miały również interakcje pomiędzy rodzajem leku i terminem pomiaru, rodzajem leku i jego dawką oraz wszystkimi czynnikami doświadczalnymi. Natomiast dla fosfomonoesterazy zasadowej duży udział w formowaniu wartości *RS* miała również interakcja pomiędzy wszystkimi czynnikami doświadczalnymi. Analizując wyniki dla fosfotriesteraz stwierdzono, że trudno jednoznacznie wskazać jaki czynnik doświadczalny w największym stopniu kształtował wartość *RS*. Na podstawie

danych liczbowych można jednak określić, że duży udział należał do interakcji pomiędzy rodzajem leku i terminem pomiaru oraz pomiędzy wszystkimi czynnikami doświadczalnymi. Z kolei w przypadku pirofosfatazy nieorganicznej największy udział w formowaniu wartości *RS* miał rodzaj leku oraz jego dawka, a także interakcja między tymi czynnikami (tab. 8).

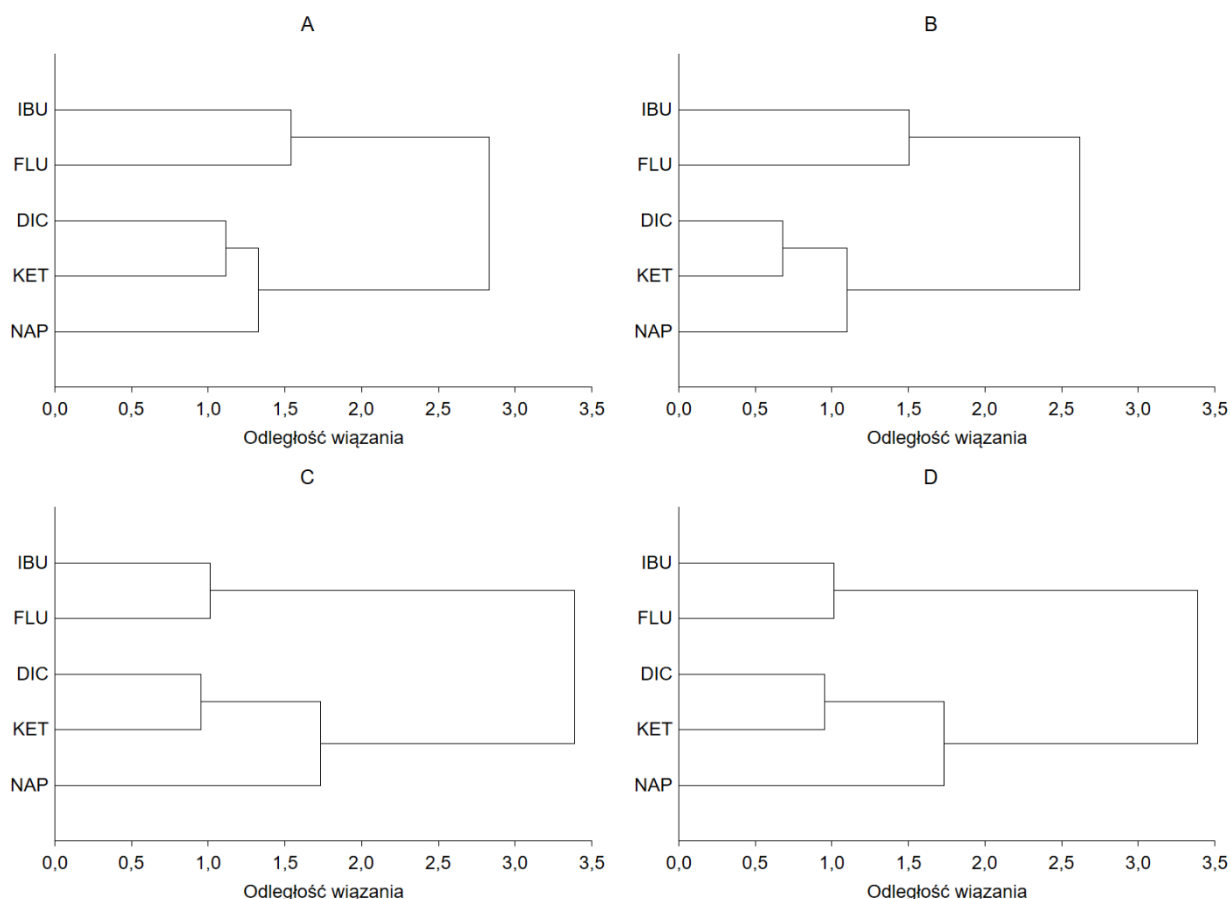
Tab. 8. Procentowy udział czynników doświadczalnych w kształtowaniu wartości współczynnika oporności (*RS*) fosfataz glebowych na obecność niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu laboratoryjnym – analiza η^2

Czynnik	Pac	Pal	PT	IPP
Rodzaj leku (L)	3,57	8,88	11,20	26,27
Dawka leku (D)	35,06	29,21	14,56	24,59
Termin pomiaru (T)	6,47	10,92	3,39	5,11
$L \times D$	12,25	10,75	9,98	16,77
$L \times T$	13,92	9,97	17,67	10,12
$D \times T$	4,36	4,96	8,27	3,87
$L \times D \times T$	13,09	17,45	17,64	8,37
Błąd	11,28	7,86	17,29	4,90

Pac – fosfomonoesteraza kwaśna, Pal – fosfomonoesteraza zasadowa, PT – fosfotriesterazy, IPP – pirofosfataza nieorganiczna

Porównanie dendrogramów analizy skupień współczynników oporności fosfataz na obecność w glebie NLPZ wykazało, że dla wszystkich oznaczanych enzymów wartości *RS* tworzą dwa relatywnie klarowne skupienia (rys. 11): wartości *RS* w glebie zawierającej ibuprofen i flurbiprofen są zbliżone do siebie (tworzą pierwsze skupienie), tak samo jak zbliżone są do siebie wartości *RS* w glebie z dodatkiem diklofenaku, ketoprofenu i naproksenu (tworzą drugie skupienie).

Na podstawie porównania wskaźników oporności oraz analizy skupień do drugiego etapu badań – określenia krótkotrwałego oddziaływania NLPZ w doświadczeniu wazonowym wybrano ibuprofen oraz naproksen (najdalej oddalone od siebie w analizie skupień), a także diklofenak.



Rys. 11. Dendrogramy analizy skupień wartości współczynników oporności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) i pirofosfatazy nieorganicznej (D) w glebie poddanej działaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych; IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

4.2. Doświadczenie wazonowe

4.2.1. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

W doświadczeniu wazonowym wprowadzenie do gleby ibuprofenu (IBU) we wszystkich dawkach spowodowało w 1. dniu doświadczenia istotne podwyższenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (tab. 9, rys. 12A). Dla dawek 1, 10 oraz 100 mg·kg⁻¹ s.m. wynosiło ono odpowiednio 23,60%, 13,93% oraz 36,85% w odniesieniu do gleby kontrolnej. Dla dawki 10 mg·kg⁻¹ s.m. istotna stymulacja aktywności enzymu utrzymała się jeszcze w 7. dniu doświadczenia (35,53% w porównaniu do kontroli), 100 mg·kg⁻¹ s.m – w 7. i 14. dniu doświadczenia (odpowiednio 53,17% i 16,93% w stosunku do gleby kontrolnej). Ponadto, po zastosowaniu IBU w najwyższej dawce, wykazano istotną statystycznie inhibicję aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej w 21. dniu doświadczenia – o 14,78% w porównaniu do kontroli.

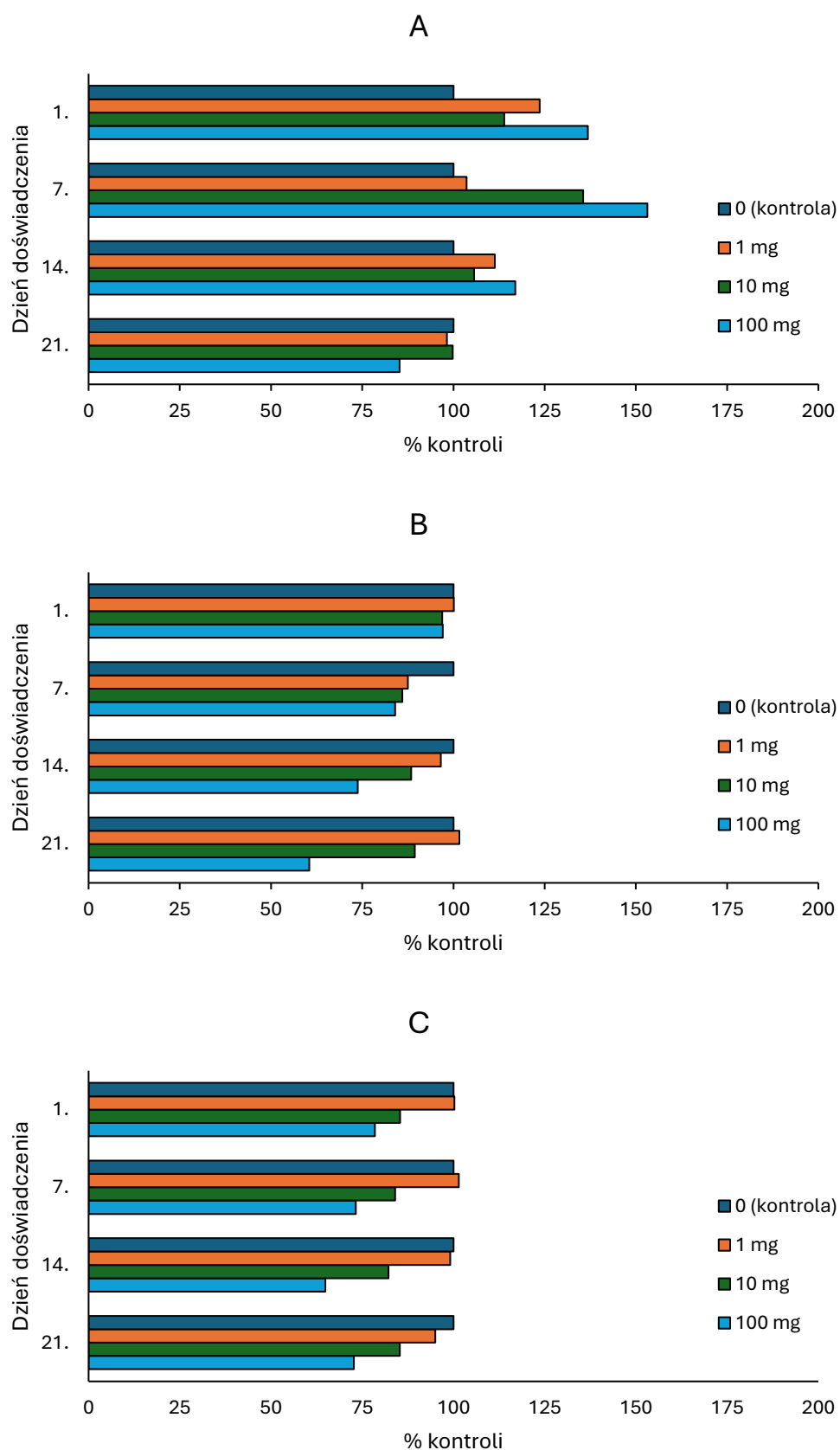
Tab. 9. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność wybranych fosfatyz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia			
	1.	7.	14.	21.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	86,52±5,63 ^c	82,73±4,07 ^c	78,32±2,70 ^b	88,25±2,62 ^a
1	106,94±5,74 ^{ab}	85,73±4,60 ^c	87,20±3,41 ^{ab}	87,53±4,77 ^a
10	98,57±2,66 ^b	112,13±2,94 ^b	82,76±4,84 ^{ab}	88,07±5,70 ^a
100	118,40±3,09 ^a	126,72±3,87 ^a	91,58±3,00 ^a	75,21±5,06 ^b
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	151,25±4,34 ^a	147,84±3,47 ^a	148,43±4,73 ^a	143,40±5,79 ^{ab}
1	151,40±5,49 ^a	129,41±4,22 ^b	143,37±4,73 ^a	145,76±6,59 ^a
10	146,60±3,73 ^a	127,15±7,05 ^b	131,27±5,31 ^b	128,24±6,87 ^b
100	146,86±3,55 ^a	124,18±6,44 ^b	109,52±3,39 ^c	87,34±6,41 ^c
Pirofosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	172,69±5,69 ^a	164,65±5,33 ^a	156,18±5,79 ^a	154,67±7,45 ^a
1	173,12±4,07 ^a	167,10±6,86 ^a	154,78±6,07 ^a	146,93±5,98 ^{ab}
10	147,39±5,59 ^b	138,44±9,22 ^b	128,34±2,43 ^b	131,86±9,89 ^{bc}
100	135,55±6,03 ^b	120,54±7,05 ^b	101,33±1,07 ^c	112,40±6,05 ^c

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$

Aktywność fosfomonoesterazy zasadowej w glebie z dodatkiem IBU we wszystkich dawkach w 1. dniu doświadczenia nie różniła się istotnie od aktywności enzymu w glebie kontrolnej. W kolejnych terminach pomiarów stwierdzono dla dawki 1 mg·kg⁻¹ s.m. istotny spadek aktywności enzymu w 7. dniu doświadczenia (o 12,47% w stosunku do kontroli), dla dawki 10 mg·kg⁻¹ s.m. – w 7. i 14. dniu doświadczenia (odpowiednio o 14,00% i 11,57% w porównaniu do kontroli), a dla dawki 100 mg·kg⁻¹ s.m. – w 7., 14. i 21. dniu doświadczenia (odpowiednio o 16,01%, 26,23% oraz 39,09% w odniesieniu do gleby kontrolnej) (tab. 9, rys. 12B).

W przypadku pirofosfatazy nieorganicznej nie wykazano istotnych zmian aktywności enzymu po aplikacji IBU w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. Natomiast w glebie, do której dodano IBU w dawce 10 oraz 100 mg·kg⁻¹ s.m. w trakcie trwania całego doświadczenia stwierdzono istotne obniżenie aktywności pirofosfatazy nieorganicznej. Wykazana inhibicja aktywności enzymu dla dawki 10 mg·kg⁻¹ s.m. kształtowała się na poziomie od 14,65% do 17,83%, a dla dawki 100 mg·kg⁻¹ s.m. wynosiła od 21,50% do 35,12% w stosunku do gleby kontrolnej (tab. 9, rys. 12C).



Rys. 12. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem ibuprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe)

4.2.2. Oddziaływanie naproksenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

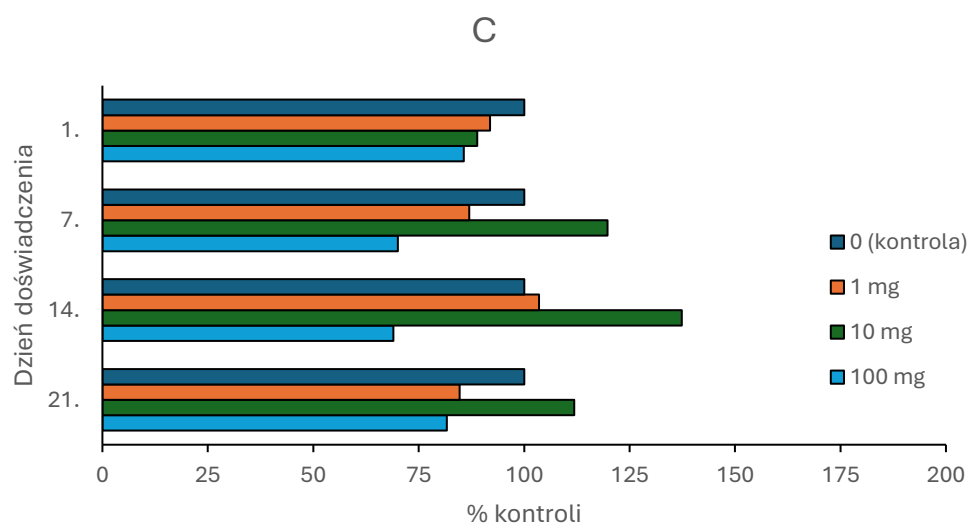
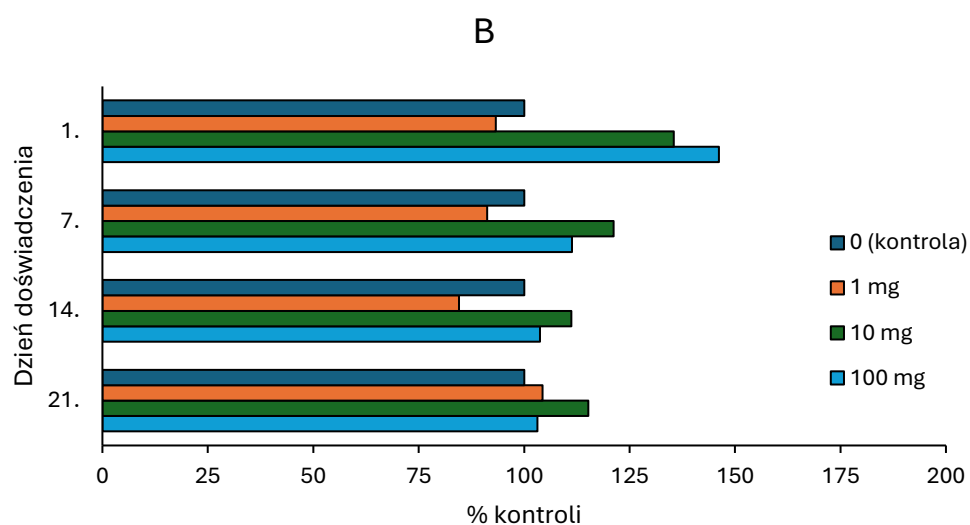
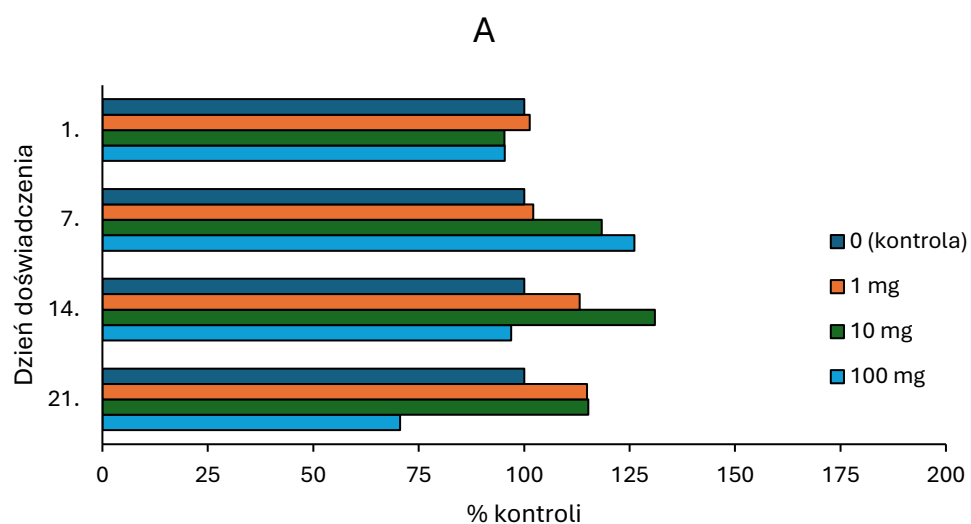
Wprowadzenie do gleby naproksenu w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ spowodowało jedynie w 21. dniu doświadczenia istotne podwyższenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (o 14,87% w odniesieniu do gleby kontrolnej). Aplikacja NAP w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wywołała natomiast stymulację aktywności enzymu od 7. dnia do końca trwania doświadczenia, na poziomie od 15,21% do 31,00% w porównaniu do kontroli. W glebie z dodatkiem NAP w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wykazano w 7. dniu doświadczenia istotny statystycznie wzrost aktywności o 26,16, a w 21. dniu doświadczenia istotny spadek aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej o 29,41% w stosunku do kontroli (tab.10, rys. 13A).

W glebie z dodatkiem NAP w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ stwierdzono istotnie obniżenie aktywności fosfomonoesterazy zasadowej tylko w 14. dniu doświadczenia (o 15,44% w odniesieniu do kontroli). Natomiast zastosowanie NAP w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$, w trakcie trwania całego doświadczenia, a w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ prawie we wszystkich terminach pomiarów (za wyjątkiem 1. dnia doświadczenia) działało hamująco na aktywność. Wykazana inhibicja aktywności dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wynosiła od 11,73% do 25,13%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ od 24,68% do 30,12% w stosunku do kontroli (tab. 10, rys. 13B).

Tab. 10. Oddziaływanie naproksenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Dawka [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$]	Dzień doświadczenia			
	1.	7.	14.	21.
Fosfomonoesteraza kwaśna [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot \text{h})^{-1}$]				
0 (kontrola)	86,52±5,63 ^a	82,73±4,07 ^b	78,32±2,70 ^b	88,25±2,62 ^b
1	87,63±4,45 ^a	84,53±4,26 ^b	88,60±4,71 ^b	101,37±5,40 ^a
10	82,48±3,37 ^a	97,95±5,31 ^a	102,61±5,75 ^a	101,67±3,42 ^a
100	82,52±3,79 ^a	104,38±4,50 ^a	75,90±6,73 ^b	62,30±3,28 ^c
Fosfomonoesteraza zasadowa [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot \text{h})^{-1}$]				
0 (kontrola)	151,25±4,34 ^a	147,84±3,47 ^a	148,43±4,73 ^a	143,40±5,79 ^a
1	141,19±4,67 ^{ab}	134,87±8,60 ^{ab}	125,54±6,74 ^b	149,63±7,31 ^a
10	133,50±5,85 ^b	121,19±6,30 ^{bc}	111,15±4,51 ^c	115,24±11,22 ^b
100	146,19±7,67 ^{ab}	111,36±7,19 ^c	103,74±4,59 ^c	103,15±4,06 ^b
Pirofosfataza nieorganiczna [$\text{mg } \text{P-PO}_4^{3-} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot \text{h})^{-1}$]				
0 (kontrola)	172,69±5,69 ^a	164,65±5,33 ^b	156,18±5,79 ^b	154,67±7,45 ^b
1	158,67±5,92 ^b	143,23±4,32 ^c	161,63±8,94 ^b	131,05±6,93 ^c
10	153,42±4,61 ^b	197,16±6,54 ^a	214,54±11,03 ^a	173,04±3,49 ^a
100	147,92±3,75 ^b	115,31±7,38 ^d	107,80±6,88 ^c	126,37±6,11 ^c

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$



Rys. 13. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem naproksenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe)

Aktywność pirofosfatazy nieorganicznej w glebie z dodatkiem NAP w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. była istotnie niższa niż w glebie kontrolnej w 1., 7. i 21. dniu doświadczenia. Podobną zależność stwierdzono po aplikacji NAP w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m., ale w tym przypadku spadek aktywności enzymu stwierdzono we wszystkich terminach pomiarów. Wykazana inhibicja aktywności dla dawki 1 mg·kg⁻¹ s.m. wynosiła od 8,12% do 15,27%, a dla dawki 100 mg·kg⁻¹ s.m. – od 14,34% do 30,98% w odniesieniu do gleby kontrolnej. Natomiast zastosowanie NAP w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. działało inhibująco na aktywność pirofosfatazy nieorganicznej w 1. dniu doświadczenia (o 11,16% w stosunku do kontroli), podczas gdy w kolejnych terminach wywołało stymulację aktywności enzymu, na poziomie od 11,88% do 37,37% w porównaniu do kontroli (tab. 10, rys. 13C).

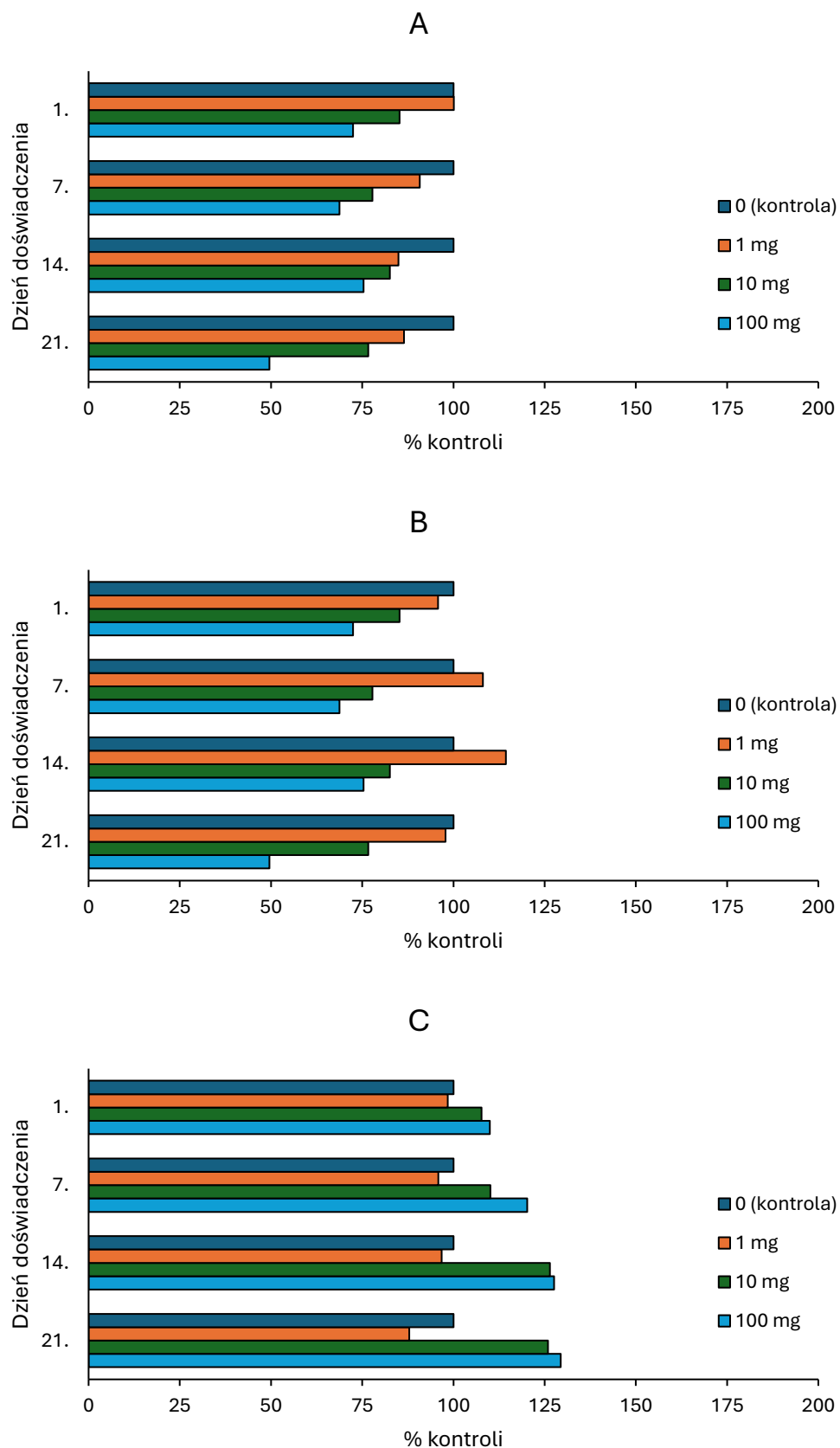
4.2.3. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Wprowadzenie w doświadczeniu wazonowym diklofenaku w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. nie spowodowało istotnych zmian aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (tab. 11, rys. 14A).

Tab. 11. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia			
	1.	7.	14.	21.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	86,52±5,63 ^a	82,73±4,07 ^a	78,32±2,70 ^a	88,25±2,62 ^a
1	86,64±6,65 ^a	75,11±6,03 ^{ab}	66,50±5,61 ^{ab}	76,31±4,89 ^{ab}
10	71,41±7,32 ^{ab}	64,37±6,03 ^{bc}	64,66±6,66 ^b	67,62±6,04 ^b
100	62,71±3,55 ^b	56,86±6,47 ^c	59,01±4,82 ^b	43,74±6,29 ^c
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	151,25±4,34 ^a	147,84±3,47 ^a	148,43±4,73 ^b	143,40±5,79 ^a
1	144,82±5,73 ^{ab}	159,82±6,21 ^a	169,83±5,92 ^a	140,31±7,27 ^a
10	133,99±4,77 ^b	126,31±7,20 ^b	114,16±6,45 ^c	112,93±3,33 ^b
100	117,98±5,85 ^c	104,14±5,02 ^c	80,59±7,99 ^d	85,33±6,71 ^c
Pirofosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	172,69±5,69 ^b	164,65±5,33 ^c	156,18±5,79 ^b	154,67±7,45 ^b
1	170,00±3,39 ^b	157,81±5,95 ^c	151,10±7,99 ^b	135,87±5,48 ^c
10	185,96±4,73 ^a	181,31±5,72 ^b	197,42±6,05 ^a	194,74±5,46 ^a
100	189,87±6,07 ^a	197,96±5,93 ^a	199,21±2,05 ^a	200,14±4,12 ^a

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$



Rys. 14. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatasy nieorganicznej (C) pod wpływem diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe)

Jednakże aplikacja tego związku w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wywołała inhibicję aktywności enzymu od 7. dnia do końca trwania doświadczenia, a w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ we wszystkich terminach pomiarów. Zaobserwowane obniżenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wynosiło od 17,45% do 23,38%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ – od 24,66% do 50,43% w stosunku do gleby kontrolnej.

Po zastosowaniu DIC w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$, jedynie w 14. dniu doświadczenia odnotowano istotną zmianę aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w stosunku do gleby kontrolnej i była to stymulacja aktywności enzymu na poziomie 14,40%. Jednakże, wprowadzenie do gleby DIC w wyższych dawkach hamowało aktywność fosfomonoesterazy zasadowej w trakcie trwania całego doświadczenia. Zaobserwowana inhibicja aktywności enzymu wynosiła dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ od 11,45% do 23,10%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ – od 22,00% do 45,71% w odniesieniu do kontroli (tab. 11, rys. 14B).

Aktywność pirofosfatazy zasadowej po dodaniu do gleby DIC w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$, tylko w 21. dniu doświadczenia była istotnie niższa niż w glebie kontrolnej (o 12,15%). Natomiast pozostałe dawki działały stymulująco na aktywność enzymu w trakcie całego doświadczenia. Wykazane podwyższenie aktywności dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ kształtowało się na poziomie od 7,69% do 26,41% a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ – od 9,95% do 29,40% (tab. 11, rys. 14C).

4.2.4. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i naproksenu na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Aplikacja mieszaniny ibuprofenu z naproksemem (IBU+NAP) w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ spowodowała w 14. dniu doświadczenia istotną inhibicję (o 14,74% w stosunku do kontroli), a w 21. dniu doświadczenia istotną stymulację (o 11,98% w odniesieniu do kontroli) aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie. W glebie zawierającej większe dawki IBU+NAP w trakcie wszystkich terminów pomiarów wykazano obniżenie aktywności w porównaniu do gleby kontrolnej. Stwierdzona inhibicja dla dawki $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wahała się od 16,70% do 36,75%, a dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ – od 29,74% do 38,88% w stosunku do kontroli (tab. 12, rys. 15A).

W przypadku fosfomonoesterazy zasadowej, po wprowadzeniu IBU+NAP w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ odnotowano, jedynie w 14. dniu doświadczenia, istotny statystycznie wzrost aktywności enzymu o 15,04% w porównaniu do kontroli. Po aplikacji IBU+NAP w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ stwierdzono w trakcie trwania całego doświadczenia podwyższenie aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w odniesieniu do gleby kontrolnej. Wykazana

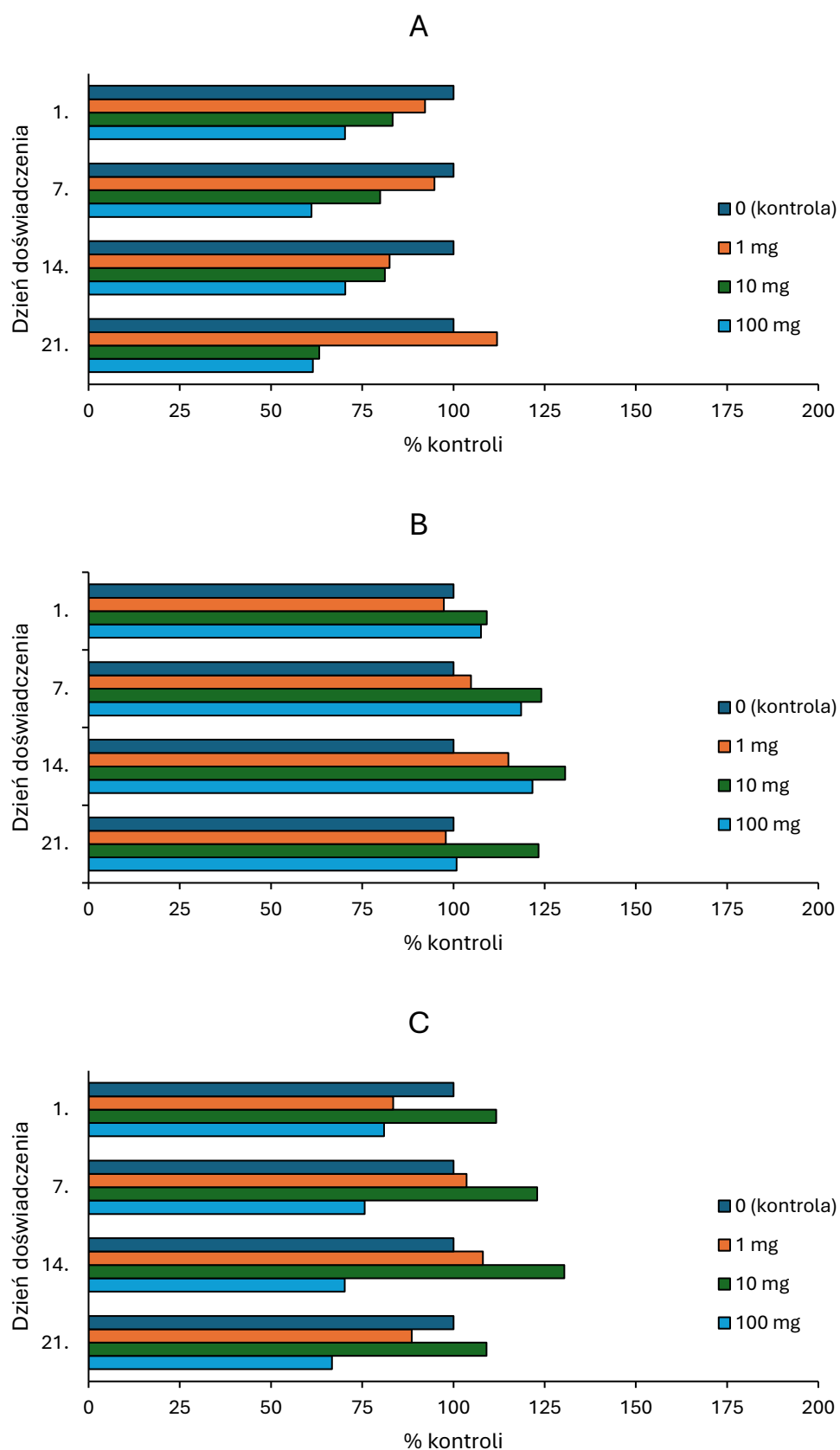
stymulacja aktywności wynosiła od 9,13% do 30,59%. W glebie z dodatkiem IBU+NAP w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ podwyższenie aktywności enzymu w porównaniu do gleby kontrolnej zaobserwowano natomiast w 7. i 14. dniu doświadczenia – wynosiło ono odpowiednio 18,51% oraz 21,65% (tab. 12, rys. 15B).

Wprowadzenie IBU+NAP w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ spowodowało istotne statystycznie obniżenie aktywności pirofosfatazy nieorganicznej w 1. oraz 21. dniu doświadczenia. Stwierdzona inhibicja aktywności wynosiła odpowiednio 16,49% oraz 11,40% w odniesieniu do kontroli. Po zastosowaniu IBU+NAP w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ wystąpiła istotna stymulacja aktywności enzymu od 1. do 14. dnia doświadczenia. Kształtowała się ona na poziomie od 11,68% do 30,39% w stosunku do gleby kontrolnej. Natomiast w glebie zawierającej IBU+NAP w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ we wszystkich terminach pomiarów wykazano istotne statystycznie obniżenie aktywności pirofosfatazy nieorganicznej w porównaniu do gleby kontrolnej. Zaobserwowana inhibicja aktywności enzymu wahała się w przedziale od 18,99% do 33,30% w stosunku do kontroli. Należy również podkreślić, że spadek aktywności enzymu pod wpływem IBU+NAP w najwyższej dawce, pogłębiał się wraz z czasem trwania doświadczenia (tab. 12, rys. 15C).

Tab. 12. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i naproksenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Dawka [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$]	Dzień doświadczenia			
	1.	7.	14.	21.
Fosfomonoesteraza kwaśna [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]				
0 (kontrola)	86,52±5,63 ^a	82,73±4,07 ^a	78,32±2,70 ^a	88,25±2,62 ^b
1	79,76±3,40 ^{ab}	78,41±4,06 ^{ab}	64,64±4,48 ^b	98,82±2,15 ^a
10	72,07±3,43 ^b	66,12±6,95 ^b	63,61±5,68 ^b	55,82±4,15 ^c
100	60,79±3,02 ^c	50,56±4,42 ^c	55,10±4,67 ^b	54,24±5,06 ^c
Fosfomonoesteraza zasadowa [$\text{mg } p\text{-NP} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]				
0 (kontrola)	151,25±4,34 ^{bc}	147,84±3,47 ^b	148,43±4,73 ^c	143,40±5,79 ^b
1	147,30±7,32 ^c	154,91±5,31 ^b	170,78±7,00 ^b	140,42±4,49 ^b
10	165,05±5,43 ^a	183,42±4,61 ^a	193,87±9,66 ^a	176,83±7,92 ^a
100	162,60±2,42 ^{ab}	175,21±4,87 ^a	180,53±6,72 ^{ab}	144,61±7,43 ^b
Pirofosfataza nieorganiczna [$\text{mg } \text{P-PO}_4^{3-} \cdot (\text{kg s.m.} \cdot 1 \text{ h})^{-1}$]				
0 (kontrola)	172,69±5,69 ^b	164,65±5,33 ^b	156,18±5,79 ^b	154,67±7,45 ^a
1	144,21±5,41 ^c	170,60±5,12 ^b	168,75±11,02 ^b	137,04±6,24 ^b
10	192,86±5,78 ^a	202,44±8,19 ^a	203,64±4,41 ^a	168,69±6,67 ^a
100	139,89±8,56 ^c	124,54±7,38 ^c	109,64±7,59 ^c	103,16±4,86 ^c

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$



Rys. 15. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem mieszanki ibuprofenu i naproksenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe)

4.2.5. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i diklofenaku na aktywność fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

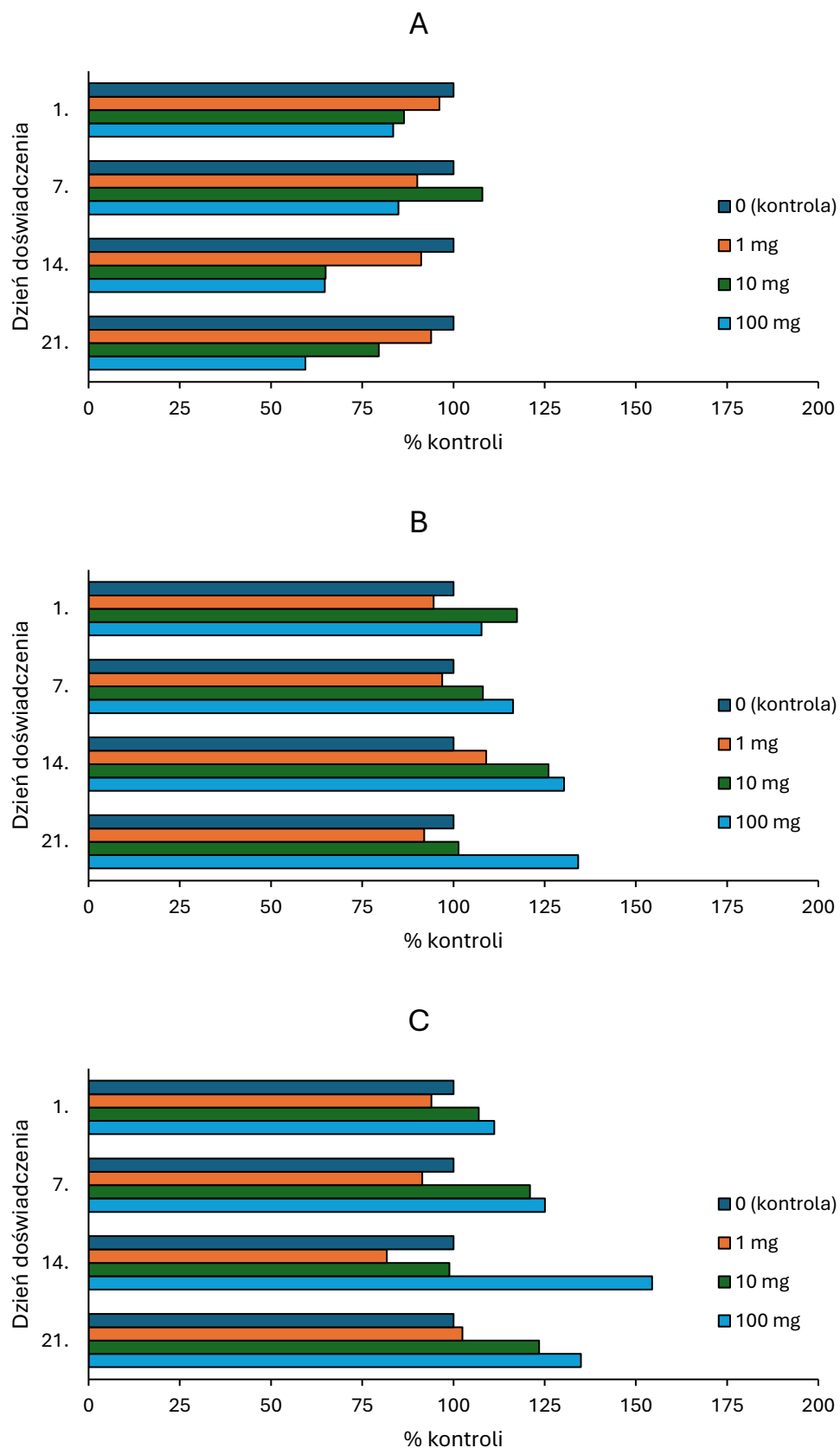
Aktywność fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie z dodatkiem mieszaniny ibuprofenu z diklofenakiem (IBU+DIC) w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. uległa jedynie w 14. dniu doświadczenia istotnemu obniżeniu w porównaniu z glebą kontrolną. Spadek ten wynosił 18,85%. Aplikacja IBU+DIC w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. spowodowała istotną inhibicję aktywności enzymu w 14. i 21. dniu doświadczenia, odpowiednio o 35,06% oraz 20,50% w odniesieniu do kontroli. Natomiast w glebie zawierającej IBU+DIC w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. w trakcie trwania całego doświadczenia stwierdzono istotnie statystycznie niższą aktywność fosfomonoesterazy kwaśnej niż w glebie kontrolnej. Wykazany spadek aktywności kształtował się na poziomie od 15,11% do 40,55% w porównaniu do kontroli (tab. 13, rys. 16A).

Tab. 13. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia			
	1.	7.	14.	21.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg p-NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	86,52±5,63 ^a	82,73±4,07 ^{ab}	78,32±2,70 ^a	88,25±2,62 ^a
1	83,20±4,06 ^{ab}	74,55±5,04 ^{bc}	63,56±5,43 ^b	82,83±5,05 ^a
10	74,82±4,50 ^{ab}	89,30±4,64 ^a	50,87±2,94 ^c	70,16±4,48 ^b
100	72,23±4,02 ^b	70,23±3,60 ^c	50,69±6,02 ^c	52,46±5,61 ^c
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg p-NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	151,25±4,34 ^{bc}	147,84±3,47 ^{ab}	148,43±4,73 ^b	143,40±5,79 ^a
1	143,08±4,19 ^c	143,30±4,75 ^b	161,85±4,96 ^b	131,91±4,46 ^a
10	177,56±5,86 ^a	159,78±7,64 ^a	187,18±5,92 ^a	145,40±6,12 ^a
100	162,94±9,69 ^{ab}	116,34±7,26 ^c	130,30±5,25 ^c	134,21±5,04 ^a
Pirofosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	172,69±5,69 ^{bc}	164,65±5,33 ^b	156,18±5,79 ^b	154,67±7,45 ^c
1	162,21±6,00 ^c	150,54±4,92 ^c	127,63±5,30 ^c	158,46±7,87 ^c
10	184,71±4,64 ^{ab}	199,15±4,09 ^a	154,43±7,92 ^b	190,99±6,73 ^b
100	191,97±8,78 ^a	205,90±6,49 ^a	241,27±7,01 ^a	208,76±4,02 ^a

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$

Po wprowadzeniu IBU+DIC w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m. nie odnotowano istotnych statystycznie zmian aktywności fosfomonoesterazy zasadowej. Natomiast zastosowanie IBU+DIC w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. spowodowało istotną stymulację aktywności enzymu w 1. oraz 14. dniu doświadczenia, która wynosiła odpowiednio 17,40% oraz 26,09%



Rys. 16. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem mieszanki ibuprofenu i diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe)

w odniesieniu do kontroli. W glebie zawierającej IBU+DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stwierdzono istotne obniżenie aktywności fosfomonoesterazy w 7. i 14. dniu doświadczenia w porównaniu do gleby kontrolnej, odpowiednio o 21,31% oraz 12,22% (tab. 13, rys. 16B).

Analizując zmiany aktywności pirofosfatazy nieorganicznej należy zauważyć istotną inhibicję aktywności enzymu po zastosowaniu IBU+DIC w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. w 7. i 14. dniu doświadczenia, odpowiednio o 8,57% i 18,28% w stosunku do kontroli. Jednakże po aplikacji IBU+DIC w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. nastąpiło istotne podwyższenie aktywności pirofosfatazy nieorganicznej w 7. i 21. dniu doświadczenia, odpowiednio o 20,96% oraz 23,48% w odniesieniu do gleby kontrolnej. Natomiast wprowadzenie IBU+DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. stymulowało aktywność enzymu we wszystkich terminach pomiarów. Zaobserwowane podwyższenie aktywności kształtowało się na poziomie od 11,17% do 54,48% (tab. 13, rys. 16C).

4.2.6. Oddziaływanie mieszaniny naproksenu i diklofenaku na aktywność fosfatyz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Wprowadzenie do gleby mieszaniny naproksenu z diklofenakiem (NAP+DIC) w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wywołało istotne podwyższenie aktywności fosfomonoesterazy zasadowej w 14. dniu doświadczenia (o 32,92% w stosunku do kontroli). Po aplikacji NAP+DIC w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. w 7. i 14. dniu doświadczenia również stwierdzono istotną statystycznie stymulację aktywności enzymu, odpowiednio o 23,54% i 44,94%. Natomiast zastosowanie NAP+DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. spowodowało istotne obniżenie aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej w 14. i 21. dniu doświadczenia, które w porównaniu do gleby kontrolnej wynosiło odpowiednio 26,49% oraz 37,16% (tab. 14, rys. 17A).

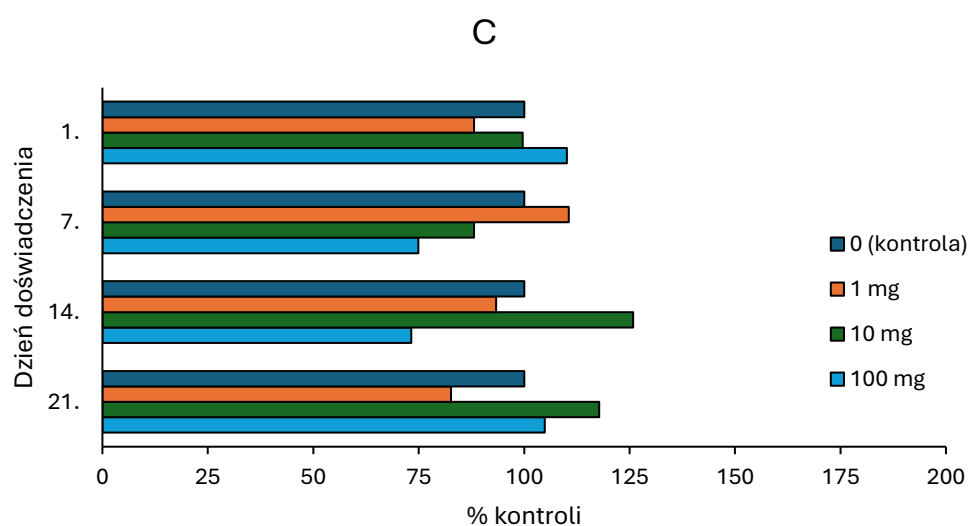
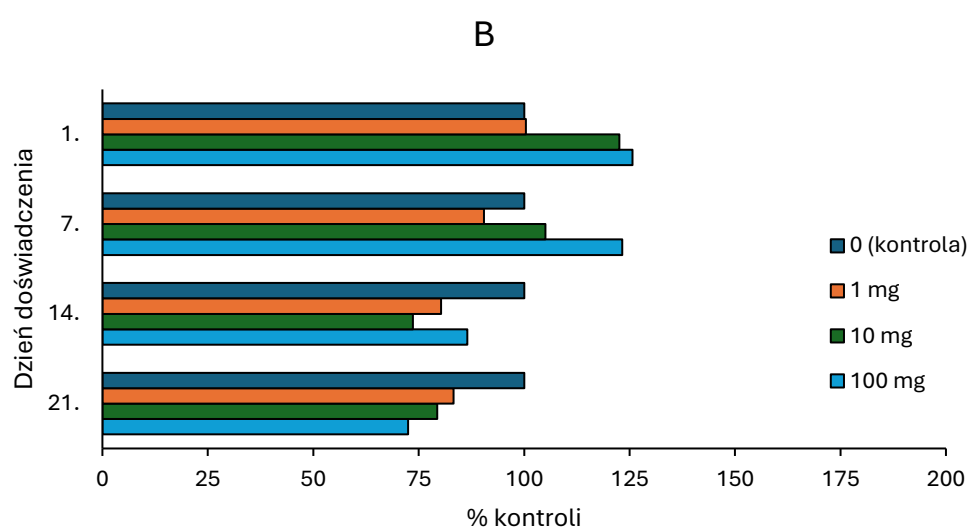
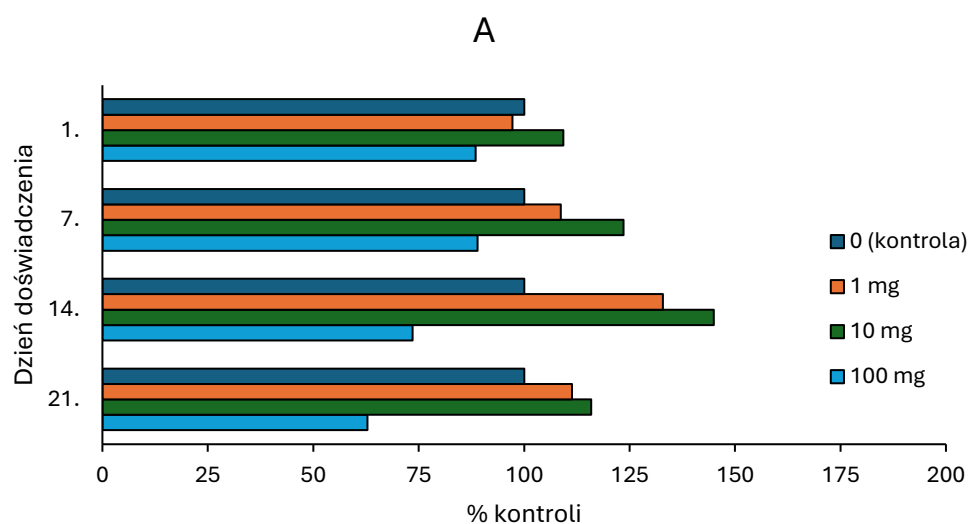
Aktywność fosfomonoesterazy zasadowej w glebie z dodatkiem NAP+DIC w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. była, od 7. dnia do końca trwania doświadczenia, istotnie statystycznie niższa niż w glebie kontrolnej. Wykazana inhibicja aktywności kształtowała się na poziomie od 9,57% do 19,67%. Wprowadzenie NAP+DIC w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. wywołało w 1. dniu doświadczenia stymulację aktywności (o 22,55% w odniesieniu do kontroli), a następnie w 14. i 21. dniu doświadczenia – spadek aktywności enzymu, odpowiednio o 26,41% oraz 20,63% w porównaniu do kontroli. Natomiast po zastosowaniu NAP+DIC w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. w 1. i 7. dniu doświadczenia odnotowano podwyższenie aktywności, odpowiednio o 25,65% i 23,27%, a w 14. i 21. dniu doświadczenia – spadek aktywności fosfomonoesterazy zasadowej, odpowiednio o 13,49% oraz 27,54% w stosunku do gleby kontrolnej (tab. 14, rys. 17B).

W przypadku pirofosfatazy nieorganicznej, w glebie zawierającej NAP+DIC w dawce 1 mg·kg⁻¹ s.m., w 1. i 21. dniu doświadczenia, stwierdzono obniżenie aktywności enzymu, odpowiednio o 11,88% oraz 17,34% w odniesieniu do gleby kontrolnej. Aplikacja NAP+DIC w dawce 10 mg·kg⁻¹ s.m. spowodowała istotny wzrost aktywności enzymu w 14. i 21. dniu doświadczenia, które wynosiło 25,87% i 17,82% w stosunku do kontroli. Natomiast po wprowadzeniu NAP+DIC w dawce 100 mg·kg⁻¹ s.m. zaobserwowano w 1. dniu doświadczenia istotną stymulację aktywności (o 10,11% w odniesieniu do kontroli), podczas gdy w 7. i 14. dniu doświadczenia wystąpiła inhibicja aktywności enzymu, odpowiednio o 25,08% oraz 26,76% w porównaniu do gleby kontrolnej (tab. 14, rys. 17C).

Tab. 14. Oddziaływanie mieszaniny naproksenu i diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym

Dawka [mg·kg ⁻¹ s.m.]	Dzień doświadczenia			
	1.	7.	14.	21.
Fosfomonoesteraza kwaśna [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	86,52±5,63 ^{ab}	82,73±4,07 ^{bc}	78,32±2,70 ^b	88,25±2,62 ^a
1	84,11±3,94 ^{ab}	89,93±4,99 ^{ab}	104,11±5,06 ^a	98,24±5,39 ^a
10	94,58±5,49 ^a	102,21±5,82 ^a	113,52±5,08 ^a	102,26±4,36 ^a
100	76,55±3,51 ^b	73,57±4,98 ^c	57,58±4,01 ^c	55,46±8,45 ^b
Fosfomonoesteraza zasadowa [mg <i>p</i> -NP·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	151,25±4,34 ^b	147,84±3,47 ^b	148,43±4,73 ^a	143,40±5,79 ^a
1	151,85±4,39 ^b	133,70±6,08 ^c	119,24±5,90 ^{bc}	119,33±6,75 ^b
10	185,36±5,54 ^a	155,32±5,40 ^b	109,25±4,10 ^c	113,82±6,76 ^b
100	190,04±5,63 ^a	182,24±3,26 ^a	128,43±2,94 ^b	103,90±4,74 ^b
Pirofosfataza nieorganiczna [mg P-PO ₄ ³⁻ ·(kg s.m.·1 h) ⁻¹]				
0 (kontrola)	172,69±5,69 ^b	164,65±5,33 ^{ab}	156,18±5,79 ^b	154,67±7,45 ^b
1	152,19±9,11 ^c	183,03±6,72 ^a	145,82±5,58 ^b	127,86±5,00 ^c
10	172,13±6,16 ^b	145,09±9,01 ^b	196,59±5,63 ^a	182,24±5,57 ^a
100	190,15±4,42 ^a	123,36±10,59 ^c	114,38±5,26 ^c	162,23±8,91 ^b

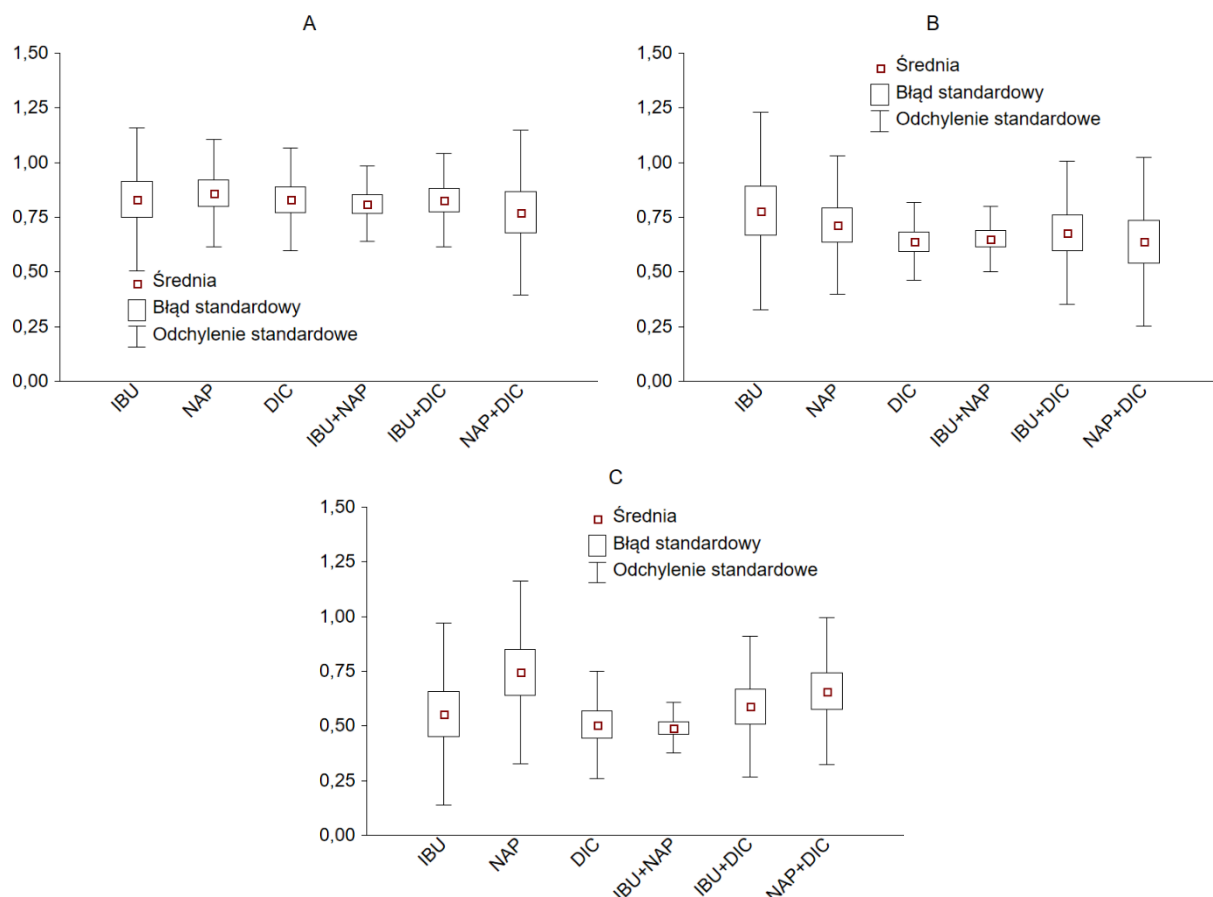
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ($n=3$) ± odchylenie standardowe; wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie określonego enzymu w danym dniu nie różnią się istotnie na poziomie $p<0,05$



Rys. 17. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem mieszaniny naproksenu i diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe)

4.2.7. Porównanie współczynników oporności fosfataz glebowych na obecność w glebie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu wazonowym

Średnie wartości współczynnika oporności fosfomonoesterazy kwaśnej po wprowadzeniu, w doświadczeniu wazonowym, NLPZ w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ kształtowały się na poziomie od 0,77 do 0,86. Najniższą wartość *RS* wykazano dla mieszaniny naproksenu z diklofenakiem, a najwyższą dla samego naproksenu (rys. 18A). Również w glebie, do której

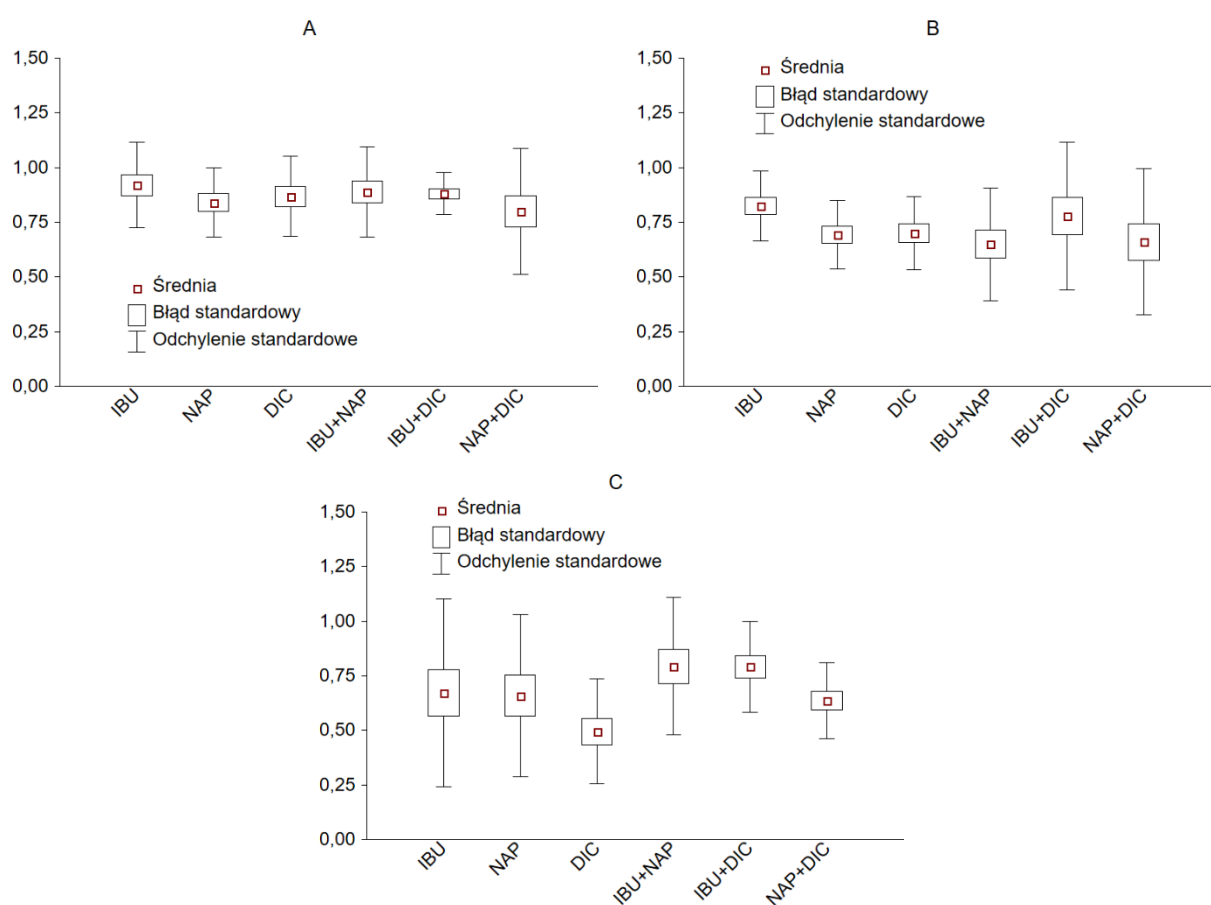


Rys. 18. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie w doświadczeniu wazonowym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (A), $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (B), $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (C); IBU – ibuprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

dodano NLPZ w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ nie stwierdzono dużych różnic pomiędzy wartościami *RS* wśród zastosowanych kombinacji NLPZ. Najniższą średnią wartość *RS* wykazano dla diklofenaku oraz mieszaniny naproksenu z diklofenakiem (0,64), a najwyższą dla ibuprofenu (0,78) (rys. 18B). Natomiast średnie wartości *RS* fosfomonoesterazy kwaśnej po aplikacji NLPZ w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ można podzielić na dwie grupy. W pierwszej grupie średnie wartości *RS* kształtowały się na poziomie około 0,5 i do tej grupy należy zaliczyć ibuprofen ($RS = 0,56$), diklofenak ($RS = 0,51$) oraz mieszaninę ibuprofenu z naproksemem

($RS = 0,49$). Lekko wyższą średnią wartość współczynnika oporności stwierdzono po wprowadzeniu ibuprofenu wraz z naproksenem ($RS = 0,59$). W drugiej grupie średnie wartości RS były wyższe i wynosiły one 0,66 dla mieszaniny naproksenu z diklofenakiem oraz 0,75 dla naproksenu (rys. 18C).

Analizując średnie wartości współczynników oporności fosfomonoesterazy zasadowej w glebie z dodatkiem NLPZ, można stwierdzić, że wprowadzenie wszystkich kombinacji związków w doświadczeniu wazonowym w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ nie spowodowało dużych zaburzeń w aktywności enzymu – średnie wartości RS wahały się w przedziale od 0,80 (mieszanina naproksenu i diklofenaku) do 0,92 (ibuprofen) (rys. 19A).

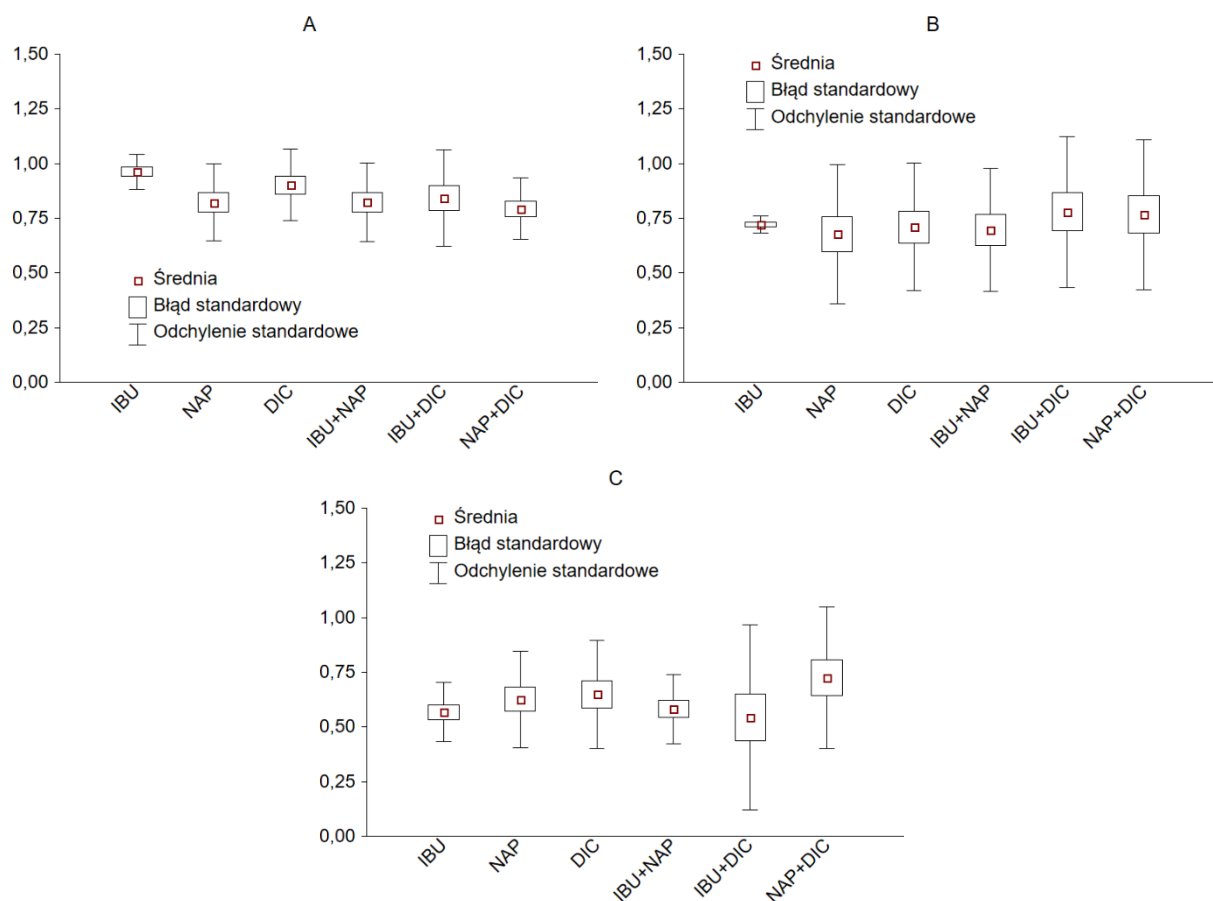


Rys. 19. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy zasadowej w glebie w doświadczeniu wazonowym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (A), $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (B), $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (C); IBU – ibuprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

Po aplikacji NLPZ w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ średnie wartości RS były w większości przypadków wyraźnie niższe. Najniższą średnią wartość RS odnotowano dla mieszaniny ibuprofenu z naproksenem (0,65), a najwyższą dla ibuprofenu (0,83) (rys. 19B). W glebie zawierającej NLPZ w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ średnie wartości RS były zazwyczaj niższe niż przy mniejszych dawkach NLPZ. Najniższe średnie wartości RS odnotowano dla diklofenaku

($RS = 0,50$), mieszaniny naproksenu z diklofenakiem ($RS = 0,63$). Natomiast najwyższe średnie wartości RS stwierdzono dla mieszaniny ibuprofenu z naproksenem oraz ibuprofenu z diklofenakiem ($RS = 0,79$) (rys. 19C).

Średnie wartości współczynnika RS pirofosfatazy nieorganicznej w glebie zawierającej NLPZ w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ kształtowały się na poziomie od $0,79$ (mieszanina naproksenu z diklofenakiem) do $0,96$ (ibuprofen) (rys. 20A). Po wprowadzeniu NLPZ w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$, średnie wartości RS dla wszystkich zastosowanych kombinacji były zbliżone do siebie: najniższą wartość odnotowano dla naproksenu ($0,68$), a najwyższą – dla mieszaniny ibuprofenu z diklofenakiem ($0,78$) (rys. 20B). Natomiast w glebie z dodatkiem NLPZ w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ najniższe średnie wartości RS stwierdzono dla mieszaniny ibuprofenu z diklofenakiem ($0,54$) oraz samego ibuprofenu ($0,57$), podczas gdy najwyższa średnia wartość RS została wykazana dla mieszaniny naproksenu z diklofenakiem ($0,73$) (rys. 20C).



Rys. 20. Zmiany współczynnika oporności pirofosfatazy nieorganicznej w glebie w doświadczeniu wazonowym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (A), $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (B), $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ (C); IBU – ibuprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak

Biorąc pod uwagę analizę η^2 należy zauważyć, że w kształtowaniu wartości współczynnika oporności oznaczanych fosfataz glebowych na obecność NLPZ największy procentowy udział miała dawka leku lub mieszaniny leków. W przypadku fosfomonoesterazy kwaśnej znaczący wpływ na wartości *RS* miały również interakcje pomiędzy rodzajem leku lub mieszaniny leków a terminem pomiaru. Natomiast dla fosfomonoesterazy zasadowej, jak również pirofosfatazy nieorganicznej duży udział w formowaniu wartości *RS* miała również interakcja pomiędzy wszystkimi czynnikami doświadczalnymi (tab. 15).

Tab. 15. Procentowy udział czynników doświadczalnych w kształtowaniu wartości współczynnika oporności (*RS*) fosfataz glebowych na obecność niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu wazonowym – analiza η^2

Czynnik	Pac	Pal	IPP
Rodzaj leku/mieszanina leków (L)	4,45	9,29	2,09
Dawka leku/mieszaniny (D)	26,42	26,14	37,86
Termin pomiaru (T)	6,57	13,98	12,57
L × D	5,45	10,76	7,45
L × T	24,06	9,44	5,21
D × T	6,87	3,05	6,70
L × D × T	12,68	17,74	19,46
Błąd	13,50	9,60	8,66

Pac – fosfomonoesteraza kwaśna, Pal – fosfomonoesteraza zasadowa, IPP – pirofosfataza nieorganiczna

5. Dyskusja

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) są jedną z najczęściej stosowanych grup leków na świecie, jak również z uwagi na ich popularność, wynikającą z dostępności bez recepty, a także wykorzystywanie w leczeniu wielu bardzo częstych dolegliwości (Paulose-Ram i in. 2005). Stanowią one niejednorodną grupę leków, zarówno pod względem budowy chemicznej, jak i efektów działania, które obejmują działania przeciwzapalne, przeciwgorączkowe i przeciwbólowe. Jednakże w przypadku poszczególnych NLPZ każdy z tych efektów występuje w różnym nasileniu lub nie występuje w ogóle (Zaremba i in. 2012). Pomimo korzyści terapeutycznych, NLPZ stwarzają problemy środowiskowe ze względu na ich potencjalną ekotoksyczność (Gorg 2022). Mogą one przedostać się do ekosystemów między innymi poprzez zrzut ścieków, gdyż usunięcie NLPZ za pomocą konwencjonalnego oczyszczania ścieków jest problematyczne (Lakshmi i in. 2024). Według Ratnasari i in. (2024) obecność niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w różnych środowiskach stanowi poważne wyzwanie ze względu na ich powszechną obecność, złożoność i szkodliwe skutki dla środowiska i zdrowia ludzi. Jak podają Zhou i in. (2023) konieczne jest zatem poszukiwanie markerów ekotoksyczności NLPZ, jak również opracowanie dokładnych, wrażliwych i skutecznych metod ich oznaczania oraz oceny ekologicznych i ekonomicznych skutków obecności tych związków w środowisku.

Wielu autorów podaje, że jednym z najlepszych wskaźników zanieczyszczenia gleby jest jej aktywność enzymatyczna (Płatkowski i Telesiński 2016b, Telesiński i in. 2018a, Lemanowicz 2019, Cui i in. 2021, Wolejko i in. 2022, Rashid i in. 2023). Fosfatazy glebowe odgrywają kluczową rolę w cyklu biogeochemicznym fosforu, a produkcja tych enzymów w glebie jest najważniejszą biologiczną strategią pozyskiwania jonów fosforanowych z cząsteczek organicznych (Margalef i in. 2021). W wyniku mineralizacji organicznych połączeń fosforu, katalizowanych przez fosfatazy, zwiększa się dostępność tego pierwiastka dla roślin i organizmów glebowych (Janes-Basset i in. 2022).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że najczęściej obserwowanym efektem oddziaływania niesteroidowych leków przeciwzapalnych była inhibicja aktywności fosfataz glebowych. Cycoń i in. (2016) wykazali natomiast, że zastosowanie ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku w dawce $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{s.m.}$ głównie spowodowało stymulację aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej oraz fosfomonoesterazy zasadowej. Jednakże w początkowym okresie obecności w glebie NLPZ obserwowano również hamowanie aktywności oznaczanych enzymów, zwłaszcza po wprowadzeniu naproksenu, ibuprofenu i ketoprofenu. W badaniach tych autorów stwierdzono ponadto, że dodanie do

gleby NLPZ w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ w niewielkim stopniu oddziaływało na aktywność fosfomonoesteraz glebowych. Jest to zbieżne z wynikami badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Natomiast Gallego i in. (2021) wykazali podwyższenie aktywności fosfomonoesteraz pod wpływem walsartanu. Kovacs i in. (2024) ponadto odnotowali, że ibuprofen i diklofenak, zastosowane osobno i w mieszaninie, obniżały zawartość fosfolipidów w glebie.

Niestety aktualnie niewiele jest doniesień odnośnie oddziaływania NLPZ na aktywność fosfataz glebowych. Można jednak znaleźć artykuły opisujące wpływ innych leków, głównie antybiotyków na aktywność fosfatazową gleby. W zależności od struktury chemicznej badanego związku, rodzaju gleby, a także czasu ekspozycji stwierdzano zarówno inhibicję, jak i stymulację aktywności fosfataz. Obniżenie aktywności fosfataz po wprowadzeniu do gleby sulfometaksozolu, sulfometazyny oraz trimetoprimu po dwudziestodwudniowym doświadczeniu wykazali Liu i in. (2009). Podobny efekt dla benzylopenicyliny, ampicyliny, streptomycyny oksytetracykliny, tylozyny, farmazyny, tromeksyny oraz nystatyny odnotowała Akimenko (2021). Również Telesiński i in. (2018b) opisali hamujące oddziaływanie polimyksyny B i penicyliny G na aktywność fosfomonoesteraz glebowych. Natomiast podwyższenie aktywności fosfomonoesterazy zasadowej pod wpływem sulfapirydyny wykazali Molaei i in. (2017). O stymulującym oddziaływaniu tetracykliny na aktywność fosfatazową gleby donoszą również Santas-Miguel i in. (2021).

W literaturze dotyczącej ekotoksykologicznych aspektów obecności NLPZ w środowisku można znaleźć pozycje odnośnie wpływu tych związków na różne parametry mikrobiologiczne gleb, w tym na aktywność innych enzymów glebowych. Cycoń i in. (2016) stwierdzili obniżenie aktywności dehydrogenaz pod wpływem ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu i diklofenaku, podczas gdy związki te działały stymulująco na aktywność ureazy oraz procesy nitryfikacji i amonifikacji. O podwyższeniu aktywności dehydrogenaz, β -glukozydazy, ureazy oraz proteaz po wprowadzeniu do gleby walsartanu donoszą również Gallego i in. (2021). Natomiast Kovacs (2020) zaobserwował inhibicję aktywności dehydrogeanz spowodowaną obecnością w glebie ibuprofenu, ketoprofenu oraz diklofenaku. Podobną zależność wykazali Monteiro i Boxall (2010) dla naproksenu. We wszystkich przytoczonych powyżej badaniach wielkość zaobserwowanego efektu była zależna od wielkości dawki, rodzaju leku oraz czasu ekspozycji. Również w badaniach własnych stwierdzono, że na oddziaływanie NLPZ na aktywność fosfataz glebowych miały

wpływ te czynniki. Przeprowadzona analiza η^2 wykazała ponadto, że czynnikiem, który w największym stopniu wpływał na aktywność oznaczanych enzymów była dawka leku.

Do interesujących wniosków doszła Akimenko (2021), badając oddziaływanie antybiotyków na aktywność enzymów glebowych. Wykazała ona, że enzymy oksydoredukcyjne są bardziej wrażliwe na obecność w glebie farmaceutyków, niż enzymy hydrolityczne. Wśród analizowanych enzymów to właśnie fosfatazy w najmniejszym stopniu reagowały na skażenie gleby lekami. Może to wynikać z faktu, że w szlakach biodegradacji ksenobiotyków, w tym antybiotyków i NLPZ, oksydoreduktazy stanowią ważny element (Stadler i Love 2016, Batucan i in. 2022, Wang i in. 2022, Ferreira i in. 2023). Dodatkowo enzymy hydrolityczne, w tym fosfatazy w glebie są unieruchomione przez organiczne i nieorganiczne koloidy glebowe, które chronią je przed degradacją (Huang i in. 2009). Pewna część wolnych fosfataz może być także stabilizowana przez adsorpcję na kwasach próchnicznych, które pomimo wpływu na ich potencjał katalityczny mogą utrzymywać aktywność fosfataz w glebie (Badiane i in. 2001). Jednakże NLPZ mogą również ulegać sorpcji na koloidach glebowych, a przez to pośrednio oddziaływać na aktywność fosfataz i innych enzymów glebowych (Yu i in. 2011, Vulava i in. 2016, Zhang i in. 2017).

Porównanie wyników prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej pozwala stwierdzić, że wśród analizowanych enzymów, najbardziej wrażliwe na obecność w glebie NLPZ okazały się fosfomonoesteraza zasadowa oraz pirofosfataza nieorganiczna. Trudno jednoznacznie stwierdzić dlaczego te enzymy w największym stopniu reagowały na obecność w glebie NLPZ. W przypadku pirofosfatazy nieorganicznej wielokrotnie występowała stymulacja aktywności, zwłaszcza w doświadczeniu wazonowym. Jak podają Cycoń i in. (2016) podwyższenie aktywności fosfataz w glebie zawierającej NLPZ może wynikać ze zmian w strukturze mikroflory glebowej i wzrostu zawartości drobnoustrojów, które wydzielają znaczące ilości tych enzymów. Dodatkowo mikroorganizmy te mogą wykazywać zdolność do degradacji NLPZ (Marco-Urrea i in. 2010, Rodarte-Morales i in. 2012). Wielu autorów wykazało istotną rolę mikroorganizmów w transformacji NLPZ i innych farmaceutyków w glebach (Girardi i in. 2013, Nowak i in. 2013, Al.-Rajab i in. 2015, Rastogi i in. 2021, Marchlewicz i in. 2023, Ratnasari i in. 2024).

Należy także podkreślić, że zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej i fosfomonoestrasy zasadowej mogą być wskaźnikami zmian w odczynie gleby (Dick i in. 2000). Wprawdzie w niniejszej pracy nie analizowano pH gleby, ale zmiany w odczynie mogą również wpływać na potencjał biodegradacyjny, jak również sorpcję NLPZ w glebie (Vulava i in. 2016, Kumaki i in. 2017, Rastogi i in. 2021). Jak podają Ratnasari i in. (2024)

mikroorganizmy acidofilne wykazują duże zdolności do degradacji związków farmaceutycznych. Wykorzystują one te związki jako jedyne źródła węgla i energii, przekształcając je w inne bioprodukty.

Na podstawie przeprowadzonych badań trudno jednoznacznie wskazać, który z analizowanych NLPZ w największym stopniu oddziaływał na aktywność oznaczanych fosfataz. Wydaje się jednak, że zaobserwowane zmiany pod wpływem diklofenaku były najbardziej znaczące. Jest to zbieżne z wynikami Cyconia i in. (2016), którzy badali oddziaływanie różnych NLPZ na aktywność różnych enzymów i parametry mikrobiologiczne gleby. Może to być wynikiem struktury chemicznej tego związku (wśród analizowanych leków była to jedyna pochodna kwasu octowego). Dodatkowo Pawłowska i in. (2021), porównując wpływ diklofenaku i naproksenu na śmiertelność i ruchliwość *Heterocypris incongruens*, wykazali większą toksyczność diklofenaku.

W niniejszej rozprawie doktorskiej w doświadczeniu wazonowym porównywano również krótkotrwałe oddziaływanie NLPZ i ich mieszanin na aktywność fosfataz glebowych. Trudno jednoznacznie wskazać czy wystąpiły synergistyczne, czy antagonistyczne interakcje w oddziaływaniu NLPZ na analizowane enzymy glebowe. Niestety wśród dostępnych danych literaturowych nie znaleziono pozycji opisujących wpływ mieszanin NLPZ na enzymy glebowe. Jednakże zmiany w procesach biochemicznych, zachodzących w glebie mogą oddziaływać na rosnące w niej rośliny. Wykazano negatywny wpływ mieszanin NLPZ na wzrost, rozwój i procesy biochemiczne w różnych gatunkach roślin: ibuprofenu i ketoprofenu w siewkach jęczmienia zwyczajnego *Hordeum vulgare* (Pawłowska i in. 2021), diklofenaku i naproksenu w siewkach kukurydzy zwyczajnej *Zea mays* (Siemieniuk i in. 2021) oraz siewkach jęczmienia zwyczajnego *H. vulgare* (Pawłowska i in. 2023), a także w siewkach pora *Allium porrum* i grochu siewnego *Pisum sativum* (Kummerova i in. 2024). Przyniesione badania wskazują również, że obecność w glebie NLPZ jest czynnikiem stresogennym, indukującym zmiany parametrów stresu oksydacyjnego w roślinach.

W przedstawionej rozprawie doktorskiej wykazano, że NLPZ: ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproksen i diklofenak stanowią zagrożenie dla środowiska glebowego i powodują zaburzenia w aktywności fosfataz, a co za tym idzie w metabolizmie związków fosforowych i cyklu biogeochemicznym fosforu. Jest to istotne, gdyż zawartość form przyswajalnych tego pierwiastka jest czynnikiem limitującym wzrost i rozwój roślin. Niestety większość prowadzonych badań skupia się głównie na ocenie ekotoksyczności NLPZ w środowisku wodnym. Nadal stosunkowo niewiele jest badań nad zachowaniem się NLPZ w glebie i ich oddziaływaniem na właściwości mikrobiologiczne, biochemiczne oraz

fizyczno-chemiczne gleb. Dlatego też konieczna jest dalsza analiza zmian wywołanych obecnością NLPZ, uwzględniająca zarówno wpływ tych związków, jak i ich metabolitów, a także próba określenia możliwości ograniczenia toksycznego działania tych substancji.

6. Wnioski i stwierdzenia

1. Porównanie długotrwałego oddziaływania w doświadczeniu laboratoryjnym, jak i oddziaływania krótkotrwałego w doświadczeniu wazonowym, niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofenu, flurbiprofenu, ketoprofenu, naproksenu oraz diklofenaku, wykazało, że najczęściej obserwowanym efektem była inhibicja aktywności fosfataz glebowych.
2. Wprowadzenie do gleby niesteroidowych leków przeciwzapalnych w dawce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby bardzo często nie wpływało istotnie na aktywności oznaczanych enzymów lub spowodowało niewielkie podwyższenie aktywności fosfataz. Natomiast dla dawek 10 oraz $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby najczęściej obserwowane obniżenie aktywności fosfataz glebowych zwiększało się wraz ze wzrostem dawki niesteroidowych leków przeciwzapalnych.
3. Najbardziej wrażliwymi fosfatazami glebowymi na obecność niesteroidowych leków przeciwzapalnych, zarówno w doświadczeniu laboratoryjnym, jak i wazonowym okazały się: fosfomonoesteraza zasadowa oraz pirofosfataza nieorganiczna.
4. Trudno jednoznacznie wskazać, który z badanych związków w największym stopniu oddziaływał na aktywność fosfataz glebowych. Można jednak stwierdzić, że w wielu przypadkach największy wpływ na aktywność fosfatazową gleby stwierdzono dla diklofenaku, a najmniejszy dla ibuprofenu. Potwierdziła to również przeprowadzona analiza skupień.
5. Współczynniki oporności fosfataz glebowych w bardzo dobry sposób obrazują zaburzenia w homeostazie gleby pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Stwierdzone dysfunkcje w metabolizmie związków fosforowych pogłębiały się wraz ze wzrostem dawki leku.
6. Przeprowadzona analiza wielkości efektu wykazała, że czynnikiem doświadczalnym, w największym stopniu wpływającym na aktywność fosfataz glebowych, zarówno w badaniach laboratoryjnych, a także wazonowych, była dawka niesteroidowych leków przeciwzapalnych.
7. W ocenie krótkotrwałego wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofenu, naproksenu i diklofenaku oraz ich mieszanin, trudno jednoznacznie określić czy wystąpiły synergistyczne, czy antagonistyczne interakcje w oddziaływaniu tych związków na aktywność fosfataz w glebie.

8. Konieczna jest dalsza analiza oddziaływania niesteroidowych leków przeciwzapalnych na metabolizm związków fosforowych w glebie, uwzględniająca również możliwości ograniczenia działania tych związków na środowisko glebowe.

Bibliografia

1. Adetunji A.T., Lewu F.B., Mulidzi R., Ncube B., 2017. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *J. Soil Sci. Plant. Nutr.* 17(3): 794-807.
2. Akimenko Y. 2021. Influence of pollution by antibiotics on biological properties of soils (through the example of ordinary chernozem). *Water Air Soil Pollut.* 232: 232.
3. Al-Rajab A.J., Sabourin L., Lapen D.R., Topp E. 2015. Dissipation of triclosan, triclocarban, carbamazepine and naproxen in agricultural soil following surface or sub-surface application of dewatered municipal biosolids. *Sci. Total Environ.* 51: 480-488.
4. Bacsi I., B-BereS V., Kokai Z., Gonda S., Novak Z., Nagy S.A., Vasas G. 2016. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages. *Environ. Pollut.* 212: 508-518.
5. Baćmaga M., Borowik A., Kucharski J., Tomkiel M., Wyszowska J. 2014. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with a mixture of diflufenican+mesosulfuron-methyl+iodosulfuron-methyl-sodium. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22: 643-656.
6. Badiane N.N.Y., Chotte J.L., Pate E., Masse D., Rouland C. 2001. Use of soil enzyme activities to monitor soil quality in natural and improved fallows in semi-arid tropical regions. *Appl. Soil Ecol.* 18: 229-238.
7. Bandyopadhyay S., Maiti S.K. 2021. Different soil factors influencing dehydrogenase activity in mine degraded lands-state-of-art review. *Water Air Soil Pollut.* 232: 360.
8. Batucan N.S.P., Tremblay L.A., Northcott G.L., Matthaei C.D. 2022. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environ. Adv.* 7: 100164.
9. Bavumiragira J.P., Ge J., Yin H. 2022. Fate and transport of pharmaceuticals in water systems: A processes review. *Sci. Total Environ.* 823: 153635.
10. Baykov A.A., Anashkin V.A, Malinen A.M., 2021. Good-practice non-radioactive assays of inorganic pyrophosphatase activities. *Molecules* 26: 2356.
11. Bielińska E.J. 2005. Oznaczanie aktywności fosfataz. *Acta Agrophys. Rozprawy i Monografie* 3: 63-74
12. Bielińska E.J., Futa B., Bik-Mołodzińska M., Szewczuk C., Sugier D. 2013. Wpływ preparatów użyźniających na aktywność enzymatyczną gleb. *J. Res. Appl. Agric. Engin.* 58(3): 15-19.
13. Bielińska E.J., Patkowski K., Futa B., Gruszecki T.M. 2017. Wpływ wypasu na środowisko glebowe. *Wiad. Zootech.* 55(5): 185-188.

14. Błońska E. 2011. Enzymy glebowe i ich znaczenie w ocenie aktywności biologicznej gleb leśnych na przykładzie rezerwatów przyrody nizin i wyżyn Polski. *Rocz. Glebozn.* 62(4): 163-172.
15. Bogati K., Walczak M. 2022. The impact of drought stress on soil microbial community, enzyme activities and plants. *Agronomy* 12(1): 189.
16. Borowik A., Wyszowska J., Kucharski M., Kucharski J. 2020. The role of *Dactylis glomerata* and Diesel oil in the formation of microbiome and soil enzyme activity. *Sensors* 20: 3362.
17. Borowik A., Wyszowska J., Zaborowska M., Kucharski J. 2024. Soil enzyme response and calorific value of *Zea mays* used for the phytoremediation of soils contaminated with Diesel oil. *Energies* 17: 2552.
18. Buer J.K. 2014. Origins and impact of the term 'NSAID'. *Inflammopharmacology* 22: 263-267.
19. Cui Y., Wang X., Zhang X., Fang L. 2021. Evaluation methods of heavy metal pollution in soils based on enzyme activities: A review. *Soil Ecol. Lett.* 3: 166-179.
20. Cunha D.L., Araujo F.G., Marques M. 2017. Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment analytical methods, and ecotoxicity – a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24: 24076-24091.
21. Cycoń M., Borymski S., Żołnierczyk B., Piotrowska-Seget Z. 2016. Variable effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on selected biochemical processes mediated by soil microorganisms. *Front. Microbiol.* 7: 1969.
22. Dick W.A., Cheng L., Wang P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biol. Biochem.* 32(13): 1915-1919.
23. Dick W.A., Tabatabai M.A. 1978. Inorganic pyrophosphatase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.* 10: 59-65.
24. Ebele A.J., Abdallah M.A.-E., Harrad S. 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 3(1): 1-16.
25. Eivazi F., Tabatabai M.A. 1977. Phosphatases in soil. *Soil Biol. Biochem.* 9: 167-172.
26. Ferreira B.L., Ferreira D.P., Borges S.F., Ferreira A.M., Holanda F.H., Ucella-Filho J.G.M., Cruz R.A.S., Birolli W.G., Luque R., Ferreira I.M. 2023. Impact of microbial physiology and microbial community structure on pharmaceutical fate driven by dissolved oxygen concentration in nitrifying bioreactors. *Front. Microbiol.* 14: 1207664.

27. Furtak K., Gajda A.M. 2018. Biochemical methods for the evaluation of the functional and structural diversity of microorganisms in the soil environment. *Post. Mikrobiol.* 57(2): 194-202.
28. Futa B. 2015. Wpływ śmietników miejskich na właściwości chemiczne i biochemiczne gleb. *Inż. Ekol.* 43: 94-99.
29. Gacki M. 2015. Niesteroidowe leki przeciwzapalne – dawniej i dziś. *Eliksir* 2: 31-34.
30. Gallego S., Nos D., Montemurro N., Sanchez-Hernandez J.C. Perez S., Sole M., Martin-Laurent F. 2021. Ecotoxicological impact of the antihypertensive valsartan on earthworms, extracellular enzymes and soil bacterial communities. *Environ. Pollut.* 275: 116647.
31. Gałązka A., Gawryjółek K., Perzyński A., Gałązka R., Księżak J. 2017. Changes in enzymatic activities and microbial communities in soil under long-term maize monoculture and crop rotation. *Pol. J. Environ. Stud.* 26(1): 39-46.
32. Gałązka A., Grządział J. 2018. Fungal genetics and functional diversity of microbial communities in the soil under long-term monoculture of maize using different cultivation techniques. *Front. Microbiol.* 9: 76.
33. Gavrilescu M. 2021. Water, soil, and plants interactions in a threatened environment. *Water* 13: 2746.
34. Girardi C., Nowak K.M., Carranza-Diaz O., Lewkow B., Miltner A., Gehre M., Schäffer A., Kästner M. 2013. Microbial degradation of the pharmaceutical ibuprofen and the herbicide 2,4-D in water and soil - use and limits of data obtained from aqueous systems for predicting their fate in soil. *Sci. Total Environ.* 444: 3242.
35. Gibczyńska M., Lewandowska L. 2005. Zawartość frakcji fosforu i aktywność fosfatazy w glebie inkubowanej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 505: 129-135.
36. Gorg B. 2022. Non-steroidal anti-inflammatory drug's potential for ecotoxicity. *J. Drug. Ecotox.* 5(2): 14-15.
37. Goździewicz-Biechońska J. 2018. Przeciwdziałanie degradacji ziemi i gleby jako globalne wyzwanie dla prawa. *Przegl. Prawa Rol.* 1(22): 41-57.
38. Guzik U., Hupert-Kocurek K., Mazur A., Wojcieszewska D. 2013. Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku. *Bromatol. Chem. Toksykol.* 46(1): 105-112.
39. Gworek B., Kijeńska M., Wrzosek J., Graniewska M. 2021. Pharmaceuticals in the soil and plant environment: a review. *Water Air Soil Pollut.* 232: 145.

40. Handzel A., Królczyk J.B., Latawiec A.E., Pluta K., Malina D., Sobczak- Kupiec A. 2017. Analiza właściwości fizykochemicznych gleb i oznaczanie zawartości wybranych pierwiastków. Infr. Ekol. Ter. Wiej. 1/2/2017: 419-432.
41. Hawrot M., Nowak A. 2004 Ocena wpływu dawki skażenia olejem napędowym i stosowanych zabiegów bioremediacyjnych na ilość biomasy żywych organizmów w glebie. Folia Univ. Agric. Stetin. Ser. Agricultura 234(93): 123-130.
42. Harshkova D., Aksmann A. 2019. Zanieczyszczenie środowiska niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi na przykładzie diklofenaku – przyczyny, skutki, bioindykacja. Kosmos 68(1): 185194.
43. He L., Rodrigues J.L.M., Soudzilovskaia N.A., Barcelo M., Olsson P.A. Song C. Tedersoo L., Yuan F., Yuan F., Lipson D.A., Xu X. 2020. Global biogeography of fungal and bacterial biomass carbon in topsoil. Soil Biol. Biochem. 151: 108024.
44. Hoeger B., Kollner B., Dietrich D.R., Hitzfeld B. 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta* f. fario). Aquat. Toxicol. 75(1): 53-64.
45. Huang Q., Zhu J., Qiao X., Cai P., Rong X., Liang W., Chen W. 2009. Conformation, activity and proteolytic stability of acid phosphatase on clay minerals and soil colloids from an Alfisol. Colloids Surf. B Biointerfaces 74(1): 279-283.
46. Janes -Basset V., Blackwell M.S.A., Blair G., Davies J., Haygarth P.M., Mezeli M.M., Stewart G. 2022. A meta-analysis of phosphatase activity in agricultural settings in response to phosphorus deficiency. Soil Biol. Biochem. 165: 108537.
47. Januszewski A. 2011. Modele równań strukturalnych w metodologii badań psychologicznych. Problematyka przyczynowości w modelach strukturalnych i dopuszczalność modeli. Stud. Psychol. KUL 17: 213-245.
48. Jezierska-Tys S., Wesółowska S., Gałązka A., Joniec J., Bednarz J., Cierpiąta R. 2020. Biological activity and functional diversity in soil in different cultivation systems. Int. J. Environ. Sci. Technol. 17: 4189-4204.
49. Kabąta C., Karczewska A., Medyńska-Juraszek A. 2014. Variability and relationships between Pb, Cu, and Zn concentrations in soil solutions and forest floor leachates at heavily polluted sites. J. Plant Nutr. Soil Sci. 177: 573-584.
50. Kaczyńska G., Borowik A., Wyszowska J., 2015. Soil dehydrogenases as an indicator of contamination of the environment with petroleum products. Water Air Soil Pollut. 226:372

51. Kashirskaya N.N., Plekhanova L.N., Chernisheva E.V., Eltsov M.V., Udaltsov S.N., Borisov A.V. 2020. Temporal and spatial features of phosphatase activity in natural and human-transformed soils. *Eurasian Soil Sci.* 53(1): 97-109.
52. Khetan S.K., Collins T.J., 2007. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem. Rev.* 107: 2319-2364.
53. Koszowska A., Ebisz M., Krzyśko-Łupicka T. 2015. Obecność farmaceutyków i środków kosmetycznych w środowisku wodnym jako nowy problem zdrowia środowiskowego. *Med. Środ.* 18(1): 62-69.
54. Kovacs D. 2020. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) impact on soil microbiota: consequences on soil functioning. ISEE 2020 Virtual Conference: 32nd Annual Conference of the International Society of Environmental Epidemiology. ISEE Conference Abstracts 2020(1): <https://doi.org/10.1289/isee.2020.virtual.P-0614>.
55. Kovacs E.D., Kovacs M.H., Barcelo D., Paulo P. 2024. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs impact the microbial community in three different soil types – a laboratory experiment. *Case Stud. Chem. Environ. Engin.* 10: 100833.
56. Kózka B., Bębas K. 2021. Pozostałości substancji farmakologicznie czynnych jako zanieczyszczenie środowiska i rola grzybów białej zgnilizny w ich usuwaniu. *Prospects Pharm. Stud.* 19(5): 42-63.
57. Kumaki M., Mamais D., Noutsopoulos C. 2017. Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. *J. Hazard. Mater.* 323(A): 233-241.
58. Kummerer K. 2010. Pharmaceuticals in environment. *Ann. Rev. Environ. Res.* 35: 57-56.
59. Kummerova M., Zezulka S., Babula P. 2024. Response of crop seed germination and primary root elongation to a binary mixture of diclofenac and naproxen. *Ecotoxicology* 33: 1039-1043.
60. Lakshmi D., Geetha V., Murali V. 2024. From prescription to pollution: The ecological consequences of NSAIDs in aquatic ecosystems. *Toxicol. Rep.* 13: 101775.
61. Lee J., Ji K., Kho Y.L., Kim P., Choi K. 2011. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 1216-1225.
62. Lee S.H., Kim M.S., Kim J.G., Kim S.O. 2020. Use of soil enzymes as indicators for contaminated soil monitoring and sustainable management. *Sustainability* 12: 8209.

63. Lemanowicz J. 2019. Activity of selected enzymes as markers of ecotoxicity in technogenic salinization soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26: 13014-13024.
64. Lemanowicz J., Bartkowiak A. 2015. Effect of scots Pine forest fire on carbon, phosphorus and phosphatase activity in soil. *Baltic Forest.* 21(2): 369-374.
65. Liu F., Ying G.-G. Tao R., Zhao J.-L., Yang J.-F., Zhao L.-F. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environ. Pollut.* 157(5): 1636-1642.
66. Marchlewicz A., Guzik U., Hupert-Kocurek K., Wojcieszńska D. 2023. Evaluation of the defined bacterial consortium efficacy in the biodegradation of NSAIDs. *Molecules* 28(5): 2185.
67. Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Cruz-Morató C., Caminal G., Vicent T. 2010. White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR. *Chemosphere* 78: 474-481.
68. Margalef O., Sardans J., Fernández-Martínez M., Molowny-Horas R., Janssens I.A., Ciais P., Goll D., Richter A., Obersteiner M., Asensio D., Peñuelas J. 2017. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Sci Rep.* 7: 1337.
69. Margalef O., Sardans J., Maspons J., Molowny-Horas R., Fernandez-Martinez M., Janssens I.A., Richter A., Ciais P., Obersteiner M., Penuelas J. 2021. The effect of global change on soil phosphatase activity. *Glob. Change Biol.* 27(22): 5989-6003.
70. Mocek-Płóciński A. 2010. Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. *Nauka Przyr. Technol.* 4(6): #86.
71. Molaei A., Lakzian A., Datta R., Haghnia G., Astaraei A., Rasouli-Sadaghiani M., Ceccherini M.T. 2017. Impact of chlortetracycline and sulfapyridine antibiotics on soil enzyme activities. *Int. Agrophys.* 31:499-505.
72. Monteiro S.C., Boxall A.B.A. 2010. Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 28(12): 2546-2554.
73. Nowak K.M., Girardi C., Miltner A., Gehre M., Schäffer A., Kästner M. 2013. Contribution of microorganisms to non-extractable residue formation during biodegradation of ibuprofen in soil. *Sci. Total Environ.* 445-446: 377-384.
74. Oleszczuk P., Joško I., Futa B., Pasieczna-Patkowska S., Pałys E., Kraska P. 2014. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. *Geoderma* 214-215: 10-18.

75. Orwin K.H., Wardle D.A. 2004. New indices for quantifying the resistance and resilience of soil biota to exogenous disturbances. *Soil Biol. Biochem.* 36(11): 1907-1912.
76. Paśmionka I.B., Bulski K., Herbut P., Boligłowa E., Vieira F.M.C., Bonassa G., Bortoli M., Celant de Pra M. 2021. Toxic effect of ammonium nitrogen on the nitrification process and acclimatisation of nitrifying bacteria to high concentrations of $\text{NH}_4\text{-N}$ in wastewater. *Energies* 14(17): 5329.
77. Paśmionka I.B., Gospodarek J. 2022. Assessment of the impact of selected industrial wastewater on the nitrification process in short-term tests. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19(5): 3014.
78. Paulose-Ram R., Hirsch R., Dillon C., Gu Q. 2005. Frequent monthly use of selected non-prescription and prescription non-narcotic analgesics among U.S. adults. *Pharmacoepidemiol. Drug. Saf.* 14: 257-266.
79. Pawłowska B., Telesiński A., Biczak R. 2021. Effect of diclofenac and naproxen and their mixture on spring barley seedlings and *Heterocypris incongruens*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 88: 103746.
80. Pawłowska B., Telesiński A., Sysa M., Godela A., Šcurek R., Biczak R. 2023. Ibuprofen and ketoprofen – Inert drugs or potential environmental hazard? *Sustainability* 15: 1613.
81. Płatkowski M., Telesiński A. 2015a. Effect of different glyphosate salts on phosphodiesterase and phosphotriesterase activities in soil with reference to ecological importance of soil pollution. A laboratory experiment. *Environ. Protect. Natural Res.* 26,2(64): 9-14.
82. Płatkowski M., Telesiński A. 2015b. Wpływ glifosatu w postaci soli amonowej na zawartość fosforu przyswajalnego i aktywność wybranych fosfataz w glebie lekkiej. *Inż. Ekol.* 43: 115-121.
83. Płatkowski M., Telesiński A. 2016a. Porównanie oddziaływania glifosatu i preparatów roundup na aktywność pirofosfatazy nieorganicznej i zawartość fosforu przyswajalnego w glinie lekkiej., *Nauka Przyr. Technol.* 10, 1, #13.
84. Płatkowski M., Telesiński A. 2016b. Response of soil phosphatases to glyphosate and its formulations - Roundup (laboratory conditions). *Plant Soil Environ.* 62(6): 286-292.
85. Qu X., Liao Y., Pan C., Li X. 2024. Positive effects of intercropping on soil phosphatase activity depend on the application scenario: A meta-analysis. *Soil Till. Res.* 235: 105914.

86. Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T. 2005. Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Res.* 39: 2654-2664.
87. Rashid A., Shutte B.J., Ulery A., Deyholos M.K., Sanogo S., Lehnhoff E.A., Beck L. 2023. Heavy metal contamination in agricultural soil: environmental pollutants affecting crop health. *Agronomy* 13(6): 1521.
88. Rastogi A., Tiwari M.K., Ghangrekar M.M. 2021. A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *J. Environ. Manag.* 300: 113694.
89. Ratnasari A., Zainiyah I.F., Thakur S.S., Boopathy R. 2024. Bio-prospective of acidophile microorganisms in biodegradation of NSAIDs, *Cur. Pollut. Rep.* 10(2): 1-18.
90. Rezka P., Balcerzak W. 2015. The occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater and water environment and methods of their removal – selected issues, *Arch. Gosp. Odpad. Ochr. Środ.* ISSN 17(1): 33-38.
91. Rizzo L., Fiorentino A., Grassi M., Attanasio D., Guida M. 2015. Advanced treatment of urban wastewater by sand filtration and graphene adsorption for wastewater reuse. Effect on a mixture of pharmaceuticals and toxicity. *J. Environ. Chem. Engin.* 3:122-128.
92. Rocabrana P.C., Domene X., Preece C., Penuelas J. 2024. Relationship among soil biophysicochemical properties, agricultural practices and climate factors influencing soil phosphatase activity in agricultural land. *Agriculture* 14: 288.
93. Rodarte-Morales A.I., Feijoo, G. Moreira M.T., Lema J.M. 2012. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation* 23: 145-156.
94. Rydzyński D. 2016. Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego środkami farmaceutycznymi, Wybrane zagadnienia z zakresu ochrony środowiska i energii odnawialnej, Lublin, 191-199.
95. Santas-Miguel V., Dias-Ravina M., Martin A., Garcia-Campos E., Barreiro A., Nunez-Delgado A., Alvarez-Rodriguez E., Arias-Estevéz M., Fernandez-Calvino D. 2021. Soil enzymatic activities and microbial community structure in soils polluted with tetracycline antibiotics. *Agronomy* 11(5): 906.
96. Santos L., Araújo A. N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175: 45-95.

97. Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I. Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 68: 141-150.
98. Siemieniuk A., Ludynia M., Rudnicka M. 2021. Response of two crop plants, *Zea mays* L. and *Solanum lycopersicum* L., to diclofenac and naproxen. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 8856
99. Stadler L.B., Love N.G. 2016. Impact of microbial physiology and microbial community structure on pharmaceutical fate driven by dissolved oxygen concentration in nitrifying bioreactors. *Wat. Res.* 104: 189-199.
100. Tabatabai M.A., Bremner J.M. 1969. Use of *p*-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1: 301-307.
101. Tecon R., Or D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *Fems Microbiol. Rev.* 41(5): 599-623.
102. Telesiński A. 2012. Zmiany parametrów biochemicznych i toksykologicznych gleb pod wpływem 1-alkilo-3-metyloimidazoliowych cieczy jonowych. Wyd. Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, ss. 108.
103. Telesiński A., Biczak R., Stręk M., Płatkowski M., Pawłowska B., Emin N. 2018a. A study on the fluoride content and the enzymatic activity in soil exposed to inorganic ammonium salt and quaternary ammonium salts with hexafluorophosphate anions. *Fluoride* 51(3): 206-219.
104. Telesiński A., Płatkowski M., Cybulska K., Telesińska N., Wróbel J., Pawłowska B. 2018b. Response of soil enzymes to two antibiotics: polymyxin B and Penicillin G. *Fres. Environ. Bull.* 27(5A): 3837-3845.
105. Telesiński A., Pawłowska B., Biczak R., Śnieg M., Wróbel J., Dunikowska D., Meller E. 2021. Enzymatic activity and its relationship with organic matter characterization and ecotoxicity to *Aliivibrio fischeri* of soil samples exposed to tetrabutylphosphonium bromide. *Sensors* 21(5): 1565.
106. Telesiński A., Sykała K., Futa B., Zawierucha E., Śnieg M., Rynkiewicz M., 2018. Porównanie oddziaływania fungicydów zawierających fenpropidynę i pikoksystrobinę na aktywność fosfataz w glebie. *Chem. Environ. Biotechnol.* 21: 52-56.
107. Tomkowiak A., Starzyk J., Kosicka-Dziechciarek D., Karwatka K. 2017. Wpływ systemów uprawy roli na stan mikrobiologiczny gleby. *Nauka Przyr. Technol.* 11(4): 355-364.
108. Vulava V.M., Cory W.C., Murphey V.L., Ulmer C.Z. 2016. Sorption, photodegradation, and chemical transformation of naproxen and ibuprofen in soils and water. *Sci. Total Environ.* 565: 1063-1070.

109. Wang Z., Liang B., Hou Y., Li S., Xie L., Peng L., Zhang P., Wang A., Yun H., Li X. 2022. Weak electrostimulation enhanced the microbial transformation of ibuprofen and naproxen. *Sci Total Environ.* 835: 155522.
110. Williamson K.E., Fuhrmann J.J., Wommack K.E., Radosevich M. 2017. Viruses in soil ecosystems: an unknown quantity within an unexplored territory. *Ann. Rev. Virol.* 4: 201-219.
111. Wojewódzki P., Lemanowicz J., Debska B., Haddad S.A. 2022. Soil enzyme activity response under the amendment of different types of biochar. *Agronomy* 12: 569.
112. Wołejko E., Wydro U., Odziejewicz J.I., Koronkiewicz A., Jabłońska-Typuć A. 2022. Biomonitoring of soil contamination with herbicides. *Water* 14(1): 1534.
113. Woron J., Wordliczek J., Dobrogowski J. 2011. Porównanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). *Med. Dypl.* 20,6(183): 55-63.
114. Woźniak M.M., Siebielec S., Siebielec G., Bojarszczuk J., Gałązka A., Urbaniak M. 2024. Microbially modified effect of exogenous organic matter on soil chemical and biological indices and plant responses. *J. Soils Sedim.* 24: 70-85.
115. Wydro U., Wołejko E., Struk-Sokołowska J., Puchlik M. 2016. Pozostałości farmaceutyków w środowisku oraz możliwość ich usuwania. *Inter. Zag. Inż. Ochr. Środ.* 7: 286-299.
116. Wyszowska J. 2004. Właściwości mikrobiologiczne gleby zanieczyszczonej herbicydem Triflurotox 250 EC. *Acta Agr. Silv. Ser. Agr.* 42: 463-473.
117. Yu T.H., Yu-Chen Li A., Panchangam S.C., Hong P.K.A., Yang P.Y., Ling C.F. 2011. Biodegradation and bio-sorption of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs using immobilized cell proces. *Chemosphere* 84(9): 1216-1222.
118. Zalewska E. 2017. Zastosowanie analizy skupień i metody porządkowania liniowego w ocenie polskiego szkolnictwa wyższego. *Prace Nauk. Uniw. Ekon. Wroc.* 469: 234-243.
119. Zaremba M., Staniszevska A., Niewada M. 2012. Niesteroidowe leki przeciwzapalne – fakty, mity i kontrowersje dotyczące ryzyka sercowo-naczyniowego oraz ryzyka powikłań ze strony przewodu pokarmowego. *Chor. Serca Nacz.* 9(3): 119-136.
120. Zhang Y., Price G.W., Jamieson R., Burton D., Khosravi K. 2017. Sorption and desorption of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in an agricultural loam-textured soil. *Chemosphere* 174: 628-637.

121. Zhou Y., Lin J., Bian Y., Ren C., Xiao-li N., Yang C., Xiao-xue X., Feng X. 2023. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the environment: Updates on pretreatment and determination methods. *Ecotoxcol. Environ. Saf.* 267: 115624.
122. Żur J., Wojcieszńska D., Guzik U. 2016. Wpływ wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych na formowanie i strukturę biofilmu, Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, Interdyscyplinarne Zagadnienia w Inżynierii i Ochronie Środowiska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 300-311.
123. <https://www.chemspider.com>
124. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Aneks

Spis tabel

Tab. 1. Podstawowe właściwości fizyczno-chemiczne niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykorzystanych w badaniach (na podstawie https://www.chemspider.com oraz https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).....	27
Tab. 2. Podstawowe właściwości fizyczno-chemiczne gleby użytej w badaniach (Telesiński 2012).....	28
Tab. 3. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym.....	33
Tab. 4. Oddziaływanie flurbiprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym.....	36
Tab. 5. Oddziaływanie ketoprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym.....	38
Tab. 6. Oddziaływanie naproksenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym.....	41
Tab. 7. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym.....	44
Tab. 8. Procentowy udział czynników doświadczalnych w kształtowaniu wartości współczynnika oporności (RS) fosfataz glebowych na obecność niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu laboratoryjnym – analiza η^2	50
Tab. 9. Oddziaływanie ibuprofenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym.....	52
Tab. 10. Oddziaływanie naproksenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym.....	54
Tab. 11. Oddziaływanie diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym.....	56
Tab. 12. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i naproksenu na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym.....	59
Tab. 13. Oddziaływanie mieszaniny ibuprofenu i diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym.....	61
Tab. 14. Oddziaływanie mieszaniny naproksenu i diklofenaku na aktywność wybranych fosfataz w glebie w doświadczeniu wazonowym.....	64

Tab. 15. Procentowy udział czynników doświadczalnych w kształtowaniu wartości współczynnika oporności (<i>RS</i>) fosfataz glebowych na obecność niesteroidowych leków przeciwzapalnych w doświadczeniu wazonowym – analiza η^2	69
--	----

Spis rysunków

Rys. 1. Wzory chemiczne niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykorzystanych w badaniach (opracowanie własne na podstawie https://www.chemspider.com).....	27
Rys. 2. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem ibuprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne).....	34
Rys. 3. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem flurbiprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne).....	37
Rys. 4. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem ketoprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne).....	39
Rys. 5. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem naproksenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne).....	42
Rys. 6. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (D) pod wpływem diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie laboratoryjne).....	45
Rys. 7. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak	46

Rys. 8.	Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy zasadowej w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	47
Rys. 9.	Zmiany współczynnika oporności fosfotrieteraz w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	48
Rys. 10.	Zmiany współczynnika oporności pirofosfatazy nieorganicznej w glebie w doświadczeniu laboratoryjnym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	49
Rys. 11.	Dendrogramy analizy skupień wartości współczynników oporności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B), fosfotriesteraz (C) i pirofosfatazy nieorganicznej (D) w glebie poddanej działaniu niesteroidowych leków przeciwzapalnych; IBU – ibuprofen, FLU – flurbiprofen, KET – ketoprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	51
Rys. 12.	Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem ibuprofenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe).....	53
Rys. 13.	Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem naproksenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe).....	55
Rys. 14.	Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe).....	57

Rys. 15. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem mieszaniny ibuprofenu i naproksenu w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe).....	60
Rys. 16. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem mieszaniny ibuprofenu i diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe).....	62
Rys. 17. Procentowe zmiany aktywności fosfomonoesterazy kwaśnej (A), fosfomonoesterazy zasadowej (B) oraz pirofosfatazy nieorganicznej (C) pod wpływem mieszaniny naproksenu i diklofenaku w odniesieniu do gleby kontrolnej (doświadczenie wazonowe).....	65
Rys. 18. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy kwaśnej w glebie w doświadczeniu wazonowym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	66
Rys. 19. Zmiany współczynnika oporności fosfomonoesterazy zasadowej w glebie w doświadczeniu wazonowym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	67
Rys. 20. Zmiany współczynnika oporności pirofosfatazy nieorganicznej w glebie w doświadczeniu wazonowym pod wpływem niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wprowadzonych w dawkach: 1 mg·kg ⁻¹ s.m. (A), 10 mg·kg ⁻¹ s.m. (B), 100 mg·kg ⁻¹ s.m. (C); IBU – ibuprofen, NAP – naproksen, DIC – diklofenak.....	68