

OCENA WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNYCH GLEBY ZANIECZYSZCZONEJ ATRAZYNĄ

CZĘŚĆ II

DYNAMIKA ZANIKANIA ATRAZYNY W GLEBIE I ODDZIAŁYWANIE JEJ POZOSTAŁOŚCI NA AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ, REDUKTAZY AZOTANOWEJ, β -GLUKOZYDAZY I UREAZY

Janina Nowak, Dariusz Klódko, Edyta Kuńska, Arkadiusz Telesiński

Katedra Biochemii, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Pestycydy wprowadzane są do środowiska w celu ograniczenia występowania lub usunięcia niepożądanych organizmów żywych. Jednak dzięki swojej aktywności biologicznej pestycydy mogą również negatywnie oddziaływać na organizmy niezbędne do funkcjonowania danego ekosystemu, przy czym efekt ten może być spotęgowany zarówno poprzez długi okres zalegania substancji czynnej preparatu w środowisku a także niejednokrotnie jeszcze bardziej toksycznych jej metabolitów. Efekt negatywnego oddziaływania związany jest między innymi z badanym preparatem – substancją czynną jak i składnikami pomocniczymi, stosowaną dawką a także z warunkami środowiska [NOWAK, NOWAK 1996]. W przypadku pestycydów długo zalegających w środowisku, w wyniku ponownego ich stosowania, może dojść efekt kumulacji danej substancji czynnej, a także nagromadzenie się toksycznych metabolitów [KOSINKIEWICZ 1984], a to z kolei może przyczynić się, poprzez zarówno inaktywację, jak i aktywację enzymów, do zmiany kierunków metabolizmu środowiska.

Podstawowym składnikiem środowiska naturalnego jest gleba, której podstawową i niezwykle ważną cechą jest żyzność. Związana jest ona z kolei z aktywnością biologiczną. Można posługiwać się różnymi wskaźnikami przy jej określeniu, jednymi z najbardziej rozpowszechnionych jest aktywność enzymatyczna [KOPER i in. 2004], od której uzależnione są między innymi przemiany związane z obiegiem podstawowych pierwiastków (C, H, N).

Celem niniejszych badań było uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy istnieje zależność między pozostałością herbicydu długo zalegającego w glebie – atrazyny – stosowanego w formie preparatu Gesaprimu 500 FW i w postaci czystej w trzech różnych stężeniach a aktywnością takich enzymów glebowych jak: dehydrogenazy, reduktaza azotanowa, ureaza i β -glukozydaza.

Materiał i metody

Badania przeprowadzone zostały w warunkach laboratoryjnych na próbkach glebowych pobranych z poziomu orno-próchniczego (0–30 cm) z pola uprawnego usytuowanego na czarnych ziemiach Równiny Gumienieckiej. Gleby te w poziomie Ap wykazują skład granulometryczny gliny lekkiej pyłastej, posiadają zawartość próchnicy na poziomie 1,2%–1,8%, odczyn słabo kwaśny (pH 6,1–6,9), wysoką zasobność w przyswajalny fosfor oraz średnią do wysokiej zasobności w przyswajalny potas i magnez [BOGDA i in. 1990]. Pobraną do badań glebę poduszono do powietrznie suchej i przesiano przez sito o wielkości oczek 2 mm. Następnie materiał glebowy został podzielony na trzy grupy: I kontrolną – bez herbicydu, II z herbicydem w postaci preparatu Gesaprim 500 FW, oraz III z herbicydem w postaci tylko substancji czynnej. W grupie II i III wyodrębnione zostały trzy serie związane z dawką użytego preparatu oraz substancji czynnej w postaci czystej. Przy doborze dawek substancji kierowano się następującą zasadą: dawka pierwsza była wielkością zalecaną przez producenta herbicydu Gesaprim 500 FW (2–3 dm³·ha⁻¹) i określono ją jako zalecaną. Przy przeliczeniu tej dawki herbicydu wzięto pod uwagę masę gleby na głębokości 0,01 m i przeliczono następnie na ilość substancji czynnej zawartej w 1 kg gleby. Dawka druga była pięciokrotnie większa a trzecia dwudziestopięciokrotnie większa od zalecanej. Następnie do przygotowanych prób glebowych o masie 1 kg wprowadzono wodne roztwory preparatu herbicydowego i czystej substancji aktywnej w ilościach podanych w tabeli 1.

Tabela 1; Table 1

Zastosowane dawki preparatu Gesaprimu 500 FW i czystej atrazyny
The applied doses of Gesaprim 500 FW and pure atrazine

Zastosowana substancja Applied substance	I dawka I dose		II dawka II dose		III dawka III dose	
	mm ³ ·kg ⁻¹	mg·kg ⁻¹	mm ³ ·kg ⁻¹	mg·kg ⁻¹	mm ³ ·kg ⁻¹	mg·kg ⁻¹
Gesaprim 500 FW	13		65		325	
Atrazyna; Atrazine		6,5		32,5		162,5

Po naniesieniu wodnych emulsji preparatu oraz roztworu czystej atrazyny doprowadzono wilgotność gleby do 60% m.p.w. i po dokładnym wymieszaniu przechowywano w zamkniętych szczelnie woreczkach foliowych w temperaturze 20°C. Wilgotność i temperatura gleby w trakcie doświadczenia były utrzymywane na stałym poziomie. Punktem odniesienia była gleba kontrolna, bez dodatku herbicydu, utrzymywana w takich samych warunkach jak próbki glebowe z dodatkiem herbicydu. W każdej próbce badano w czterech powtórzeniach aktywność czterech enzymów: dehydrogenaz, reduktazy azotanowej, β -glukozydazy oraz ureazy. Jednocześnie w próbkach z dodatkiem herbicydu badano w trzech powtórzeniach pozostałości atrazyny. Analizy przeprowadzono w następujących terminach: 0, 1, 3, 7, 14, 28 i 56 dniu. Aktywność enzymów oznaczano według następujących procedur: dehydrogenaz według zmodyfikowanej przez ÖHLINGERA [1996] metody THALMANNA [1968] i podana w μg TPF na 5 gramów suchej masy gleby i czas inkubacji 16 godzin, reduktazy azotanowej metodą podaną przez FU i TABATABAI [1989] i podana w μg N-NO₂⁻ na 5 gramów suchej masy gleby i czas inkubacji 24 godziny, ureazy według metody BONMATTI i in. [1992] i podana w μg N-NH₃ na

1 gram suchej masy gleby i czas inkubacji 0,75 godziny oraz β -glukozydazy metodą HOFMANNĄ i DEDEKENA [1965] i podana w mg saligeniny w przeliczeniu na 10 gramów suchej masy gleby i czas inkubacji 3 godzin. Pozostałości atrazyny oznaczano metodą chromatografii cieczowej przy użyciu chromatografu HPLC Series 200 firmy Perkin Elmer stosując detektor UV 254 nm, kolumnę chromatograficzną Adsorbosphere UHS (C18) 5 μ m, długości 150 mm przy następujących warunkach: objętość nastrzyku 10 mm³, faza ruchoma metanol: woda w stosunku 60 : 40 (v/v), przepływ cieczy elucyjnej 1 cm³·min⁻¹, czas retencji 3,20 min, najmniejsza oznaczana ilość 0,02 mg·kg⁻¹ gleby.

Doświadczenie zostało przeprowadzone w układzie kompletnej randomizacji. Czynnikiem doświadczalnym było stężenie badanego herbicydu. Wyniki otrzymane z przeprowadzonego doświadczenia zostały opracowane statystycznie przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji. Najmniejsze istotne różnice NIR wyliczono opierając się na teście Tukey'a dla przedziału ufności $\alpha = 0,05$.

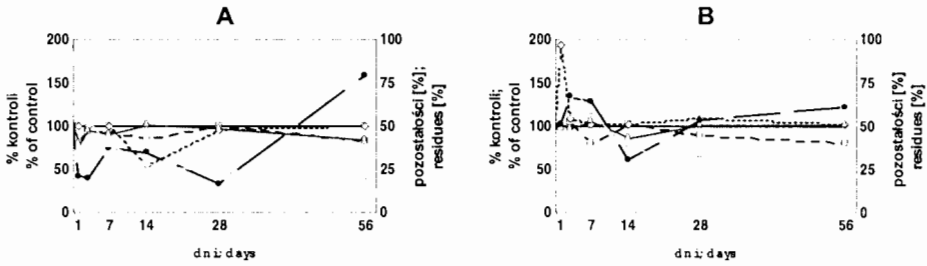
Wyniki i dyskusja

Wyniki badań dotyczących aktywności wymienionych czterech enzymów zostały przeliczone i podane jako % aktywności w glebie kontrolnej, przyjmując jej aktywność jako 100%. Z kolei pozostałości atrazyny podano również w % przyjmując dawkę pestycydu jako 100%. Aktywność enzymów dodatkowo została przeliczona i podana jako wartość średnia ze wszystkich pomiarów i również odniesiona do średniej aktywności danego enzymu w glebie kontrolnej.

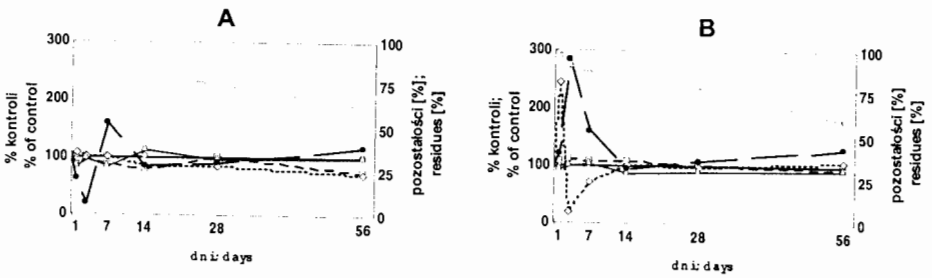
Wyniki badań wskazują na znaczne oddziaływanie atrazyny stosowanej zarówno w postaci preparatu, jak i w postaci czystej na aktywność badanych enzymów, przy czym oddziaływanie nasilało się wraz ze wzrostem dawki preparatu. Spośród czterech testowanych enzymów dehydrogenazy i reduktaza azotanowa (rys. 1) były w największym stopniu narażone na zahamowanie aktywności, zwłaszcza przy stosowaniu preparatu herbicydowego Gesaprim 500 FW. Jednocześnie na uwagę zasługuje mniejsza szybkość zanikania atrazyny w glebie przy stosowaniu preparatu pestycydowego niż w postaci tylko substancji czynnej, przy czym proces zanikania wyraźnie był uzależniony od zastosowanej dawki (wraz ze wzrostem dawki herbicydu szybkość zanikania wyraźnie zmniejszała się). Badania te są w pewnym stopniu potwierdzeniem badań KRUTZA i in. [2003], w których to atrazyna stosowana tylko w postaci preparatu Aatrex 4L zanikała szybciej niż stosowana łącznie z preparatem Roundup Ultra (s.a. glyfosat). Również HANEY i in. [2002] przy zastosowaniu tych samych preparatów stwierdzili różne ich oddziaływanie zarówno na proces mineralizacji, jak i stymulacji mikrobiologicznej aktywności. Stwierdzono także istotną korelację (tab. 2) między szybkością zanikania atrazyny (tylko zastosowanej w postaci czystej) w glebie a aktywnością dehydrogenaz, ureazy i β -glukozydazy oraz istotne zależności między aktywnością enzymów – z tym, że inne w przypadku stosowania preparatu Gesaprimu 500 FW (między aktywnością β -glukozydazy i ureazy oraz między aktywnością reduktazy azotanowej i dehydrogenaz) i inne w przypadku stosowania atrazyny w postaci czystej (między aktywnością ureazy i dehydrogenaz oraz między aktywnością β -glukozydazy i dehydrogenaz). Biorąc pod uwagę wartości uśrednione aktywności badanych enzymów (rys. 2) na uwagę zasługuje większe oddziaływanie atrazyny w postaci czystej niż w postaci preparatu. Najbardziej podatnymi, zwłaszcza

na zastosowane najwyższej dawki (25 x dawka zalecana) były dehydrogenazy i ureaza, a w następnej kolejności reduktaza azotanowa, i w najmniejszym stopniu β -glukozydaza. Interesujące jest również zupełnie różne oddziaływanie czystej atrazyny – aktywacja enzymów, co potwierdzają badania SANNINO I GIANFREDY [2001] i atrazyny w postaci preparatu (raczej inhibicja). Również PERUCCI i in. [1999] stwierdzili zmniejszanie się aktywności niektórych enzymów m.in. dehydrogenaz oraz zawartości ATP w glebie w wyniku stosowania zwiększonych dawek herbicydu sulfonilomocznikowego – rimsulfuronu.

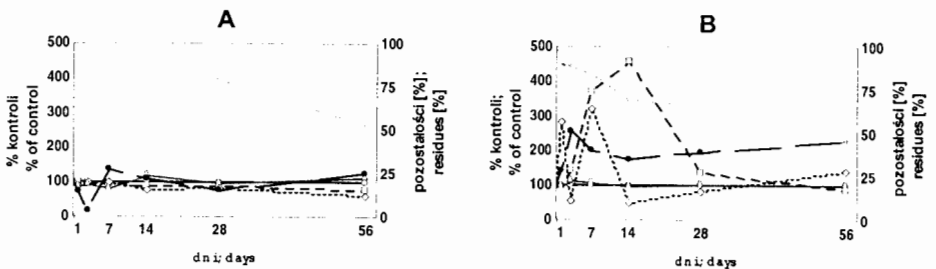
dawka zalecana; recommende dose



5 x dawka zalecana; 5 x recommende dose



25 x dawka zalecana; 25 x recommende dose



— kontrola; control
 - - - dehydrogenazy; dehydrogenases
 ····· reduktaza azotanowa; nitrate reductase
 - - - β -glukozydaza; β -glucosidase
 — ureaza; urease
 ○···· pozostałości atrazyny; residues of atrazine

Rys. 1. Szybkość zanikania różnych dawek atrazyny w glebie i oddziaływanie jej pozostałości na aktywność enzymów glebowych: A – Gesaprim 500 FW, B – czysta atrazyna

Fig. 1. Degradation rate of different atrazine doses and effect of its residues on the soil enzyme activity: A – Gesaprim 500 FW, B – pure atrazine

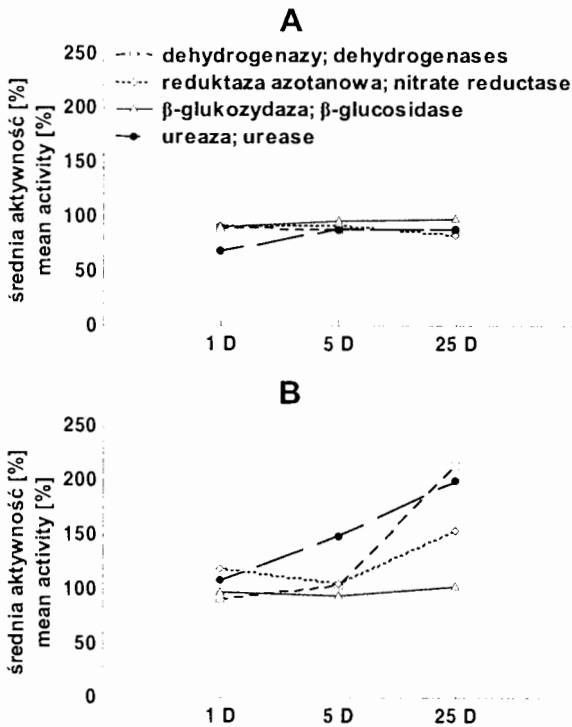
Tabela 2; Table 2

Współczynniki korelacji pomiędzy pozostałościami atrazyny
a aktywnością enzymów glebowych

Correlation coefficients between atrazine residues and the soil enzyme activity

Wyszczególnienie Specification	Atrazyna (pozostałości) atrazine	Ureaza Urease	Dehydrogenazy Dehydrogenases	β -glukozydaza β -glucosidase
Gesaprim 500 FW				
Ureaza; Urease	0,19			
Dehydrogenazy; Dehydrogenases	0,19	0,13		
β -glukozydaza; β -glucosidase	0,05	0,75*	0,27	
Reduktaza azotanowa; Nitrate reductase	-0,02	-0,23	0,64*	-0,03
Czysta atrazyna; pure atrazine				
Ureaza; Urease	0,59*			
Dehydrogenazy; Dehydrogenases	0,59*	0,45*		
β -glukozydaza; β -glucosidase	0,15	-0,01	0,37*	
Reduktaza azotanowa; Nitrate reductase	-0,41*	-0,24	-0,58*	-0,24

* istotność na poziomie 0,05; significance level at $p = 0.05$



Rys. 2. Wpływ różnych dawek Gesaprimu 500 FW (A) i czystej atrazyny (B) na aktywność enzymów glebowych: 1 D – dawka zalecana, 5 D – 5 x dawka zalecana, 25 D – 25 x dawka zalecana

Fig. 2. Influence different doses of Gesaprim 500 FW (A) and pure atrazine (B) on the soil enzyme activity: 1 D – recommende dose, 5 D – 5 x recomende dose, 25 D – 25 recomende dose

Wnioski

1. Doglebowe zastosowanie herbicydu zawierającego atrazynę Gesaprimu 500 FW oraz czystej atrazyny przyczyniło się do wystąpienia zakłóceń (zwiększenie bądź zmniejszenie) aktywności dehydrogenaz, β -glukozydazy, ureazy i reduktazy azotanowej.
2. Stwierdzono odmienne oddziaływanie atrazyny zastosowanej w postaci preparatu Gesaprim 500 FW i w postaci czystej na aktywność wyżej wymienionych enzymów.
3. Atrazyna zawarta w preparacie Gesaprim 500 FW zanikała w glebie wolniej niż atrazyna zastosowana w postaci czystej.
4. Spośród czterech testowanych enzymów reduktaza azotanowa i dehydrogenazy były w największym stopniu narażone na zahamowanie aktywności, zwłaszcza przy stosowaniu preparatu herbicydowego Gesaprimu 500 FW.

Literatura

- BOGDA A., CHODAK T., NIEDŹWIECKI E. 1990.** *Niektóre właściwości i skład mineralogiczny gleb Równiny Gumienieckiej.* Roczn. Glebozn. 41(3/4): 179–191.
- BONMATI M., COCCANTI B., NANPIERI P. 1992.** *Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil.* Soil Biol. Biochem. 4: 391–396.
- FU M.H., TABATABAI M.A. 1989.** *Nitrate reductase activity in soils: effects of trace elements.* Soil Biol. Biochem. 21: 943–946.
- HANEY R.L., SENSEMAN S.A., KRUTZ L.J., HONS F.M. 2002.** *Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate.* Biol Fertil Soils 35: 35–40.
- 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.
- HOFMANN G., DEDEKEN M. 1965.** *Eine Methode zur colorimetrischen Bestimmung der β -glukosidase – Aktivität im Boden.* Z. Pflanz. Bod. 108/3: 193–198.
- KOPER J., PIOTROWSKA A., SIWIK-ZIOMEK A. 2004.** *Wartość enzymatycznego wskaźnika żyzności w zależności od zróżnicowanego zmianowania i nawożenia gleby.* Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 501: 219–225.
- KOSINKIEWICZ B. 1984.** *Transformacja i wykorzystanie niektórych związków aromatycznych przez mikroorganizmy glebowe.* Post. Mikrobiol. 23(2): 109–116.
- NOWAK A., NOWAK J. 1996.** *Veränderungen des Gehaltes an mikrobieller Biomasse während des Abbaus von Atrazin und Prometryn im Boden.* Z. PflKrankh. PflSchutz. 15: 627–634.
- ÖHLINGER R. 1996.** *Dehydrogenase activity with the substrate TTC,* in: *Methods in soil biology.* Schinner F., Öhlinger R., Kandeler E., Margesin R. (Eds) Springer Verlag, Berlin: 241–243.
- PERUCCI P., VISCHETTI C., BATTISTONI F. 1999.** *Rimsulfuron in a silty clay loam soil: effects upon microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions.* Soil Biol. Biochem. 31: 195–204.
- SANNINO F., GIANFREDA L. 2001.** *Pesticide influence on soil enzymatic activities.* Chemosphere 45: 417–425.
- THALMAN A. 1968.** *Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im*

Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). Landwirtsch. Forsch. 21: 249-258.

Słowa kluczowe: atrazyna, gleba, reduktaza azotanowa, dehydrogenazy, β -glukozydaza, ureaza

Streszczenie

Uzyskano odpowiedź na pytanie czy istnieje zależność między ilością pozostałości herbicydu długo zalegającego w glebie – atrazyny – stosowanego w formie preparatu Gesaprim 500 FW i w postaci czystej w trzech różnych stężeniach a aktywnością enzymów glebowych. Badania przeprowadzone zostały w warunkach laboratoryjnych na materiale glebowym podzielonym na trzy grupy: I kontrolną – bez herbicydu, II z herbicydem w postaci preparatu Gesaprim 500 FW, oraz III z herbicydem w postaci tylko substancji czynnej. W grupie II i III wyodrębnione zostały trzy serie związane z dawką użytego preparatu i substancji czynnej w postaci czystej. Przy doborze dawek substancji kierowano się następującą zasadą: dawka pierwsza była wielkością zalecaną przez producenta herbicydu Gesaprim 500 FW ($2-3 \text{ dm}^3\text{-ha}^{-1}$), dawka druga była pięciokrotnie większa, a trzecia dwudziestopięciokrotnie większa od zalecanej (polowej). Punktem odniesienia była gleba kontrolna, bez dodatku herbicydu. W każdej próbie badano w czterech powtórzeniach aktywność czterech enzymów: dehydrogenaz, ureazy, β -glukozydazy oraz reduktazy azotanowej. Jednocześnie w próbach z dodatkiem herbicydu badano w trzech powtórzeniach pozostałości atrazyny metodą HPLC. Analizy przeprowadzano w następujących terminach: 0, 1, 3, 7, 14, 28 i 56 dniu.

Wyniki badań wskazują na znaczne oddziaływanie atrazyny stosowanej zarówno w postaci czystej, jak i w postaci preparatu na aktywność badanych enzymów, przy czym oddziaływanie nasilało się wraz ze wzrostem dawki preparatu. Spośród czterech testowanych enzymów reduktaza azotanowa i dehydrogenazy były w największym stopniu narażone na zahamowanie aktywności, zwłaszcza przy stosowaniu preparatu herbicydowego Gesaprim 500 FW. W odniesieniu do powyższego na uwagę zasługuje mniejsza szybkość zanikania atrazyny w glebie przy stosowaniu preparatu pestycydowego niż czystej atrazyny. Stwierdzono także istotną korelację między szybkością zanikania substancji czynnej atrazyny w glebie a aktywnością dehydrogenaz, ureazy i reduktazy azotanowej.

EVALUATING BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE SOIL CONTAMINATED WITH ATRAZINE

PART II

DYNAMICS OF ATRAZINE DISAPPEARANCE IN SOIL AND THE INFLUENCE OF ITS RESIDUES ON DEHYDROGENASE, NITRATE REDUCTASE, β -GLUCOSIDASE AND UREASE ACTIVITY

Janina Nowak, Dariusz Klódko, Edyta Kuńska, Arkadiusz Telesiński
Department of Biochemistry, Agricultural University, Szczecin

Key words: atrazine, soil, nitrate reductase, dehydrogenase, β -glucosidase, urease

Summary

The study aimed at answering a question whether there is a relationship between the residues of a herbicide – atrazine, present in the soil for a long time, which was introduced there in the form of Gesaprim 500 FW and pure substance applied in three different doses and the activity of soil enzymes. Experiments were conducted in soil samples under laboratory conditions. Soil samples were divided into 3 groups: I – control, without herbicide, II – with the Gesaprim 500 FW preparation and III – with pure atrazine. In groups II and III three series were isolated on the basis of the applied dose of herbicide and the pure substance. The lowest dose of the herbicide Gesaprim 500 FW ($2\text{--}3\text{ dm}^3\text{ha}^{-1}$) was the one recommended by the manufacturer, the second dose was 5 fold larger and the third dose – 25 fold larger. The soil without herbicide was the reference. In all samples the activity of four enzymes: dehydrogenase, urease, β -glucosidase and nitrate reductase was measured in four repetitions. At the same time the presence of atrazine residues was measured in soil samples with the addition of the herbicide in three repetitions with the help of the HPLC method. The analyses were performed on the following days: 0, 1, 3, 7, 14, 28 and 56th.

The results of the investigations revealed a significant effect of atrazine applied both in the pure form and in the form of the preparation on the activity of the investigated enzymes and the effect increased with the increasing dose of the dose of the preparation. Out of four tested enzymes nitrate reductase and dehydrogenase were to the highest degree put at a risk of inhibiting their activity, especially in the case of using the Gesaprim 500 FW preparation. In this respect, attention should be paid to the lower rate of disappearance of atrazine in the soil while using the pesticide preparation than pure atrazine. A significant correlation was also observed between the rate of disappearance of the atrazine active substance in the soil and the activities of dehydrogenase, urease, and nitrate reductase.

Prof. dr hab. Janina **Nowak**
Katedra Biochemii
Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17
71-434 SZCZECIN
e-mail: jnowak@agro.ar.szczecin.pl