

ZMIANY W AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ DROBNOUSTROJÓW GLEBOWYCH PO ZASTOSOWANIU PESTYCYDÓW

CZEŚĆ I

MIEDZIAN 50 WP, MIEDZIAN EXTRA 350 SC

Andrzej Nowak, Magdalena Błaszak

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Adiuwenty w połączeniu z pestycydami stosowanymi w agrotechnice wspomagają walkę z chwastami i szkodnikami roślin, wydłużają okres działania substancji aktywnej, potęgują niejednokrotnie jej oddziaływanie [ADAMCZEWSKI i in. 1996]. Istnieje niebezpieczeństwo, że pestycydy udoskonalone (z dodatkowymi wspomagaczami) również skutecznie mogą przyczynić się do redukcji pożytecznej mikrobiocenozy glebowej. Fakt zastępowania mało odpornych mikroorganizmów przez inne, często nie spełniające specyficznych ekologicznych funkcji, może mieć poważne konsekwencje w zaburzonym funkcjonowaniu ekosystemu [BEELEN, DOELMAN 1997]. Znacznie mniej badań poświęconych jest oddziaływaniu pestycydów i innych ksenobiotyków na liczebność i aktywność enzymatyczną grup fizjologicznych mikroorganizmów, czyli drobnoustrojów zdolnych do hydrolizy związków organicznych trafiających do gleby. Wydaje się wysoce właściwe pozyskiwanie dokładnych informacji na temat oddziaływania pestycydów na procesy mikrobiologicznego przekształcania materii organicznej, bowiem nawet niewielkie upośledzenie aktywności jednej grupy drobnoustrojów wyspecjalizowanej w rozkładzie specyficznego związku, może wpływać niekorzystnie na cały cykl przemiany związków węgla i azotu w przyrodzie. Ograniczanie różnorodności mikroorganizmów spowodowane wprowadzaniem różnych związków chemicznych do gleby może mieć odbicie w zakłóceniu procesów mineralizacji, a w konsekwencji może spowodować obniżenie zasobności gleby w składniki pokarmowe [STRZELEC 1984; RÓŻAŃSKI 1992; NIKLIŃSKA, CHMIEL 1997].

Material i metodyka

Mikroorganizmy wyizolowano metodą posiewu rozcieńczeń glebowych z powierzchniowej warstwy gleby uprawnej, tj. z piasku gliniastego lekkiego pylastego o pH w H₂O 7,94 (oznaczenie wykonano metodą potencjometryczną). Glebę –

źródło mikroorganizmów – pobrano w Lipniku k. Stargardu Szczecińskiego w Stacji Doświadczalnej Akademii Rolniczej. Spośród wyizolowanych mikroorganizmów (bakterii hodowanych na podłożu Bunta-Roviry i grzybów wyrosłych na podłożu Martina), wybrano kilkanaście szczepów o odpowiednich właściwościach. Brane pod uwagę właściwości drobnoustrojów to intensywność hydrolizy danego substratu (skrobi, tributyryny lub kazeiny) oraz zdolność do wykorzystywania różnych źródeł węgla i/lub energii. Aktywność hydrolityczną oceniano hodując mikroorganizmy na podłożach stałych zawierających wymienione związki organiczne: skrobię (w ilości 1%) [COONEY, EMERSON 1964], tributyrynę (1%) [KOSEWSKA 1970], kazeinę (ok. 1,4%) [KĘDZIA 1974] i obserwując ubytek tych substratów w podłożu.

Wybrano sześć szczepów bakteryjnych i osiem grzybowych. Wśród bakterii, jeden szczep wykazywał aktywność potrójną: proteolityczną, lipolityczną i amylolityczną, dwa były zdolne do hydrolizy skrobi i kazeiny, inne dwa hydrolizowały tributyrynę i kazeinę oraz jeden był zdolny do rozkładu jedynie tributyryny. Wśród grzybów jeden szczep przejawiał aktywność lipolityczną, proteolityczną i amylolityczną (potrójną), dwa były zdolne do hydrolizy skrobi i tributyryny, a inne dwa były aktywne w rozkładzie kazeiny i tributyryny; dwa następne szczepy przeprowadzały hydrolizę tylko skrobi i jeden był zdolny do rozkładu jedynie kazeiny.

Wybrane mikroorganizmy przeszczepiano punktowo na podłoże ze skrobią, tributyryną lub kazeiną (te same podłoża, które opisano powyżej); gdzie dodatkowo wprowadzano fungicydy w dawkach: 1, 10, 100 mg substancji aktywnej (Miedzian 50 WP) lub substancji aktywnej z adiuwantem (Miedzian extra 350 SC) w dm^3 podłoża (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Charakterystyka preparatów użytych w doświadczeniach
Characteristics for 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
Miedzian 50 WP	fungicyd tradycyjny, bez adiuwanta traditional fungicide without adjuvant	tlenochlorek miedzi (copper oxychloride)	50%	$5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$	III	Z. Ch. „Organik-Azol” S.A. Jaworzno
Miedzian extra 350 SC	fungicyd udoskonalony, z adiuwantem fungicide with adjuvant		$350 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$	$5 \text{ dm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$	III	

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 szcze-

pów, jako stosunek średnicy strefy hydrolizy (kazeiny, skrobi lub tributyriny) do średnicy kolonii. Odczyty dla mikroorganizmów amylolitycznych dokonywane były po wcześniejszym zalaniu podłoża płynem Lugola. Każdy szczepek badano w trzech powtórzeniach.

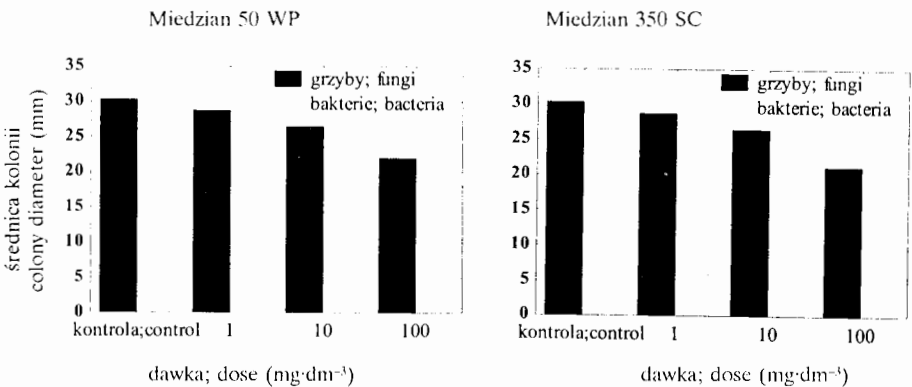
Wyniki poddano analizie statystycznej, przy pomocy testu Duncana. Stwierdzano istotność różnic (przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$) pomiędzy wpływem dwóch fungicydów, pomiędzy wpływem odpowiadających sobie dawek tych preparatów, zarówno dla dwóch grup systematycznych (badano bakterie i grzyby), jak i poszczególnych szczepek.

Wyniki i dyskusja

Niewiele badań poświęcono wpływowi adiuwantów na kształtowanie aktywności substancji czynnej fungicydów, ponieważ w większości przypadków adiuwanty stosowane są łącznie z herbicydami nalistnymi, ostatnio jednak pojawiły się zalecenia używania wspomagaczy również z innymi środkami ochrony roślin, w tym z fungicydami [PIĄSZKOWSKA i in. 1997; PRACZYK 2002].

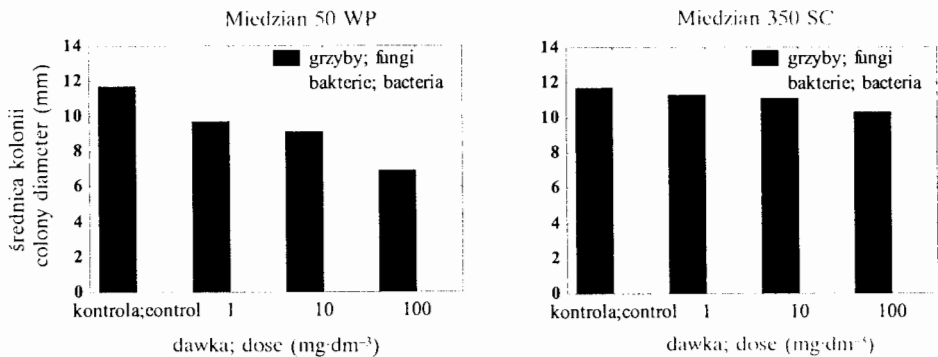
Trudno jednoznacznie określić, która forma fungicydu (tradycyjna, czy udoskonalona dodatkowym adiuwantem), w całym doświadczeniu silniej wpływała na mikroorganizmy, ponieważ rozpatrując poszczególne grupy systematyczne mikroorganizmów (bakterie lub grzyby), poszczególne dawki pestycydów (1, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), określoną aktywność (hydroliza skrobi, tributyriny lub kazeiny) i przede wszystkim badany parametr (wzrost mikroorganizmów lub aktywność hydrolytyczną), raz silniej oddziaływała forma tradycyjna, a w innym przypadku udoskonalona.

Wzrost bakterii i grzybów zdolnych do hydrolizy białka na podłożu z dodatkiem tlenochlorku miedzi najskuteczniej redukowała dawka najwyższa tej substancji biologicznie czynnej – 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$, najniższe wartości (niższe niż w kontroli odpowiednio o ok. 50 i 30%) zanotowano po użyciu formy udoskonalonej, czyli Miedzianu extra 350 SC, mimo że substancji aktywnej w tym preparacie było mniej, niż w Miedzianie 50 WP (rys. 1).



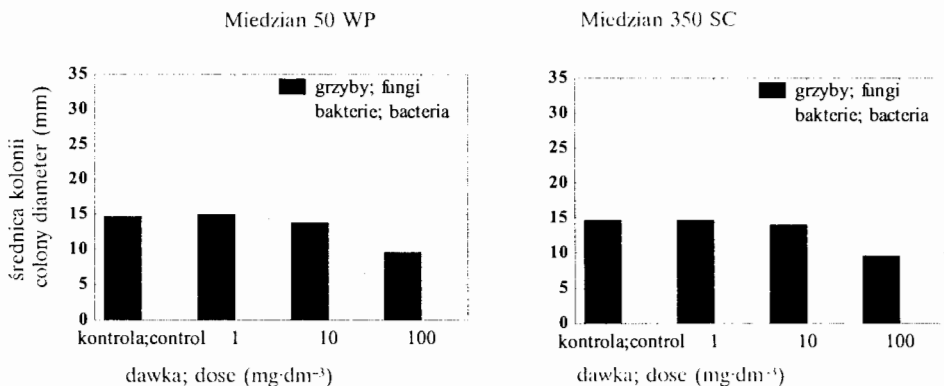
Rys. 1. Wpływ pestycydów na wielkość średnic kolonii mikroorganizmów proteolitycznych (wyniki uśrednione dla wszystkich szczepek)

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



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

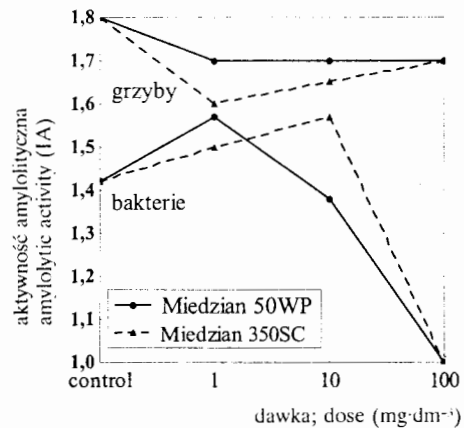
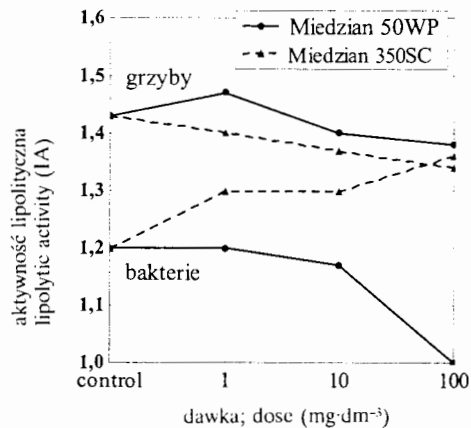
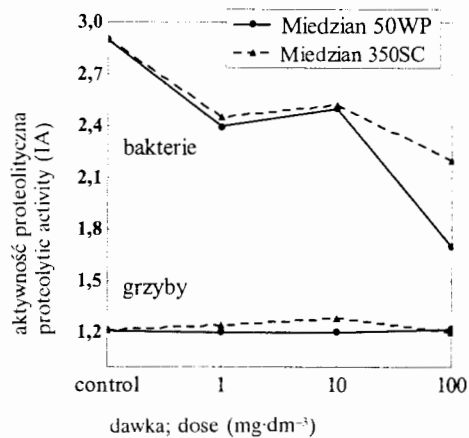
Fig. 2. The influence of pesticide on the diameter of lipolytic colony microorganisms (average from the whole experiment for all strains)



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

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

Podobnie w innym eksperymencie [PTASZKOWSKA i in. 1997], gdzie badano wpływ fungicydów Siarkolu i Siarkolu w połączeniu z adiuwantami na fitopatogenicznego grzyba *Erysiphe graminis*, okazało się, że obniżona dawka fungicydu zastosowanego łącznie z adiuwantami: Olemix, Adbios 85 SL, Citowett w sposób silniejszy i dłuższy wstrzymuje rozwój testowanego mikroorganizmu. W doświadczeniu NOWAKA i in. [2001] większość szczepów proteolitycznych na pożywkach z tlenochlorkiem miedzi rosła do stężenia 0,5 mmol·dm⁻³. Najczęściej wraz ze wzrostem stężenia miedzi malała wielkość kolonii bakterii i rosła intensywność hydrolizy białka. Pod wpływem stężenia 0,05 mmol·dm⁻³ miedzi szczepy proteolityczne rosły najczęściej słabiej w porównaniu do wzrostu na podłożach bez dodatku tego pierwiastka. Niewielki spadek liczebności bakterii zdolnych do hydrolizy białka opisał DIGRAK i ÖZCELİK [1998] po zastosowaniu dogłębowo fungicydu Endosulfan 35 WP.



Rys. 4. Wpływ pestycydów na aktywność hydrolityczną mikroorganizmów (wyniki uśrednione dla wszystkich szczepów)

Fig. 4. The influence of pesticides on the enzymatic activity (average from the whole experiment for all strains)

Wszystkie zastosowane w doświadczeniu dawki Miedzianów: 1, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ redukowały zdolność do wzrostu bakterii na podłożu z dodatkiem tłuszczu i skrobi (rys. 2, 3). NOWAK i in. [2001] badając wpływ miedzi na aktywność amylolytyczną i lipolityczną bakterii wykazali większą wrażliwość enzymów biorących udział w hydrolizie skrobi, ponieważ już pod wpływem stężenia 0,5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mikroorganizmy rosły bardzo słabo, a średnice kolonii zmalały o ok. 80% w stosunku do kontroli. ATLAS i in. [1978] doniósł także o okresowo hamującym wpływie substancji biologicznie czynnych fungicydów (trichlorometylu, folpetu i captafolu) na procesy mineralizacji związków organicznych, spadek aktywności enzymatycznej tłumaczył redukcją populacji grzybów czynnych w tych procesach.

Porównując wpływ Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC w odpowiadających sobie dawkach 1 oraz 10 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ na mikroorganizmy lipolityczne, stwierdzono brak różnic statystycznie istotnych, natomiast dawka najwyższa (100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) dwóch fungicydów różniła się pod tym względem w sposób statystycznie istotny. Ogólnie można stwierdzić niewielki wpływ Miedzianów na mikroorganizmy hydrolizujące tributyrinę, jedynie dawka najwyższa oddziaływała silnie, szczególnie Miedzianu 50 WP, który redukował zdolność do wzrostu bakterii i grzybów odpowiednio o ok. 80 i 40% (Miedzian 350 SC o 60 i kilka %). Na działanie tlenochlorku miedzi bardziej wrażliwe były bakterie lipolityczne niż grzyby (rys. 2, 4).

W większości przypadków oddziaływanie Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC na badane parametry było podobne, szczególnie przy porównywaniu oddziaływania dawek niższych (rys. 1, 2, 3, 4). Wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt, że same adiuwanty niezbyt silnie oddziałują na mikroorganizmy, dlatego wprowadzenie wspomagacza nie wpłynęło znacznie na modyfikację działania substancji aktywnej wobec badanych mikroorganizmów. W doświadczeniu NOWAK i BŁASZAK [2004], adiuwanty Rapol 90 EC i Silwet 560 nieznacznie wpływały na kształtowanie zawartości biomasy mikroorganizmów – średnio kilka procent różnicy w porównaniu z kontrolą. Ewentualne odchylenia od wartości kontrolnych były sporadyczne i krótkotrwałe. Podobnie adiuwanty Olemix i Olejan użyte dolebowo przez autorów innego doświadczenia [NOWAK i in. 1998] także nie zmieniły istotnie (w porównaniu do kontroli) zawartości biomasy żywych mikroorganizmów glebowych. Podobnie preparat Oleo (olej parafinowy) zwiększał jedynie nieznacznie intensywność oddychania gleby [ENGELLEN i in. 1998].

Wnioski

1. Wzrost mikroorganizmów i ich aktywność hydrolityczną w większości przypadków silniej modyfikował Miedzian 50 WP, niż jego udoskonalony odpowiednik Miedzian 350 SC. Rozpatrując poszczególne grupy systematyczne mikroorganizmów (bakterie lub grzyby), poszczególne dawki pestycydów (1, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), określoną aktywność (hydroliza skrobi, tributyriny lub kazeiny) i przede wszystkim badany parametr (wzrost mikroorganizmów lub aktywność hydrolityczną), raz silniej oddziaływała forma tradycyjna, a w innym przypadku udoskonalona.

2. Różnice statystycznie istotne między wpływem Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC dotyczyły najczęściej dawki najwyższej ($100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), na niższe dawki dwóch pestycydów (1 i $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) mikroorganizmy reagowały podobnie (kilka – kilkanaście % różnicy) lub tak samo.
3. Odmienne oddziaływanie Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC dotyczyło częściej bakterii niż grzybów. Badania wykazały, że wyraźne różnice we wzroście grzybów na podłożu i w ich aktywności hydrolitycznej dotyczyły głównie tributyriny, w mniejszym stopniu skrobi i kazeiny.
4. Odmienne oddziaływanie Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC obserwowano częściej badając zdolność do wzrostu mikroorganizmów (rozmiary średnic kolonii) hodowanych na podłożu z pestycydami, niż ich zdolność do hydrolizy związku organicznego (skrobi, kazeiny lub tributyriny), wyrażoną indeksem aktywności (IA).

Literatura

- ADAMCZEWSKI K., GRALA B., STACHECKI S. 1996. *Ekonomiczne aspekty stosowania adiuwantów przy zwalczaniu chwastów*. Post. Ochr. Roślin 36: 126–133.
- ATLAS R.M., PRAMER D., BARTHA R. 1978. *Assessment of pesticide effects on non – target soil microorganisms*. Soil Biol. Biochem. 10: 231–239.
- BELLEN P., DOELMAN P. 1997. *Significance and adaptation of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminations in soil and sediment*. Chemosphere 34: 455–499.
- COONEY D.G., EMERSON R. 1964. *Thermophilic fungi*, w: *An account of their biology, activities and classification*. W.H. Freeman and Company, San Francisco, London: 188 ss.
- DIGRAK M., ÖZCELİK S. 1998. *Effect of some pesticides on soil microorganisms*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60: 916–922.
- ENGELEN B., MEINKEN K., VON WINTZINGERODE F., HOLGER H., MALKOMES H., BACHAUS H. 1998. *Monitoring impact of pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures*. Appl. Environ. Microbiol. 64(8): 2814–2821.
- KĘDZIA W., KONAR H. 1980. *Diagnostyka mikrobiologiczna*. PZWŁ Warszawa: 245 ss.
- KOSEWSKA L. 1970. *Analiza mikrobiologiczna w przemyśle spożywczym*. PWSZ: 253 ss.
- NIKLIŃSKA M., CHMIEL M. 1997. *Porównanie odporności na metale ciężkie u mikroorganizmów glebowych z rejonów silnie zanieczyszczonych miedzią lub cynkiem*, w: *Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie*. Barabasz W. (Red.) Wyd. AR Kraków: 491–504.
- NOWAK A., BŁASZAK M. 2004. *Wpływ dodatku adiuwantów na działanie fungicydów zmieniające ilość biomasy żywych mikroorganizmów w glebie*. Folia Univ. Agric. Stetin., Agric. 242(98): 115–122.
- NOWAK A., NOWAK J., PRZYBULEWSKA K., TUROS-BIERNACKA M. 1998. *Auswirkung von Betanal 160 EC in Kombination mit Zusatzstoffen auf die biologische Aktivität des*

Bodens. Teil I: Einfluß auf die mikrobielle Biomasse, Z. PflKrankh. PflSchutz 16: 763–770.

NOWAK A., PRZYBULEWSKA K., SZOPA E., STACEWICZ A. 2001. Wpływ metali ciężkich (Hg, Cd, Cu, Pb) na wzrost i aktywność enzymatyczną bakterii glebowych. Folia Univ. Agric. Stetin., Agric. 221(81): 165–173.

PRACZYK T. 2002. Adiuwanty – lepsze i tańsze odchwaszczanie. Agrochemia 5: 11–14.

PTASZKOWSKA J., MALIŃSKI Z., TUROS-BIERNACKA M. 1997. Wpływ wybranych adiuwantów na aktywność biologiczną fungicydu Siarkol K 85 WP. Post. Ochr. Roślin 37: 257–259.

RÓŻAŃSKI L. 1992. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. PWRiL Warszawa: 275 ss.

STRZELEC A. 1984. Wpływ herbicydów na przemiany biochemiczne zachodzące w glebach. Roczn. Glebozn. XXXV(2): 107–119.

Słowa kluczowe: aktywność enzymatyczna, mikroorganizmy, fungicydy

Streszczenie

Adiuwanty w połączeniu z pestycydami stosowanymi w agrotechnice wspomagają walkę z chwastami i szkodnikami roślin, wydłużają okres działania substancji aktywnej, potęgują niejednokrotnie jej oddziaływanie. Istnieje niebezpieczeństwo, że pestycydy udoskonalone (z dodatkowymi wspomagaczami) również skutecznie mogą przyczynić się do redukcji pożytecznej mikroflory glebowej.

Badano wpływ Miedzianu 50 WP i Miedzianu extra 350 SC na wyizolowane z gleby bakterie i grzyby, badano wpływ zarówno na ich wzrost, jak i na aktywność hydrolityczną wobec skrobi, kazeiny i tributyriny.

Wzrost mikroorganizmów i ich aktywność hydrolityczną w większości przypadków silniej modyfikował Miedzian 50 WP, niż jego udoskonalony odpowiednik Miedzian 350 SC. Rozpatrując poszczególne grupy systematyczne mikroorganizmów (bakterie lub grzyby), poszczególne dawki pestycydów (1, 10, 100 mg·dm⁻³), określoną aktywność (hydroliza skrobi, tributyriny lub kazeiny) i przede wszystkim badany parametr (wzrost mikroorganizmów lub aktywność hydrolityczną), raz silniej oddziaływała forma tradycyjna, a w innym przypadku udoskonalona. Różnice statystycznie istotne między wpływem dwóch fungicydów, dotyczyły najczęściej dawki najwyższej (100 mg·dm⁻³), na niższe dawki (1 i 10 mg·dm⁻³) mikroorganizmy reagowały podobnie (kilka – kilkanaście % różnicy) lub tak samo. Odmiennie oddziaływanie Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC dotyczyło częściej bakterii niż grzybów. Badania wykazały, że wyraźne różnice we wzroście grzybów na podłożu i w ich aktywności hydrolitycznej dotyczyły głównie tributyriny, w mniejszym stopniu skrobi i kazeiny. Zróznicowane oddziaływanie Miedzianu 50 WP i Miedzianu 350 SC obserwowano częściej badając zdolność do wzrostu mikroorganizmów (rozmiary średnic kolonii) hodowanych na podłożu z pestycydami, niż ich zdolność do hydrolizy związku organicznego (skrobi, kazeiny lub tributyriny).

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

PART I

MIEDZIAN 50 WP, MIEDZIAN EXTRA 350 SC

Andrzej Nowak, Magdalena Błaszczak

Department of Microbiology and Environmental Biotechnology,
Agriculture University, Szczecin

Key words: enzymatic activity, microorganisms, fungicides

Summary

Adjuvants and pesticides widely applied in agrotechniques provide a significant support in fighting weeds and crop pests, prolonging the period over which a substance remains active, multiplying its effect and impact. Still, there is a risk that the perfected pesticides (with additional adjuvants admixtures) can be equally effective in reducing the microbiocenose in the soil.

Thus, an impact of Miedzian 50 WP and Miedzian 350 SC upon fungi and bacteria isolated from the soil, was studied with regards to their impact on the growth rate, and hydrolytic activity, for various organic substrates.

The obtained results confirmed a hypothesis that for the same pesticides their impact on microbes can be significantly different. Though to determine which pesticide affected the microbes most severely proved impossible, as the influence depended on the fungicide dose, as well as the studied substrate and parameter under consideration, in most cases Miedzian 50 WP proved to be the most efficient. The differences observed for various copper based pesticides were statistically significant, although the regular differences amounted only to a few to several percent, particularly when lower doses of fungicide are concerned. The observed pesticide impact tended to vary more frequently for bacteria than for fungi. For fungi the differences in their growth capabilities and activities were found to be distinct only for their capability to hydrolyse lipids. The observed impact of fungicides tended to vary more frequently with respect to growth rate in microbes on the substrates with pesticides, than for their capability to hydrolyse organic compounds.

Prof. dr hab. Andrzej **Nowak**

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska

Akademia Rolnicza

ul. Słowackiego 17

71-434 SZCZECIN

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