

JADWIGA FURCZAK, DOROTA KOŚCIELECKA

OCENA UBOCZNEGO ODDZIAŁYWANIA FUNGICYDU TETRAKONAZOLU NA GRZYBY SAPROFITYCZNE ORAZ AKTYWNOŚĆ BIOCHEMICZNĄ GLEBY PIASZCZYSTEJ I GLINIASTEJ

Katedra Mikrobiologii Rolniczej Akademii Rolniczej w Lublinie

WSTĘP

Tetrazonazol (nazwa handlowa Eminent 125 SL) jest nowym, włoskim preparatem triazolowym zsyntetyzowanym przez *Agrimont Research Centre* [Garavaglia i in. 1988]. W Polsce fungicyd ten został zarejestrowany w 1993 roku z przeznaczeniem do zwalczania mączniaka prawdziwego, rdzy brunatnej, żółtej, żdźbłowej i karłowej, septoriozy oraz rynchosporiozy liści w uprawie pszenicy, pszenżyta, jęczmienia i żyta.

Z literatury polskiej oraz zagranicznej wynika, że nie prowadzono dotychczas badań nad ubocznym wpływem tetrazonazolu na drobnoustroje i ich aktywność w środowisku glebowym. Niewiele uwagi w tym zakresie poświęcono również innym fungicydom triazolowym [Auspurg i in. 1989; Elmholt 1991; Elmholt i in. 1988; Furczak, Kościelecka 1996; Malkomes 1985; 1988; Schuster 1987; Wendler, Gadkari 1986]. Dlatego też podjęto badania mające na celu sprawdzenie poziomu zagrożenia ze strony Eminentu 125 SL dla rozwoju pożytecznych grzybów glebowych oraz procesów biochemicznych związanych z cyklami o istotnym znaczeniu dla żyzności gleby i żywienia roślin.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych zgodnie z zaleceniami Gerbera i in. [1991]. Zastosowano w nich próbki dwu gleb (z poziomu A) wykorzystywanych w uprawie roślin chronionych przez tetrazonazol, tj. gleby bielcowej wytworzonej z piasku gliniastego mocnego, pylastego (Cog. – 1,1%, pojemność sorpcyjna – 6,8 meq/100 g, pH_{KCl} – 5,0) oraz gleby brunatnej wytworzonej z gliny lekkiej (Cog. – 1,1%, pojemność sorpcyjna – 18,5 meq/100 g, pH_{KCl} – 6,3). Świeży materiał glebowy przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm i przechowywano w temperaturze pokojowej przez 7 dni w celu ustalenia się równowagi. Następnie 800-gramowe porcje gleb umieszczono w pojemnikach

szklanych o objętości 1,5 dm³ i poddano działaniu Eminentu 125 SL. Wodny roztwór fungicydu wniesiono do gleb w dwu dawkach: polowej (6 mcg s. a./g s.m. gleby) oraz 10-krotnie wyższej od polowej (60 mcg s.a./g s.m. gleby), przyjmując za podstawę obliczenia dawek 1 dm³ preparatu (125 g s.a.) i masę 5-centymetrowej warstwy gleby na powierzchni 1 hektara. Kontrolę stanowiły próbki gleb nie traktowane fungicydem. Wilgotność wszystkich próbek uzupełniono do 60% c.p.w. i inkubowano w temperaturze pokojowej przez cztery miesiące, utrzymując stały założony poziom wilgotności. Analizy mikrobiologiczne i biochemiczne gleb przeprowadzono po upływie 3, 15, 30, 60 i 120 dni trwania doświadczenia.

W ramach **analiz mikrobiologicznych** oznaczono:

- a) tzw. ogólną liczebność grzybów saprofitycznych na pożywce Martina;
- b) liczbę grzybów amyloolitycznych (pożywka mineralna z antybiotykami i 1% skrobi stanowiącej jedyne źródło węgla);
- c) liczbę grzybów celuloolitycznych (pożywka Sandersa z antybiotykami i bibułą Whatmana jako jedynym źródłem węgla);
- d) liczbę grzybów proteolitycznych (pożywka mineralna z antybiotykami i żelatyną będącą jedynym źródłem węgla i azotu).

Analizy biochemiczne obejmowały określanie:

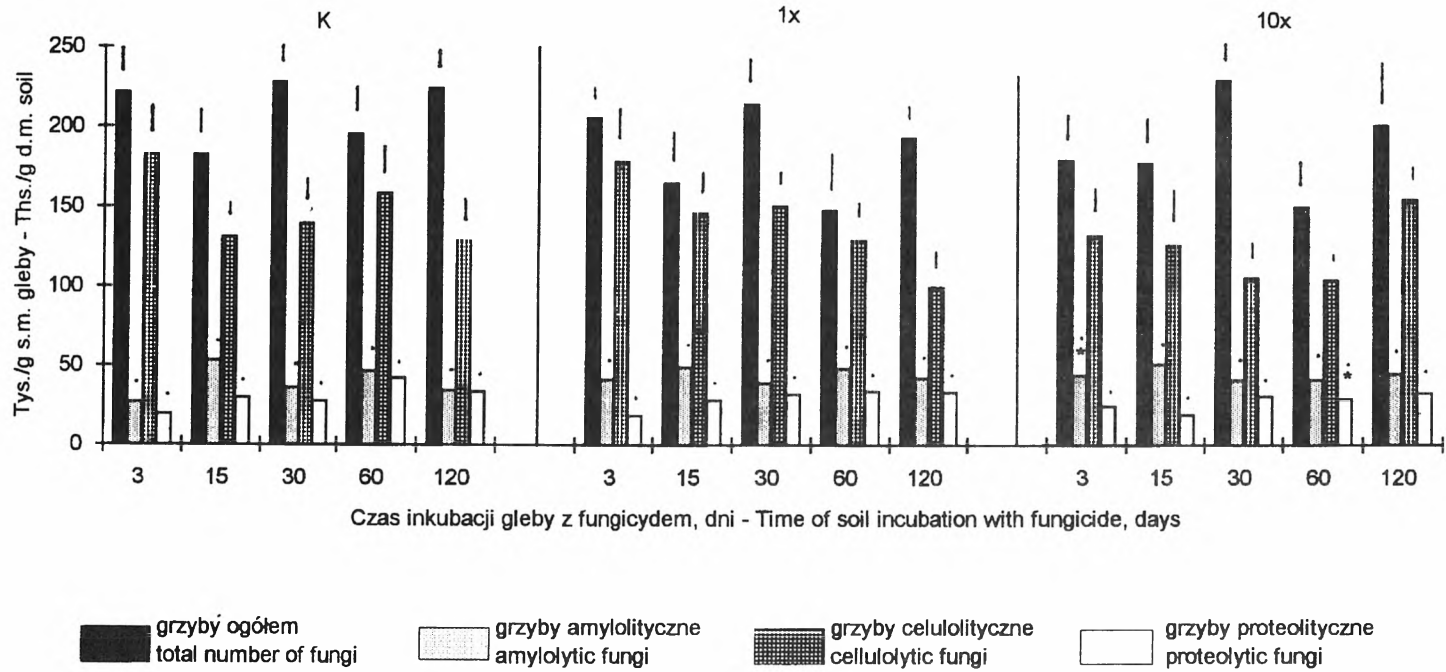
- a) mineralizacji glukozy – zgodnie z metodą podaną we wcześniejszej pracy [Furczak 1989],
- b) mineralizacji celulozy w 50-gramowych próbkach glebowych zawierających 0,5% sproszkowanej celulozy Whatmana; wydzielony po 24 godzinach CO₂ oznaczano metodą Ruhlinga i Tylera [1973] w ciągu 10 dni; wyniki stanowią sumę CO₂ uwalnianego po tym okresie;
- c) nasilenia amonifikacji i nityfikacji według metodyki opisanej przez Furczak [1989];
- d) aktywności dehydrogenaz – metodą Thalmanna (1968), aktywności proteazy – według Ladda i Butlera [1972], natomiast aktywność kwaśnej fosfatazy oznaczano metodą podaną przez Tabatabai i Bremnera [1969].

Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki opracowano statystycznie w oparciu o test t-Studenta przy poziomie istotności P=0,05.

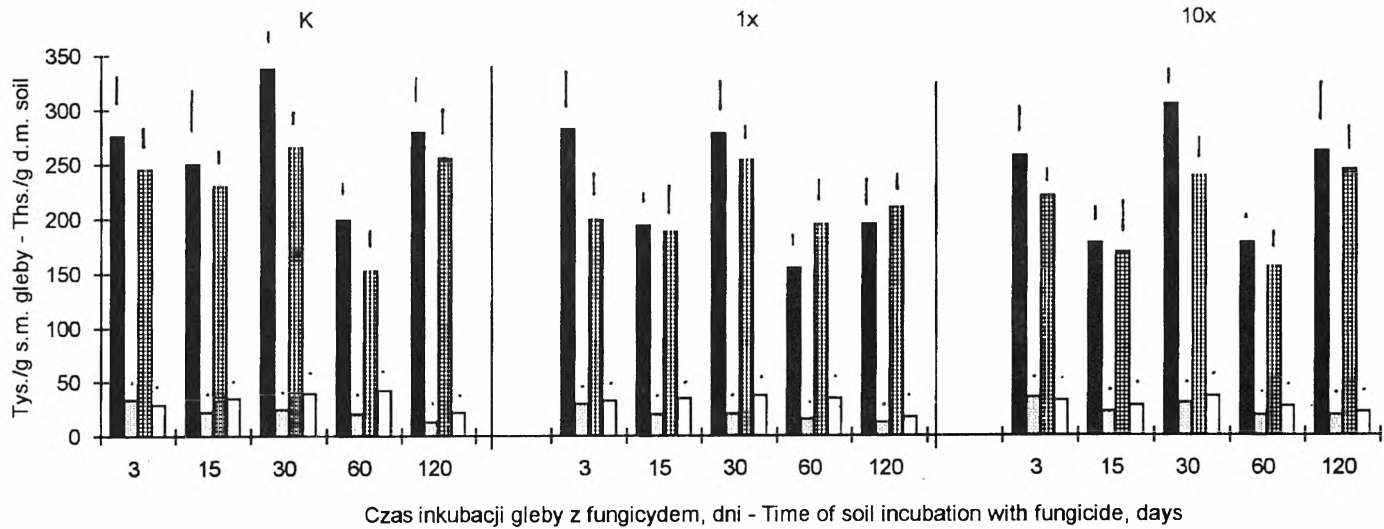
WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

Wyniki, przedstawione na rysunkach 1 i 2, wskazują, że zarówno w glebie piaszczystej, jak i gliniastej analizowane dawki tetrakonazolu (polowa i 10-krotnie wyższa od polowej) nie spowodowały zakłóceń w ogólnej populacji grzybów saprofitycznych. Nie stwierdzono również wyraźnych zmian w liczebności grzybów amyloolitycznych, celuloolitycznych i proteolitycznych obu gleb traktowanych tym preparatem. Jedynie w glebie piaszczystej najwyższa dawka fungicydu wywołała statystycznie istotną, krótkotrwałą stymulację rozwoju grzybów hydrolizujących skrobię oraz hamowanie namnażania się grzybów rozkładających białko (rys. 1). Przeprowadzone w tym zakresie obserwacje potwierdzają wcześniejsze badania własne [Furczak, Kościelecka 1996], a także Elmholt [1991] oraz Elmholt i in. [1988] donoszące o wpływie nieistotnym z ekotoksykologicznego punktu widzenia innych fungicydów triazolowych na zespoły grzybów saprofitycznych.

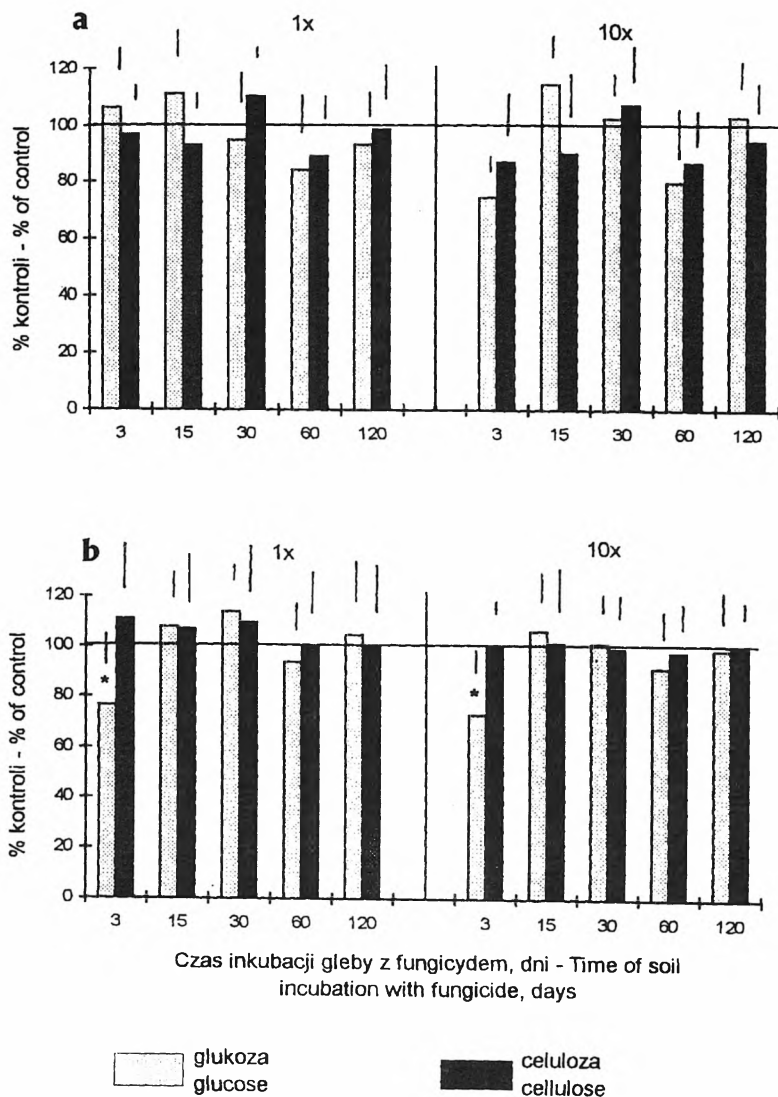
Interesujących informacji dla rolnictwa mogą dostarczyć również wyniki dotyczące ubocznego oddziaływania tetrakonazolu na procesy biochemiczne oraz



RYSUNEK 1. Liczebność grzybów saprofitycznych w glebie piaszczystej: K – gleba kontrolna, 1x – dawka polowa fungicydu, 10x – dawka dziesięciokrotnie wyższa od polowej, * – statystycznie istotna różnica w porównaniu z kontrolną, | – odchylenie standardowe
 FIGURE 1. Number of saprophytic fungi in sandy soil: K – control soil, 1x – field dose of fungicide, 10x - ten times higher dose than the field one, * – indicate significance in comparison to control, | – standard deviation



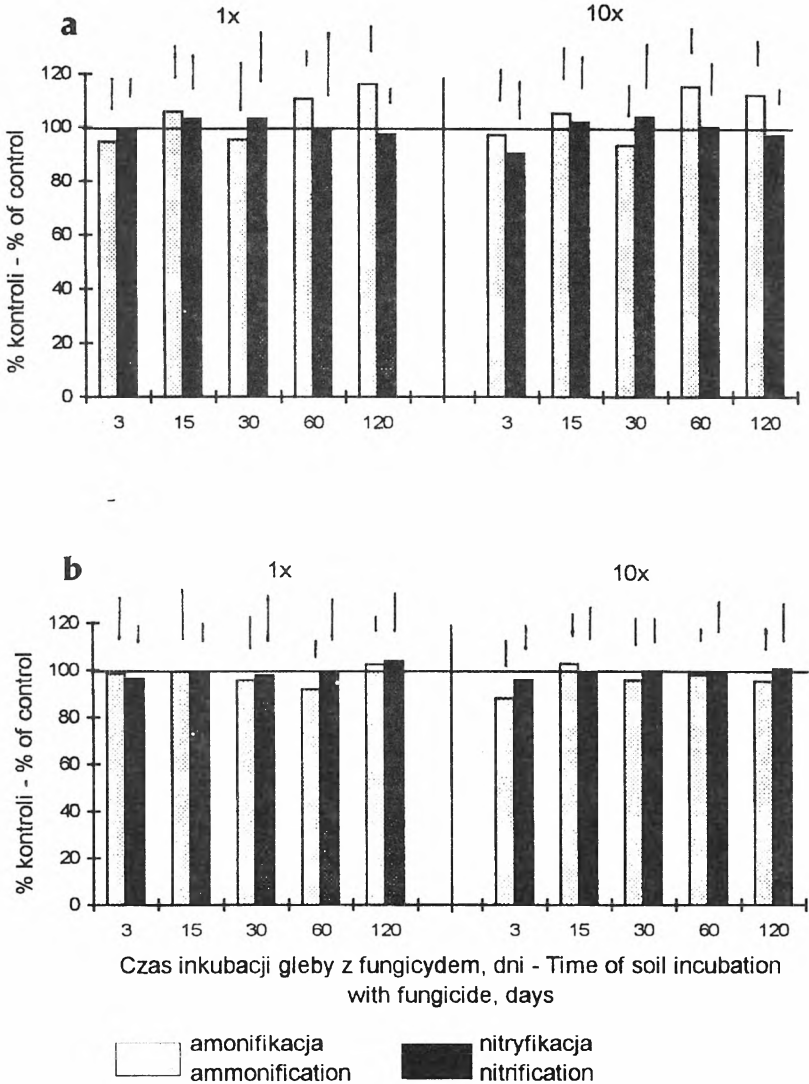
RYSUNEK 2. Liczebność grzybów saprofitycznych w glebie gliniastej, objaśnienia jak na rys. 1
 FIGURE 2. Number of saprophytic fungi in loamy soil, explanation as on Fig. 1



RYSUNEK 3. Mineralizacja glukozy i celulozy w glebie piaszczystej (a) i gliniastej (b), objaśnienia jak na rys. 1

FIGURE 3. Glucose and cellulose mineralization in sandy soil (a) and loamy soil (b), explanation as on Fig. 1

aktywność enzymów glebowych związanych z ważnymi dla żyzności gleby cyklami, tj. z krążeniem węgla, azotu i fosforu. Wskazują one na statystycznie istotne hamowanie przez badany preparat przebiegu niektórych procesów i aktywności enzymów (rys. 3–5), jednakże zmiany te były krótkotrwałe i utrzymywały się najdłużej do 30 dnia trwania doświadczenia. Natężenie obserwowanych zakłóceń zależne było od właściwości gleby, wielkości dawki preparatu oraz rodzaju badanego testu. Wyraźniejszy wpływ tetrakonazolu w tym zakresie odnotowano



RYSUNEK 4. Nasilenie amonifikacji i nityfikacji w glebie piaszczystej (a) i gliniastej (b), objaśnienia jak na rys. 1

FIGURE 4. The intensity of ammonification and nitrification in sandy soil (a) and loamy soil (b), explanation as on Fig. 1

w glebie zakwaszonej, charakteryzującej się mniejszą pojemnością sorpcyjną. Do procesów, na które nie stwierdzono w obu glebach oddziaływania stosowanych dawek fungicydu, należą: mineralizacja celulozy (rys. 3), amonifikacja (rys. 4), nityfikacja (rys. 4) oraz aktywność fosfatazy (rys. 5). Jakkolwiek z prac przeglądowych Domscha [1984] oraz Domscha i in. [1983] wynika, że nityfikacja i aktywność fosfatazy uznawane są za parametry biochemiczne najsilniej reagujące

na stres spowodowany przez chemiczne środki ochrony roślin. Niewielki i krótkotrwały (zarejestrowany tylko po trzech dniach) wpływ tetrakonazolu zaznaczył się natomiast w przypadku mineralizacji glukozy w glebie gliniastej (rys. 3b). W warunkach tych obie dawki preparatu spowodowały statystycznie istotne obniżenie poziomu omawianego procesu.

W ostatnich latach niektórzy autorzy zwracają uwagę na mniejszą wartość enzymów glebowych (z wyjątkiem dehydrogenaz) jako testów ze względu na różnorodne ich pochodzenie oraz brak powszechnie akceptowanych metod oznaczania. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy oraz uzyskane we wcześniejszych badaniach własnych [Furczak, Kościelecka 1996] nie potwierdzają jednak tej sugestii. Reakcja enzymów glebowych na wprowadzenie fungicydu była silniejsza niż pozostałych testów biochemicznych i wystąpiła głównie w glebie piaszczystej (rys. 5). Zaobserwowane zjawisko można tłumaczyć słabszą buforowością gleby piaszczystej, a tym samym większą możliwością występowania w niej preparatu w formie niezaadsorbowanej, tj. biologicznie aktywnej. W środowisku tym odnotowano istotny (utrzymujący się do 30 dni) spadek aktywności dehydrogenaz i proteazy, przy czym efekt ten zaznaczył się wyraźniej przy większej dawce preparatu. Natomiast w glebie gliniastej obydwie dawki fungicydu spowodowały jedynie krótkotrwałe (stwierdzone po trzech dniach) hamowanie aktywności dehydrogenaz, a dawka wyższa od połowej wywołała także jednorazową inhibicję aktywności proteazy.

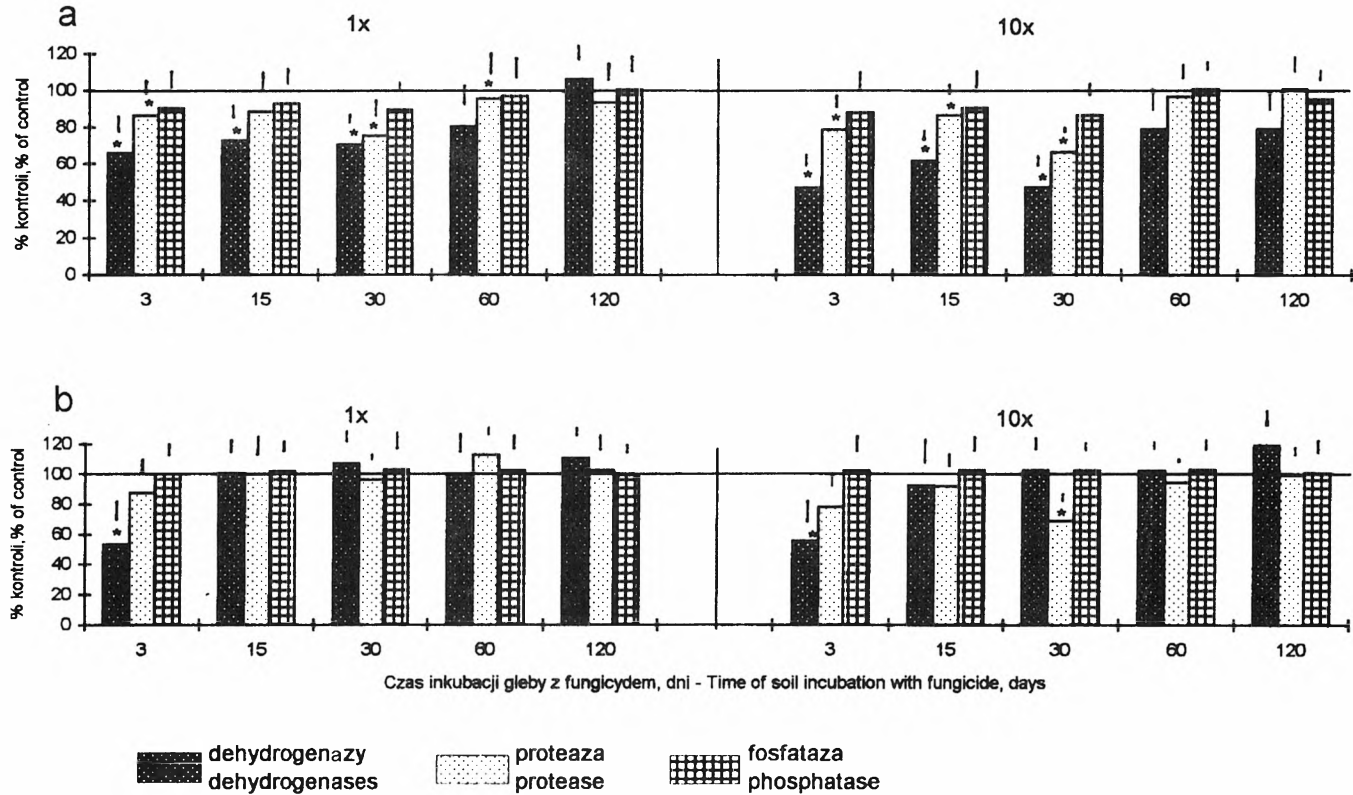
Stwierdzonym zakłóceniom w składzie ilościowym niektórych grup fizjologicznych grzybów mogły towarzyszyć zmiany jakościowe powstałe w wyniku selekcji. Krótkotrwały charakter zarejestrowanych odchyłeń zarówno w liczebności drobnoustrojów, jak i aktywności biochemicznej badanych gleb był spowodowany prawdopodobnie zjawiskiem kompensacji, ewentualnie szybką adaptacją drobnoustrojów do testowanego środka chemicznego. Otrzymane wyniki wskazują ponadto, że tetrakonazol nie wywiera większego wpływu na stan mikrobiologiczny badanych gleb niż inne fungicydy triazolowe [Auspurg i in. 1989; Elmholt 1991; Elmholt i in. 1988; Furczak, Kościelecka 1996; Malkomes 1985; 1988; Schuster 1987; Wendler, Gadkari 1986].

Przyjmując kryteria Domscha [1980, 1984] do oceny ubocznego wpływu Eminentu 125 SL, należy stwierdzić, że stosowanie tego preparatu zgodnie z zaleceniami dla praktyki rolniczej nie powinno zagrażać prawidłowemu rozwojowi mikroorganizmów i przebiegowi procesów biochemicznych ważnych z punktu żyźności gleby. Podstawę do takiego stwierdzenia stanowi niewielki na ogół poziom obserwowanych zmian, a przede wszystkim ich krótkotrwałość (nie przekraczająca 30 dni). Według Domscha i in. [1983], czas trwania zakłóceń spowodowanych przez pestycydy odgrywa decydującą rolę przy ich ekotoksykologicznej ocenie.

WNIOSKI

1. W glebie piaszczystej i gliniastej obydwie dawki tetrakonazolu (połowa i 10-krotnie wyższa od połowej) nie spowodowały wyraźnych zmian w ogólnej liczebności grzybów saprofitycznych oraz grupach fizjologicznych tych drobnoustrojów uczestniczących w rozkładzie skrobi, celulozy i białka.

2. Badane dawki fungicydu hamowały przejściowo aktywność niektórych



RYSUNEK 5. Aktywność enzymatyczna gleby piaszczystej (a) i gliniastej (b), objaśnienia jak na rys. 1

FIGURE 5. Enzymatic activity of sandy soil (a) and loamy soil (b), explanation as on Fig. 1

procesów i enzymów związanych z krążeniem węgla i azotu. Zakłócenia te zaznaczyły się wyraźniej w glebie piaszczystej niż gliniastej.

3. Stwierdzone pod wpływem tetrakonazolu zmiany utrzymywały się okresowo i nie przekraczały na ogół 50% wartości kontrolnych, co – zgodnie z kryteriami Domscha – pozwala zaklasyfikować ten fungicyd jako niegroźny dla stanu mikrobiologicznego badanych gleb i ich żyzności.

Wskazane byłoby kontynuowanie badań z tego zakresu w warunkach polowych (przy określonym zmianowaniu roślin) w celu uzyskania informacji jak często należy stosować testowany fungicyd, aby nie naruszyć równowagi mikrobiologicznej gleby uprawnej.

LITERATURA

- AUSPURG B., PESTEMER W., HEITEFUSS R., 1989: Untersuchungen zum Einfluss einer Pflanzenschutzmittelspritzfolge auf das Rückstandsverhalten von Terbutryn und die mikrobielle Aktivität. *Weed Res.* **29**: 79-91.
- DOMSCH K. H., 1980: Recommended tests for assessing the side-effects of pesticides on the soil microflora. *Tech. Rep. Agric. Res. Council. Weed Res. Org.* Begbroke Hill, Yarnton, Oxford **59**: 1-10.
- DOMSCH K. H., 1984: Effects of pesticides and heavy metals on biological processes in soil. *Plant and Soil* **76**: 367-378.
- DOMSCH K. H., JAGNOW G., ANDERSON T. H., 1983: An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Res. Rev.* **86**: 65-105.
- ELMHOLT S. 1991: Side effects of propiconazole (Tilt 250 EC) on non-target soil fungi in a field trial compared with natural stress effects. *Microb. Ecol.* **22**: 99-108.
- ELMHOLT S., SMEDEGAARD-PETERSEN V., 1988: Side-effects of field applications of "propiconazol" and "captafol" on the composition of non-target soil fungi in spring barley. *J. Phytopathology* **123**: 79-88.
- FURCZAK J., 1989: The evaluation of side-effects of tetradecyloxymethylene-N-methylmorpholinium chloride (IPO-5707) on soil microorganisms and their activity in brown soil. *Pol. J. Soil Sci.* **22**: 73-80.
- FURCZAK J., KOŚCIELECKA D., 1996: The effect of fungicide propiconazole (Tilt 250 EC) on saprophytic fungi and microbiological transformations in brown soil. *Pol. J. Soil Sci.* **29**: 47-55.
- GARAVAGLIA C., MIRENNA L., PUPPIN O., SPAGNI E., 1988: M 14360, a new broad-spectrum and versatile antifungal triazole. Brighton Crop Protection Conference-Pests and Diseases, Agrimont (Montedison Group) Ricerche Fitofarmaci, Nowara, Italy: 49-56.
- GERBER H. R., ANDERSON J. P. E., BUGEL- MOGENSEN B., CASTLE D., DOMSCH K. H., MALKOMES H. P., SOMERVILLE L., ARNOLD D. J., Van De WERF H., VERBEKEN R., VONK J. W., 1991: 1989 revision of recommended laboratory tests for assessing side-effects of pesticides on the soil microflora. *Toxicol. Environ. Chem.* **30**: 249-261.
- LADD-J. N., BUTLER J. H., 1972: Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 19-30.
- MALKOMES H. -P., 1985: Einfluss eines Fungizids und dessen Kombination mit einem Phospholipid auf bodenbiologische Aktivitäten unter Labor- und Gewachshausbedingungen. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **37**: 59-63.
- MALKOMES H. -P., 1988: Wirkung von Agrarchemikalien auf Bodenlebewesen. VDLUFA-Schriftenreihe 28, Teil II: 1171-1185, Kongressband.
- RUHLING A., TYLER G., 1973: Heavy metal pollution and decomposition of spruce needle litter. *Oikos* **24**: 402-415.
- SCHUSTER E., 1987: Die Beeinflussung der mikrobiellen Aktivität des Bodens und der Nebenwirkungen von Pflanzenschutzmitteln durch Zugabe verschiedener organischer Substrate. VDLUFA-Schriftenreihe **23**: 925-936. Kongressband.

- TABATABAI H. A., BREMNER J. M., 1969: Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* **1**: 301–307.
- THALMANN Z., 1968: Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Boden mittels Triphenyltetrazolium chlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* **21**: 249–258.
- WENDLER R., GADKARI D., 1986: Influence of the fungicides Bayleton, Desmel, Sportak and Corbel on nitrification. *Zentralbl. Mikrobiol.* **141**: 141–149.

J. Furczak, D. Kościelecka

THE EVALUATION OF SIDE-EFFECTS OF FUNGICIDE – TETRACONAZOLE ON SAPROPHYTIC FUNGI AND BIOCHEMICAL ACTIVITY OF SANDY AND LOAMY SOILS

Department of Agricultural Microbiology, Agricultural University of Lublin

SUMMARY

Residual-effect of two doses (field dose and tenfold field dose) of tetraconazole on saprophytic fungi associations and biochemical activity of sandy and loamy soil was studied under laboratory conditions. Experiments ran for 4 months at 60% of soil water capacity. After 3, 15, 30, 60 and 120 days of work commencement, microbiological and biochemical soil analyses were made. The microbiological analyses included determination of total number of saprophytic fungi, and amylolytic fungi, cellulolytic and proteolytic ones. While carrying out biochemical analyses the following traits were determined: cellulose and glucose mineralization, intensity of ammonification and activity of dehydrogenases, protease and phosphatase. It was proved that no significant effect was produced in fungi association under study by the application of the two doses of tetraconazole. The presence of the substance has produced, however, a transitory inhibition of dehydrogenases and protease activity in both soils studied. The malfunction was more obvious in the sandy soil, given tenfold dose of fungicide. While in the loamy soil, only a slight and short-lasting decrease in glucose mineralization was observed. The changes stated in soils under study were temporary and they did not exceed more than 50% the control level which, according to Domsch, justifies the classifying the used doses of tetraconazole as not harmful for the microbiological status and fertility of the soil environments.

Praca wpłynęła do redakcji w lipcu 1996 r.

*Dr hab. Jadwiga Furczak
Katedra Mikrobiologii Rolniczej, Akademia Rolnicza w Lublinie
20-069 Lublin, Leszczyńskiego 7*