

좁개구리밥(*Lemna perpusilla* Torr.)의 생육에 대한 PAHs와 암모늄의 영향^{1a}

박진희² · 심상인^{3*}

Influences of PAHs and Ammonium on Growth of Duckweed (*Lemna perpusilla* Torr.)^{1a}

Jin Hee Park², Sang In Shim^{3*}

요 약

좁개구리밥(*Lemna perpusilla* J. Torrey)은 오염물질의 독성시험에 사용되어 온 대표적인 부유성 수생식물이다. 본 연구에서는 오염된 공장지대나 농경지에서 식물의 생육에 악영향을 미치는 독성물질인 PAHs(polycyclic aromatic hydrocarbons; 다환방향족탄화수소)와 암모늄(NH₄⁺)의 식물 독성 평가를 위해 좁개구리밥을 이용하였다. 독성물질인 PAHs와 암모늄이 들어있는 배양액에 좁개구리밥 엽상체를 배양하면서 반응을 조사하였다. 조사결과, 좁개구리밥의 생장은 PAHs의 종류와 농도에 따라 다르게 반응하였다. PAHs중 fluorene의 처리 때 좁개구리밥의 생장이 가장 저해되었으며, fluoranthene과 pyrene은 생장 저해 효과가 적었다. fluoranthene과 pyrene의 경우 30ppm정도의 낮은 농도에서는 좁개구리밥의 생장 저해는 거의 일어나지 않았다. 식물색소 함량도 또한 처리한 독성물질의 종류에 따라 다르게 나타났다. Phenanthrene과 fluorene 처리 시 fluoranthene과 pyrene 처리 때보다 chlorophyll의 함량이 많이 감소되었다. 그러나, 항산화 화합물로 잘 알려진 carotenoids의 경우 fluoranthene과 pyrene을 30ppm 이하의 낮은 농도로 처리 시 오히려 함량이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 이는 저농도의 fluoranthene 또는 pyrene 처리 시 이들 물질이 좁개구리밥의 황산화 작용을 자극하여 황산화 물질인 carotenoids를 많이 만들게 하는 작용을 하는 것으로 추측된다. 암모늄은 3 mM의 낮은 농도에서도 좁개구리밥 엽상체의 생장에 강한 저해효과를 갖는 것으로 나타났다.

주요어: 다환방향족탄화수소(PAHs), 암모늄, 식물독성, 광합성 색소

ABSTRACT

Duckweed (*Lemna perpusilla* J. Torrey) is a typical floating aquatic macrophyte that has been used for evaluating phytotoxicity of toxicants. In this study, we evaluated the responses of duckweed to PAHs and ammonium as toxicants that frequently affect the growth of plants in polluted industrial and agricultural areas. As the duckweed is growing in aquatic environment, the PAHs and ammonium were incorporated into nutrient solution and the fronds were cultured hydroponically. Frond growth was responded differentially to the concentration and type of PAHs. The severe inhibition of frond growth was observed in the treatment of fluorene. Fluoranthene and pyrene, however, showed weak inhibition of frond growth. The latter PAHs that showed weak inhibition did not reduced frond number at the low concentration of 30 ppm. Pigment contents

1 접수 2014년 9월 22일, 수정 (1차: 2014년 10월 10일, 2차: 2014년 10월 22일), 게재확정 2014년 10월 23일
Received 22 September 2014; Revised (1st: 10 October 2014, 2nd: 22 October 2014); Accepted 23 October 2014
2 경상대학교 생물학과 Dept. of Biology, Gyeongsang National Univ., Jinju 660-701, Korea (parkjh23@gnu.ac.kr)
3 경상대학교 농학과 Dept. of Agronomy, Gyeongsang National Univ., Jinju 660-701, Korea (sishim@gnu.ac.kr)
a 이 논문은 환경부 2014년도 환경산업선진화기술개발사업 연구비 지원에 의해 연구되었음.
* 교신저자 Corresponding author: sishim@gnu.ac.kr

were also responded differentially. Phenanthrene and fluorene reduced chlorophyll content more strongly than fluoranthene and pyrene. Carotenoids, well-known antioxidative compound, was relatively increased at the low concentration of PAHs up to 30 ppm by the treatment of fluoranthene and pyrene, suggesting an increased antioxidative activity in fronds. Ammonium treatment showed higher inhibitory effect even low concentration of 3 mM.

KEY WORDS: PAHs, AMMONIUM, PHYTOTOXICITY, PHOTOSYNTHETIC PIGMENT

서 론

토양오염이나 수질오염 등에 의한 환경오염은 산업화와 깊은 관련이 있으며 주변 산업 시설 등에 의해 영향을 받는다. 오염을 일으키는 오염물질은 공업과 농업 등 산업 시설의 유형에 따라 매우 다양하게 발생한다. 오염물질 중 많은 연구가 진행되고 그 오염이 많이 보고 된 종류는 중금속, 유류, 질소화합물 등을 들 수 있다. 유류오염은 환경에 대한 영향뿐만 아니라 인간 건강에 대한 문제로 인하여 1980년 이후로 심각한 환경오염의 대표적 유형이 되고 있다(Li *et al.*, 1993). 유류에 의하여 오염된 토양 내에서 농도가 높은 것은 다환방향족탄화수소[polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)]로서 이 물질은 두개 이상의 벤젠 고리가 결합되어 이루어진 화합물로 유류의 구성분이기도 하다. 따라서 유조선이나 유조차, 유류 저장시설로부터의 유류 유출에 의해 문제가 발생하기도 하고, 공장은 물론 발전소 및 소각장, 자동차 등에서 화석연료의 불완전한 연소 과정에서 많이 발생하는 것으로 알려져 있다(Pothuluri and Cerniglia, 1994; Jensen and Folker-Hansen, 1995; Wild and Jones, 1995; Maliszewska-Kordybach, 1999). PAHs는 환경오염 물질로서 생물체에 독성을 나타내는데, 돌연변이뿐만 아니라 발암원으로 작용하는 것으로 알려져 있다(LaFlamme and Hite, 1978; Pahmann and Pelkonen, 1987; Wild and Jones, 1995). 환경오염은 단일물질에 의한 오염보다 여러 오염물질에 의해 복합적으로 오염된 경우가 많은데, PAHs의 경우도 중금속과 같은 오염발생원으로부터 나오는 경우가 많아 중금속과 더불어 문제가 되는 경우가 많다(Maliszewska-Kordybach, 2000a, 2000b; Terelak and Motowicka-Terelak, 2000). 생태계에서 PAHs는 일차적으로 식물에 영향을 주지만 그 피해 양상에 대한 연구는 많지 않아 이에 대한 연구가 필요하다.

농산물 수입개방 등의 영향으로 늘어난 양축농가와 화학공정에서 나오는 배기가스 때문에 농촌이나 도시근교의 질소화합물 오염이 심각해지고 있다(Schulze, 1989; Kronzucker *et al.*, 2001). 질소화합물의 경우 적절한 형태와 적정수준은

식물의 생육에 필수적이지만, NH_4^+ 이 과다하게 존재할 경우 식물의 생리적 변화를 유발하는데 그 피해 유형이나 피해 원인은 다양하다고 알려져 있다. 외견상으로는 식물체의 신장 저해뿐만 아니라 chlorosis, 전분합성의 저해를 일으키고 심한 경우 식물체 고사를 유발하고(Mehrer and Mohr, 1989), 세포질내 pH의 교란, 광인산화의 저해, 유기산의 부족(Salsac *et al.*, 1987), glucose의 축적(Matsumoto *et al.*, 1969), 근계의 산성화 등의 원인으로 일어난다고 보고되고 있다(Cerfff, 1973). 암모늄에 의해 발생하는 여러 피해의 대표적인 발생 기작은 질산염의 축적으로 알려져 있는데, Mehrer and Mohr(1989)와 이 후 발표된 Reddy and Menary (1990)의 보고에 의하면 질산염이 과다하게 존재할 경우 체내의 질산환원효소의 활성이 저해되어 독성을 일으킨다고 하였다. 이와 같은 결과는 Melzer *et al.*(1984)의 보고에서처럼 질산염이 과다하게 존재할 때 암모늄이나 아미노산에 의해서 질산환원효소 활성이 피드백 억제를 받기 때문이다. 암모늄에 대한 식물의 반응은 생장 조건에 따라서 다양하고 식물종에 따라 다르게 나타난다(Lasa *et al.*, 2001)는 보고가 있어, 오염물질에 대한 피해 평가 시 최적의 식물종을 이용해야 한다.

전 세계적으로 오염 정도 평가에 있어서 많이 이용되는 식물로는 좁개구리밥(*Lemna* spp.)이 있다. 좁개구리밥은 *L. minor*, *L. gibba*, *L. polyrrhiza*와 같은 종이 독성 평가에 이용되고 있으나 이들 종은 생장량의 차이가 있으며 형태도 다소 상이하다(Rejmánková, 1975; Wang, 1990). 좁개구리밥으로 알려진 종 중에서 우리나라에 자생하는 종은 그 학명이 *L. perpusilla* Torr.로서 외국의 좁개구리밥과는 다소 상이한 종이다. 좁개구리밥은 물에서 자라는 수생식물로 단자엽식물이며 개구리밥과(Lemnaceae)에 속한다. 우리나라에서도 논이나 연못 등에서 많이 발생하는 식물로 독성 시험에 이용되는 대표적인 식물종이다(Kim and Lee, 2001). 좁개구리밥은 영양변식이 매우 빠른 식물로서 약 3.5일 마다 배로 증가하는 특성을 보여 높은 상대생장율로 식물종에 오염 피해 평가에 유용하게 적용할 수 있는 종이다.

본 연구는 우리나라에 외국종이 아닌 자생하는 좁개구리밥을 이용하여 오염물질 중 다환방향족탄화수소(PAHs)와

대표적 질소화합물인 암모늄의 식물독성을 평가하고자 수행하였다.

연구방법

좁개구리밥(*L. perpusilla* Torr.)은 2009년 8월에 경남 사천시 두량면에서 수집하여 수돗물에 세척 후 1% sodium hypochlorite 용액에 20분간 넣어 멸균하였다. 멸균된 식물체는 물기를 제거한 후 배양액에서 실험 시까지 배양하였다. 계대배양은 25℃의 생육상에서 실시하였고 1 주일에 한번씩 양액을 갈아주었다. 실험에 이용된 개체는 수집된 좁개구리밥에서 계대 배양 과정에서 새로이 발생한 개체만을 이용하였다.

PAHs의 효과를 보기 위하여 세척한 모래 150g에 아세톤에 종류별로 녹인 PAH를 50mg 코팅시킨 후 투명 사각 용기(72 × 72 × 100mm)에 모래를 채우고 좁개구리밥 양액 100mL를 첨가한 후 좁개구리밥을 엽상체를 기준으로 5개씩 넣고 생육장에서 배양을 실시하였다. 암모늄은 처리 농도에 맞게 NH₄Cl을 배양액에 첨가하였다. 배양은 OECD 기준을 따라 실시하였으며 배양액의 무기양분의 농도는 다음과 같다. NaNO₃, 510mg/L; MgCl₂·6H₂O, 240mg/L; CaCl₂·2H₂O, 90mg/L; MgSO₄·7H₂O, 290mg/L; K₂HPO₄·3H₂O, 30mg/L; H₃BO₃, 3.7mg/L; MnCl₂·4H₂O, 8.3mg/L; FeCl₃·6H₂O, 3.2mg/L; Na₂EDTA·2H₂O, 6.0mg/L; ZnCl₂, 66μ g/L; CoCl₂·6H₂O, 29μ g/L; Na₂MoO₄·2H₂O, 145μ g/L; CuCl₂·2H₂O, 0.24μ g/L; NaHCO₃ 300mg/L. 배양액은 사용 시 pH를 6.5로 조절하였다. 배양온도는 25℃ 항온조건이었으며 생육장의 광도(PAR)는 100μ Em-2s-1이었다. 이외의 배양 조건은 OECD 기준에 준하여 실시하였다(OECD, 2002).

좁개구리밥 성장 분석은 엽상체의 수를 기준으로 계산하였으며, 색소는 메탄올로 추출 후 spectrophotometer(Shimadzu UV-1700, Shimadzu, Japan)를 이용해 663, 646, 470nm에서 흡광도를 측정 후 다음 식에 따라 엽록소 a와 엽록소 b 및 카로티노이드 함량을 구하였다.

$$\text{Chlorophyll a} = 12.21 \times A_{663} - 2.81 \times A_{646}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 20.13 \times A_{646} - 5.03 \times A_{663}$$

$$\text{Carotenoid} = (1000 \times A_{470} - 1.82 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b})/198$$

결과 및 고찰

식물종 중에서 중금속, 제초제 등의 독성 평가에 많이 이용되고 있는 좁개구리밥을 PAHs 독성 확인을 위해 이용한 결과 Figure 1에서 보는 바와 같이 PAHs 종류에 따라 차이를 나타내었다. 엽상체의 성장에 가장 강한 억제 효과를

나타낸 PAHs는 fluorene이었으며 fluoranthene과 pyrene은 외견상 억제 정도가 상대적으로 낮았다. 강한 억제를 나타낸 phenanthrene의 경우 엽상체의 수도 적었으며 발생한 엽상체의 형태도 기형을 나타내는 경우도 있었다. 이러한 기형은 Maliszewska-Kordybach and Smreczak(2000)의 보고에서처럼 PAHs가 돌연변이 유발과 관련된 유전독성을 나타내기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 PAHs 중 억제가 심한 화학종은 엽상체의 발생은 물론 정상적인 발달에도 영향을 크게 미치는 것으로 확인되었다. 처리 5일 후 엽상체의 수는 Figure 2에서 보는 바와 같이 fluorene에 의한 억제 효과가 가장 강하게 나타났으며, pyrene에 의한 효과는 가장 약하게 나타났다. 억제 효과가 크게 나타난 fluorene과 phenanthrene은 농도가 높아질수록 지속적으로 엽상체 수가 줄어들었으나 fluoranthene과 pyrene은 100ppm의 농도까지도 그 억제 효과가 크지 않았다. 처리 10일 후의 결과를 보면 억제 효과가 큰 fluorene과 phenanthrene은 지속적으로 억제 효과가 나타났으나 fluoranthene과 pyrene은 그 억제 효과가 다소 줄어드는 결과를 보였다. 전체적인 결과를 보면 4 가지 PAHs 중 가장 억제 효과가 큰 물질은 fluorene이었으며 가장 억제 효과가 작은 물질은 pyrene이었다.

색소 함량에 대한 결과를 보면 엽록소 a와 엽록소 b는 PAHs에 대한 반응이 다소 상이하였다. 엽록소 a가 엽록소 b보다 PAHs에 대해 민감하게 반응하는 결과를 보였으며 전반적인 반응 양상은 엽상체의 반응 양상과 유사한 결과를 보였다(Figure 3). 좁개구리밥의 경우 엽록소 b에 비해 엽록소 a의 함량 변화가 PAHs의 종류에 따라 그 편차가 더 컸으며, 카로티노이드의 경우 엽록소 a와 비슷한 양상을 보였다. 엽록소 b의 경우는 PAHs 농도의 증가에 따른 함량 감소폭도 작았으며 PAHs 화학종간 차이도 작아 엽록소 a에 비해

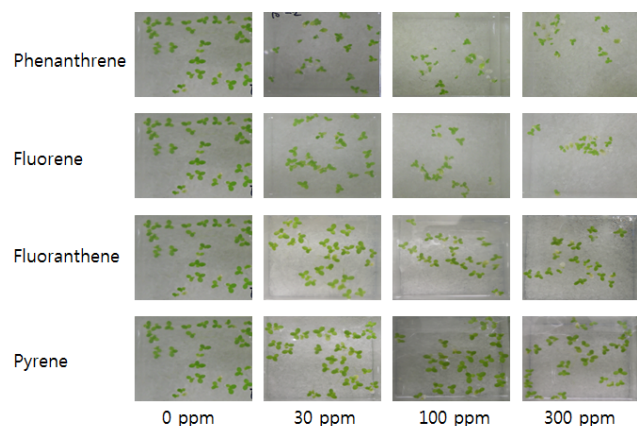


Figure 1. Growth of fronds of *L. perpusilla* in the medium containing various concentrations of PAHs. Five fronds of *L. perpusilla* were incubated for 10 days in growth chamber of 25℃

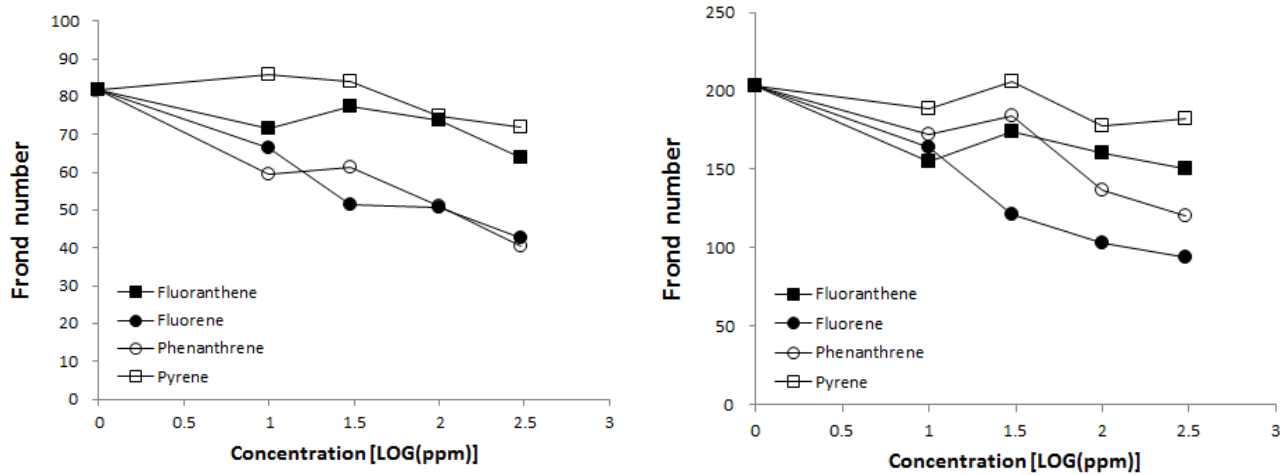


Figure 2. Responses of frond proliferation of *L. perpusilla* to the increasing concentration of four PAHs. Left and right figures indicate the frond number at 5 days and 10 days after treatment, respectively

PAHs에 대한 반응이 둔감한 것으로 확인되었다. 엽록소 a는 다른 연구들에서도 PAHs 독성의 바이오마커로 알려져 있는데(Oleszczuk, 2008), 본 연구에서도 PAHs의 독성에 대해 엽록소 b보다 강하게 반응하였다.

카로티노이드는 엽록소의 경우와는 달리 저농도의 PAHs에 의해서는 농도가 다소 증가하는 결과를 나타냈으며 함량의 감소폭도 엽록소 함량에 비해 작게 나타났다. 카로티노이드는 식물체에 존재하는 대표적인 방어물질로 PAHs가 식물체 내에서 산화적 스트레스를 유발한다는 실험 결과(Brennan *et al.*, 2014)를 고려해 볼 때 PAHs에 의해 유발된 산화적 스트레스를 경감시키기 위해 카로티노이드 함량이 증가한 것으로 보인다. 색소에 의한 피해 평가는 식물체의 크기나 무게와 같은 양적 평가와 더불어 손쉽게 피해 정도를 확인할 수 있는 방법으로서 본 연구에서 확인된 PAHs에 대한 광합성 색소들의 함량 반응은 좁개구리밥의 이용에 좋은 장점으로 작용한다고 볼 수 있다.

암모늄 처리 시 좁개구리밥은 엽수와 무게 및 색소 공히 감소하였으며 10mM 이상에서 그 감소가 급격하게 나타났다(Figure 4). 좁개구리밥의 경우 암모늄에 민감하게 반응하여 암모늄 검정에 적합한 수준의 반응을 보였으며 엽수의 경우 암모늄 농도에 대해 일정한 반응을 보이는 형질이었다(Figure 4). 엽상체 수와 생체중은 10mM까지는 감소폭이 크지 않았으나 색소의 경우 엽록소와 카로티노이드 모두 그 감소폭이 엽상체수나 생체중보다 크게 줄었으며 카로티노이드의 경우 그 함량이 10mM 이상의 암모늄 농도에서 극히 낮은 결과를 보여 엽록소보다는 카로티노이드 합성이 암모늄에 의해 강하게 억제되는 결과를 보였다. 암모늄은 식물체내에 과다하게 흡수될 경우 체내 pH 변화와 색소 함량 감소 등을 유발한다고 알려져 있는데(Britto and Kronzucker, 2002), 그 독성은 체내 질소 대사의 교란이 주된 원인으로서 영양 생장에 가장 중요한 원소인 질소 대사가 교란되어 생육 저해가 발생하였다. 암모늄은 수용성 물

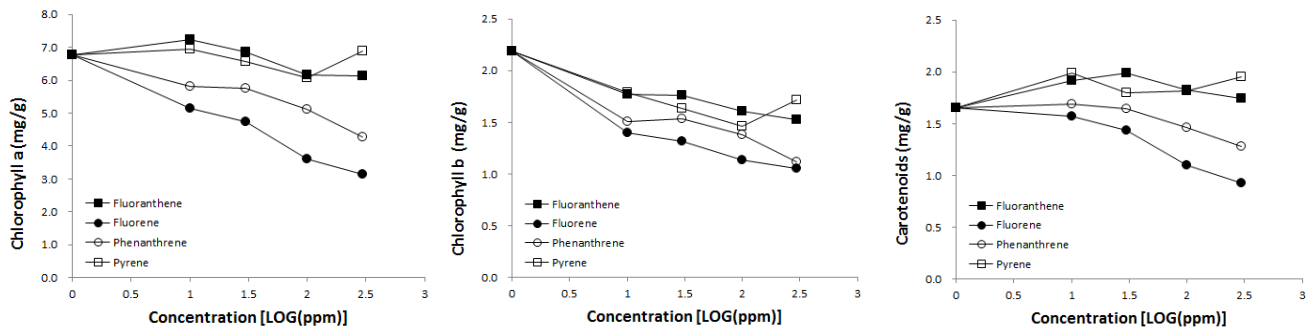


Figure 3. Responses of pigment contents of *L. perpusilla* to the increasing concentration of four PAHs. Pigment contents were determined at 10 days after treatment. Left, middle and right figures indicate chlorophyll a, b, and carotenoids contents, respectively

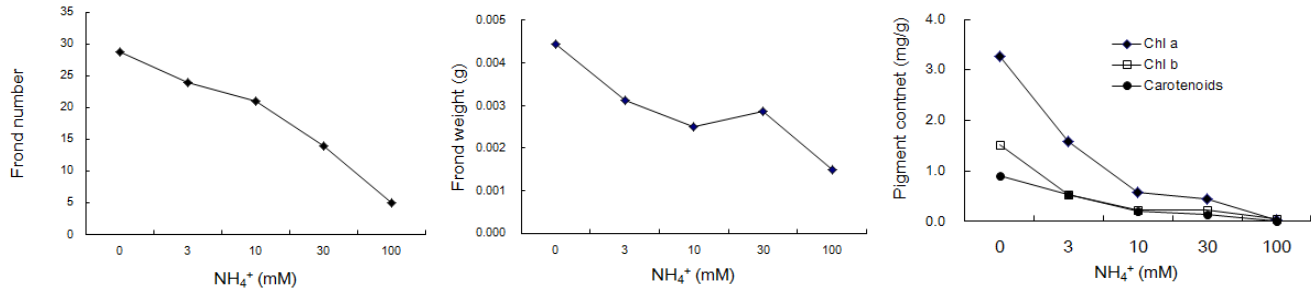


Figure 4. Responses of *L. perpusilla* to the increasing concentration of ammonium. Left, middle and right figures indicate frond number, weight and pigments contents, respectively, of fronds grown for 10 days

질로서 수질 오염의 주된 물질 중 하나이다. 따라서 수생식물인 잠개구리밥이 본 연구의 결과에서처럼 암모늄 농도에 민감하게 반응하므로 암모늄 오염과 연관된 수질 평가의 생물검정에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

잠개구리밥은 그 생육 속도가 매우 빨라 증급속, 체초제 등의 다양한 독성물질에 의한 독성 평가에서 가장 많이 이용되는 식물종으로서(Wang, 1990; Cedergreen *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2007), 본 연구에서도 PAHs와 암모늄의 독성 평가에 대한 잠개구리밥 활용이 효과적인 것으로 확인되었다. 본 연구는 국내 자생 중인 잠개구리밥을 이용하였으므로 외국의 결과와는 다소 차이를 보일 수 있다. 그러나 환경 변화 혹은 환경오염의 영향 평가에 있어서 국내 자생종의 활용은 외국종의 이용보다는 가치가 있다고 생각된다. 잠개구리밥은 대표적인 부유성 수생식물로 토양에 존재하는 오염물질의 영향을 알아보기에는 적합하지 않으며 토양에서 자라는 육상식물과는 반응성에 있어서 차이가 존재한다. 그러므로 개구리밥의 반응 결과를 다른 육상 식물종에 확대 적용하기에는 부족함이 있다고 볼 수 있다. 잠개구리밥은 다년생식물이나 생육 기간이 5월부터 10월까지로 연중 약 6개월 정도 자라는 식물이다. 그러나 기내에서 액체 배지에서 손쉽게 배양할 수 있어 오염 평가에 널리 활용될 수 있다. 특히 국내 자생종으로서 습지 등에서 가장 흔하게 발견되는 종이므로 수생태계에서 문제가 될 수 있는 식물독성에 대한 간접 평가에 효율적으로 활용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Brennan, A., E.M. Jimenez, J.A. Albuquerque, C.W. Knapp and C. Switzer(2014) Effects of biochar and activated carbon amendment on maize growth and the uptake and measured availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and potentially toxic elements (PTEs). *Environ. Pollut.* 193: 79-87
- Britto, D.T., H.J. Kronzucker(2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review *J. Plant Physiol.* 159: 567-584.
- Cedergreen, N., M. Abbaspoor, H. Sørensen, J.C. Streibig(2007) Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67: 323-332.
- Cerff, R.(1973) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases and glyoxylate reductase. I. Their regulation under continuous red and far red light in the cotyledons of *Sinapis alba* L. *Plant Physiol.* 51: 76-81.
- Hou, W., X. Chen, G. Song, Q. Wang, C.C. Chang(2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol. Biochem.* 45: 62-69
- Jensen, J. and P. Folker-Hansen(1995) Soil quality criteria for selected organic compounds. Working Report No. 47, Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, Denmark.
- Kim, E.J. and S.K. Lee(2001) Use of Duckweed (*Lemna gibba*) growth-inhibition test to evaluate the toxicity of chromate in Korea. *Kor. J. Environ. Toxicol.* 16(4): 205-209. (in Korean with English abstract)
- Kronzucker, H.J., D.T. Britto, R.J. Davenport and M. Tester(2001) Ammonium toxicity and the real cost of transport. *Trends Plant Sci.* 6: 335-337.
- LaFlamme, L.E. and R.A. Hite(1978) The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42: 289-303.
- Lasa, B., S. Frechilla, C. Lamsfus and P.M. Aparicio-Tejo(2001) The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. *Scientia Hort.* 91: 143-152.
- Li, K.Y., A.J. Kane, J.J. Wang and W. Cawley(1993) A measurement of biodegradation rate constants of a water extract from petroleum contaminated soil. *Waste Manage* 13: 245-251.
- Maliszewska-Kordybach, B.(1999). Persistent organic contaminants in the environment; PAHs as a case study. In: J.C. Block, V.V. Goncharuk and P. Baveye(Eds.), *Bioavailability of organic xenobiotics in the environment*. NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Netherlands, pp. 3-37.
- Maliszewska-Kordybach, B.(2000a) Polycyclic aromatic hydro-

- carbons in agroecosystems—example of Poland. *Polycycl. Aromat. Compd.* 21: 287-295.
- Maliszewska-Kordybach, B.(2000b) Organic contaminants in agricultural soils in Central and East European countries as compared to West European countries; example of PAHs. In: M.J. Wilson and B. Maliszewska-Kordybach(eds.), *Soil quality, sustainable agriculture and environmental security in central and eastern Europe*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Boston, London, pp. 49-60.
- Maliszewska-Kordybach, B. and B. Smreczak(2000) Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—Effect on plants. *Environ. Technol.* 21: 1099– 1110.
- Matsumoto, H., N. Wakiuchi and E. Takahashi(1969). The suppression of starch synthesis and the accumulation of uridine diphosphoglucose in cucumber leaves due to ammonium toxicity. *Physiol. Plant.* 22: 537-545.
- Mehrer, I. and H. Mohr(1989) Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation. *Physiol. Plant.* 77: 545-554.
- Melzer, A., G. Gebauer and H. Rehder(1984) Nitrate content and nitrate reductase activity in *Rumex obtusifolius* L.: II. Response to nitrate starvation and nitrogen fertilization. *Oecologia.* 63: 380-385.
- OECD(2002) Revised proposal for a new guideline 221: *Lemna* sp. growth inhibition test. Washington, DC: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals
- Oleszczuk, P.(2008) Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69: 496–505.
- Pahlmann, R. and O. Pelkonen(1987) Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structures. *Carcinogenesis* 8: 773-778.
- Pothuluri, J.V. and C.E. Cerniglia(1994) Microbial metabolism of cyclic aromatic hydrocarbon. In: G.R. Chaundry(ed.), *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*, Dioscorides Press, Portland, Oregon, pp. 92-124.
- Reddy, K.S. and R.C. Menary(1990) Nitrate reductase and nitrate accumulation in relation to nitrate toxicity in *Boronia megastigma*. *Physiol. Plant.* 78: 430-434.
- Rejmánková, E.(1975) Comparison of *Lemna gibba* and *Lemna minor* from the production ecological viewpoint. *Aquat. Bot.* 1: 423-427.
- Salsac, L., S. Chaillou, J.F. Morot-Gaudry, C. Lesaint and E. Jolivet(1987) Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805-812.
- Schulze, E.D.(1989) Air pollution and forest decline in a spruce (*Picea abies*) forest. *Science* 244: 776-783.
- Terelak, H. and T. Motowicka-Terelak(2000) The heavy metals and sulfur status of agricultural soils in Poland. In: M.J. Wilson and B. Maliszewska-Kordybach (eds.), *Soil quality, sustainable agriculture and environmental security in central and eastern Europe*, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, Boston, London, pp. 37-48.
- Wang, W.(1990) Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* 52: 7-22.
- Wild, S.R. and K.C. Jones(1995) Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* 88: 91-108.