

ZMIANY W AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ DROBNOUSTROJÓW GLEBOWYCH PO ZASTOSOWANIU PESTYCYDÓW

CZĘŚĆ II

TRIFLUROTOX 250 EC, TRIFLURALINA 250 EC

Magdalena Błaszak, Andrzej Nowak

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Istnieje wiele publikacji porównujących działanie pestycydów i pestycydów w połączeniu z adiuwantami na chwasty. W większości przypadków efekt działania obniżonej dawki pestycydu stosowanego z adiuwantem jest podobny lub nawet silniejszy od preparatu tradycyjnego stosowanego w dawce wyższej [ADAMCZEWSKI i in. 1996; PŁACZYŃSKI i in. 1997; WOŹNICA i in. 1997; KUCHARSKI i in. 2000]. Udoskonalanie pestycydów (zmiana formy użytkowej preparatu, dodatkowe adiuwanty) z jednej strony pozwala na obniżenie dawek substancji aktywnych wprowadzanych do środowiska, ale z drugiej strony wydłuża okres zalegania pestycydów.

Badania wykazały, że intensywne i długotrwałe stosowanie pestycydów stwarza zagrożenie nie tylko dla chwastów i szkodników upraw, ale także dla „pożytecznej” mikroflory glebowej. Nic wiele prac jednak dotyczy reakcji mikroorganizmów na obecność adiuwantów w środkach ochrony roślin. Aby zdobyć więcej informacji na ten temat podjęto badania, które są próbą ustalenia w jaki sposób mikroorganizmy, a szczególnie ich aktywność hydrolityczna wobec różnych związków organicznych zmienia się pod wpływem dodatku adiuwantu.

Materiał i metodyka

W doświadczeniu wykorzystano materiał (glebę i mikroorganizmy) oraz metodykę obszernie opisaną w NOWAK, BŁASZAK [2006]. Do podłoża mikrobiologicznych ze skrobią, kazeiną lub tributyriną wprowadzano herbicydy Triflurotox 250 EC i Trifluralinę 250 EC w dawkach 1, 10, 100 mm³ substancji aktywnej w dm³ podłoża (tab. 1). Zastosowano podłoża kontrolne bez pestycydów. Hodowle inkubowano w temperaturze 25°C. Po siedmiodniowej inkubacji, za pomocą linijki mierzono średnice kolonii (mm) i średnice stref hydrolizy (przejaśnienia)

wokół kolonii (mm). Na tej podstawie wyliczono tzw. indeks aktywności (IA) dla poszczególnych szczepów, jako stosunek średnicy strefy hydrolizy (kazeiny, skrobi lub tributyriny) do średnicy kolonii. Odczyty dla mikroorganizmów amylolytycznych dokonywane były po wcześniejszym zalaniu podłoża płynem Lugola. Każdy szczep badano w trzech powtórzeniach. Opis analiz statystycznych znajduje się w części pierwszej [NOWAK, BŁASZAK 2006].

Tabela 1; Table 1

Charakterystyka preparatów użytych w doświadczeniach
Characteristics of pesticides applied in the experiment

Nazwa handlowa pestycydu Trade name of pesticide	Rodzaj pestycydu Type of pesticide	Substancja biologicznie czynna Biologically active matter		Dawka polowa Field dose	Klasa toksyczności Toxicity class	Producent Producer
		nazwa	g·dm ⁻³			
Triflurotox 250 EC	herbicyd tradycyjny, bez adiuwantu traditional herbicide without adjuvant	trifluralina trifluralin	250	4 dm ³ ·ha ⁻¹	IV	Z. Ch. „Organik – Sarzyna” S.A. Nowa Sarzyna
Trifluralina 250 EC	herbicyd udoskonalony, z adiuwantem herbicide with adjuvant		250	4 dm ³ ·ha ⁻¹	forma eksperymentalna experimental form	

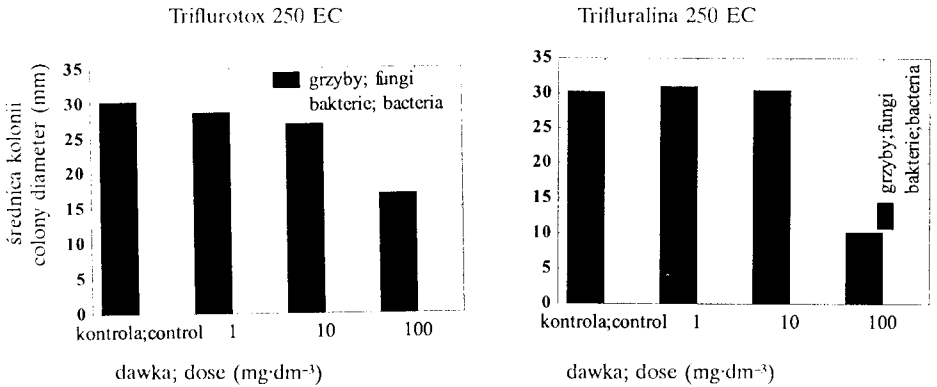
Wyniki i dyskusja

Nie stwierdzono jednoznacznie, która forma herbicydu (tradycyjna, czy udoskonalona – z dodatkowym adiuwantem) silniej oddziaływała na mikroorganizmy. Na ogół siła oddziaływania zależała od wrażliwości danego szczepu na dodany do podłoża herbicyd i od dawki preparatów.

Herbicydy są w większości przypadków substancjami organicznymi, dodane do gleby mogą być wykorzystane przez niektóre mikroorganizmy jako źródło energii, węgla lub azotu [RÓŻAŃSKI 1992; SOULAS, LAGACHERIE 2001; WYSZKOWSKA 2002]. Dlatego dodane do gleby w dawkach zalecanych w uprawie roślin mogą powodować okresowy wzrost liczebności mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji danego herbicydu [BALICKA 1983; POPRAWSKI, MAJCHROWICZ 1995]. Z gleby uprawnej, gdzie stosowano trifluralinę [BELLINASSO i in. 2003] wyizolowano z gleby mikroorganizmy odporne na ten herbicyd i badano ich zdolność do jego biodegradacji. W zależności od szczepu bakterii proces ten przebiegał ze skutecznością: 24,6%, 25%, 21%, 16% początkowej zawartości trifluraliny.

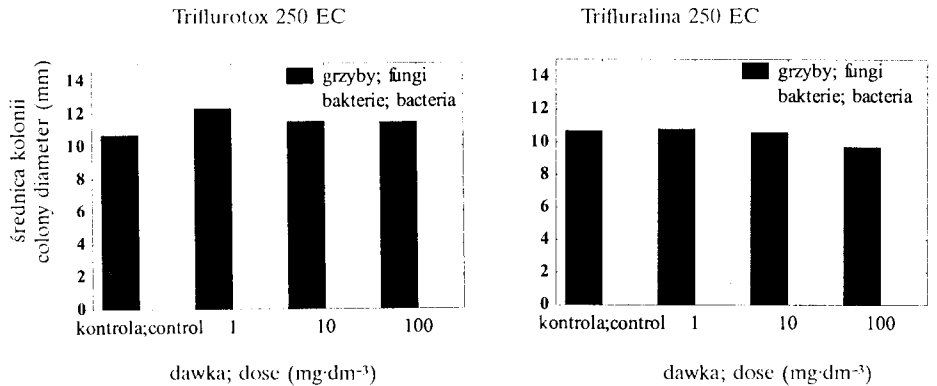
Podobnie wzrost mikroorganizmów (bakterii i grzybów) na podłożu z jedynym źródłem węgla w postaci tłuszczu oraz zdolność ich do hydrolizy tego substratu (oceniana jako IA) ulegały niewielkim modyfikacjom w obecności herbicydów w podłożu (rys. 2, 4). Różnice w oddziaływaniu dwóch herbicydów na badane parametry wynosiły na ogół kilka – kilkanaście %. Niestety istnieje niewiele danych o oddziaływaniu pestycydów na mikroorganizmy zdolne do rozkładu związków tłuszczowych w glebie. Fragmentaryczne informacje na ten temat są zdecydowanie niewystarczające, chociażby ze względu na specyfikę i duże znaczenie

procesu biodegradacji związków hydrofobowych, trudnych do rozkładu, a powszechnych w przyrodzie (kutyna, suberyna). W badaniach MICHALCEWICZ [2001] mikroorganizmy lipolityczne wykazywały najczęściej wzmożony wzrost liczebności w kontakcie z pestycydami, chociaż herbicydy mocznikowe i triazynowe powodowały okresowe zmniejszenie liczebności tych mikroorganizmów.



Rys. 1. Wpływ pestycydów na wielkość średnic kolonii mikroorganizmów proteolitycznych (wyniki uśrednione dla wszystkich szczepów)

Fig. 1. The influence of pesticide on the diameter of proteolytic colony microorganism (average from the whole experiment for all strains)

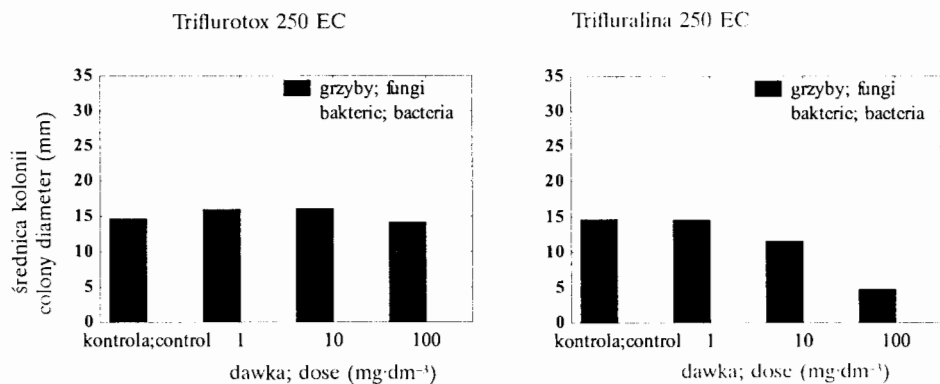


Rys. 2. Wpływ pestycydów na wielkość średnic kolonii mikroorganizmów lipolitycznych (wyniki uśrednione dla wszystkich szczepów)

Fig. 2. The influence of pesticide on the diameter of lipolytic colony microorganism (average from the whole experiment for all strains)

Po dodaniu herbicydów (szczególnie Trifluraliny 250 EC) do podłoża ze skrobią, średnice kolonii bakterii i grzybów oraz ich aktywność hydrolityczna uległy zmniejszeniu (rys. 3, 4). Różnice w oddziaływaniu dwóch herbicydów były wyraźne, wynosiły do ok. 60% (porównując średnice wzrostu mikroorganizmów) i do ok. 30% (porównując IA). W doświadczeniu [LUKI i in. 1997] z innymi herbi-

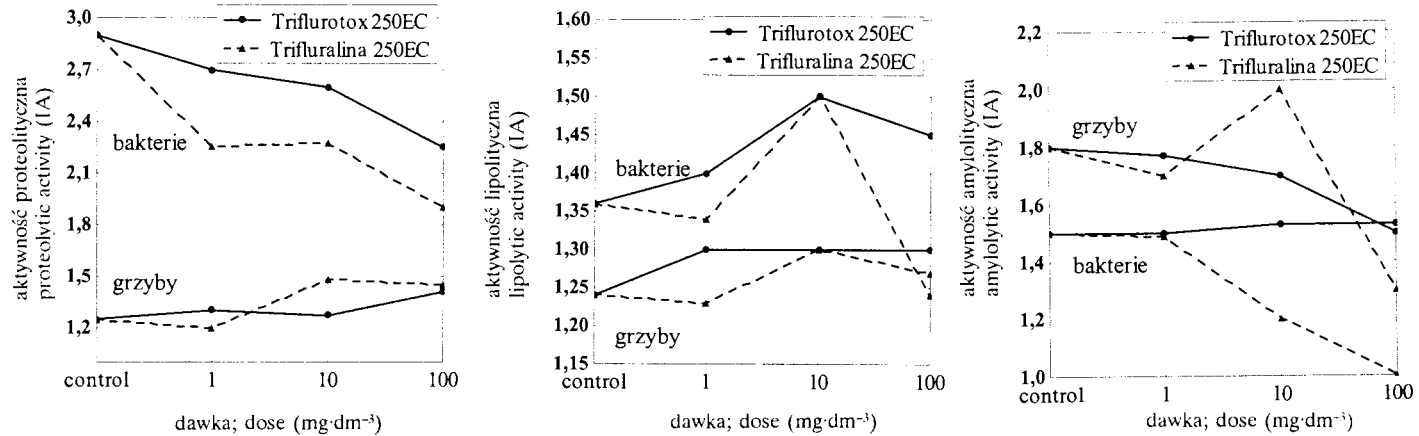
cydami (symazyną i napropamidem) zanotowano zmniejszenie liczebności mikroorganizmów amylolytycznych odpowiednio o ok. 30 i 20% (średnie z całego doświadczenia), w porównaniu do wartości kontrolnych. Także Tu [1992] po aplikacji do gleby 10 mg·kg⁻¹ ethalfuraliny oraz trifluraliny stwierdził hamowanie aktywności amylaz w glebie, w pierwszym przypadku znaczne, w drugim niewielkie. W niektórych doświadczeniach obserwowano odmienną reakcję drobnoustrojów zdolnych do hydrolizy skrobi na obecność pestycydów w glebie, po dodaniu do gleby herbicydu Tarol 200SL [LUKI i in. 1997] odnotowano zwiększenie liczebności tych mikroorganizmów.



Rys. 3. Wpływ pestycydów na wielkość średnic kolonii mikroorganizmów amylolytycznych (wyniki uśrednione dla wszystkich szczepów)

Fig. 3. The influence of pesticide on the diameter of amylolytic colony microorganism (average from the whole experiment for all strains)

Różnice w oddziaływaniu dwóch herbicydów na wzrost mikroorganizmów proteolitycznych były znaczne, wynosiły do 35%, natomiast wpływ na aktywność proteolityczną był mniej zróżnicowany. PERUCCI i SCARPONI [1992] badając aktywność hydrolityczną mikroorganizmów zaobserwowali wyraźny jej wzrost (szczególnie w pierwszym tygodniu doświadczenia) po dodaniu do gleby trifluraliny w dawce 5 ppm. Natomiast w przedstawianym doświadczeniu, dodanie do podłoża mikrobiologicznego z białkiem mleka herbicydów zawierających trifluralinę, spowodowało w większości przypadków przyspieszenie wzrostu kolonii bakterii (rys. 1). Jednak zdolność do hydrolizy białka (IA) przez te mikroorganizmy ulegała obniżeniu (rys. 4). Wytlumaczenie tej z pozoru sprzecznej reakcji może być następujące: bakterie zdolne do rozkładu i wykorzystania stosowanego herbicydu [MARTIN i in. 1999; SOULAS, LAGACHERIE 2001] wykazały większe „zainteresowanie” właśnie tym źródłem węgla w podłożu, niż białkiem. Stąd też mniejsze rozmiary stref hydrolizy (w porównaniu z kontrolą), jednocześnie przy okazałym wzroście kolonii. BELLINASSO i in. [2003] przeprowadzając doświadczenie z trifluraliną także wyizolowała z gleby bakterie zdolne do rozkładu i wykorzystania tej substancji biologicznie czynnej. Podobnie po dodaniu do gleby trifluraliny [Tu 1992] nastąpiło zwiększenie liczebności grzybów, co mogło sugerować, że herbicyd stał się dla tych mikroorganizmów źródłem węgla i (lub) energii. Również MICHALCEWICZ [2001] stwierdziła w większości przypadków wzrost liczebności mikroorganizmów proteolitycznych po zastosowaniu Pivota 100SL i Sencoru 70WG.



Rys. 4. Wpływ pestycydów na aktywność hydrolityczną mikroorganizmów (wyniki uśrednione dla wszystkich szczepów)
 Fig. 4. The influence of pesticide on the enzyme activity (average from whole experiment for all strains)

W innym badaniu [Tu 1994] ustalono, że dichloropropan powodował istotną stymulację procesu amonifikacji. Efekt działania związku staje się coraz silniejszy w miarę wzrostu dawki aplikowanej do gleby [PIOTROWSKI, ŚLIZAK 1992; CHAUHAN 1994]. MANDI i LUKI [2002] badając reakcję mikroorganizmów zdolnych do hydrolizy białka na obecność w glebie symazyny i parakwatu stwierdzili obniżenie liczebności mikroorganizmów proteolitycznych o kilka, kilkanaście procent. BALICKA [1983] podaje wręcz przykłady herbicydów, które zazwyczaj hamują aktywność proteolityczną bakterii i grzybów, są to herbicydy triazynowe, mocznikowe, karbaminianowe. WYSZKOWSKA [2002] oceniając oddziaływanie trifluraliny na mikroflorę również stwierdziła zaburzenie równowagi biologicznej gleby, efekt ten objawiał się obniżeniem liczebności mikroorganizmów biorących udział w przemianach węgla i azotu.

W doświadczeniu HUBERA i in. [1980] pochodne aniliny wywierały zróżnicowany wpływ na oddychanie mikroorganizmów. W zależności od typu związku, a także badanego obiektu, którym były różne szczepy mikroorganizmów, hamowanie oddychania sięgało do 50% wartości kontrolnej w przypadku bakterii (*Pseudomonas fluorescens*) i do ok. 60% w przypadku *Aspergillus niger*. Po wprowadzeniu do gleby bentrifluraliny biomasa mikroorganizmów została zredukowana w początkowej fazie doświadczenia o ok. 60% [VISCHETTI, CASUCCI 2002].

Adiuwant dodawany jest (lub wbudowany) do herbicydu w niewielkiej ilości, na ogół zalecana w uprawie roślin ilość wspomagacza nie przekracza $1,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$ [ADAMCZEWSKI, MATYSIAK 1997]. Mimo to dodatek tak niewielkiej ilości związku wpływa na zmianę mobilności i trwałości (i co za tym idzie toksyczności) herbicydu [SWARCEWICZ 2000]. Dlatego też oddziaływanie herbicydu stosowanego samodzielnie i tego samego preparatu w połączeniu z adiuwantem może zasadniczo być różne. Oddziaływanie Betanalu 160 EC w kombinacji z Olemixem lub Olejanem tylko nieznacznie różniło się od wpływu samego herbicydu na zawartość biomasy żywych mikroorganizmów [NOWAK i in. 1998]. Inaczej w doświadczeniu SWARCEWICZ [2000], gdzie herbicyd w połączeniu z adiuwantem (Azoprim 50 WP + Atpol) znacznie silniej oddziaływał na proces oddychania mikroorganizmów glebowych niż sam herbicyd.

Wnioski

1. Dodatek adiuwantu do herbicydu w sposób statystycznie istotny zmienił jego oddziaływanie na wzrost oraz aktywność hydrolityczną bakterii i grzybów. Najmniejsze różnice w oddziaływaniu odnotowano w przypadku mikroorganizmów hodowanych na podłożu z tributyriną, a największe na pożywce z kazeiną.
2. Ogólnie można stwierdzić, że im wyższa dawka porównywanych pestycydów, tym różnice w oddziaływaniu na mikroorganizmy były większe, jednak trudno jest stwierdzić, który z herbicydów silniej oddziaływał na mikroorganizmy, ponieważ efekt działania zależał od badanego parametru, dawki pestycydów, grupy mikroorganizmów.
3. Większe różnice w oddziaływaniu dwóch herbicydów stwierdzano częściej w hodowli szczepów bakteryjnych. Mikroorganizmy te ujawniły odmienne

oddziaływanie herbicydów obecnych w podłożu, hydrolizując białka i węglowodany w różnym tempie i zakresie.

4. Grzyby w mniejszym stopniu niż bakterie były podatne na wpływ herbicydów, różnice w oddziaływaniu Triflurotoxu 250 EC i Trifluraliny 250 EC były bardziej widoczne odnośnie tempa wzrostu grzybów na podłożach z herbicydami niż ich aktywności hydrolitycznej.

Literatura

- ADAMCZEWSKI K., GRALA B., STACHECKI S. 1996. *Ekonomiczne aspekty stosowania adiuwantów przy zwalczaniu chwastów*. Post. Ochr. Roślin 36: 126–133.
- ADAMCZEWSKI K., MATYSIAK R. 1997. *Adiuwanty do środków ochrony roślin – podział i klasyfikacja*. Ochrona Roślin 4/5: 16–18.
- BALICKA N. 1983. *Różne formy wzajemnego oddziaływania drobnoustrojów z herbicydami*. Post. Mikrob. 22(3/4): 291–298.
- BELLINASSO M., GREER C.W., PERALBA M. 2003. *Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil*. FEMS Microb. Ecol., Wyd. Elsevier 43: 191–194.
- CHAUHAN U.K., MAHINDRA A., SURYANARAYANA V. 1994. *Influence of pesticide on soil microflora*. J. Ecotoxicol. Enviroment. Monit. 4: 133–136.
- HUBER S.J., POSCHENRIEDER G., WALLNOFER P.R. 1980. *Einfluß von Pflanzenbehandlungsmitteln und deren Metaboliten auf Wachstum und Atmung einer Bodenmikroorganismen*. Z. PflKrankh. PflSchutz. 9: 533–545.
- KUCHARSKI J., SADOWSKI M., GOŁĘBIEWSKA H. 2000. *Wpływ adiuwantów na pozostałości wybranych herbicydów w uprawie kukurydzy*. Post. Ochr. Roślin 40: 945–947.
- LUKI D., MANDI L., RANKOVI M. 1997. *Herbicidi kao faktor regulacije brojnosti amilo-litskih mikroorganizma i Azotobaktera u zemlji tu pod rastilom jabuke*. J. of Yugoslav Pomology 31(117/118): 159–166.
- MANDI L., LUKI D. 2002. *Effect of different herbicides on number of ammonificators and soil proteolytic activity under apple root stock*. J. Sci. Agric. Reseach 56(3–4): 41–51.
- MARTIN M., MENGES G., ALLENDE J.L., FERNANDEZ J., ALONSO R., FERRER E. 1999. *Characterization of two novel propachlor degradation pathways in two species of soil bacteria*. Applied and Environmental Microbiology 65(2): 802–806.
- MICHALCEWICZ W. 2001. *Wpływ wybranych herbicydów na biomasę i liczebność drobnoustrojów w glebie*. Rozpr. 200 AR Szczecin: 92 ss.
- NOWAK A., BŁASZAK M. 2006. *Zmiany w aktywności enzymatycznej drobnoustrojów glebowych po zastosowaniu pestycydów*. Cz. I. Miedzian 50 WP, Miedzian extra 350 SC. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 515: 289–297.
- NOWAK A., NOWAK J., PRZYBULEWSKA K., TUROS-BIERNACKA M. 1998. *Auswirkung von Betanol 160 EC in Kombination mit Zusatzstoffen auf die biologische Aktivität des Bodens. Teil I: Einfluß auf mikrobielle Biomasse*. Z. PflKrankh. PflSchutz, XVI: 763–770.

- PERUCCI P., SCARPONI L. 1992. *Interference on soil microbial biomass and persistence of trifluralin in a clay soil*. Proceedings of the international symposium on environmental aspects of pesticide microbiology, Sigstuna, Sweden: 129–134.
- PIOTROWSKI W., ŚLIZAK W. 1992. *Oddziaływanie antybiotyków i fungicydów na rozwój mikroorganizmów glebowych na tle zróżnicowanego nawożenia*. Zesz. Nauk. ART Bydgoszcz 178, Rol. 31: 33–42.
- PLACZYŃSKI J., DOBRZYŃSKI A., ANYSZKA Z. 1997. *Skuteczność chwastobójcza obniżonych dawek metrybuzyny z dodatkiem adiutantów w uprawie pomidora*. Post. Ochr. Roślin 37: 163–166.
- POPRAWSKI T., MAJCHROWICZ J. 1995. *Effects of herbicides on in vitro vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi*. Crop Protection 14: 81–87.
- RÓŻAŃSKI L. 1992. *Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku*. PWRiL Warszawa: 275 ss.
- SOULAS G., LAGACHERIE B. 2001. *Modelling of microbial degradation of pesticides in soils*. Biol. Fertil Soil 33: 551–557.
- SWARCEWICZ M. 2000. *Influence of Atrazine and spray Atpol adjuvant on respiration and nitrification processes in the soil*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 472: 627–633.
- TU C.M. 1992. *Effect of some herbicides on activities of microorganisms and enzymes in soil*. J. Environ. Sci. Health B27(6): 695–709.
- TU C.M. 1994. *Effects of herbicides and fumigations on microbial activities in soil*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53: 12–17.
- VISCHETTI C., CASUCCI C. 2002. *Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and bensfluralin degradation*. Biol. Fertil Soils 35: 13–17.
- WOŹNICA Z., MIŁKOWSKI P., WANIOREK W. 1997. *Adiuwanty a skuteczność chwastobójcza herbicydów*. Post. Ochr. Roślin 37: 190–192.
- WYSZKOWSKA J. 2002. *Microbiological properties of soil contaminated with the herbicide Treflan 480 EC*. Pol. J. Natur. Sc. 10: 57–69.

Słowa kluczowe: aktywność enzymatyczna, mikroorganizmy, herbicydy

Streszczenie

Szereg badań wykazało, że intensywne i długotrwałe stosowanie pestycydów stwarza zagrożenie nie tylko dla chwastów i szkodników upraw, ale także dla pożytecznej mikroflory glebowej. Udoskonalanie pestycydów (zmiana formy użytkowej, dodawanie wspomagaczy) z jednej strony pozwala na obniżenie dawek substancji aktywnych wprowadzanych do środowiska, a z drugiej strony wydłuża okres ich zalegania w środowisku.

Badano wpływ Triflurotoxi 250 EC i Trifluraliny 250 EC (herbicyd z dodatkowym adiutantem) na wyizolowane z gleby bakterie i grzyby, badano wpływ zarówno na tempo wzrostu mikroorganizmów, jak i na aktywność hydrolytyczną wobec różnych organicznych substratów.

Porównywane herbicydy różniły się (w sposób statystycznie istotny) w swoim oddziaływaniu na mikroorganizmy. Nie można jednoznacznie stwierdzić, który z pestycydów silniej oddziaływał na mikroorganizmy, bowiem efekt oddziaływania zależał od dawki herbicydów, użytego substratu w podłożu i badanego parametru. Większe różnice w oddziaływaniu dwóch herbicydów stwierdzono odnośnie bakterii. Mikroorganizmy te ujawniły odmienne oddziaływanie herbicydów obecnych w podłożu, hydrolizując białka i węglowodany w różnym tempie i zakresie. Grzyby w mniejszym stopniu niż bakterie były podatne na wpływ herbicydów, różnice w oddziaływaniu Triflurotoxu 250 EC i Trifluraliny 250 EC były bardziej widoczne odnośnie tempa wzrostu grzybów na podłożach z herbicydami niż ich aktywności hydrolitycznej.

CHANGES IN ENZYMATIC ACTIVITY OF SOIL MICROORGANISMS AFTER THE APPLICATION OF PESTICIDES

PART II

TRIFLUROTOX 250 EC, TRIFLURALINA 250 EC

Magdalena Blaszak, Andrzej Nowak

Department of Microbiology and Environmental Biotechnology,
Agricultural University, Szczecin

Key words: enzymatic activity, microorganisms, pesticides

Summary

Pesticides applied intensively and over a long time have proved to pose threats not only to weeds and crop pests, but also to the useful microflora of the soil. Perfecting pesticides by changing the form they are applied in, and/or adding aid substances on the one hand, leads to lowering the doses of the active substances introduced into the environment, but prolonging their deposition time in the soil on the other.

The influence of Triflurotox 250 EC and Trifluralina 250 EC, a herbicide with an additional adjuvant, on bacteria and fungi isolated from soil was studied, with regards to the microbes growth rate, and their hydrolytic activity on various organic substrates.

The pesticides under comparison were found to differ, at the level of statistical significance, as far as their impact on microbes is concerned. Since the effect depended on the applied herbicide doses and the substrate alike, as well as on the studied parameter, it was hard to clearly determine which pesticide action on the microbes were the most effective. Differences between two herbicides were more pronounced for bacteria. Such microbes revealed the different soil herbicides impact by hydrolyzing proteins and carbohydrates at the various rate and scope. Fungi were found to be less susceptible to herbicides induced impacts than microbes; differences in Triflurotox 250 EC and Trifluralin 250 EC

influence were pronounced stronger in the fungi growth rate at substrates with herbicides than in their hydrolytic activities.

Dr Magdalena **Błaszak**
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska
Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17
71-434 SZCZECIN
e-mail: mblaszak@agro.ar.szczecin.pl