

Teresa KRZYŚKO-ŁUPICKA¹ i Katarzyna GRATA¹

EKOLOGICZNE SKUTKI DZIAŁANIA HERBICYDU FOSFOROORGANICZNEGO NA DIAZOTROFY GLEBOWE W OKRESIE JESIENNYM. CZĘŚĆ I

ECOLOGICAL EFFECTS OF PHOSPHOROORGANIC HERBICIDE ON SOIL DIAZOTROPHS IN AUTUMN. PART I

Streszczenie: Badano wpływ herbicydu fosforoorganicznego Roundup na liczebność i intensywność wiązania azotu przez glebowe drobnoustroje niesymbiotyczne (diazotrofy) w glebie nienawożonej i nawożonej obornikiem w okresie jesiennym. Liczebność diazotrofów oznaczano metodą płytkową na bezazotowej pożywce Fenglerowej, a potencjalną aktywność wiązania azotu atmosferycznego przez diazotrofy glebowe zmodyfikowaną metodą Pochona. Na podstawie przeprowadzonych badań w okresie jesiennym stwierdzono okresową stymulację liczebności diazotrofów po 30 dniach działania herbicydu zarówno w glebie nienawożonej, jak i glebie z obornikiem. Natomiast po 7 i 90 dniach odnotowano istotny spadek ich liczebności. W tym okresie potencjalna aktywność wiązania azotu atmosferycznego była stymulowana przez herbicyd w glebie nienawożonej po 90 dniach jego działania, natomiast w glebie z obornikiem proces ten był najwyraźniej hamowany po 30 dniach. Stężenie azotu amonowego wykazywało tendencję spadkową, ale było większe w obiektach z Roundupem. Natomiast stężenie azotu azotanowego wzrastało w obiektach z herbicydem.

Słowa kluczowe: gleba, Roundup, diazotrofy, intensywność wiązania N₂, jesień

Zróżnicowane pod względem systematycznym bakterie zawierające enzym nitrogenazę, odpowiedzialny za wiązanie azotu atmosferycznego, określa się wspólnym terminem diazotrofy [1]. Przeprowadzają one reakcje wbudowywania N₂ do związków organicznych, które bezpośrednio trafiają do zapasów białka w glebie. Biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego ma znaczenie ekologiczne i ekonomiczne. Tą drogą zostaje związane 175·10⁶ Mg azotu rocznie, z czego 30% przypada na wiązanie niesymbiotyczne [2].

Wolno żyjące (niesymbiotyczne) diazotrofy potrafią prowadzić ten proces całkowicie bez udziału rośliny, wykorzystując jako źródło energii związki organiczne, często odporne na rozkład. Do grupy tej zaliczane są cyjanobakterie (sinice), bakterie tlenowe z rodzajów *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azomonas*, *Azospirillum*, *Azotococcus*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Derxia* i *Pseudomonas*, *Xanthomonas* względnie tlenowe, takie jak *Enterobacter* i *Bacillus*, oraz beztlenowe np. *Clostridium* czy redukujące siarczany *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum* [3-5].

Wpływ herbicydów na rozwój i aktywność mikroorganizmów glebowych zależy nie tylko od właściwości herbicydu, ale również od fizykochemicznych właściwości gleb, ich aktywności biologicznej, zabiegów agrotechnicznych [6] i warunków klimatycznych [7, 8], a także od terminu jego zastosowania [9, 10].

Oddziaływanie herbicydów na rozwój populacji drobnoustrojów następuje na skutek zaburzeń w metabolizmie komórki, ale nie wszystkie jego zmiany prowadzą do zahamowania procesu rozmnażania się. Jednym ze zjawisk zaburzenia metabolizmu pierwotnego jest wiązanie wolnego azotu [11], np. fungicydy tiuramowe silnie hamowały rozwój czystych kultur bakterii z rodzajów *Azotobacter*, *Azotomonas* i *Beijerinckia*.

W obecności herbicydu Roundup obserwowano zmniejszoną zdolność tworzenia brodawek na korzeniach soi, a przez to inhibicję wiązania azotu przez bakterie brodawkowe

¹ Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 4, 45-035 Opole, tel. 077 401 60 57, e-mail: teresak@uni.opole.pl

[10] oraz obniżenie aktywności nitrogenazy. Wachowska [12] zaobserwowała, że herbicyd Roundup stosowany do niszczenia traw wywołał niekorzystne zmiany środowiska, prowadzące początkowo do zahamowania rozwoju bakterii z rodzaju *Azotobacter*, a po 20 dniach w miarę zanikania substancji aktywnej do odbudowy jej populacji.

Herbicyd Roundup (substancja czynna glifosat - *N*-(fosfonometylo)glicyna) jest powszechnie stosowany do niszczenia około 70 gatunków chwastów oraz do desykcji zbóż i rzepaku. Jest on degradowany prawie wyłącznie pod wpływem wytwarzanych przez drobnoustroje enzymów, gdyż kowalencyjne wiązanie C-P jest odporne na czynniki chemiczne, fotolityczne i termiczne [13, 14]. Produktami degradacji mogą być: sarkozyna lub kwas aminometylofosfonowy (AMPA), NH_3 , CO_2 , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, woda i fosforany [15, 16]. Jednak AMPA może ulegać w glebie kumulacji albo degradacji wolniejszej niż glifosat, co prowadzi do wzrostu liczebności grzybów, a tym samym zakłócenia równowagi biologicznej gleby [17, 18]

Mikroorganizmy glebowe w większym stopniu mogą reagować na zmiany środowiska związane z roślinnością, zabiegami agrotechnicznymi, warunkami klimatycznymi niż bezpośrednio na sam herbicyd. Z tego względu w badaniach nad wpływem herbicydów na właściwości gleb i mikroflorę preferowane są testy laboratoryjne, prowadzone w glebie w warunkach kontrolowanych.

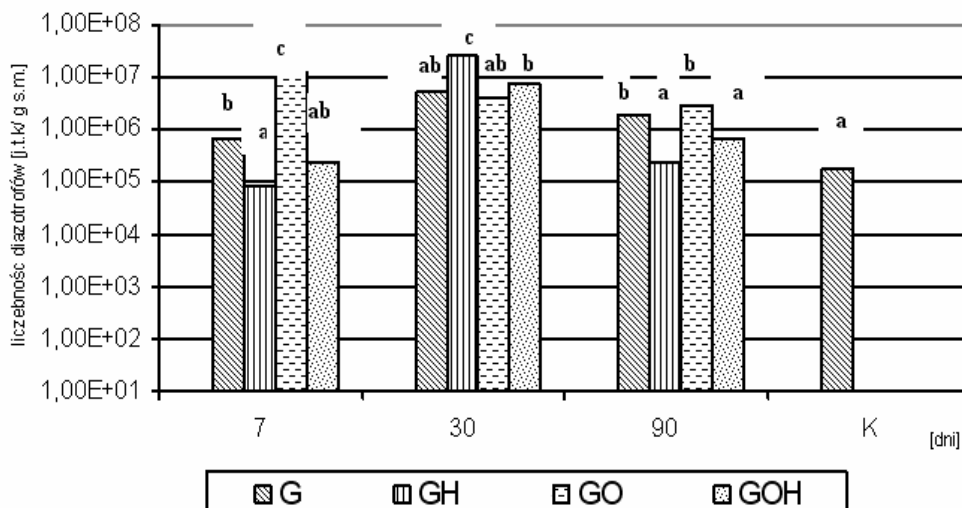
Celem badań była laboratoryjna ocena wpływu Roundupu na liczebność i intensywność wiązania azotu przez diazotrofy niesymbiotyczne w glebie nienawożonej i nawożonej obornikiem w okresie jesiennym.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły próbki gleby brunatnej właściwej o $\text{pH} = 5,5$, pobrane jesienią z warstwy gleby 0÷25 cm. Zawartość azotu amonowego w roztworze glebowym wynosiła $27,5 \text{ mg}(\text{kg s.m.})^{-1}$, a azotu amonowego $23,8 \text{ mg}(\text{kg s.m.})^{-1}$. Doświadczenie wazonowe założono w następujących obiektach: I-Gleba (G), II-Gleba + Roundup (GH), III-Gleba + obornik (GO), IV-Gleba + obornik+ Roundup (GOH). Do każdego wazonu wprowadzono 1 kg badanej gleby. Roundup rozpylono na powierzchni wazonów w ilości równoważnej dawce połowej $2,67 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$, a dojrzały obornik wprowadzono w ilości równoważnej dawce połowej $1,33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Za podstawę obliczenia przyjęto masę 5 cm warstwy ornej na powierzchni 1 ha. Badaną glebę inkubowano w temperaturze 20°C przez 90 dni, utrzymując stałą wilgotność na poziomie 60% pojemności wodnej. Liczebność diazotrofów oznaczano metodą płytkową na bezazotowej pożywce Fenglerowej [19], a potencjalną aktywność wiązania azotu atmosferycznego przez diazotrofy glebowe zmodyfikowaną metodą Pochona [20]. Wyniki podano w przeliczeniu na 1 g suchej masy gleby. Obliczenia statystyczne wykonano metodą analizy wariancji z zastosowaniem testu Duncana. Analizy chemiczne wykonywane po 7, 30 i 90 dniach z próbek uśrednionych obejmowały: oznaczenie pH_{KCl} metodą potencjometryczną, mineralnych form azotu metodą Greweling-Peecha [21].

Wyniki

Wyniki badań przeprowadzonych w okresie jesiennym wykazały po 30 dniach w obiektach z Roundupem okresową stymulację liczebności diazotrofów, natomiast po 7 i 90 dniach odnotowano wyraźne hamowanie ich rozwoju (rys. 1).

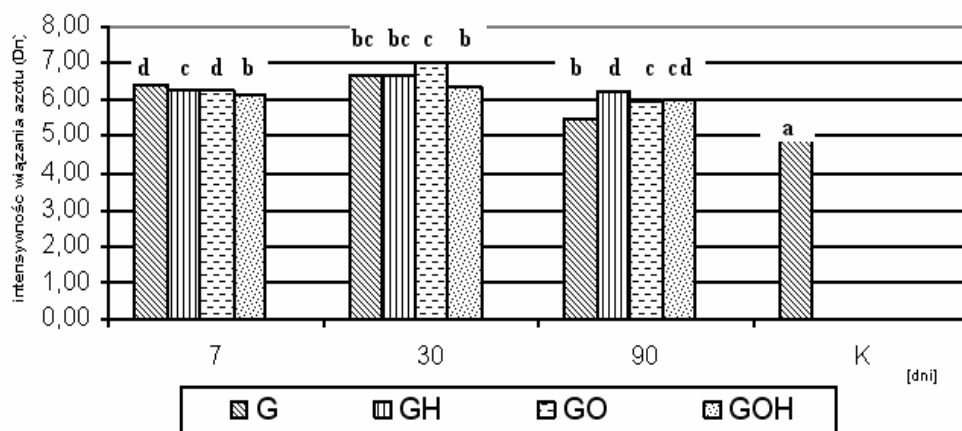


K – kontrola; G - gleba nawożona; GH - gleba nawożona traktowana herbicydem; GO - gleba nawożona obornikiem; GOH - gleba nawożona obornikiem traktowana herbicydem. Wartości oznaczone takimi samymi literami nie różnią się dla $p < 0,05$

Rys. 1. Ogólna liczebność diazotrofów w glebie w obecności herbicydu w okresie jesiennym [jtk (g s.m. gleby)⁻¹]

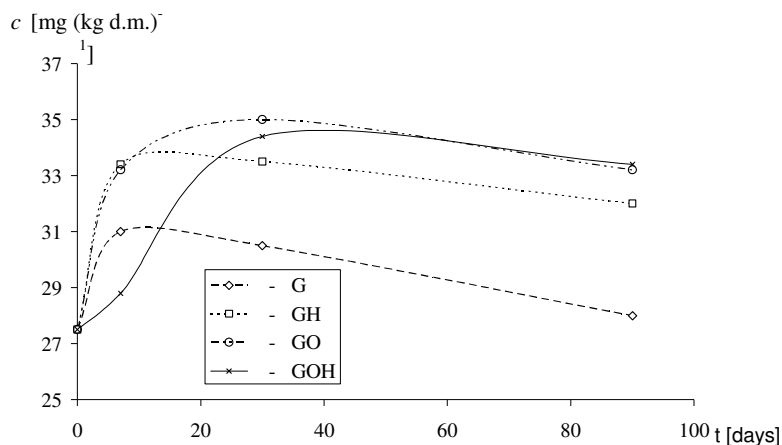
Potencjalna aktywność wiązania azotu atmosferycznego w obiektach z herbicydem Roundup była początkowo wyraźnie hamowana, a najsilniej po 30 dniach w glebie nawożonej, natomiast po 90 dniach zaobserwowano jej stymulację w glebie nienawożonej (rys. 2).

Stężenia azotu azotanowego (N-NO₃) wyraźniej wzrastało w obecności herbicydu w glebie nienawożonej, osiągając maksimum w 30 dniu. Natomiast w glebie z obornikiem potraktowanej herbicydem stężenie N-NO₃ do 30 dnia doświadczenia było mniejsze niż w samej glebie z obornikiem. Następnie ulegało powolnemu obniżeniu do poziomu 33 mg/kg s.m. gleby zarówno w glebie nawożonej, jak i nienawożonej (rys. 3).



objaśnienia podano pod rys. 1

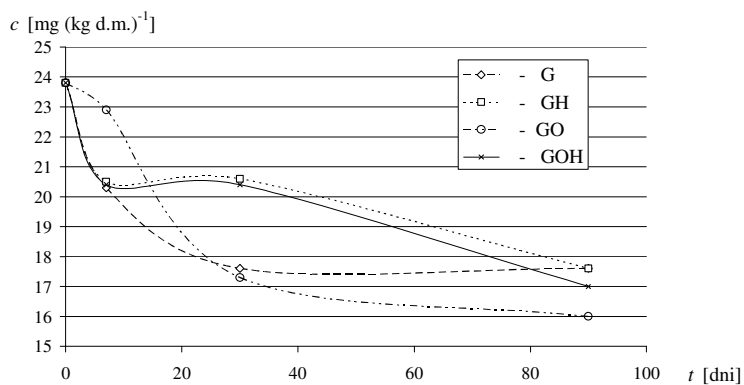
Rys. 2. Intensywność wiązania azotu [dni] w obecności herbicydu w okresie jesiennym



S - gleba nienawożona; SH - gleba nienawożona traktowana herbicydem; SM - gleba nawożona obornikiem; SMH - gleba nawożona obornikiem traktowana herbicydem

Rys. 3. Stężenie N-NO₃ w glebie w zależności od czasu działania herbicydu [mg (kg s.m.)⁻¹]

Stężenia azotu amonowego (N-NH₄) w obiektach z herbicydem wykazywało podobną tendencję spadkową, ale było większe niż w obiektach bez herbicydu (rys. 4). Pomiędzy 7 a 30 dniem doświadczenia niezależnie od typu gleby utrzymywało się na poziomie 20,4 mg kg⁻¹ s.m. gleby.



Objaśnienia podano pod rys. 3

Rys. 4. Stężenie N-NH₄ w glebie w zależności od czasu działania herbicydu [mg (kg s.m.)⁻¹]

Wnioski

1. W okresie jesiennym Roundup powodował okresową (po 30 dniach) stymulację diazotrofów niesymbiotycznych, większą w glebie nienawożonej niż nawożonej.
2. Wzrost intensywności wiązania azotu w obecności Roundupu obserwowano po 90 dniach w glebie nienawożonej, a istotny spadek po 30 dniach w glebie z obornikiem.

3. Stężenie $N-NH_4$ wykazywało tendencję spadkową, ale było większe w obiektach z Roundupem.
4. Stężenia azotu azotanowego ($N-NO_3$) wyraźniej wzrastało w obecności herbicydu w glebie nienawożonej, osiągając największą wartość w 30 dniu doświadczenia.

Literatura

- [1] Wielbo J. i Skorupska A.: Post. Mikrobiol., 2003, **42**(3), 263-283.
- [2] Król M.J. i Zielewicz-Dukowska J.: Post. Mikrobiol., 2005, **44**(1), 47-56.
- [3] Hubbell B.H i Gaskins M.H.: [w:] Biological nitrogen fixation. Plenum Press, New York-London 1984.
- [4] Barabas W.: Post. Mikrobiol., 1992, **31**(1), 3-40.
- [5] Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna. WN PWN, Warszawa 1996.
- [6] Myśków W. i Kobus J.: Post. Mikrobiol., 1986, **25**(3/4), 243-255.
- [7] Grossbard E.: Effect on soil microflora [w:] Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology. Ed. L.J. Audus, Academic Press, London 1976, 99.
- [8] Hauke-Pacewiczowa T.: Pam. Puław., 1971, **46**, 5-48.
- [9] Koper J. i Piotrowska A.: ZN Akademii Techn.-Roln., Bydgoszcz, 1999, **220**(44), 151-158.
- [10] Cieśla W. i Koper J.: Roczn. Glebozn., 1990, **41**(3/4), 73-83.
- [11] Balicka N.: Post. Mikrobiol., 1983, **22**(3/4), 291-299.
- [12] Wachowska U. i Banaszkiwicz T.: Natur. Sci., 1999, **2Y**, 191-200.
- [13] La Nauze I., Rosenberg H. i Show P.C.: Biochim. Biophys. Acta, 1970, **212**, 332-350.
- [14] Zeleznick L.D., Myers T.C. i Tichener E.B.: Biochim. Biophys. Acta, 1963, **78**, 546-547.
- [15] Dick R.E. i Quinn J.P.: Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995, **43**, 545-550.
- [16] Klimek-Ochab M., Obojska A. i Lejczak B.: Biotechnologia, 2004, **1**, 68-84.
- [17] Rueppel M.L., Brighwell B.B., Schaefer J. i Marvel J.T.: J. Agric. Food Chem., 1997, **25**, 517-528.
- [18] Araujo A.S.F., Monteiro R.T.R. i Abarkeli R.B.: Chemosphere 2003, **52**, 799-804.
- [19] Fenglerowa W.: Acta Microbiol. Pol., 1970, **14**(2), 203-206
- [20] Pfeifer-Maliszewska W.: Metody oznaczania potencjalnej aktywności procesu wiązania wolnego azotu w glebie. Prace z dziedziny mikrobiologii gleby. PTG, Warszawa 1974.
- [21] Nowosielski O.: Metody oznaczania potrzeb nawozowych. PWRiL, Warszawa 1974.

ECOLOGICAL EFFECTS OF PHOSPHOROORGANIC HERBICIDE ON SOIL DIAZOTROPHS IN AUTUMN. PART I.

Summary: The main aim of the research, was to check how phosphoroorganic herbicide affects the number and intensity of nitrogen absorbtion by diazotrophs, depending on the soil organic substance content, in autumn. The number of diazotrophs has been determined by means of the plate method based on the nitrogen free Fengler's medium and their potential ability of atmospheric nitrogen absorbtion by means of the modified Pochon's method. On the basis of the carried out research, it has been found that the 30 day herbicide presence seems to stimulate diazotrophs number in both, manured and non-manured soil. However, after 7 and 90 days tenfold decrease in their number has been observed. In autumn, potential ability of atmospheric nitrogen absorbtion has been stimulated by the herbicide after its 90 day activity in the non-manured soil, whereas this process in the manured soil has been obviously suppressed after 30 days. It shows the lack of co-relation between the number of diazotrofics and their ability to absorb nitrogen.

Keywords: soil, Roundup, diazotrophs, N-fixing activity, autumn