

OCENA PRZYDATNOŚCI HUMUSU W ZMNIEJSZENIU NIEKORZYSTNEGO ODDZIAŁYWANIA ATRAZYNY NA AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ENZYMÓW GLEBOWYCH

Dariusz Kłódka, Aldona Bojko

Katedra Biochemii, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Triazyny to wciąż tani i skuteczny sposób walki z chwastami w uprawie kukurydzy. Niewątpliwie jest to duża zaleta tych preparatów. Do wad zaliczyć trzeba długi okres zalegania w glebie oraz dużą mobilność w profilu glebowym [BIZIUK 2001; SWARCEWICZ 2002]. Stąd w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są liczne badania, których celem jest wypracowanie metod, mających na celu zmniejszenie ujemnego wpływu triazyn oraz innych pestycydów na środowisko. Niewątpliwie na zachowanie się atrazyny w glebie duży wpływ ma jej odczyn. Niskie wartości pH sprzyjają wolniejszemu zanikowi tego preparatu [HOUST, TOPP 2000]. Szybkość rozkładu atrazyny maleje również wraz ze wzrostem zawartości materii organicznej i minerałów ilastych w glebie, gdyż herbicyd ten może łączyć się wiązaniami wodorowymi i jonowymi z wymienionymi składnikami gleby [HOUST i in. 1998; GEVAO i in. 2000; SWARCEWICZ 2002]. Dodatkowo, innym czynnikiem spowalniającym zanik atrazyny jest stosowanie innych preparatów pestycydowych [GOBENDINGER, RADOSEVICH 1999; KRUTZ i in. 2003]. Zanik atrazyny w glebie uzależniony jest również od typu gleby i aktywności mikroflory glebowej [NOWAK 1995].

Celem podjętych badań była próba wykorzystania humusu w zmniejszeniu niekorzystnego oddziaływania atrazyna na środowisko glebowe. Do oceny posłużono się aktywnością enzymatyczną ureazy, dehydrogenaz, reduktazy azotanowej i β -glukozydazy oraz szybkością rozkładu tego herbicydu.

Material i metody

Badania przeprowadzono w laboratorium na próbkach czarnej ziemi o składzie granulometrycznym gliny lekkiej pylastej, charakteryzującej się niską zawartością próchnicy (1,2%) i odczynem słabo kwaśnym (pH 6,1-6,9) [BOGDAL i in. 1990]. Pobraną do badań glebę podsuszone i przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm. Tak przygotowaną glebę podzielono na 4 grupy, do których dodano wagowo humus (producent: Przedsiębiorstwo Gospodarki Komunalnej i Mieszka

niowej w Pyrzycach) w ilości 0, 1, 5 i 10%. Następnie każdą z grup podzielono na 4 jednokilogramowe próbki i wprowadzono wodne emulsje herbicydu Gesaprim 500 FW w dawkach: I – zalecaniej przez producenta na uprawy ($2 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$), II – $5 \times \text{I}$ i III – $25 \times \text{I}$. Ostatnią próbkę gleby pozostawiono bez dodatku preparatu – kontrola. Poszczególne dawki Gesaprimu 500 FW użyte w doświadczeniu przeliczono i podano na 1 kg gleby (tab. 1). Przy określaniu dawki wzięto pod uwagę masę gleby o miąższości 0,01 m.

Tabela 1; Table 1

Zastosowane w doświadczeniu dawki Gesaprimu 500 FW
Doses of Gesaprim 500 FW applied in the experiment

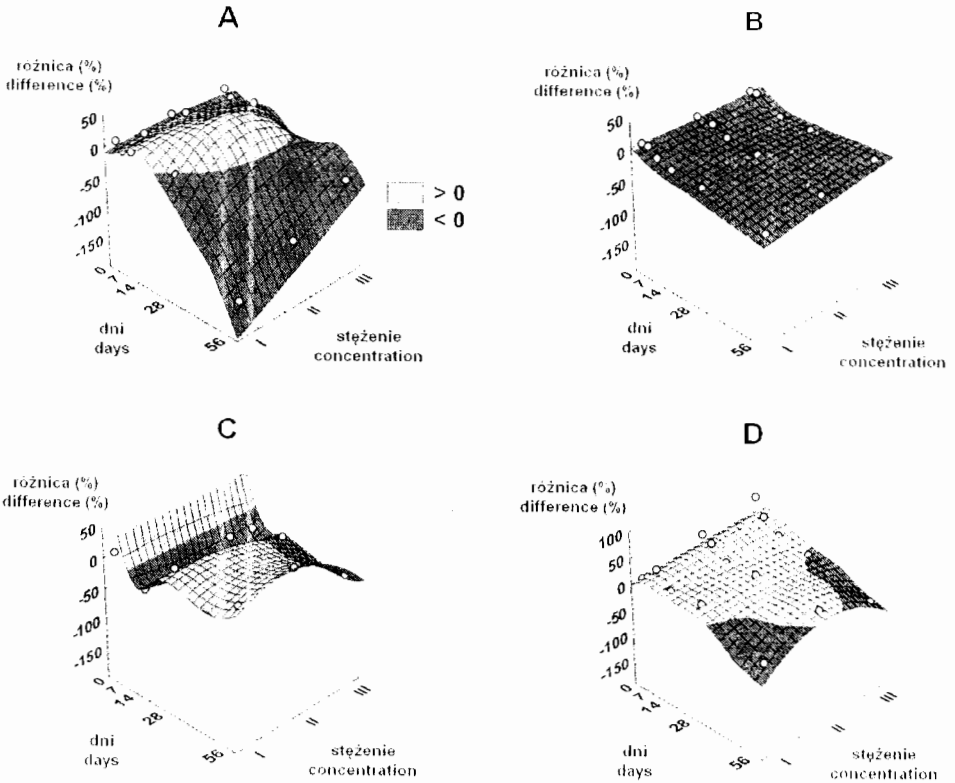
Herbicyd Herbicide	Substancja aktywna Active substance	Zastosowane dawki Applied doses			Zawartość atrazyny Atrazine content		
		(mm ³ ·kg ⁻¹)			(mg·kg ⁻¹)		
		I	II	III	I	II	III
Gesaprim 500 FW	Atrazyna	13	65	325	6,5	32,5	162,5

Przez okres ośmiu tygodni wszystkie próbki glebowe przechowywano w polietylenowych woreczkach w optymalnych warunkach wilgotności i temperatury: 20°C i 60% m.p.w. W 1., 7., 14., 28. i 56. dniu doświadczenia badano kolorymetrycznie aktywność czterech enzymów glebowych: dehydrogenaz metodą THALMANA [1968] w modyfikacji ÖHLINGER [1996]; reduktazy azotanowej metodą FU i TABATABAI [1989]; ureazy metodą BONMATTI i in. [1992] i β -glukozydazy metodą HOFMANA i DEDEKLENA [1965]. Zawartość atrazyny w glebie oznaczono wykorzystując zestaw do wysoko sprawnej chromatografii cieczowej Series 200 firmy Perkin Elmer. Warunki chromatograficzne były następujące: detektor UV, długość fali $\lambda = 254 \mu\text{m}$, kolumna chromatograficzna: Adsorbosphere UHS (C18) $5 \mu\text{m}$ długości 150 mm, objętość nasytunku 10 mm³, faza ruchoma: metanol i woda w stosunku 60 : 40 (v/v), przepływ cieczy elucyjnej $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, czas retencji 3,20 min, najmniejsza oznaczana ilość 0,02 mg·kg⁻¹ gleby.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań dotyczące możliwości wykorzystania humusu, w redukcji toksycznego oddziaływania Gesaprimu 500 FW w stosunku do enzymów glebowych, przedstawiono na wykresach powierzchniowych i słupkowych. Uzyskane w laboratorium wyniki aktywności badanych enzymów przeliczono i podano jako procent aktywności danego enzymu w glebie kontrolnej bez dodatku humusu i Gesaprimu 500 FW, przyjmując jej aktywność jako 100%. Na wykresach powierzchniowych przedstawiono różnice w aktywności enzymów po zastosowaniu samego Gesaprimu 500 FW oraz w kombinacji z humusem. Różnice większe od zera informują, o korzystnym wpływie dodatku humusu do gleby zanieczyszczonej użytym w doświadczeniu herbicydem na aktywność badanych enzymów. Różnice mniejsze od zera przedstawiają zależność odwrotną. Wykresy słupkowe przedstawiają wartości uśrednione aktywności badanych enzymów ze wszystkich dni pomiaru w zależności

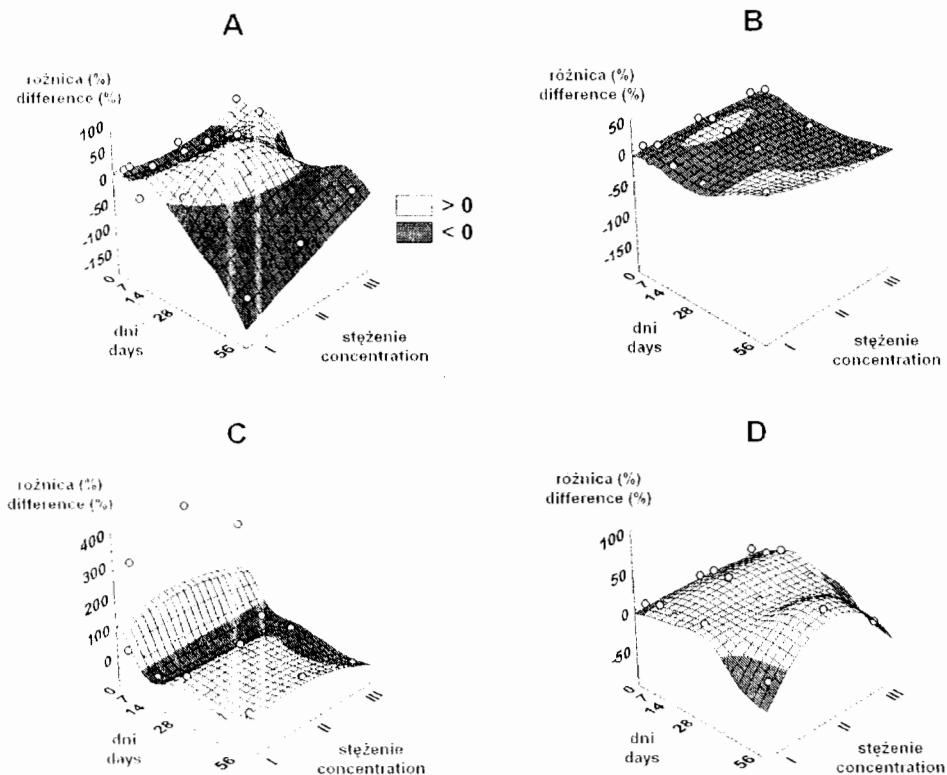
ci od ilości użytego w doświadczeniu humusu i Gesaprimu 500 FW. Na wykresach liniowych przedstawiono szybkość zanikania atrazyny w czasie w zależności od użytej w doświadczeniu kombinacji humusu i herbicydu.



Rys. 1. Procentowe różnice w aktywności dehydrogenaz (A), reduktazy azotanowej (B), ureazy (C) i β -glukozydazy (D) po zastosowaniu do gleby 1% dodatku humusu oraz Gesaprimu 500 FW

Fig. 1. Percentage differences in activity of dehydrogenases (A), nitrate reductase (B), urease (C) and β -glucosidase (D) after application of 1% humus and Gesaprim 500 FW to soil

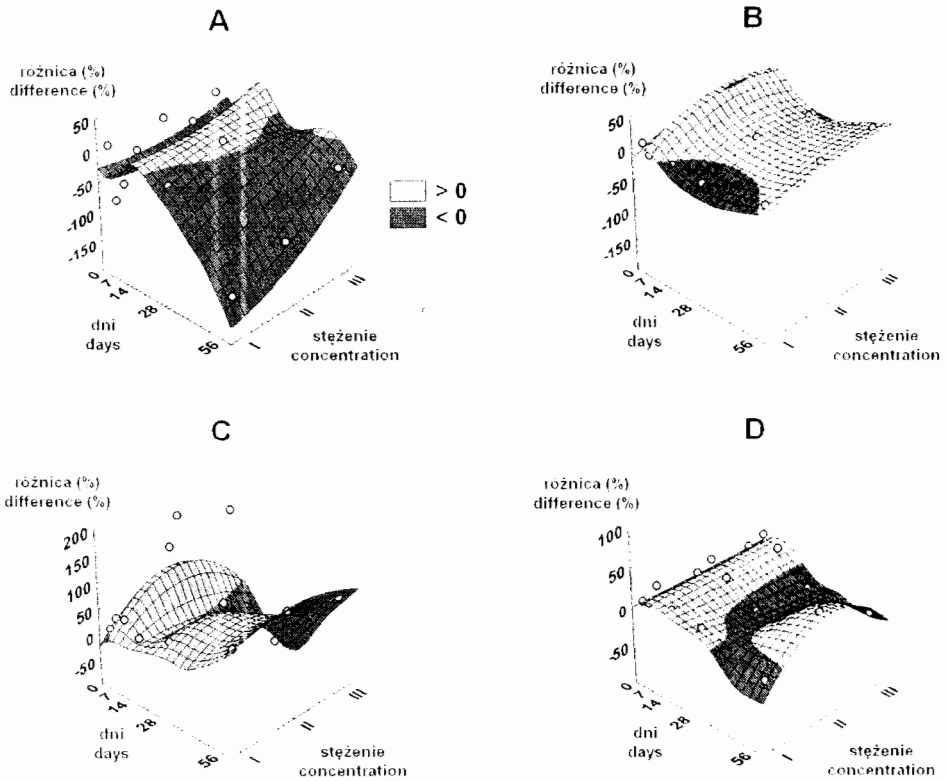
Dodatek humusu do gleby zanieczyszczonej Gesaprimem 500 FW wyraźnie oddziaływał na aktywność badanych enzymów (rys. 1, 2, 3, 4). Wraz ze wzrostem dawki humusu aktywność enzymów była wyraźnie większa. Enzymami, które najsilniej zareagowały na dodatek humusu były reduktaza azotanowa i ureaza. Pozytywny efekt dodatku humusu obserwowany był nie tylko po zastosowaniu dawki połowej użytego w doświadczeniu preparatu, ale również po zastosowaniu dawek podwyższonych. Różnice w aktywności ureazy po zastosowaniu 5% dodatku humusu sięgały nawet 250–400% (średnia aktywność ureazy po zastosowaniu II stężenia Gesaprimu 500 FW, niezależnie od ilości humusu, była prawie dwukrotnie większa niż aktywność tego enzymu w glebie bez humusu). PERUCCI i in. [1999] wykazali aktywację reduktazy azotanowej po zastosowaniu rimsulfuronu.



Rys. 2. Procentowe różnice w aktywności dehydrogenaz (A), reduktazy azotanowej (B), ureazy (C) i β -glukozydazy (D) po zastosowaniu do gleby 5% dodatku humusu oraz Gesaprimu 500 FW

Fig. 2. Percentage differences in activity of dehydrogenases (A), nitrate reductase (B), urease (C) and β -glucosidase (D) after application of 5% humus and Gesaprim 500 FW to soil

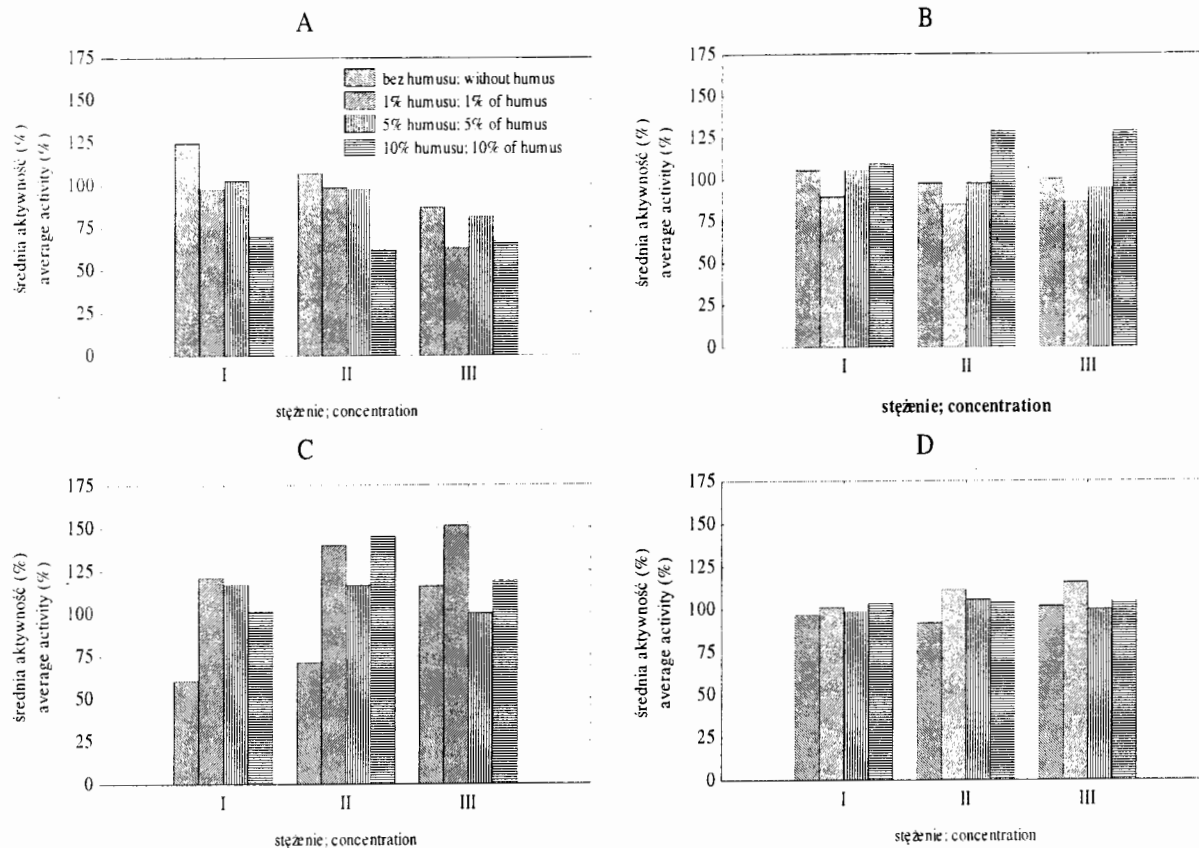
Srednia aktywność β -glukozydazy w glebie skażonej wszystkimi dawkami użytego w doświadczeniu herbicydu była podobna po wprowadzeniu 1, 5 i 10% dodatku humusu. Również MEGHARAJ i SINGLETON [1999] nie stwierdzili wpływu fenamifosu na aktywność tego enzymu. Jedynie aktywność dehydrogenaz przedstawiała się odwrotnie. Dodatek humusu do gleby, do której wprowadzono Gesaprim 500 FW, spowodował znaczne obniżenie aktywności tego enzymu w odniesienia do aktywności dehydrogenaz w glebie bez dodatku materii organicznej. Różnice w aktywności tego enzymu sięgały od 50 do 150%, niezależnie od zastosowanej w doświadczeniu ilości humusu i Gesaprimu 500 FW. Tendencja ta widoczna była zwłaszcza w drugiej połowie doświadczenia. Uzyskane wyniki są zatem sprzeczne z doniesieniami MASCIANDARO i in. [1998] oraz KOPERA i in. [2004], którzy nie zaobserwowali związku pomiędzy aktywnością dehydrogenaz i zawartością substancji humusowych w glebie. Przytoczeni autorzy zaobserwowali wzrost aktywności dehydrogenaz glebowych dodatkowo skorelowany z zawartością materii organicznej w glebie.



Rys. 3. Procentowe różnice w aktywności dehydrogenaz (A), reduktazy azotanowej (B), ureazy (C) i β -glukozydazy po zastosowaniu do gleby 10% dodatku humusu oraz Gesaprimu 500 FW

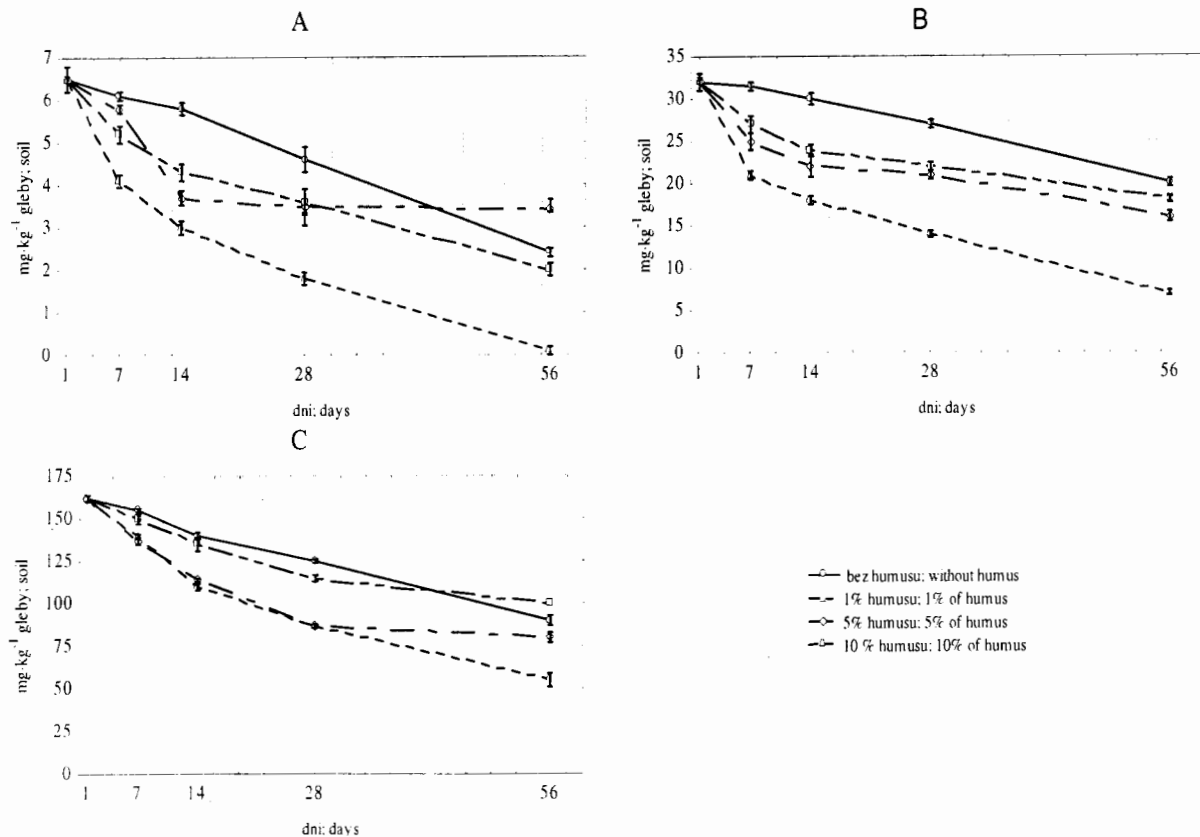
Fig. 3. Percentage differences in activity of dehydrogenases (A), nitrate reductase (B), urease (C) and β -glucosidase (D) after application of 10% humus and Gesaprim 500 FW to soil

Niezależnie od zastosowanej w doświadczeniu dawki Gesaprimu 500 FW dodatek humusu przyspieszał rozkład atrazyny w glebie, a okres połowicznego rozpadu tego herbicydu wahał się w przedziale od 10 do 56 dni (rys. 5). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem dawki humusu zanik był szybszy. W przypadku dawki połowej i 10-krotnie większej herbicydu szybkość zaniku atrazyny przy 1% i 5% dodatku humusu była podobna. Tylko przy 10% dodatku humusu tempo zanikania atrazyny było wyraźnie szybsze. Po zastosowaniu dawki połowej Gesaprimu 500 FW i 10% dodatku humusu w ostatnim dniu doświadczenia nie stwierdzono pozostałości atrazyny w glebie. Podobne wyniki okresu połowicznego rozpadu atrazyny (15–77 dni) uzyskała SWARCEWICZ [2002]. Jednak autorka stwierdziła również, że szybkość rozkładu atrazyny zmniejszała się wraz ze wzrostem zawartości substancji organicznej. Podobne zależności uzyskali HOUOT i in. [1998] w wyniku dodatku do gleby kompostu. Jednak PERRIN-GANIER i in. [2001] wykazali, że osad ściekowy nie wpływał na szybkość rozkładu izoproturonu w glebie. Jedynie CULLINGTON i WALKER [1999] donoszą o korzystnym wpływie dodatku glukozy na szybkość zaniku diuronu i izoproturonu w glebie.



Rys. 4. Wpływ dodatku humusu i Gesaprimu 500 FW na aktywność dehydrogenaz (A), reduktazy azotanowej (B), ureazy (C) i β -glukozydazy (D) w glebie (wartości średnie)

Fig. 4. Influence of application humus and Gesaprim 500 FW (A) addition on dehydrogenase (A), nitrate reductase (B), urease (C) and β -glucosidase (D) activity in soil (mean values)



Rys. 5. Szybkość zanikania atrazyny w glebie po zastosowaniu humusu i Gesaprimu 500 FW w I stężeniu (A), II stężeniu (B) i III stężeniu (C)

Rys. 5. Degradation rate of atrazine in soil after humus and Gesaprim 500 FW application in I concentration (A), II concentration (B) and III concentration (C)

Zdaniem DZIADOWIEC [1993] i GONETA [1995] triazyny mogą być wiązane przez humus wiązaniami wodorowymi i Van der Walsa. Związany pestycyd może częściowo tracić swoje toksyczne właściwości i jest bardziej podatny na biodegradację przez mikroflorę glebową oraz oddziaływania niebiologiczne. Oddziaływania te mogą wynikać z reaktywności grup funkcyjnych związków humusowych, zdolności redukcyjnych kwasów huminowych i fulwowych oraz obecności wolnych rodników na glebowych związkach organicznych. Substancje humusowe wchodząc w reakcje z pestycydami mogą zmieniać ich strukturę chemiczną i przyspieszać degradację, czym w pewnym stopniu można wytłumaczyć uzyskane w pracy wyniki.

Wnioski

1. Aktywność ureazy, reduktazy azotanowej i β -glukozydazy w glebie różniła się znacznie po zastosowaniu samego Gesaprimu 500 FW oraz w kombinacji z humusem i była zazwyczaj wyższa w glebie z dodatkiem humusu.
2. Szybkość rozkładu atrazyny w glebie zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości humusu w glebie.
3. Wyniki badań wskazują, że humus może zostać wykorzystany w celu zmniejszenia niekorzystnego oddziaływania atrazyny na środowisko glebowe.

Literatura

- BIZIUK M. 2001. *Pestycydy – Występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa: 276 ss.
- BOGDA A., CHODAK T., NIEDŹWIECKI E. 1990. *Niektóre właściwości i skład mineralogiczny gleb Równiny Gumiennieckiej*. Roczn. Glebozn. 41(3/4): 179–191.
- BONMATI M., COCCANTI B., NANNIPIERI P. 1992. *Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil*. Soil Biol. Biochem. 4: 391–396.
- CULLINGTON J.E., WALKER A. 1999. *Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium*. Soil Biol. Biochem. 31: 677–686.
- DZIADOWIEC H. 1993. *Ekologiczna rola próchnicy glebowej*. Zesz. Probl. Postęp. Nauk. Rol. 411: 267–282.
- FU M.H., TABATABAI M.A. 1989. *Nitrate reductase activity in soils: effects of trace elements*. Soil Biol. Biochem. 21: 943–946.
- GEVAO B., SEMPLE K.T., JONES K.C. 2000. *Bound pesticide residues in soils, a review*. Environ Pollut. 108: 3–14.
- GOBENDINGER N., RADOSEVICH M. 1999. *Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M91-3*. Microbiol. Biotechnol. 51: 375–381.
- GONET S. 1995. *Rola substancji humusowych w glebach*. Ekol. Tech. 3/4: 25–27.
- HOFMAN G., DEDEKEN M. 1965. *Eine Methode zur colorimetrischen Bestimmung der β -glukosidase – Aktivität im Boden*. Z. Pflanz. Bod. 108/3: 193–198.

- HOUOT S., BARRIUSO E., BERGHEAND V. 1998. *Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments*. Weed Res. (45)2: 130–139.
- HOUOT S., TOOP E. 2000. *Dependence of accelerated degradation of atrazine on soil pH in French and Canadian soils*. Soil Biol. Biochem. 321: 615–625.
- KOPER J., PIOTROWSKA A., SIWIK-ZIOMEK A. 2004. *Wartość enzymatycznego wskaźnika żyzności gleby w zależności od zróżnicowanego zmianowania i nawożenia gleby*. Żesz. Probl. Post. Nauk. Rol. 501: 219–225.
- KRUTZ L.J., SENSEMAN S.A., HANEY R.L. 2003. *Effect of Roundup Ultra on atrazine degradation in soil*. Biol. Fertil. Soils 38: 115–118.
- MASCIANDARO G., CECCANTI B., GALLARDO-LANCHIO J.F. 1998. *Organic matter properties in cultivated versus set-aside arable soils*. Agric. Ecosyst. Environ. 67: 267–274.
- MEGHARAJ M., SINGLETON I. 1999. *Persistence and effects of fenaminophos on algal populations and enzymatic activities in soil*. Soil Biol. Biochem. 31: 1549–1553.
- NOWAK J. 1995. *Dynamika biologicznego i abiotycznego rozkładu niektórych pestycydów w glebie oraz ich wpływ na ilość biomasy żywych mikroorganizmów*. Rozprawa nr 169 AR w Szczecinie: 101 ss.
- ÖHLINGER R. 1996. *Dehydrogenase activity with the substrate TTC*, w: *Methods in soil biology*. Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (red.). Springer Verlag, Berlin: 241–243.
- PERRIN-GANIER C., SCHIAVON F., MOREL J.-L., SCHIAVON M. 2001. *Effect of sludge-amendment or nutrient addition in the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil*. Chemosphere 44: 887–892.
- PERUCCI P., VISCHETTI M., BATTISTONI F. 1999. *Rimsulfuron in silt clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions*. Soil Biol. Biochem. 31: 195–204.
- SWARCEWICZ M. 2002. *Studia nad trwałością wybranych herbicydów w obecności innych ksenobiotyków w środowisku glebowym*. Rozprawa nr 208 AR w Szczecinie: 94 ss.
- THALMAN A. 1968. *Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)*. Landwirtsch. Forsch. 21: 249–258.

Słowa kluczowe: herbicyd, Gesaprim 500 FW, enzymy glebowe, aktywność enzymatyczna, humus

Streszczenie

Badano wykorzystanie humusu w zmniejszeniu niekorzystnego oddziaływania atrazyny na środowisko glebowe. Do oceny posłużono się aktywnością enzymatyczną ureazy, dehydrogenaz, reduktazy azotanowej i β -glukozydazy.

Badania przeprowadzono w laboratorium na próbkach gleby o składzie granulometrycznym gliny lekkiej pylastej. Do przygotowanych naważek gleby wprowadzono rozdrobniony humus w ilości 1, 5 i 10%. Następnie do każdej z przygotowanych kombinacji dodano Gesaprim 500 FW w dawkach: połowej, pięciokrotnie i dwudziestopięciokrotnie większej od zalecanej. Próbkę dokładnie wymieszano.

no i przechowywano przez okres 56 dni w polietylenowych woreczkach w optymalnych warunkach wilgotności i temperatury. W 1., 7., 14., 28., i 56. dniu doświadczenia badano spektrofotometrycznie aktywność dehydrogenaz, ureazy, β -glukozydazy i reduktazy azotanowej według ogólnie stosowanych metod. Dodatkowo w w/w terminach badano szybkość zanikania atrazyny w glebie.

Stwierdzono, że szybkość zanikania atrazyny zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości humusu. Po zastosowaniu 1% i 5% dodatku do gleby humusu stwierdzono wyższą aktywność reduktazy azotanowej, β -glukozydazy i ureazy w porównaniu z aktywnością enzymów w glebie bez dodatku humusu. Jedynie aktywność dehydrogenazy była niższa po zastosowaniu wszystkich dawek humusu.

ESTIMATION OF HUMUS USEFULNESS IN DECREASING AN ADVERSE INFLUENCE OF ATRAZINE ON ACTIVITY OF SELECTED SOIL ENZYMES

Dariusz Klódka, Aldona Bojko

Department of Biochemistry, Agricultural University, Szczecin

Key words: herbicide, Gesaprim 500 FW, soil enzymes, enzymatic activity, humus

Summary

An attempt was made to use the humus utility to decreasing the adverse influence of atrazine on soil environment. Evaluation was based on enzymatic activity of urease, dehydrogenases, nitrate reductase and β -glucosidase.

The investigations were conducted under laboratory conditions on soil samples taken from black earth, originating from light dusty clay. Prepared soil samples were supplemented with crumbled humus in quantity 1, 5 and 10%. Next to every of prepared combinations Gesaprim 500 FW was added in doses: field, five and twenty five times greater than the recommended. All samples were mixed and stored for 56 days in plastic containers under optimum conditions of moisture and temperature. On 1st, 7th, 14th, 28th and 56th days of experiment the activities of dehydrogenases, urease, nitrate reductase and β -glucosidase were determined according to generally used practical methods. Moreover, at the same terms the rate of atrazine disappearance in soil was studied

It was found that the rate of atrazine disappearance increased with increasing of humus content. After use 1% and 5% humus addition the higher activity of nitrate reductase, urease and β -glucosidase in soil was observed in comparison to enzymatic activity in soil without humus addition. The only activities of dehydrogenases were lower after using all doses of humus.

Dr inż. Dariusz **Klódka**

Katedra Biochemii

Akademia Rolnicza

ul. Słowackiego 17

71-434 SZCZECIN

e-mail: dklodka@agro.ar.szczecin.pl