



Otrzymano: 30 marca 2016
Zaakceptowano: 9 maja 2016
Udostępniono online: 16 maja 2016

Oddziaływanie nadtlenu wapnia na aktywność wybranych oksydoreduktaz w glebie zanieczyszczonej olejem krezotowym

The effect of calcium peroxide on the activity of some oxidoreductases in soil contaminated with creosote

Michał STRĘK, Arkadiusz TELESIŃSKI*

Katedra Fizjologii Roślin i Biochemii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, 71-434 Szczecin, Słowackiego 17, Polska

Streszczenie: Celem podjętych badań było określenie oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność wybranych enzymów oksydoredukcyjnych: dehydrogenaz, oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy w glebie zanieczyszczonej olejem krezotowym. Doświadczenie laboratoryjne przeprowadzono na próbkach gleb pobranych z poziomu ornopróchnicznego (0÷30 cm) ziem rdzawych typowych (piasek gliniasty, C_{org} 8.7 g·kg⁻¹). Do części ziemistych pobranego materiału glebowego wprowadzono w różnych kombinacjach olej krezotowy typu C (w ilościach 0 i 50 g·kg⁻¹) oraz nadtlenek wapnia (w ilościach 0, 100 i 200 mg·kg⁻¹). Próbkę doprowadzono do 60% maksymalnej pojemności wodnej i przechowywano w szczelnie zamkniętych szklanych pojemnikach w temperaturze 20°C. We wszystkich kombinacjach oznaczono w 1., 7., 14. i 28. dniu doświadczenia aktywność dehydrogenaz, oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy. Zanieczyszczenie gleby olejem krezotowym w dawce 50 g·kg⁻¹ spowodowało inhibicję aktywności oznaczanych oksydoreduktaz, co szczególnie uwidoczniło się w aktywności oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy. Wprowadzenie nadtlenu wapnia w dawce 100 mg·kg⁻¹ zarówno do gleby zanieczyszczonej, jak i niezanieczyszczonej olejem krezotowym w niewielkim stopniu spowodowało zmiany aktywności oznaczanych enzymów. Natomiast zastosowanie CaO₂ w dawce 200 mg·kg⁻¹ przyczyniło się do poprawy aktywności dehydrogenaz i katalazy w glebie zawierającej olej krezotowy.

Słowa kluczowe: olej krezotowy; nadtlenek wapnia; aktywność enzymatyczna; gleba

Abstract: The aim of study was the assessment of calcium peroxide influence on some oxidoreductases (dehydrogenase, *o*-diphenol oxidase, catalase) activities in soil contaminated with creosote. The laboratory experiment was carried out on loamy sand samples with organic carbon content of 8.7 g·kg⁻¹. Different combination of creosote (0 and 50 g·kg⁻¹) and calcium peroxide (0, 100 and 200 mg·kg⁻¹) were added to soil samples. The soil samples were adjusted to 60% maximum water holding capacity, and they were incubated in tightly closed glass containers at a temperature of 20°C. Activity of dehydrogenase, *o*-diphenol oxidase and catalase was determined on day 1, 7, 14 and 28. Soil contamination with creosote caused inhibition of analyzed oxidoreductases, especially *o*-diphenol oxidase and catalase. Application of calcium peroxide at the dosage of 100 mg·kg⁻¹ to non-contaminated soil and to soil with creosote usually had only a little impact on the activity of determined enzymes. However application of CaO₂ at the dosage of 200 mg·kg⁻¹ caused increase in dehydrogenase and catalase in soil containing creosote.

Keywords: creosote; calcium peroxide; enzymatic activity; soil

1. Wstęp

Olej krezotowy, stosowany do impregnacji drewnianych podkładów kolejowych, jest mieszaniną wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (w tym m.in. naftalenu, antracenu, fenantrenu, chryzenu), stanowiących od 80 do 90% składników oleju oraz składników zasadowych i kwaśnych – krezoli, fenoli czy metylowych pochodnych piryny i innych [1]. Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 528/2012 z dnia 22 maja 2012 r. [2], od 1 maja 2013 r. krezot, stosowany do impregnacji podkładów kolejowych, uznano za bezprogowy czynnik rakotwórczy i sklasyfikowano jako substancję rakotwórczą kategorii 1B, a niektóre z wielopierścieniowych węglowodorów aroma-

tycznych (WWA) uznano za trwałe, zdolne do bioakumulacji i toksyczne [3].

Ze względu na wysoką toksyczność, konieczne jest poszukiwanie skutecznych metod bioremediacji gleby skażonej olejem krezotowym. Dotyczy to przede wszystkim obszarów szczególnie narażonych na zanieczyszczenie olejem krezotowym, np. na terenie nasycalni podkładów kolejowych. Jak podają Liu i in. [4], jedną z obiecujących metod jest zastosowanie nadtlenu. Podczas rozkładu tych związków, powstaje nadtlenek wodoru, który jest z jednej strony źródłem tlenu dla mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, a z drugiej powstają z niego rodniki hydroksylowe, zdolne do utleniania zanieczyszczeń organicznych [5].

Badania wielu autorów wykazały, że wprowadzenie do gleby nadtlenu wapnia jest jednym z najbardziej skutecznych sposobów usuwania z gleby wielopierścieniowych węglowo-

* Autor korespondencyjny.
Adres e-mail: arkadiusz.telesinski@zut.edu.pl (A. Telesiński).

dorów aromatycznych, tetrachloroetyleny czy 2,4,6-trinitrotoluenu [6–10]. Niska rozpuszczalność tego związku umożliwia ciągle uwalnianie nadtlenu wodoru i tlenu przez długi okres czasu. Ponadto, dodanie nadtlenu wapnia, umożliwia rozkład zanieczyszczeń w szerokim zakresie pH.

Jednym ze wskaźników oceny stanu jakości środowiska glebowego, jak i szybkości rozkładu substancji ropopochodnych jest aktywność enzymatyczna [11]. Większość enzymów biorących udział w degradacji węglowodorów należy do klasy oksydoreduktaz [12].

Celem podjętych badań było określenie oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność wybranych enzymów oksydoredukcyjnych: dehydrogenaz, oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy w glebie zanieczyszczonej olejem krezotowym.

2. Część eksperymentalna

Doświadczenia przeprowadzono w Laboratorium Diagnostycznym Stanu Środowiska Przyrodniczego Katedry Fizjologii Roślin i Biochemii Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, na próbkach gleb pobranych z poziomu ornopróchnicznego (0÷30 cm) ziem rdzawych typowych z terenu Rolniczej Stacji Doświadczalnej w Lipniku (woj. zachodniopomorskie).

Gleba ta charakteryzuje się składem granulometrycznym piasku gliniastego oraz zawartością węgla organicznego 8.7 g C·kg⁻¹. Do części ziemistych pobranego materiału glebowego wprowadzono w różnych kombinacjach olej krezotowy typu C (w ilościach 0 i 50 g·kg⁻¹) oraz nadtlenek wapnia – CaO₂ (w ilościach 0, 100 i 200 mg·kg⁻¹).

Następnie doprowadzono wilgotność gleby do 60% maksymalnej pojemności wodnej. Glebę dokładnie wymieszano i przechowywano w szczelnie zamkniętych szklanych pojemnikach typu twist w temperaturze 20°C. We wszystkich kombinacjach w trzech powtórzeniach badano aktywność dehydrogenaz [13], oksydazy *o*-difenolowej [14] oraz katalazy [15] w 1., 7., 14. i 28. dniu doświadczenia. Substratami do oznaczania aktywności dehydrogenaz był chlorek 2,3,5-trifenyloctetrazolu (TTC), katalazy – nadtlenek wodoru, a oksydazy *o*-difenolowej – katechol i prolina. Do sporządzania roztworów wykorzystano wodę zdejonizowaną o średniej przewodności właściwej 0.15 μS·cm⁻¹ i napięciu powierzchniowym 72.3 mN·m⁻¹ w temperaturze 25°C. W oznacze-

niach spektrofotometrycznych zastosowano spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu).

W oparciu o otrzymane wyniki aktywności oksydoreduktaz obliczono indeks oddziaływania nadtlenu wapnia, zgodnie ze wzorem podanymi przez Kaczyńską i in. [16]:

$$IF = \frac{A_{n.w.}}{A} \quad (1)$$

IF – indeks oddziaływania nadtlenu wapnia; *A* – aktywność oksydoreduktaz w glebie kontrolnej (*A*₀) lub w glebie zanieczyszczonej olejem krezotowym (*A*_{o.k.}); *A*_{n.w.} – aktywność oksydoreduktaz w glebie po aplikacji nadtlenu wapnia.

Wartości *IF* równe 1 świadczą o braku wpływu nadtlenu wapnia na aktywność oksydoreduktaz, natomiast wartości powyżej i poniżej 1 wskazują odpowiednio na inhibicję i stymulację aktywności enzymu.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu oprogramowania STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc.). Grupy jednorodnie wyznaczono na podstawie obliczonych testem Tukey'a najmniejszych istotnych różnic na poziomie *p* < 0.05. Ponadto w oparciu o analizę wariancji η^2 określono procentowy udział poszczególnych czynników w zmianie aktywności oksydoreduktaz.

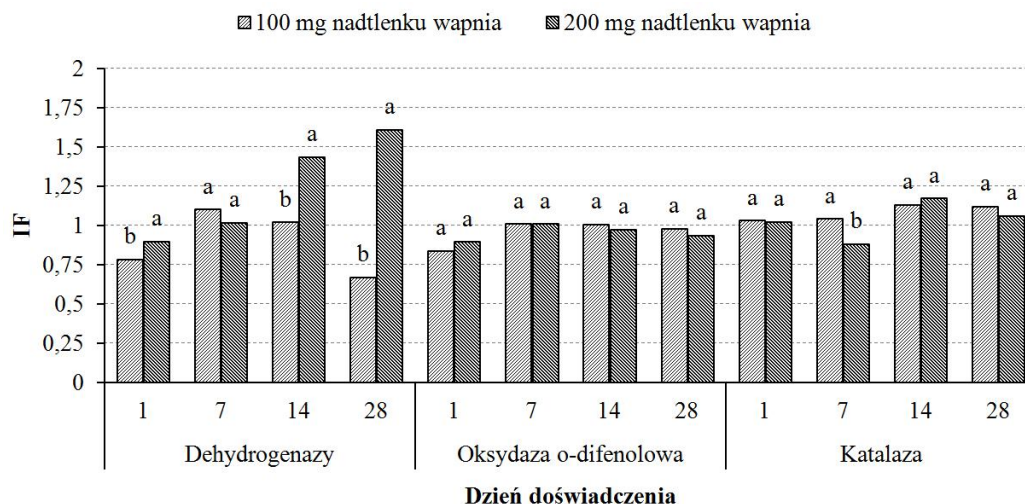
3. Wyniki i dyskusja

Aktywność oznaczanych enzymów w glebie bez dodatku oleju krezotowego oraz nadtlenu wapnia w trakcie trwania doświadczenia kształtowała się na poziomie: dehydrogenazy – 8.45–20.68 mg TPF·(kg·s.m.·16 h)⁻¹, oksydazy *o*-difenolowa – 2.04–3.25 mmol utlenionego katecholu·(kg·s.m.·10 min)⁻¹, katalaza – 2.70–3.54 mmol H₂O₂·(kg·s.m.·min)⁻¹. Wprowadzenie do gleby oleju krezotowego w ilości 50 g·kg⁻¹ spowodowało w 1. i 7. dniu doświadczenia istotny statystycznie wzrost aktywności dehydrogenaz odpowiednio o 50.4 i 48.5% w stosunku do gleby kontrolnej. W kolejnych terminach pomiarów (14. i 28. dzień doświadczenia) odnotowano inhibujące działanie oleju krezotowego na aktywność tej grupy enzymów (o 36.4 i 51.2% w odniesieniu do kontroli). Natomiast aktywność oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy w glebie z dodatkiem oleju krezotowego w trakcie trwania całego doświadczenia była niższa niż w glebie kontrolnej, odpowiednio o 65.4–79.3% i 43.8–82.0% (Tabela 1).

Tabela 1. Wpływ oleju krezotowego na aktywność oksydoreduktaz w glebie.

Ilość oleju krezotowego (g·kg ⁻¹)	Dzień doświadczenia			
	1	7	14	28
Dehydrogenazy (mg TPF·(kg·s.m.·16 h) ⁻¹)				
0	8.45 ^b	8.93 ^b	11.13 ^a	20.68 ^a
50	12.71 ^a	13.26 ^a	7.08 ^b	10.10 ^b
Oksydaza <i>o</i> -difenolowa (mmol utlenionego katecholu·(kg·s.m.·10 min) ⁻¹)				
0	3.25 ^a	2.04 ^a	2.14 ^a	2.09 ^a
50	0.67 ^b	0.71 ^b	0.59 ^b	0.56 ^b
Katalaza (mmol H ₂ O ₂ ·(kg·s.m.·min) ⁻¹)				
0	3.54 ^a	2.96 ^a	2.70 ^a	3.33 ^a
50	1.84 ^b	1.31 ^b	1.01 ^b	0.50 ^b

Wartości w obrębie kolumn, dotyczące danego enzymu, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie na poziomie *p* < 0.05.



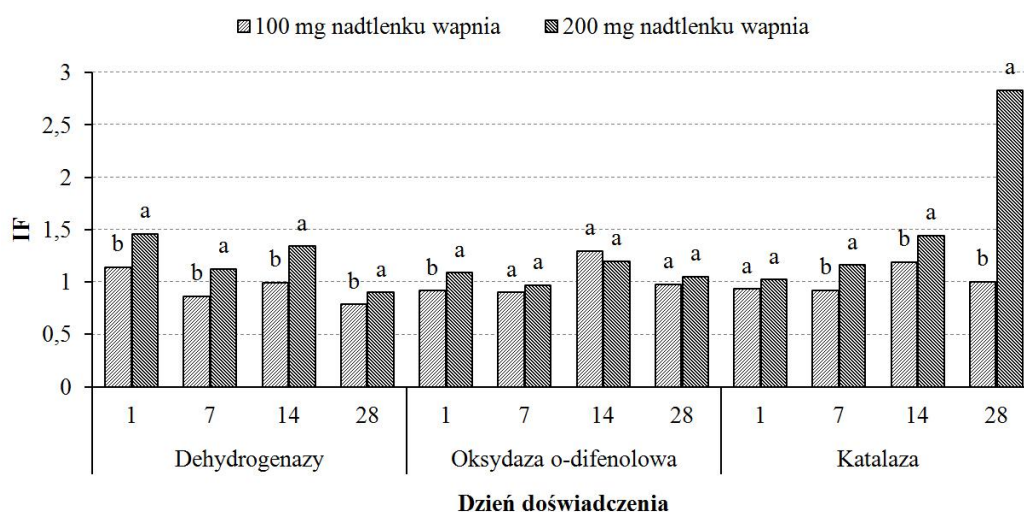
Rysunek 1. Wskaźniki oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność oksydoreduktaz w glebie niezanieczyszczonej olejem kreozotowym.

Badania wielu autorów wykazały, że aktywność enzymatyczna jest bardzo dobrym wskaźnikiem służącym do oceny zanieczyszczenia gleby substancjami ropopochodnymi, zwłaszcza wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi [5,17–20]. Głównymi składnikami oleju kreozotowego są właśnie WWA [21], a w ich biodegradację zaangażowane są przede wszystkim enzymy oksydoredukcyjne wydzielane przez grzyby [22]. Jednakże Bielińska i in. [23] podają, że relacje między aktywnością enzymatyczną a zawartością WWA w glebach są w dużej mierze determinowane poprzez stan środowiska kształtowanego intensywnością presji antropogenicznej. Ponadto Molnar i in. [24], badając szereg parametrów fizycznych, chemicznych i biologicznych, wykazali, że istnieją lepsze wskaźniki biodegradacji oleju kreozotowego niż aktywność enzymatyczna jak np. ocena ekotoksyczności.

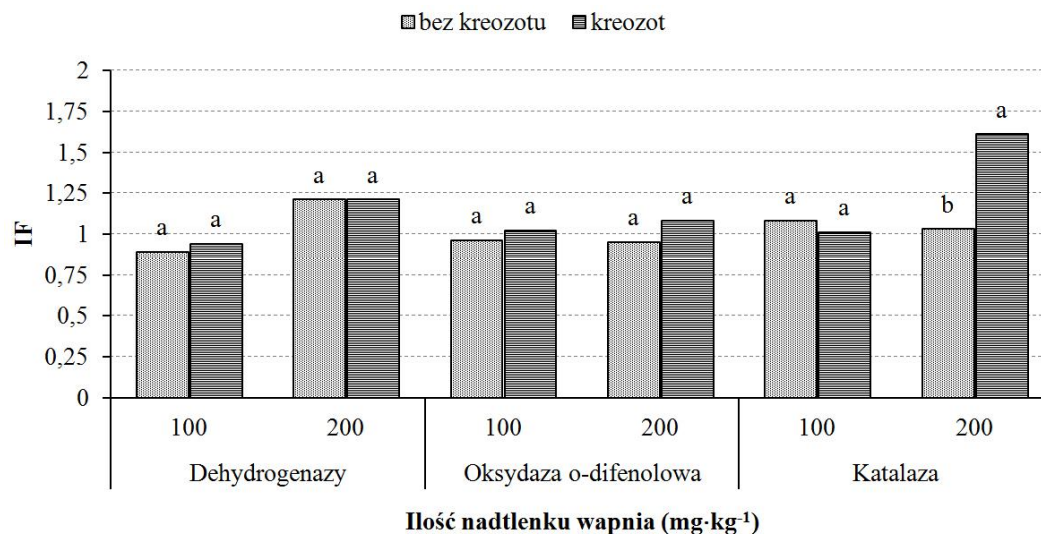
W glebie niezanieczyszczonej olejem kreozotowym wprowadzenie nadtlenu wapnia w ilości 100 mg·kg⁻¹ spowodowało w 1. i 28. dniu doświadczenia obniżenie aktywności dehydrogenaz (wartości *IF* wynosiły odpowiednio 0.78 i 0.67).

W dwóch pozostałych terminach pomiarów aktywność tej grupy enzymów była zbliżona do gleby kontrolnej. Natomiast po aplikacji CaO₂ w ilości 200 mg·kg⁻¹ odnotowano w 1. dniu doświadczenia spadek aktywności dehydrogenaz (*IF* = 0.89). W kolejnych dniach eksperymentu aktywność dehydrogenaz systematycznie wzrastała w porównaniu do gleby kontrolnej i w 7. dniu doświadczenia była zbliżona do kontroli (*IF* = 1.02), a w 14. i 28. dniu doświadczenia wystąpiła aktywacja tej grupy (wartości *IF* wynosiły odpowiednio 1.47 i 1.61).

Aktywność oksydazy o-difenolowej w glebie niezanieczyszczonej olejem kreozotowym po wprowadzeniu obu dawek CaO₂ uległa obniżeniu jedynie w 1. dniu doświadczenia (wartości *IF* wynosiły odpowiednio 0.84 i 0.89), a w kolejnych terminach pomiarów była zbliżona do aktywności w glebie kontrolnej (dla dawki 100 mg·kg⁻¹ *IF* od 0.98 do 1.01, dla dawki 200 mg·kg⁻¹ *IF* od 0.93 do 1.01). Ponadto we wszystkich dniach nie odnotowano istotnych statycznie różnic (*p* < 0.05) pomiędzy oddziaływaniem obu dawek nadtlenu wapnia na aktywność oksydazy o-difenolowej



Rysunek 2. Wskaźniki oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność oksydoreduktaz w glebie zanieczyszczonej olejem kreozotowym.



Rysunek 3. Średnie wartości wskaźników oddziaływania nadtlenu wapnia na aktywność oksydoreduktaz w glebie niezanieczyszczonej i zanieczyszczonej olejem kreozytowym.

(Rysunek 1).

Aktywność katalazy w glebie niezanieczyszczonej olejem kreozytowym po aplikacji obu dawek CaO₂ nie uległa większym zmianom (wartości *IF* wynosiły odpowiednio 1.03 i 1.02). W 7. dniu doświadczenia tendencja ta utrzymała się dla dawki 100 mg·kg⁻¹, podczas gdy dawka 200 mg·kg⁻¹ spowodowała inhibicję aktywności enzymu (*IF* = 0.88). Natomiast w dwóch kolejnych terminach pomiarów aktywność katalazy uległa niewielkiej stymulacji (dla dawki 100 mg·kg⁻¹ *IF* wynosił 1.13 i 1.12, dla dawki 200 mg·kg⁻¹ *IF* wynosił 1.17 i 1.06).

W glebie zanieczyszczonej olejem kreozytowym dodatek nadtlenu wapnia w ilości 100 mg·kg⁻¹ wywołał w 1. dniu doświadczenia wzrost (*IF* = 1.14), a w 7. i 28. dniu doświadczenia spadek (*IF* odpowiednio 0.86 i 0.78) aktywności dehydrogenaz. Natomiast po aplikacji CaO₂ w ilości 200 mg·kg⁻¹ odnotowano stymulację tej grupy enzymów w pierwszych trzech terminach pomiarów (wartości *IF* od 1.12 do 1.46) oraz jej inhibicję w 28. dniu doświadczenia (*IF* = 0.91). Wprowadzenie CaO₂ w obu ilościach jedynie w 14. dniu doświadczenia wywołało podwyższenie aktywności oksydazy o-difenolowej (dla dawki 100 mg·kg⁻¹ *IF* wynosił 1.29, dla dawki 200 mg·kg⁻¹ 1.20); w pozostałych terminach pomiarów zmiany aktywności enzymu nie przekraczały 0.1. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku katalazy po aplikacji nadtlenu wapnia

w ilości 100 mg·kg⁻¹ (*IF* w 14. dniu doświadczenia 1.19). Natomiast po dodaniu CaO₂ w ilości 200 mg·kg⁻¹ aktywność katalazy w 1. dniu doświadczenia zbliżona była do gleby zanieczyszczonej olejem kreozytowym, w kolejnych dniach eksperymentu aktywność enzymu systematycznie wzrastała w porównaniu do gleby zanieczyszczonej olejem i w 28. dniu doświadczenia wartość *IF* wynosiła aż 2.83 (Rysunek 2).

Analizując średnie wartości *IF* dla oznaczanych oksydoreduktaz, stwierdzono, że po wprowadzeniu nadtlenu wapnia, w większości przypadków były one podobne w glebie bez oleju kreozytowego, jak i z olejem kreozytowym. Ponadto zazwyczaj były one także zbliżone do 1. Jedyne aktywność katalazy w glebie zanieczyszczonej olejem kreozytowym uległa znacznej stymulacji po dodaniu CaO₂ w ilości 200 mg·kg⁻¹ (*IF* = 1.61). Może to być spowodowane poprzez zwiększone uwalnianie do środowiska nadtlenu wodoru, który jest substratem katalazy [25]. Na uwagę zasługuje również podwyższenie aktywności dehydrogenaz po aplikacji CaO₂ w ilości 200 mg·kg⁻¹ (Rysunek 3).

Dostępne dane literaturowe wskazują, że zastosowanie nadtlenu wapnia, jak i innych nadtlenu przyspiesza degradację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie [5,25,26] może jednak negatywnie oddziaływać na aktywność enzymów glebowych [5], co potwierdzają przed-

Tabela 2. Procentowy udział czynników doświadczalnych w kształtowaniu aktywności oksydoreduktaz w glebie.

Czynnik zmienności	Dehydrogenazy	Oksydaza o-difenolowa	Katalaza
Ilość oleju kreozytowego (A)	6.74	96.01	90.91
Ilość CaO ₂ (B)	15.92	0.05	0.59
Dzień doświadczenia (C)	13.73	1.96	0.70
A × B	2.07	0.11	6.64
A × C	51.72	1.64	0.62
B × C	3.20	0.08	0.20
A × B × C	6.16	0.05	0.16
Błąd	0.44	0.10	0.19

stawione wyniki badań. Podobne zależności zostały wykazane w doświadczeniach nad możliwością wykorzystania biowęglu [27], biosurfaktantów [22] i biogenów [28] do bioremediacji gleb zanieczyszczonych olejem kreozytowym.

Wyniki analizy wariancji η^2 wykazały, że na aktywność oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy największy wpływ miała ilość oleju kreozytowego. Natomiast aktywność dehydrogenaz była w największym stopniu kształtowana przez interakcję między ilością oleju kreozytowego a dniem doświadczenia. Można ponadto zauważyć, że wśród oznaczanych oksydoreduktaz ilość nadtlenu wapnia miała znaczący wpływ jedynie na aktywność dehydrogenaz (Tabela 2).

4. Podsumowanie

(1) Zanieczyszczenie gleby olejem kreozytowym w dawce $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ spowodowało inhibicję aktywności oznaczanych oksydoreduktaz, co szczególnie uwidoczniło się w przypadku oksydazy *o*-difenolowej oraz katalazy.

(2) Zastosowanie nadtlenu wapnia w dawce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ okazało się niewystarczająco skuteczne w ograniczeniu oddziaływania oleju kreozytowego na aktywność dehydrogenaz, katalazy i oksydazy *o*-difenolowej w glebie. Natomiast wprowadzenie CaO_2 przyczyniło się do poprawy aktywności dehydrogenaz oraz katalazy.

(3) Spośród analizowanych oksydoreduktaz aktywność katalazy była w największym stopniu kształtowana przez dodatek nadtlenu wapnia.

Literatura

- [1] E. Gallego, F.J. Roca, J.F. Perales, X. Guardino, M.J. Berenguer, *Sci. Total Environ.*, **2008**, *402*, 130–138. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.04.008
- [2] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 528/2012 z dnia 22 maja 2012 r. (Dz.U. L 167 z 27.6.2012).
- [3] E. Kukulska-Zajac, A. Król, A. Krasieńska, *Chemik*, **2014**, *68*, 979–982.
- [4] X. Liu, X. Song, Z. Zhang, M. Wang, B. Pan, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 7571–7577. doi: 10.1039/C3CP54765E
- [5] A. Małachowska-Jutcz, M. Niesler, *Water Air Soil Pollut.*, **2015**, *226*, 365–375. doi: 10.1007/s11270-015-2632-y
- [6] M. Arienzo, *Chemosphere*, **2000**, *40*, 441–448.
- [7] G.C. Bianchi-Mosquera, R.M. Allen-King, D.M. Mackay, *Ground Water Monit. Remed.*, **1994**, *14*, 120–128.
- [8] A. Goi, M. Viisimaa, M. Trapido, R. Munter, *Chemosphere*, **2011**, *82*, 1196–1201. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.11.053
- [9] D.N. Hanh, B.K. Rajbhandari, A.P. Annachhatre, *Environ. Technol.*, **2005**, *26*, 581–589. doi: 10.1080/09593332608618543
- [10] J. Khodawesi, H. Benejad, A. Afkhami, E. Olyae, S. Lashgari, R. Dashti, *J. Hazard. Mater.*, **2011**, *192*, 1437–1440. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.06.060
- [11] P. Chaudhary, B.S. Shashi, S. Chaudhry, L. Nain, *Environ. Monit. Assess.*, **2012**, *184*, 1145–1156. doi: 10.1007/s10661-011-2029-3
- [12] A.K. Haritash, C.P. Kaushik, *J. Hazard. Mater.*, **2009**, *169*, 1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137
- [13] V. Balaji, P. Arulazhagan, P. Ebenezer, *J. Environ. Biol.*, **2014**, *35*, 521–529.
- [14] F.A. Bezza, M. Nkhalambayausi Chirwa, *Chemosphere*, **2016**, *144*, 635–644. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.027
- [15] E.J. Bielińska, A. Mocek-Plóćiniak, B. Futa, M. Kawecka-Radomska, *J. Res. Appl. Agric. Engin.*, **2014**, *59*, 8–11.
- [16] M. Molnar, K. Gruiz, M. Halász, *Chem. Engin.*, **2007**, *51*, 23–32. doi: 10.3311/pp.ch.2007-1.05
- [17] V.S. Gan, H.K. Ng, *Chem. Engin. J.*, **2012**, *213*, 295–317. doi: 10.1016/j.cej.2012.10.005
- [18] M.R. Palmroth, J.H. Langwaldt, T.A. Aunola, A. Goi, U. Münster, J.A. Puhakka, T.A. Tuhkanen, *Biodegradation*, **2006**, *17*, 131–141.
- [19] C. Garcia-Delgado, I. Alfaro-Barta, E. Eymar, *J. Hazard. Mater.*, **2015**, *285*, 259–266. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.12.002
- [20] T. Sayara, E. Borrás, G. Caminal, M. Sarra, A. Sanchez, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **2011**, *65*, 859–865. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.05.006
- [21] A. Thalmann, *Landwirtsch. Forsch.*, **1968**, *21*, 249–258.
- [22] R. Perucci, C. Casucci, S. Dumonet, *Soil Biol. Biochem.*, **2000**, *32*, 1927–1933.
- [23] J.I. Johnson, K.L. Temple, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **1964**, *28*, 207–209.
- [24] G. Kaczyńska, A. Borowik, J. Wyszowska, *Water Air Soil Pollut.*, **2015**, *226*, 372. doi: 10.1007/s11270-015-2642-9
- [25] V. Andreoni, L. Cavalca, M.A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, M. Colombo, L. Gianfreda, *Chemosphere*, **2004**, *57*, 401–412.
- [26] S. Baran, E.J. Bielińska, P. Oleszczuk, *Geoderma*, **2004**, *118*, 221–232.
- [27] A. Lipińska, J. Kucharski, J. Wyszowska, *Water Air Soil Pollut.*, **2014**, *222*, 2097. doi: 10.1007/s11270-014-2097-4
- [28] M. Stręk, A. Telesiński, *Ochr. Środ.*, **2015**, *37*, 43–47.