

Słowa kluczowe: nasiona, mikrobiotest, gleba, chlorosulfuron, nikosulfuron, 2,4 DP

Tomasz SEKUTOWSKI*, Jerzy SADOWSKI*

ZASTOSOWANIE KIELKUJĄCYCH NASION *SINAPIS ALBA*, *FAGOPYRUM ESCULENTUM* i *CUCUMIS SATIVUS* W OCENIE POZIOMU POZOSTAŁOŚCI HERBICYDÓW W ŚRODOWISKU GLEBOWYM

Badania obejmowały cztery serie doświadczeń przeprowadzonych w laboratorium biologicznym w latach 2007–2008. W badaniach wykorzystano zestaw do kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin Phytotoxkit™ firmy Tigret do oznaczeń fitotoksycznych pozostałości substancji aktywnych herbicydów w glebie. Jako bioindykatorów użyto trzech gatunków roślin: *Sinapis alba*, *Fagopyrum esculentum* i *Cucumis sativus*. Badanymi substancjami aktywnymi herbicydów były: chlorosulfuron, nikosulfuron i 2,4 DP. Rośliną która najsilniej reagowała na chlorosulfuron i nikosulfuron była *Sinapis alba* następnie *Fagopyrum esculentum* a dopiero w następnej kolejności *Cucumis sativus*. Natomiast w przypadku 2,4 DP najsilniej reagował *Cucumis sativus* następnie *Fagopyrum esculentum* oraz *Sinapis alba*.

1. WSTĘP

W ostatnich latach, obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania wykorzystaniem kiełkujących nasion różnych gatunków roślin w badaniach bioindykacyjnych pozostałości różnych ksenobiotyków w środowisku glebowym [Fargasova 2001, Gong i in. 2001]. Takie postępowanie wydaje się być zasadne zarówno ze względów praktycznych jak i ekonomicznych. Testy z zastosowaniem szybko kiełkujących nasion posiadają kilka bardzo ważnych zalet, a mianowicie: są tanie i łatwe w użyciu, nie wymagają drogiego sprzętu laboratoryjnego oraz są proste do obserwacji i dają powtarzalne wyniki. I chyba najważniejsza cecha, niektóre rośliny są wrażliwe na specyficzne lub bardzo szerokie spektrum działania substancji chemicznych (w tym również herbicydów) [Sadowski i in. 2002, Demczuk i in. 2004, Smreczak, Maliszewska-Kordybach 2003].

* Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Zakład Herbologii i Technik Uprawy Roli, ul. Orzechowa 61, 50-540 Wrocław, e-mail: t.sekutowski@iung.wroclaw.pl

Należy również podkreślić fakt, że mikrobiotesty z wykorzystaniem szybko kiełkujących nasion wybranych gatunków roślin, mogą być dobrym uzupełnieniem lub nawet alternatywą dla klasycznych pomiarów instrumentalnych służących do wykrywania fitotoksycznych pozostałości substancji aktywnych herbicydów w środowisku glebowym.

W ekotoksykologii przyjętymi metodami oznaczeń stopnia biodostępnych fitotoksycznych pozostałości herbicydów w glebie są biotesty [Günther i in. 1993, Sadowski i in. 2002]. Jednym z takich mikrobiotestów jest test kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin Phytotoxkit™ firmy Tigret.

Celem badania była ocena wykorzystania kiełkujących nasion różnych gatunków roślin w oznaczaniu biodostępnych pozostałości substancji aktywnych herbicydów w glebie.

2. MATERIAŁ I METODA

Badania obejmowały cztery serie doświadczeń laboratoryjnych w odstępach 3 miesięcznych w latach 2007-2008. W badaniach zastosowano zestaw do oznaczania fitotoksycznych pozostałości herbicydowych w glebie na podstawie kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin - Phytotoxkit™ firmy Tigret. W teście tym standardowo wykorzystywane są 3 rośliny: *Sorghum saccharatum*, *Sinapis alba* oraz *Lepidium sativum*. Aby uzupełnić wiedzę na temat zachowania się innych roślin przeprowadzono modyfikacje testu Phytotoxkit™ polegającą na zastąpieniu dwóch gatunków roślin (*Sorghum saccharatum* oraz *Lepidium sativum*) innymi gatunkami: *Fagopyrum esculentum* i *Cucumis sativus*.

Materiał do badań stanowiła gleba pobrana z poziomu 0–20 cm, z pola produkcyjnego (monokultura pszenicy ozimej i kukurydzy), należącego do Stacji Doświadczalnej IUNG-PIB w Jelczu-Laskowicach. Gleba ta (o składzie granulometrycznym piasku gliniastego mocnego) charakteryzowała się odczynem lekko kwaśnym ($pH_{KCL}=5,5$) i małą zawartością węgla organicznego ($C_{org.}= 1,42\%$). Pobrane próbki gleby wysuszono do poziomu powietrznie suchego i przesiano przez sito o $\phi=2$ mm. Przesianą glebę umieszczano kolejno na płytkach testowych i nasączano wodą destylowaną w celu osiągnięcia pełnej pojemności wodnej próbki. Badano pozostałości substancji aktywnych następujących herbicydów: Glean 75 WG (chlorosulfuron), Milagro 040 SC (nikosulfuron) oraz Aminopielik Plus 570 SL (2,4 DP) w przedziale $0,025-1,2$ $mg \cdot kg^{-1}$. Płytki testowe umieszczano w komorze opryskowej „Aporo”, gdzie aplikowano odpowiednie ilości substancji aktywnych tak aby uzyskać ich zakładany poziom w próbkach glebowych. Następnie płytki przykrywano filtrem papierowym i wysiewano nasiona roślin testowych (*Sinapis alba*, *Fagopyrum esculentum* i *Cucumis sativus*) w ilości 5 szt./płytkę. Testy inkubowano w pozycji pionowej, w temperaturze $25^{\circ}C$ bez dostępu światła przez okres 4–5 dni. Reakcję roślin na obecność chlorosulfuronu, nikosulfuronu i 2,4 DP określano na podstawie redukcji długości korzeni w porównaniu do obiektu kontrolnego

(nie opryskiwanego herbicydem). Rejestracji obrazu dokonano używając aparatu cyfrowego a do pomiarów długości korzeni roślin testowych wykorzystano program analizy obrazu „Image Tools”. Otrzymane wyniki poddano analizie wariancji, szacując istotność różnic na poziomie $\alpha \leq 0,05$. Dokładny sposób przeprowadzania mikrobiotestu został opisany w standardowej procedurze operacyjnej [Phytotoxkit 2004].

3. WYNIKI I DYSKUSJA

Zdaniem Hernández-Seviliano i in. [1999], Sadowskiego i in. [2002], Demczuka i in. [2004] oraz Klimkowicz-Pawlas i in. [2007] dobór odpowiedniej rośliny testowej, w odpowiedniej fazie rozwojowej, reagującej na dany ksenobiotyk jest podstawowym i najtrudniejszym warunkiem wpływającym na dokładność tego rodzaju testów.

Na rys. 1, 2, 3 przedstawiono wyniki badań przy użyciu mikrobiotestu Phytotoxkit™ w którym korzenie roślin testowych posłużyły do określenia stężenia pozostałości substancji aktywnych herbicydów w glebie.

Rośliną która najsilniej reagowała na chlorosulfuron i nikosulfuron była *Sinapis alba* następnie *Fagopyrum esculentum* a dopiero w następnej kolejności *Cucumis sativus*. Przebieg zależności zmian redukcji długości korzeni od stężenia najniższego ($0,025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) do najwyższego ($1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) chlorosulfuronu i nikosulfuronu w glebie wskazuje, że wybrane rośliny (*Sinapis alba* i *Fagopyrum esculentum*) charakteryzowały się najlepszą reakcją na te substancje aktywne. Przełamanie zdolności detoksykacyjnej testowanych substancji aktywnych przez te rośliny (redukcja długości korzeni o 50%) następowało już dla pozostałości rzędu $0,05 - 0,125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, a dalszy wzrost stężenia chlorosulfuronu i nikosulfuronu w glebie powodował dalszą redukcję długości korzeni ($1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} - 90-100\%$) (rys. 1, 2). Porównywalne wyniki uzyskał również Sadowski i in. [2002] w swoich badaniach nad wykrywaniem i zachowaniem się pozostałości sulfosulfuronu i chlorosulfuronu w glebie przy użyciu klasycznego biotestu.

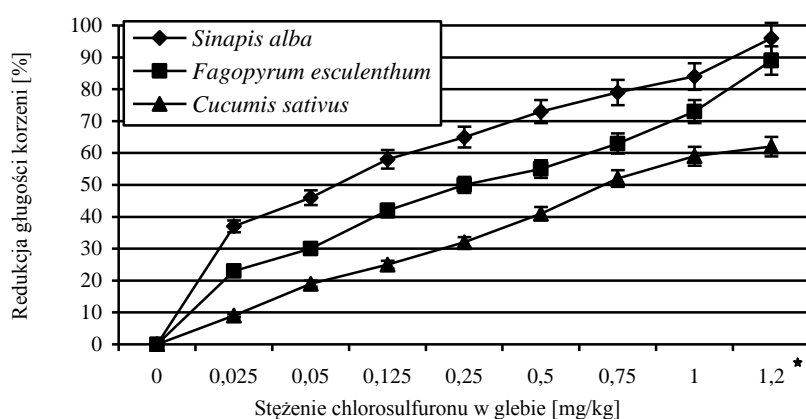
Najslabszą reakcję na chlorosulfuron i nikosulfuron stwierdzono dla *Cucumis sativus*. Przy najniższym stężeniu $0,025 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ zahamowanie wzrostu korzeni wynosiło 7–10% a przy stężeniu najwyższym ($1,2 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$) tylko 60–65% (rys. 1, 2). Taki typ reakcji badanej rośliny bardzo mocno ogranicza możliwość użycia jej do detekcji tak niewielkich stężeń badanych substancji. Również w swoich wcześniejszych badaniach Sekutowski i Sadowski [2006] wskazują na stosunkowo małą czułość *Cucumis sativus* w odniesieniu do tifensulfuronu.

Natomiast w przypadku 2,4 DP gradacja przedstawiała się w nieco odmienny sposób: najsilniej reagował *Cucumis sativus* następnie *Fagopyrum esculentum* i dopiero jako ostatnia *Sinapis alba* (rys. 3).

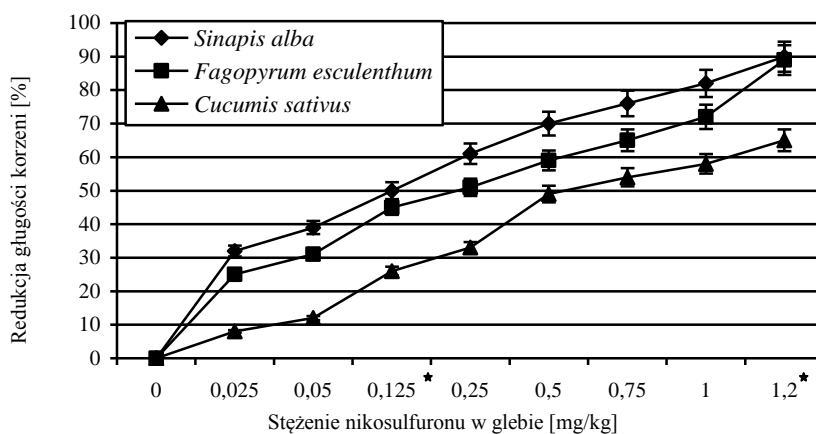
Reakcja zarówno *Cucumis sativus*, *Fagopyrum esculentum* jak i *Sinapis alba* na 2,4 DP dla najniższych stężeń była porównywalna. Redukcja długości korzeni dla stężenia $0,025$ i $0,05 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ wahała się w granicach 5–10%. W miarę zwiększania

stężenia 2,4 DP różnice pomiędzy badanymi roślinami ulegały radykalnej zmianie i przy najwyższym stężeniu, redukcja długości korzeni dla *Cucumis sativus* wynosiła 99% a dla *Fagopyrum esculentum* i *Sinapis alba* około 80% (rys. 3). Wyraźnie widać, że przełamanie zdolności detoksykacji 2,4 DP przez *Cucumis sativus* (redukcja długości korzeni o 50%) następowało już dla pozostałości rzędu 0,05–0,125 mg·kg⁻¹.

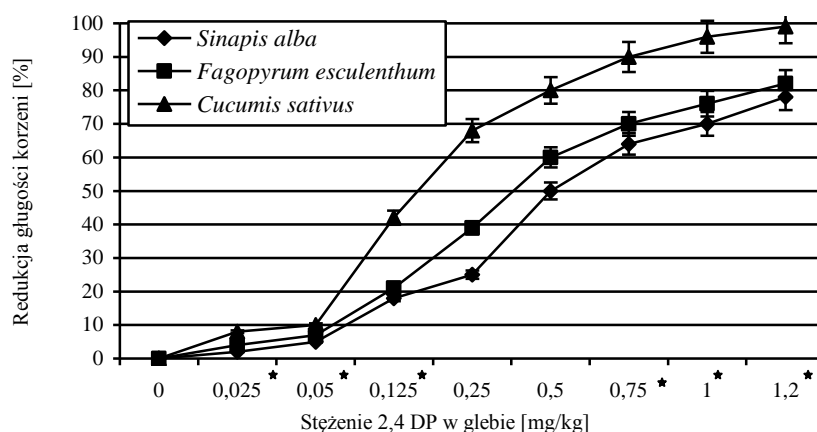
Taki rodzaj reakcji detektora roślinnego (*Cucumis sativus*) umożliwia badanie nawet niewielkich pozostałości 2,4 DP w glebie (rzędu 10⁻³ mg·kg⁻¹). Podobne wyniki uzyskał Sadowski i in. [2002] porównując efekt działania chlorosulfuronu, pendimetaliny i 2,4 DP na redukcję suchej masy *Cucumis sativus*.



Rys. 1. Efekt działania chlorosulfuronu na redukcję długości korzeni roślin testowych (* - różnice statystycznie istotne dla $\alpha \leq 0,05$)



Rys. 2. Efekt działania nikosulfuronu na redukcję długości korzeni roślin testowych (* - różnice statystycznie istotne dla $\alpha \leq 0,05$)



Rys. 3. Efekt działania 2,4 DP na redukcję długości korzeni roślin testowych
 (* - różnice statystycznie istotne dla $\alpha \leq 0,05$)

4. WNIOSKI

1. Do wykrywania pozostałości (nawet rzędu 10^{-3} mg·kg⁻¹) chlorosulfuronu i nikosulfuronu w glebie najlepiej nadawała się *Sinapis alba* w następnej kolejności *Fagopyrum esculentum*, natomiast najslabiej na badane substancje reagował *Cucumis sativus*.
2. W przypadku pozostałości w glebie 2,4 DP najlepiej do tego celu należy wykorzystywać *Cucumis sativus*. Pozostałe fitodetektory: *Fagopyrum esculentum* i *Sinapis alba* wykazywały znacznie słabszą reakcję na badaną substancję aktywną.
3. W tego typu badaniach bardzo istotny jest dobór odpowiedniej rośliny (dostatecznie wrażliwej) do badanej substancji aktywnej herbicydów. Pozwala to na prowadzenie badań nad pozostałościami rzędu $2 \cdot 10^{-2}$ mg·kg⁻¹ czy nawet niższymi ($2 \cdot 10^{-4}$ mg·kg⁻¹).

LITERATURA

- [1] Demczuk A., Sacała E., Grzyś E. 2004. Zmiany aktywności syntezy acetylomleczanowej (ALS) pod wpływem herbicydu Titus 25 DF u różnych odmian ogórka. *Progr. Plant Protect./Post. Ochr. Roślin* 44 (2): 645-647.
- [2] Fargasova A. 2001. Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biol. Plant* 44(3): 471-473.
- [3] Gong P., Wilke B.M., Strozzi E., Fleischmann S. 2001. Evaluation and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere* 44: 491-500.
- [4] Hernández-Seviliano E., Chueca M.C., Alonso-Prados J.L., Garcia-Baudin J.M. 1999. A rapid, sensitive bioassay method for sulfonylurea herbicides. *The BCPC Conference-Weeds* 3: 711-716.
- [5] Klimkowicz-Pawlas A., Krulova J., Smreczak B., Maliszewska-Kordybach B. 2007. Wykorzystanie testu Phytotoxkit do oceny gleb zanieczyszczonych przez WWA – badania wstępne. Materiały Konferencji Naukowej pt.: „Ekotoksykologia w ochronie środowiska glebowego i wodnego”. 14-16 października, IUNG-PIB Puławy 2007: 111-114.
- [6] Phytotoxkit 2004. Seed germination and early growth microbiotest with higher plants. Standard Operational Procedure. Nazareth, Belgium: MicroBioTest Inc. 24p.
- [7] Sadowski J., Rola H., Kucharski M. 2002. Zastosowanie biotestów do oceny pozostałości herbicydów w glebie. *Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin*, 42(1): 152- 158.
- [8] Sekutowski T., Sadowski J. 2006. Use of bioassays for assessment of residues level of herbicides active ingredients in soil. *Pestycydy/Pesticides*, (1-2): 59-64.
- [9] Smreczak B., Maliszewska-Kordybach B. 2003. Seeds germination and root growth of selected plants in PAH contaminated soil. *Fresenius Environmental Bulletin* 12: 946-949.

USING OF GERMINATING SEEDS *SINAPIS ALBA*, *FAGOPYRUM ESCULENTUM* AND *CUCUMIS SATIVUS* IN EVALUATION OF RESIDUES LEVEL OF HERBICIDES IN SOIL

Researches consisted of the four experiments carried out in the years 2007-2008. In the biological laboratory the germination and early growth microbiotest - Phytotoxkit™ produced by Tigret, was used to the detection of the herbicide active ingredients phytotoxic residues. Following plants were used as a bioindicators: *Sinapis alba*, *Fagopyrum esculentum* and *Cucumis sativus*, and the tested herbicide active ingredients were: chlorsulfuron, nicosulfuron and 2,4 DP. *Sinapis alba* was the most sensitive to chlorsulfuron and nicosulfuron, the next one was *Fagopyrum esculentum* and finally *Cucumis sativus*. Different plant reaction to the herbicide residues was observed in the case where 2,4 DP was applied – the highest sensitivity was noticed for *Cucumis sativus*, then for *Fagopyrum esculentum* and the lowest one for *Sinapis alba*.