

Magdalena Błaszak

**Rozprzestrzenienie w środowisku  
mikroorganizmów biodegradujących  
symazyne**

Szczecin 2013

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Magdalena Błaszak

**Rozprzestrzenienie w środowisku  
mikroorganizmów biodegradowanych symazynę**

Szczecin 2013

Recenzenci

ELŻBIETA JOLANTA BIELIŃSKA

JADWIGA WYSZKOWSKA

Opracowanie redakcyjne

ALICJA BERNER

WYDANO ZA ZGODĄ

REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE

Badania sfinansowano ze środków MNiSW przyznanych na realizację  
projektu badawczego habilitacyjnego nr N N305 368038

ISBN 978-83-7663-164-6

Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

70-311 Szczecin, al. Piastów 50, tel. 91 449 47 60, e-mail: [wydawnictwo@zut.edu.pl](mailto:wydawnictwo@zut.edu.pl)

Druk PPH „Zapól” Dmochowski, Sobczyk Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434 10 21

e-mail: [zarzad@zapol.com](mailto:zarzad@zapol.com)

## Spis treści

1. Wstęp i cel pracy.....	5
2. Przegląd literatury .....	7
3. Materiał i metodyka .....	15
3.1. Charakterystyka materiałów doświadczalnych .....	15
3.2. Charakterystyka Azotopu 50 WP .....	19
3.3. Schemat doświadczeń.....	20
3.3.1. Badanie oddziaływania symazyny na mikroorganizmy oraz skrining bakterii i grzybów biodegradujących tę substancję.....	20
3.3.2. Badanie wpływu symazyny na mikroorganizmy .....	20
3.3.3. Badanie zdolności mikroorganizmów do biodegradacji symazyny. ....	20
3.4. Metodyka analiz mikrobiologicznych .....	23
3.4.1. Ocena wpływu symazyny na mikroorganizmy z różnych siedlisk .....	23
3.4.1.1. Określenie liczebności bakterii .....	23
3.4.1.2. Określenie liczebności grzybów.....	23
3.4.1.3. Określenie szybkości wydzielania CO <sub>2</sub> przez mikroorganizmy.....	23
3.4.2. Ocena zdolności mikroorganizmów do biodegradacji symazyny .....	24
3.4.2.1. Ocena obiektów badawczych pod względem obecności mikroorganizmów biodegradujących symazynę.....	24
3.4.2.2. Ocena obiektów badawczych pod względem liczebności mikroorganizmów biodegradujących symazynę.....	24
3.4.2.3. Izolacja, hodowla bakterii oraz ustalanie najefektywniejszego zestawu mikroorganizmów biodegradujących symazynę .....	24
3.4.2.4. Określenie wpływu dawki symazyny i temperatury na przebieg biodegradacji .....	26
3.4.2.5. Badanie przebiegu biodegradacji symazyny w hodowli okresowej .....	26
3.5. Metodyka analiz chemicznych .....	27
3.5.1. Oznaczanie zawartości symazyny za pomocą chromatografii gazowej.....	27
3.5.1.1. Parametry techniczne analizy .....	27
3.5.1.2. Izolacja i wzbogacenie próby .....	28
3.5.1.3. Oznaczenia końcowe.....	28
3.5.1.4. Opracowanie danych .....	28
3.6. Statystyczna analiza wyników badań .....	29

4. Wyniki badań .....	31
4.1. Wpływ symazyny na mikroorganizmy z różnych siedlisk.....	31
4.1.1. Liczebność bakterii i grzybów oraz ich aktywność metaboliczna po zastosowaniu symazyny w różnych dawkach.....	31
4.1.2. Liczebność bakterii w różnych matrycach środowiskowych .....	35
4.1.3. Liczebność grzybów w różnych matrycach środowiskowych .....	37
4.1.4. Szybkość wydzielania CO <sub>2</sub> przez mikroorganizmy z różnych siedlisk .....	39
4.2. Ocena zdolności mikroorganizmów z różnych siedlisk do biodegradacji symazyny .....	40
4.2.1. Wykrywanie obecności mikroorganizmów biodegradujących symazynę w różnych matrycach środowiskowych.....	40
4.2.2. Liczebność mikroorganizmów biodegradujących symazynę w różnych matrycach środowiskowych .....	44
4.2.3. Efektywność biodegradacji symazyny przeprowadzanej przez inokulaty jedno-, dwu- i wieloszczepowe .....	45
4.2.4. Biodegradacja symazyny przeprowadzana przez wybrane szczepy bakteryjne, w zależności od dawki i temperatury .....	51
4.2.5. Biodegradacja symazyny przeprowadzana przez wybrane szczepy bakteryjne w hodowli okresowej .....	54
5. Dyskusja.....	57
6. Podsumowanie .....	67
7. Wnioski .....	71
Piśmiennictwo .....	73
Summary.....	83
Zusammenfassung .....	85

## 1. Wstęp i cel pracy

Biotechnologiczne metody unieszkodliwiania odpadów pestycydowych nie są powszechnie stosowane, mimo że udokumentowano wielokrotnie zdolność mikroorganizmów do biodegradacji substancji aktywnych pestycydów (Biziuk 2001; Strong i in. 2002; Scott i in. 2008). Do utylizacji odpadów pestycydowych stosowane są najczęściej metody termiczne. Jednak to metody „ekologiczne” są zalecane do utylizacji odpadów podlegających biodegradacji (*Uchwała Rady Ministrów z dnia 24 grudnia 2010 r. w sprawie „Krajowego planu gospodarki odpadami 2014”*). Biologiczne metody utylizacji organicznych polutantów stosowane są głównie do usuwania niewielkich stężeń związków chemicznych w glebie, wodzie lub ściekach. Zaletą metod biologicznego unieszkodliwiania niechcianych substancji jest ich rozkład do związków neutralnych dla środowiska, tzn. do soli mineralnych, wody i ditlenku węgla. Oczywiście produkty reakcji biochemicznych mogą być różne, w zależności od ukierunkowania procesu (Różański 1992; Ralebitso i in. 2002). Środki ochrony roślin to różnorodna grupa chemikaliów, jednak mikroorganizmy to też ogromna pula komórek o urozmaiconych właściwościach. Wiele izolatów mikroorganizmów (stosowanych w postaci szczepionek jedno- lub wieloskładnikowych) jest w stanie biodegradować efektywnie i w pełni kilka substancji aktywnych pestycydów (Strong i in. 2002; Scott i in. 2008). Metody biotechnologicznej utylizacji (również w kombinacji z metodami chemicznymi) są alternatywne dla metod termicznych, które budzą kontrowersje społeczne. Dlatego poszukiwanie mikroorganizmów łatwych i tanich w hodowli, a jednocześnie zdolnych do biodegradacji kilku substancji aktywnych, daje szansę na coraz częstsze wdrażanie do przemysłu metod „przyjaznych” dla środowiska.

Do badań wybrano herbicyd Azotop 50 WP, ponieważ decyzją Komisji Europejskiej (*Decyzja Komisji z dnia 10 marca 2004 r. dotycząca niewłączenia symazyny do załącznika I do dyrektywy Rady 91/414/EWG*) został wycofany z obrotu handlowego w krajach należących do Unii Europejskiej. Azotop 50 WP pozyskano z prywatnego gospodarstwa rolnego, w którym był magazynowany wraz z innymi nieprzydatnymi środkami, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla środowiska. Ponieważ symazyna jest substancją podlegającą biodegradacji (Różański 1992), podjęto próbę utylizacji tego ksenobiotyku drogą biologiczną.

Celem niniejszej pracy była ocena:

- oddziaływania symazyny (Azotopu 50 WP) na mikroorganizmy (zasiedlające zróżnicowane siedliska), na ich liczebność i aktywność metaboliczną;
- rozprzestrzenienia w środowisku mikroorganizmów biodegradujących symazynę;
- przebiegu biodegradacji symazyny po zastosowaniu wyselekcjonowanych, testowanych pojedynczo i w zespołach, szczepów mikroorganizmów.



## 2. Przegląd literatury

Mikroorganizmy środowiskowe, przede wszystkim bakterie, archeony i grzyby, stanowią istotne (może nawet najważniejsze) ogniwo łańcucha troficznego, ponieważ są obecne w każdej naturalnej biocenozie na Ziemi (Kunicki-Goldfinger 2007; Dzik 2011). Życie na naszej planecie nie mogłoby istnieć w obecnej postaci bez udziału mikroorganizmów. Są niezastąpione, ponieważ odgrywają główną rolę w obiegu pierwiastków, w tym makroelementów niezbędnych do życia organizmów wyższych (Błaszczuk 2010). Przez miliardy lat bakterie (prakomórki) funkcjonowały w skrajnie różnych warunkach środowiskowych i przeżywając mniejsze lub większe kataklizmy, pozostawały na Ziemi, ewoluowały, by ponownie ją opanować (Schopf 2006; Van Andel 2010). Powszechnie uważa się (szczególnie w mediach), że obecnie trwa era człowieka, ale czy na pewno? Trudno ocenić, kto lub co odnosi zwycięstwo w „wyścigu zbrojeń” na polu medycyny (Krzyszowska i in. 1997; Salyers i Whitt 2010), czy człowiek może obejść się bez mikroorganizmów, bo jak wiemy z całą pewnością, mikroorganizmy bez człowieka „radzą” sobie znakomicie. Również pod względem ilości i wszechobecności mikroorganizmy opanowały środowisko. Występują zarówno w ekstremalnych (dla innych organizmów) warunkach środowiskowych (Błaszczuk 2008; Beblo i in. 2009; Jaeschke i in. 2012), jak i licznie opanowują powszechnie dostępne miejsca: gleby, zbiorniki wodne, wody płynące, wnętrza organizmów i ich powłoki, a także powietrze (Bradford i in. 1994; Taylor 2003; Tsapko i in. 2011; Michaud i in. 2012; Griffiths i Philippot 2013; Shen in. 2013).

Człowiek wykorzystuje mikroorganizmy w różnych celach (ryc. 1). Podglądając naturalnie zachodzące w środowisku procesy, takie jak: samooczyszczanie się wód, powstawanie gleby, próchnicy glebowej, rozkład szczątków roślinnych i zwierzęcych, mineralizację związków organicznych, jest w stanie naśladować przyrodę, intensyfikować procesy, zamykać je w instalacjach, ukierunkowywać metabolizm organizmów (Klimiuk i Łebkowska 2003). Przykładami wykorzystania mikroorganizmów w szeroko pojętej ochronie środowiska są: biologiczne oczyszczanie ścieków (Bartkiewicz 2002; Kornaros i Lyberatos 2006; Miyahara i in. 2010), kompostowanie odpadów pochodzenia organicznego (Lacey 1997; Sugumar i in. 2012), inaktywacja patogenów roślinnych (Martyniuk 2011; Solanki i in. 2012; Vorholt 2012), ochrona sadzonek roślin (mikoryzacja) (Castillo i in. 2006), bioremediacja terenów zanieczyszczonych, np. substancjami ropopochodnymi (Rojas-Avelizapa i in. 1999; Kucharski i in. 2011; Hawrot-Paw i Nowak 2012), bioługowanie metali z osadów ściekowych i rud metali (Dhal i in. 2010; Gadd 2010; Sharma i in. 2012), biodesulfuryzacja węgla i ropy naftowej (Li i in. 2009; Pandey i in. 2005; Irani i in. 2011), biofiltracja (Ralebitso-Senior i in. 2012). Główną rolę w przetwarzaniu materii organicznej odgrywają procesy biochemiczne, katalizowane przez enzymy mikroorganizmów, między innymi: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy, ligazy i wiele innych (Grigulis i in. 2013). Posiadając takie „narzędzia”, mikroorganizmy są w stanie wykorzystać zarówno naturalną, jak i przetworzoną przez człowieka materię jako źródło makroelementów i energii. Od wielu lat wykorzystuje się drobnoustroje, przede wszystkim bakterie lub ich enzymy, do biodegradacji związków trwałych, toksycznych dla organizmów żywych (Guenzi i Beard 1967; Swisher 1967; Nishino i Spain 1993; Kulkarni i Chaudhari



2006), w związku z czym możliwe jest również wykorzystanie ich do unieszkodliwiania organicznych odpadów pestycydowych (Stobiecki i in. 1998; Biziuk 2001; Liberatore i in. 2012). Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji tego rodzaju odpadów jest znikome, ponieważ częściej stosowanym sposobem unieszkodliwiania jest utylizacja termiczna (Stobiecki i Siłowiecki 1997; Podgórska 2000; Karstensen i in. 2006). W zasadzie nie ma rozwiązania alternatywnego dla spalania, które jest szybkim sposobem pozbycia się toksycznego ładunku ze środowiska, jednak właśnie metody „ekologiczne” są zalecane do redukcji ilości odpadów (*Uchwała Rady Ministrów z dnia 24 grudnia 2010 r. w sprawie „Krajowego planu gospodarki odpadami 2014”*, *Uchwała Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 22 maja 2009 r. w sprawie przyjęcia dokumentu „Polityka ekologiczna Państwa w latach 2009–2012 z perspektywą do roku 2016”*).



Ryc. 1. Przykłady wykorzystania mikroorganizmów w różnych dziedzinach w szeroko pojętej ochronie środowiska

Odpady pestycydowe (w tym wszystkie, które zawierają symazynę) to beużyteczne środki ochrony roślin (przeteterminowane lub zdyskwalifikowane na podstawie badań jakościowych) oraz zużyte opakowania po środkach ochrony roślin, skażona odzież ochronna, skażona gleba, woda i materiał roślinny, zaklasyfikowane do tzw. odpadów niebezpiecznych (*Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 września 2001 r. w sprawie katalogu odpadów*). Do 30 czerwca 2010 roku w Polsce zlikwidowano łącznie 180 mogiłników zawierających około 16,4 tys. Mg odpadów pestycydowych oraz 97 magazynów zawierających 0,54 tys. Mg tych beużytecznych środków ochrony roślin. Obecnie na terenie kraju funkcjonuje jedna instalacja do termicznego unieszkodliwiania odpadów, w tym niebezpiecznych, do których zaliczają się także odpady pestycydowe (*Uchwała Rady Ministrów z dnia 24 grudnia 2010 r. w sprawie „Krajowego planu gospodarki odpadami 2014”*). Generalnie gospodarka odpadami pestycydowymi w Europie jest pod kontrolą (Stobiecki i Waleczek 2004). Najgorzej pod względem utylizacji odpadów pestycydowych jest w Etiopii, Somalii, Tanzanii, Botswanie, Mali, na Madagaskarze, w krajach, w których nie zwraca się uwagi na bezpieczeństwo ludzi. Poza tym kraje Trzeciego Świata są miejscami zbytu toksycznych ładunków, co związane jest z korzyściami finansowymi „kontra-hentów” takich praktyk (Naidoo i Buckley 2003; Martínez 2004; Dalvie i in. 2006).

Do końca czerwca 2007 r. wycofano w Polsce z obrotu handlowego ponad 55% substancji aktywnych (w tym pochodne *s*-triazyny), podlegających przeglądowi. Decyzje o wycofaniu

wielu z nich podjęto włącznie na podstawie kryteriów formalnych, związanych z niedostarczeniem wymaganych wyników badań, których wysokie koszty spoczywają na producentach tych środków (Matyjaszczyk 2008). Jednak pochodne *s*-triazyny (atrazyna i symazyna) stanowiły zagrożenie dla środowiska (Hayes i in. 2002, 2003). Azotop 50 WP (zawierający symazynę), zaliczany do herbicydów o działaniu układowym, należał do IV klasy toksyczności. Okres połowicznego rozpadu symazyny w glebie waha się od kilkudziesięciu do kilkuset dni (Nowak 1995; Barra-Caracciolo i in. 2005; Gregorczyk i Swarcewicz 2012). Jako herbicyd triazynowy łatwo migruje w profilu glebowym (Biziuk 2001). Symazyna i atrazyna cechują się szybkim przenikaniem do wód gruntowych, przez co stają się szczególnie niebezpieczne dla fitoplanktonu i całych biocenoz (Kłódka i Nowak 2006). Również badania innych właściwości mikroorganizmów, np. zdolności do wydzielania enzymów glebowych, wskazują na istotny wpływ herbicydów triazynowych na organizmy glebowe. Długoletnie stosowanie środków ochrony roślin (w tym herbicydów z atrazyną i symazyną) w sadach jabłoniowych spowodowało zmniejszenie aktywności badanych enzymów glebowych, dehydrogenaz, fosfataz, ureaz, proteaz (Bielińska i Pranagal 2007).

Jak należy rozumieć odporność (wrażliwość) organizmów na działanie danego czynnika? Organizmy mogą reagować na czynniki pochodzenia naturalnego lub antropogenicznego na trzy sposoby. Mogą nie odczuwać ich wpływu (są odporne, tolerują je). Po kontakcie z czynnikiem reagują zmniejszeniem wartości danego parametru (są wrażliwe) lub jego zwiększeniem (czy są wtedy odporne?). Trudno stwierdzić, czy zwiększenie wartości parametru jest jednoznaczne z odpornością na dany czynnik. Bodziec zadziałał na organizm i zmienił jego charakterystykę, a według definicji w *Słowniku języka polskiego* (1982) „odporny” to „[...] niepoddający się działaniu czegoś [...]”.

Termin „odporność” nie jest utożsamiany z jedną konkretną cechą organizmów; ma szerokie znaczenie. Może charakteryzować zarówno właściwości pojedynczych organizmów (takie jak wzrost, rozmnażanie, aktywność enzymatyczna), jak i ich całych populacji (np. liczebność, zawartość biomasy mikroorganizmów, zawartość enzymów glebowych). Na podstawie badań pojedynczych izolatów mikroorganizmów, pod względem odporności na ksenobiotyk, nie jest możliwe prognozowanie jego wpływu na całą mikrobiocenozę. W środowisku występują miliardy komórek, a przebadanie reakcji kilku, a nawet kilkudziesięciu szczepów nie wystarczy do sformułowania daleko idących wniosków. Dlatego badania cech ilościowych, dotyczących całej populacji mikroorganizmów danego siedliska, są przydatne do oceny szkodliwości określonego czynnika. Kierunek zmian, które mogą nastąpić w ekosystemie po ekspozycji na dany ksenobiotyk, określają parametry ogólne, na przykład metabolizm gleby, profil enzymatyczny matrycy środowiskowej, liczebność poszczególnych grup systematycznych mikroorganizmów. Oczywiście nie ma doskonałej metody badawczej; błąd można popełnić zarówno w trakcie realizacji każdego rodzaju badania, jak i po nim, np. podczas formułowania wniosków. Wielu autorów (Przybulewska i Taborska 2008; Hawrot-Paw 2011; Zhang i in. 2011; Fang i in. 2012) bada odporność (wrażliwość) na czynniki środowiskowe pojedynczych szczepów i całych mikrobiocenoz.

Wracając do tematu wpływu pochodnych *s*-triazyny na organizmy, jako ciekawostkę można przytoczyć to, że w ostatnim dziesięcioleciu naukowcy stwierdzili negatywny wpływ atrazyny na rozrodczość zwierząt. Badacze z wielu krajów w międzynarodowej publikacji (Hayes i in. 2011) dowodzą, że ekspozycja na atrazynę pociąga za sobą dysfunkcję rozrodczą

u zwierząt. Badania przeprowadzono w wielu krajach (w USA, Kanadzie, Brazylii, krajach Europy, Japonii). Najczęściej obiektami badawczymi były płazy, w przypadku których ekspozycja na atrazynę powiązana była z przekształcaniem genetycznych samców w samice i ich funkcjonowaniem jako samice. Zakłócenia rozwoju płciowego różnych organizmów wystawionych na działanie atrazyny polegają na zmianach w ekspresji genów biorących udział w sygnalizacji hormonalnej, zaburzeniach przepoczwarczenia się, hamowaniu kluczowych enzymów regulujących wytwarzanie estrogenu i androgenu (Stoker i in. 1999; Hayes i in. 2002; Hayes i in. 2003; Roberge i in. 2004). Mimo że herbicydy triazynowe zostały wycofane w Europie z praktyki rolniczej, nadal ich pozostałości są wykrywane w środowisku, np. w pobliżu mogiłników (Swarcewicz i Skórska 2006; Vogel i in. 2008; Udiković-Kolić i in. 2012; Albright i in. 2013).

Wśród pochodnych *s*-triazyny najbardziej popularna była w Europie atrazyna. Atrazyna ( $C_8H_{14}ClN_5$ ) była substancją aktywną wchodzącą w skład kilkunastu herbicydów (np. w Polsce najpopularniejsze były: Atrasan 500 SC, AtraneX 90 WG, Azoprim 50 WP, Gesaprim 90 WG). Symazyna ( $C_7H_{12}ClN_5$ ) występowała w Azotopie 50 WP i Sanazynie 80 WP. Obecnie herbicydy z atrazyną i symazyną są stosowane na szeroką skalę w Stanach Zjednoczonych i Australii. W uprawach kukurydzy, trzciny cukrowej, roślin paszowych używane są herbicydy z atrazyną, a na plantacjach owoców cytrusowych, w uprawie winorośli, gajach oliwnych i w wielu innych uprawach – preparaty z symazyną.

Jak podaje Róžański (1992), herbicydy triazynowe charakteryzują się dość długim okresem zalegania w glebie (do kilkuset dni), a za ich zanikanie odpowiedzialne są przede wszystkim mikroorganizmy. Badacze (Michalcewicz i in. 2004; Kłódka i Nowak 2006; Przybulewska i Taborska 2008) dowodzą, że pod wpływem środków ochrony roślin zahamowana zostaje aktywność niektórych grup mikroorganizmów glebowych, przy jednoczesnej stymulacji innych. Róžański (1992) twierdzi, że ma to związek z selekcją mikroorganizmów wrażliwych oraz z adaptacją pozostałych mikroorganizmów do nowych warunków w środowisku, gdy ustala się ponownie dynamiczna równowaga w nowym składzie mikrobiocenozy. Według tego autora mikroorganizmami o najlepszych właściwościach adaptacyjnych są grzyby, które wykazują zdolności do hydrolizowania toksycznych związków, a produkty rozkładu wykorzystują na własne potrzeby pokarmowe i energetyczne. Korzystając z substancji organicznych, wchodzących w skład pestycydów oraz pochodzących z obumarłych komórek mikroorganizmów wrażliwych, są w stanie przeżyć i rozmnażać się, a nawet powiększać pulę swoich komórek w środowisku.

W tabeli 1 podano przykłady bakterii zdolnych do wykorzystania atrazyny jako źródła węgla i azotu (mineralizacja) lub jedynie przekształcających ją w metabolity pośrednie, np. analogi dealkilowe, hydroksylowe, deetylowe, amelinę, amelid i kwas cyjanurowy. Największą aktywnością w degradowaniu pestycydów wyróżniają się bakterie z rodzajów: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* i *Pseudomonas*, promieniowce z rodzajów *Nocardia* i *Streptomyces* oraz grzyby: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* i *Trichoderma* (Róžański 1992). Jednak większość prac naukowych nt. biodegradacji symazyny lub atrazyny dotyczy bakterii (Wang i in. 2011). Od kilkudziesięciu lat izolowane są ze środowiska bakterie, które w mniejszym lub większym stopniu wykorzystują pochodne *s*-triazyny, np. bakterie z rodzajów: *Nocardia* (Giardi i in. 1985), *Rhodococcus* (Behki i in. 1993), *Pseudomonas* (Yanze-Kontchou i Gschwind 1994; Mandelbaum i in. 1995), *Rhizobium* (Bouquard i in. 1997), *Agrobacterium* (Struthers i in. 1998), *Pseudaminobacter* (Topp i in. 2000 a), *Nocardioides* (Topp i in. 2000 b), *Arthrobacter*

(Strong i in. 2002; Cai i in. 2003; Vaishampayan i in. 2007; Wang i in. 2011), *Stenotrophomonas* (Marecik i in. 2008).

Tabela 1. Przykłady szczepów bakterii zdolnych do rozkładu i (lub) mineralizacji atrazyny

Bakterie	Końcowe produkty przemian	Mineralizacja	Piśmiennictwo
<i>Pseudomonas</i> sp.	deetyloatrazyna + deizopropyloatrazyna	–	Behki i Khan (1986)
<i>Pseudomonas</i> sp. YAYA6	ditlenek węgla	+	Yanze-Kontchou i Gschwind (1994)
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	ditlenek węgla + amoniak	+	Mandelbaum i in. (1995)
<i>Rhodococcus</i> sp. N186/21	hydroksyizopropyloatrazyna	–	Nagy i in. (1995)
<i>Ralstonia</i> M91-3	biuret + ditlenek węgla + amoniak	+	Radosevich i in. (1995)
<i>Rhizobium</i> sp.	hydroksyatrazyna	–	Bouquard i in. (1997)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14A	ditlenek węgla	+	Struthers i in. (1998)
<i>Clavibacter michiganese</i> ATZ1	hydroksyatrazyna + <i>N</i> -etyloamelid	–	de Souza i in. (1998 a)
<i>Pseudomonas</i> sp. CN1	kwasy cyjanurowy + ditlenek węgla	+	de Souza i in. (1998 b)
<i>Nocardioides</i> sp.	hydroksyatrazyna + <i>N</i> -etyloamelid	–	Topp i in. (2000 a)
<i>Pseudoaminobacter</i> sp.	ditlenek węgla	+	Topp i in. (2000 b)

Źródło: Ralebitso i in. (2002).

Wymienione mikroorganizmy łączą to, że tolerują obecność pochodnych *s*-triazyny w środowisku – wszystkie wykorzystują te substancje jako źródło azotu i (lub) węgla, jednak nie zawsze dochodzi do pełnej mineralizacji, rozerwania pierścienia triazynowego, przekształcenia substratu w amoniak, wodę i ditlenek węgla (Wang i in. 2011). Nie tylko prokarioty są zdolne do biodegradacji; badano również pod tym względem glony (Gonzalez-Barreiro i in. 2006), drożdże i grzyby strzępkowe (Nishimura i in. 2002; Fragoeiro i Magan 2005) oraz kultury mieszane mikroorganizmów (Grigg i in. 1997; Kontchou i Gschwind 1999).

Wielokrotnie naukowcy, stwierdzając zdolność izolatu do rozkładu pochodnych *s*-triazyny, klasyfikowali go do rodzaju *Arthrobacter*. Bardzo rozpowszechnione w środowisku są bakterie z rodzaju *Arthrobacter* – były one izolowane zarówno z gleb (Vaishampayan i in. 2007; Fajardo i in. 2012; Wang i in. 2013), jak i ze ścieków (Wang i in. 2011) oraz z kompostu (Błaszak i in. 2011). Zasięg ich występowania jest również znaczny – bakterie te izolowano zarówno w Europie (Fajardo i in. 2012), Azji (Vaishampayan i in. 2007; Wang i Xi 2012), jak i Ameryce Północnej i Południowej (Topp i in. 2000 b; Fernández i in. 2013). Bakterie z rodzaju *Arthrobacter* są Gram-dodatnie i pleomorficzne; należą do typu *Actinobacteria*. Uczestniczą w obiegu pierwiastków w przyrodzie, szczególnie azotu (Gunner 1963; Gounot 1967; Hagedorn i Holt 1979). Substraty uwalniane przez *Arthrobacter* do środowiska glebowego (witaminy, aminokwasy, biosurfaktanty) regulują rozwój roślin, wpływają na obecność innych drobnoustrojów, w tym patogennych (Rouatt i Katznelson 1961; Różycki i Strzelczyk 1985). Według Kołwzan i in. (2006) są to typowe autochtony, o niewielkich wymaganiach pokarmowych, bardzo rozpowszechnione w środowisku (od 2 do 60% całej populacji bakteryjnej). Głazewska-Maniewska i in. (2004) ustalili, że liczebność komórek tych bakterii wzrasta wraz z oddalaniem się od ryzosfery roślin. Badali również szerokie spektrum enzymatyczne tych mikroorganizmów, zdolnych do wykorzystywania lecytyny, pektyny, białka, skrobi, a także zdolnych do redukcji azotanów. Aktywność enzymatyczna badanych szczepów wskazuje na ich istotną rolę w ekosystemie glebowym (Głazewska-Maniewska i in. 2004).

Natomiast szczepy bakterii z gatunku *Stenotrophomonas maltophilia* jedynie kilkakrotnie były opisywane jako zdolne do biodegradacji substancji aktywnych pestycydów (Rousseaux i in. 2001; Marecik i in. 2008); są to Gram-ujemne nieprzetrwalnikujące bakterie, o niskiej zjadliwości, będące przyczyną zakażeń oportunistycznych. Bakterie te występują powszechnie w środowisku wilgotnym, w glebie, wodzie, w ściekach, na roślinach. Bakterie z rodzaju *Stenotrophomonas* należą do typu *Proteobacteria* (Dzierżanowska 2008). Szczep *Stenotrophomonas maltophilia* AF012541 był zdolny do hydroksylacji (dechloracji) atrazyny. Aż 60% atrazyny ubyło z podłoża zaszczepionego tą bakterią w ciągu 15–20 dni (Rousseaux i in. 2001). W innym doświadczeniu wśród najefektywniejszych mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji atrazyny znalazł się szczep BM4, również należący do *Stenotrophomonas maltophilia* (Marecik i in. 2008). W doświadczeniu tym z ryzosfery tataraku wyizolowano kilkanaście szczepów mikroorganizmów (z rodzajów: *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Rahnella*, *Umbelopsis*, *Volutella*, *Botrytis*) zdolnych w różnym stopniu i zakresie do wykorzystywania atrazyny jako źródła węgla i azotu. *Stenotrophomonas maltophilia* wyróżniał się zarówno efektywnością biodegradacji (wykryto ok. 30% początkowej ilości atrazyny po 15-dniowej hodowli), jak i skutecznością mineralizacji, ponieważ wykrywano śladowe ilości metabolitów atrazyny w podłożu. Bakterie z rodzaju *Stenotrophomonas* opisywane są częściej jako bakterie aktywne w biodegradacji substancji ropopochodnych (Samanta i in. 2002; Tesar i in. 2002), heterocyklicznych nitroamin (Binks i in. 1995) niż substancji aktywnych pestycydów (Rousseaux i in. 2001).

Proces biodegradacji pochodnych *s*-triazyny może zakończyć się powstaniem różnych produktów, w zależności od warunków inkubacji (np. może zależeć od dostępności tlenu, odczynu środowiska, składu chemicznego podłoża), jak i od potencjału enzymatycznego poszczególnych szczepów mikroorganizmów. Symazyna po przekształceniu w 6-deizopropylotriazynę może podlegać takim samym przemianom jak atrazyna (Scribner i in. 2000) lub może być przekształcona na drodze *N*-dealkilacji w 2-chloro-4-etyloamino-6-*s*-triazynę, a na drodze hydroksylacji – w amelinę i amelid (Róžański 1992).

Ciekawe wyniki dotyczące biodegradacji symazyny zaprezentowali Fajardo i in. (2012). Na podstawie badań molekularnych (dotyczących obecności genów *atzA*, *atzB* i *atzC*, kodujących enzymy biorące udział w rozkładzie pochodnych *s*-triazyny) stwierdzili, że ok. 5% bakterii ( $3 \cdot 10^8 \cdot g^{-1}$ ) z całej populacji jest zdolnych do biodegradacji tej substancji. Faktycznie po miesięcznym okresie inkubacji symazyny w glebie ubyło jej 83%, a wzrosła ogólna liczebność bakterii – o ok. 14%. Następnie wyizolowano w glebie 4 szczepy bakteryjne, zidentyfikowane jako: *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium sp.*, *Pseudomonas sp.* Z tej grupy bakterii najefektywniej na podłożu mineralnym rozkładał i mineralizował symazynę szczep *Rhizobium sp.* (odpowiednio 71% i 39% symazyny), natomiast najmniej efektywnie – szczep należący do gatunku *Acinetobacter lwoffii* (50% degradacji i 22% mineralizacji). Również w materiale biologicznym z namnożonych czystych kultur potwierdzono obecność genów kodujących enzymy katalizujące rozkład symazyny (*atzA*, *atzB* i *atzC*), przy czym bakterie z rodzaju *Rhizobium* charakteryzowały się większą zawartością 3 „biomarkerów” niż *A. lwoffii* (liczba kopii genów była większa o kilka rzędów wielkości).

Analiza molekularna PCR pozwala zlokalizować i określić geny charakterystyczne dla organizmów zdolnych do rozkładu pochodnych *s*-triazyny. Geny kodujące enzymy, zaangażowane

w proces rozkładu tych związków, najlepiej scharakteryzowano w przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (Anderson i in. 2002; Ralebitso i in. 2002; Kolić i in. 2007; Vibber i in. 2007; Monard i in. 2008). Geny *atzA*, *atzB*, *atzC* zlokalizowane są na zmiennym dużym regionie plazmidu pADP-1 – o wielkości 108-kpz. Zaangażowane są one w pierwsze etapy procesu hydrolytycznego rozkładu atrazyny i symazyny. Kodują hydrolazy niezbędne w procesach hydroksylacji (dechloracji) i *N*-dealkilacji związków organicznych. Inny region tego plazmidu zawiera geny *atzD*, *atzE*, *atzF*, które kodują enzymy aktywne w następnych reakcjach przekształcania metabolitów pośrednich w amoniak, wodę i ditlenek węgla (Vibber i in. 2007). Obecność genów *atzA*, *atzB*, *atzC* związana jest również ze zdolnościami adaptacyjnymi drobnoustrojów w danym środowisku, co ma związek z szybkością i ze skutecznością procesu rozkładu ksenobiotyków (Topp 2001). Sama więc obecność w środowisku wyżej wymienionych genów może stać się miarą potencjału mikrobiologicznego rozkładu (etapu biodegradacji) tych herbicydów w danym medium lub matrycy środowiskowej.

Wykorzystanie mikroorganizmów do utylizacji odpadów pestycydowych (np. przeterminowanych) wydaje się możliwe. Wang i in. (2011) wyizolowali ze ścieków bakterie z rodzaju *Arthrobacter* (szcep HB-5), które już po 12 godzinach inkubacji rozłożyły 100% atrazyny (z  $0,1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Bakterie z rodzaju *Arthrobacter* (*Arthrobacter* sp. TC1) usunęły znaczną ilość atrazyny ( $3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) w ciągu tygodnia (Strong i in. 2002). Dlatego alternatywne dla metod termicznych likwidacji odpadów pestycydowych mogą być nowoczesne metody biotechnologiczne lub biologiczne w połączeniu z chemicznymi (Petruska i in. 1985; Biziuk 2001; Skoczko i Ignatowicz 2004; Liberatore i in. 2012). Biologiczne metody degradacji organicznych polutantów stosowane są głównie do usuwania niewielkich stężeń związków chemicznych w glebie lub wodzie. Jednak prowadzenie hodowli ciągłej mikroorganizmów umożliwia stałe, długookresowe i wydajne przekształcanie substratów odpadowych w produkty naturalnie występujące w środowisku (Subashchandrabose i in. 2013).

Problem z wdrażaniem metod biotechnologicznych stosowanych do usuwania odpadów pestycydowych wiąże się z różnorodnością chemiczną środków ochrony roślin i z brakiem uniwersalnych rozwiązań dotyczących dużej grupy nieprzydatnych pestycydów. Oczywiście, w środowisku są obecne zarówno wąsko wyspecjalizowane mikroorganizmy, jak i szybko adaptujące się do zmiennych warunków środowiskowych drobnoustroje, o dużym potencjale enzymatycznym (Cork i Krueger 1991; Głazewska-Maniewska i in. 2004); na przykład szczepy *Pseudomonas* sp. ADP i *Nocardioides* sp. rozkładają kilka herbicydów triazynowych (Scott i in. 2008).

Na większą skalę biotechnologiczne metody utylizacji pestycydów stosuje się najczęściej w oczyszczalniach ścieków przemysłowych lub w fabrykach produkujących środki ochrony roślin i to w połączeniu z innymi metodami unieszkodliwiania, np. chemicznymi i fizykochemicznymi (Perkowski i Sidor 2007). Jednak w Polsce stosowanie metod biotechnologicznych do utylizacji odpadów pestycydowych jest znikome, przy czym jeśli są one stosowane, to dyskretnie, „[...] by nie wywołać zbyt dużego zainteresowania” (odmowa informacji o działającej na terenie zakładu Fregata S.A. w Gdańsku instalacji ze stałym, biologicznie aktywnym, złożem do czyszczenia ścieków przemysłowych zawierających pozostałości środków ochrony roślin).

Obiecujące badania przeprowadzili Liberatore i in. (2012), łącząc metody chemiczne i biologiczne w oczyszczaniu ścieków zawierających dazomet i fenamifos. Mikroorganizmy

z osadu czynnego przeprowadzały biodegradację produktów wcześniej przeprowadzonej reakcji chemicznego utleniania (reakcji Fentona  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ). Połączenie techniki chemicznej z biologiczną okazało się najbardziej efektywne i najmniej kosztowne (w porównaniu z zastosowaniem metody czysto chemicznej i metody biologicznej). Podobne doświadczenie zrealizowano, poddając mieszaninę substancji aktywnych pestycydów (alachloru, atrazyny, chlorfenwinfosu, diuronu, izoproturonu) najpierw utlenianiu chemicznemu (reakcji Fentona i foto-Fentona), a następnie oddziaływaniu mikroorganizmów osadu czynnego (pозyskanego z oczyszczalni ścieków przemysłowych). Poszczególne substancje aktywne wprowadzano w dawkach po  $30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Szukano takiego rozwiązania technologicznego, w którym stopień usunięcia ksenobiotyków z mieszaniny byłby duży, jednocześnie przy znacznym udziale metody biotechnologicznej w całym procesie. Badaczom zależało na dużym udziale etapu biologicznego w oczyszczaniu ścieków, ponieważ wpływa to na koszt całego procesu (tańsze są metody biologiczne niż chemiczne). Spośród kilku uzyskanych rozwiązań jako najbardziej skuteczne wskazano te, w których ponad 80% węgla zawartego w mieszaninie substancji aktywnych pestycydów DOC (ang. *dissolved organic carbon*) uległo degradacji, przy ponad 50-procentowym udziale metody biologicznej w całym procesie oczyszczania ścieków. W etapie chemicznym zużyto jedynie 1 g  $\text{H}_2\text{O}_2$  na litr mieszaniny (Lapertot i in. 2007).

Podsumowując, odpady pestycydowe to zróżnicowana grupa chemikaliów, dla których trudno znaleźć uniwersalną technologię biodegradacji. Jednak mikroorganizmy to też zróżnicowana i liczna grupa organizmów o wszechstronnych zdolnościach metabolicznych. Wiele spośród wyizolowanych szczepów mikroorganizmów jest w stanie rozkładać kilka substancji aktywnych (Scott i in. 2008). Metody biotechnologicznej utylizacji (szczególnie w połączeniu z metodami chemicznymi) są alternatywne dla powszechnie stosowanych metod termicznych. Poszukiwanie mikroorganizmów łatwych w hodowli oraz zdolnych do biodegradacji kilku toksycznych substancji jest zasadne i daje szansę na wdrażanie biotechnologii do przemysłu.

### 3. Materiał i metodyka

#### 3.1. Charakterystyka materiałów doświadczalnych

Do badań wykorzystano 30 obiektów: próbki gleb, materiały utworzone z gleb i warstw organicznych (poziom O), a także środki wspomagające uprawę roślin. Obiekty te różniły się wybranymi właściwościami chemicznymi (tab. 2) oraz pochodzeniem (ryc. 2). Szesnaście próbek pobrano na terenie Szczecina, 8 w sąsiednich gminach; wykorzystano również piasek z plaż nadmorskich (2 obiekty). Szesnaście obiektów to gleby, a 11 to materiały utworzone z gleb i poziomu organicznego, tj. ze ściółki lub/i ze szczątków roślin i zwierząt w różnym stopniu rozkładu, zalegających na tych glebach. Środki wspomagające uprawę roślin to: kompost, biohumus, podłoże ogrodnicze. Obiekty dobrano tak, by były zróżnicowane pod względem zawartości substancji organicznej (od 0,5 do 894,3 g·kg<sup>-1</sup>). Wszystkie obiekty badawcze (poza biohumusem, kompostem, podłożem ogrodniczym) były położone w odległości co najmniej 30 m od elementów infrastruktury, obiektów przemysłowych i zabudowań.

Próbki gleb pobierano z warstwy powierzchniowej o miąższości 10 cm (zarówno w przypadku obiektów złożonych tylko z gleb, jak i obiektów złożonych z gleb wzbogaconych w kilkucentymetrową warstwę organiczną). W skład niektórych obiektów badawczych wchodziła ściółka lub/i szczątki roślin, jeśli zalegały bezpośrednio na glebach (dotyczy to obiektów o numerach 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 22, 23, 26, 28). Ściółka i warstwa organiczna, leżąca bezpośrednio na glebie, są zasobne w mikroorganizmy, dlatego wzbogacając próbki o dodatkowy materiał, zwiększono jednocześnie szansę na wyizolowanie mikroorganizmów o pożądanym właściwościach.

Obiekty nr 1 i nr 2 pochodziły z Przęsęcina – ze wsi leżącej w gminie Police. Próbkę gliny piaszczystej (obiekt nr 1) pobrano z łąki trawiastej z dominującym gatunkiem kłósówki wełnistej, a drugą próbkę – z oddalonego o ok. 50 m młodnika brzoźowego (obiekt nr 2). Obiekt nr 3 to materiał utworzony z gleby i zalegających na niej szczątków organicznych. Piasek gliniasty wraz z dodatkowym materiałem (głównie ze szczątkami traw w różnym stadium rozkładu) przywieziono z terenu należącego do wsi Wołczkowo w gminie Dobra. W gminie Kołbaskowo, we wsi Siadło Dolne, z nabrzeża Odry Zachodniej pobrano próbkę gliny piaszczystej (obiekt nr 4) – z miejsca gęsto porośniętego trzciną pospolitą. Obiekt nr 5 pozyskano z Parku Leśnego Zdroje – z miejsca oddalonego o niecałe 100 m od Jeziora Szmaragdowego; była to gleba wraz ze ściółką, w skład której wchodziły opadłe liście, gałązki, bukiw (w różnym stadium rozkładu). Obiekt nr 6 (glinę piaszczystą) pobrano we wsi Ostoja (w gminie Kołbaskowo); był to materiał pochodzący z zaoranego pola. Obiekt nr 7 pozyskano z dzielnicy Osowo (z „Gubałówki”); była to próbka piasku słabogliniastego, która pochodziła z miejsca skąpo porośniętego przez trawy. Z Parku Leśnego Arkońskiego, z okolicy Doliny Siedmiu Młynów, przetransportowano do laboratorium glebę wraz z warstwą ściółki (ze szczątkami roślinnymi w różnym stadium rozkładu, pochodzącymi głównie z drzew liściastych) w celu utworzenia obiektu nr 8. Obiekt nr 9 pozyskano z parku Kasprowicza w Szczecinie. Materiał stanowiła warstwa organiczna (poziom O) w różnym stadium rozkładu, złożona



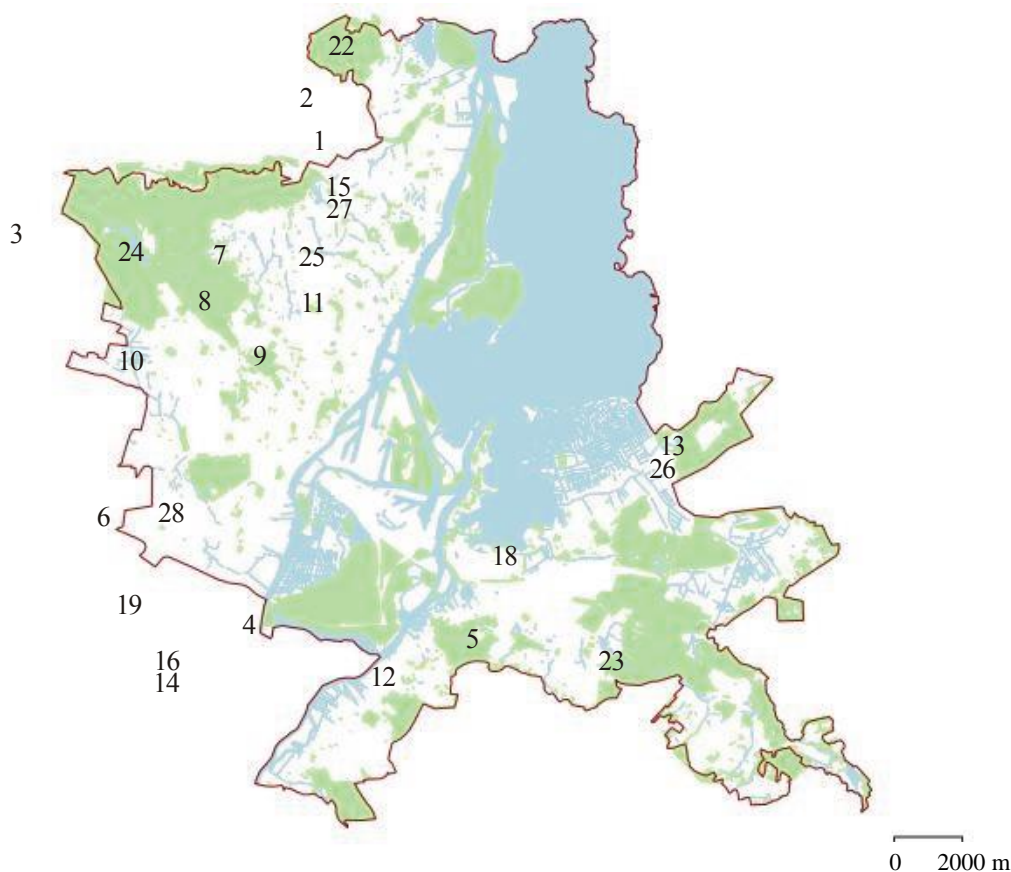
głównie ze szczątków drzew liściastych, pobrana tylko z poziomem próchniczym gleby (A) o trzycentymetrowej miąższości. Obiekt nr 10 pochodził ze szczecińskiego osiedla Krzekowo – z odłogu. Materiał stanowił piasek gliniasty wraz z centymetrową warstwą organiczną, zalegającą na tej glebie. W dzielnicy Szczecin-Niebuszewo (w parku Brodowskim) pobrano piasek gliniasty wraz ze ściółką pochodzącą głównie z drzewostanu liściastego mieszanego (obiekt nr 11).

Tabela 2. Charakterystyka materiałów użytych w badaniach pod względem wybranych właściwości chemicznych

Numer obiektu <sup>a</sup>	Substancja organiczna (g·kg <sup>-1</sup> )	N (g·kg <sup>-1</sup> )	pH <sub>KCl</sub>	Miejsce pozyskania materiału (osiedle, wieś lub obiekt)
1	38,4	1,3	4,6	Przęsocin, łąka
2	38,9	1,3	7,3	Przęsocin, młodnik
3	72,2 <sup>b</sup>	2,7 <sup>b</sup>	5,8 <sup>b</sup>	Wolczkowo, nieużytki
4	61,7	2,3	7,1	Siadło Dolne, nabrzeże Odry
5	75,6 <sup>b</sup>	2,2 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>	Park Leśny Zdroje, okolica Jeziora Szmaragdowego
6	45,3	1,7	6,9	Ostoja, pole
7	16,8	0,7	6,6	Ostoja („Gubałówka”), odłóg
8	77,0 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>	6,0 <sup>b</sup>	Park Leśny Arkoński
9	185,8 <sup>b</sup>	6,6 <sup>b</sup>	5,9 <sup>b</sup>	park Kasprowicza, próchnica
10	54,1 <sup>b</sup>	1,8 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>	Krzekowo, odłóg
11	103,6 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>	4,7 <sup>b</sup>	park Brodowski
12	91,3 <sup>b</sup>	3,8 <sup>b</sup>	2,9 <sup>b</sup>	Podjuchy, nabrzeże Odry
13	4,1	1,6	7,6	Załom, młodnik
14	31,4	1,0	5,7	Przeclaw, pole
15	15,8	0,5	4,9	Bukowo, pole
16	35,8	1,4	5,0	Przeclaw, pole
17	894,3	15,5	4,5	Firma Lasland Sp. z o. o., uniwersalna ziemia dla roślin na bazie torfu NATURA®
18	0,6	0,1	6,4	Dąbie, nabrzeże jeziora Dąbie
19	40,5	1,5	5,5	Warzymice, łąka
20	0,6	0,3	6,9	Woliński Park Narodowy (WPN), plaża
21	344,1	19,6	5,2	Bartoszewo, kompost
22	20,3 <sup>b</sup>	0,5 <sup>b</sup>	4,2 <sup>b</sup>	Park Leśny Mścięcino
23	86,7 <sup>b</sup>	1,8 <sup>b</sup>	8,7 <sup>b</sup>	Puszcza Goleniowska
24	0,8	0,1	7,8	Głębokie – Pilchowo, nabrzeże Jeziora Głębokiego
25	27,8	0,9	7,5	Bukowo, nieużytki
26	9,0 <sup>b</sup>	0,4 <sup>b</sup>	7,0 <sup>b</sup>	Załom, łąka
27	26,2	1,0	5,2	Bukowo, łąka
28	25,0 <sup>b</sup>	0,1 <sup>b</sup>	7,3 <sup>b</sup>	Gumieńce, nieużytki
29	301,6	15,1	5,5	Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowe EKODARPOL, biohumus
30	0,5	0,1	6,7	Słowiński Park Narodowy (SPN), plaża

<sup>a</sup> Kolejność obiektów wynika z kolejności wykorzystania ich do badań mikrobiologicznych.

<sup>b</sup> Oznaczenia wykonano na próbkach gleb pobranych wraz z poziomem organicznym (O).



Ryc. 2. Orientacyjna lokalizacja punktów pobrania próbek – Szczecin i najbliższe okolice (punkty naniesiono na mapę uzyskaną z zasobów mapowych Urzędu Miasta w Szczecinie)

Z nabrzeża Odry Wschodniej (z dzielnicy Podjuchy), porośniętego bujnie trawami z dominującym gatunkiem trzciny pospolitej, pozyskano materiał złożony z gleby i ze szczątków roślin w różnych stadiach rozkładu. Obiekty nr 13 i nr 26 to próbki pochodzące z dzielnicy Załom w Szczecinie. Odległość między miejscami pobrania materiałów wynosiła ok. 15 m, a gleby różniły się sposobem użytkowania. Obiekt nr 13 to gleba z terenu niewielkiego młodnika sosnowego. Obiekt nr 26 składał się z gleby i dwucentymetrowej warstwy obumarłej roślinności trawiasłej w różnych stadiach rozkładu. Obiekty nr 14 i nr 16 pochodziły z Przeclawia – miejscowości położonej w gminie Kołbaskowo. Gleby przywieziono z dwóch pól uprawnych, oddalonych od siebie o kilkanaście metrów. Na jednym z pól uprawiana była kukurydza (obiekt nr 14), a drugie pole było zaorane (obiekt nr 16). W północnej części Szczecina, w dzielnicy Bukowo, wytypowano trzy punkty pobrania materiałów. Obiekt nr 15 stanowiła gleba pochodząca z pola porośniętego rzepakami. Obiekt nr 25 to materiał glebowy z terenu rekreacyjnego, porośniętego zróżnicowaną pod względem gatunków roślinnością (z dominacją traw i koniczyń). Próbkę piasku gliniastego (obiekt nr 27) przywieziono z terenu zespołu przyrodniczo-krajobrazowego „Wodozbiór”; na terenie tym dominowały rośliny z rodziny astrowatych. Obiekt nr 17 to uniwersalna ziemia dla roślin (firmy Lasland Sp. z o. o.) – materiał na bazie torfu, wzbogacony w mikro- i makroelementy. Z piaszczystego nabrzeża jeziora Dąbie, usytuowanego w prawobrzeżnej dzielnicy Szczecina, pozyskano piasek luźny (obiekt nr 18).

Tabela 3. Gatunek i skład granulometryczny gleb w miejscach, w których pobierano próbki (w Szczecinie, okolicy i z plaż nadmorskich)

Numer obiektu	Gatunek gleby wg PTG (2008)	Skład granulometryczny (średnica ziaren w mm)			Miejsce pobrania gleby
		2–0,05	0,05–0,002	<0,002	
		zawartość frakcji (%)			
1	glina piaszczysta	51	46	3	Przęsocin, łąka
2	glina piaszczysta	54	43	3	Przęsocin, młodnik
3	piasek gliniasty	79	20	1	Wołczkowo, nieużytki
4	glina piaszczysta	56	41	3	Siadło Dolne, nabrzeże Odry
5	piasek luźny	94	6	0	Park Leśny Zdroje, okolica Jeziora Szmaragdowego
6	glina piaszczysta	58	39	3	Ostoja, pole
7	piasek słabogliniasty	88	11	1	Ostoja („Gubałówka”), odlóg
8	piasek gliniasty	85	14	1	Park Leśny Arkoński
9	piasek słabogliniasty	88	11	1	Park Kasprowicza, próchnica
10	piasek gliniasty	80	19	1	Krzekowo, odlóg
11	piasek gliniasty	74	25	1	park Brodowski
12	piasek luźny	90	10	0	Podjuchy, nabrzeże Odry
13	piasek luźny	92	8	0	Załom, młodnik
14	glina lekka	52	41	7	Przeclaw, pole
15	piasek gliniasty	85	14	1	Bukowo, pole
16	glina piaszczysta	53	43	4	Przeclaw, pole
18	piasek luźny	100	0	0	Dąbie, nabrzeże jeziora Dąbie
19	glina piaszczysta	56	41	3	Warzymice, łąka
20	piasek luźny	100	0	0	Woliński Park Narodowy (WPN), plaża
22	piasek luźny	94	6	0	Park Leśny Mścięcino
23	piasek luźny	96	4	0	Puszcza Goleniowska
24	piasek luźny	100	0	0	Głębokie – Pilchowo, nabrzeże Jeziora Głębokiego
25	glina piaszczysta	66	31	3	Bukowo, nieużytki
26	piasek luźny	95	5	0	Załom, łąka
27	piasek gliniasty	83	16	1	Bukowo, łąka
28	piasek gliniasty	77	22	1	Gumieńce, nieużytki
30	piasek luźny	100	0	0	Słowiński Park Narodowy (SPN), plaża

Glinę piaszczystą (obiekt nr 19) pobrano w Warzymicach (w gminie Kołbaskowo); gleba porośnięta była trawami, z dominującym gatunkiem kostrzewy łąkowej. Obiekt nr 20 to piasek z plaży oddalonej o ok. 4 km od Międzyzdrojów, usytuowanej w Wolińskim Parku Narodowym. Obiekt nr 21 to kompost pozyskany z ogródka działkowego usytuowanego w Bartoszewie – w gminie Police. Kompost pochodzenia roślinnego wytworzony został w wyniku zabie-

gów pielęgnacyjnych – pasywnego kompostowania ścinków roślin i zrębków drzewnych. W celu uzupełnienia niedoboru azotu dodano do kompostu niewielką ilość kurzego obornika. Obiekt nr 22 pochodził ze Szczecina, z Parku Leśnego Mścięcino, z którego pobrano próbkę materiału złożonego z gleby i ze ściółki. Obiekt ten zawierał glebę wraz z masą roślinną w różnych stadiach rozkładu (pochodzącą głównie z olsz i buków). Z Puszczy Goleniowskiej (z prawobrzeżnej części Szczecina) uzyskano materiał złożony z gleby i ze ściółki wytworzonej z obumarłych szczątków pochodzenia roślinnego, głównie z drzew iglastych (obiekt nr 23). Obiekt nr 24 to piasek luźny z piaszczystego nabrzeża Jeziora Głębokiego, usytuowanego w zachodniej części Szczecina. Gumieńce to osiedle w zachodniej części Szczecina, skąd przetransportowano glebę wraz z obumarzonymi szczątkami roślinności ruderalnej (obiekt nr 28). Materiał stanowiący obiekt nr 29 (Biohumus SM firmy EKODARPOL) został zakupiony w sklepie ogrodniczym; to ogrodniczy uniwersalny sypki nawóz naturalny – produkt z hodowli dżdżownic kalifornijskich. Ostatnim badanym obiektem (nr 30) był piasek pobrany z plaży na terenie Słowińskiego Parku Narodowego – z miejsca oddalonego od Łeby o ok. 4 km, a od brzegu morza – o ok. 10 m.

Wszystkie próbki gleb oraz gleb z dodatkowym materiałem organicznym, a także pozostałe obiekty po przetransportowaniu do laboratorium podsuszono i przesiano przez sito o średnicy oczek wynoszącej 2 mm. Następnie oznaczono: zawartość substancji organicznej (straty przy prażeniu), ogólną zawartość azotu (Ostrowska i in. 1991) i kwasowość (PN-ISO 10390:1997) – tab. 2. Określono maksymalną pojemność wodną próbek (cylinderkową metodą Kopecky'ego) i wilgotność aktualną. Wilgotność materiałów doświadczalnych doprowadzono do 50% całkowitej pojemności wodnej.

Orientacyjną lokalizację punktów pobrania próbek oraz charakterystykę gleb występujących w miejscach, w których pobierano materiał do badań (skład granulometryczny – uziarnienie gleb mierzono laserowym miernikiem cząsteczek), przedstawiono odpowiednio na ryc. 2 i w tab. 3. Analizy chemiczne materiałów wykonano, a skład granulometryczny oznaczono w Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Szczecinie.

### **3.2. Charakterystyka Azotopu 50 WP**

Azotop 50 WP zawiera symazynę (6-chloro-*N,N'*-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) w ilości 500 g·kg<sup>-1</sup> pestycydu (co potwierdzono badaniami ilościowymi z czystym wzorcem w postaci symazyny 98%); pozostałe komponenty preparatu to kaolin i środki powierzchniowo czynne (producent: Zakłady Chemiczne Organika-Azot S.A. w Jaworzynie; rok produkcji 1997). Od 21.02.2007 r. pestycydy z symazyną wycofano z obrotu handlowego. Herbicyd pozyskano z magazynu prywatnego gospodarstwa rolnego. Symazynę (czysty wzorec) udostępnił Zakład Syntezy Organicznej i Technologii Leków Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Herbicyd był przeznaczony do zwalczania chwastów w uprawie: szparaga, rabarbaru, agrestu, maliny, porzeczki, winorośli, truskawki, w sadach i szkółkach drzew owocowych. Chwasty wrażliwe na symazynę to: gorczyca polna, gwiazdnica pospolita, jasnota purpurowa i różowa, komosa biała, kurzyślak polny, maki, starzec zwyczajny, wiechlina roczna i wiele innych. Zalecana dawka herbicydu, w zależności od uprawy, wynosiła 2–3 kg·ha<sup>-1</sup> (informacja z etykiety preparatu Azotop 50 WP).

### **3.3. Schemat doświadczeń**

#### **3.3.1. Badanie oddziaływania symazyny na mikroorganizmy oraz skrining bakterii i grzybów biodegradujących tę substancję**

Całe badanie podzielono na dwa etapy. W pierwszym etapie oceniano wpływ symazyny na mikroorganizmy (zasiedlające 30 obiektów). Badano zmiany liczebności bakterii i grzybów oraz ilości wydzielanego przez mikroorganizmy CO<sub>2</sub> – po aplikacji symazyny. Celem tego etapu była ocena mikroorganizmów pod względem odporności (wrażliwości) na symazynę, ze szczególnym uwzględnieniem:

- zróżnicowanej zawartości substancji organicznej w obiektach,
- miejsca pobierania próbek do badań.

Drugi etap badania był złożony z 5 zadań, których głównym celem był skrining mikroorganizmów biodegradujących symazynę oraz skonstruowanie efektywnej szczepionki biodegradującej symazynę. Poza tym celem było również ustalenie, czy w obiektach, w których dominowały mikroorganizmy odporne na symazynę (pierwszy etap), będą jednocześnie obecne mikroorganizmy biodegradujące tę substancję.

W drugim etapie badanie rozpoczęto od oceny wszystkich obiektów pod względem obecności mikroorganizmów biodegradujących symazynę. Następnie z obiektów, w których stwierdzono ubytek symazyny, izolowano mikroorganizmy, hodowano je w warunkach laboratoryjnych i oceniano ich zdolność do biodegradacji symazyny w różnych dawkach, w temperaturze 18 i 28°C. Spośród izolatów (testowanych pojedynczo i w zespołach) wybierano izolaty najbardziej wydajne w procesie biodegradacji symazyny i prowadzono ich hodowle okresowe w bioreaktorze.

#### **3.3.2. Badanie wpływu symazyny na mikroorganizmy**

Do gleby lub innego materiału doświadczalnego, przygotowanych według opisu w podrozdziale 3.1, wprowadzano herbicyd Azotop 50 WP w dawkach: 100, 300, 500 mg·kg<sup>-1</sup> (w przeliczeniu na symazynę). Do gleby kontrolnej wprowadzono tylko sterylną wodę. W tak przygotowanym materiale określano:

- liczebność bakterii, którą oznaczano na podłożu Bunta-Roviry (1955);
- liczebność grzybów, którą oznaczano na podłożu Martina (1950);
- szybkość wydzielania CO<sub>2</sub> przez mikroorganizmy glebowe (Nowak 1986; Cheng i Coleman 1989).

Liczebność bakterii i grzybów oraz szybkość wydzielania CO<sub>2</sub> przez mikroorganizmy określano raz po 14 dobach od momentu wprowadzenia herbicydu do gleby. Mikroorganizmy inkubowano w temperaturze 25°C. Bakterie hodowano przez 3 doby, a grzyby przez 5 dób. Liczebność bakterii i grzybów określano w 5 powtórzeniach. Szybkość oddychania mikroorganizmów badano w 3 powtórzeniach.

#### **3.3.3. Badanie zdolności mikroorganizmów do biodegradacji symazyny**

Obiekty badawcze oceniano pod względem:

- obecności mikroorganizmów biodegradujących symazynę. Badano, czy następuje ubytek symazyny (wprowadzonej w dawce 50 mg·dm<sup>-3</sup>) w zmodyfikowanym podłożu Bushnella i Haasa (1941) (tab. 4, 5, 6) po aplikacji mikroorganizmów (w postaci rozcieńczonej zawiesiny glebowej

lub innego materiału). Hodowle inkubowano przez 14 dni w temperaturze 25°C, zawartość symazyiny określano w 3 powtórzeniach za pomocą chromatografii gazowej w 1, 7 i 14 dobie. Hodowle prowadzono w 2 powtórzeniach;

– liczebności mikroorganizmów biodegradujących symazyinę. Badano zdolność do wzrostu mikroorganizmów hodowanych na stałych podłożach zawierających symazyinę (50 mg·dm<sup>-3</sup>) i/lub inne źródło węgla i/lub azotu (tab. 7, 8, 9, 10). Hodowle inkubowano przez 14 dni w temperaturze 25°C, w 3 powtórzeniach.

Tabela 4. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 5

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Symazyina	0,05 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	2 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Tabela 5. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 6

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Symazyina	0,05 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
Glukoza	2 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Tabela 6. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 7

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Symazyina	0,05 g
Pepton	1 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
Glukoza	2 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Tabela 7. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 8

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Symazyina	0,05 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	2 g
Agar	15 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Tabela 8. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 9

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Symazyina	0,05 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
Glukoza	2 g
Agar	15 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Tabela 9. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 10

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
Symazyina	0,05 g
Pepton	1 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
Glukoza	2 g
Agar	15 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Tabela 10. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) nr 11

Składniki	Zawartość
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
FeCl <sub>3</sub>	0,05 g
Glukoza	2 g
Agar	15 g
Woda destylowana	1 dm <sup>3</sup>

Z hodowli w zmodyfikowanym podłożu płynnym Bushnella i Haasa (1941), w których stwierdzono największy ubytek symazyny już w pierwszym tygodniu inkubacji, izolowano mikroorganizmy, namnażano je, wyprowadzono czyste kultury bakteryjne i oceniano ich zdolność do biodegradacji symazyny (50 i 100 mg·dm<sup>-3</sup>); ubytek symazyny oznaczano metodą chromatografii gazowej w 1, 3, 5 i 7 dobie, w dwóch powtórzeniach. Badano skuteczność biodegradacji symazyny, przeprowadzanej przez pojedyncze szczepy i przez zespoły tych szczepów (dwu- lub kilkuskładnikowe), w zmodyfikowanym podłożu płynnym Bushnella i Haasa (1941) – tab. 4. Oceniano również zdolność tzw. hodowli macierzystej do biodegradacji symazyny, przeprowadzanej przez zespoły niezidentyfikowanych pod względem przynależności gatunkowej mikroorganizmów (oprócz oznaczonych pod względem przynależności systematycznej kilku izolatów, pochodzących z tej hodowli). Wszystkie hodowle inkubowano w temperaturze 25°C. Dodatkowo sprawdzano, czy zachodzi mineralizacja symazyny, poprzez obserwację wydzielania CO<sub>2</sub> (nagromadzonego w rurce Durhama) i pojawiania się w hodowli amoniaku (obserwowano, czy następuje reakcja barwna po użyciu odczynnika Nesllera).

Identyfikowano gatunki bakterii (czyste kultury bakterii) z wykorzystaniem metody PCR oraz sekwencjonowania DNA – fragmentu genu kodującego jednostkę 16 S rRNA. W przypadku hodowli mieszanej („macierzystej”) wykrywano również obecność innych, niż bakterie, mikroorganizmów (grzybów, archeonów) z wykorzystaniem metody PCR, w której zastosowano specyficzne startery – odpowiednio do fragmentu DNA kodującego fragment ITS (ang. *ribosomal internal transcribed spacer*) grzybów, fragmentu DNA kodującego jednostkę 16 S rRNA archeonów. Wykrywano również obecność pierwotniaków, z zastosowaniem metody PCR i sekwencjonowania fragmentu DNA kodującego jednostkę 18 S rRNA pierwotniaków. Analizy molekularne zostały wykonane przez firmę A&A Biotechnology z Gdyni.

Wybrane najskuteczniejsze w biodegradacji symazyny warianty inokulatów (jedno- lub wieloszczepowe) badano pod względem:

– biodegradacji symazyny (50, 100, 150, 200 mg·dm<sup>-3</sup>) w zmodyfikowanym podłożu płynnym Bushnella i Haasa (1941) (tab. 4), w temperaturze 18°C i 28°C. Zawartość symazyny mierzono w hodowlach przez kolejnych 5 dni, a następnie co 2 dni (w 2 powtórzeniach), aż do przekroczenia progu oznaczalności symazyny lub maksymalnie przez 2 tygodnie; ubytek symazyny określano za pomocą chromatografii gazowej. Czas półtrwania symazyny (DT<sub>50</sub>) ustalano metodą interpolacji liniowej (Gregorczyk i Swarczewicz 2012);

– biodegradacji symazyny ( $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) w zmodyfikowanym podłożu Bushnella i Haasa (1941) (tab. 4), w temperaturze  $28^\circ\text{C}$ , w bioreaktorze Optimax 1001 firmy Mettler Toledo. Zawartość symazyny w hodowli mierzono co 2 godziny, w 3 powtórzeniach, aż do przekroczenia progu oznaczalności. Ubytek symazyny badano za pomocą chromatografii gazowej. Analizę kinetyki rozkładu symazyny przeprowadzano za pomocą funkcji logistycznej, często stosowanej w badaniach przyrodniczych, również dotyczących rozkładu pestycydów (France i Thornley 1984; Gregorczyk 1991; FOCUS 2006; Gregorczyk i in. 2010).

### **3.4. Metodyka analiz mikrobiologicznych**

#### **3.4.1. Ocena wpływu symazyny na mikroorganizmy z różnych siedlisk**

##### **3.4.1.1. Określenie liczebności bakterii**

Z materiałów doświadczalnych wykonano wglębny posiew rozcieńczeń glebowych, metodą płytkową Kocha. Wykorzystano podłoże Bunta-Roviry (1955) dla bakterii glebowych. Zawiesina glebowa podczas pobierania była mieszana ( $200 \text{ obr.} \cdot \text{min}^{-1}$ ) za pomocą mieszadła magnetycznego.

##### **3.4.1.2. Określenie liczebności grzybów**

Z materiałów doświadczalnych wykonano wglębny posiew rozcieńczeń glebowych, metodą płytkową Kocha. Wykorzystano podłoże Martina (1950) dla grzybów. Zawiesina glebowa podczas pobierania była mieszana ( $200 \text{ obr.} \cdot \text{min}^{-1}$ ) za pomocą mieszadła magnetycznego.

##### **3.4.1.3. Określenie szybkości wydzielania $\text{CO}_2$ przez mikroorganizmy**

Ilość ditlenku węgla wydzielanego z materiałów doświadczalnych oznaczano w analizatorze gazowym Ultragas U4S. Materiały doświadczalne wzbogacano w glukozę, by umożliwić wszystkim mikroorganizmom dostęp do źródła węgla, aby ewentualne zmiany wartości parametru były spowodowane przez badany czynnik, a nie były wynikiem braku dostępu do źródła węgla i energii (Anderson i Domsch 1978). Mieszaninę glukozy z talkiem (1:5) wprowadzano w ilości, która nie powodowała już zwiększania się zawartości  $\text{CO}_2$  wydzielanego z materiałów kontrolnych (maksymalną dawkę glukozy dla wszystkich obiektów ustalono przed podjęciem właściwego badania). Materiał wymieszany dokładnie z talkiem i glukozą przenoszono do kolumn pomiarowych analizatora Ultragas U4S i mierzono ilość wydzielonego ditlenku węgla. Wyniki rejestrowano w postaci zapisu graficznego – pików o różnej długości (w zależności od ilości wydzielonego  $\text{CO}_2$ ).

Otrzymane wyniki (długość pików) przeliczono według równań:

$$y = 0,00424 \cdot h \text{ – dla długości pików z zakresu } 0\text{--}50 \text{ mm}$$

$$y = 0,02121 \cdot h \text{ – dla długości pików z zakresu } 0\text{--}250 \text{ mm}$$

gdzie:

$$y \text{ – objętość wydzielonego ditlenku węgla } (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}),$$

$$h \text{ – długość pików krzywej } \text{CO}_2 \text{ na rejestratorze analizatora (mm).}$$



### **3.4.2. Ocena zdolności mikroorganizmów do biodegradacji symazyny**

#### **3.4.2.1. Ocena obiektów badawczych pod względem obecności mikroorganizmów biodegradujących symazynę**

Z materiałów bez symazyny (kontrolnych), które przygotowano według opisu w podrozdziale 3.1, wykonano serię rozcieńczeń. Zawiesinę glebową (o objętości 15 cm<sup>3</sup>) z rozcieńczenia 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> (w zależności od zasobności obiektu w mikroorganizmy) wprowadzano do płynnych sterylnych podłoży (o objętości 285 cm<sup>3</sup>) z dodatkiem symazyny. Podłoża płynne sporządzono na podstawie receptury Bushnella i Haasa (1941), którą zmodyfikowano, wymieniając składniki będące źródłem azotu i węgla; zamiast azotanu amonowego zastosowano symazynę (Azotop 50 WP) oraz symazynę (Azotop 50 WP) z peptonem; w celu wzbogacenia podłoża w węgiel dodano glukozę lub cytrynian sodu (tab. 4, 5, 6). Hodowle o objętości 300 cm<sup>3</sup> umieszczano w półlitrowych kolbach i inkubowano na mieszadle magnetycznym (200 obr.·min<sup>-1</sup>). Za pomocą chromatografii gazowej ustalano zawartość symazyny w podłożach hodowlanych, stwierdzając jej ubytek lub brak ubytku (co wskazywało na obecność mikroorganizmów biodegradujących symazynę lub nieobecność tych drobnoustrojów). Jednocześnie oznaczano zawartość symazyny w sterylnych podłożach, by przekonać się, że ubytek symazyny jest wynikiem działalności mikroorganizmów.

#### **3.4.2.2. Ocena obiektów badawczych pod względem liczebności mikroorganizmów biodegradujących symazynę**

Po stwierdzeniu ubytku symazyny z płynnej hodowli mieszanej, co jednocześnie wskazywało na obecność mikroorganizmów biodegradujących symazynę w próbce materiału (zob. rozdział 3.4.2.1), wykonano wglębny posiew rozcieńczeń glebowych, metodą płytkową Kocha. Posiew wykonano tylko z materiałów, które w poprzednim etapie wykazywały obecność mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny na podstawie jej ubytków z hodowli. Podczas pobierania zawiesina glebowa była mieszana (200 obr.·min<sup>-1</sup>) za pomocą mieszadła magnetycznego. Wykorzystano 4 podłoża, przygotowane wg receptury Bushnella i Haasa (1941), którą zmodyfikowano. Modyfikacje pierwszego podłoża polegały na wymianie składnika będącego źródłem azotu – zamiast azotanu amonowego zastosowano symazynę (Azotop 50 WP), a jako źródło węgla wprowadzono cytrynian sodu (tab. 7). Drugie podłoże nie zawierało cytrynianu sodu, natomiast zawierało glukozę oraz symazynę (Azotop 50 WP) – tab. 8. Trzecie podłoże, oprócz symazyny (Azotopu 50 WP), zawierało pepton i glukozę (tab. 9). Do ostatniego podłoża nie dodano źródła azotu, natomiast dodano glukozę (tab. 10). Wszystkie podłoża zawierały agar. Liczono mikroorganizmy (w jtk·g<sup>-1</sup>) wyhodowane na podłożach zestalonych agarom oraz oceniano ich zdolność do wykorzystywania symazyny, peptonu, azotu atmosferycznego jako źródła azotu.

#### **3.4.2.3. Izolacja, hodowla bakterii oraz ustalanie najefektywniejszego zestawu mikroorganizmów biodegradujących symazynę**

Wyhodowane na podłożu z symazyną (tab. 7) siedmiodniowe izolaty z poprzedniego badania (zob. rozdział 3.4.2.2) przeszczepiano na zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (tab. 8, 9, 10). Z każdej wyrosłej kolonii na podłożu z symazyną (tab. 7) pobierano materiał biologiczny i wykonywano posiew redukcyjny na pozostałych podłożach (tab. 8, 9, 10).

Wzrost mikroorganizmów na tych podłożach (w postaci widocznych skupisk komórek – kolonii) świadczy o ich zdolności do wykorzystywania symazyny, peptonu lub azotu cząsteczkowego jako źródeł azotu.

Jednocześnie namnożone czyste kultury bakteryjne (na podłożu z symazyną – tab. 7) wprowadzano do płynnego zmodyfikowanego podłoża Bushnella i Haasa (tab. 4) w celu ustalenia bakteryjnego „sprawcy” ubytku symazyny. Poszczególne izolaty namnażano na podłożu z symazyną (tab. 8), wykonując posiew redukcyjny z siedmiodniowej kolonii macierzystej. Wykonano 2 pasażę w celu uzyskania czystych kultur bakteryjnych. Następnie zebrano pięciodniowe kolonie sterylnym skalpelem i umieszczono w sterylnym płynie fizjologicznym (o obj. 100 cm<sup>3</sup>). Zawiesinę bakterii poddano godzinnemu mieszaniu na mieszadle magnetycznym (200 obr. · min<sup>-1</sup>). W 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny było od 1·10<sup>7</sup> do 2·10<sup>8</sup> jednostek tworzących kolonie (jtk), w zależności od inokulatu. Liczbę jednostek tworzących kolonie bakteryjne ustalono, wykonując wgłębny posiew rozcieńczeń glebowych, metodą płytkową Kocha na podłożu z symazyną (tab. 7). Do zmodyfikowanego podłoża Bushnella i Haasa (tab. 4), o objętości 245 cm<sup>3</sup>, wprowadzano inokulum o objętości 5 cm<sup>3</sup>.

W kolejnych doświadczeniach (1–7) poszukiwano wariantu inokulum najefektywniejszego w biodegradacji symazyny. Zadanie wykonano w następujący sposób: Przygotowano pojedyncze izolaty bakteryjne w postaci zawiesiny bakterii w płynie fizjologicznym (1·10<sup>7</sup>–2·10<sup>8</sup> jtk·cm<sup>-3</sup>) i dodawano do podłoża (po 5 cm<sup>3</sup>). W ten sposób uzyskano hodowle w zmodyfikowanym podłożu Bushnella i Haasa (tab. 4), o objętości 300 cm<sup>3</sup>, z inokulatem jednoskładnikowym, dwuskładnikowym lub kilkuskładnikowym:

– Wariant pierwszy inokulatu zawierał pojedyncze izolaty bakteryjne (doświadczenia 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

– Wariant drugi inokulatu zawierał 2 izolaty bakteryjne – jeden o stwierdzonej aktywności biodegradacyjnej, a drugi niewykazujący aktywności biodegradacyjnej, ale zawsze towarzyszący w hodowli mieszanej izolatowi biodegradującemu (doświadczenia 4, 5, 7).

– Wariant trzeci to inokulat wieloskładnikowy – izolat bakteryjny o stwierdzonej aktywności biodegradacyjnej oraz 2 izolaty bakteryjne niewykazujące aktywności biodegradacyjnej, ale zawsze towarzyszące w hodowli mieszanej izolatowi biodegradującemu (doświadczenia 1, 2, 3, 4, 7).

– Wariant czwarty to mikroorganizmy z hodowli mieszanej („macierzystej”), z której izolowano opisane powyżej szczepy bakteryjne (zob. rozdział 3.4.2.1). Z takiej pięciodniowej hodowli, po osadzeniu na dnie naczynia biomasy i usunięciu płynu znad osadu, pobierano 5 cm<sup>3</sup> płynu hodowlanego (10<sup>9</sup> jtk·cm<sup>-3</sup>) i umieszczano w 245 cm<sup>3</sup> podłoża z symazyną (tab. 4) – doświadczenia 3, 5, 6.

W pierwszym i ostatnim terminie badania, używając odczynnika Nesllera, obserwowano, czy zachodzi reakcja barwna po wymieszaniu go z płynem hodowlanym. Zmiana koloru na żółty (do brązowego) świadczy o obecności amoniaku w hodowli; obserwowano, czy w rurce Durhama gromadzi się gaz.

Wszystkie izolaty osobno oraz wariant „macierzysty” namnożono w podłożu z symazyną (tab. 4) i umieszczono po 1,5 cm<sup>3</sup> w sterylnych zamykanych ampulkach, o pojemności 2 cm<sup>3</sup>, w celu wykorzystania w następnych badaniach. Bezpośrednio przed kolejnymi etapami badań oceniano liczebność mikroorganizmów (jtk·cm<sup>-3</sup>) w przechowywanym w chłodni inokulacie. Stosowano wgłębny posiew rozcieńczeń glebowych metodą płytkową Kocha na podłożu z symazyną (tab. 7).

#### 3.4.2.4. Określenie wpływu dawki symazyny i temperatury na przebieg biodegradacji

Po wytypowaniu w poprzednim etapie najefektywniejszych zestawów mikroorganizmów do biodegradacji symazyny (zob. rozdział 3.4.2.3) określano wpływ temperatury (18°C, 28°C) i dawki symazyny (50, 100, 150, 200, 300 mg·dm<sup>-3</sup>) na efektywność biodegradacji. Przygotowano 4 wersje podłoża z symazyną (tab. 4) – każde o objętości 245 cm<sup>3</sup>, ale każde z inną dawką symazyny. Do podłoży wprowadzano ten sam wybrany wariant inokulum o tej samej objętości, wynoszącej 5 cm<sup>3</sup> (1·10<sup>8</sup>–8·10<sup>8</sup> jtk·cm<sup>-3</sup>), który oceniono jako najbardziej efektywny w biodegradacji symazyny (zob. rozdział 3.4.2.3). Hodowle inkubowano w temperaturze 18°C. Analogiczną metodykę zastosowano w przypadku inkubacji tej samej hodowli, ale w temperaturze 28°C. Czas półtrwania symazyny DT<sub>50</sub> (d) wyznaczano metodą interpolacji liniowej (2). Metoda ta polega na znalezieniu przedziału dwóch pomiarów koncentracji substancji [C(t<sub>n</sub>); C(t<sub>n+1</sub>)] – przedziału, który obejmuje połowę wartości początkowego stężenia substancji aktywnej (0,5 C<sub>max</sub>), czyli C(t<sub>n</sub>) > 0,5 C<sub>max</sub> > C(t<sub>n+1</sub>) oraz t<sub>n</sub> < DT<sub>50</sub> < t<sub>n+1</sub>, gdzie n oznacza kolejny termin pomiaru stężenia (1).

Stosując twierdzenie o podobieństwie trójkątów, otrzymano równość:

$$\frac{C(t_n) - 0,5 C_{\max}}{DT_{50} - t_n} = \frac{C(t_n) - C(t_{n+1})}{t_{n+1} - t_n} \quad (1)$$

Po przekształceniach:

$$DT_{50} = t_n + \frac{C(t_n) - 0,5 C_{\max}}{C(t_n) - C(t_{n+1})} (t_{n+1} - t_n) \quad (2)$$

Średnie tempo biodegradacji symazyny  $\langle -\Delta C / \Delta t \rangle$  (mg·dm<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>) obliczono z identycznej formuły (8) jak w przypadku modelu logistycznego – zob. rozdział 3.4.2.5.

#### 3.4.2.5. Badanie przebiegu biodegradacji symazyny w hodowli okresowej

Po wybraniu najefektywniejszego zestawu mikroorganizmów oraz ustaleniu optymalnej dla procesu biodegradacji wersji temperatury i dawki symazyny przeprowadzono hodowlę metodą okresową w bioreaktorze Optimax 1001 firmy Mettler Toledo. Jałowe podłoże z symazyną (100 mg·dm<sup>-3</sup>) (tab. 4), o objętości 392 cm<sup>3</sup>, zaszczepiono inokulatem o objętości 8 cm<sup>3</sup> (2·10<sup>8</sup> jtk·cm<sup>-3</sup>). Badania procesu biodegradacji symazyny prowadzono w komorze roboczej bioreaktora (o objętości 5 dm<sup>3</sup>), którego wyposażenie umożliwia kontrolę i utrzymywanie na stałym poziomie parametrów procesowych (pH, natlenienia zawiesiny, obrotów mieszadła, temperatury). Doświadczenia prowadzono w temperaturze 28°C, przy obrotach mieszadła 200 obr·min<sup>-1</sup>.

W celu scharakteryzowania kinetyki biodegradacji symazyny sformułowano hipotezę roboczą, że tempo rozkładu herbicydu jest proporcjonalne do iloczynu aktualnej wartości stężenia substancji aktywnej i różnicy między wartością maksymalną a wartością aktualną:

$$\frac{-dC}{dt} = \frac{k}{C_0} C (C_0 - C) \quad (3)$$

Rozwiązaniem tego równania różniczkowego jest tzw. funkcja logistyczna:

$$C(t) = \frac{C_0}{1 + b \cdot \exp(kt)} \quad (4)$$

gdzie:

$C(t)$  – aktualna wartość stężenia,  
 $C_0$  – początkowa maksymalna wartość stężenia,  
 $k$  – stała szybkości degradacji ( $k > 0$ ),  
 $b$  – stały współczynnik ( $b > 0$ ),  
 $t$  – czas.

Jest to malejąca funkcja ciągła, która ma punkt przegięcia, gdy stężenie substancji aktywnej zmniejsza się do połowy. Współczynniki modelu logistycznego:  $C_0$ ,  $b$ ,  $k$  estymowano numerycznie metodą Levenberga-Marquardta, wykorzystując pakiet statystyczny Statistica 9.

Kluczową dla procesów degradacji wartość półrozpadu  $DT_{50}$  (h) obliczono z równania:

$$DT_{50} = \frac{\ln(1/b)}{k} \quad (5)$$

Dodatkowo obliczono inne parametry funkcji logistycznej – współrzędne punktu przegięcia wykresu funkcji: [ $DT_{50}$  (h),  $C(DT_{50})$  ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ )] (6), charakterystyczną dla tego punktu maksymalną teoretyczną szybkość rozpadu [ $-dC/dt(DT_{50})$  ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )] (7) oraz średnie tempo degradacji [ $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )] (8). Obliczenia te wykonano na podstawie następujących wzorów:

$$C(DT_{50}) = 0,5 C_0 \quad (6)$$

$$-dC/dt(DT_{50}) = 0,25 k C_0 \quad (7)$$

$$\langle -\Delta C/\Delta t \rangle = \frac{C(t_p) - C(t_k)}{t_k - t_p} \quad (8)$$

gdzie:

$C(t_p)$  – stężenie symazyny na początku doświadczenia,  
 $C(t_k)$  – stężenie symazyny po ubytku co najmniej 90% jej początkowej ilości  $C(t_p)$ ,  
 $t_p$  – czas pierwszego pomiaru,  
 $t_k$  – czas końcowego pomiaru.

Wykreślono też krzywe tempa degradacji po uprzednim obliczeniu pochodnych  $dC/dt$ :

$$-dC/dt = \frac{C_0 b k \cdot \exp(kt)}{[1 + b \cdot \exp(kt)]^2} \quad (9)$$

W celu porównania dokładności dopasowania krzywych teoretycznych do danych doświadczalnych obliczono wartości współczynników determinacji  $R^2$ .

## 3.5. Metodyka analiz chemicznych

### 3.5.1. Oznaczanie zawartości symazyny za pomocą chromatografii gazowej

#### 3.5.1.1. Parametry techniczne analizy

Do oznaczenia stężenia symazyny w płynnych hodowlach mikroorganizmów (lub w wodzie) wykorzystano technikę chromatografii gazowej (GC), używając aparatu Thermo Electro

Trace Ultra. Próbkę wprowadzana do układu chromatograficznego, po przeprowadzeniu w fazę gazową, przemieszczała się wraz z helem (aplikowanym w objętości  $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ) przez kolumnę kapilarną RTX-5 o długości 30 m i średnicy 0,53 mm. W czasie pomiaru program temperaturowy pieca był ustawiony na  $200^\circ\text{C}$  (przez pierwsze 4 min); następnie zaprogramowano wzrost temperatury ( $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Detektor płomieniowo-jonizujący (FID) z utrzymywaną temperaturą  $280^\circ\text{C}$  reagował na obecność symazyny, jeśli była ona w próbce.

### 3.5.1.2. Izolacja i wzbogacenie próby

Do izolacji symazyny z matrycy (z podłoża mikrobiologicznego lub z wody) stosowano ekstrakcję rozpuszczalnikiem – dichlorometanem. Oznaczenia ilościowe symazyny prowadzono metodą wzorca wewnętrznego, przy użyciu 1-bromonaftalenu jako wzorca wewnętrznego. Stężenie 1-bromonaftalenu ustalono na  $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### 3.5.1.3. Oznaczenia końcowe

Umieszczano  $1 \text{ cm}^3$  analizowanego roztworu w zważonej polipropylenowej fiolce stożkowej, o pojemności  $2 \text{ cm}^3$ . Po zważeniu roztworu z fiolką stożkową dodawano  $0,5 \text{ cm}^3$  dichlorometanowego roztworu 1-bromonaftalenu. Zawartość fiolki wytrząsano przez 5 min. Po rozdzieleniu faz fazę dichlorometanu, o objętości równiej  $0,1 \text{ cm}^3$ , poddawano analizie. Stężenia symazyny poniżej  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  oznaczano analogicznie, dodając  $0,1 \text{ cm}^3$  dichlorometanowego roztworu 1-bromonaftalenu.

### 3.5.1.4. Opracowanie danych

Stężenie symazyny, na podstawie uzyskanych powierzchni pików, obliczano z poniższego równania:

$$C_s = \left( A \cdot \frac{S_s}{S_w} + B \right) \cdot C_w \cdot \frac{m_e}{m_r} \quad (10)$$

gdzie:

$A, B$  – współczynniki korekcyjne,

$C_s, C_w$  – stężenie symazyny i wzorca wewnętrznego ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ),

$S_s, S_w$  – stosunek pików symazyny i wzorca wewnętrznego,

$m_e, m_r$  – masa ekstrahentu i masa badanego roztworu (g).

Współczynniki korekcyjne wyznaczono poprzez dozowanie na układ chromatografu serii roztworów symazyny o znanych stężeniach. Wyznaczono współczynniki:  $A = 1,843$  i  $B = 0,525$ ; obliczono wartość współczynnika determinacji  $R^2 = 0,993$ .

Wyznaczony średni błąd względny metody wynosił 15% (11). Średni błąd względny wyznaczono z równania:

$$\bar{\delta} = \frac{\sum \delta_i}{N} \quad (11)$$

gdzie:

$N$  – liczba pomiarów,

$\delta$  – względny błąd pomiaru.

$$\delta_i = \frac{C_{si} - C_{soi}}{C_{si}} \quad (12)$$

gdzie:

$C_{si}$  – stężenie symazyny wprowadzonej do układu chromatografu,

$C_{soi}$  – stężenie symazyny obliczone z równania (10).

### **3.6. Statystyczna analiza wyników badań**

W celu ustalenia statystycznie istotnych różnic w liczebności bakterii, grzybów, ilości wydzielanego CO<sub>2</sub>, różnic w stopniu biodegradacji symazyny (po zastosowaniu różnych dawek, różnych obiektów i kolejnych terminów pomiarów) zastosowano analizę wariancji oraz test porównań wielokrotnych Tukeya na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Przed rozpoczęciem analiz liczebności wyniki poddano transformacji, stosując funkcję logarytmiczną. Do opracowania wyników wykorzystano program komputerowy Statistica ver. 9.



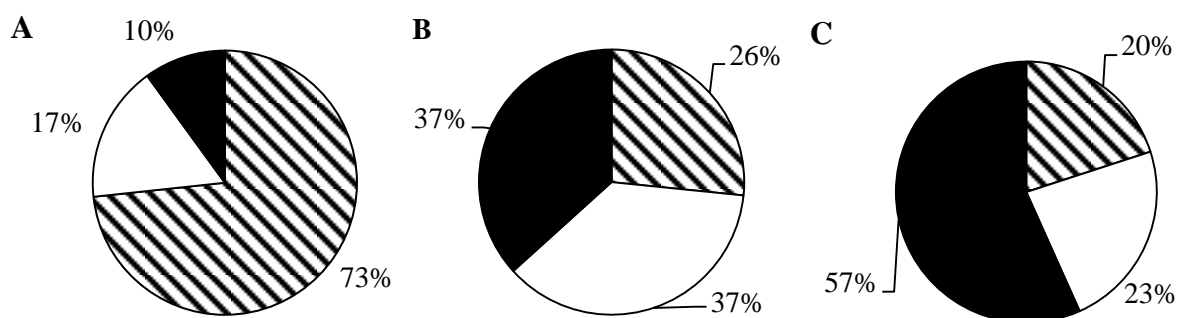
## 4. Wyniki badań




### 4.1. Wpływ symazyny na mikroorganizmy z różnych siedlisk

#### 4.1.1. Liczebność bakterii i grzybów oraz ich aktywność metaboliczna po zastosowaniu symazyny w różnych dawkach

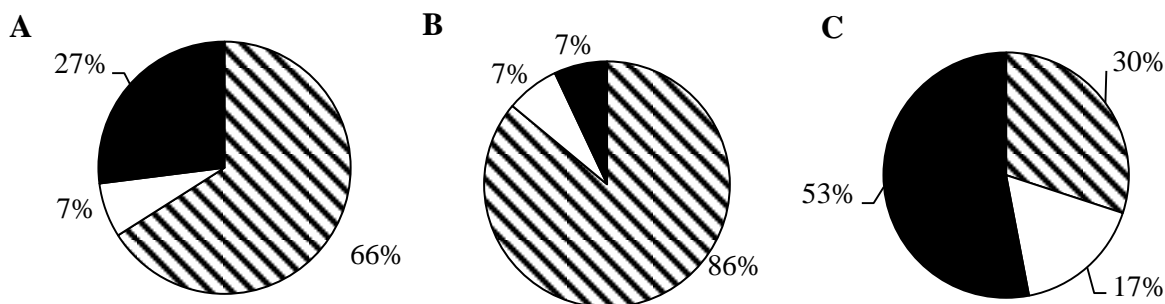
Największy wpływ na liczebność bakterii, grzybów oraz na intensywność wydzielania CO<sub>2</sub> miała dawka symazyny. Gdyby w doświadczeniu badano wpływ jedynie 2 dawek symazyny, tj. 100 i 300 mg·kg<sup>-1</sup>, z całą pewnością należałoby stwierdzić, że w obiektach dominowały mikroorganizmy odporne na tę substancję. Przypadków (obiektów), w których stwierdzono brak wpływu symazyny na bakterie i grzyby, lub w których odnotowano wręcz wzrost wartości badanych parametrów, było zdecydowanie więcej, niż przypadków, w których symazyna spowodowała statystycznie istotne zmniejszenie liczby mikroorganizmów i ich aktywności oddechowej. Natomiast symazyna zastosowana w dawce największej (500 mg·kg<sup>-1</sup>) w co najmniej 15 obiektach statystycznie istotnie redukowała liczebność bakterii, grzybów oraz intensywność wydzielania CO<sub>2</sub> (ryc. 3, 4, 5).




Analizując wyniki z 3 doświadczeń (liczebność bakterii, grzybów i wydzielanie CO<sub>2</sub>), można wskazać 3 przypadki (obiekty), w których – niezależnie od zastosowanej dawki symazyny i od badanej cechy – mikroorganizmy tak samo reagowały na symazynę. Liczebność bakterii, grzybów i intensywność wydzielania CO<sub>2</sub> nie zmieniły się statystycznie istotnie po zastosowaniu symazyny wprowadzonej do gleb, tj. do gliny piaszczystej pobranej w Siadle Dolnym (obiekt nr 4) i do gliny piaszczystej pozyskanej w Warzymicach (obiekt nr 19) – tab. 11. Podobnie było w przypadku piasku pobranego z plaży w Słowińskim Parku Narodowym (obiekt nr 30), w którym – niezależnie od dawki i badanej cechy – symazyna zawsze wywoływała zmniejszenie wartości 3 badanych parametrów.

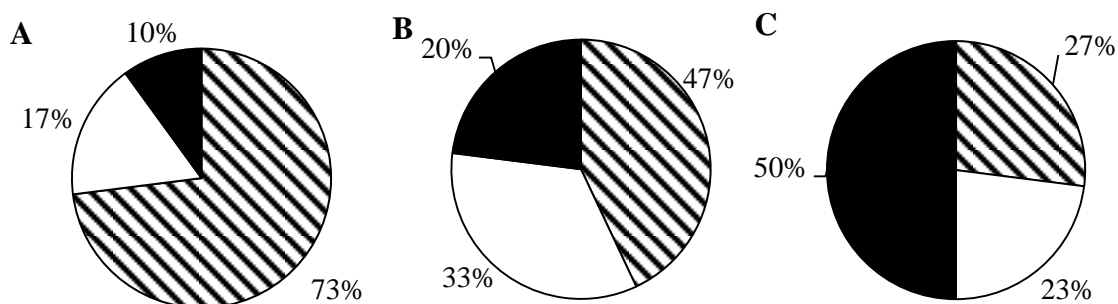





Ryc. 3. Odsetek obiektów, w których po zastosowaniu symazyny:  – liczba bakterii (jtk·g<sup>-1</sup>) nie zmieniła się statystycznie istotnie, w porównaniu z liczebnością tych mikroorganizmów w obiekcie kontrolnym;  – liczba bakterii (jtk·g<sup>-1</sup>) zwiększyła się statystycznie istotnie, w porównaniu z liczebnością tych mikroorganizmów w obiekcie kontrolnym;  – liczba bakterii (jtk·g<sup>-1</sup>) zmniejszyła się statystycznie istotnie, w porównaniu z liczebnością tych mikroorganizmów w obiekcie kontrolnym. Dawka symazyny: A – 100 mg·kg<sup>-1</sup>, B – 300 mg·kg<sup>-1</sup>, C – 500 mg·kg<sup>-1</sup>





Ryc. 4. Odsetek obiektów, w których po zastosowaniu symazyny:  – liczba grzybów ( $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nie zmieniła się statystycznie istotnie, w porównaniu z liczebnością tych mikroorganizmów w obiekcie kontrolnym;  – liczba grzybów ( $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ ) zwiększyła się statystycznie istotnie, w porównaniu z liczebnością tych mikroorganizmów w obiekcie kontrolnym;  – liczba grzybów ( $\text{jtk}\cdot\text{g}^{-1}$ ) zmniejszyła się statystycznie istotnie, w porównaniu z liczebnością tych mikroorganizmów w obiekcie kontrolnym. Dawka symazyny: A –  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , B –  $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , C –  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$






Ryc. 5. Odsetek obiektów, w których po zastosowaniu symazyny:  – ilość wydzielonego  $\text{CO}_2$  ( $\text{cm}^3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nie zmieniła się statystycznie istotnie, w porównaniu z ilością  $\text{CO}_2$  wydzielonego z obiektu kontrolnego;  – ilość wydzielonego  $\text{CO}_2$  ( $\text{cm}^3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) zwiększyła się statystycznie istotnie, w porównaniu z ilością  $\text{CO}_2$  wydzielonego z obiektu kontrolnego;  – ilość wydzielonego  $\text{CO}_2$  ( $\text{cm}^3\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) zmniejszyła się statystycznie istotnie, w porównaniu z ilością  $\text{CO}_2$  wydzielonego z obiektu kontrolnego. Dawka symazyny: A –  $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , B –  $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , C –  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

W pozostałych 27 przypadkach (obiekciech), w zależności od dawki symazyny i rozpatrywanego wskaźnika, notowano brak wpływu symazyny lub obserwowano zmiany w liczebności i intensywności oddychania mikroorganizmów (tab. 11). W obiektach nr 3 i nr 5 (w materiale z Wołczkowa i w materiale z Parku Leśnego Zdroje) po zastosowaniu symazyny mikroorganizmy nie zmieniały istotnie swojej liczebności i tempa oddychania lub wykazywały intensywny rozwój poprzez zwiększenie swojej liczebności i tempa metabolizmu (oddychania). Na szczególną uwagę zasługuje obiekt nr 10 (materiał z Krzekowa), ponieważ mikroorganizmy były tam wyraźnie stymulowane przez symazynę do wzrostu i wydzielania  $\text{CO}_2$  – zanotowano prawie sześciokrotny wzrost ilości wydzielonego  $\text{CO}_2$ , w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Jeszcze dwa obiekty – nr 26 i 27 (materiał z Załomia i piasek gliniasty z Bukowa) charakteryzowały się obecnością mikroorganizmów, które w zależności od użytej dawki symazyny i badanej cechy albo nie zmieniały tempa rozmnażania i aktywności metabolicznej, albo były wręcz stymulowane do rozwoju.

Tabela. 11. Wykaz kierunku zmian badanych parametrów po zastosowaniu symazyny (Azotopu 50 WP), z zaznaczeniem zawartości substancji organicznej w obiektach i pozytywnego wyniku biodegradacji

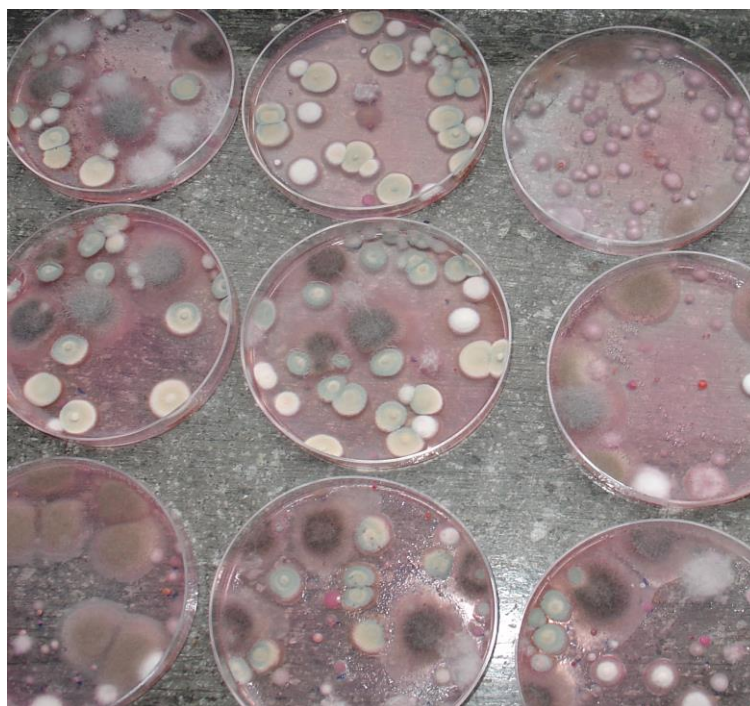
Zawartość substancji organicznej (g·kg <sup>-1</sup> )	Numer obiektu	Symazyna (mg·kg <sup>-1</sup> )								
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
		liczebność bakterii (jtk·g <sup>-1</sup> )			liczebność grzybów (jtk·g <sup>-1</sup> )			szybkość wydzielania CO <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> ·g <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )		
0,5	30									
0,6	20									
0,6	18									
0,8	24									
4,1	13									
9,0	26									
15,8	15									
16,8	7									
20,3	◆ 22									
25,0	28									
26,2	27									
27,8	25									
31,4	◆ 14									
35,8	16									
38,4	◆ 1									
38,9	2									
40,5	19									
45,3	6									
54,1	◆ 10									
61,7	◆ 4									
72,2	3									
75,6	5									
77,0	◆ 8									
86,7	23									
91,3	12									
103,6	11									
185,8	◆ 9									
301,6	29									
344,1	21									
894,3	17									

Objaśnienia:  – brak statystycznie istotnego wpływu na badany parametr;  – statystycznie istotne zmniejszenie wartości parametru;  – statystycznie istotne zwiększenie wartości parametru. ◆ – mikroorganizmy zasiedlające obiekt są zdolne do biodegradacji symazyny. Dawki symazyny: I – 100 mg·kg<sup>-1</sup>, II – 300 mg·kg<sup>-1</sup>, III – 500 mg·kg<sup>-1</sup>.

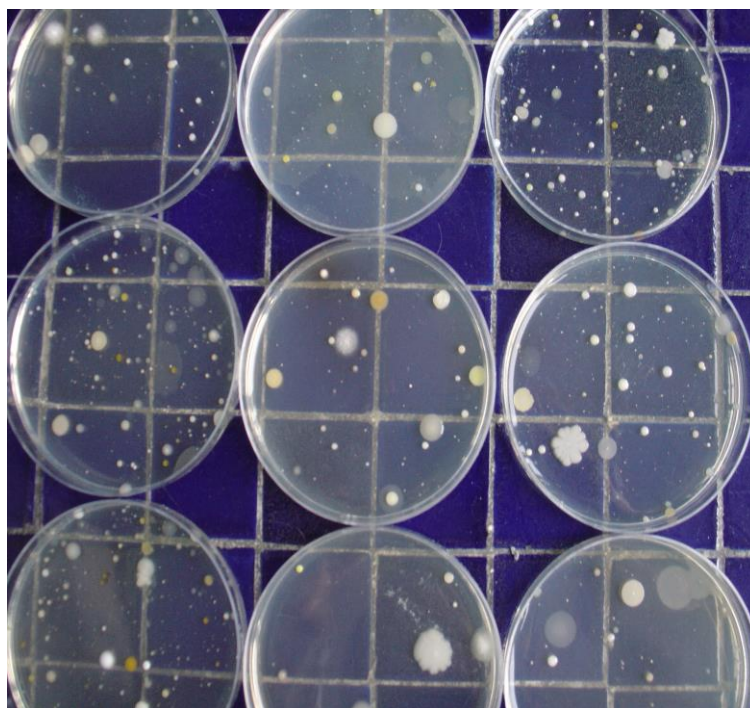
Obiekty: 1 – glina piaszczysta z Przęsocina (łąka), 2 – glina piaszczysta z Przęsocina (młodnik), 3 – materiał z Wołczkowa, 4 – glina piaszczysta z Siadła Dolnego, 5 – materiał z Parku Leśnego Zdroje, 6 – glina piaszczysta z Ostoi, 7 – piasek słabogliniasty z „Gubałówki”, 8 – materiał z Parku Leśnego Arkońskiego, 9 – materiał z parku Kasprowicza, 10 – materiał z Krzekowa, 11 – materiał z parku Brodowskiego, 12 – materiał z Podjuch, 13 – piasek z Załomia, 14 – glina lekka z Przeclawia (pole po kukurydzy), 15 – piasek gliniasty z Bukowa (pole), 16 – glina piaszczysta z Przeclawia (zaorane pole), 17 – podłoże ogrodnicze, 18 – piasek z Dąbia, 19 – glina piaszczysta z Warzymic, 20 – piasek z plaży WPN, 21 – kompost ogrodowy, 22 – materiał z Parku Leśnego w Mścięcinnie, 23 – materiał z Puszczy Goleniowskiej, 24 – piasek z nabrzeża Jeziora Głębokiego, 25 – glina piaszczysta z Bukowa, 26 – materiał z Załomia, 27 – piasek gliniasty z Bukowa (łąka), 28 – materiał z Gumieniec, 29 – biohumus, 30 – piasek z plaży SPN.

Wśród 30 obiektów można również wskazać takie, w których mikroorganizmy w obecności symazyny, zastosowanej w 3 dawkach, zmniejszały swoją liczebność i spowalniały tempo wydzielania CO<sub>2</sub>. Obiekty nr 30, 20, 11, 18 i 29 (piasek z plaży SPN, z plaży WPN, materiał z parku Brodowskiego, piasek z nabrzeża jeziora Dąbie i biohumus) zasiedlały mikroorganizmy wrażliwe na symazynę (tab. 11).

Zaobserwowano, że obiekty (30, 20, 18, 24), które charakteryzowały się najmniejszą zawartością substancji organicznej (od 0,5 do 0,8 g·kg<sup>-1</sup>) i jednocześnie przewagą frakcji piasku (powyżej 95%), zawierały mikroorganizmy albo wrażliwe, albo niereagujące na symazynę (tab. 11). Po zastosowaniu symazyny w dawkach 300 i 500 mg·kg<sup>-1</sup> (ponieważ symazyna w dawce 100 mg·kg<sup>-1</sup> w większości przypadków nie wpływała statystycznie istotnie na mikroorganizmy) obserwowano znacznie częściej brak jej statystycznie istotnego wpływu na mikroorganizmy w obiektach zawierających co najmniej 38 g substancji organicznej, niż w obiektach zawierających mniej tej substancji (tab. 11). Jednak wśród obiektów z większą ilością substancji organicznej (powyżej 38 g·kg<sup>-1</sup>) były też takie obiekty, w których reakcja mikroorganizmów na symazynę była statystycznie istotna. Potwierdzeniem zróżnicowanych reakcji mikroorganizmów na symazynę były obiekty (8, 9, 17, 21) z największą zawartością substancji organicznej (185,8–894,3 g·kg<sup>-1</sup>). Cenne spostrzeżenie dotyczy wpływu symazyny, użytej w dawce 500 mg·kg<sup>-1</sup>, na mikroorganizmy zasiedlające obiekty zróżnicowane pod względem zasobności w substancję organiczną. Na ogół badane cechy mikroorganizmów zmieniały się (statystycznie istotnie) w obiektach z mniejszą zawartością substancji organicznej (do 38 g·kg<sup>-1</sup>), natomiast – jak już wspomniano – w obiektach bardziej zasobnych w substancję organiczną (powyżej 38 g·kg<sup>-1</sup>) reakcja mikroorganizmów na symazynę częściej była nieistotna statystycznie (tab. 11).



Fot. 1. Kolonie grzybów na podłożu Martina (1950), izolowane z kompostu (obiekt nr 21)



Fot. 2. Kolonie bakterii na podłożu Bunta-Roviry (1955), izolowane z kompostu (obiekt nr 21)

Stwierdzono pewne zbieżności (tendencje), na podstawie których można uogólnić efekty oddziaływania symazyny na mikroorganizmy. Przede wszystkim należy zwrócić uwagę na niewielki wpływ dawki symazyny  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Tylko w kilku obiektach (najwyżej w ośmiu) symazyna w tej dawce wywołała niewielkie zmiany, chociaż statystycznie istotne, dotyczące zarówno liczebności mikroorganizmów, jak i ilości wydzielanego  $\text{CO}_2$  (ryc. 3, 4, 5). Ponadto wraz ze wzrostem dawki symazyny przybywało obiektów, w których wartości badanych parametrów były mniejsze niż w obiektach kontrolnych. Najsilniej na mikroorganizmy oddziaływała dawka symazyny wynosząca  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Liczba obiektów, w których nie zanotowano zmian, po aplikacji symazyny w tej dawce wyraźnie się zmniejszyła – dominowały obiekty, w których liczebność bakterii i grzybów była mniejsza, a szybkość oddychania wolniejsza niż w obiektach kontrolnych (ryc. 3, 4, 5).

Wraz ze wzrostem dawki symazyny zmniejszała się liczba obiektów, w których mikroorganizmy były obojętne na symazynę (nie zanotowano zmian wartości badanych parametrów w odniesieniu do wartości tych parametrów w obiektach kontrolnych). Wzrost dawki symazyny „wymuszał” reakcje mikroorganizmów związane z ich liczebnością i aktywnością metaboliczną. Po zastosowaniu symazyny w dawce  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  obiektów, w których nie ustalono statystycznie istotnych zmian w liczebności bakterii i grzybów oraz w szybkości wydzielania ditlenku węgla, było ok. 70%. Natomiast po użyciu symazyny w dawce  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  już tylko ok. 25% obiektów charakteryzowało się obecnością mikroorganizmów odpornych na wpływ tej substancji aktywnej (ryc. 3, 4, 5). Przykłady kolonii bakterii i grzybów izolowanych z obiektu nr 21 przedstawiono powyżej (fot. 1, 2).

#### 4.1.2. Liczebność bakterii w różnych matrycach środowiskowych

Po zastosowaniu symazyny nie stwierdzono obecności bakterii w obiekcie nr 30 (w piasku z plaży SPN). Obiekty nr 18 i nr 20 (piasek z nabrzeża jeziora Dąbie i piasek z plaży WPN) zawierały mikroorganizmy wrażliwe na symazynę, ponieważ po zastosowaniu dawek 300

i 500 mg·kg<sup>-1</sup> nie wykryto w nich obecności bakterii. Bakterie z obiektu nr 29 (z biohumusu) również były nieodporne na symazynę – ich liczba była mniejsza, niż w obiekcie kontrolnym, o 20, 60 i 40% (odpowiednio po zastosowaniu symazyny w dawkach 100, 300, 500 mg·kg<sup>-1</sup>). W pozostałych obiektach, jeżeli odnotowano zmianę liczebności bakterii, to było to zmniejszenie rzędu kilkunastu–kilkudziesięciu procent i to jedynie po zastosowaniu największej dawki symazyny (tab. 12).

Tabela 12. Liczebność bakterii w obiektach ( $\cdot 10^4$  jtk·g<sup>-1</sup>) po zastosowaniu symazyny (Azotopu 50 WP)

Numer obiektu*	Symazyna (mg·kg <sup>-1</sup> )			
	0	100	300	500
1	405,79 b	399,58 bc	498,96 a	339,54 c
2	529,01 a	607,28 a	596,49 a	237,51 b
3	1243,52 bc	1371,33 b	1668,39 a	1188,25 c
4	804,46 a	815,64 a	831,28 a	887,15 a
5	3157,89 a	3001,12 a	3247,48 a	3135,49 a
6	626,45 b	582,36 b	809,74 a	41,29 c
7	19,43 b	36,83 a	6,03 c	0,01 d
8	1119,89 a	1028,06 ab	1109,69 a	931,12 b
9	11 094,45 b	13 103,45 b	20 689,66 a	12 143,93 b
10	89,91 b	97,75 b	125,33 a	104,26 ab
11	3215,50 a	3717,21 a	2394,52 b	45,15 c
12	7991,45 a	7564,10 a	613,24 b	670,94 b
13	170,87 a	179,71 a	119,89 b	111,83 b
14	439,48 c	500,58 bc	571,09 b	2397,18 a
15	40,38 a	38,87 a	38,44 a	0,01 b
16	550,81 b	909,28 a	0,02 d	0,14 c
17	10 436,89 b	12645,63 a	11 893,20 ab	5842,23 c
18	13,64 a	13,36 a	0,00 b	0,00 b
19	118,25 a	116,37 a	119,67 a	112,60 a
20	0,14 a	0,04 b	0,00 c	0,00 c
21	81 789,80 c	81 581,69 c	109 885,50 a	102 809,00 b
22	26,76 b	26,52 b	53,75 a	50,93 a
23	8392,07 a	8656,38 a	7466,96 b	5022,02 c
24	4,31 a	4,42 a	4,80 a	0,00 b
25	1091,29 b	1007,34 b	776,49 c	4344,17 a
26	7,87 c	13,31 b	15,13 b	280,52 a
27	138,35 c	140,99 c	148,32 b	198,57 a
28	56,74 c	91,75 b	92,15 b	111,26 a
29	88 016,11 a	68 479,36 b	37 059,42 d	54 179,25 c
30	0,02 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b

Wartości liczbowe w wierszach tabeli oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie według testu Tukeya, przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

\* Opis obiektów zob. tab. 11.

Dość liczną grupę stanowiły obiekty (1, 6, 7, 25, 16, 17), w których po zastosowaniu jednej dawki symazyny (najczęściej 100 mg·kg<sup>-1</sup>) zwiększała się liczba bakterii, a po użyciu

drugiej dawki (najczęściej 300 lub/i 500 mg·kg<sup>-1</sup>) odnotowywano redukcję liczebności tych mikroorganizmów. Przykładem jest obiekt nr 16 (próbka gliny piaszczystej z Przeclawia), w którym po zastosowaniu najmniejszej dawki symazyny liczba bakterii zwiększyła się o 65%, w porównaniu z obiektem kontrolnym, a większe dawki symazyny (300, 500 mg·kg<sup>-1</sup>) zmniejszyły ich liczbę i to o kilka rzędów wielkości (tab. 12).

Wśród kilkudziesięciu obiektów można wskazać też takie, w których po zastosowaniu symazyny liczebność bakterii nie zmieniała się lub była większa niż w obiektach kontrolnych. Największy wzrost liczby bakterii (o 70%, 90% i 250%, w porównaniu z liczbą bakterii w obiekcie kontrolnym, po zastosowaniu odpowiednio wzrastających dawek symazyny) zaobserwowano w materiale z łąki pobranej w Załomiu (w obiekcie nr 26). Stwierdzono tam zależność: im więcej symazyny, tym więcej bakterii. W glebie z symazyną (w obiekcie nr 26) bakterii było więcej średnio o ok. milion jtk·g<sup>-1</sup> niż w glebie kontrolnej. Podobnie było po zastosowaniu wzrastających dawek symazyny w przypadku obiektów: 28, 22, 14, w których odnotowano wielokrotne (nawet pięciokrotne w obiekcie nr 14 – w glinie lekkiej z Przeclawia) zwiększenie liczby bakterii po kontakcie z symazyną. W 15 obiektach co najmniej jedna dawka symazyny stymulowała wzrost bakterii – najczęściej były to mniejsze zmiany liczebności, sięgające kilku-, kilkunastu procent. Jedynie w 3 obiektach (nr 4 – w glinie piaszczystej z nabrzeża Odry, 5 – w materiale z parku w Zdrojach, 19 – w glinie piaszczystej z Warzymic) nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu 3 dawek symazyny na liczebność bakterii (tab. 12).

Jak już wspomniano, w obiektach, w których zawartość substancji organicznej przekraczała 38 g·kg<sup>-1</sup>, obserwowano znacznie częściej występowanie bakterii odpornych na symazynę. W tych przypadkach liczba bakterii po zastosowaniu symazyny w dawkach 300 i 500 mg·kg<sup>-1</sup> często nie zmieniała się statystycznie istotnie (tab. 11).

#### **4.1.3. Liczebność grzybów w różnych matrycach środowiskowych**

Negatywny wpływ symazyny, zastosowanej w 3 dawkach, dotyczył obiektu nr 30 (piasku z plaży SPN), w którym liczba grzybów zmniejszyła się o 33% (po zastosowaniu symazyny w dawce 100 mg·kg<sup>-1</sup>) i o ok. 67% (po użyciu dawek symazyny 300 i 500 mg·kg<sup>-1</sup>). Symazyna zredukowała też liczbę grzybów w obiekcie nr 22 (w materiale z parku w Mścięcinnie), jednak nie tak znacznie jak ww. obiekcie – liczba grzybów uległa zmniejszeniu średnio o 20%. Na uwagę zasługuje oddziaływanie symazyny na grzyby w obiekcie nr 7 (w piasku słabogliniastym pobranym na szczecińskiej „Gubałówce”), w którym jej najmniejsza dawka (100 mg·kg<sup>-1</sup>) nie wpłynęła statystycznie istotnie na liczebność grzybów, natomiast aplikacja pozostałych 2 dawek spowodowała ich całkowitą eliminację. W obiektach nr 15 i nr 20 (w piasku gliniastym z Bukowa i w piasku z plaży WPN) również symazyna w dawce 500 mg·kg<sup>-1</sup> całkowicie wyeliminowała grzyby, jednak co najmniej jedna z dawek (100 lub/i 300 mg·kg<sup>-1</sup>) w tych obiektach nie wpłynęła istotnie na liczebność grzybów. W dalszej kolejności największą redukcję liczby tych mikroorganizmów zanotowano w obiektach nr 8 i nr 9 (w materiale z Parku Leśnego Arkońskiego i z parku Kasprowicza), w których dawki symazyny, wynoszące 300 i 500 mg·kg<sup>-1</sup>, zmniejszyły liczbę grzybów średnio o ok. 50% (tab. 13).

Znacznie mniej było obiektów, które charakteryzowały się zwiększeniem liczby grzybów po wprowadzeniu do podłoża symazyny. Największy wzrost liczebności grzybów, i to po zastosowaniu wszystkich 3 dawek symazyny, dotyczył obiektów nr 10 i nr 5 (materiału z Krzekowa i materiału z Parku Leśnego Zdroje). Mimo że w tych 2 przypadkach jedna jej dawka nie wpłynęła statystycznie istotnie na wynik, wzrost liczby grzybów był znaczny – wynosił średnio

kilkadziesiąt procent, w odniesieniu do liczebności grzybów w obiektach kontrolnych. W obiekcie nr 5 wraz ze zwiększaniem ilości symazyny w glebie stwierdzano coraz większą liczbę grzybów – liczba ich komórek (w jtk) zwiększała się sukcesywnie o 7, 58 i 89%, w odniesieniu do liczebności grzybów w obiekcie kontrolnym (tab. 13). W obiektach 24, 11 i 13 stwierdzono przeciwstawne kierunki oddziaływania symazyny na grzyby, w zależności od zastosowanej dawki. Dawka symazyny wynosząca 100 mg·kg<sup>-1</sup> stymulowała grzyby do rozwoju (we wszystkich 3 obiektach grzybów było więcej o kilkanaście procent niż w wariancie kontrolnym); kolejne dawki symazyny zmniejszały liczebność grzybów (zazwyczaj o kilkadziesiąt procent).

Tabela 13. Liczebność grzybów w obiektach ( $\cdot 10^2$  jtk·g<sup>-1</sup>) po zastosowaniu symazyny (Azotopu 50 WP)

Numer obiektu*	Symazyna (mg·kg <sup>-1</sup> )			
	0	100	300	500
1	554,8 b	699,7 a	536,2 b	575,5 b
2	750,7 a	829,1 a	798,3 a	64,4 b
3	3488,7 a	4352,3 a	3765,1 a	3488,7 a
4	2256,9 a	2189,9 a	2145,2 a	2614,5 a
5	2284,4 c	2441,2 c	3605,8 b	4322,5 a
6	2326,1 a	2234,8 a	2326,1 a	1984,0 b
7	4,2 a	4,5 a	0,0 b	0,0 b
8	1653,0 a	1622,4 a	1247,4 b	7,1 c
9	4377,8 a	4407,8 a	26,7 b	24,0 b
10	3004,4 b	5650,2 a	3834,0 b	4910,3 a
11	198 840,0 a	223 202,0 a	165 429,2 b	0,0 c
12	3076,9 ab	3354,7 a	2927,3 b	3055,5 ab
13	153,4 b	174,2 b	239,2 ab	30,3 c
14	987,0 a	904,8 a	944,7 a	827,2 b
15	1,1 a	0,8 b	1,1 a	0,0 c
16	138,5 b	150,3 ab	148,2 ab	154,3 a
17	8665,0 a	7669,9 b	8300,9 ab	8373,7 ab
18	1,2 a	1,3 a	1,2 a	0,2 b
19	636,0 a	596,0 a	666,6 a	676,0 a
20	1,3 a	1,3 a	1,2 a	0,0 b
21	5327,7 a	5306,9 a	4412,0 b	3725,2 c
22	66,4 a	58,7 ab	50,7 b	53,8 b
23	949,3 a	962,5 a	920,7 a	914,1 a
24	3,4 a	3,8 a	0,9 b	0,9 b
29	4994,7 ab	4575,0 b	5204,6 a	5267,5 a
26	33,3 b	36,3 b	36,1 b	44,2 a
27	23,0 bc	26,7 b	21,4 c	39,5 a
28	75,1 a	77,3 a	73,0 a	32,8 b
25	0,17 a	0,16 a	0,15 a	0,0 b
30	0,09 a	0,06 b	0,03 c	0,03 c

Wartości liczbowe w wierszach tabeli oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie według testu Tukeya, przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

\* Opis obiektów zob. tab. 11.

W pięciu obiektach (3, 4, 12, 19, 23) symazyna w żadnej z zastosowanych dawek nie wpłynęła statystycznie istotnie na wartość badanego parametru. W obiektach niewymienionych w tym rozdziale zastosowanie tylko jednej dawki symazyny (100 lub 300, lub 500 mg·kg<sup>-1</sup>) wpłynęło znacznie na liczebność grzybów (tab. 13).

W obiektach, w których zawartość substancji organicznej przekraczała 38 g·kg<sup>-1</sup>, znacznie częściej występowały grzyby odporne na symazynę. Jednak statystycznie istotny brak wpływu symazyny na liczebność grzybów odnotowano w obiektach zawierających więcej niż 38 g·kg<sup>-1</sup> substancji organicznej jedynie w przypadku zastosowania największej dawki tej substancji, tj. 500 mg·kg<sup>-1</sup> (tab. 11).

#### **4.1.4. Szybkość wydzielania CO<sub>2</sub> przez mikroorganizmy z różnych siedlisk**

Zaobserwowano, że wzrost dawki symazyny w różny sposób oddziaływał na wydzielanie CO<sub>2</sub> przez mikroorganizmy. Wraz ze wzrostem dawki symazyny zmniejszała się liczba obiektów, w których nie stwierdzano statystycznie istotnego wpływu tej substancji na intensywność wydzielania ditlenku węgla (ryc. 5). Po zastosowaniu symazyny w dawce 100 mg·kg<sup>-1</sup> odnotowano brak istotnego wpływu na badany parametr w 22 obiektach, a po użyciu 300 mg·kg<sup>-1</sup> – w 14 obiektach; największa dawka symazyny nie wywarła istotnego wpływu jedynie w 8 obiektach (ryc. 5). Stosując dawkę symazyny wynoszącą 500 mg·kg<sup>-1</sup>, w 15 obiektach (1, 2, 6, 7, 8, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 24, 25, 29, 30) zanotowano zmniejszenie ilości wydzielanego CO<sub>2</sub>. W pozostałych obiektach ilość ditlenku węgla po użyciu symazyny była albo znacznie większa niż w wariantach kontrolnych (5, 10, 14, 20, 22, 26, 27, 28), albo nie różniła się statystycznie istotnie od jego ilości w wariantach bez symazyny (3, 4, 9, 12, 17, 19, 21, 23). Przy czym gdy ilość CO<sub>2</sub> była większa w obiektach z symazyną, niż w wariantach kontrolnych, często różnica wynosiła kilkaset procent (np. w obiektach 10, 14, 26). Natomiast gdy ilość CO<sub>2</sub> była mniejsza, niż w obiektach kontrolnych, różnica wynosiła kilkanaście albo najwyżej kilkadziesiąt procent (tab. 14).

W materiale z Krzekowa (w obiekcie nr 10) ilość ditlenku węgla wzrosła pięciokrotnie po kontakcie z symazyną we wszystkich dawkach. Po zastosowaniu symazyny w dawkach 300 i 500 mg·kg<sup>-1</sup> intensywność wydzielania ditlenku węgla wzrosła ponaddwukrotnie w obiekcie nr 14 (w glinie lekkiej z Przecławia). W obiekcie nr 26 (w materiale pobranym na łące w Załomiu) również dwukrotnie więcej CO<sub>2</sub> stwierdzono w glebie z dodatkiem symazyny (tab. 14). Jeszcze w kilku innych obiektach (3, 5, 22, 28) odnotowano kilkudziesięcioprocentowe zwiększenie ilości wydzielanego ditlenku po aplikacji do gleby symazyny w co najmniej 2 dawkach.

Wśród obiektów, w których symazyna we wszystkich dawkach wywołała zmniejszenie wydzielania badanego gazu, znalazły się piaski z dwóch plaż (WPN i SPN – odpowiednio obiekty nr 20 i nr 30), a w dalszej kolejności – obiekty, w których jedynie dwie dawki symazyny wywołały efekt zmniejszenia ilości ditlenku węgla; były to: piasek z nabrzeża jeziora Dąbie (obiekt nr 18), piasek słabogliniasty z „Gubałówki” (obiekt nr 7), materiał z parku Brodowskiego (obiekt nr 11), biohumus (obiekt nr 29). Mikroorganizmy zasiedlające piasek z 2 plaż podobnie reagowały na symazynę – dawka najmniejsza, wynosząca 100 mg·kg<sup>-1</sup>, spowodowała zmniejszenie wydzielania CO<sub>2</sub> o ok. 30%, kolejna dawka (300 mg·kg<sup>-1</sup>) – o ok. 50%, a dawka największa (500 mg·kg<sup>-1</sup>) – średnio o 65% (w porównaniu z wariantami kontrolnymi tych obiektów) – tab. 14. Mikroorganizmy, które nie zmieniły statystycznie istotnie szybkości wydzielania ditlenku węgla po kontakcie z symazyną (użyta w dawce 500 mg·kg<sup>-1</sup>), zasiedlały obiekty zawierające więcej niż 40 g·kg<sup>-1</sup> substancji organicznej (były to obiekty 19, 4, 3, 23, 12, 9, 21, 17) – tab. 11.



Tabela 14. Tempo oddychania mikroorganizmów, ilość wydzielonego CO<sub>2</sub> (cm<sup>3</sup>·g<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) w obiektach po zastosowaniu symazyny (Azotopu 50 WP)

Numer obiektu*	Symazyna (mg·kg <sup>-1</sup> )			
	0	100	300	500
1	0,122 ab	0,126 a	0,119 b	0,096 c
2	0,174 a	0,171 a	0,166 a	0,131 b
3	0,223 c	0,314 b	0,348 a	0,245 c
4	0,301 a	0,295 a	0,275 a	0,291 a
5	0,270 b	0,273 b	0,352 a	0,363 a
6	0,170 b	0,168 b	0,226 a	0,130 c
7	0,109 a	0,101 a	0,048 b	0,023 c
8	0,152 b	0,152 b	0,162 a	0,133 c
9	0,236 a	0,230 a	0,239 a	0,231 a
10	0,057 b	0,286 a	0,295 a	0,295 a
11	0,247 a	0,259 a	0,213 b	0,128 c
12	0,193 a	0,191 a	0,192 a	0,185 a
13	0,177 a	0,170 a	0,170 a	0,140 b
14	0,225 c	0,209 c	0,465 b	0,557 a
15	0,104 a	0,098 a	0,095 a	0,046 b
16	0,162 b	0,312 a	0,151 b	0,122 c
17	0,262 ab	0,269 a	0,244 b	0,242 b
18	0,032 a	0,031 a	0,022 b	0,015 c
19	0,142 a	0,133 a	0,135 a	0,133 a
20	0,100 a	0,072 b	0,052 c	0,042 c
21	0,285 b	0,293 ab	0,302 a	0,296 ab
22	0,018 c	0,018 c	0,029 a	0,021 b
23	0,179 a	0,182 a	0,183 a	0,178 a
24	0,170 b	0,187 a	0,168 b	0,099 c
25	0,099 a	0,097 a	0,093 a	0,078 b
26	0,130 c	0,141 b	0,261 a	0,289 a
27	0,072 b	0,076 b	0,075 b	0,099 a
28	0,109 c	0,133 b	0,141 a	0,140 a
29	0,451 a	0,439 a	0,290 b	0,268 c
30	0,008 a	0,005 b	0,004 c	0,002 d

Wartości liczbowe w wierszach tabeli oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie według testu Tukeya, przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

\* Opis obiektów zob. tab. 11.

## 4.2. Ocena zdolności mikroorganizmów z różnych siedlisk do biodegradacji symazyny

### 4.2.1. Wykrywanie obecności mikroorganizmów biodegradujących symazynę w różnych matrycach środowiskowych

W większości badanych obiektów nie stwierdzono obecności mikroorganizmów szybko biodegradujących symazynę, tj. takich, które w ciągu 14 dni chociaż zainicjowałyby proces

rozkładu tej substancji. Jedynie w 7 przypadkach (tj. w 23% wszystkich obiektów) wykazano statystycznie istotny ubytek symazyny w podłożach hodowlanych, co potwierdziło obecność mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny (ryc. 6). Obiekty, w których wykryto obecność mikroorganizmów aktywnych w biodegradacji symazyny, to: glina piaszczysta z Przęsocina (obiekt nr 1), glina piaszczysta z Siadła Dolnego (obiekt nr 4), materiał z parku w Mścięcinie (obiekt 22), materiał z Parku Arkońskiego (obiekt 8), materiał z Krzekowa (obiekt 10), glina lekka z Przeclawia (obiekt 14), materiał z parku Kasprowicza (obiekt 9). W pozostałych obiektach nie wykryto mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny. Dlatego w pracy tej zamieszczono wyniki badań dotyczące biodegradacji tylko we wspomnianych 7 obiektach (ryc. 6).

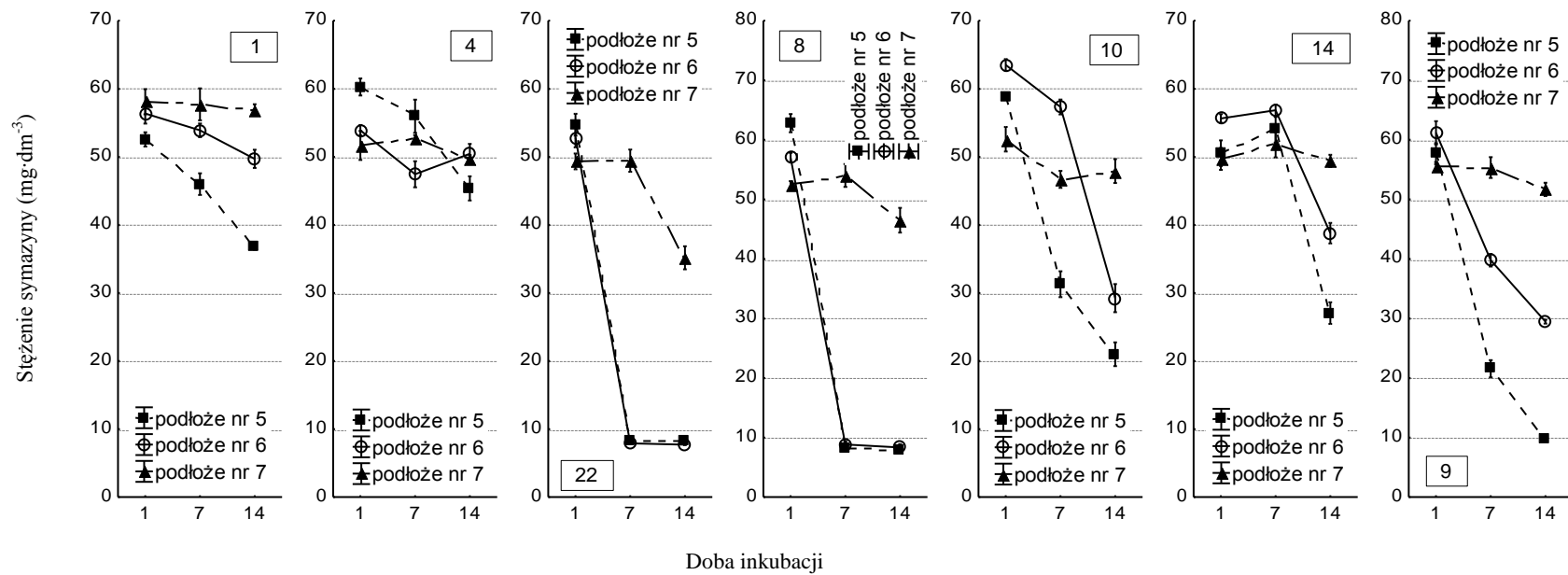
Mikroorganizmy hodowano w 3 podłożach z symazyną, różniących się źródłem węgla i/lub azotu. Zmodyfikowane podłoże Bushnella i Haasa (1941) zawierało symazynę i cytrynian sodu (tab. 4, podłoże nr 5) lub symazynę i glukozę (tab. 5, podłoże nr 6), lub symazynę, pepton i glukozę (tab. 6, podłoże nr 7). W podłożach nr 5 i nr 6 obserwowano ubytek symazyny po wprowadzeniu mikroorganizmów ze wszystkich obiektów, tj. z obiektów 1, 4, 22, 8, 10, 14, 9. Jednak w podłożu, w którym zamiast cytrynianu sodu dodano glukozę (w podłożu nr 6), proces biodegradacji przebiegał na ogół wolniej niż w podłożu z cytrynianem sodu (nr 5). Próba przeprowadzania biodegradacji symazyny w podłożu z peptonem i glukozą (w podłożu nr 7) wykazała, że obecność w podłożu hodowlanym innego, niż symazyna, organicznego źródła azotu hamuje proces jej biodegradacji. We wszystkich wariantach hodowlanych z peptonem biodegradacja nie zachodziła lub przebiegała jedynie w niewielkim zakresie (ryc. 6).

Mikroorganizmy z obiektu nr 1 (z gliny piaszczystej z łąki w Przęsocinie) przeprowadzały biodegradację symazyny na podłożu płynnym z cytrynianem sodu (na podłożu nr 5). Jedynie w tej wersji hodowlanej zanotowano statystycznie istotny ubytek substancji już po tygodniu hodowli (ilość symazyny zmniejszyła się o 13%). W ostatnim terminie pomiaru symazyny było o ok. 30% mniej niż na początku.

W glinie piaszczystej z nabrzeża Odry – z Siadła Dolnego (w obiekcie nr 4) co prawda odnotowano obecność mikroorganizmów biodegradujących symazynę, ale jej rozkład zachodził jedynie na podłożu z cytrynianem sodu (w podłożu nr 5) – ryc. 6. W ostatnim terminie pomiaru ubyło jedynie 25% symazyny.

Na szczególną uwagę zasługują dwa kolejne obiekty – nr 22 i nr 8 (odpowiednio materiał z parku w Mścięcinie i materiał z Parku Leśnego Arkońskiego), ponieważ zasiedlały je mikroorganizmy intensywnie biodegradujące symazynę (ryc. 6). W drugim terminie pomiaru (w siódmej dobie) symazyny już prawie nie było – odnotowano jedynie kilka-, kilkanaście procent wartości początkowej. W tych dwóch przypadkach biodegradacja symazyny zachodziła intensywnie zarówno w podłożu z cytrynianem sodu, jak i w podłożu z glukozą (nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości symazyny w tych 2 podłożach). Również wyjątkowo (jedyny taki przypadek w doświadczeniu) w hodowli w podłożu z peptonem (w podłożu nr 7) mikroorganizmy z obiektu nr 22 wykorzystywały symazynę; w drugim terminie pomiaru było jej mniej o ok. 25% (ryc. 6).

W płynnym podłożu hodowlanym z cytrynianem sodu i w podłożu z glukozą odnotowano ubytek symazyny (ryc. 6), ponieważ była ona biodegradowana przez mikroorganizmy



Ryc. 6. Biodegradacja symazyny przez mikroorganizmy zasiedlające 7 obiektów. Podłoże: nr 5 – z cytrynianem sodu, nr 6 – z glukozą, nr 7 – z glukozą, peptonem. Skład podłoża zob. w tab. 4–6. Opis obiektów 1, 4, 22, 8, 10, 14, 9 zob. tab. 11

z obiektu nr 10 (z materiału z Krzekowa). Podłoże z cytrynianem sodu (podłoże nr 5) „odpowiadało” mikroorganizmom biodegradującym symazynę, ponieważ już po 7 dobach było jej mniej o ok. 50%, a po 14 dobach – o 65%, w porównaniu z ilością symazyny w pierwszej dobie.

Mikroorganizmy z obiektu nr 14 (z gliny lekkiej pobranej z Przeclawia) maksymalnie o 47% zmniejszyły ilość symazyny w czternastodniowej hodowli w podłożu z cytrynianem sodu (w podłożu nr 5). W podłożu z glukozą (nr 6) nastąpiła redukcja zawartości symazyny o 32% (ryc. 6).

Biodegradacja symazyny przez mikroorganizmy z obiektu nr 9 (z materiału pobranego w parku Kasprowicza) w podłożu z cytrynianem sodu (w podłożu nr 5) już po pierwszym tygodniu doprowadziła do zmniejszenia zawartości tej substancji prawie o 60%; w następnym terminie było już tylko 16% jej początkowej ilości. Zawartość symazyny w podłożu z glukozą też stopniowo malała – w siódmej dobie było jej mniej o 35%, a w ostatnim terminie pomiaru – już o 52%.

Porównując wyniki 2 eksperymentów, dotyczących wykrywania obecności mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny (zob. rozdział 4.2.1) i wpływu symazyny na liczebność bakterii i grzybów (zob. rozdziały 4.1.1 i 4.1.2), stwierdzono, że obiekty z odpornymi na symazynę mikroorganizmami nie zawsze zawierały mikroorganizmy biodegradujące tę substancję (tab. 11). Jedynie 2 obiekty spośród 7 (nr 10 i nr 4), ze stwierdzoną obecnością mikroorganizmów biodegradujących, wykazywały jednocześnie obecność bakterii i grzybów odpornych, niepoddających się działaniu symazyny lub stymulowanych do wzrostu i aktywności metabolicznej przez tę substancję. Jedynie w 2 obiektach spośród 7 (w obiektach nr 1 i nr 8) były obecne mikroorganizmy biodegradujące symazynę, ale jednocześnie wrażliwe na tę substancję zastosowaną w największej dawce ( $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) – tab. 11. Można wskazać też obiekty, które zawierały bakterie i grzyby odporne, a nawet stymulowane przez symazynę do wzrostu i oddychania, ale jednocześnie niezdolne do jej biodegradacji (np. mikroorganizmy z obiektów 19, 27, 3).

Siedem obiektów (1, 4, 8, 9, 10, 14, 22), które charakteryzowały się obecnością mikroorganizmów biodegradujących symazynę, zawierało różną ilość substancji organicznej (od  $20,3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  w obiekcie nr 22 do  $185,8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  w obiekcie nr 9). Nie zaobserwowano, by mikroorganizmy zdolne do biodegradacji symazyny „preferowały” obiekty o określonej zawartości substancji organicznej, ponieważ nie wykryto ich obecności ani w obiektach z najmniejszą, ani w obiektach z największą jej zawartością (tab. 11).

W każdej dzielnicy miasta Szczecina wytypowano kilka miejsc pobierania próbek, jednak nie ustalono, by któraś lokalizacja zapewniała mikroorganizmom odporność na symazynę czy zdolność do jej biodegradacji. W toku badań okazało się, że w każdej dzielnicy Szczecina (i poza miastem) wykrywano obecność mikroorganizmów biodegradujących i/lub odpornych (wrażliwych) na symazynę. Wyniki wskazują, że odległość między miejscami pobierania próbek (lokalizacja) nie miała wpływu na obecność mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny. W przypadku blisko położonych od siebie obiektów – o kilka, kilkanaście metrów (np. w przypadku obiektów 14, 16 oraz 1, 2), różniących się sposobem użytkowania, w jednym z nich stwierdzano obecność mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny, a w drugim nie. Ten fakt wskazuje na ważną rolę sposobu użytkowania gleb w kształtowaniu składu mikrobiocenozy i jej właściwości.

#### 4.2.2. Liczebność mikroorganizmów biodegradujących symazynę w różnych matrycach środowiskowych

Po inkubacji mikroorganizmów w podłożach płynnych (nr 5, 6, 7), zawierających glukozę lub cytrynian sodu oraz symazynę lub symazynę i pepton (zob. rozdz. 4.2.1), wykorzystano te podłoża w wersjach zestalonych agarem (podłoża nr 8, 9, 10) do oceny liczebności mikroorganizmów (w jtk). Podłoże nr 11, zawierające glukozę, ale bez symazyny i innego źródła azotu, włączono do badań w celu sprawdzenia zdolności izolatów do diazotrofii.

Generalnie najwięcej mikroorganizmów wyhodowano na podłożu zawierającym pepton (nr 10) – tab. 15. Jednak to nie ono (w wersji płynnej) najbardziej nadawało się do biodegradacji symazyny. Podłoże płynne z cytrynianem sodu (podłoże nr 5) okazało się najlepsze do przeprowadzania biodegradacji symazyny (ryc. 6).

Tabela 15. Liczebność mikroorganizmów inkubowanych na podłożach zawierających różne źródła węgla i azotu ( $\cdot 10^2$  jtk $\cdot$ g $^{-1}$ )

Numer obiektu	Numer podłoża mikrobiologicznego			
	8	9	10	11
1	181,1 c	390,7 b	13172,8 a	0,0 d
4	117,3 b	33,2 c	25698,3 a	0,0 d
22	12,7 c	48,0 b	1581,9 a	13,5 c
8	481,5 c	650,5 b	101721,9 a	357,1 d
10	0,0 b	0,0 b	5241,0 a	0,0 b
14	0,0 a	0,0 a	88,0 a	0,0 a
9	1,7 b	1,3 b	9766,0 a	0,0 c

Wartości liczbowe w wierszach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie według testu Tukeya, przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Obiekty: 1 – glina piaszczysta z Przęsocina, 4 – glina piaszczysta z Siadła Dolnego, 22 – materiał z parku w Mścięcinie, 8 – materiał z Parku Leśnego Arkońskiego, 10 – materiał z Krzekowa, 14 – glina lekka z Przeclawia, 9 – materiał z parku Kasprowicza. Podłoża: nr 8 – z cytrynianem sodu (tab. 7), nr 9 – z glukozą (tab. 8), nr 10 – z glukozą i peptonem (tab. 9), nr 11 – bez źródła azotu (tab. 10).

Mikroorganizmy z obiektu nr 1 (z gliny piaszczystej z Przęsocina) bez źródła azotu w podłożu hodowanym (w podłożu nr 11) nie rosły, w związku z czym można stwierdzić, że nie były zdolne do diazotrofii. Po wprowadzeniu symazyny do podłoża (nr 9) wyhodowano bakterie w ilości około 40 tys. jtk $\cdot$ g $^{-1}$ . Również na podłożu z cytrynianem sodu (nr 8) odnotowano ich obecność – nieco ponad 18 tys. jtk $\cdot$ g $^{-1}$  (tab. 15). Wzrost mikroorganizmów na podłożach z symazyną jako jedynym źródłem azotu (na podłożach nr 8 i nr 9) i brak wzrostu na podłożu bez dodanego źródła azotu (na podłożu nr 11) wskazuje na zdolność tych mikroorganizmów do biodegradacji symazyny. Jeszcze więcej mikroorganizmów z tego obiektu (ok. 1,3 mln jtk $\cdot$ g $^{-1}$ ) pojawiło się na podłożu nr 10, gdy źródło azotu uzupełniono peptonem, jednak prawdopodobnie nie były to mikroorganizmy wykorzystujące tylko symazynę (tab. 15).

Również w obiekcie nr 4 (w glinie piaszczystej z nabrzeża Odry – z Siadła Dolnego), nie odnotowano obecności mikroorganizmów zdolnych do wzrostu na podłożu nr 11, tj. na podłożu bez dodanego źródła azotu. Natomiast po dodaniu do podłoża źródła węgla w postaci glukozy (podłoże nr 9) lub cytrynianu sodu (podłoże nr 8) liczba bakterii zwiększyła się odpowiednio do ok. 3,3 i ok. 12 tys. jtk $\cdot$ g $^{-1}$ . Liczba mikroorganizmów, hodowanych na podłożu

z glukozą i peptonem (nr 10), wielokrotnie się zwiększyła, w porównaniu z ich liczebnością na podłożach z symazyną jako jedynym źródłem azotu – było ich ok. 2,5 mln. jtk·g<sup>-1</sup>.

W obiektach nr 22 i nr 8 (odpowiednio w materiale z parku w Mścięcinnie i z Parku Leśnego Arkońskiego) stwierdzono obecność bakterii asymilujących azot cząsteczkowy z powietrza. Na podłożu bez źródła azotu (na podłożu nr 11) wyrosło bakterii około 1,3 tys. jtk·g<sup>-1</sup> (z obiektu nr 22) oraz 36 tys. jtk·g<sup>-1</sup> (z obiektu nr 8). W obiekcie nr 22 bakterii biodegradujących symazynę było kilka razy więcej na podłożu z glukozą niż na podłożu z cytrynianem sodu (tab. 15). Podobne spostrzeżenia dotyczą hodowli mikroorganizmów pochodzących z obiektu nr 8. Bardzo dużo bakterii z obiektu nr 8 wyhodowano na podłożu z peptonem (nr 10) – ponad 10 mln. jtk·g<sup>-1</sup>. Zdolność mikroorganizmów do wzrostu na podłożu bez azotu (na podłożu nr 11) może sugerować, że – mimo wzrostu na podłożach z symazyną (na podłożach nr 8 i nr 9) – mogły one korzystać z azotu atmosferycznego, a nie z symazyny. Jednak w płynnych odpowiednikach podłoży hodowlanych z cytrynianem sodu lub glukozą (w podłożu nr 5 i nr 6) odnotowano ubytek symazyny, mimo że tu również drobnoustroje te mogły korzystać z azotu atmosferycznego (zob. rozdz. 4.2.1). Ze względu na efektywność procesu biodegradacji symazyny, przeprowadzanego przez mikroorganizmy z obiektów nr 22 i nr 8, wytypowano je do dalszych badań.

Mikroorganizmy (bakterie) z obiektu nr 10 (z materiału z Krzekowa) pojawiły się jedynie na podłożu z peptonem (na pożywce nr 10) – w ilości nieco ponad 500 tys. jtk·g<sup>-1</sup>. Nie zaobserwowano ani jednej kolonii na innych pożywkach (tab. 15), mimo że w odpowiednikach tych podłoży w wersji płynnej (zob. rozdz. 4.2.1) biodegradacja symazyny zachodziła (ryc. 6). Mikroorganizmy pochodzące z obiektu nr 14 (z próbki gliny lekkiej z Przeclawia) również nie rosły na podłożach zestalonych agarem, oprócz podłoża z peptonem (nr 10), na którym wyhodowano ich prawie 9 tys. jtk·g<sup>-1</sup> (tab. 15).

Wśród mikroorganizmów wyizolowanych z obiektu nr 9 (z materiału z parku Kasprowicza), oprócz kolonii bakterii, również drożdże były obecne na podłożu z peptonem i glukozą (na pożywce nr 10). Nie one jednak powodowały ubytek symazyny z hodowli, ponieważ tylko bakterie wyrosły na podłożach z symazyną i cytrynianem lub glukozą (na podłożach nr 8 i nr 9). Sto siedemdziesiąt jednostek tworzących kolonie w gramie gleby stwierdzono, hodując mikroorganizmy na podłożu z cytrynianem sodu, a o kilkadziesiąt jednostek mniej na podłożu z glukozą. Prawie milion kolonii odnotowano na podłożu z peptonem i glukozą (nr 10). Nie wykryto obecności asymilatorów azotu cząsteczkowego (tab. 15).

### **4.2.3. Efektywność biodegradacji symazyny przeprowadzanej przez inokulaty jedno-, dwu- i wieloszczepowe**

Spośród 7 obiektów ze stwierdzoną obecnością mikroorganizmów biodegradujących symazynę (zob. rozdz. 4.2.1) wybrano te obiekty, które zawierały najskuteczniejsze (najszybsze) w biodegradacji symazyny drobnoustroje. Były to dwa obiekty – nr 22, tj. materiał z parku w Mścięcinnie, i obiekt nr 8, tj. materiał z Parku Leśnego Arkońskiego. W obu przypadkach materiał był utworzony z gleb i zalegających na nich warstw organicznych (O).

Z obiektu nr 22 wyizolowano 5 szczepów bakterii należących do gatunków: *Variovorax paradoxus*, *Rhodococcus ruber*, *Ensifer adhaerens*, *Pseudoxanthomonas mexicana* i *Arthrobacter* sp. Z obiektu nr 8 wyizolowano: *Pseudomonas reinekei*, *Chryseobacterium indologenes*, *Stenotrophomonas* sp.

Nie wszystkie szczepy bakterii były zdolne do samodzielnej i/lub skutecznej biodegradacji symazyny. W niektórych przypadkach pomocna dla bakterii biodegradującej była obecność innego szczepu bakterii (tab. 16). Jednak w przypadku obiektu nr 22 szczepem odpowiedzialnym za biodegradację był szczep *Arthrobacter* sp. X-4, natomiast spośród izolatów z obiektu nr 8 – szczep CK6, zidentyfikowany jako *Stenotrophomonas* sp. (tab. 17).

Porównując przebieg biodegradacji symazyny, przeprowadzanej przez najefektywniejsze wersje inokulatów z dwóch obiektów (nr 22 i nr 8), stwierdzono, że wersja dwuskładnikowa inokulum – *Arthrobacter* sp. i *Pseudoxanthomonas mexicana* – szybciej i skuteczniej biodegradowała symazynę niż *Stenotrophomonas* sp. (tab. 16, 17; ryc. 7–13). W pierwszym przypadku, w trzeciej dobie hodowli, stwierdzono jedynie kilka miligramów symazyny w podłożu w tym samym czasie w hodowli ze *Stenotrophomonas* sp. było jej jeszcze ok. 25 mg·dm<sup>-3</sup>.

Tabela 16. Końcowy efekt biodegradacji symazyny przeprowadzanej przez izolaty mikroorganizmów pozyskane z parku w Mścięcinnie (z obiektu nr 22)

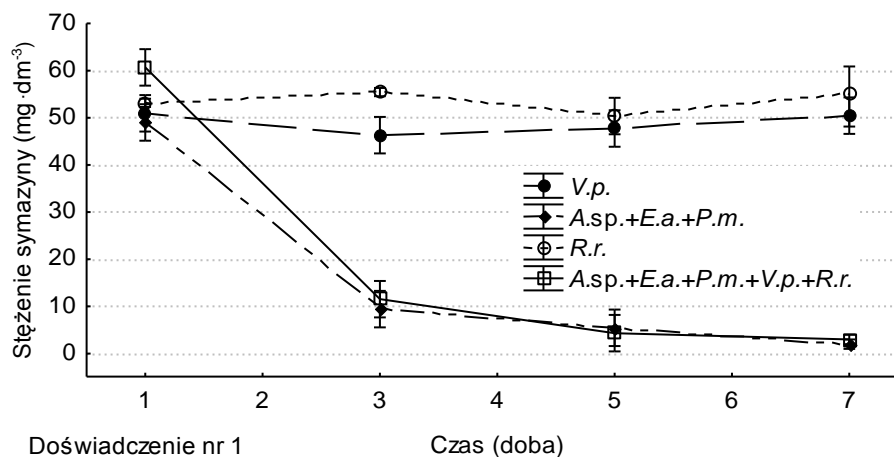
Numer doświadczenia	Warianty inokulatu									
	V.p.	A.sp.	R.r.	E.a.	P.m.	E.a. P.m. A.sp.	V.p. R.r. E.a. P.m. A.sp.	E.a. A.sp.	P.m. A.sp.	hodowla mieszana
1	-	/	-	/	/	△ +++	+++ ▽	/	/	/
2	/	▽+	/	-	-	△ +++	/	/	/	/
3	/	▽+	/	/	/	△ +++	/	/	/	△+++
4	/	▽+	/	/	/	△ +++	/	▽+	△ +++	/
5	/	▽+	/	/	/	/	/	/	△ +++	△+++

V.p. – *Variovorax paradoxus*, A.sp. – *Arthrobacter* sp., R.r. – *Rhodococcus ruber*, E.a. – *Ensifer adhaerens*, P.m. – *Pseudoxanthomonas mexicana*. + – ubytek symazyny do 30% początkowej ilości, +++ – ubytek symazyny wynoszący ponad 90% początkowej ilości, – – brak ubytku symazyny. △ – obecność CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub> w hodowli, ▽ – brak CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub> w hodowli.

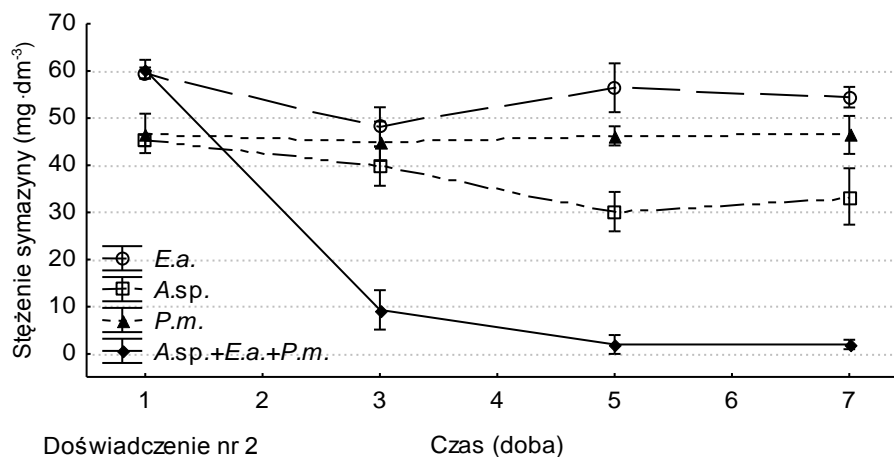
Tabela 17. Końcowy efekt biodegradacji symazyny przeprowadzanej przez izolaty mikroorganizmów pozyskane z Parku Leśnego Arkońskiego (z obiektu nr 8)

Numer doświadczenia	Warianty inokulatu						hodowla macierzysta
	P.r.	Ch.i.	S.sp.	S.sp. P.r.	S.sp. Ch.i.	S.sp. Ch.i. P.r.	
6	-	-	+++▽	/	/	/	+++▽
7	/	/	+++▽	+++▽	+++▽	+++▽	/

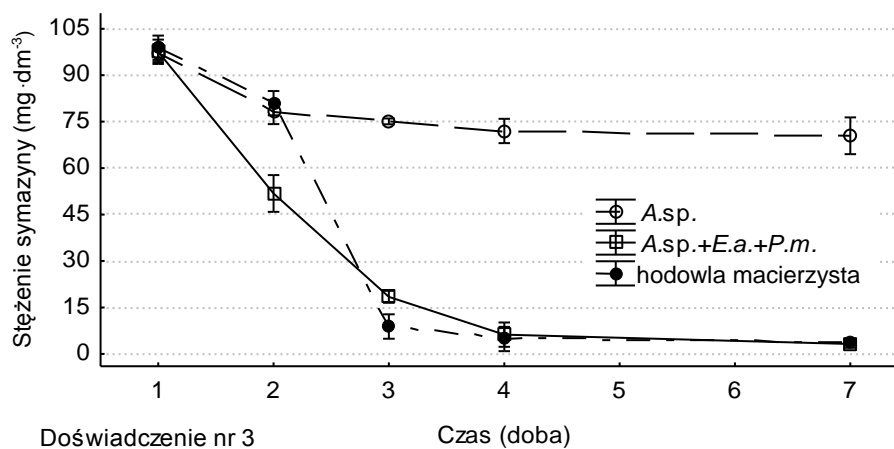
P.r. – *Pseudomonas reinekei*, Ch.i. – *Chryseobacterium indologenes*, S.sp. – *Stenotrophomonas* sp. +++ – ubytek symazyny wynoszący ponad 90% początkowej ilości, – – brak ubytku symazyny. ▽ – brak CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub> w hodowli.



Ryc. 7. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *V.p.* – *Variovorax paradoxus*, *A.sp.* – *Arthrobacter sp.*, *E.a.* – *Ensifer adhaerens*, *P.m.* – *Pseudoxanthomonas mexicana*, *R.r.* – *Rhodococcus ruber*, *E.a.* – *Ensifer adhaerens*

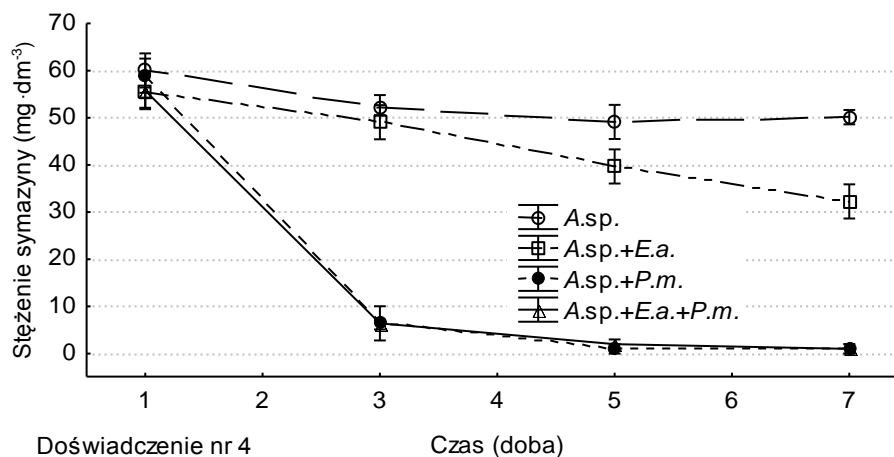


Ryc. 8. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *A.sp.* – *Arthrobacter sp.*, *E.a.* – *Ensifer adhaerens*, *P.m.* – *Pseudoxanthomonas mexicana*

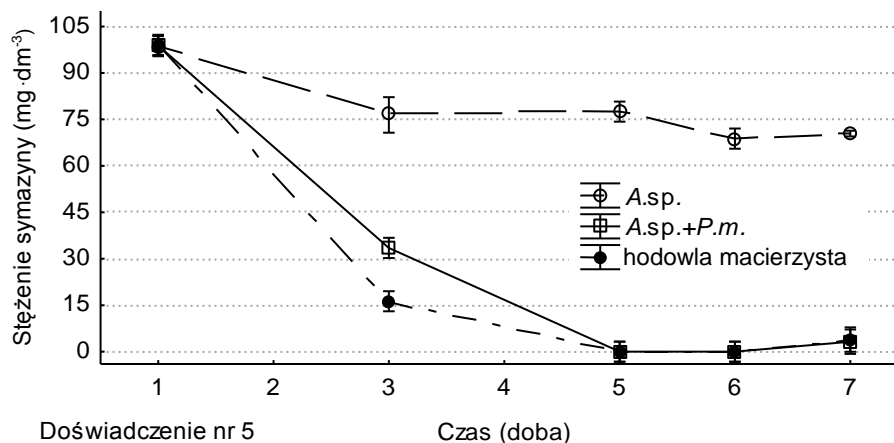


Ryc. 9. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *A.sp.* – *Arthrobacter sp.*, *E.a.* – *Ensifer adhaerens*, *P.m.* – *Pseudoxanthomonas mexicana*

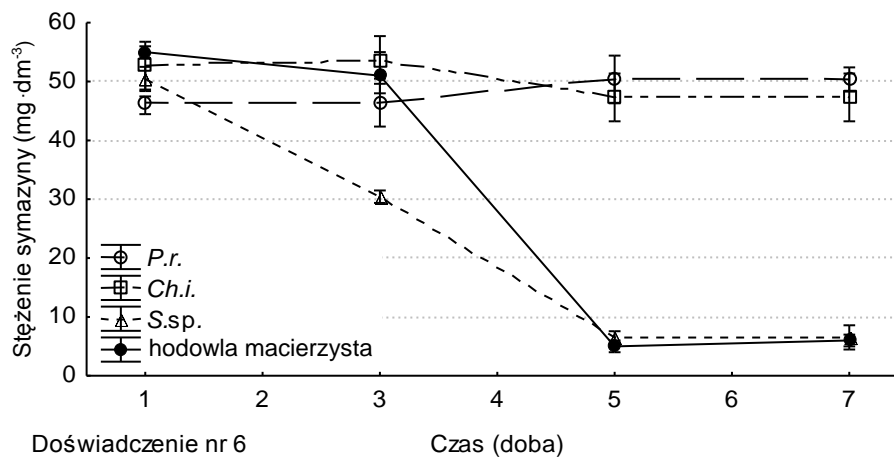




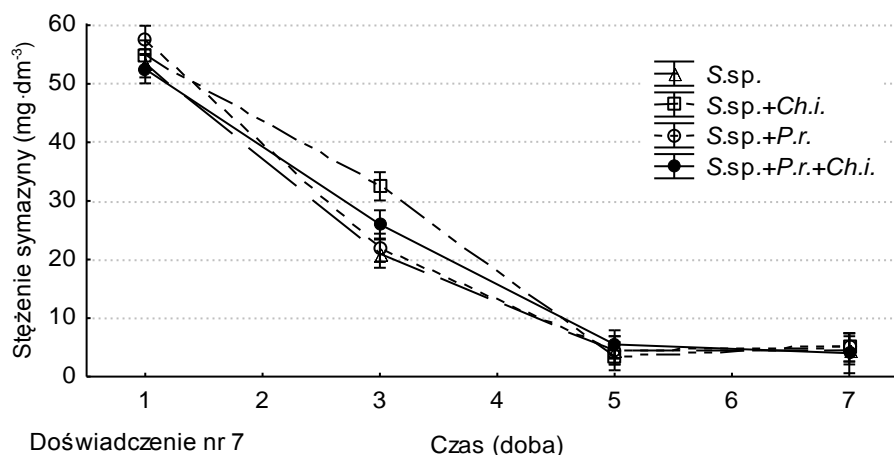
Ryc. 10. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *A.sp.* – *Arthrobacter sp.*, *E.a.* – *Ensifer adhaerens*, *P.m.* – *Pseudoxanthomonas mexicana*



Ryc. 11. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *A.sp.* – *Arthrobacter sp.*, *E.a.* – *Ensifer adhaerens*, *P.m.* – *Pseudoxanthomonas mexicana*



Ryc. 12. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *P.r.* – *Pseudomonas reinekei*, *Ch.i.* – *Chryseobacterium indologenes*, *S.sp.* – *Stenotrophomonas sp.*



Ryc. 13. Efektywność inokulatów w biodegradacji symazyny. *P.r.* – *Pseudomonas reinekei*, *Ch.i.* – *Chryseobacterium indologenes*, *S.sp.* – *Stenotrophomonas sp.*

Spośród bakterii wyizolowanych z obiektu nr 22 żaden szczep samodzielnie nie był zdolny do skutecznej biodegradacji symazyny. Na szczególną uwagę zasługują wyniki dotyczące biodegradacji symazyny przeprowadzanej przez *Arthrobacter sp.* Wprowadzając do podłoża z cytrynianem sodu (nr 5) inokulat jednoskładnikowy zawierający tę bakterię, nie zawsze stwierdzano statystycznie istotny ubytek symazyny (ryc. 8, 9). Jednak bez tej bakterii biodegradacja symazyny w żadnym doświadczeniu nie przebiegała (ryc. 7–11). Wydaje się, że obecność szczepu bakterii należącego do gatunku *Pseudoxanthomonas mexicana* warunkowała skuteczność biodegradacji przeprowadzanej przez *Arthrobacter sp.* W doświadczeniach, w których te 2 szczepy występowały w inokulancie (w wersji dwu-, lub wieloskładnikowej), zawsze zachodziła biodegradacja symazyny (ryc. 7–11). Potwierdzeniem głównej roli *Arthrobacter sp.* i *Pseudoxanthomonas mexicana* w biodegradacji jest kontynuacja doświadczenia nr 4 (ryc. 10), w którym do tygodniowej hodowli z jednoskładnikowym inokulantem z *Arthrobacter sp.* (bez znacznego ubytku symazyny w podłożu) wprowadzono bakterie *Pseudoxanthomonas mexicana*; już po dobie ponad 90% symazyny uległo biodegradacji. Niewykluczone, że szczep bakterii *Arthrobacter sp.* rozkładał częściowo symazynę, a szczep *Pseudoxanthomonas mexicana* kontynuował proces poprzez mineralizację produktów rozkładu symazyny (obecność CO<sub>2</sub> i NH<sub>3</sub>). Możliwe też jest to, że wydzielane przez *P. mexicana* substancje aktywujące uruchomiły mechanizm rozkładu symazyny przez *Arthrobacter sp.* Jednak przeprowadzone doświadczenie nie potwierdza tego jednoznacznie. Zwraca uwagę to, że po zastosowaniu wariantu inokulum pięcioskładnikowego (*Variovorax paradoxus*, *Arthrobacter sp.*, *Rhodococcus ruber*, *Ensifer adhaerens*, *Pseudoxanthomonas mexicana*) nie odnotowano mineralizacji symazyny (tab. 16).

Ciekawe wyniki otrzymano, porównując biodegradację symazyny przeprowadzaną przez inokulaty jedno-, dwu-, kilkuskładnikowe (pozyskane z obiektu nr 22) z biodegradacją przeprowadzaną przez mikroorganizmy z hodowli macierzystej (pozyskanej z zawiesiny glebowej z obiektu nr 22) – ryc. 9, 11. W hodowli macierzystej (zawierającej oprócz bakterii również pierwotniaki należące do rodzaju *Hyperamoeba*) przez pierwszą dobę ubyło jedynie kilkanaście miligramów symazyny (niecałe 20% ilości początkowej). W porównaniu z biodegradacją przeprowadzaną przez bakterie: *Arthrobacter sp.*, *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Ensifer adhaerens* (które w tym samym czasie rozłożyły ok. 50% początkowej ilości symazyny) była

to niewielka ilość (ryc. 9). Jednak w trzeciej dobie okazało się, że w hodowli macierzystej jest symazyny niecałe  $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a w hodowli trójskładnikowej (*Arthrobacter* sp., *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Ensifer adhaerens*) – jeszcze ok.  $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W tych dwóch doświadczeniach (ryc. 9 i ryc. 11) zastosowana czysta kultura bakteryjna *Arthrobacter* sp. w niewielkim stopniu rozłożyła symazynę (jedynie w ok. 30%).

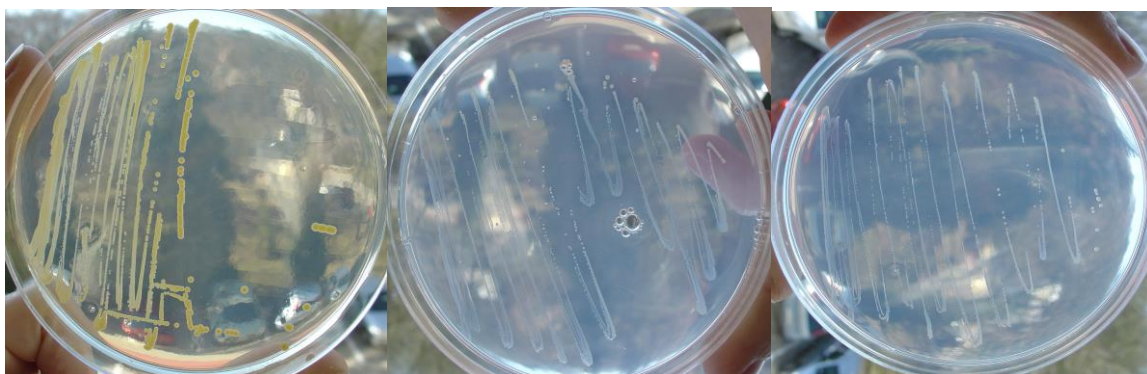
W pierwszym doświadczeniu (ryc. 7) nie zastosowano inokulatu jednoskładnikowego z *Arthrobacter* sp., wbrew pierwotnym założeniom. Po identyfikacji genetycznej okazało się, że hodowla, w której ubyło ok. 90% symazyny, uważana za monokulturową, jest niejednorodna. Oprócz *Arthrobacter* sp. były obecne w niej jeszcze *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Ensifer adhaerens*. Bardzo trudno było rozdzielić te szczepy bakteryjne. Dopiero po kilku pasażach i posiewach redukcyjnych otrzymano czyste kultury bakteryjne należące do podanych wyżej gatunków. Nie stwierdzono wpływu na biodegradację symazyny wyizolowanych z hodowli macierzystej szczepów *Variovorax paradoxus* i *Rhodococcus ruber*, które również same nie były zdolne do jej biodegradacji (ryc. 7).

W drugim doświadczeniu (ryc. 8) analizowano zdolność do biodegradacji symazyny 2 szczepów, tj. *Pseudoxanthomonas mexicana* i *Ensifer adhaerens*, związanych z *Arthrobacter* sp. Okazało się, że te dwa szczepy zastosowane pojedynczo nie są zdolne do jej biodegradacji. W tym doświadczeniu, wyjątkowo, bakterie szczepu X-4 *Arthrobacter* sp. (zawarte w inokulacie jednoskładnikowym) przeprowadzały wydajną biodegradację symazyny. W kolejnych 3 doświadczeniach nie potwierdzono zdolności *Arthrobacter* sp. do samodzielnej biodegradacji symazyny.

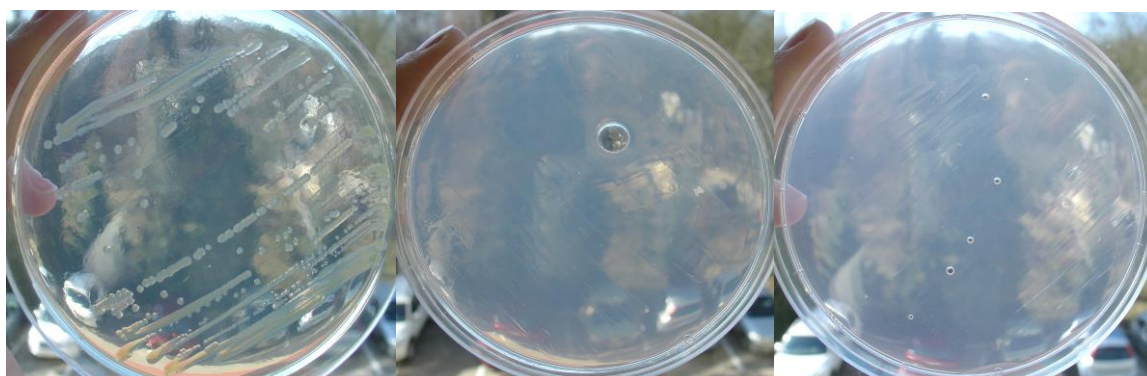
W czwartym doświadczeniu (ryc. 10) oceniano zdolność do biodegradacji symazyny szczepów należących do *Pseudoxanthomonas mexicana* i *Ensifer adhaerens* – bakterii izolowanych z macierzystej hodowli mieszanej wraz z *Arthrobacter* sp. Okazało się, że bakterie z gatunku *Pseudoxanthomonas mexicana* aktywują *Arthrobacter* sp. do przeprowadzenia biodegradacji. Ta dwuskładnikowa wersja inokulatu już w trzeciej dobie przyczyniła się do prawie 90-procentowego ubytku symazyny z podłoża. Szczep *Ensifer adhaerens* też stymulował *Arthrobacter* sp. do biodegradacji, jednak w mniejszym stopniu. Po zastosowaniu tej dwuskładnikowej szczepionki ostatecznie ubyło z hodowli ok. 40% symazyny. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między zawartością symazyny w hodowlach dwuskładnikowej (*Arthrobacter* sp., *Pseudoxanthomonas mexicana*) i trójskładnikowej (*Arthrobacter* sp., *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Ensifer adhaerens*), co potwierdza brak istotnego oddziaływania *Ensifer adhaerens* na przebieg wspomnianego procesu.

Wśród pozyskanych izolatów z obiektu nr 8 (z piasku gliniastego z Parku Leśnego Arkońskiego) szczep bakterii CK6 *Stenotrophomonas* sp. samodzielnie biodegradował symazynę (ryc. 12, 13). Natomiast *Stenotrophomonas* sp., obecny w hodowli macierzystej, jeszcze w trzeciej dobie nie rozpoczął biodegradacji, ale w piątej dobie było już jedynie kilka miligramów symazyny. Po wzbogaceniu inokulatu jednoskładnikowego *Stenotrophomonas* sp. w inne obecne w hodowli macierzystej szczepy (*Pseudomonas reinekei*, *Chryseobacterium indologenes*) nie stwierdzono zmian w przebiegu biodegradacji (ryc. 13).

Badano zdolność szczepów bakteryjnych do wzrostu na podłożach zestalonych, zawierających: symazynę (na podłożach nr 8 i nr 9), symazynę i pepton (na podłożu nr 10) oraz na podłożu bez dodanego azotu (nr 11). Jedynie *Arthrobacter* sp. i *Stenotrophomonas* sp. były zdolne do wzrostu w 3 wariantach podłoża. Wykonano posiew redukcyjny izolatów na wspomnianych 3 podłożach, co udokumentowano fotografiami (fot. 3–5).



Fot. 3. *Arthrobacter* sp., szczep X-4, inkubowany na podłożu (od lewej): z glukozą, peptonem i symazyną (nr 10), z cytrynianem sodu i symazyną (nr 8), bez dodanego źródła azotu (nr 11)



Fot. 4. Szczep *Pseudoxanthomonas mexicana*, inkubowany na podłożu (od lewej): z glukozą, peptonem i symazyną (nr 10), z cytrynianem sodu i symazyną (nr 8), bez dodanego źródła azotu (nr 11)

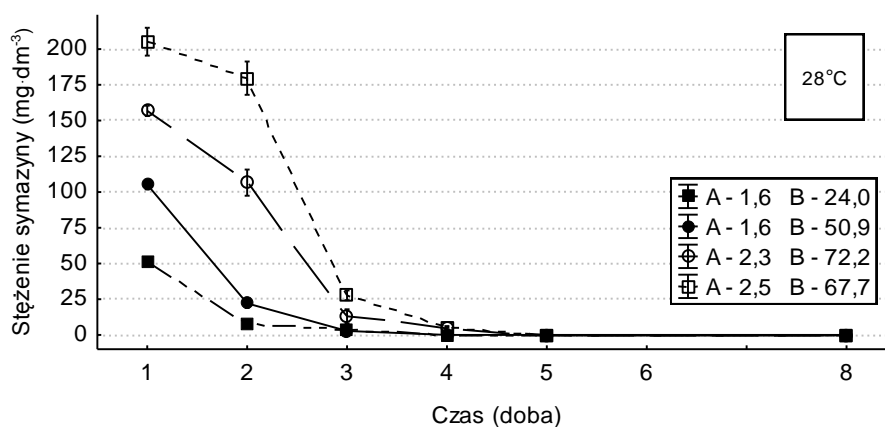


Fot. 5. *Stenotrophomonas* sp., szczep CK6, inkubowany na podłożu (od lewej): z glukozą, peptonem i symazyną (nr 10), z cytrynianem sodu i symazyną (nr 8), bez dodanego źródła azotu (nr 11)

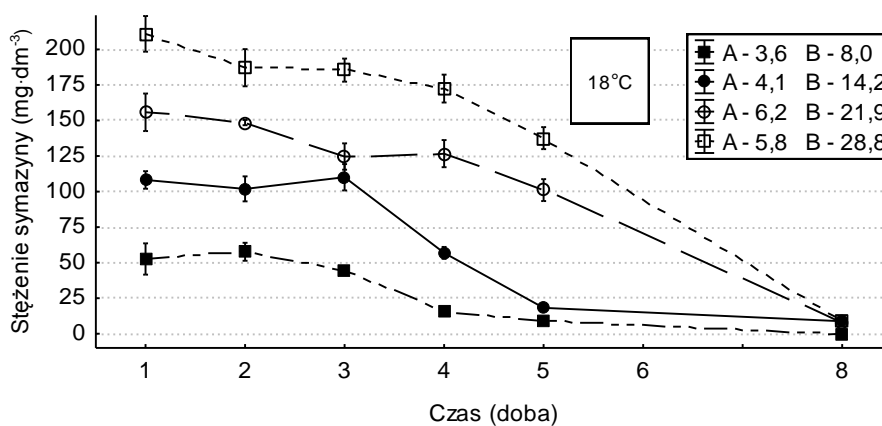
#### 4.2.4. Biodegradacja symazyny przeprowadzana przez wybrane szczepy bakteryjne, w zależności od dawki i temperatury

Zarówno temperatura inkubacji, jak i dawka miały statystycznie istotny wpływ na tempo biodegradacji symazyny (ryc. 14–17). Ogólnie można stwierdzić, że w temperaturze 18°C proces biodegradacji przebiegał wolniej, a w temperaturze 28°C – szybciej. Z porównania wartości parametru półtrwania symazyny w hodowli  $DT_{50}$  wynika, że wzrost temperatury o 10°C miał znacznie większy wpływ na tempo biodegradacji niż zwiększenie dawki symazyny nawet o 150 mg·dm<sup>-3</sup>. Wzrost temperatury o 10°C spowodował przyspieszenie biodegradacji co najmniej o 1,5 doby (w przypadku rozkładu 50 mg·dm<sup>-3</sup> przez *Stenotrophomonas* sp.). Zaobserwowa-

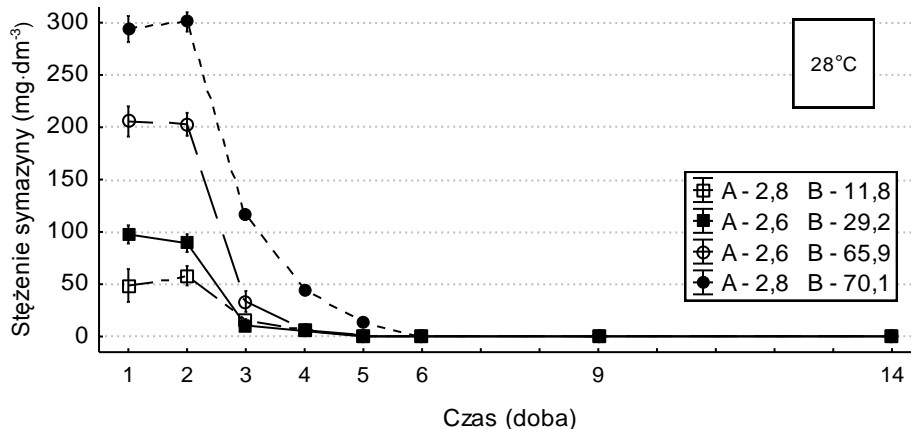
no, że wraz ze zwiększaniem dawki symazyny w hodowli (o 50, 100 mg·dm<sup>-3</sup>) wydłuża się różnica w czasie połowicznego rozkładu symazyny DT<sub>50</sub> pomiędzy hodowlą inkubowaną w temperaturze 18°C a hodowlą inkubowaną w 28°C. Przykładowo 2 doby różnicy w osiągnięciu DT<sub>50</sub> (w hodowli z symazyną w dawce 50 mg·dm<sup>-3</sup>) odnotowano w hodowli z *Arthrobacter* sp. i *P. mexicana* inkubowanej odpowiednio w 18°C i 28°C. Natomiast 2,4 doby różnicy w osiągnięciu czasu połowicznego rozkładu symazyny, wprowadzonej w dawce 100 mg·dm<sup>-3</sup>, odnotowano między hodowlą inkubowaną w 18°C a hodowlą inkubowaną w 28°C. Różnicę 4 doby w osiągnięciu czasu połowicznego rozkładu symazyny wprowadzonej w dawce 150 mg·dm<sup>-3</sup> stwierdzono pomiędzy hodowlą inkubowaną w 18°C a jej odpowiednikiem inkubowanym w temperaturze 28°C. Różnicę 3,3 doby w osiągnięciu czasu połowicznego rozkładu symazyny, wprowadzonej w dawce 200 mg·dm<sup>-3</sup>, odnotowano pomiędzy tą samą hodowlą inkubowaną w temperaturze 18°C a hodowlą inkubowaną w 28°C (ryc. 14, 15). W przypadku *Stenotrophomonas* sp. obserwacja powyżej opisanej zależności była utrudniona, ponieważ bakterie nie rozłożyły 50% symazyny, wprowadzonej do hodowli w dawkach 200 i 300 mg·dm<sup>-3</sup>. Jednak po wprowadzeniu do hodowli mniejszych dawek symazyny różnica w DT<sub>50</sub> zwiększała się w zależności od temperatury – w tym przypadku o 1,5 i o 2 doby (odpowiednio po zastosowaniu symazyny w dawkach 50 i 100 mg·dm<sup>-3</sup>) – ryc. 16, 17.



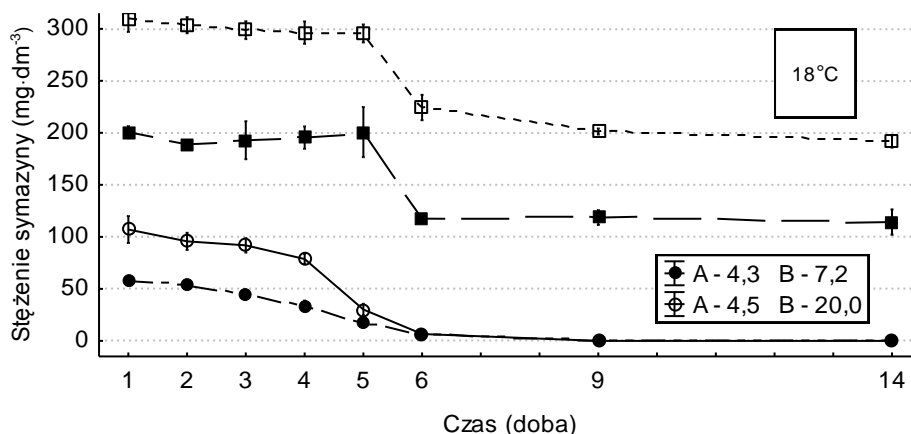
Ryc. 14. Biodegradacja symazyny przeprowadzana w temp. 28°C przez inokulaty z *Arthrobacter* sp. i *Pseudoxanthomonas mexicana*. A – czas połowicznego rozkładu DT<sub>50</sub> (d), B – średnie tempo biodegradacji  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  (mg·dm<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>)



Ryc. 15. Biodegradacja symazyny przeprowadzana w temp. 18°C przez inokulaty z *Arthrobacter* sp. i *Pseudoxanthomonas mexicana*. A – czas połowicznego rozkładu DT<sub>50</sub> (d), B – średnie tempo biodegradacji  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  (mg·dm<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>)



Ryc. 16. Biodegradacja symazyny przeprowadzana w temp. 28°C przez inokulaty ze *Stenotrophomonas* sp. A – czas połowicznego rozkładu  $DT_{50}$  (d), B – średnie tempo biodegradacji  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ )



Ryc. 17. Biodegradacja symazyny przeprowadzana w temp. 18°C przez inokulaty ze *Stenotrophomonas* sp. A – czas połowicznego rozkładu  $DT_{50}$  (d), B – średnie tempo biodegradacji  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ )

Porównując różnice w osiągnięciu czasu połowicznego rozkładu symazyny  $DT_{50}$ , wynikające z wpływu jej dawki, nie stwierdzono tak dużych zmian (lub nie stwierdzono ich wcale) jak pod wpływem temperatury. Zarówno w hodowli z *Arthrobacter* sp. i *P. mexicana*, jak i ze *Stenotrophomonas* sp. zwiększenie dawki symazyny o 50 lub 100  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  zazwyczaj tylko o kilka-kilkanaście godzin wydłużało (a w dwóch przypadkach skracało) czas, w którym następował 50-procentowy rozkład symazyny (ryc. 14–17).

W związku z tym, że zmiany wartości parametru  $DT_{50}$  były stosunkowo niewielkie pod wpływem wzrostu dawki symazyny, wartości średniego tempa biodegradacji symazyny  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  gwałtownie rosły wraz z ilością tej substancji w podłożu, szczególnie w przypadku hodowli *Stenotrophomonas* sp. Natomiast wzrost temperatury o 10°C spowodował kilkukrotne przyspieszenie średniego tempa biodegradacji symazyny  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  – ryc. 14–17.

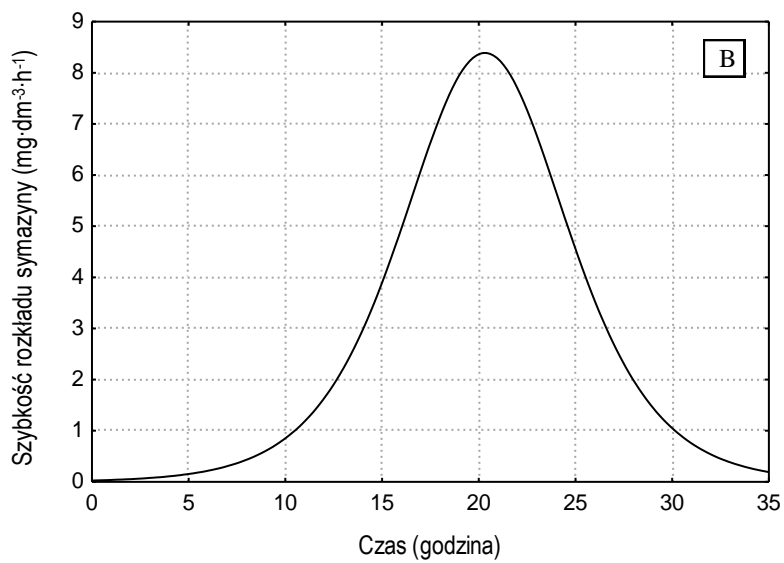
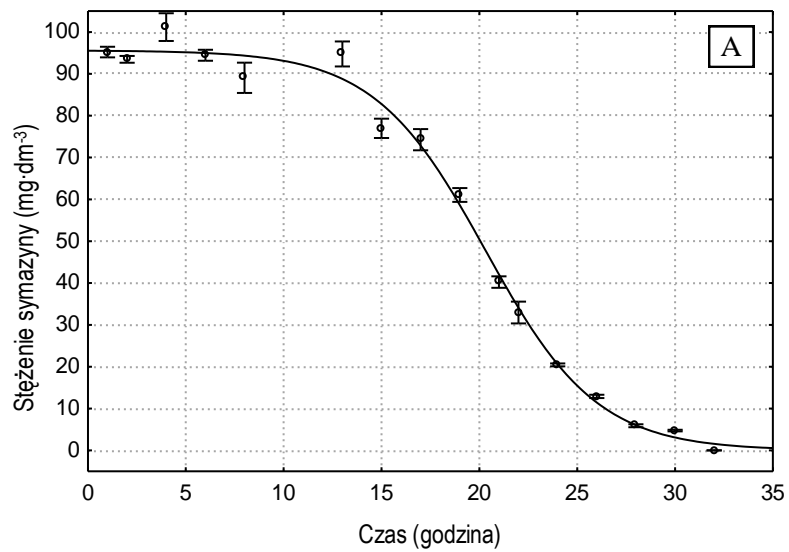
#### 4.2.5. Biodegradacja symazyny przeprowadzana przez wybrane szczepy bakteryjne w hodowli okresowej

Dwa szczepy bakterii, tj. *Arthrobacter* sp. (X-4) i *Pseudoxanthomonas mexicana* (wariant A), zawarte w inokulacie dwuskładnikowym, ponad dwa razy szybciej biodegradowały symazynę niż szczep CK6 *Stenotrophomonas* sp. (wariant B). Bakterie z wariantu A biodegradowały symazynę w średnim tempie, wynoszącym  $3,03 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ , a szczep CK6 *Stenotrophomonas* sp. (wariant B) rozkładał ją zdecydowanie wolniej – średnio o  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  (tab. 18). Jednak w tych dwóch przypadkach biodegradacja zachodziła podobnie, ponieważ krzywe biodegradacji można podzielić na 3 odcinki (ryc. 18, 19). W pierwszej fazie odnotowano zastój procesu (odpowiednik lag-fazy, tylko nieco dłuższy, na krzywej wzrostu populacji bakterii w hodowli okresowej), ponieważ nie następował ubytek symazyny. W pierwszym wariantcie hodowli (A) faza ta trwała przez ok. 10 godzin, w drugiej hodowli (wariant B) – ok. 30 godzin. Kolejna faza to szybki rozkład symazyny, z apogeum tempa biodegradacji, które bakterie osiągnęły, metabolizując połowę początkowej ilości symazyny  $C(DT_{50})$ . Nastąpiło to w 20 godzinie doświadczenia (w przypadku wariantu hodowlanego A) i w 48 godzinie (wariant B) – tab. 18, ryc. 18, 19. Gdy ilość symazyny w hodowli z *Arthrobacter* sp. (X-4) i *Pseudoxanthomonas mexicana* (wariant A) była równa połowie jej początkowej ilości, tempo rozkładu symazyny było najszybsze i wynosiło  $8,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . Natomiast w hodowli ze szczepem *Stenotrophomonas* sp. maksymalne tempo rozkładu symazyny  $[(-dC/dt)(DT_{50})]$  wynosiło  $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . Po tym okresie następowało spowolnienie tempa biodegradacji, aż do wyczerpania symazyny, co w przypadku hodowli z *Arthrobacter* sp. i *P. mexicana* nastąpiło między 30 a 32 godziną doświadczenia, w przypadku szczepu CK6 *Stenotrophomonas* sp. – po 70 godzinie eksperymentu.

Tabela 18. Parametry funkcji logistycznej opisującej biodegradację symazyny: A – przeprowadzaną przez dwuszczepowe inokulum z *Arthrobacter* sp. (X-4) i *Pseudoxanthomonas mexicana*, B – przeprowadzaną przez *Stenotrophomonas* sp.

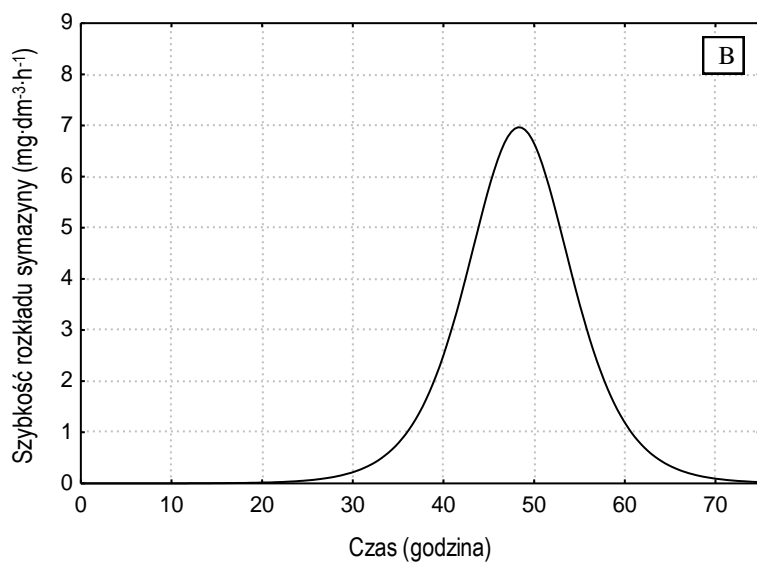
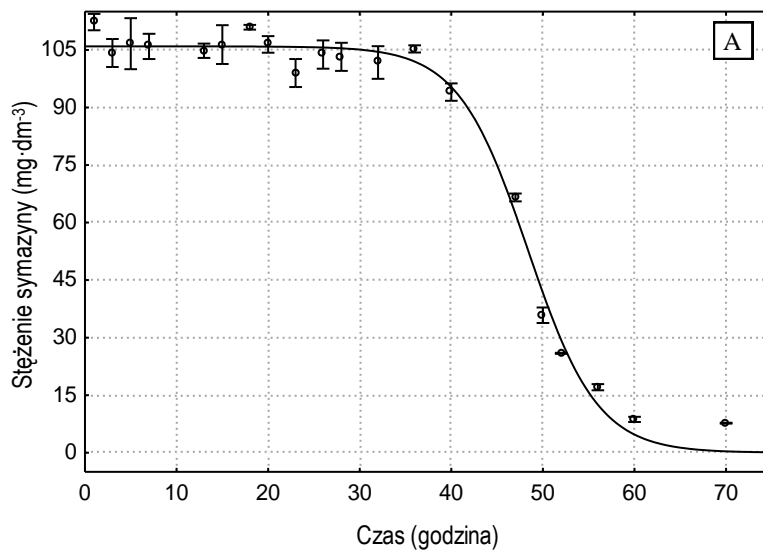
Wariant	$C_0$ ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	$b$	$k$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$DT_{50}$ (h)	$C(DT_{50})$ ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	$-dC/dt$ ( $DT_{50}$ ) ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )	$\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$ ( $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )	$R^2$
A	95,6	$7,98 \cdot 10^{-4}$	0,351	20,3	48,7	8,39	3,03	0,987
B	105,9	$3,03 \cdot 10^{-6}$	0,263	48,4	52,9	6,97	1,52	0,979

$C_0$  – maksymalna wartość stężenia,  $k$  – stała szybkości procesu,  $b$  – stały współczynnik procesu,  $DT_{50}$  – czas połowicznego rozkładu,  $C(DT_{50})$  – stężenie symazyny w czasie połowicznego rozkładu,  $-dC/dt(DT_{50})$  – teoretyczna szybkość rozkładu symazyny w czasie jej połowicznego rozkładu,  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  – średnie tempo biodegradacji,  $R^2$  – współczynnik determinacji.



Ryc. 18. Biodegradacja symazyny przeprowadzana przez inokulum z *Arthrobacter* sp. (X-4) i *Pseudoxanthomonas mexicana*. A – kinetyczna krzywa rozkładu symazyny w hodowli. Symbole obrazują średnie z trzech replikacji i odchylenia standardowe. B – przebieg krzywej szybkości rozkładu symazyny





Ryc. 19. Biodegradacja symazyny przeprowadzana przez szczep CK6 *Stenotrophomonas* sp. A – kinetyczna krzywa rozkładu symazyny w hodowli. Symbole obrazują średnie z trzech replikacji i odchylenia standardowe. B – przebieg krzywej szybkości rozkładu symazyny

## 5. Dyskusja

Po próbach wykrycia w 30 różnych obiektach mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny okazało się, że są one mało rozpowszechnione na terenie Szczecina i okolic. Poszukiwano mikroorganizmów szybko biodegradujących symazynę – takich, które ciągu 2 tygodni zainicjują proces rozkładu tej substancji. Jedynie w przypadku 7 obiektów (próbek gliny piaszczystej z Przęsocina, gliny piaszczystej z Siadła Dolnego, materiału z parku w Mścięcieniu, materiału z Parku Leśnego Arkońskiego, materiału z Krzekowa, gliny lekkiej z Przeclawia, materiału z parku Kasprowicza) mikroorganizmy je zasiedlające, po izolacji i hodowli w warunkach laboratoryjnych, były zdolne do rozkładu symazyny. Większość badaczy (Mandelbaum i in. 1995; Rousseaux i in. 2001; Kolić i in. 2007; Vibber i in. 2007; Marecik i in. 2008) stosuje podłoża mineralne z dodatkiem testowanych ksenobiotyków jako źródłem makroelementów lub/i energii dla mikroorganizmów. Na przykład Kolić i in. (2007), umieszczając czystą kulturę bakteryjną szczepu ATZ2 (*Arthrobacter keyseri*) w podłożu mineralnym jedynie z atrazyną ( $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), po niecałych 40 godzinach stwierdzili brak atrazyny w tym podłożu, natomiast odnotowali pojawienie się w nim metabolitów jej rozkładu (hydroksyatrazyny i kwasu cyjanurowego). W niniejszych badaniach zastosowano 3 podłoża, w których – oprócz związków mineralnych – umieszczono związki organiczne. Źródłami węgla były cytrynian sodu i symazyna lub glukoza i symazyna, a źródłami azotu – sama symazyna lub symazyna i pepton. We wcześniejszych badaniach własnych (Błaszak i in. 2011) nie potwierdzono przydatności podłoża tylko z symazyną jako źródłem azotu i węgla do biodegradacji tej substancji.

Znany jest fakt nietolerowania warunków laboratoryjnych przez mikroorganizmy środowiskowe, ponieważ jedynie nikły procent całej mikrobiocenozy gleby jest w stanie wzrastać na podłożach mikrobiologicznych (Błaszczuk 2009). Dlatego zastosowanie metod pośrednich (hodowlanych) nie odzwierciedla rzeczywistej liczby mikroorganizmów w matrycach środowiskowych. Wyniki genetycznej analizy rRNA w glebach dowodzą, że mikroorganizmów jest o kilka rzędów wielkości więcej, niż wynika to z badań metodami pośrednimi. Jednak w przypadku, gdy celem badań jest nie ustalenie rzeczywistej liczby mikroorganizmów w obiektach, a ocena wpływu ksenobiotyków, metody pośrednie (hodowlane) są niezastąpione, ponieważ uwzględniają jedynie żywe mikroorganizmy. Natomiast w wielu metodach bezpośrednich nie ma możliwości weryfikacji żywotności mikroorganizmów. Przydatność metod hodowlanych do oceny wpływu danego czynnika na mikroorganizmy oznacza również możliwość dokładnego określenia stopnia zmian (np. w procentach), jakie on wywołuje. Dlatego w przedstawianych badaniach wykorzystano do oceny wpływu symazyny na mikroorganizmy zasiedlające różne matryce środowiskowe metody hodowlane.

Zapewniając wszystkim mikroorganizmom danego biotopu kontakt z zanieczyszczeniem, wielu autorów (Entry i in. 1996; Widrig i in. 1997; Alexander 1999; Arthur i in. 2000) przeprowadza badania dotyczące biodegradacji ksenobiotyków w materiale glebowym lub stwarza im warunki podobne do środowiskowych (np. kompostowanie, landfarming, biopiling). Porównując tempo biodegradacji zachodzącej w miejscu skażenia (*in situ*) i w warunkach laboratoryjnych (*ex situ*), stwierdzono, że zdecydowanie szybciej biodegradacja zachodzi w podłożach

mikrobiologicznych niż bezpośrednio w glebie czy kompoście. Na przykład Kodama i in. (2001) wyizolowali z gleby szczep bakteryjny należący do gatunku *Moraxella ovis*, który w podłożu hodowlanym rozłożył symazynę i atrazynę ( $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) prawie całkowicie w ciągu 5 dób. Jednocześnie cytowani autorzy badali grzyby należące do rodzaju *Penicillium*, które w tym samym czasie rozłożyły symazynę w ok. 50 procentach, w odniesieniu do jej początkowej ilości. *Arthrobacter aureescens*, szczep TC1, wykorzystał atrazynę jako źródło azotu i węgla. Aż  $3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  atrazyny, umieszczonej w mineralnym płynnym podłożu, w ciągu 7 dób uległo biodegradacji (Strong i in. 2002). Tymczasem degradacja symazyny (atrazyny) w glebie przebiega, w zależności od typu gleby, w ciągu kilkudziesięciu–kilkuset dni ( $\text{DT}_{50}$ ) i to częściowo (Nowak 1995; Barra-Caracciolo i in. 2005; Przybulewska i Sienicka 2008; Gregorczyk i Swarcewicz 2012). Możliwe, że mikroorganizmy, mając w glebie zapas makroelementów i substratów potrzebnych do procesów energetycznych, nie są „zainteresowane” eksploatacją substancji nieznanych czy występujących w małych stężeniach (Barriuso i in. 1997; Govantes i in. 2009).

W badaniach własnych testowano przydatność podłoży z różnymi źródłami węgla i azotu. Jako źródło azotu stosowano symazynę i/lub pepton, natomiast jako źródło węgla – cytrynian sodu lub glukozę. Stwierdzono, że obecność w podłożu hodowlanym innego organicznego źródła azotu (w tym przypadku peptonu) hamuje proces biodegradacji symazyny, ponieważ we wszystkich 7 przypadkach (we wszystkich obiektach o stwierdzonej obecności mikroorganizmów biodegradujących) rozkład nie następował lub zachodził w małym zakresie. Mniej efektywna była biodegradacja symazyny, gdy wprowadzonym źródłem węgla była glukoza, a nie cytrynian sodu. Jednak w tym wypadku nie doszło do znacznego spowolnienia tempa biodegradacji, co wskazuje na wykorzystywanie głównie symazyny jako źródła azotu, a nie węgla. Potwierdzeniem powyższych rozważań są wyniki doświadczenia przeprowadzonego przez Houot i in. (1998), w którym mineralizacja atrazyny przebiegała w glebie ilastej oraz w tej samej glebie z dodatkiem różnego pochodzenia nawozów organicznych. Proces rozkładu atrazyny zachodził zdecydowanie szybciej w samej glebie, co mogło być powiązane ze zmianą jej właściwości sorpcyjnych po wprowadzeniu kompostu z odpadów komunalnych i słomy. Jak wskazują cytowani autorzy, wprowadzenie komponentów organicznych mogło przyczynić się do immobilizacji atrazyny (Houot i in. 1998).

W badaniach własnych, po zastosowaniu symazyny w dawce  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , obiekty z większą ilością substancji organicznej (powyżej  $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) częściej, niż obiekty z jej mniejszą ilością, charakteryzowały się obecnością mikroorganizmów tolerujących symazynę. Jednak wśród obiektów z większą zawartością substancji organicznej (powyżej  $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) były też obiekty, które zawierały mikroorganizmy wrażliwe. Dlatego wydaje się, że nie zawsze substancja organiczna w glebach ma działanie „ochronne” na mikroorganizmy; w niektórych matrycach środowiskowych inne czynniki modyfikują działanie ksenobiotyków. Abdelhafid i in. (2000) potwierdzili w swoich badaniach, że jeżeli mikroorganizmy mają dostęp do innego źródła azotu (np. do soli azotanowych), to mineralizacja atrazyny najczęściej zostaje zahamowana. Jednak nie zawsze. W tym samym doświadczeniu (Abdelhafid i in. 2000) dodatek związków organicznych zawierających azot do gleby niemającej wcześniej kontaktu z atrazyną stymulował mikroorganizmy do dealkilacji atrazyny. Również Barra-Caracciolo i in. (2005) donoszą, że dodatek mocznika do gleby wpłynął pozytywnie na rozwój mikroorganizmów glebowych – wzrosła ich liczba i zachodziła biodegradacja symazyny. Autorzy tłumaczą, że mocznik mógł stymulować rozwój bakterii zdolnych do transformowania symazyny na drodze metabolicznej

lub kometabolicznej. Wang i in. (2011), badając skuteczność biodegradacji atrazyny, po dodaniu do podłoża innych źródeł węgla i azotu (sacharozy i soli amonowych) stwierdzili brak ich wpływu na przebieg rozkładu atrazyny przez *Arthrobacter* sp. To zupełnie odmienne wyniki badań od przedstawionych w niniejszej pracy, w których dodatek peptonu (a w mniejszym stopniu glukozy) do podłoża z symazyną zahamował lub spowolnił jej biodegradację.

Metody pośrednie (hodowlane) oceny ilościowej mikroorganizmów wydają się przydatne do porównywania wpływu danego czynnika (np. symazyny stosowanej w różnych dawkach) na mikroorganizmy. Oczywiście, bada się wtedy tylko mikroorganizmy, które tolerują warunki laboratoryjne i wzrastają na podłożach hodowlanych. Większość bakterii z gatunków należących do typów *Proteobacteria*, *Actinobacteria* jest zdolna do wzrostu na odpowiednich podłożach mikrobiologicznych (Hugenholtz i in. 1998).

Na podstawie wyników badań własnych można stwierdzić, że w badanych glebach i materiałach rozpowszechnione były mikroorganizmy tolerujące symazynę użytą w dawkach 100 i 300 mg·kg<sup>-1</sup>, co niekoniecznie znaczy, że były one zdolne do biodegradacji symazyny. Reakcja bakterii i grzybów na symazynę była zróżnicowana. Najczęściej po zastosowaniu symazyny nie obserwowano zmian w liczebności bakterii lub stwierdzano zwiększenie ich liczby w obiektach, w których notowano obecność mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny. Natomiast grzyby, mimo że też pochodziły z tych samych obiektów, nie reagowały na symazynę lub zmniejszały statystycznie istotnie swoją liczebność. Następne badania potwierdziły, że to bakterie były odpowiedzialne za biodegradację symazyny, ponieważ tylko one były zdolne do wzrostu na podłożach zestalonych agarem z dodatkiem symazyny. Jak wspomniano, większość prac poświęconych biodegradacji pochodnych *s*-triazyny dotyczy bakterii (Rousseaux i in. 2001; Strong i in. 2002; Sánchez i in. 2005; Vibber i in. 2007; Marecik i in. 2008).

W badaniach własnych wraz ze wzrostem dawki symazyny zwiększała się liczba bakterii i grzybów, dla których obecność tej substancji nie była obojętna – albo zmniejszała ich liczbę, albo stymulowała je do wzrostu. Podobnie Michalcewicz i in. (2004) odnotowali negatywny wpływ herbicydu triazynowego z atrazyną (Azoprimu 50 WP) na liczbę grzybów w piasku gliniastym lekkim. Po zastosowaniu atrazyny w dawce stukrotnie większej, niż zalecana przez producenta, liczba grzybów zmniejszyła się średnio o ok. 40%, w porównaniu z ich liczbą w obiekcie kontrolnym. Jednak w tym samym doświadczeniu cytowani autorzy stwierdzili zwiększenie liczby bakterii – o ok. 70%. Podobne wyniki otrzymały Przybulewska i Taborska (2008) – również odnotowały zmniejszenie się liczby grzybów po długoletnim kontakcie z kilkoma herbicydami triazynowymi. Najsilniej na grzyby oddziaływał Gesaprim 90 WG (atrazyna) – grzybów było mniej o ponad 50% niż w obiekcie kontrolnym. Gesagard 500 SC (prometryna) i Gesatop 50 WP (symazyna) również redukowały liczbę grzybów, ale o ok. 30%. Zupełnie inaczej niż grzyby (w cytowanej powyżej pracy) na długoletnie stosowanie herbicydów triazynowych reagowały bakterie. Ich liczba była nawet o kilkaset procent większa niż w obiekcie kontrolnym (Przybulewska i Taborska 2008). Podobnie w doświadczeniu przeprowadzonym przez Grangera i in. (1995) dziesięciokrotny wzrost dawki symazyny spowodował zmniejszenie liczby grzybów w glebach – średnio o 10%. Michalcewicz i in. (2004) oraz Przybulewska i Taborska (2008) otrzymali podobne wyniki – grzyby reagowały negatywnie na obecność herbicydów triazynowych, a bakterie przeciwnie – ich liczba się zwiększała.

W badaniach własnych można było wyróżnić zarówno obiekty, które zawierały bakterie i grzyby wrażliwe na symazynę (odnotowano silnie redukujący wpływ największej dawki

symazyny na liczebność tych mikroorganizmów), jak i obiekty, w których obecność symazyny wpływała stymulująco na bakterie i na grzyby. Wpływ symazyny na liczebność i oddychanie bakterii i grzybów był niewielki po zastosowaniu dawki najmniejszej ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Jedynie w kilku obiektach liczebność bakterii i/lub grzybów oraz oddychanie mikroorganizmów różniły się istotnie od wartości kontrolnych. Jednak wpływ największej dawki symazyny ( $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) był zdecydowanie negatywny. W większości przypadków to bakterie, a nie grzyby reagowały na symazynę zmniejszeniem swej liczebności. Mimo to można wskazać obiekty, w których było inaczej – w obiekcie nr 28 (w piasku gliniastym) i w kompoście (w obiekcie nr 21) dominowały grzyby wrażliwe lub obojętne na symazynę, a bakterie były stymulowane do wzrostu i rozmnażania w obecności symazyny.

Przybulewska i in. (2011), badając wzrost grzybów strzępkowych na podłożu zanieczyszczonym herbicydami triazynowymi, ustalili, że większość badanych izolatów jest odporna na herbicydy, a nawet reaguje na nie wzmożonym wzrostem. Do najbardziej odpornych zaliczyli szczepy z rodzajów: *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichotecium*, *Trichocladium*, *Trichoderma*. Szczepami najbardziej wrażliwymi na zanieczyszczenie podłoża herbicydami triazynowymi okazały się izolaty należące do gatunków *Penicillium claviforme* i *Mucor mucedo*. Stymulujący wpływ atrazyny na liczebność mikroorganizmów (zarówno bakterii, jak i grzybów) zaobserwowali Michalcewicz i in. (2006). W ciągu 3 miesięcy po wprowadzenia herbicydu z atrazyną (Atrasan 500 SC) obserwowali zwiększenie liczebności mikroorganizmów (od kilkunastu do kilkuset procent więcej komórek niż w obiekcie kontrolnym).

W opisywanym w niniejszym opracowaniu doświadczeniu, spośród 30 przebadanych obiektów jedynie z 2 pozyskano szczepy bakteryjne, z których utworzono skuteczne szczepionki do biodegradacji symazyny. W przypadku obiektu nr 22 (pobranego w parku w Mścięcinnie) odpowiedzialne za biodegradację symazyny okazały się bakterie należące do rodzaju *Arthrobacter* (*Arthrobacter* sp. szczep X-4), natomiast spośród izolatów z obiektu nr 8 (z materiału z Parku Leśnego Arkońskiego) odpowiedzialny za biodegradację symazyny był szczep CK6 z rodzaju *Stenotrophomonas*. Zarówno bakterie z rodzaju *Arthrobacter*, jak i z rodzaju *Stenotrophomonas* znane są ze swoich wszechstronnych właściwości enzymatycznych (Rożański 1992; Rousseaux i in. 2001; Strong i in. 2002; Vibber i in. 2007; Marecik i in. 2008; Błaszak i in. 2011).

Wang i in. (2011) wyizolowali ze ścieków bakterie z rodzaju *Arthrobacter* (szczep HB-5), inkubowali je na podłożu mineralnym z dodatkiem atrazyny ( $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Już po 12 godzinach inkubacji stwierdzili prawie 100-procentowy ubytek atrazyny z podłoża! Jest to prawdziwy rekord, ponieważ nie opisano dotychczas szybszej biodegradacji pochodnej *s*-triazyny. Jednak szczep HB-5 *Arthrobacter* sp. nie był zdolny do pełnej mineralizacji atrazyny; szlak metaboliczny zatrzymywał się na transformacji atrazyny w kwas cyjanurowy. W przedstawianych badaniach własnych bakterie z rodzaju *Arthrobacter*, szczep X-4, łącznie z bakteriami *Pseudoxanthomonas mexicana*, aktywnie utylizowały symazynę, jednak w 12 godzinie doświadczenia bakterie wciąż przebywały w lag-fazie, a ilość substancji aktywnej była ta sama jak na początku badania. Dopiero po 15 godzinach od momentu rozpoczęcia inkubacji zaobserwowano gwałtowny ubytek symazyny, a w 27 godzinie eksperymentu nie było jej już w podłożu. Inokulat zawierający *Arthrobacter* sp. i *Pseudoxanthomonas mexicana* był zdolny do mineralizacji symazyny (stwierdzono w podłożu obecność amoniaku i ditlenku węgla), jednak nie zbadano, czy procesowi podlegały tylko łańcuchy boczne czy pierścień triazynowy.

Współdziałanie mikroorganizmów w rozkładzie i mineralizacji substancji organicznych jest powszechnie znane (Kunicki-Goldfinger 2007). *Arthrobacter* sp. szczep X-4 sam jedynie w niewielkim stopniu rozkładał symazynę; dopiero po wprowadzeniu do hodowli drugiego szczepu, tj. *Pseudoxanthomonas mexicana*, dochodziło do szybkiego ubytku symazyny i wydzielania CO<sub>2</sub> i amoniaku. Z kolei sam szczep *P. mexicana* nie rozkładał symazyny w ogóle. Prawdopodobnie współpraca szczepów polegała na początkowym rozkładzie symazyny przez *Arthrobacter* sp. do produktów przejściowych. Następnie do biodegradacji włączał się *P. mexicana*, który nie mogąc wykorzystać symazyny, jedynie mineralizował produkty poprzednich procesów. Nie stwierdzono, czy niektóre z tych metabolitów, wytwarzanych przez *P. mexicana*, były ponownie wykorzystywane przez *Arthrobacter* sp. Podobne spostrzeżenia mieli Kolić i in. (2007), porównując biodegradację atrazyny prowadzoną przez pojedynczy izolat (*Arthrobacter keyseri* ATZ2) oraz przez zespół bakterii (*Arthrobacter keyseri* ATZ2, *Arthrobacter* sp. szczep ATZ1, *Ochrobactrum* sp. CA1 i *Pseudomonas* sp. CA2). Udowodniono, że współpraca bakterii powoduje efektywniejszą biodegradację atrazyny, przede wszystkim pod względem skuteczności – nastąpiła pełna mineralizacja. Jeśli chodzi o efektywność procesu, ubytek atrazyny w hodowli jedno- i wieloskładnikowej był porównywalny. Doświadczenie Kolić i in. (2007) świetnie obrazuje współpracę drobnoustrojów, właśnie na przykładzie biodegradacji atrazyny. Spośród 4 szczepów atrazynę rozkładał jedynie szczep ATZ2, należący do gatunku *Arthrobacter keyseri*. Jednak niektórych powstających w tym procesie produktów ten szczep nie był w stanie dalej metabolizować (np. kwasu cyjanurowego). Z kolei pozostałe 3 szczepy co prawda nie rozkładały samej atrazyny, ale aktywnie metabolizowały produkty jej rozkładu (izopropylaminę, etylaminę, kwas cyjanurowy). Takie następowanie po sobie bujnego rozwoju poszczególnych grup organizmów, w zależności od dostępności substratów, tworzy zjawisko sukcesji. Tak jak mikroorganizmy od wieków współpracują w rozkładzie naturalnych polimerów, np. lignin, tak samo wydaje się prawdopodobne, że nie pojedyncze izolaty, a ich grupy mają większe znaczenie w biodegradacji polutantów (Róžański 1992).

Podobne wyniki otrzymały Przybulewska i Sienicka (2008) w eksperymencie nad biodegradacją atrazyny (100 mg·kg<sup>-1</sup>) w glebie. Mniej symazyny ubyło (ok. 15%) po wprowadzeniu biodegradującego symazynę inokulatu do gleby sterylnej, niż do gleby naturalnie zawierającej mikroorganizmy. Podobne doświadczenie wykonali Morgante i in. (2010). Wprowadzili do gleby szczep *Pseudomonas* sp. MHP41, aby wspomóc mikroorganizmy naturalnie zasiedlające glebę w biodegradacji symazyny (10 mg·kg<sup>-1</sup>). Testowali 2 obiekty – pierwsza gleba pochodziła z plantacji awokado, w przypadku której stosowano przez 20 lat symazynę (Gesatop 90WG); w przypadku drugiej gleby nie stosowano herbicydów triazynowych. Niezależnie od gleby bioaugmentacja (dodatek namnożonych bakterii szczepu MHP41) wyraźnie wpływała na przyspieszenie biodegradacji symazyny. Również wcześniejszy kontakt z symazyną (w glebie z herbicydami triazynowymi) spowodował przyspieszenie biodegradacji. Współpraca mikroorganizmów w kompleksowym przeprowadzaniu procesów biochemicznych w danym środowisku zależy nie tylko od ich uzdolnień metabolicznych. Wystarczy, że nastąpi wydzielanie do środowiska substancji stymulujących wzrost mikroorganizmów albo sekrecja biosurfaktantów, a procesy biochemiczne zostaną przyspieszone. Duże znaczenie ma zdolność niektórych mikroorganizmów do wydzielania biosurfaktantów. Są to związki o różnej budowie chemicznej, np. glikolipidy, peptydy lub wysokocząsteczkowe lipopolisacharydy, biopolimerowe kompleksy

i lipoproteiny. Biosurfaktanty, czyli powierzchniowo czynne cząsteczki wytwarzane przez żywe komórki, produkowane są z udziałem bakterii (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*), a także grzybów (*Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Curvularia*), które nie uczestnicząc bezpośrednio w biochemicznym rozkładzie ksenobiotyków, znacznie go przyspieszają lub w ogóle umożliwiają (Paraszkiewicz i Długoński 2007; Błaszczuk 2009). Być może rola *Pseudoxanthomonas mexicana* w biodegradacji symazyny, w opisanych badaniach, też sprowadzała się tylko do aktywacji szczepu X-4 *Arthrobacter* sp. Wydzielanie do podłoża związków o charakterze biosurfaktantów lub stymulatorów mogło stymulować bakterie z rodzaju *Arthrobacter* do rozkładu symazyny.

Szczep HB-5, testowany przez Wang i in. (2011), biodegradował atrazynę w szerokim zakresie temperatury, w warunkach korzystnego odczynu podłoża (pH = 7). Zmiana temperatury (od 10°C do 40°C) nie miała wpływu na tempo biodegradacji. Natomiast w opisywanych badaniach własnych, w temperaturze 18°C, bakterie zastosowane łącznie w postaci inokulatu (*Arthrobacter* sp. szczep X-4 i *Pseudoxanthomonas mexicana*) kilkakrotnie spowolniły tempo biodegradacji symazyny (w odniesieniu do ich inkubacji w 28°C). Jeszcze w trzeciej dobie eksperymentu symazyny było tyle co na początku doświadczenia. W przedstawianym w niniejszym opracowaniu doświadczeniu w podłożu, oprócz symazyny, był również cytrynian sodu, co wpłynęło na uzyskanie niższego pH (5,5), niż w doświadczeniu powyżej cytowanym, w którym nie wprowadzono dodatkowego źródła węgla i/lub energii. Odczyn podłoża w trakcie badań własnych się zmieniał, aby ostatecznie osiągnąć wartość pH równą 6,8. Zmiana pH była spowodowana wykorzystywaniem cytrynianu sodu jako źródła węgla lub/i energii.

W doświadczeniu Wang i in. (2013) szczep DAT1, należący do *Arthrobacter* sp., wyizolowano z lekko alkalicznej gleby piaszczysto-gliniastej. Dopiero po dodaniu go w postaci namnożonego inokulatu ( $1,3 \cdot 10^7$  jtk·g<sup>-1</sup>) do gleby, z której został wyizolowany, nastąpiła biodegradacja atrazyny. W ciągu 3 dni ubyło prawie 100% atrazyny (z 0,4 g·kg<sup>-1</sup>). W glebie (w tej samej, z której pochodził szczep DAT1), w przypadku której nie zastosowano bioaugmentacji, nie stwierdzono ubytku atrazyny nawet w 17 dniu doświadczenia. Również w badaniach własnych przebieg biodegradacji symazyny różnił się w zależności od zastosowanego inokulatu. Mimo że w dwóch przypadkach w inokulacie był obecny szczep X-4 *Arthrobacter* sp., w hodowli macierzystej (w której mikroorganizmy pochodziły bezpośrednio z zawiesiny glebowej) biodegradacja zachodziła w początkowej fazie wolniej niż w wariacie z inokulatem dwu- lub trójskładnikowym (z namnożonym szczepem *Arthrobacter* sp. X-4,  $10^7$  jtk·cm<sup>-3</sup>). Zarówno w jednym, jak i w drugim przypadku biodegradacja była skuteczna, jednak faza przygotowawcza bakterii do rozkładu symazyny była krótsza po zastosowaniu namnożonych komórek *Arthrobacter* sp., a dłuższa po dodaniu do podłoża zawiesiny glebowej. Prawdopodobnie kluczową rolę w efektywności biodegradacji odgrywała po prostu liczba komórek aktywnych. W inokulacie dwu- i trójskładnikowym komórek *Arthrobacter* sp. było więcej niż w rozcieńczonej zawieszynie glebowej. Natomiast w innym doświadczeniu (Martin-Montalvo i in. 1997) na tempo biodegradacji wpływała dawka symazyny, a nie liczba aktywnych komórek. Cytowani autorzy badali wpływ liczby komórek w inokulacie na skuteczność biodegradacji symazyny, przeprowadzanej przez szczep bakteryjny DSZ1 o niezidentyfikowanej przynależności gatunkowej. Okazało się, że na tempo i skuteczność biodegradacji ma wpływ ilość symazyny dodawanej do podłoża (2, 5, 10, 20 mg·cm<sup>-3</sup>), a nie liczba komórek obecnych w inokulacie ( $6 \cdot 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  jtk·cm<sup>-3</sup>). Po wprowadzeniu symazyny w dawkach 2 i 5 mg·cm<sup>-3</sup> ubyło jej średnio 60%

po 20 dniach inkubacji. Natomiast po wprowadzeniu do podłoża większych dawek symazyny rozłożonych zostało jedynie od kilku do kilkunastu procent jej początkowej ilości. Dokładnie tę samą zależność odnotowano po wprowadzeniu do hodowli  $6 \cdot 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  jtk $\cdot$ cm $^{-3}$ .

Z ryzosfery wetiwerii pachnącej (*Vetiveria zizanioides*) wyizolowano szczep *Arthrobacter* sp. MCM B-436 (Vaishampayan i in. 2007). Szczep ten, wprowadzony do podłoża mineralnego z symazyną ( $10^8$  jtk $\cdot$ cm $^{-3}$ ), po 30 godzinach rozłożył ją w 73%. Jak już wspomniano, wiele szczepów z rodzaju *Arthrobacter* jest zdolnych do wykorzystywania pochodnych *s*-triazyny, jednak szczep MCM B-436 wyróżnia się tym, że jest zdolny do całkowitej mineralizacji pochodnych *s*-triazyny (atrazyny, symazyny, ametryny); wykorzystuje również kwas cyjanurowy jako źródło makroelementów i/lub energii. Izolaty, należące do rodzaju *Arthrobacter*, różnią się również sposobem wykorzystania pochodnych *s*-triazyny. Większość szczepów wykorzystuje atrazynę tylko jako źródło azotu, np. *A. radiobacter* J14a (Struthers i in. 1998) i *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai i in. 2003). Niektóre szczepy mogą wykorzystać *s*-triazynę jako źródło węgla, azotu i energii, np. *Arthrobacter aurescens* TC1 (Strong i in. 2002) i wspomniany szczep MCM B-436.

W badaniach własnych bakterie z rodzaju *Stenotrophomonas* (*Stenotrophomonas* sp. CK6) wyizolowano z obiektu nr 8 (z materiału z Parku Leśnego Arkońskiego). Stwierdzono, że są one zdolne do biodegradacji symazyny, ponieważ wprowadzone do podłoża ( $10^7$  jtk $\cdot$ cm $^{-3}$ ) rozłożyły ją całkowicie po 70 godzinach inkubacji. Szczepy należące do gatunku *Stenotrophomonas maltophilia* opisywane są przez kilku autorów jako zdolne do biodegradacji pochodnych *s*-triazyny (Rousseaux i in. 2001; Marecik i in. 2008).

Zarówno szczep *Arthrobacter* sp. X-4, jak i *Stenotrophomonas* sp. CK6, wyizolowane ze środowiska w toku badań własnych, były zdolne do diazotrofii. W laboratorium wzrastały na podłożach, do których nie dodano żadnego źródła azotu, natomiast w środowisku wyizolowano je z gleb, które porastały między innymi rośliny motylkowe (koniczyny). W pracach innych autorów (Bouquard i in. 1997; Marecik i in. 2008; Fajardo i in. 2012) również bakterie zdolne do biodegradacji pochodnych *s*-triazyny były jednocześnie zdolne do asymilacji azotu cząsteczkowego (np. z rodzajów *Rhizobium*, *Rahnella*). Ta informacja może okazać się niezwykle przydatna w poszukiwaniu szczepów mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji tych substancji.

Na podstawie wyników badań własnych można stwierdzić, że dodatek symazyny do gleby w większości przypadków (obektów) nie wywołał zmian w intensywności wydzielania ditlenku węgla przez mikroorganizmy glebowe. Większość mikroorganizmów wykazywała tolerancję na herbicyd (szczególnie po zastosowaniu najmniejszej dawki symazyny, wynoszącej 100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ), nie zmieniając w sposób istotny ilości wytwarzanego CO $_2$ . Część obiektów zasiedlona była przez mikroorganizmy, które potraktowały symazynę jako źródło energii, dlatego tempo oddychania w tych obiektach uległo przyspieszeniu.

Podobne wyniki otrzymali Michalcewicz i in. (2004). W ich badaniach tempo respiracji gleby służyło do określenia zawartości biomasy mikroorganizmów glebowych. O 30% i o ok. 80% więcej ditlenku węgla wydzielali mikroorganizmy w glebie z atrazyną (Azoprim 50 WP) – odpowiednio po zastosowaniu dawki zalecanej przez producenta i stukrotnie większej niż w glebie kontrolnej. Szczególnie w pierwszym miesiącu doświadczenia odnotowano silną stymulację wydzielania gazu. Po 49 dniach doświadczenia ilość wydzielanego ditlenku węgla w glebach skażonych była porównywalna z ilością tego gazu w glebie kontrolnej (Michalce-



wicz i in. 2004). Wydaje się, że intensywne wydzielanie ditlenku węgla mogło mieć związek z wykorzystywaniem atrazyny jako źródła energii lub/i węgla (Róžański 1992). Nowak (1995), badając wpływ atrazyny (Azoprim 50 WP) na tempo respiracji mikroorganizmów w glebie, zaobserwowała stymulujący wpływ substancji aktywnej na drobnoustroje. Mikroorganizmy wydzielały o kilka–kilkanaście procent więcej ditlenku węgla w glebie z atrazyną niż w glebie bez atrazyny. W przedstawianym w niniejszym opracowaniu doświadczeniu również opisano obiekty, które charakteryzowały się zwiększeniem ilości wydzielanego ditlenku węgla przez mikroorganizmy i to po zastosowaniu wszystkich dawek symazyny (w materiale z Krzekowa, Wołczkowa i Gumieniec).

Badanie własne kinetyki rozkładu symazyny przez aktywne szczepy *Arthrobacter* sp. (X-4) i *Pseudoxanthomonas mexicana* oraz *Stenotrophomonas* sp. ujawniło pewne podobieństwo podczas tego procesu. Krzywa biodegradacji miała podobny przebieg (kształt), niezależnie od użytego inokulum. W przebiegu procesu można było wydzielić okres zastoju biodegradacji, w którym nie stwierdzono ubytku symazyny. Mogło to być spowodowane adaptowaniem się mikroorganizmów do nowych warunków, co zazwyczaj ma miejsce, gdy bakterie nie miały wcześniej kontaktu z ksenobiotykiem. Jednak w przypadku obu inokulatów (*Arthrobacter* sp. X-4, *Pseudoxanthomonas mexicana* oraz *Stenotrophomonas* sp. CK6) bakterie te miały wcześniej kontakt z symazyną. We wstępnym etapie procesu biodegradacji pochodnych *s*-triazyny niektóre bakterie mogą pozyskiwać azot z powietrza, jednak ze względu na energochłonny charakter diazotrofii w dalszej kolejności – jeśli potrafią – wykorzystują symazynę. Innym wyjaśnieniem długiego okresu przygotowawczego mikroorganizmów do rozkładu symazyny (początek biodegradacji nastąpił odpowiednio po 9 i 30 godzinie eksperymentu) może być niedostateczna liczba komórek w inokulatach ( $10^7$  jtk·cm<sup>-3</sup>) i potrzeba dłuższego czasu na namnożenie ich do ilości wystarczającej do zainicjowania biodegradacji. Jednak inni autorzy (Vaishampayan i in. 2007; Marecik i in. 2008) wprowadzali zbliżoną liczbę komórek bakterii do podłoża w celu biodegradacji pochodnych *s*-triazyny. Zacytowani autorzy pomiary stężenia pochodnych *s*-triazyny przeprowadzali raz na kilkanaście godzin lub znacznie rzadziej, w związku z czym brakuje danych dotyczących przebiegu biodegradacji w pierwszych kilkunastu godzinach badań. Zresztą poszczególne gatunki, a nawet szczepy, mogą różnić się swoimi wymaganiami środowiskowymi (Kodama i in. 2001).

W badaniach własnych gwałtowny ubytek symazyny charakteryzował drugą fazę biodegradacji, w której maksymalne tempo ubywania symazyny z hodowli wynosiło  $8,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  (w wariancie z *Arthrobacter* sp. i *P. mexicana*). W przypadku hodowli bakterii z rodzaju *Stenotrophomonas* (szczep CK6) maksymalne tempo biodegradacji wynosiło prawie  $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . Stopniowe spowalnianie tempa biodegradacji symazyny, aż do przekroczenia jej progu oznaczalności, następowało do 32 (*Arthrobacter* sp. i *P. mexicana*) i 70 (*Stenotrophomonas* sp.) godziny eksperymentu. Czas półtrwania substancji aktywnych pestycydów (DT<sub>50</sub>) jest kluczowym parametrem opisującym kinetykę rozkładu pestycydów w glebie lub w hodowli (Beulke i Brown 2001; FOCUS 2006). Znacznie różni się czas połowicznego rozkładu pestycydów aplikowanych do gleby i do podłoża laboratoryjnego. W pierwszym przypadku na tempo biodegradacji ma zawsze wpływ również obecność innych składników występujących w glebach (w tym przede wszystkim występowanie substancji organicznej – Houot i in. (1998). W przedstawianych badaniach własnych bakterie rozłożyły symazynę (DT<sub>50</sub>) w ciągu 20,3 godziny (*Arthrobacter* sp. i *P. mexicana*) lub 48,4 godziny (*Stenotrophomonas* sp.). Jednak trudno

porównywać wartość tego parametru z wartościami uzyskanymi przez innych badaczy, którzy realizowali doświadczenia w zróżnicowanych warunkach inkubacji. Jak wynika z przedstawionego doświadczenia, nie tyle dawka co wpływ temperatury inkubacji miał istotny wpływ na tempo biodegradacji, a tym samym na czas półtrwania symazyny  $DT_{50}$ . Wzrost temperatury inkubacji o  $10^{\circ}C$  spowodował przyspieszenie tempa biodegradacji. Różnice w osiągnięciu czasu połowicznego rozkładu symazyny  $DT_{50}$  w hodowlach, w zależności od temperatury ( $18$  lub  $28^{\circ}C$ ), wynosiły 2–4 doby, a różnice w osiągnięciu  $DT_{50}$ , wynikające ze wzrostu dawki symazyny (o  $50$  i  $100\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) – jedynie kilka–kilkanaście godzin.

Fernandez i in. (2001) oraz Nicholls i in. (1984) również wskazują na temperaturę jako na czynnik kluczowy modyfikujący przebieg procesu biotransformacji symazyny w glebach. Czas połowicznego rozkładu symazyny mierzony latem (44 doby) wydłużył się kilkukrotnie zimą (Fernandez i in. 2001). Natomiast w innych badaniach (Nicholls i in. 1984) latem czas połowicznego rozkładu symazyny wynosił ok. 75 dni, a zimą wydłużył się do ok. 150 dni. Cytowani autorzy (Nicholls i in. 1984; Fernandez i in. 2001) swoje spostrzeżenia potwierdzili w warunkach laboratoryjnych, w których stosując różną temperaturę inkubacji, wydłużali lub skracali czas połowicznego rozkładu symazyny. Wpływ temperatury na tempo biodegradacji symazyny badali Kodama i in. (2001). Szczep N5C, należący do gatunku *Moraxella ovis*, rozłożył o 30% więcej symazyny po podwyższeniu temperatury o  $10^{\circ}C$  ( $25$ ,  $35^{\circ}C$ ). Zresztą nie tylko proces biodegradacji ksenobiotyków zależy od temperatury; wiadomo, że w zasadzie wszystkie procesy biochemiczne, katalizowane przez enzymy, są od niej uzależnione (Kunicki-Goldfinger 2007).



## 6. Podsumowanie

Biologiczne unieszkodliwianie odpadów pestycydowych (również w połączeniu z metodami chemicznymi) jest alternatywne dla termicznych metod utylizacji. Dlatego poszukiwanie mikroorganizmów łatwych, tanich w hodowli i wykazujących szerokie spektrum aktywności enzymatycznej daje szansę na coraz częstsze wdrażanie do przemysłu metod „przyjaznych” środowisku. Do badań wybrano wycofaną z obrotu handlowego substancję aktywną – symazynę (ang. *6-chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine*) zawartą w herbicydzie Azotop 50 WP, ponieważ zdaniem wielu badaczy (Behki i Khan 1994; Martin-Montalvo i in. 1997; Kodama i in. 2001; Barra-Caracciolo i in. 2005; Sánchez i in. 2005) jest rozkładana przez wiele szczepów mikroorganizmów środowiskowych. Herbicyd pozyskano z prywatnego gospodarstwa rolnego, w którym był przechowywany wraz z innymi wycofanymi z handlu środkami ochrony roślin, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla ludzi i środowiska.

W pierwszym etapie badań oceniano wpływ symazyny na mikroorganizmy, na ich liczebność i tempo wydzielania ditlenku węgla. Liczebność bakterii i grzybów oraz wydzielanie CO<sub>2</sub> były uzależnione od zastosowanej dawki symazyny. W większości obiektów po zastosowaniu symazyny w dawkach 100 i 300 mg·kg<sup>-1</sup> liczebność bakterii i grzybów oraz tempo ich oddychania nie zmieniały się statystycznie istotnie. Natomiast symazyna zastosowana w dawce 500 mg·kg<sup>-1</sup> przeważnie zmieniała (statystycznie istotnie) wartości badanych parametrów. Jedynie w 3 przypadkach (na 30 obiektów) mikroorganizmy, niezależnie od dawki symazyny i badanej właściwości, podobnie reagowały na symazynę. W dwóch obiektach, tj. w próbce gliny piaszczystej pobranej z łąki we wsi Warzymice oraz w próbce gliny piaszczystej pobranej z nabrzeża Odry we wsi Siadło Dolne, nie stwierdzono statystycznie istotnego wpływu symazyny ani na liczebność bakterii i grzybów, ani na tempo wydzielania ditlenku węgla. W tych obiektach mikroorganizmy były odporne na symazynę, ponieważ w żadnym przypadku nie zanotowano jej statystycznie istotnego wpływu. Tylko w jednym obiekcie (w próbce piasku pobranego z plaży w Słowińskim Parku Narodowym) liczebność bakterii i grzybów oraz szybkość wydzielania CO<sub>2</sub> ulegały zmianie (zmniejszeniu) po zastosowaniu symazyny we wszystkich dawkach. W pozostałych obiektach, w zależności od dawki symazyny i badanego parametru, reakcja mikroorganizmów na symazynę była różna, dlatego nie można jednoznacznie stwierdzić, czy mikroorganizmy są wrażliwe czy odporne na symazynę. Odporność na symazynę nie gwarantuje mikroorganizmom zdolności do jej biodegradacji. Wielokrotnie w obiektach zawierających bakterie i/lub grzyby, których liczebność nie podlegała istotnym zmianom lub wręcz zwiększała się pod wpływem symazyny, nie stwierdzano obecności mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny.

Jeśli w podłożu hodowlanym lub w glebach jest dostępny azot w formie łatwo przyswajalnej dla mikroorganizmów, biodegradacja symazyny i innych pochodnych *s*-triazyny zostaje spowolniona lub wręcz zahamowana (Houot i in. 1998; Abdelhafid i in. 2000). Dodatek peptonu do pożywki płynnej z symazyną hamował jej biologiczny rozkład we wszystkich badanych przypadkach.

Substancja organiczna zawarta w materiałach badawczych neutralizowała negatywne oddziaływanie symazyny na mikroorganizmy. Jednak ochronna rola substancji organicznej dotyczyła mikroorganizmów narażonych na działanie największej dawki symazyny, tj.  $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . W obiektach zawierających substancję organiczną w ilości poniżej  $40 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$  symazyna wpływała statystycznie istotnie na wartości badanych parametrów, natomiast wraz ze wzrostem zawartości substancji organicznej w obiektach wpływ symazyny częściej był statystycznie nieistotny. W przypadku symazyny zastosowanej w mniejszych dawkach liczebność mikroorganizmów i tempo ich oddychania w większości obiektów nie zmieniały się albo wręcz się zwiększały.

W drugim etapie badań testowano obiekty badawcze (30 zróżnicowanych materiałów środowiskowych) pod względem obecności mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny. Jedynie w 7 obiektach (na 30) wykryto mikroorganizmy zdolne do biodegradacji symazyny, co wskazuje na niewielkie rozpowszechnienie tej właściwości wśród mikroorganizmów. Wykryto je w próbkach pobranych w dzielnicy Szczecin-Północ (w Parku Leśnym w Mścięcinnie, w Przęsolinie), w próbkach pobranych w dzielnicy Szczecin-Zachód (na Krzekowie, w Parku Leśnym Arkońskim, w parku Kasprowicza) i w próbkach pozyskanych z Siadła Dolnego i Przeclawia. Nie zaobserwowano, by odległość między miejscami pobierania próbek wpływała na rozprzeszczenie cechy, nadającej mikroorganizmom zdolność do rozkładu symazyny. Mimo że niektóre miejsca pobrania materiałów badawczych były oddalone od siebie jedynie o kilkanaście metrów, w jednej próbce stwierdzano obecność mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji symazyny, a w drugiej nie. We wszystkich dzielnicach Szczecina (Północ, Zachód, Śródmieście, Prawobrzeże) wśród pobranych materiałów były takie, które zawierały mikroorganizmy biodegradujące symazynę oraz niezdolne do jej biodegradacji.

Wybrane izolaty bakterii hodowano w warunkach laboratoryjnych i oceniano ich zdolność do biodegradacji symazyny. Testowano inokulaty jedno- i wieloszczepowe pod względem zdolności do biodegradacji symazyny. Kinetykę biodegradacji symazyny w hodowli okresowej opisano za pomocą funkcji logistycznej. Współczynniki modelu logistycznego estymowano numerycznie metodą Levenberga-Marquardta. Spośród wszystkich wersji inokulatów jedno- i wieloszczepowych najszybciej i najskuteczniej symazynę rozkładał wariant zawierający łącznie bakterie z rodzajów *Arthrobacter* oraz *Pseudoxanthomonas*. Szczep X-4 należący do rodzaju *Arthrobacter* oraz bakterie należące do gatunku *Pseudoxanthomonas mexicana* wyizolowano z materiału utworzonego z gleby i warstwy organicznej, pobranych w parku w Mścięcinnie. W przypadku hodowli tych bakterii czas półtrwania symazyny ( $DT_{50}$ ), wprowadzonej do podłoża w dawce  $100 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , wynosił 20,3 godziny (w  $28^\circ\text{C}$ ), a maksymalne tempo biodegradacji symazyny ( $-dC/dt$ ) wynosiło  $8,4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ . Skuteczny w biodegradacji symazyny był również szczep CK6, zidentyfikowany jako *Stenotrophomonas* sp., który samodzielnie biodegradował symazynę. Szczep pochodził z materiału pobranego w Parku Leśnym Arkońskim w Szczecinie. W hodowli bakterii *Stenotrophomonas* sp. CK6 czas półtrwania symazyny wynosił 48,4 godziny (w  $28^\circ\text{C}$ ), a maksymalne tempo biodegradacji symazyny wynosiło  $7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ . Znacznie częściej bakterie z rodzaju *Arthrobacter*, niż z rodzaju *Stenotrophomonas*, opisywane są jako zdolne do biodegradacji substancji aktywnych pestycydów (Kodama i in. 2001; Rousseaux i in. 2001; Cai i in. 2003; Kolić i in. 2007; Marecik i in. 2008; Wang i in. 2013). Również wiele innych mikroorganizmów, należących do różnych rodzajów bakterii, grzybów, glonów, jest zdolnych do metabolizowania pestycydów (Róžański 1992; Gonzalez-Barreiro i in. 2006).

Porównując efektywność procesu biodegradacji symazyny po użyciu różnych jej dawek ( $50\text{--}300\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) podczas inkubacji w temperaturze  $18$  i  $28^\circ\text{C}$  inokulatów zawierających *Arthrobacter* sp. X-4 i *Pseudoxanthomonas mexicana* oraz szczep *Stenotrophomonas* sp. CK6, okazało się, że główną rolę w kształtowaniu przebiegu procesu odgrywa nie dawka symazyny, a temperatura. Przy tym tempo biodegradacji symazyny zwiększyło się o kilka dób po wzroście temperatury o  $10^\circ\text{C}$ . Zwiększenie dawki symazyny o 50, a nawet  $100\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  spowolniło tempo procesu jedynie o kilka–kilkanaście godzin i to nie w każdej hodowli.

Przeprowadzone badania własne i innych autorów (Bouquard i in. 1997; Vaishampayan i in. 2007; Marecik i in. 2008) wskazują na możliwość wykorzystania mikroorganizmów do biologicznego unieszkodliwiania pochodnych *s*-triazyny. Należałoby więc kontynuować badania dotyczące biodegradacji odpadów pestycydowych, a szczególnie badania poświęcone skrinin-gowi mikroorganizmów zdolnych do mineralizacji co najmniej kilku substancji aktywnych pestycydów. Bakterie z rodzaju *Arthrobacter* (w tym pozyskany w toku badań własnych *Arthrobacter* sp. X-4) to typowe autochtony, rozpowszechnione w środowisku, łatwe w hodowli i dobrze znoszące długi czas przechowywania (Głazewska-Maniewska i in. 2004; Kołwzan i in. 2006). Bakterie te wraz ze szczepem należącym do gatunku *Pseudoxanthomonas mexicana* szybko rozkładały symazynę dodaną do podłoża, nawet w dawce  $200\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Przeprowa-dzone badania nie ustaliły granicy możliwości tych bakterii dotyczących maksymalnej dawki symazyny podlegającej całkowitemu rozkładowi oraz dotyczących zdolności do rozkładu innych substancji aktywnych. Dlatego konieczne są kolejne badania (np. hodowla ciągła aktywnych inokulatów), które potwierdzą konkurencyjność biotechnologicznych metod utylizacji odpadów triazynowych.



## 7. Wnioski

1. Mikroorganizmy zdolne do biodegradacji symazyny nie występują powszechnie w środowisku. Wykryto je w 7 obiektach na 30 badanych: w 2 obiektach w dzielnicy Szczecin-Północ (w próbkach pobranych z Parku Leśnego w Mścięcinnie i z Przęsocina), w 3 obiektach w dzielnicy Szczecin-Zachód (w próbkach pozyskanych z Krzekowa, z Parku Leśnego Arkońskiego, z parku Kasprowicza) i w 2 miejscach wykraczających poza granice Szczecina (w materiale pobranym z Siadła Dolnego i Przeclawia).

2. Matryce środowiskowe mogą być źródłem mikroorganizmów rozkładających symazynę. Skuteczne w biodegradacji tej substancji okazały się inokulaty zawierające łącznie szczepy bakterii *Arthrobacter* sp. X-4 i *Pseudoxanthomonas mexicana*. Bakterie te wyizolowano z materiału glebowego pobranego w parku w Mścięcinnie. Szczep *Stenotrophomonas* sp. CK6 wyizolowano z próbki pobranej w Parku Leśnym Arkońskim.

3. Zmiana temperatury inkubacji hodowli silniej modyfikuje przebieg procesu rozkładu symazyny niż zwiększenie jej dawki. Tempo biodegradacji symazyny przyspieszyło średnio o kilka dób po zwiększeniu temperatury o 10°C. Wzrost dawki symazyny (nawet o 150 mg·dm<sup>-3</sup>), spowolnił tempo jej rozkładu zaledwie o kilka-kilkanaście godzin.

4. Nie można jednoznacznie ustalić, czy mikroorganizmy są odporne czy wrażliwe na symazynę. Reakcja mikroorganizmów na tę substancję jest zróżnicowana; zależy przede wszystkim od użytej dawki ksenobiotyku, jak również od obiektu, badanego parametru i sposobu użytkowania gleb. Jedynie w 2 obiektach (w próbce gliny piaszczystej pobranej z łąki we wsi Warzymice oraz w próbce gliny piaszczystej pobranej z nabrzeża Odry we wsi Siadło Dolne) liczba bakterii, grzybów oraz ich aktywność metaboliczna nie zmieniały się po zastosowaniu symazyny we wszystkich dawkach. Piasek z plaży ze Słowińskiego Parku Narodowego zawierał bakterie i grzyby wrażliwe na wszystkie zastosowane dawki symazyny. W pozostałych 27 obiektach bakterie i grzyby różnie reagowały na symazynę (zwiększając, zmniejszając lub nie zmieniając swojej liczebności i szybkości oddychania).

5. Zawartość substancji organicznej w obiektach miała wpływ na mikroorganizmy jedynie w przypadku oddziaływania największej dawki symazyny (500 mg·kg<sup>-1</sup>). Wraz ze wzrostem ilości substancji organicznej w obiektach częściej występowały w nich bakterie i grzyby odporne na symazynę.

6. Mała odległość (kilkanaście metrów) między miejscami pobrania próbek nie wpływała na rozprzestrzenienie cech nadających mikroorganizmom odporność na symazynę i zdolność do jej rozkładu.

7. Odporność na symazynę nie zawsze wiąże się ze zdolnością do jej rozkładu. Wielokrotnie w obiektach zawierających bakterie i/lub grzyby odporne na symazynę (nawet stymulowane przez nią do wzrostu i aktywności) nie stwierdzono obecności mikroorganizmów zdolnych do jej biodegradacji.





## Piśmiennictwo

1. Abdelhafid R., Houot S., Barriuso E. 2000. Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. *Soil Biol. Biochem.* 32: 389–401.
2. Albright V.C., Murphy I.J., Anderson J.A., Coats J.R. 2013. Fate of atrazine in switchgrass-soil column system. *Chemosphere* 90 (6): 1847–1853.
3. Alexander M. 1999. Bioremediation technologies: in situ and solid phase, in: *Biodegradation and bioremediation*. San Diego, Academic Press: 159–176.
4. Anderson J.P.E., Domsch K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10 (2):15–221.
5. Anderson K., Wheeler K., Robinson J., Tuovinen O. 2002. Atrazine mineralization potential in two wetlands. *Water Res.* 36: 4785–4794.
6. Arthur E., Perkovich B., Anderson T. 2000. Degradation of an atrazine and metolachlor herbicide mixture in pesticide – contaminated soil from two agrochemical dealerships in Iowa. *Water Air Soil Poll.* 119: 75–90.
7. Barra-Caracciolo A., Grenni P., Ciccoli R., Di Landa G., Cremisini C. 2005, Simazine biodegradation in soil: analysis of bacterial community structure by in situ hybridization. *Pest. Manag. Sci.* 61: 863–869.
8. Barriuso E., Houot S. Serra-Wittling C. 1997. Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicides. *Pestic. Sci.* 49: 65–75.
9. Bartkiewicz B. 2002. *Oczyszczanie ścieków przemysłowych*. Warszawa, Wydaw. PWN.
10. Beblo K., Rabbow E., Rachel R., Huber H., Rettberg P. 2009. Tolerance of thermophilic and hyperthermophilic microorganisms to desiccation. *Extremophiles.* 13 (3): 521–531.
11. Behki R.M., Khan S.U. 1994. Degradation of atrazine, propazine and simazine by *Rhodococcus* strain B-30. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1237–1241.
12. Behki R., Topp E., Dick W., Germon P. 1993. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Appl. Environ. Microb.* 59: 1955–1959.
13. Behki R.M., Khan S.U. 1986. Degradation by *Pseudomonas*: n-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 34: 746–749.
14. Beulke S., Brown C.D. 2001. Evaluation of methods to drive pesticide degradation parameters for regulatory modelling. *Biol. Fertil. Soils* 33: 558–564.
15. Bielińska E.J., Pranagal J. 2007. Enzymatic activity of soil contaminated with triazine herbicides. *Pol. J. Environ. Stud.* 16 (2): 295–300.
16. Binks P., Nicklin S., Bruce N. 1995. Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,3-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (4): 1318–1322.
17. Biziuk M. 2001. *Pestycydy – występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*. Warszawa, Wydaw. WNT.
18. Błaszak M., Pelech R., Graczyk P. 2011. Screening of microorganisms for biodegradation of simazine pollution (obsolete pesticide Azotop 50 WP). *Water Air Soil Poll.* 220 (1–4): 373–385.
19. Błaszczyk M. 2009. *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*. Warszawa, Wydaw. PWN.
20. Błaszczyk M. 2010. *Mikrobiologia środowisk*. Warszawa, Wydaw. PWN.

21. Błaszczuk M.K. 2008. Gdzie występują psychrofile? *Post. Mikrobiol.* 47 (3): 207–213.
22. Bouquard C., Ouazzani J., Prome J., Briand Y., Plesiat P. 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 862–866.
23. Bradford S.M., Palmer C.J., Olson B.H. 1994. Assimilable organic carbon concentrations in Southern California surface and groundwater. *Water Res.* 28 (2): 427–435.
24. Bunt J., Rovira A. 1955. Microbiological studies of some sub Antarctic soils. *J. Soil Sci.* 6: 119–128.
25. Bushnell L., Haas H. 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganism. *J. Bact.* 41: 653–673.
26. Cai B., Han Y., Liu B., Ren Y., Jiang S. 2003. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 272–276.
27. Castillo P., Nico A.I., Azcón-Aguilar C., Del Río Rincón C., Calvet C., Jiménez-Díaz R.M. 2006. Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Pathol.* 55 (5): 705–713.
28. Cheng W., Coleman D.C. 1989. A simple method for measuring CO<sub>2</sub> in a continuous air-flow system: Modifications to the substrate – induced respiration technique. *Soil Biol. Biochem.* 21 (3): 385–388.
29. Cork D.J., Krueger J.P. 1991. Microbial transformations of herbicides and pesticides (Review). *Adv. Appl. Microbiol.* 36: 1–66.
30. Dalvie M.A., Africa A., London L. 2006. Disposal of unwanted pesticides in Stellenbosch, South Africa. *Sci. Total Environ.* 361: 8–17.
31. De Souza M.L., Newcombe D., Alvey S., Crowley D.E., Hay A., Sadowsky M.J., Wackett L.P. 1998 a. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 178–184.
32. De Souza M.L., Seffernick J., Martinez B., Sadowsky M.J., Wackett L.P. 1998 b. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* 180: 1951–1954.
33. *Decyzja Komisji nr 2004/247/WE z dnia 10 marca 2004 r. dotycząca niewłoczenia symazyny do załącznika I do dyrektywy Rady 91/414/EWG oraz cofnięcia zezwoleń na środki ochrony roślin zawierające tę substancję czynną. DzU UE L 78 z 2004 r.*
34. Dhal B., Thatoi H., Das N., Pandey B.D. 2010. Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *J. Chem. Technol. Biot.* 85 (11): 1471–1479.
35. Dzierżanowska D. 2008. *Antybiotykoterapia praktyczna*. Bielsko-Biała, Wydaw. Alfa Medica Press.
36. Dzik J. 2011. *Dzieje życia na Ziemi*. Warszawa, Wydaw. PWN.
37. Entry J., Donnelly P., Emmingham W. 1996. Mineralization of atrazine and 2,4-D in soils inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trappea darkeri*. *Appl. Soil Ecol.* 3: 85–90.
38. Fajardo C., Saccà M., Gibello A., Martínez-Iñigo M., Nande M., Lobo C., Martín M. 2012. Assessment of *s*-triazine catabolic potential in soil bacterial isolates applying *atz* genes as functional biomarkers. *Water Air Soil Poll.* 223: 3385–3392.
39. Fang P., Wang L., Zhang X., Shawulieti, Jiang B. 2012. Study on screening microorganisms with resistance to parathion-methyl and degradation characteristics. *Appl. Mech. Mater.* 209–211: 2077–2080.
40. Fernández L., Valverde C., Gómez M. 2013. Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strains from Argentine agricultural soils. *Ann. Microbiol.* 63: 207–214.

41. Fernandez M.D., Perez R.A., Sanchez-Brunete C., Tadeo J.L. 2001. Persistence of simazine and hexazinone in soil. *Fresen. Environ. Bull.* 10: 490–494.
42. FOCUS. 2006. *Guidance document on estimating persistence and degradation kinetics from environmental fate studies on pesticides in EU registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics.* EC Document Reference Sanco/10058/2005. Version 1.0. Brussels, European Commission.
43. Fragoeiro S., Magan S. 2005. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environ. Microbiol.* 7 (3): 348–355.
44. France J., Thornley J.H.M. 1984. *Mathematical models in agriculture.* London, Butterworths.
45. Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation (Review). *Microbiology* 156 (3): 609–643.
46. Giardi M., Giardina M., Filacchioni G. 1985. Chemical and biological degradation of primary metabolism of atrazine by a *Nocardia* strain. *Agricult. Biol. Chem.* 49: 1551–1558.
47. Głazewska-Maniewska R., Maciejewska A., Melech A. 2004. Występowanie bakterii z rodzaju *Arthrobacter* ssp. W uprawie żyta ozimego oraz ich enzymatyczne i antagonistyczne właściwości. *Acta Sci. Pol., Ser. Agricultura* 3 (1): 129–137.
48. Gonzalez-Barreiro O., Rioboo C., Herrero C., Cid A. 2006. Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environ. Pollut.* 144 (1): 266–271.
49. Gounot A. 1967. Role biologique des *Arthrobacter* dans les limons souterrains. *Ann. Inst. Pasteur Paris* 113 (6): 923–945.
50. Govantes F., Porrúa O., García-González V., Santero E. 2009. Atrazine biodegradation in the lab and in the field: enzymatic activities and gene regulation. *Microbial. Biotechnol.* 2 (2): 178–185.
51. Granger R.L., Khanizadeh S., Meheriuk M., Dalpe Y. 1995. Effects of simazine on the mycorrhizal population in soil beneath an apple tree canopy. *Fruit Varieties J.* 49: 90–93.
52. Gregorczyk A. 1991. The logistic function – its application to the description and prognosis of plant growth. *Acta Soc. Bot. Pol.* 60: 67–76.
53. Gregorczyk A., Gawska A., Stolarska A. 2010. Wpływ kadmu na kinetykę wzrostu roślin owsa. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Ser. Agric. Aliment. Pisc. Zootech.* 279 (15): 5–10.
54. Gregorczyk A., Swarczewicz M. 2012. Porównanie wybranych kinetycznych modeli zanikania wybranych herbicydów w glebie. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Ser. Agric. Aliment. Pisc. Zootech.* 293 (21): 27–34.
55. Griffiths B.S., Philippot L. 2013. Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community (Review). *FEMS Microbiol. Rev.* 37 (2): 112–129.
56. Grigg B., Bischoff M., Turco R. 1997. Cocontaminant effects on degradation of triazine herbicides by a mixed microbial culture. *J. Agric. Food Chem.* 45 (3): 995–1000.
57. Grigulis K., Lavorel S., Krainer U., Legay N., Baxendale C., Dumont M., Kastl E., Arnoldi C., Bardgett R., Poly F., Pommier T., Schloter M., Tappeiner U., Bahn M., Clément J.-C. 2013. Relative contributions of plant traits and soil microbial properties to mountain grassland ecosystem services. *J. Ecol.* 101 (1): 47–57.
58. Guenzi W.D., Beard W. E. 1967. Anaerobic biodegradation of DDT to DDD in soil. *Science* 156 (3778): 1116–1117.
59. Gunner H., 1963. Nitrification by *Arthrobacter globiformis*. *Nature* 197: 1127–1128.

60. Hagedorn C., Holt J. 1979. Ecology of soil *Arthrobacter* in Clarion-Webster top sequences of Iowa. *Appl. Microbiol.* 20: 254–258.
61. Hawrot-Paw M. 2011. *Biologiczna aktywność gleb zanieczyszczonych biodieslem oraz możliwości ich rekultywacji*. Szczecin, Wydaw. ZUT.
62. Hawrot-Paw M., Nowak A. 2012. An attempt at mathematical modelling of the process of microbiological biodegradation of diesel oil. *Environ. Prot. Eng.* 38 (3): 23–29.
63. Hayes T., Haston K., Tsui M., Hoang A., Haeffele C., Vonk A. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environ. Health Persp.* 111 (4): 568–575.
64. Hayes T.B., Anderson L.L., Beasley V.R., De Solla S.R., Iguchi T., Ingraham H., Kestemont P., Kniewald J., Kniewald Z., Langlois V.S., Luque E.H., McCoy K.A., Muñoz-De-Toro M., Oka T., Oliveira C.A., Orton F., Ruby S., Suzawa M., Tavera-Mendoza L.E., Trudeau V.L., Victor-Costa A.B., Willingham E. 2011. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes (Review). *J. Steroid Biochem.* 127 (1–2): 64–73.
65. Hayes T.B., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A.A., Vonk A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (8): 5476–5480.
66. Houot S., Barriuso E., Bergheaud V. 1998. Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biol. Biochem.* 30 (14): 2147–2157.
67. Hugenholtz P., Goebel B., Pace N. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180 (18): 4765–4774.
68. Irani Z.A., Mehrnia M.R., Yazdian F., Soheily M., Mohebali G., Rasekh B. 2011. Analysis of petroleum biodesulfurization in an airlift bioreactor using response surface methodology. *Biores. Technol.* 102 (22): 10585–10591.
69. Jaeschke A., Jørgensen S.L., Bernasconi S.M., Pedersen R.B., Thorseth I.H., Früh-Green G.L. 2012. Microbial diversity of Loki's Castle black smokers at the Arctic Mid-Ocean Ridge. *Geobiology* 10 (6): 548–561.
70. Karstensen K.H., Kinh N.K., Thang L.B., Viet P.H., Tuan N.D., Toi D.T., Hung N.H., Quan T.M., Hanh L.D., Thang D.H. 2006. Environmentally sound destruction of obsolete pesticides in developing countries using cement kilns. *Environ. Sci. Policy* 9 (6): 577–586.
71. Klimiuk E., Łebkowska M. 2003. *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Warszawa, Wydaw. PWN.
72. Kłódka D., Nowak J. 2006. Ocena właściwości biochemicznych gleby zanieczyszczonej atrazyną. Oddziaływanie atrazyny zawartej w Gesaprimie 500 FW na aktywność wybranych enzymów glebowych. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol.* 515: 155–163.
73. Kodama T., Ding L., Yoshida M., Yajima M. 2001. Biodegradation of an *s*-triazine herbicide, simazine. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11: 1073–1078.
74. Kolić N., Hrasak D., Begonia A., Petrić I., Stipicevic S., Soulas G. 2007. Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 60: 299–307.
75. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawelczyk A. 2006. *Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska*. Wrocław, Wydaw. PWN.
76. Kontchou C., Gschwind N. 1999. Biodegradation of *s*-triazine compounds by a stable mixed bacterial community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43 (1): 47–56.

77. Kornaros M., Lyberatos G. 2006. Biological treatment of wastewaters from a dye manufacturing company using a trickling filter. *J. Hazard. Mater.* 136: 95–102.
78. Krzanowska H., Łomnicki A., Rafiński J., Szarski H., Szymura J.M. 1997. *Zarys mechanizmów ewolucji*. Warszawa, Wydaw. PWN.
79. Kucharski J., Kucharski M., Borowik A., Wyszowska J. 2011. Liczebność grzybów w glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi. *Rocz. Glebozn.* 62: 256–264.
80. Kulkarni M.A., Chaudhari A.B. 2006. Biodegradation of p-nitrophenol by *P. putida*. *Biores. Technol.* 97: 982–988.
81. Kunicki-Goldfinger W. 2007. *Życie bakterii*. Warszawa, Wydaw. PWN.
82. Lacey J. 1997. *Actinomycetes* in compost. *Ann. Agric. Environ. Med.* 4: 113–121.
83. Lapertot M., Ebrahimi S., Dazio S., Rubinelli A., Pulgarin C. 2007. Photo-Fenton and biological integrated process for degradation of a mixture of pesticides. *J. Photoch. Photobiol. A* 186: 34–40.
84. Li W., Tang H., Liu Q., Xing J., Li Q., Wang D., Yang M., Li X., Liu H. 2009. Deep desulfurization of diesel by integrating adsorption and microbial method. *Biochem. Eng. J.* 44 (2–3): 297–301.
85. Liberatore L., Bressan M., Belli C., Lustrato G., Ranalli G. 2012. Chemical and biological combined treatments for the removal of pesticides from wastewaters. *Water Air Soil Poll.* 223 (8): 4751–4759.
86. Mandelbaum R., Allan D., Wackett L. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. That mineralizes the *s*-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microb.* 61: 1451–1457.
87. Marecik R., Króliczak P., Czaczyk K., Białas W., Olejnik A., Cyplik P. 2008. Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.). *Biodegradation* 19: 293–301.
88. Martin J.P. 1950. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi, *Soil Sci.* 69: 215–233.
89. Martínez J. 2004. Practical guideline on environmentally sound management of obsolete pesticides, in: *Basel convention coordinating centre for Latin America and the Caribbean*. Red. S. Aguinaga Montevideo, Uruguay, [b.w.].
90. Martin-Montalvo D., Mengs G., Ferrer E., Allende J. L., Alonso R., Martin M. 1997. Simazine degradation by immobilized and suspended soil bacterium. *Int. Biodeter. Biodegr.* 40 (2–4): 93–99.
91. Martyniuk S. 2011. Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. *Post. Mikrobiol.* 50 (4): 321–328.
92. Matyjaszczyk E. 2008. Rejestracja środków ochrony roślin w Polsce – uwarunkowania i stan aktualny. *Prog. Plant Prot.* 48 (1): 34–40.
93. Michalcewicz W., Swarczewicz M., Praczyk T. 2004. Wpływ wybranych adiuwantu PGA-031 z atrazyną na mikroflorę glebową. *Prog. Plant Prot.* 44 (2): 952–956.
94. Michalcewicz W., Wieczorek T., Swarczewicz M., Praczyk T. 2006. Wpływ adiuwantu Adpros 850 SL i Adopolan 80 EC z atrazyną na liczebność drobnoustrojów glebowych. *Zesz. Probl. Postę. Nauk Rol.* 515: 281–287.
95. Michaud L., Caruso C., Mangano S., Interdonato F., Bruni V., Lo Giudice A. 2012. Predominance of *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Polaromonas* within the prokaryotic community of freshwater shallow lakes in the northern Victoria Land, East Antarctica. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82 (2): 391–404.
96. Miyahara M., Kim S.-W., Fushinobu S., Takaki K., Yamada T., Watanabe A., Miyauchi K., Endo G., Wakagi T., Shoun H. 2010. Potential of aerobic denitrification by *Pseudomonas*

- stutzeri* TR2 to reduce nitrous oxide emissions from wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (14): 4619–4625.
97. Monard C., Martin-Laurent F., Vecchiato C., Francez A.J., Vandenkoornhuyse P., Binet F. 2008. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biol. Biochem.* 40 (9): 2253–2259.
  98. Morgante V., Lopez-Lopez A., Flores C., Gonzalez M., Gonzalez B., Vasquez M., Rossello-Mora R., Seeger M. 2010. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71: 114–126.
  99. Nagy I., Compennolle F.M., Ghys K., Vanderleyden J., De Mot R. 1995. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (s ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain N186/21. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2056–2060.
  100. Naidoo V., Buckley C.A. 2003. *Survey of pesticide wastes in South Africa and review of treatment options*. WRC Report No. 1128/1/03. Pretoria: WRC, 64.
  101. Nicholls P.H., Briggs G.G., Evans A.A. 1984. The influence of water solubility on the movement and degradation of simazine in a fallow soil. *Weed Res.* 24: 37–50.
  102. Nishimura K., Yamamoto M., Nakagomi T., Takiguchi Y., Naganuma T., Uzuka Y. 2002. Biodegradation of triazine herbicides on polyvinylalcohol gel plates by the soil yeast *Lipomyces Starkeyi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 848–852.
  103. Nishino S.F., Spain J.C. 1993. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2520–2525.
  104. Nowak A. 1986. Pomiar oddychania w ocenie wpływu czynników środowiskowych na mikroflorę glebową. *Post. Mikrobiol.* 25 (3/4): 273–281.
  105. Nowak J. 1995. Dynamika biologicznego i abiotycznego rozkładu niektórych herbicydów w glebie oraz ich wpływ na ilość biomasy żywych drobnoustrojów. *Rozpr. AR Szczec.* 169.
  106. Ostrowska A., Gawliński S., Szczubiałka Z. 1991. *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*. Warszawa, Wydaw. IOŚ.
  107. Pandey R.A., Raman V.K., Bodkhe S.Y., Handa B.K., Bal A.S. 2005. Microbial desulphurization of coal containing pyritic sulphur in a continuously operated bench scale coal slurry reactor. *Fuel* 84 (1): 81–87.
  108. Paraszkiwicz K., Długoński J. 2007. Wykorzystanie drobnoustrojowych surfaktantów do usuwania metali ciężkich z gleby. *Biotechnologia* 2 (77): 81–94.
  109. Perkowski J., Sidor M. 2007. Badania rozkładu niejonowych związków powierzchniowo czynnych w wybranych procesach pogłębionego utleniania. *Ochr. Środ.* 29 (1): 19–25.
  110. Petruska J.A., Mulling D.E., Young R.W., Collins E.R. 1985. A benchtop system for evaluation of pesticide disposal by composting. *Nucl. Chem. Waste Man.* 5: 177–182.
  111. PN-ISO 10390: 1997. Jakość gleby. Oznaczanie pH.
  112. Podgórska B. 2000. Nieprzydatne środki ochrony roślin – co zrobić z niebezpieczną spuścizną? *Ochr. Rośl.* 10: 33–34.
  113. Przybulewska K., Michałowska S., Błaszak M., Stolarska A. 2011. Growth of soil fungi on culture media contaminated with selected herbicides. *Ecol. Chem. Eng.* 18 (7): 959–966.
  114. Przybulewska K., Sienicka K. 2008. Rozkład atrazyny przez drobnoustroje wyizolowane z gleby wieloletnich doświadczeń herbicydowych. *Ecol. Chem. Eng.* 15 (4): 491–498.

115. Przybulewska K., Taborska J. 2008. Próba określenia odporności drobnoustrojów zasiedlających gleby zanieczyszczone substancjami triazynowymi na różne grupy herbicydów. *Ecol. Chem. Eng.* 15 (3): 359–374.
116. PTG. 2008. *Klasyfikacja uziarnienia gleb i utworów mineralnych*. [http://www.ptg.sggw.pl/images/Uziarnienie\\_PTG\\_2008.pdf](http://www.ptg.sggw.pl/images/Uziarnienie_PTG_2008.pdf), dostęp dn. 19.07.2013 r.
117. Radosevich M., Hao Y.-L., Traina S.J., Tuovinen O.H. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 297–302.
118. Ralebitso T., Senior E., Verseveld H. 2002. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation* 13: 11–19.
119. Ralebitso-Senior T.K., Senior E., Di Felice R., Jarvis K. 2012. Waste gas biofiltration: Advances and limitations of current approaches in microbiology. *Environ. Sci. Technol.* 46 (16): 8542–8573.
120. Roberge M., Hakk H., Larsen G. 2004. Atrazine is a competitive inhibitor of phosphodiesterase but does not affect the estrogen receptor. *Toxicol. Lett.* 154 (1–2): 61–68.
121. Rojas-Avelizapa N.G., Rodríguez-Vázquez R., Martínez-Cruz J., Esparza-García F., De Oca-García A.M., Ríos-Leal E., Fernández-Villagómez G. 1999. Isolation and characterization of bacteria degrading polychlorinated biphenyls from transformer oil. *Folia Microbiol.* 44 (3): 317–321.
122. Rouatt J., Katznelson H. 1961. A study of the bacteria on the root surface and in rhizosphere soil of crop plants. *J. Appl. Bact.* 24: 164–171.
123. Rousseaux S., Hartman A., Soulas G. 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 36: 211–222.
124. Różański L. 1992. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. Warszawa, Wydaw. PWRiL.
125. *Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 27 września 2001 r. w sprawie katalogu odpadów*. DzU z 2001 r., nr 112, poz. 1206.
126. Różycki H., Strzelczyk E. 1985. Połączenia organiczne wydzielane przez drobnoustroje glebowe i korzenie roślin. *Post. Mikrobiol.* 14 (4): 285–303.
127. Salyers A., Whitt D. 2010. *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*. Warszawa, Wydaw. PWN.
128. Samanta S., Singh O., Jain R. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20 (6): 243–247.
129. Sánchez M., Garbi C., Martínez-Álvarez R., Ortiz L., Allende J., Martín M. 2005. *Klebsiella planticola* strain DSZ mineralizes simazine: physiological adaptations involved in the process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 589–596.
130. Schopf J. W. 2006. *Kolebka życia*. Warszawa, Wydaw. PWN.
131. Scott C., Pandey G., Hartley C.J., Jackson C.J., Cheesman M.J., Taylor M.C., Pandey R., Khurana J.R., Teese M., Coppin C.W., Weir K.M., Jain R.K., Lal R., Russell R., Oakeshott J.G. 2008. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48: 65–79.
132. Scribner E.A., Thurman E.M., Zimmerman L.R. 2000. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *Sci. Total Environ.* 248 (2–3): 157–167.
133. Sharma A., Kawarabayasi Y., Satyanarayana T. 2012. Acidophilic bacteria and archaea: Acid stable biocatalysts and their potential applications (Review). *Extremophiles* 16 (1): 1–19.
134. Shen J., Obin M.S., Zhao L. 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance (Review). *Mol. Aspects Med.* 34 (1): 39–58.



135. Skoczko I., Ignatowicz K. 2004. The influence of selected environmental toxins on the speed of decomposition of organic compounds in processes of oxygen biodegradation. *Pol. J. Environ. Stud.* 13 (2): 219–222.
136. *Słownik języka polskiego*. 1982. Red. M. Szymczak. Warszawa, Wydaw. PWN.
137. Solanki M.K., Robert A.S., Singh R.K., Kumar S., Pandey A.K., Srivastava A.K., Arora D.K. 2012. Characterization of mycolytic enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Curr. Microbiol.* 65 (3): 330–336.
138. Stobiecki S., Giza I., Siłowiecki A., Broda K. 1998. Rozkład środków ochrony roślin w odciekach z mogilnika w Niedźwiedzicach przy użyciu preparatów bakteryjnych. *Prog. Plant Prot.* 38 (2): 568–571.
139. Stobiecki S., Siłowiecki A. 1997. Likwidacja odpadów pestycydowych metodami termicznymi – wymagania ekologiczne i technologiczne. *Ochr. Rośl.* 12: 14–15.
140. Stobiecki S., Waleczek K. 2004. Prawne i praktyczne aspekty likwidacji odpadów pestycydowych. *Prog. Plant Prot.* 44 (1): 430–437.
141. Stoker T.E., Robinette C.L., Cooper R.L. 1999. Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling- induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicol. Sci.* 52 (1): 68–79.
142. Strong L., Rosendahl C., Johnson G., Sadowsky M., Wackett L. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse *s*-triazine ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (12): 5973–5980.
143. Struthers J., Jayachandran K., Moorman T. 1998. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3368–3375.
144. Subashchandrabose S.R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. 2013. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation (Review). *Environ. International.* 51: 59–72.
145. Sugumar S., Mudhoo A., Ganesan S., Arumugam K., Ravi A.M., Muthunarayanan V. 2012. Vermicomposting of vegetable and fruit wastes-effects of bioaugmentation on process parameters and manural value of composts. *J. Solid Waste Technol. Manage* 38 (4): 240–248.
146. Swarcewicz M., Skórska E. 2006. Wpływ adiutantów na desorpcję atrazyny z długo zalegających pozostałości w glebie. *Prog. Plant Prot.* 46 (2): 284–287.
147. Swisher R.D. 1967. Biodegradation of LAS benzene rings in activated sludge. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 44 (12): 717–724.
148. Taylor S.C. 2003. Epidemiology of skin diseases in ethnic populations (Review). *Dermatol. Clin.* 21 (4): 601–607.
149. Tesar M., Reichenauer T., Sessitsch A. 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biol. Biochem.* 34: 1883–1892.
150. Topp E. 2001. A comparison on three atrazine – degrading bacteria for soil bioremediation. *Biol. Fert. Soils.* 33: 529–534.
151. Topp E., Mulbry W., Zhu H., Nour S., Cuppels D. 2000 a. Characterization of *s*-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides sp.* isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3134–3141.
152. Topp E., Zhu H., Nour S., Houot S., Lewis M., Cuppels D. 2000 b. Characterization of an atrazine degrading *Pseudaminobacter sp.* isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2773–2782.

153. Tsapko V.G., Chudnovets A.J., Sterenbogen M.J., Papach V.V., Dutkiewicz J., Skórska C., Krysińska-Traczyk E., Golec M. 2011. Exposure to bioaerosols in the selected agricultural facilities of the Ukraine and Poland – A review. *Ann. Agr. Env. Med.* 18 (1): 19–27.
154. Uchwała Rady Ministrów z dnia 24 grudnia 2010 r. w sprawie “Krajowego planu gospodarki odpadami 2014”. MP z 2010 r., nr 101, poz. 1183.
155. Uchwała Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 22 maja 2009 r. w sprawie przyjęcia dokumentu “Polityka ekologiczna Państwa w latach 2009–2012 z perspektywą do roku 2016”. MP z 2009 r., nr 34, poz. 501.
156. Udiković-Kolić N., Scott C., Martin-Laurent F. 2012. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96: 1175–1189.
157. Vaishampayan P., Kanekar P., Dhakephalkar P. 2007. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 60: 273–278.
158. Van Andel T.H. 2010. Nowe spojrzenie na starą planetę. Zmienne oblicze Ziemi. Warszawa, Wydaw. PWN.
159. Vibber L.L., Pressler M.J., Colores G.M. 2007. Isolation and characterization of novel atrazine degrading microorganisms from an agricultural soil. *Appl. Microbiol. Biot.* 75 (4): 921–928.
160. Vink J.P.M., Van-Der-Zee S.E.A.T.M. 1997. Pesticide biotransformation in surface waters: Multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Res.* 31: 2858–2868.
161. Vogel J.R., Majewski M.S., Capel P.D. 2008. Pesticides in rain in four agricultural watersheds in the United States. *J. Environ. Qual.* 37 (3): 1101–1115.
162. Vorholt J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere (Review). *Nat. Rev. Microbiol.* 10 (12): 828–840.
163. Wang J., Zhu L., Liu A., Ma T., Wang Q., Xie H., Wang J., Jiang T., Zhao R. 2011. Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine. *Environ. Geochem. Health.* 33: 259–266.
164. Wang Q., Xi S. 2012. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *Int. Biodeter. Biodegr.* 71: 61–66.
165. Wang Q., Xie S., Hu R. 2013. Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 77: 63–67.
166. Widrig D., Boopathy R., Manning J.Jr. 1997. Bioremediation of TNT-contaminated soil: a laboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1141–1148.
167. Yanze-Kontchou C., Gschwind N. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4297–4302.
168. Zhang X., Li X., Zhang C., Li X., Zhang H. 2011. Ecological risk of long-term chlorimuron-ethyl application to soil microbial community: An in situ investigation in a continuously cropped soybean field in Northeast China. *Environ. Sci. Pollut. R.* 18 (3): 407–415.



## Summary

### Propagation in the environment of microorganisms biodegrading the simazine

An active substance – simazine (6-chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine), withdrawn from trading, was selected for research. It is contained in Azotop 50 WP herbicide. The herbicide was obtained from a private farm where it was stored together with other useless agents, making up potential threat for the environment. The simazine is a substance subject to biodegradation and therefore a trial of biological neutralisation of this xenobiotic was undertaken.

In the first stage of research, simazine's impact was assessed on microorganisms, their number and the rate of carbon dioxide release. In the second stage, selected objects were tested (30 different environmental materials) as to microorganisms content capable of simazine biodegrading. Then, bacteria isolates obtained from soils were cultivated in laboratory conditions and their ability to biodegrade simazine was assessed. Single and multi-strain inoculates were tested, as well as their combinations as to the capacity to biodegrade simazine. The efficiency of the biodegradation process was compared after the application of various doses of simazine (50–200 mg·dm<sup>-3</sup>), and during incubation of the bacteria culture at the temperatures of 18 and 28°C. Kinetics of simazine biodegradation in the periodic bacteria culture were described, i.e. the period of elimination half-life of simazine  $DT_{50}$  (h) was established together with the determination of the maximum theoretical velocity of decomposition  $-dC/dt$  (mg·dm<sup>-3</sup>·h<sup>-1</sup>), and the average rate of simazine degradation  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  (mg·dm<sup>-3</sup>·h<sup>-1</sup>) with the help of a logistic function. The coefficients of the logistic models were estimated numerically with the Levenberg-Marquardt method, with the use of Statistica 9 statistic package.

The number of bacteria and fungi and the rate of carbon dioxide release by microorganisms depended first of all upon the simazine dose applied. In most objects, after the application of simazine in doses of 100 and 300 mg·kg<sup>-1</sup>, the number of bacteria and fungi and the rate of breathing did not change to a statistically material extent. However, the impact of simazine in the dose of 500 mg·kg<sup>-1</sup> in most objects changed the values of parameters being tested to a statistically material extent. Only in three cases (per 30 objects), microorganisms, independently upon the dose and feature being tested, responded similarly to simazine. In two objects (in the sample of loam collected from a meadow in the village of Warzymice and in the sample of loam collected from the Odra River bank in the village of Siadło Dolne), no statistically material impact of simazine was found out, neither on bacteria and fungi, nor on the rate of carbon dioxide release rate. In these objects, microorganisms were resistant to simazine as in no case, statistically material increase or reduction in the values of parameters with reference to the control object were noted. Only in one object (in the sample of sand collected from the beach in the Słowiński National Park) did the value of parameters being tested always change after the application of simazine. In the remaining objects, depending upon the dose of simazine and the parameters being tested, the response of microorganisms to simazine was differentiated.

Therefore, we may not establish unambiguously whether the microorganisms are susceptible or resistant to simazine.

The organic substance contained in the test materials neutralised the adverse impact of simazine on microorganisms (in the case of a  $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dose). In objects containing an organic substance at an amount below  $40 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , the simazine had a statistically material impact on the values of parameters being tested. However, following the growth of organic substance in the content of objects, the impact of simazine was more frequently statistically immaterial. It was not found out whether the content of the organic substance in the objects had an impact on the response of microorganisms to the simazine applied in smaller doses ( $100$  and  $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Microorganisms capable of simazine biodegrading are not widespread in the environment. Only in 7 objects (per 30) was the presence of microorganisms capable of simazine biodegrading found out. They were detected in samples collected in the Szczecin-Północ District (in the Leśny Park in Mścięcino, in Przęsocin), in the samples collected in the Szczecin-Zachód District (in Krzekowo, in the Leśny Arkoński Park, in the Kasprowicza Park) and in samples obtained from places outside the current boundaries of Szczecin (in Siadło Dolne, Przeclaw). It was not noted that the distance between the places where the samples were collected had any impact on the propagation of features which give the microorganisms the capacity to biodegrade the simazine. Although some places where the test material was collected were distant from each other only by a dozen or so metres, in one sample the presence of microorganisms capable of simazine biodegrading was found out and in another one were not. In all districts of Szczecin (Szczecin Północ, Zachód, Śródmieście, Prawobrzeże), amongst the materials collected, there were such which contained microorganisms able to biodegrade simazine and those which did not.

The resistance to simazine does not guarantee microorganisms the capacity to biodegrade it. Quite frequently, in the objects which contained bacteria and/or fungi resistant to simazine (whose number was not subject to material changes) or in the objects which contained microorganisms which were stimulated for growth in its presence, no presence of any microorganisms able to biodegrade simazine was ascertained.

Amongst all versions of single-strain and multi-strain inoculates, the quickest and most efficient to break down simazine was an inoculate which contained bacteria both of *Arthrobacter* and *Pseudoxanthomona* types. The X-4 strain, belonging to the *Arthrobacter* type, as well as the bacteria belonging to *Pseudoxanthomonas mexicana*, were isolated from the material made from soil and organic layer, collected in the park in Mścięcino. In the case of this bacteria culture, the half-life time of the simazine ( $DT_{50}$ ), introduced to the substrate in a dose of  $100 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , was 20,3 hours (in  $28^\circ\text{C}$ ), and the maximum rate of simazine biodegradation ( $-dC/dt$ ) was  $8,4 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ . The CK6 strain identified as *Stenotrophomonas* sp., was also efficient in the simazine biodegradation. It biodegraded the simazine independently. The strain came from the material collected in the Leśny Arkoński Park in Szczecin. In the culture of bacteria belonging to *Stenotrophomonas* sp. the half-life of simazine was 48,4 hours (in  $28^\circ\text{C}$ ), and the maximum rate of simazine biodegradation was  $7 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ .

The key role in the simazine biodegradation was played by the temperature, and its dose had a smaller impact on the rate of simazine disappearance. The rate of simazine biodegradation (measured by the time of simazine half-life in the  $DT_{50}$  culture) was accelerated on average by a few full days and nights after an increase in the temperature by  $10^\circ\text{C}$ . An increase in the simazine dose by 50, and even  $100 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  slowed down the process rate only by a few to a dozen or so hours and even not in every case.

## Zusammenfassung

### Ausbreitung in der Umwelt von Mikroorganismen, die das Simazin biologisch abbauen

Für die Untersuchungen wurde die aus dem Handelsverkehr zurückgezogene Aktivsubstanz Simazin (6-Chlor-N,N'-diethyl-1,3,5-triazin-2,4-diamin) gewählt, die im Herbizid Azotop 50 WP enthalten ist. Das Herbizid stammte aus einer privaten Landwirtschaft, wo es gemeinsam mit anderen unbrauchbaren Mitteln gelagert wurde und eine potenzielle Gefahr für die Umwelt darstellte. Das Simazin ist eine biologisch abbaubare Substanz und aus diesem Grund wurde ein Versuch unternommen dieses Xenobiotikum biologisch zu entsorgen.

In der ersten Forschungsetappe bewertete man den Einfluss von Simazin auf Mikroorganismen, deren Menge und das Tempo der Ausscheidung von Kohlendioxid. In der zweiten Etappe wurden Versuchsobjekte (30 differenzierte Umweltstoffe) hinsichtlich des Gehalts an Mikroorganismen getestet, die in der Lage sind das Simazin biologisch abzubauen. Anschließend wurden die aus den Böden gewonnenen Bakterienisolate unter Laborbedingungen gezüchtet und deren Fähigkeit zum biologischen Abbauen von Simazin bewertet. Es wurden ein- und mehrstämmige Inokulate und deren Kombinationen hinsichtlich deren Fähigkeit zum biologischen Abbauen von Simazin getestet. Es wurde die Effektivität des Bioabbauprozesses nach der Anwendung von verschiedenen Simazin-Dosen ( $50\text{--}200\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) und während der Inkubation der Zucht bei Temperaturen von  $18$  und  $28^\circ\text{C}$  verglichen. Die Kinetik des Bioabbaus von Simazin in einer Batch-Kultur, d. i. die Bestimmung der Halbwertszeit von Simazin  $DT_{50}$  (h), die Bestimmung der maximalen theoretischen Geschwindigkeit der Zersetzung  $-dC/dt$  ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ) und des mittleren Abbautempos von Simazin  $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$  ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ), wurden mit Hilfe einer logistischen Funktion beschrieben. Die Kennzahlen des logistischen Modells wurden numerisch nach der Levenberg-Marquardt-Methode estimiert, wofür die Statistik-Software Statistica 9 eingesetzt wurde.

Die Menge von Bakterien und Pilze als auch das Tempo der Kohlendioxid-Ausscheidung durch Mikroorganismen hingen vor allem von der angewendeten Simazin-Dosis ab. Nach dem Anwenden von Simazin in Dosen von  $100$  und  $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  änderten sich in den meisten Objekten die Mengen von Bakterien und Pilzen als auch das Tempo der Atmung statistisch in keinem wesentlichen Maße. Der Einfluss von Simazin in einer Dosis von  $500\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  änderte dagegen im statistisch wesentlichen Maße die Werte von untersuchten Parametern in den meisten Objekten. Lediglich in drei Fällen (aus 30 Objekten) reagierten Mikroorganismen auf Simazin unabhängig von der Dosis und der untersuchten Eigenschaft in ähnlicher Weise. In zwei Objekten (in einer Probe des sandigen Tons, die aus einer Wiese im Dorf Warzymice entnommen wurde und in einer Probe des sandigen Tons, die aus dem Oder-Ufer im Dorf Siadło Dolne entnommen wurde) wurde kein statistisch wesentlicher Einfluss von Simazin weder auf die Menge von Bakterien und Pilzen noch auf das Tempo der Ausscheidung des Kohlendioxides festgestellt. In diesen Objekten waren die Mikroorganismen gegen Simazin beständig, weil in keinem der Fälle weder eine statistisch wesentliche Zunahme noch eine Verringerung der

Parameterwerte im Vergleich mit dem Kontrollobjekt verzeichnet wurde. Nur in einem Objekt (in der Sandprobe entnommen am Strand im Słowiński Nationalpark) änderte sich immer der Wert von untersuchten Parametern nach dem Einsatz von Simazin. In sonstigen Objekten, in Abhängigkeit von der Simazindosis und dem untersuchten Parameter, war die Reaktion von Mikroorganismen auf Simazin unterschiedlich; deswegen kann man nicht eindeutig feststellen, ob diese Mikroorganismen gegen Simazin empfindlich oder beständig sind.

Organische Substanz, die in untersuchten Stoffen enthalten war, neutralisierte eine negative Einwirkung von Simazin auf Mikroorganismen (im Fall der Dosis von  $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ). In Objekten, die organische Substanz in einer Menge von niedriger als  $40 \text{ g kg}^{-1}$  enthielten, beeinflusste das Simazin in einem statistisch wesentlichen Maße die Werte von untersuchten Parametern. Dagegen mit der Zunahme des Gehalts an organischer Substanz in Objekten war der Einfluss von Simazin häufiger statistisch unbedeutend. Es konnte nicht festgestellt werden, dass der Gehalt einer organischen Substanz in Objekten einen Einfluss auf die Reaktion von Mikroorganismen auf das in kleineren Dosen angewendete Simazin ( $100$  i  $300 \text{ mg kg}^{-1}$ ) hatte.

Mikroorganismen, die zum biologischen Abbau von Simazin fähig sind, sind in der Umwelt nicht verbreitet. Lediglich in 7 Objekten (aus 30) wurde die Anwesenheit von Mikroorganismen entdeckt, die zum Bioabbau von Simazin fähig sind. Sie wurden in Proben entdeckt, die im Stadtviertel Szczecin-Nord (im Waldpark in Mścięcín, Przęsocin) entnommen wurden, in Proben, die im Wohnviertel Szczecin-West (Krzekowo, Waldpark Arkoński, Kasprowicz-Park) und in Proben, die an Stellen gewonnen wurden, die außerhalb von gegenwärtigen Grenzen von Szczecin liegen (Siadło Dolne, Przeclaw). Es konnte nicht festgestellt werden, dass die Entfernung zwischen den Entnahmestellen der Proben einen Einfluss auf die Ausbreitung der Eigenschaft hatte, die den Mikroorganismen die Fähigkeit zum Bioabbau von Simazin verleihen würde. Trotz der Tatsache, dass manche Entnahmestellen des Forschungsmaterials voneinander lediglich um ein Dutzend Meter entfernt waren, stellte man in einer Probe die Anwesenheit von Mikroorganismen fest, die zum Bioabbau von Simazin fähig sind und in der anderen keine Anwesenheit von solchen Mikroorganismen. In allen Wohnvierteln Szczecins (Nord, West, Mitte, rechtes Ufer) gab es unter den entnommenen Materialien solche, die das Simazin biologisch abbauenden Mikroorganismen enthielten, als auch solche, die keine solche Fähigkeit hatten.

Die Beständigkeit gegen Simazin garantiert den Mikroorganismen keine Fähigkeit dieses biologisch abzubauen zu können. In Objekten, die Bakterien und/oder Pilze enthalten, die gegen Simazin beständig sind (deren Menge keinen wesentlichen Änderungen unterlag) oder in Objekten, die Mikroorganismen enthielten, die geradezu zum Wachstum in seiner Anwesenheit stimuliert wurden, konnte keine Anwesenheit von Mikroorganismen festgestellt werden, die zum Bioabbau von Simazin fähig sind.

Aus allen Versionen von ein- und mehrstämmigen Inokulaten wurde das Simazin am schnellsten und am effektivsten durch das Inokulat zersetzt, welches gemeinsam Bakterien der Art *Arthrobacter* und *Pseudoxanthomonas* enthielt. Der Stamm X-4, welcher zu der Art *Arthrobacter* gehört, als auch Bakterien, die zu der Art *Pseudoxanthomonas mexicana* gehören, wurden aus dem Material isoliert, welches aus dem Boden und einer organischen Schicht gebildet wurde, die im Park in Mścięcín entnommen wurden. Im Fall der Zucht von diesen Bakterien betrug die Halbwertszeit von Simazin ( $DT_{50}$ ), das in den Nährboden in einer Dosis

von  $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  eingeführt wurde, 20,3 Stunden (bei  $28^\circ\text{C}$ ) und das maximale Tempo des Bioabbaus von Simazin ( $-dC/dt$ ) betrug  $8,4 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ . Die Wirksamkeit beim Bioabbau von Simazin zeigte auch der Stamm CK6, welcher als *Stenotrophomonas* sp. identifiziert wurde und welcher das Simazin selbständig biologisch abbaut. Der Stamm stammte aus dem im Waldpark Arkoński in Szczecin entnommenen Material. Im Fall der Zucht von den zum *Stenotrophomonas* sp. gehörenden Bakterien betrug die Halbwertszeit von Simazin 48,4 Stunden (bei  $28^\circ\text{C}$ ) und das maximale Tempo des Bioabbaus von Simazin  $7 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ .

Die Schlüsselrolle beim Bioabbau von Simazin spielte die Temperatur, einen kleineren Einfluss auf das Tempo des Verschwindens von Simazin hatte dagegen seine Dosis. Das Tempo des Bioabbaus von Simazin (gemessen mit der Halbwertszeit von Simazin  $DT_{50}$  in der Zucht) beschleunigte durchschnittlich um einige Tage nach der Erhöhung der Temperatur um  $10^\circ\text{C}$ . Die Erhöhung der Simazindosis um 50 oder sogar um  $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  verlangsamte das Tempo des Prozesses lediglich um einige bis ein Dutzend Stunden und dies nicht in jedem Fall.



Biblioteka Główna  
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu  
Technologicznego w Szczecinie

**CZ.56288**



001-056288-00-0

CZ 15.03

ISBN 978-83-7663-164-6