

KEMIJSKI I MIKROBIOLOŠKI EFEKTI ZRAČENJA HUMUSNOG SUPSTRATA GAMA ZRAKAMA

CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL EFFECTS OF GAMMA IRRADIATION ON HUMUS SOIL

B. Dugonjić, I. Pavlović, L. Čoga i S. Pepeljnjak

SAŽETAK

Humusom bogat supstrat je podvrgnut širokom rasponu doza zračenja od 1 do 64 kGy gama zraka na panoramskom izvoru ^{60}Co . Izvršene su kemijske i mikrobiološke analize zračenih uzoraka i kontrolnog uzorka u cilju određivanja posljedica djelovanja zračenja. Posebno su uspoređeni podaci o promjenama nitratnog i amonijačnog dušika u vodenom ekstraktu i ukupnog dušika u suhoj tvari. Na osnovi primijećenih promjena raspravlja se o mogućim efektima primjene gama zračenja u sterilizaciji supstrata za uzgoj nekih poljoprivrednih kultura. Naglašena je potencijalna vrijednost ove metode sterilizacije u suzbijanju gljivičnih bolesti mladih biljaka, dok se hranidbeni efekti svode na izvjesnu promjenu odnosa vrsta dušika i hranidbenog efekta organske tvari koja potječe iz uništenih mikroorganizama.

UVOD

Svestrana istraživanja djelovanja ionizacijskih zračenja na različite materijale i biološke sustave (Bozzini, A., 1991, Miller, A. Chadwick, K. H. i Nam, J. W., 1982) dovela su i do primjene zračenja u ekološkim sustavima, osobito do zračenja kanalizacijskog mulja i otpadnih voda.

Kanalizacijski mulj se ozračuje visokim dozama zračenja na izvorima ^{60}Co , ^{137}Cs ili akceleratorima elektrona velike snage. Već postoje industrijska postrojenja podignuta u tu svrhu u razvijenim zemljama (Kanada, USA, Japan, Njemačka) a u nekima se intenzivno istražuje na tom polju. Kapaciteti postojećih postrojenja su veliki, od 50 do 150 tona dnevno (Machi, S. 1982.).

Osnovni cilj ozračivanja kanalizacijskog mulja je uništavanje patogenih mikroorganizama prije kompostiranja koje se provodi pomoću zasijanih humifikacijskih bakterija. Intenzivno zračenje mulja ne utječe na proces kompostiranja (Machi, S. 1982, Sivinski, J. S. 1982). Konačan proizvod postupka kompostiranja treba biti prihvatljiv i zdravstveno bezopasan za upotrebu u poljoprivredi kao visoko vrijedno organsko gnojivo.

Prilikom sterilizacije zračenjem uništavaju se i fitopatogene gljive koje su česti uzrok polijeganja i propadanja nasada (Radman, Lj. i Batinica, J. 1982) pa na taj način uzrokuju smanjenje uroda. Činjenica da doze od 5 - 25 kGy (0,5 - 2,5 Mrad) uništavaju spomenute gljivice čini metodu dezinfekcije supstrata zračenjem pogodnom i za obradu supstrata za sijanje i uzgoj presadnica u povrćarstvu, šumarstvu i cvjećarstvu.

Svakako da bi sterilizacija zemlje za uzgoj industrijskog bilja do punog zrenja željenog uroda bila tehnički i ekonomski neopravdana. Uostalom, najosjetljiviji period u razvoju biljaka je upravo vrijeme do razvoja više pravih listova i ojačanog korijenovog sustava, tj. do stadija presadnje. Ova metoda sterilizacije supstrata je prihvatljiva samo za uzgoj sadnica skupocjenih i osjetljivih vrsta koje se teško uzgajaju u uobičajenim uvjetima.

Naši eksperimenti s ozračivanjem supstrata (Dugonjić, B. i Čoga, L., 1992) su pokazali da biljke u zračenom supstratu pokazuju bolji porast, osobito u humusom bogatom supstratu. Uz pretpostavku biološkog uništenja prisutnih živih stanica eventualno prisutne flore i faune, očekivao se bolji porast zbog prisustva mrtve organske tvari u kojoj su dušikovi spojevi u pogodnom obliku za korištenje biljkama (Anić, J., 1973. ^{a)}, Anić, J., 1973. ^{b)}, Beevers, L., 1976., Haynes, R. J., 1986., Durman, P., Čustić, M., 1988., Roorda van Eysinga, J. P. N. L., 1984., Voogt, W., Sonneveld, C., 1984., Čustić, M. 1989.) Da bi se pretpostavka provjerila izvršena su istraživanja opisana u ovom radu.

MATERIJAL I METODE

U pokusima je primijenjen supstrat slijedećeg sastava: neutralni treset iz okolice Pitomače 69 %, humus kalifornijskih glista (iz stajnjaka goveda) 20 %, sitni pijesak iz Drave 10 %, kalcit u prahu 1 %. Homogenizirana smjesa s oko 55 % vlage je strojno prešana u blokove od 4 x 4 cm, koji su pakirani u jednom sloju u kartonske kutije obložene polietilenskom folijom radi očuvanja vlažnosti i čistoće. U svakoj su se kutiji nalazila po 24 bloka.

Kutije s blokovima su zračene na panoramskom izvoru ⁶⁰Co uz brzinu doze od 8.0 Gy/min. Da bi se osigurala jednoličnost zračenja, unatoč tankom sloju materijala, kutije su zračene prvo s jedne strane polovicom potrebne doze, a zatim okretane za 180° i zračene drugom polovicom doze. Poslije izvršenog ozračivanja uzeti su prosječni uzorci iz svih kutija i kontrolne nezračene kutije te izvršena kemijska i mikrobiološka analiza. U tijeku kemijske analize primijenjene su metode kako slijedi (Jelenić, Đ., Džamić, R. 1984).

KEMIJSKE ANALIZE

Izvršena je ekstrakcija u vodi topivih komponenti na slijedeći način: odmjerena je jedan volumni dio supstrata i prelijevan dvostrukim volumnim dijelom deionizirane

vode, te mućkano 1 sat na rotacionoj mućkalici. Nakon mućkanja, suspenzija je filtrirana kroz filter papir „plava traka” kako bi se dobio bistri filtrat koji se dalje podvrgava analitičkom postupku.

Određivanje klora: Primijenjena je metoda po Mohru: u neutralnoj odn. slabo alkalnoj se sredini titracijom sa srebro-nitratom taloži srebro-klorid u prisutnosti iona kromata. Kraj titracije se vidi po nastajanju žutog srebro-kromata.

Kalcij je određivan kompleksometrijski titracijom s versenatom (etilendiamino-tetraoctenom kiselinom) uz indikator calcein u alkalnom mediju (uz kalij-hidroksid) do pojave ružičaste boje.

Magnezij je određivan također kompleksometrijski i to određivanjem sume kalcija i magnezija uz eriochrom-black-T indikator. Od sume se odbija prije određena vrijednost za kalcij i dobije količina magnezija.

Natrij i kalij su određivani metodom plamene fotometrije uz upotrebu standardnih otopina kalija i natrija poznatih koncentracija.

Specifična vodljivost (E.C.) je određivana na mikroprocesorskom konduktometru "ISKRA". Dobivene vrijednosti govore o količini topivih soli (elektrolita) u mjerenom vlažnom supstratu ili u njegovoj suspenziji (ili njegovom ekstraktu).

Fosfor je određivan spektrofotometrijskom metodom na Pye Unicam UV/VIS spektrofotometru. Fosfati daju s fotorexom i amonij-molibdatom plavu boju koja se mjeri na 620 nm. Dobivene ekstinkcije se uspoređuju s rezultatima usporednog mjerenja otopina poznate koncentracije.

Nitratni dušik se određuje kolorimetrijskom metodom koja se osniva na sposobnosti nitratnih iona da s fenol-disulfonskom kiselinom daju trinitrofenol koji s amonijakom daje žutu boju. Mjerenje se vrši na valnoj dužini od 436 nm.

Određivanje amonijačnog dušika je vršeno spektrofotometrijskom metodom mjerenjem ekstinkcije žuto obojenog spoja koji nastaje kvantitativno iz prisutnog amonijaka i dodanog Nesslerovog reagensa.

Ukupni dušik u suhoj tvari je određivan po metodi Kjeldahla: 1 g suhog supstrata se spaljuje mokrim postupkom s koncentriranom sumpornom kiselinom uz dodatak selenske smjese kao katalizatora i vodik-peroksida kao oksidansa. Nakon spaljivanja, iz nastalog amonij-sulfata zalučivanjem se oslobada amonijak koji se destilira na TECATOR destilacijskom aparatu. Titracijom s NaOH se utvrđuje količina amonijaka.

MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Mikrobiološko određivanje broja preživjelih bakterija i plijesni u uzorcima supstrata prije i poslije zračenja, provedeno je nasađivanjem uzoraka metodom razrjeđenja na Muller-Hinton agaru za bakterije i Sabouraud agaru za plijesni. Analize su provedene prema uobičajenim mikrobiološkim metodama (Duraković, 1991., Pepeljnjak, 1985.).

REZULTATI I DISKUSIJA

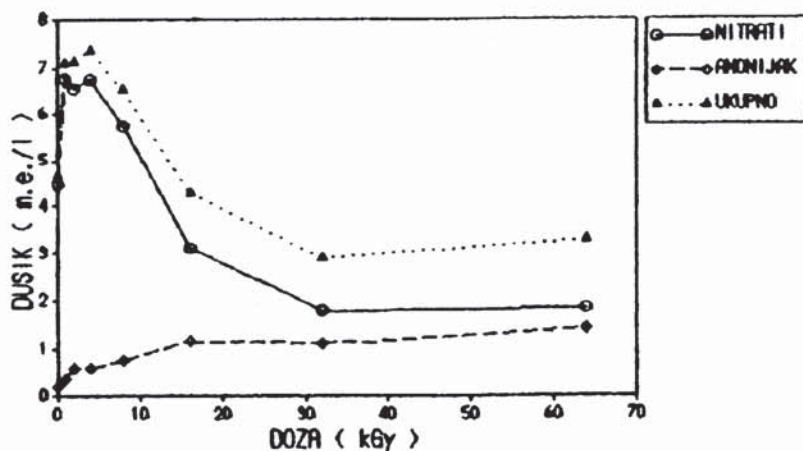
Tablica 1 Rezultati kemijske analize ekstrakta uzoraka supstrata (1:2 vol.)
Table 1 Results of chemical analysis of the extract of soil probe (1:2 vol.)

	Doza zračenja (kGy) - Irradiation dose (kGy)							
	0	1	2	4	8	16	32	64
Suha tv %	44.5	46.0	44.8	44.6	44.9	44.1	43.9	45.1
pH	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
E. C.	1.29	1.44	1.53	1.62	1.48	1.44	1.25	1.52
Soli %	0.17	0.18	0.20	0.21	0.19	0.18	0.16	0.19
NO ₃ -N m. e. /l	4.48	6.75	6.55	6.74	5.75	3.10	1.79	1.86
NH ₄ -N m. e. /l	0.20	0.36	0.59	0.61	0.76	1.17	1.11	1.43
N uk. % s. tv.	1.49	1.44	1.40	1.20	1.25	1.32	1.47	1.29
K m. e. /l	4.15	5.23	4.62	5.02	4.62	4.87	4.33	4.87
Na m. e. /l	1.43	1.87	1.61	1.78	1.70	1.70	1.52	1.70
Mg m. e. /l	3.00	2.60	3.20	3.40	3.00	2.60	2.60	2.60
Ca m. e. /l	5.80	7.60	6.60	6.72	6.20	5.80	5.40	6.80
Cl m. e. /l	2.52	2.86	2.80	2.80	2.60	3.00	2.80	3.10
P mg/l	2.87	2.87	2.70	3.04	3.48	3.57	3.57	4.09

Rezultati analize sadržaja dušika u supstratu:

Tablica 2 Dušik u ekstraktu supstrata nakon zračenja
Table 2 Nitrogen in soil extract after irradiation

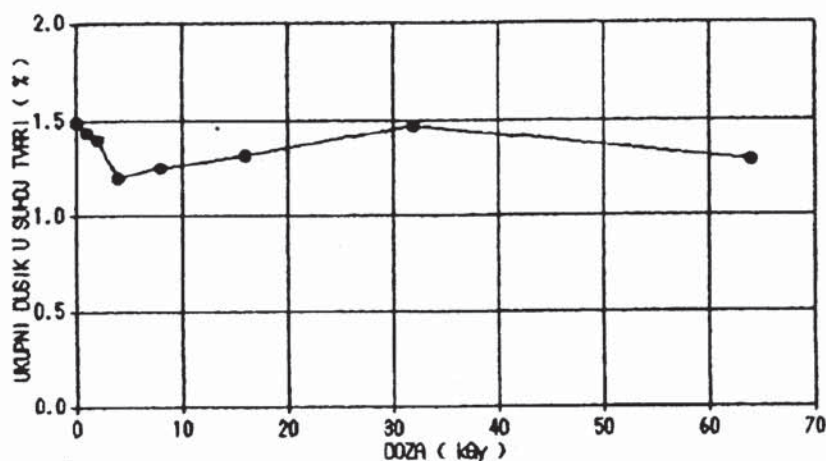
Uzorak Probe	NO ₃ ⁻ m. e. /l	NH ₄ ⁺ m. e. /l	Ukupno NH ₄ ⁺ + NO ₃ ⁻ m. e. /l
Kontrola 0 kGy	4.48	0.20	4.68
1 kGy	6.75	0.36	7.11
2 kGy	6.55	0.59	7.14
4 kGy	6.74	0.61	7.35
8 kGy	5.75	0.76	6.51
16 kGy	3.10	1.17	4.27
32 kGy	1.79	1.11	2.90
64 kGy	1.86	1.43	3.29



Graf 1 Promjene koncentracije nitratnog i amonijačnog dušika u supstratu u ovisnosti o dozi zračenja.

Graph 1 Change of nitrate and ammonium nitrogen in soil upon radiation dose.

Na tablici 2 i grafu vidi se da se u toku zračenja i neposredno nakon njega mijenja sadržaj dušika količinski i kvalitativno. Primjećuje se pad koncentracije nitrata, što se može objasniti nastajanjem slobodnih radikala (i aktiviranih molekula) u supstratu koji djeluju reduktivno na nitrat i proizvode njegove radiolize reducirajući ih sve do elementarnog dušika. Ovaj se gubi u atmosferu, što može objasniti smanjenje ukupnog sadržaja dušika u vodenom ekstraktu.



Graf 2 Promjene koncentracije ukupnog dušika u suhoj tvari supstrata u ovisnosti o dozi gama zračenja.

Graph 2 Changes of the total concentration of nitrogen in dry matter depending on gamma irradiation dose.

S druge strane, povećava se koncentracija amonijačnog dušika. Ovo je za očekivati. Amidni dušik nastaje kao proizvod raspada žive tvari, tkiva mikroorganizama koji su uništeni velikim dozama zračenja. Proteinski dio tkiva mrtvih stanica je materijal od kojeg između ostalog nastaje i amonijak. Povećanje količine fosfora od cca 1 mg /1 u vodenom ekstraktu koje se može primijetiti na tablici 1 vjerojatno potječe također iz raspadnutog tkiva mrtvih mikroorganizama, što treba ispitati posebno planiranim pokusima.

Iz podataka na Tablici 1 i njihovog grafičkog prikaza na Grafu 2, vidi se da zračenje ne uzrokuje znatnije promjene u ukupnom sadržaju dušika u suhoj tvari ispitivanog supstrata. Male razlike vrijednosti koncentracije ukupnog dušika su reda veličine greške mjerenja primijenjene analitičke metode.

Tablica 3
Table 3

Rezultati mikrobioloških ispitivanja:
Results of microbiological investigation:

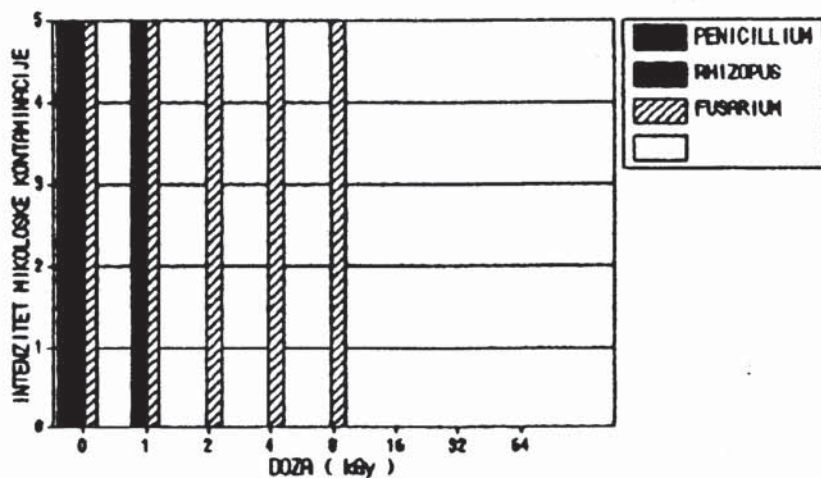
Uzorak Probe	Bakteriološka pretraga Bacterial investigation		Mikološka pretraga Micological investigation	
	Bujon IZ	Broj klica	IK	Vrste plijesni
Kontrola 0 kGy	+++	760 000 000	+++++	Fusarium
				Penicillium
				Rhizopus
1 kGy	+++	20 000 000	+++++	Fusarium
				Rhizopus
2 kGy	+++	50 000 000	+++++	Fusarium
4 kGy	+++	32 000 000	+++++	Fusarium
8 kGy	+	300 000	+++++	Fusarium
16 kGy	+	500 000	-	-
32 kGy	-	-	-	-
64 kGy	-	-	-	-

Legenda uz tablicu 3:

IZ = intenzitet zamućenja bujona, maksimalno 3+, za bistar bujon -.

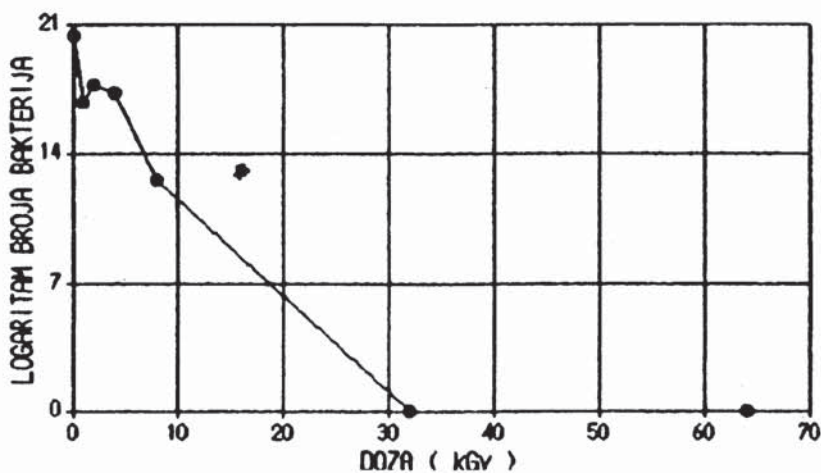
IK = intenzitet kontaminacije plijesnima, maksimalno 5+.

Od promatranih plijesni, najosjetljivije na zračenje su vrste Penicillium dok Fusarium pokazuje visoku rezistentnost do doze preko 8 kGy. Kod doza većih od 16 kGy plijesni su potpuno eliminirane iz supstrata, pa se te doze mogu smatrati dozama za sterilizaciju supstrata s obzirom na uzročnike gljivičnih bolesti. Radi bolje preglednosti rezultati su prikazani i grafički na grafovima 3 i 4.



Graf 3 Promjene intenziteta mikološke kontaminacije supstrata pri raznim dozama gama zračenja.

Graph 3 Changes of intensity of micological contamination upon different irradiation doses.



Graf 4 Promjene populacije bakterija u supstratu pri raznim dozama gama zračenja (zvjezdica predstavlja vrijednost mjerenja koja je statistički neprihvatljiva).

Graph 4 Changes of the bacterial population upon different irradiation doses (asterisk shows statistical bad value).

Krivulja dobivena na grafu 4 pokazuje vrlo dobro slaganje s tipičnom krivuljom preživljavanja stanica (Jarmonenko, S. P. 1988.).

ZAKLJUČCI

1. Promjene u sadržaju i obliku dušika u supstratu, tj. smanjenje nitratnog oblika i određeno povećanje amonijačnog ne može samo po sebi imati toliko izraženo povećanje u rastu kakvo je primijećeno u našim prethodnim pokusima (Dugonjić, B. i Čoga, L. 1992.).

2. Najveća vrijednost zračenja supstrata očituje se na uništavanju patogene mikroflore (i faune). Spore plijesni vrsta *Penicillium* ugibaju već kod doze od 1 kGy, *Rhizopus* kod 2 kGy dok vrste *Fusarium* prežive i dozu od 8 kGy gama zračenja. Broj bakterija se značajno smanjuje već kod doze od 1 kGy. Sprečavanje razvoja bolesti mladih biljaka u najosjetljivijem periodu do razvoja prvih pravih listova, kao i omogućavanje boljeg i bržeg razvoja korijena djeluje pozitivno i na kasniji razvoj biljaka.

3. Neosporno je da raspadanje organske supstance nastale uslijed uništenja gljivica i bakterija oslobađa određene količine dušikovih spojeva, primarno amina koji se kasnije oksidiraju u nitrite i nitrate te bivaju iskorišteni kao biljno hranjivo.

SUMMARY

The humus-rich soil mixture was irradiated with gamma-ray doses ranging from 1 to 64 kGy in panoramic cobalt-60 source. Chemical and microbiological analyses were made of irradiated and non-irradiated soil in order to determine the influence of irradiation. Data about changes of the nitric and ammoniac nitrogen in water extract were compared as well as total nitrogen level in dry matter. On the basis of the changes observed, possible effects of the use of gamma irradiation in sterilization of soil mixture for agricultural plant growth have been discussed. Potential value of this method of sterilization in the prevention of fungal diseases of young plants has been stressed. The feed effects are to be observed as changes of relation between the quality of nitrogen and the feed effect of organic matter from the destroyed microorganisms.

LITERATURA

BOZZINI, A., The role of plant breeding for the future of mankind and the need for genetic resources and opportunities for mutagenesis or gene engineering, Proc. Symp. Plant Mutation Breeding for Crop Improvement, Vienna, 18-22 June 1990, IAEA, Vienna, 1991, Vol. 2, 465-6.

MILLER, A., Chadwick, KH. and Nam, J. W.: Dose assurance in radiation processing plants. Proc. Fourth Int. Meeting on Radiation Processing, Dubrovnik, 4-8 October 1982, Vol 1, Pergamon Press (1983), 62-78.

MACHI, S., Radiation technology for environmental conservation, Radiat. Phys. Chem., Vol 22 No 1/2, 1983, pp 91-97.

SIVINSKI, J. S.: Environmental application of cesium-137 irradiation technology: sludges and foods. Proc. Fourth Int. Meeting on Radiation Processing, Dubrovnik, 4-8 October 1982, Vol 1, Pergamon Press (1983), 117-136.

RADMAN, Lj., Batinica, J.: Bolesti i štetočine povrća, "Zadrugar", Sarajevo, 1983.

DUGONJIĆ, B., Čoga, L.: Utjecaj supstrata zračenog gama zračenjem ⁶⁰Co na presadnice paprike (*Capsicum annum* L.), Agronomski glasnik, 1, 1992, 51-57.

ANIĆ, J. ^{a)}, Biljna hraniva, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1973.

ANIĆ, ^{b)}, Fiziologija ishrane bilja, Sveučilište u Zagrebu, 1973.

BEEVERS, L., Nitrogen metabolism in plants, Edward Arnold, London, 1976.

HAYNES, R. J., Mineral nitrogen in plant soil system, Academic press, New York, 1986.

DURMAN, P., Čustić, M., Utjecaj gnojidbe dušikom na visinu i kvalitetu prinosa salate, Savjetovanje "Salata iz zaštićenog prostora". Zadar, 1988.

ROORDA VAN EYSINGA, J. P. N. L., Nitrate in vegetables under protected cultivation, Acta Hort., 145, 251-255, 1984.

VOOGT, W., Sonneveld, H. C., Nitrogen source and crop growth, Glasshouse crops research station, Annual Report, Naaldwijk, 1984.

ČUSTIĆ, M., Akumulacija nitrata u salati u ovisnosti od intenziteta ishrane dušikom, Mag. radnja, FPZ, Zagreb, 1989.

JELENIĆ, Đ. i Džamić, Ružica: Fitofiziologija praktikum, Naučna knjiga, Beograd, 1989.

DURAKOVIĆ, S., Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, 1991, 242-245.

PEPELJNJAK, S., Cvetnić Zdenka, Plijesni bilja u vegetaciji na nefropatičnim područjima SR Hrvatske, Mikrobiologija, 22, 1985, 51-57.

JARMONENKO, S.P. Radiobiology of Humans and Animals, Mir Publishers, Moscow, 1988, 62-80.

Adrese autora - Author's address:

Primljeno: 15. 06. 1992.

B. Dugonjić, Institut "Ruđer Bošković",
Laboratorij za radijacionu kemiju i dozimetriju,
Zagreb, Bijenička 54

I. Pavlović, L. Čoga, Agronomski fakultet,
Zavod za ishranu bilja,
Zagreb, Svetošimunska cesta 25

S. Pepeljnjak, Zavod za mikrobiologiju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, A. Kovačića 1