

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 biodegradowujących 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 ₂ przez mikroorganizmy.....	23
3.4.2. Ocena zdolności mikroorganizmów do biodegradacji symazyny	24
3.4.2.1. Ocena obiektów badawczych pod względem obecności mikroorganizmów biodegradowujących symazynę.....	24
3.4.2.2. Ocena obiektów badawczych pod względem liczebności mikroorganizmów biodegradowujących symazynę.....	24
3.4.2.3. Izolacja, hodowla bakterii oraz ustalanie najefektywniejszego zestawu mikroorganizmów biodegradowujących 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 ₂ 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.

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⁻³), 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⁻³·h⁻¹), and the average rate of simazine degradation $\langle -\Delta C/\Delta t \rangle$ (mg·dm⁻³·h⁻¹) 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⁻¹, 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⁻¹ 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°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°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°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°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 mg kg^{-1}). In Objekten, die organische Substanz in einer Menge von niedriger als 40 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 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°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°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°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.