

Received: 17.11.2017 / Accepted: 27.02.2018

Adjuvants as a factor modifying the effect of herbicide on microbial activity of soil polluted with copper and zinc

Adiuwanty jako czynnik modyfikujący wpływ herbicydu na aktywność mikrobiologiczną gleby zanieczyszczonej miedzią i cynkiem

Olga Zajączkowska*, Mariusz Kucharski

Summary

The aim of the studies was to determine the influence of herbicide chlorotoluron applied with oil adjuvants and surfactant on soil microbial activity under controlled conditions. Herbicide containing adjuvants and surfactant was applied to two different soils, which had similar textures, pH and organic carbon content but varied in content of copper and zinc. The soil samples were taken for analysis at given intervals. Soil microbiological activity was analyzed using colorimetric method. The amount of formazan (TF) in soil samples was considered as a microbial activity indicator. High concentration of heavy metals in soil decreased microbial activity. Use of surfactant reduced negative impact of chlorotoluron on soil microorganisms. Application of oil adjuvant with chlorotoluron promoted faster microbial regeneration in soil.

Key words: heavy metals; adjuvants; soil microorganisms; soil microbial activity; chlorotoluron; dehydrogenase

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu adiuwantów stosowanych łącznie z herbicydem na aktywność mikrobiologiczną gleby. Badania prowadzono w warunkach kontrolowanych. Herbicyd zawierający chlorotoluron stosowany łącznie z adiuwantem olejowym i surfaktantem aplikowano na dwa warianty tej samej gleby – zanieczyszczoną kontrolowanymi dawkami soli Cu i Zn oraz niewykazującą takiego zanieczyszczenia. Próbki do analizy pobierano w przyjętych odstępach czasu. Aktywność mikrobiologiczną oznaczano metodą kolorymetryczną. Za wskaźnik aktywności mikrobiologicznej przyjęto ilość formazanu (TF) w próbkach glebowych. Obecność metali ciężkich powodowała spadek aktywności mikrobiologicznej. Połączenie herbicydu z surfaktantem redukowało negatywne oddziaływanie herbicydu na mikroflorę gleby. Dodatek adiuwanta olejowego sprzyjał szybszej regeneracji mikroorganizmów w badanej glebie.

Słowa kluczowe: metale ciężkie; adiuwanty; mikroorganizmy glebowe; aktywność mikrobiologiczna gleby; chlorotoluron; dehydrogenaza

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Herbolgii i Techniki Uprawy Roli
Orzechowa 61, 50-540 Wrocław

*corresponding author: o.kalitowska@iung.wroclaw.pl

Wstęp / Introduction

Mikroorganizmy glebowe odgrywają znaczącą rolę w obiegu pierwiastków w przyrodzie, tworzeniu i zachowaniu struktury gleby, detoksykacji szkodliwych substancji, kontroli szkodników roślinnych i wzrostu roślin (Wang i wsp. 2007). Różnorodność i aktywności mikroorganizmów od wielu lat uważane są za istotne markery stanu gleb (Kizilkaya i wsp. 2004; Renella i wsp. 2004; Klimek i Niklińska 2007; Wang i wsp. 2007). Dane literaturowe jednoznacznie wskazują, że ksenobiotyki, takie jak metale ciężkie czy herbicydy mają wpływ na aktywność enzymatyczną grzybów i bakterii. W małych stężeniach substancje te mogą działać stymulująco, w dużych wykazują działanie hamujące (Badura i wsp. 1980; Nowak i wsp. 1999; Mocek-Płóćiniak 2010). Wiele badań wskazuje również, iż bakterie są znacznie bardziej podatne na stres wywołany obecnością metali ciężkich niż grzyby (Wyszkowska i Kucharski 2003; Lock i Janssen 2005; Klimek i Niklińska 2007; Mocek-Płóćiniak 2011). Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi stanowi zazwyczaj problem lokalny i jest efektem intensywnego oddziaływania przemysłu wydobywczego, przetwórstwa metali, produkcji energii, składowisk odpadów, a nawet samego rolnictwa. W skali kraju podwyższone zawartości takich pierwiastków, jak miedź i cynk odnotowano odpowiednio w 10,6% i 12,2% gruntów ornych, jednak na terenie Dolnego Śląska wartości te wzrastają do 14,4% gruntów ornych wykazujących co najmniej podwyższone zawartości Cu i 24,8% gruntów ornych wykazujących podwyższone zawartości Zn (Karczewska 2008). Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin (ś.o.r.) jest współcześnie jednym z najprostszych i chętnie stosowanych sposobów kontrolowania agrofagów w uprawach polowych. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego (Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2016) w ostatnich latach sprzedaż herbicydów wzrosła z 24 455 ton (rok 2005) do 38 799 ton (rok 2015). Wprowadzanie herbicydów do gleby tworzy warunki stresowe nie tylko dla zwalczanej rośliny. Elementem środowiska szczególnie wrażliwym na działanie czynników zewnętrznych jest życie mikrobiologiczne gleby, którego różnorodność i aktywność jest bardzo istotna w ocenie stanu zanieczyszczenia gruntów (Kizilkaya i wsp. 2004; Renella i wsp. 2004; Klimek i Niklińska 2007; Wang i wsp. 2007). W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na adiuwanty jako środki mogące minimalizować negatywne oddziaływanie pestycydów na środowisko, w tym na biologię gleby. Przy ocenie wpływu metali ciężkich i herbicydów na aktywność mikrobiologiczną, szczególne istotne jest oznaczenie aktywności dehydrogenaz (DH). Jest to bowiem wskaźnik intensywności metabolizmu oddechowego żywych, nieuszkodzonych komórek bakterii i promieniowców, bardzo wrażliwy na działanie metali ciężkich (Margesin i wsp. 2000; Maliszewska-Kordybach i Smreczak 2003; Mocek-Płóćiniak 2010).

Celem badań była ocena wpływu łącznego stosowania herbicydu zawierającego chlorotoluron z adiuwantami na aktywność mikrobiologiczną gleby zanieczyszczonej miedzią i cynkiem.

Materiały i metody / Materials and methods

Stosowano herbicyd Lentipur Flo 500 SC zawierający substancję czynną (s.cz.) chlorotoluron (3-(3-chloro-p-tolyl)-1,1-dimthylurea) produkcji Nufarm GmbH & Co KG, Linz, Austria oraz adiuwant olejowy Atpolan Soil Maxx (mieszanina oleju mineralnego i estrów metylowych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego, 80%) produkcji Zakład Produkcyjno-Handlowy Agromix, Niepołomice, Polska i surfaktant Trend 90 EC (oksyetylowany alkohol izodecyłowy, 90%) produkcji DuPont de Nemours S.A.S., Paryż, Francja. Glebę do badań pobrano z pola uprawnego w okolicach Wrocławia z warstwy ornej 0–20 cm. Gleba charakteryzowała się uziarnieniem pyłu gliniastego (piasek 30%, pył 64%, il 4%), odczynem obojętnym (pH w 1M KCl 7,1), zawartością C_{org} na poziomie 1,23% i nie wykazywała zanieczyszczenia metalami ciężkimi. Część pobranej gleby skażono w warunkach laboratoryjnych solami miedzi ($CuSO_4 \times 5H_2O$) produkcji Chempur, Piekary Śląskie i cynku ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) produkcji Chempur, Piekary Śląskie w dawkach odpowiadających IV stopniowi zanieczyszczenia Cu według skali Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa (514 mg Cu/kg gleby) i II stopniowi zanieczyszczenia Zn (455 mg Zn/kg gleby). Doświadczenia prowadzono w warunkach kontrolowanych. Glebę o ustalonej wilgotności (60% mpw) napełniano doniczki o średnicy 7 i wysokości 7,5 cm. Liczbę doniczek ustalono jako iloczyn kombinacji występujących w doświadczeniu (2 warianty skażenia gleby, 1 herbicyd, 2 adiuwanty), 3 powtórzeń i liczby pobrań (1 doniczka = 1 pobranie). Siarczan miedzi i cynku aplikowano na glebę w postaci wodnego roztworu w dawce 1,21 g $CuSO_4$ /kg gleby i 1,13 g $ZnSO_4$ /kg gleby. Gleba skażona metalami ciężkimi przed aplikacją herbicydu była inkubowana w warunkach laboratoryjnych przez 14 dni. Po tym czasie aplikowano na gleby, według ustalonego schematu, herbicyd oraz jego mieszaninę z adiuwantami (tab. 1). Zabieg przeprowadzono w stacjonarnej komorze opryskowej z ruchomą dyszą typu TeeJet XR 11003-VS, o wydajności cieczy użytkowej 250 l/ha, przy ciśnieniu roboczym 0,2 MPa. Po opryskiwaniu doniczki inkubowano w komorze klimatycznej (Sanyo MLR-350), w której utrzymywano warunki odpowiadające wiosennej aplikacji herbicydu (dzień 16 h, 20°C, oświetlenie 14 000 lx; noc 8 h, 10°C, bez oświetlenia). W trakcie trwania doświadczenia wilgotność gleby była utrzymywana na stałym poziomie 60% mpw (metodą wagową). Próbkę do oznaczeń pobierano w następujących odstępach czasu: 2 h po aplikacji herbicydu, a następnie 1, 6, 8 i 14 dni od aplikacji herbicydu.

Tabela 1. Schemat doświadczenia
Table 1. Design of experiment

Obiekt – Object	Dawka – Dose [l, kg/ha]	Gleba – Soil	Opis do rysunku Description for figures
–	–	C	C
–	–	M	M
Chlorotoluron	1,25	C	C + H
Chlorotoluron	1,25	M	M + H
Chlorotoluron + Atpolan Soil Maxx	1,25 0,5	C	C + H + A1
Chlorotoluron + Atpolan Soil Maxx	1,25 0,5	M	M + H + A1
Chlorotoluronu + Trend 90 EC	1,25 0,2	C	C + H + A2
Chlorotoluronu + Trend 90 EC	1,25 0,2	M	M + H + A2

C – gleba bez zanieczyszczenia Cu + Zn – soil without Cu + Zn contamination

M – gleba zanieczyszczona Cu + Zn – soil contaminated with Cu + Zn

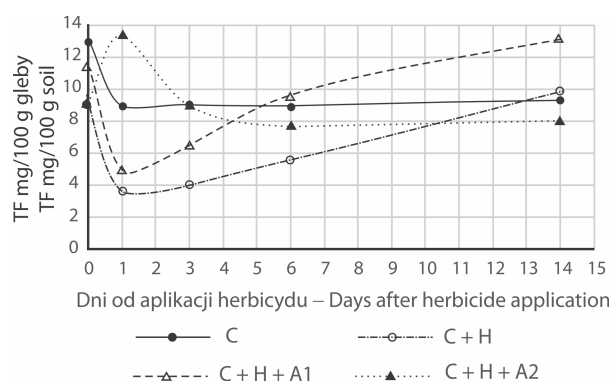
H – herbicyd – herbicide (chlorotoluron)

A1 – adiuwant olejowy – oil adjuvant

A2 – surfaktant – surfactant

Dobór czasu trwania eksperymentu został ustalony na podstawie badań własnych i danych literaturowych wykazujących, że po około 10–14 dniach od wprowadzenia do środowiska glebowego ksenobiotyków w postaci herbicydów lub metali ciężkich ogólna aktywność mikrobiologiczna osiąga stabilizację (Kandeler i wsp. 1996; Shen i wsp. 2005; Pampulha i Oliveira 2006; Abbas i wsp. 2014; Zajączkowska i Kucharski 2017). Dla ustalenia wartości referencyjnej oznaczono również ilość produkowanych dehydrogenaz w glebie bez zanieczyszczenia. Ze świeżego materiału glebowego pobrano trzy próby po 2 g i umiesz-

czono je w płaskodennych próbkach polietylenowych, a następnie dodano 1 ml 0,1% siarczanu sodu (Na_2SO_4) w celu odtlenienia próby. Do dwóch powtórzeń dodano 3 ml 3% chlorku trójfenylotetrazolinowego (TTC), natomiast do trzeciej próbki (ślepej) dodano 3 ml wody destylowanej (H_2O destylowana). Próbki inkubowano w ciemności, w stałej temperaturze 37°C przez 20 h. Po tym czasie do próbek dodano 10 ml metanolu w celu przerwania reakcji i wyekstrahowania powstałego formazanu (TF). Próbki odwirowywano na wirówce laboratoryjnej MPW 223e przy obrotach 3500 rpm przez 5 minut. Ciecz z nad osadu zbie-



M – gleba zanieczyszczona Cu + Zn – soil contaminated with Cu + Zn

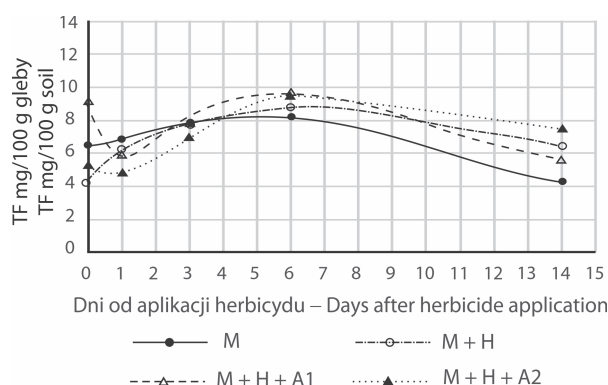
H – herbicyd – herbicide (chlorotoluron)

A1 – adiuwant olejowy – oil adjuvant

A2 – surfaktant – surfactant

Rys. 1. Zmiany aktywności mikrobiologicznej w glebie niezanieczyszczonej Cu + Zn

Fig. 1. Change in soil microbial activity in soil without Cu + Zn contamination



M – gleba zanieczyszczona Cu + Zn – soil contaminated with Cu + Zn

H – herbicyd – herbicide (chlorotoluron)

A1 – adiuwant olejowy – oil adjuvant

A2 – surfaktant – surfactant

Rys. 2. Zmiany aktywności mikrobiologicznej w glebie zanieczyszczonej Cu + Zn

Fig. 2. Change in soil microbial activity in soil contaminated with Cu + Zn

rano i oznaczono kolorymetrycznie na spektrofotometrze Genesys 10 przy długości fali 485 nm. Jednocześnie wykonano krzywą wzorcową dla stężeń 10, 20, 40, 50, 100 μg formazanu na ml. Roztwory wzorcowe sporządzono z formazanu (1,3,5-triphenyltetrazolium formazan) o czystości $\geq 90\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Aktywność dehydrogenazy była wyrażana w mg powstałego w glebie formazanu. Wszystkie doświadczenia prowadzono w 2 seriach, a w każdej z nich wykonano 3 powtórzenia. Otrzymane wyniki zostały opracowane statystycznie w programie ARM 8 (Gylling Data Management Inc., South Dakota, USA) i przedstawione na rysunkach 1 i 2.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Oddziaływanie \acute{s} .o.r. na mikroorganizmy glebowe jest niejednoznaczne. Wielu autorów raportuje zarówno wzrost, jak i spadek aktywności mikrobiologicznej po aplikacji herbicydów. Aplikacja takich substancji, jak acetamipiryd, chlorpyrifos czy diazinon powodowała wzrost produkcji dehydrogenaz, natomiast znaczny spadek produkcji tych enzymów odnotowano po aplikacji glifosatu, bromoksynilu czy acetochloru (Baćmaga i wsp. 2007; Wolińska 2010; Jacobsen i Hjelmsø 2014). W szczególnych przypadkach herbicydy, jako związki organiczne, mogą być wykorzystywane przez bakterie jako źródło łatwo dostępnego węgla. W literaturze brak jest pełnych informacji dotyczących wpływu chlorotoluronu na mikroorganizmy glebowe. Część prac pokazuje, że herbicydy z grupy pochodnych mocznika mogą stanowić pożywkę dla pewnych gatunków grzybów, jednak spośród wszystkich badanych substancji czynnych, chlorotoluron nie był najchętniej wykorzystywanym substratem (Badawi i wsp. 2009). Przebieg zmian aktywności mikrobiologicznej w glebie niezawierającej metali ciężkich przedstawiono na rysunku 1. Aktywność mikrobiologiczna w glebie niezawierającej ksenobiotyków, po początkowym niewielkim spadku, utrzymywała się na stałym poziomie w trakcie trwania doświadczenia. Najsilniejsze zahamowanie produkcji dehydrogenaz obserwowano po aplikacji samego herbicydu, jednak po około 12 dniach aktywność mikrobiologiczna powróciła do stanu początkowego. Aplikacja chlorotoluronu z surfaktantem powodowała krótkotrwały wzrost aktywności mikrobiologicznej, a następnie jej spadek do poziomu niższego niż wyjściowy. Przepuszczalnie obecność surfaktantu w pierwszej chwili uaktywniała mikroflorę zymogeniczną, tym samym krótkotrwanie maskując negatywny wpływ herbicydu. Po aplikacji chlorotoluronu z adiuwantem olejowym obserwowano w początkowym etapie trwania doświadczenia zahamowanie produkcji DH, przy czym regeneracja aktywności mikrobiologicznej następowała znacznie szybciej niż w przypadku zastosowania samego herbicydu. Zmienność aktywności mikrobiologicznej

w glebie zanieczyszczonej solami miedzi i cynku zobrazowano na rysunku 2. Pomimo, że aplikację herbicydu wykonano 14 dni po skażeniu gleby solami Cu i Zn, obserwowano nadal istotne obniżenie wyjściowej aktywności mikrobiologicznej. W chwili pojawienia się nadmiernych ilości metali ciężkich uaktywniają się trzy mechanizmy prowadzące do wykształcenia tolerancji mikroorganizmów na te ksenobiotyki: 1 – natychmiast giną gatunki najbardziej wrażliwe, 2 – następuje wybór mechanizmu tolerancji metalu przez różne możliwości i konkurencję organizmów, które przetrwały, 3 – następuje adaptacja organizmów rozwiniętych w zanieczyszczonym środowisku przez zmiany fizjologiczne i genetyczne (Lock i Janssen 2005). Obserwowany spadek produkcji dehydrogenaz może być efektem procesu adaptacyjnego mikroorganizmów do nowych warunków. Aplikacja herbicydu z adiuwantem olejowym powodowała jedynie nieznaczne obniżenie produkcji dehydrogenaz, a następnie wzrost aktywności mikrobiologicznej. Aplikacja herbicydu z surfaktantem powodowała krótkotrwałe zahamowanie aktywności DH i szybki powrót do wartości wyjściowej. Najmniejszą aktywnością mikrobiologiczną odznaczała się gleba tylko z dodatkiem metali ciężkich. Aplikacja samego herbicydu powodowała nieznaczny wzrost produkcji dehydrogenaz. Zaobserwowana różnorodność reakcji była znacznie mniejsza w porównaniu do gleby niezawierającej zanieczyszczeń, najprawdopodobniej na skutek rozwoju w glebie puli mikroorganizmów bardziej odpornych na warunki stresowe.

Wnioski / Conclusions

1. W przeprowadzonych badaniach dodatek Cu i Zn do gleby był przyczyną zmniejszenia jej aktywności mikrobiologicznej. Zastosowanie adiuwantów modyfikowało wpływ herbicydu na tę aktywność.
2. W glebie pozbawionej zanieczyszczeń reakcja mikroflory na wprowadzane \acute{s} .o.r. była dynamiczna. Zastosowanie adiuwantu olejowego redukowało negatywne działanie herbicydu i przyspieszało odbudowę puli mikroorganizmów uszkodzonych obecnością herbicydu. Zastosowanie surfaktantu, w pierwszych dniach trwania doświadczenia, znacznie stymulowało aktywność mikroflory.
3. Stosowanie połączenia herbicydów i różnego typu adiuwantów, w zabiegach przeprowadzanych na glebach wykazujących podwyższone zawartości metali ciężkich, w całości przyczyniło się do szybszej regeneracji aktywności mikrobiologicznej. Jednak w przypadku połączenia herbicydu z surfaktantem, w pierwszych 3 dniach prowadzenia badań, odnotowano istotne zahamowanie produkcji dehydrogenaz.

Podziękowanie / Acknowledgements

Praca wykonana w ramach Zadania 1.2 Programu Wieloletniego Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –

Państwowego Instytutu Badawczego, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

Literatura / References

- Abbas Z., Akmal M., Khan K.S., ul-Hassan F. 2014. Effect of butrilsuper (bromoxynil) herbicide on soil microbial biomass and bacterial population. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57 (1): 9–14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132014000100002>.
- Baćmaga M., Kucharski J., Wyszowska J. 2007. Wpływ środków ochrony roślin na aktywność mikrobiologiczną gleby. *Journal of Elementology* 12 (3): 225–239.
- Badawi N., Rønne S., Olsson S., Kragelund B.B., Johnsen A.H., Jacobsen O.S., Aamand J. 2009. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. *Environmental Pollution* 157 (10): 2806–2812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.019>.
- Badura L., Pacha J., Śliwak K. 1980. Wpływ cynku i miedzi na aktywność enzymatyczną gleb. *Acta Biologica* 36 (9): 128–141.
- Jacobsen C.S., Hjelmsø M.H. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 15–20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003>.
- Kandeler F., Kampichler C., Horak O. 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23 (3): 229–306. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00335958>.
- Karczewska A. 2008. Ochrona gleb i rekultywacja terenów zdegradowanych. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 414 ss.
- Kızılkaya R., Aşkın T., Bayraklı B., Sağlam M. 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology* 40 (2): 95–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2004.10.002>.
- Klimek B., Niklińska M. 2007. Zinc and copper toxicity to soil bacteria and fungi from zinc polluted and unpolluted soils: a comparative study with different type of biologic plates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 78: 112–117. DOI: 10.1007/s00128-007-9045-6.
- Lock K., Janssen C.R. 2005. Influence of soil zinc concentration on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. *Environmental Pollution* 136 (2): 275–281. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.12.038>.
- Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International* 28 (8): 719–728. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00117-4).
- Margesin R., Walder G., Schinner F. 2000. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnologica* 20 (3–4): 313–333. DOI: 10.1002/abio.370200312.
- Mocek-Płóćiniak A. 2010. Wykorzystanie aktywności enzymatycznej do oceny wpływu antropogenicznych zmian wywołanych przez metale ciężkie w środowisku glebowym. [Utilisation of enzymatic activity for the evaluation of the impact of anthropogenic changes caused by heavy metals in soil environment]. *Nauka Przyroda Technologie* 4 (6): #86.
- Mocek-Płóćiniak A. 2011. Wpływ metali ciężkich na mikroorganizmy oraz aktywność enzymatyczną gleby. [Impact of heavy metals on microorganisms and the soil enzymatic activity]. Artykuł przeglądowy. *Roczniki Gleboznawcze* 62 (4): 211–220.
- Nowak J., Niedźwiedzki E., Dziel M. 1999. Wpływ metali ciężkich na zmiany aktywności enzymatycznej gleby. *Roczniki Gleboznawcze* 50 (1–2): 61–70.
- Pampulha M.E., Oliveira A. 2006. Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Current Microbiology* 53 (3): 238–243. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0116-4>.
- Renella G., Landi L., Nannipieri P. 2004. Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil. *Geoderma* 122 (2–4): 311–315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.018>.
- Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2016. Główny Urząd Statystyczny. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-statystyczny-rolnictwa-2016,6,10.html> [dostęp: 12.10.2017].
- Shen G., Lu Y., Zhou Q., Hong J. 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere* 61 (8): 1175–1182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.074>.
- Wang Y., Shi J., Wang H., Lin Q., Chen X., Chen Y. 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67 (1): 75–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.007>.
- Wolińska A. 2010. Aktywność dehydrogenazowa mikroorganizmów glebowych i dostępność tlenu w procesie reoksydacji wybranych mineralnych gleb Polski. *Acta Agrophysica. Rozprawy i Monografie* 3 (180), 88 ss.
- Wyszowska J., Kucharski J. 2003. Liczebność drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 492: 427–433.
- Zajączkowska O., Kucharski M. 2017. Adjuvants as a factor limiting the metazachlor degradation in soils contaminated with heavy metals. *Przemysł Chemiczny* 96 (7): 1515–1517. DOI: 10.15199/62.2017.7.14.