

Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza w centralnej części Gór Świętokrzyskich

Microbiological air pollution in central part of Swietokrzyskie Mountains

WIOLETTA ADAMUS-BIAŁEK¹, MONIKA WAWSZCZAK²,
MAREK JÓŹWIAK¹

Summary. The aim of the described experiment was the microbiological analysis of the air filters. The filters were monthly placed in APSA370 analyzer in Monitoring Station of the Department of Environment Protection and Modelling Jan Kochanowski University on Saint Cross in the Swietokrzyskie Mountains. Studies was carried out during the period from winter and summer. All samples was incubated on various microbiological media under different growth conditions. The isolated bacterial strains were taxonomic different. The strains was classified by Gram staining and biochemical tests. Most of bacteria was classified as mesophilic heterotrophs. Presented results confirmed that air filters are the useful materials to isolate microorganisms which could possess some unique factors for adapt to environment. Also air filters can be used to metagenomic analysis of microorganisms transferred by air flowing on large heights.

Słowa kluczowe: bioaerozole, mezofile, zanieczyszczenia powietrza

Key words: bioaerosols, mesophilic bacteria, air pollution

¹ **Wioletta Adamus-Białek, Marek Józwiak**, *Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce, wioletta.adamus-bialek@ujk.edu.pl.*

² **Monika Wawszczak**, *Studia magisterskie, Biotechnologia, Instytut Chemii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce.*

WPROWADZENIE

Do powietrza atmosferycznego dostaje się wiele substancji pochodzących z różnych źródeł. Mogą to być pary, pyły organiczne i nieorganiczne, inne gazy oraz mikroorganizmy, tworząc tzw. zanieczyszczenia atmosfery (Adamiak, Kołwzan 2001). Zanieczyszczenia te mogą być wynikiem funkcjonowania okręgów przemysłowych i bytowych człowieka (Berleć i in. 2009, Bożko 1991, Toffel, Wolski 1996). Oprócz materii nieożywionej znajdują się także liczne mikroorganizmy, mimo że powietrze nie jest dla nich sprzyjające (Libudzisz i in. 2007). Każde z tych źródeł zanieczyszczeń, z mniejszym lub większym udziałem, wywiera swój negatywny wpływ na środowisko (Błaszczak 2009, Józwiak 2001).

Obecność drobnoustrojów w powietrzu jest naturalnym zjawiskiem pod warunkiem, że nie przekracza norm jakościowych i ilościowych. Liczba drobnoustrojów w powietrzu atmosferycznym utrzymuje się na poziomie od kilku do 10^7 jtk/m³ (liczba jednostek tworzących kolonie w metrze sześciennym) w zależności od miejsca, pory roku, wysokości terenu i innych czynników (Libudzisz i in. 2007). Dotychczas wyizolowano około 1200 gatunków bakterii i ponad 40 000 gatunków grzybów. Dominującą mikroflorą są grzyby strzępkowe, które stanowią około 70% wszystkich mikroorganizmów. Liczba pleśni w znacznym stopniu zależy od pory roku, najwięcej obserwuje się w miesiącach letnich, średnio $10^2 - 10^3$ jtk/m³ powietrza, natomiast w najmniejszych ilościach w grudniu i styczniu, z reguły $10 - 10^2$ jtk/m³. Ponadto obserwuje się sezonową dominację określonych rodzajów grzybów strzępkowatych. Maksymalne stężenie popularnych aeroalergenów z rodzaju *Cladosporium* i *Alternaria* stwierdza się w lipcu i sierpniu. Spory tych grzybów stanowią wtedy ponad 90% wszystkich spor obecnych w powietrzu atmosferycznym. Udział ilościowy bakterii waha się od 18 do 20% wszystkich drobnoustrojów. Najczęściej spotykane są bakterie saprofityczne z rodzaju *Micrococcus* i *Bacillus*. Bakterie z rodzaju *Micrococcus* stanowią od 30 do 70% wszystkich bakterii obecnych w powietrzu, a przetrwalnikujące *Bacillus* – 20 do 60%. Zwykle około 5% bakterii wyizolowanych z powietrza stanowią promieniowce, pochodzące głównie z gleby (Kołwzan i in. 2005, Krzysztofik 1992, Libudzisz i in. 2007).

Większość mikroorganizmów obecnych w powietrzu występuje w postaci bioaerozoli (Adamiak, Kołwzan 2001). Bioaerozol jest to układ dwu- lub trójfazowy, składający się z fazy rozpraszającej (powietrze) oraz rozproszonej (stałej lub ciekłej), zawierającej drobnoustroje. Faza rozproszona bioaerozolu składa się z drobnych cząsteczek wody, substancji organicznych pochodzących od człowieka i zwierząt oraz cząstek stałych: nasion, pyłków roślin, kurzu, komórek wegetatywnych i przetrwalników bakterii, fragmentów strzępek grzybów i zarodników komórek drożdży i wirusów. Zawiera również endotoksyny oraz produkty metabolizmu grzybów – cząsteczki miktotoksyn,

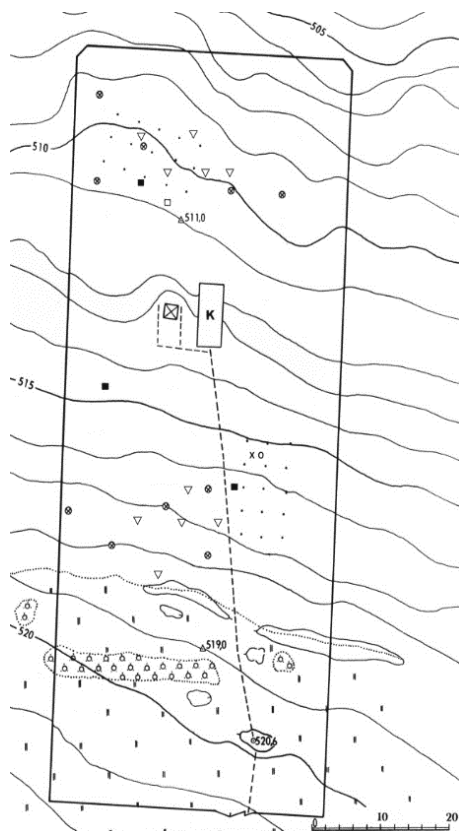
związane z komórkami lub innymi stałymi elementami bioaerozolu (Kołwzan i in. 2005). Średnica cząstek bioaerozolu mieści się w zakresie od 0,01 μm (rozmiary niektórych wirusów) do 100 μm (duże aglomeraty), najczęściej osiąga średnicę 1–40 μm . Wielkość cząstek bioaerozolu zależy głównie od gatunków drobnoustrojów i zanieczyszczeń pyłowych. Czas przeżycia mikroorganizmów w powietrzu zależy od wielu czynników, przede wszystkim od genetycznie uwarunkowanych cech gatunkowych, a nawet szczepowych, stanu fizjologicznego, wielkości oraz składu cząstek bioaerozolu, liczby mikroorganizmów obecnych w bioaerozolu oraz od warunków klimatycznych, głównie wilgotności i temperatury powietrza. Drobnoustroje w bioaerozolach mogą przetrwać znacznie dłużej niż pojedyncze komórki. Najdłużej pozostają przy życiu, odporne na niekorzystne wpływy warunków atmosfery, spory grzybów, przetrwalniki bakterii, szczególnie tolerujące niską wilgotność. Z reguły wirusy oraz wegetatywne komórki bakterii gramdodatnich są bardziej odporne na wysuszenie i niekorzystne warunki niż bakterie gramujemne. Zwiększona przeżywalność wirusów w powietrzu jest związana z ochroną przez komórki gospodarza (nabłonek, śluz), które razem z wirusami są wydalane jako bioaerozol. Bioaerozole rozprzestrzeniają się w środowisku różnymi sposobami. Drogą inhalacyjną lub za pomocą prądów konwekcyjnych powietrza. Drobnoustroje rozprzestrzeniają się także poprzez system wentylacyjno-klimatyzacyjny pomieszczeń (Kołwzan i in. 2005, Krzysztofik 1992, Libudziś i in. 2007).

Prowadzone badania związane były z materiałami otrzymywanymi ze Stacji Monitoringu Katedry Ochrony i Kształtowania Środowiska Uniwersytetu Jana Kochanowskiego na Świętym Krzyżu. Funkcjonuje ona jako Stacja Bazowa w podsystemie Zintegrowanego Monitoringu Środowiska Przyrodniczego (ZMŚP), w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska (Józwiak, Wróblewski 2002). Zlokalizowana jest na północnym stoku Łysicy (Św. Krzyż) na wysokości ok. 513,5 m n.p.m. na terenie Świętokrzyskiego Parku Narodowego. Założonym celem są kompleksowe badania dynamiki rozwoju środowiska jako całego systemu, w skład którego wchodzi elementy biotyczne i abiotyczne pozostające we wzajemnych relacjach. Jak dotąd nie prowadzono w tym zakresie badań mikrobiologicznych, które stanowią ważny element monitoringu środowiska i badania jakości powietrza (Jones i in. 2000). Celem niniejszej pracy było wykazanie obecności i zróżnicowania drobnoustrojów asymilowanych z powietrzem na filtry w stacji monitoringu na Świętym Krzyżu. Prezentowane wyniki mogą stanowić argument do analiz metagenomowych lub zapoczątkować badania nad analizą zróżnicowania drobnoustrojów przenoszonych na dużych wysokościach.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy

Materiałem wykorzystanym do badań było 9 filtrów powietrza – krążki PTFE (politetrafluoroetylen; teflon) absorbujące pył powietrza, o wymiarach 54 mm/0,1 mm, równoważna średnica porów to 0,1 mikrometra. Badane filtry umieszczane były uprzednio w analizatorze APSA 370 (Horiba) o sile zasysania powietrza 216 000 l/miesiąc. Czerpnia do poboru próbek powietrza zamontowana jest na wieży o wysokości 30 m n.p.g. Po okresie 1 miesiąca filtry były umieszczane w sterylnej szalce Petriego w celu dalszych badań w laboratorium (ryc. 1). Materiał badawczy pochodził z okresu zimowo-wiosennego.



Ryc. 1. Mapa Stacji Monitoringu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach na Św. Krzyżu (Jóźwiak 2001); ☒ wieża pomiarowa

Fig. 1. Map of The Monitoring Station of the Jan Kochanowski University in Kielce, St. Cross

Podłoża, odczynniki, sprzęt

- Sterylny płyn fizjologiczny (0,85-procentowy NaCl); podłoża do hodowli drobnoustrojów (Biocorp): King B, agar wzbogacony, M9, Chapman, podłoże Kliglera, agar wzbogacony z dodatkiem mannitolu, agar wzbogacony z dodatkiem 10-procentowego mleka odtłuszczonego,
- zestaw do barwienia metodą Grama: palnik, szkiełka podstawowe, eza, roztwór fioletu krystalicznego, płyn Lugola, fuksyna, etanol 96-procentowy, woda destylowana,
- pipety automatyczne, końcówki do pipet (Eppendorf),
- termostat do hodowli drobnoustrojów (Infors HT, Ecotron),
- zestaw do obserwacji mikroskopowej i sporządzenia dokumentacji: mikroskop świetlny, obiektyw pow. 100x, olejek immersyjny, program AverTV GO Series,
- łaźnia wodna.

METODY BADAŃ

Izolacja drobnoustrojów z filtra badawczego: Bakterie izolowano z filtra badawczego poprzez wytrząsanie w 100 ml soli fizjologicznej przez 30 minut w temperaturze pokojowej, uzyskując w ten sposób roztwór biologiczny (sól fizjologiczna + wypłukana zawartość filtra). Następnie pipetą automatyczną наносono metodą posiewu powierzchniowego równomiernie 100 μ l roztworu biologicznego na podłoża agarowe. Hodowle prowadzono w temperaturze 4°C, 22°C i 37°C przez okres do 2 tygodni. Kolonie bakteryjne wyrosłe na podłożach selekcionowano do identyfikacji mikroskopowej, na podstawie oceny makroskopowej kolonii.

Hodowla drobnoustrojów na podłożach różnicujących: Wyrosłe kolonie drobnoustrojów, zróżnicowane pod względem makroskopowym, wysiewano na podłoża różnicujące i inkubowano odpowiednio w temperaturze 22°C lub 37°C do momentu pojawienia się widocznego wzrostu hodowli. Hodowlę analizowano pod względem wyglądu, jak i zaistniałych zmian w podłożach.

Identyfikacja właściwości glikolitycznych: Na podłożu Kliglera badano zdolność drobnoustrojów do rozkładu glukozy poprzez zażółcenie podłoża w części słupka oraz zdolność do rozkładu laktozy poprzez zażółcenie podłoża w części skosu. Na podłożu agar wzbogacony z dodatkiem mannitolu badano zdolność do rozkładu mannitolu poprzez zażółcenie podłoża wokół kolonii.

Identyfikacja właściwości proteolitycznych: Na podłożu Kliglera badano zdolność do rozkładu peptonu poprzez zmianę zabarwienia podłoża na kolor różowobordowy. Na podłożu agar wzbogacony z dodatkiem mleka identyfikowano koagulację

białek (kazeina) zawartych w mleku poprzez przejaśnienie podłoża w okolicy wyrosłej kolonii.

Badanie zdolności do wytwarzania siarkowodoru: Na podłożu Kliglera badano zdolność drobnoustrojów do wytwarzania siarkowodoru, którego obecność obserwowano poprzez wytrącone z podłoża jonów żelaza – zaczernienie podłoża.

Badanie zdolności do wydzielania gazu: Na podłożu Kliglera badano zdolność drobnoustrojów do wydzielania gazu poprzez obserwację przestrzeni powietrznych w podłożu.

Barwienie drobnoustrojów metodą Grama i obserwacja mikroskopowa: Preparat sporządzono na szkiełku podstawowym w postaci rozmazu. Nanoszono na powierzchnię czystego i odtuszczonego szkiełka kolonię wyrosłych drobnoustrojów. Rozprowadzano je eż w kropli soli fizjologicznej po powierzchni szkiełka. Preparat suszono w temperaturze pokojowej i utrwalano nad płomieniem palnika. Przed obserwacją bakterie barwiono metodą Grama. Zabarwiano preparat roztworem fioletu krystalicznego (przez 3 minuty), następnie utrwalano płynem Lugola (przez 2 minuty), odbarwiano etanolem (przez 30 sekund) oraz dobarwiano barwnikiem kontrastowym fuksyną (przez 20 sekund). Wszystkie etapy barwienia poprzedzano splukiwaniem preparatu wodą destylowaną. Na zabarwione preparaty bakteryjne nanoszono kroplę olejku immersyjnego i oglądano pod mikroskopem, stosując obiektyw 100x powiększający i okular 12,5x powiększający. Sporządzono zdjęcia z obserwacji mikroskopowej, wykorzystując w tym celu program AVerTV GO Series.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania dotyczyły analizy mikrobiologicznej powietrza w okresie zimy i wiosny na terenie Świętokrzyskiego Parku Narodowego. Do badań wykorzystano wkładki filtracyjne asymilujące powietrze z wysokości 30 m n.p.g. w Stacji Bazowej ZMŚP Święty Krzyż. Próbkę roztworu soli fizjologicznej z uwolnionymi z filtra drobnoustrojami poddawano inkubacji w różnorodnych warunkach wzrostu, w zależności od temperatury, czasu hodowli i typu podłoża. W badanym materiale zidentyfikowano zróżnicowane grupy drobnoustrojów. W temperaturze 26°C kolonie pojawiały się rzadko (do kilku kolonii na podłożu agarowym). Najliczniejszy wzrost obserwowano na podłożu odżywczym w temperaturze 37°C (do kilkudziesięciu kolonii na podłożu agarowym) (tab. 1). Na podłożu minimalnym M9 nie zaobserwowano wzrostu żadnej kolonii bakterii. Podłoże wzbogacone oraz podłoże King B nie dały wzrostu bakterii w temperaturze 4°C. Świadczy to o tym, że w badanym materiale najliczniej występowały drobnoustroje mezofilne. Są to drobnoustroje bytujące najliczniej u zwierząt stałocieplnych i ludzi, przyczyniające się do zanieczyszczenia powietrza (Saylers, Witt 2003). Wyniki świadczą, że wysokość nie

stanowi dla nich bariery w transmisji na duże odległości. W przenoszeniu ich prawdopodobnie sprzyjają cząsteczki różnych pyłów zawieszone w powietrzu, tworząc z bakteriami bioaerozole i stanowiąc dla nich dogodny rezerwuar do przetrwania niekorzystnych warunków środowiska (Adamiak, Kołwzan 2001). Pyłki takie mogą także stanowić podstawowe źródło energii lub węgla w postaci organicznych lub nieorganicznych związków. Badanie takich filtrów mogłoby być dobrym materiałem w poszukiwaniu drobnoustrojów o unikalnych właściwościach, asymilujących tlenki metali czy posiadających różnorodne właściwości metaboliczne (Libudzisz i in. 2007, Tan i in. 2008).

Tabela 1. Wzrost drobnoustrojów w zróżnicowanych warunkach hodowli; + obecny wzrost drobnoustrojów, – brak wzrostu drobnoustrojów

Table 1. Bacterial growth under different conditions; + presence of growth, – lack of growth

| Podłoże <i>Medium</i> | Warunki inkubacji: temperatura/czas <i>Growth conditions: temperature/time</i> | | |
|---|---|------------------------------------|--|
| | 4°C/2–3 tyg. <i>4°C/2–3 weeks</i> | 22°C/2 tyg. <i>22°C/2 weeks</i> | 37°C/do 48 godz. <i>37°C/up to 48 hours</i> |
| Agar wzbogacony <i>Enriched agar</i> | – | + | + |
| King B | – | + | + |
| M9 | – | – | – |

W pracy określono także stopień zróżnicowania drobnoustrojów występujących w powietrzu pod względem wymagań żywieniowych w okresie zimy i wiosny. Zastosowano wybrane podłoża różnicujące podstawowe właściwości biochemiczne drobnoustrojów (Kluczek 1999). Szczepy analizowano pod względem właściwości glikolitycznych i proteolitycznych. Identyfikowano również dodatkowe właściwości drobnoustrojów, takie jak wydzielanie siarkowodoru lub gazu CO₂ (tab. 2). Do badań wybrano 21 kolonii odmiennych w ocenie makroskopowej. Szczepy o numerach od 1 do 8 wyizolowane zostały w okresie zimy (styczeń, luty), natomiast szczepy od numeru 9 do 21 wyizolowane zostały w okresie wiosny (marzec, kwiecień). Kolonie przesiewano na podłoża różnicujące i inkubowano w temperaturze 37°C w celu identyfikacji wybranych właściwości biochemicznych. Czas hodowli dostosowany został do tempa wzrostu drobnoustrojów. Zidentyfikowano 12 profili biochemicznych szczepów o odmiennych właściwościach biochemicznych. Otrzymane wyniki potwierdzają, że ponad połowa zidentyfikowanych szczepów reprezentuje przynależność do różnych gatunków. Porównując szczepy wyizolowane zimą i wiosną, nie zaobserwowano istotnych różnic pod względem wymagań żywieniowych. Wszystkie badane szczepy pobierały

z podłoża przynajmniej jeden związek organiczny i rosły w temperaturze 37°C, co zalicza je do organizmów heterotroficznych, mezofilnych. Pomimo że węglowodany stanowią podstawowe źródło węgla dla bakterii, tylko 57% wyizolowanych szczepów korzystało z niego, a ponad 90% szczepów wykazywało właściwości proteolityczne.

Tab. 2. Profile biochemiczne wyizolowanych szczepów bakteryjnych; + wynik pozytywny, – wynik negatywny reakcji biochemicznej

Tab. 2. Biochemical patterns of isolated bacterial strains; + positive reaction, – negative reaction

| Lp. No. | Numer szczepu Strain marks | Liczba (%) szczepów zdolnych do: Number (%) of strains able to: | | | | | | |
|------------|-------------------------------------|--|---|---|---|---|--|--|
| | | rozkładu laktozy <i>lactose</i> <i>degradation</i> | rozkładu glukozy <i>glucose</i> <i>degradation</i> | rozkładu man- nitolu <i>mannitol</i> <i>degradation</i> | rozkładu peptonu <i>peptone</i> <i>degradation</i> | ko- agulacji kazeiny <i>casein</i> <i>coagulation</i> | wydzie- lania H ₂ S H ₂ S <i>secretion</i> | wydzie- lania CO ₂ CO ₂ <i>secretion</i> |
| | | 5 (23) | 10 (47) | 3 (14) | 10 (47) | 17 (81) | 0 (0) | 4 (19) |
| 1 | 3, 12, 17, 18, 20, 21 | – | – | – | + | + | – | – |
| 2 | 13, 15, 16, 19 | – | + | – | – | + | – | – |
| 3 | 7, 10 | + | + | – | – | + | – | + |
| 4 | 5 | + | + | + | – | + | – | – |
| 5 | 4 | – | + | + | – | + | – | – |
| 6 | 2 | – | – | + | + | + | – | – |
| 7 | 8 | – | – | – | + | + | – | + |
| 8 | 6 | + | + | – | – | – | – | – |
| 9 | 11 | + | – | – | – | + | – | – |
| 10 | 9 | – | – | – | + | – | – | + |
| 11 | 1 | – | + | – | – | – | – | – |
| 12 | 14 | – | – | – | + | – | – | – |

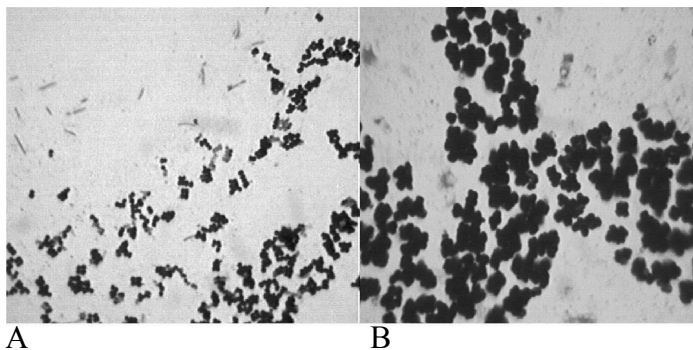
Szczepy te stanowią cenne źródło proteaz bakteryjnych, które mogą mieć szerokie zastosowanie w przemyśle, np. produkcja detergentów, browarnictwo, artykuły spożywcze (Krasowska, Łukasiewicz 2011, Tan i in. 2008). Obecnie w sprzedaży jest ponad 60% enzymów proteolitycznych pochodzenia bakteryjnego, ze względu na niskie koszty produkcji i krótki czas z powodu częstych podziałów komórek mikroorganizmów. W większości

enzymy te są wydzielane zewnątrzkomórkowo, dzięki temu dużo łatwiej je oczyścić, omijając etapy izolacji enzymu z komórek, co przy produkcji na skalę przemysłową ma istotne znaczenie (Rao i in. 1998). Żaden szczep nie wykazywał zdolności do wydzielania siarkowodoru, co wyklucza obecność *Proteus vulgaris*. Jedynie dwa szczepy (nr 7 i 10) wykazywały typowe właściwości dla powszechnie występującego wskaźnika zanieczyszczenia środowiska – *Escherichia coli* (rozkład glukozy, laktozy, wydzielanie CO₂) (Byappanahalli i in. 2006). Obecność tych bakterii w powietrzu należy jednak do rzadkości (Clermont i in. 2000, Walk i in. 2007).

Dodatkowo z wyizolowanych na podłożach hodowlanych bakterii sporządzono 30 preparatów mikroskopowych. Z obserwacji mikroskopowej wynika, że w materiale badawczym wyodrębniono jednoznacznie przynajmniej 4 gatunki bakterii zróżnicowane pod względem budowy ściany komórkowej i kształtu komórki. W barwionych preparatach zidentyfikowano: gramdodatnie dwoinki, gramdodatnie pakietowce (*Sarcina* sp.), pałeczki gramujemne, laseczki gramdodatnie lub gramzmienne (ryc. 2, 3). Kilka obrazów mikroskopowych dało wątpliwe i wymagające potwierdzenia wyniki. Podczas barwienia metodą Grama uzyskano laseczki zabarwione na kolor różowy, co sugeruje przynależność do grupy bakterii gramujemnych oraz pałeczki zabarwione na granatowo, co sugeruje przynależność do bakterii gramdodatnich. Uzyskane, nietypowe wyniki mogą również sugerować gramzmienny charakter ściany komórkowej obserwowanych bakterii. Najliczniej występowały laseczki gramdodatnie oraz pakietowce gramdodatnie, co potwierdzają dane źródłowe (Libudzisz i in. 2007). Te grupy bakterii są najbardziej odporne na niekorzystne warunki środowiska, jakie panują w powietrzu (Kołwzan i in. 2005, Krzysztofik 1992).

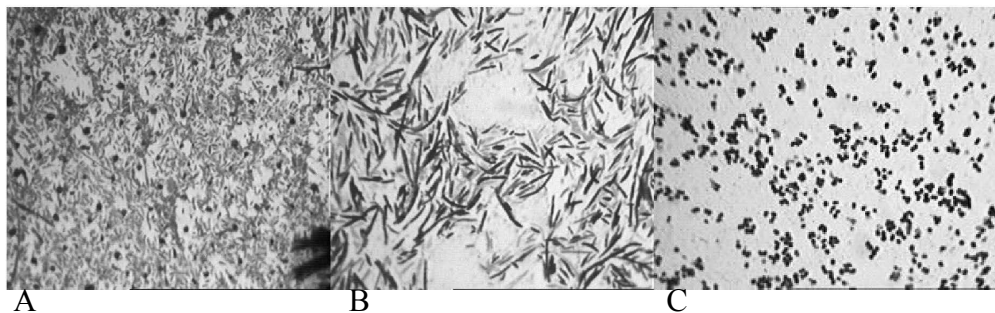
Obecność zidentyfikowanych grup drobnoustrojów w powietrzu Gór Świętokrzyskich jest typowa dla drobnoustrojów środowiskowych występujących w powietrzu i uzasadniona warunkami panującymi na tym terenie (Kołwzan i in. 2005). Region Gór Świętokrzyskich wyniesiony w stosunku do otoczenia od 100 do 400 m znajduje się pod wpływem zarówno lokalnych, jak i zdalnych emisji przemysłowych i transportowych, szczególnie z kierunków dominujących zachodnich oraz północno- i południowo-zachodnich wiatrów (Jóźwiak, Wróblewski 2002). Stacja Monitoringu Uniwersytetu Jana Kochanowskiego na Świętym Krzyżu zlokalizowana jest w dolnej części peryglacyjnej terasy, na wysokości 510–530 m n.p.m w Świętokrzyskim Parku Narodowym. Źródłami zanieczyszczeń pyłowych powietrza, mierzonymi w Stacji, są elektrownie, gospodarstwa domowe, ciepłownie i zakłady przemysłowe i komunikacja. Oprócz lokalnych emitorów do odległości 50–100 km istotny wpływ na stan zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego w regionie świętokrzyskim mogą mieć także odległe ośrodki miejsko-przemysłowe (Toffel, Wolski 1996). Dołączenie badań mikrobiologicznych do zakresu prowadzonych analiz w zakresie Stacji Monitoringu może być dobrym

punktem wyjścia do szeroko pojętych analiz epidemiologicznych tego regionu Polski oraz poszukiwania drobnoustrojów o unikalnych właściwościach adaptacyjnych czy metabolicznych (Saylers, Witt 2003). W mikrobiologii środowiskowej powszechne są tego typu badania, szczególnie jeżeli chodzi o drobnoustroje izolowane z gleb czy wód (Bobek i in. 2009, Krasowska, Łukaszewicz 2011, Taylor i in. 2002). Uzupełnieniem badań fenotypowych niewątpliwie mogą być analizy genetyczne w celu identyfikacji bakterii niehodowlanych, dla których jedynym możliwym miejscem wzrostu jest naturalne środowisko (Bohannon, Hughes 2003, Hughes i in. 2001, Karczmarczyk, Bartoszcze 2006).



Ryc. 2. Pakietowce gramdodatnie (*Sarcina* sp.) (A,B) oraz pałeczki gramujemne (A) barwione metodą Grama, mikroskop świetlny, powiększenie 15x100

Fig. 2. Gram positive *Sarcina* sp. (A,B) and Gram negative rods (A) Gram stained, light microscope, oil-immersion, 15x100 magnification



Ryc. 3. Pałeczki gramujemne (A), laseczki gramdodatnie lub gramzmiennie (B) oraz dwójki gramdodatnie, mikroskop świetlny, powiększenie 15x100

Fig. 3. Gram negative rods (A), Gram positive or Gram variables bacilli (B) and Gram positive *Diplococcus* sp., Gram stained, light microscope, oil-immersion, 15x100 magnification

PODSUMOWANIE

Głównym zadaniem niniejszej pracy była analiza mikrobiologiczna powietrza metodami fenotypowymi, a w szczególności identyfikacja i izolacja drobnoustrojów oraz zróżnicowanie na podstawie obserwacji makroskopowej, mikroskopowej i wymagań żywieniowych, drobnoustrojów wyizolowanych z filtra badawczego Stacji Bazowej ZMŚP na Świętym Krzyżu. Niniejsza praca ma charakter eksperymentalny, przede wszystkim nowatorski, ponieważ nigdy z badanego terenu nie były pobierane próbki filtra do badań mikrobiologicznych. Czynnikiem specyficznym jest również wysokość – 30 m od gruntu, 4 m nad konarami drzew (545 m n.p.m.) – z jakiej absorbowano pył powietrza na filtr badawczy. Należy podkreślić, że praca przedstawia bardzo ogólne i podstawowe wyniki badań, które mogą być ciekawym wstępem do kolejnych w przyszłości.

Bakterie przyczepiają się do cząstek pyłu i kurzu w powietrzu, dlatego ich koncentracja wzrasta wraz ze stopniem zapylenia. Bezpośrednimi źródłami części zanieczyszczeń pyłowych powietrza, mierzonymi w Świętokrzyskim Parku Narodowym, są elektrownie, zakłady przemysłowe, ciepłownie, komunikacja i gospodarstwa domowe. Istotny wpływ na stan powietrza atmosferycznego w regionie świętokrzyskim mają odległe ośrodki miejsko-przemysłowe, należą do nich przede wszystkim Górnośląski Okręg Przemysłowy (GOP) oraz region Morawskiej Ostrawy w Czechach. Sezonowa dynamika stężenia pyłu zawieszonego jest związana z aktywnością człowieka w środowisku. W okresie zimy i początku wiosny, gdy trwa sezon grzewczy, do atmosfery emitowana jest duża ilość pyłów z elektrociepłowni i gospodarstw przydomowych. W miesiącach wiosennych i jesiennych, kiedy gleba pozbawiona jest jeszcze chroniącej ją okrywy roślinnej, na gruntach ornych trwają intensywne prace polowe. W czasie wykonywania zabiegów agrotechnicznych duże ilości materiału mineralnego dostają się do powietrza. Istotny wpływ na stężenie pyłu zawieszonego, a co za tym idzie drobnoustrojów, mają również warunki meteorologiczne. Zwiększona wilgotność względna powietrza powoduje zmniejszenie stężenia pyłu w powietrzu. Wyniki badań nad pyłem zawieszonym w centralnej części Gór Świętokrzyskich wykazały, że każdorazowo po wystąpieniu opadów stężenie pyłu zanieczyszczonego malało. Wzrost stężenia pyłu bądź spadek uzależnione były od siły i kierunku wiatru. Jeżeli wiatr wieje znad obszaru o dużej emisji pyłów, wówczas wraz ze wzrostem prędkości wiatru rośnie stężenie pyłów, natomiast gdy wiatr wieje z kierunku, gdzie nie ma zlokalizowanych wyraźnych źródeł emisji, stężenie pyłu wraz z prędkością maleje. Wspomniane wyżej czynniki niewątpliwie mają istotny wpływ na zróżnicowanie i obecność drobnoustrojów na badanym terenie. Można przypuszczać, że w okresie wiosny powinna przeważać obecność drobnoustrojów saprofitycznych ze względu na zmniejszające się

zanieczyszczenie powietrza pyłami pochodzenia antropogenicznego, tj. pyły z elektrociepłowni i gospodarstw rolnych.

Podziękowanie

Projekt został sfinansowany ze środków badań statutowych, nr: s 612488/2014 oraz badań nr 622008

Acknowledgement

The project was funded by the statutory research, no: s 612488/2014 and research No 622008

LITERATURA

- Adamiak W., Kołwzan B., 2001: Qualitative assessment of the bioaerosol in the surroundings of Maślice landfill in Wrocław, *Environ. Protect. Engin.*, vol. 27, s. 27-42.
- Berleć K., Budzińska K., Szejniuk B., Kułakowska A., 2009: Ocena oddziaływania składowiska odpadów komunalnych na wybrane parametry mikrobiologiczne powietrza, *Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska*, vol. 11, s. 1317-1328.
- Błaszczak M., 2009: *Mikroorganizmy w Ochronie Środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Bobek B., Smyła A., Rychter P., Biczak R., Kowalczyk M., 2009: Degradacja wybranych poliestrów w glebie z udziałem mikroorganizmów, *EcoPole*, vol. 3(1), s. 51-56.
- Bohannon B.J., Hughes, J., 2003: New approaches to analyzing microbial biodiversity data, *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, s. 282-287.
- Bożko L., 1991: Mikroflora powietrza zakładów gastronomicznych i powietrza atmosferycznego miasta Warszawy, *Acta Microbiol. Polon.*, vol. 10(3), s. 307-311.
- Byappanahalli M.N., Whitman R.L., Shively D.A., Sadowsky M.J., Ishii S., 2006: Population structure, persistence and seasonality of autochthonous *Escherichia coli* in temperate, coastal forest soil from a Great Lakes watershed, *Environ. Microbiol.*, vol. 8, s. 504-513.
- Caugant D.A., Levin B.R., Selander R.K., 1981: Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host, *Genetics*, vol. 98, s. 467-490.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E., 2000: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 66, s. 4555-4558.
- Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannon B.J., 2001: Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, s. 4399-4406.
- Jones B.L., Cookson J.T., 2000: Natural atmospheric microbial conditions in a typical suburban area, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 45(3), s. 919-934.

- Józwiak M., 2001: Funkcjonowanie wybranego geosystemu w Górach Świętokrzyskich w warunkach kwaśnej imisji, *Przeł. Geolog.*, 49, 9:775-779.
- Józwiak M. Wróblewski H., 2002: Dynamika pyłu zawieszonego na podstawie wyników uzyskanych w Stacji Monitoringu Akademii Świętokrzyskiej w latach 1994–2000, *Regionalny Monitoring Środowiska Przyrodniczego*, vol. 3, s. 87-89.
- Karczmarczyk M., Bartoszcze M., 2006: Mikromacierze DNA – nowe narzędzie w wykrywaniu czynników biologicznych, *Przeł. Epidemiologiczny*, vol. 60, s. 803-811.
- Kluczek J.P., 1999: Biochemiczne metody identyfikacji mikroorganizmów, Wydawnictwo Uczelniane ATR, Bydgoszcz.
- Koźwzan B., Adamiak W., Grabas K., Wełczyk A., 2005: Podstawy Mikrobiologii w Ochronie Środowiska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Krasowska A., Łukaszewicz M., 2011: Izolacja, identyfikacja oraz aktywność proteolityczna i lipolityczna mikroorganizmów arktycznych, *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 10(1), s. 5-14.
- Krzysztofik B., 1992: Mikrobiologia powietrza, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2007: Mikrobiologia techniczna – mikroorganizmy i środowiska ich występowania, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microb. Mol. Biol. Rev.*, vol. 62, s. 597-635.
- Saylers A.A., Witt Dixie D., 2003: Mikrobiologia: Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko, Wydawnictwo PWN, Warszawa, s. 95-97.
- Toffel A., Wolski K., 1996: Migracje zanieczyszczeń przemysłowych nad Kielecczyzną, *Aura*, vol. 6, s. 10-12.
- Tan F.T., Cooper D.G., Maric M. i Nicell J.A., 2008: Biodegradation of a synthetic copolyester by aerobic mesophilic microorganisms, *Polymer Degradat. Stabil.*, vol. 93, s. 1479-1485.
- Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S. i Burns R.G., 2002: Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.*, vol. 34, s. 387-401.
- Walk S.T., Alm E.W., Calhoun L.M., Mladonicky J.M., Whittam T.S., 2007: Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches, *Environmental Microbiology*, vol. 9, s. 2274-2288.