

Néhány mikrobacsoport klórszulfuron herbicid-érzékenysége laboratóriumi és talajinkubációs kísérletekben

^{1,3} ANGERER P. ILDIKÓ, ² KÖVES-PÉCHY KRISZTINA, ¹ KECSKÉS MIHÁLY és ² BIRÓ BORBÁLA

¹ Szent István Egyetem Környezettudományi Doktori Iskola, Mezőgazdasági és környezetvédelmi mikrobiológia és biotechnológia PhD alprogram, Gödöllő,

² MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézet, Budapest és

³ Dunaújváros Megyei Jogú Város Polgármesteri Hivatala, Dunaújváros

Bevezetés

A nagyüzemi mezőgazdasági termeléssel párhuzamosan a peszticidek, közöttük a gyomirtó szerek (herbicidek) használata is fokozódott. Ezekre általában jellemző a talajban történő gyors lebomlás (KÁTAI et al., 2002), ezért hatásuk nem terjed ki a teljes vegetációs időszakra. Ismert eljárás ezért, hogy az aktív hatóanyaghoz ún. extendereket is adagolnak, ami kiterjeszti a gyomirtó képességet, de fokozhatja az ún. „nem célzott” (non-target) mikroorganizmusokra kifejtett káros hatásokat (KECSKÉS, 1976) is. A peszticidek használata befolyásolhatja a mikrobiális közösségek struktúráját és működőképességét (JUNNILA et al., 1996), de toxikusságukat vagy metabolizmusukat a kémiai szerkezetük, mennyiségük, és a mikroszervezetek faji, törzsi, élettani tulajdonságai is befolyásolják. A növényvédő szerek leginkább a fototróf mikroorganizmusokra fejtik ki a legkárosabb hatást a fotoszintézises folyamatok károsítása révén (DELORENZO et al., 2000). Napjainkban az ún. „új generációs” gyomirtó szerek vannak forgalomban, amelyek szelektivitása kifejezettebb, alkalmazási dózisuk pedig általában kisebb lehet a korábbiakhoz viszonyítva (INUI et al., 2001), gyomirtó hatásukat mégis képesek az egész vegetációs időszak alatt megtartani (NAGY, 1989). Az egyik ilyen szulfonil-karbamid típusú herbicid a Glean, ami 75%-ban klórszulfuron- (2-klór-//4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il/-aminokarbonil/-benzo-szulfonamid) tartalmú, formulázott készítmény. A klórszulfuron az őszi búza-, a len- és a szójakultúrák hatékony gyomirtó szere (FAO, 2003). A korábbi gyomirtó szerekhez viszonyítva feleakkora dózist is elegendő alkalmazni belőle, a herbicidhatás ennek ellenére akár százszoros is lehet. A Glean-t valamennyi növény könnyen felveszi, mind levélen, mind pedig gyökéren keresztül. Szelektivitása azon alapul, hogy a gabonafélék és a len képesek a herbicidet nem károsító, inaktív terméké alakítani, mind a kétszikű gyomokhoz viszonyított kis (5–10 g·ha⁻¹), mind az egyszikűekhez javasolt nagy (15–20 g·ha⁻¹) dózisok alkalma-

Postai cím: ANGERER P. ILDIKÓ, Dunaújvárosi Megyei Jogú Város Polgármesteri Hivatala, 2400 Dunaújváros, Városháza tér 1. *E-mail:* angerer@pmh.dunanet.hu

zása mellett is (ELEFHEROORINOS, 1987). A klórszulfuron „előnyét” növeli az a tény is, hogy felezési ideje viszonylag rövid (6–8 hét), így nem károsítja a vetésforgó következő növénykultúráját, pl. a burgonyát, ami már az alkalmazási dózis 1/25-ével szemben is érzékeny lehet (SMITH, 1986). A klórszulfuron-tartalmú herbicidek talaj-mikrobiológiai hatásai kevésbé ismertek. Kísérletek során megállapítást nyert, hogy a *Streptomyces griseus*, *Aspergillus niger* és a *Penicillium spp* tiszta kultúrái képesek bontani a ^{14}C klórszulfuront (JOSHI et al., 1985).

BERGER és WOLFE (1996) 12-féle szulfonil-karbamid herbicid lebomlását vizsgálták anaerob üledékekben különböző pH-értékek mellett laboratóriumi körülmények között. Míg a természetes üledékben semleges pH-értéknél a mikrobiológiai lebomlás dominált, addig az alacsonyabb pH-értéknél a kémiai hidrolízis bizonyult jelentősnek. JUNNILA és munkatársai (1996) szerint a szer csak kismértékű hatást gyakorolt a mikrobiológiai úton végbemenő nitrifikációs folyamatokra. Más tanulmányok jelezték a mezőgazdasági kemikáliáknak a hasznos mikrobacsoportokra, így például a szimbióta nitrogénkötő *Rhizobium*okra, „növénynövekedést-serkentő” *Pseudomonas*okra kifejtett káros, vagy dózisfüggően akár serkentő hatásait is (BIRÓ & KECSKÉS, 1984; BAYOUMI et al., 1988; BIRÓ et al., 1993; KÖVES-PÉCHY et al., 1996). A tarka koronafűrt *Rhizobium* baktériumainak aziprotrin herbicidlebontó képessége is igazolást nyert, amivel a káposztafélék gyommentesítésének környezetvédelmi kockázata csökkenthető (JOZEPOVITS et al., 1980). A mikroorganizmusok különböző mértékű herbicid-toleranciája a *Trichoderma* gombák elterjedésére és gyakoriságára is hatással van (NAÁR et al., 1997).

Dolgozatunk célja mikroorganizmusok klórszulfuron-érzékenységének összehasonlító értékelése volt laboratóriumi és szabadföldi körülmények között. Ehhez a talajokból egyszerű szelektív táplemezekkel is kitenyészhető mikroorganizmusokat és azok autentikus törzseit választottuk ki. A klórszulfuron-tartalmú Glean herbicid gyakorlati adagjai mellett provokatív dózisokat is alkalmaztunk és a tesztmikrobák abundanciájának változását egy átlagos vegetációs időszak kezdetén és végén is ellenőriztük.

Anyag és módszer

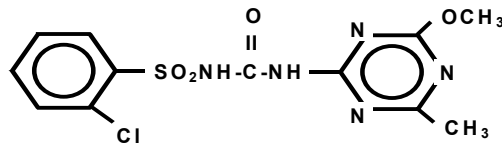
A mikroorganizmusok herbicid-érzékenységének vizsgálata in vitro

Laboratóriumi körülmények között különböző mikroorganizmusok klórszulfuron-érzékenységét tanulmányoztuk rázatásos, mikrofermentoros módszerrel. A gyomirtó szerrel szemben még intakt, nem adaptált mikrobák, *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Rhizobium leguminosarum*, Bükköny 75/4, *Rhizobium lupini* Csf. 75/1, *Rhizobium meliloti* LuK, *Rhizobium trifolii* Lóhere 73/3, *Streptomyces griseus* törzseit a megfelelő folyékony tápoldatba (Nutrient, arginin-glicerin- vagy élesztő-mannit tápleves (AGS, YMB) oltottuk, majd a szaporodás mértékét 24–48 óras, 25°C-on történő inkubációt követően állapítottuk meg. A táptalajok 5–5 ml-eihez előzetesen a klórszulfuron megfelelő dózisait (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 mg·L⁻¹) adagoltuk a beoltás előtt. Az inkubálást követően a szaporodás mértékét spektrofotométerrel állapítottuk meg a kontroll, nem peszticid-terhelt csövekkel való össze-

hasonlításban. A kezelések hatását három ismétlésben értékeltük, majd a sejtszaporodás mértékét a kontrollhoz viszonyítva az optikai denzitás (OD 560 nm) alapján adtuk meg. Az eredményeket egytényezős varianciaanalízissel értékeltük ki, majd az extinkció átlagértékeit ábrázoltuk a szignifikancia-értékek megjelölésével.

Tenyészedényes in vivo mikrokozmosz kísérletek

A szulfonil-karbamidok csoportjába tartozó klórszulfuron ($C_{12}H_{12}Cl-N_5O_4S$ – 1. ábra) mikroorganizmusokra kifejtett hatását mikrokozmosz talajinkubációs modell-kísérletben is elemeztük nagyhorcsóki mészlepedékes csernozjom talajjal (pH(H_2O): 7,71; szerves anyag: 3,27%; összes N: 1692 $mg \cdot kg^{-1}$; összes P: 1690 $mg \cdot kg^{-1}$; összes K: 1190 $mg \cdot kg^{-1}$).



1. ábra

A szulfonil-karbamidok csoportjába tartozó klórszulfuron (2-klór-//4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il/-aminokarbonil/-benzoszulfonamid) kémiai szerkezete

A tenyészedényekbe 200 g légszáraz talajmintát mértünk be, majd a klórszulfuront (azaz a kereskedelmi forgalomban levő formulázott, 75% tiszta klórszulfuron hatóanyag-tartalmú Glean 75 DF készítményt) a kontroll mellett négy koncentrációban alkalmaztuk. Az egyszikűek gyomirtására a szántóföldön javasolt 10–20 $g \cdot ha^{-1}$ mennyiség a 20 cm-es talajrétegben 0,001 $mg \cdot kg^{-1}$ dózist eredményez, amihez viszonyítva 10-, 1000- és 10000-szeres mennyiségeket is bevontunk a vizsgálatokba. Az inkubációs időszak letelte után a megfelelő talajhígításokat 20 μl -es mikropipettával az általunk kifejlesztett cseppmódszerrel (ANGERER et al., 1998, 2006; BIRÓ & ANGERER, 1997) juttattuk a szelektív táptalajok felületére hígításonként 3–3 ismétlésben. A *Bacillus cereus* var. *mycoides* meghatározásához Nutrient (N) táptalajt, a sugárgombák számlálásához Arginin-glicerin (AG) agart, a szabadon élő nitrogénkötők meghatározásához pedig Kongóvörös indikátort is tartalmazó Ashby agart (KA) használtunk (SZEGLI, 1979; VINCENT, 1970). A talajmintákat 10^{-8} értékig hígítottuk a vizsgálat során. Az inkubáció letelte után a kifejlődött telepeket megszámláltuk, és a telepképző egységeket („colony-forming units”, CFU) 1 g légszáraz talajra vonatkoztattuk, egytényezős varianciaanalízissel értékeltük, majd az átlagadatok \log_{10} -transzformált adatait ábrázoltuk az SZD_{95%} szignifikancia-érték megjelölésével.

Eredmények

Mikroorganizmusok szaporodása klórszulfuron növekvő adagjainál in vitro

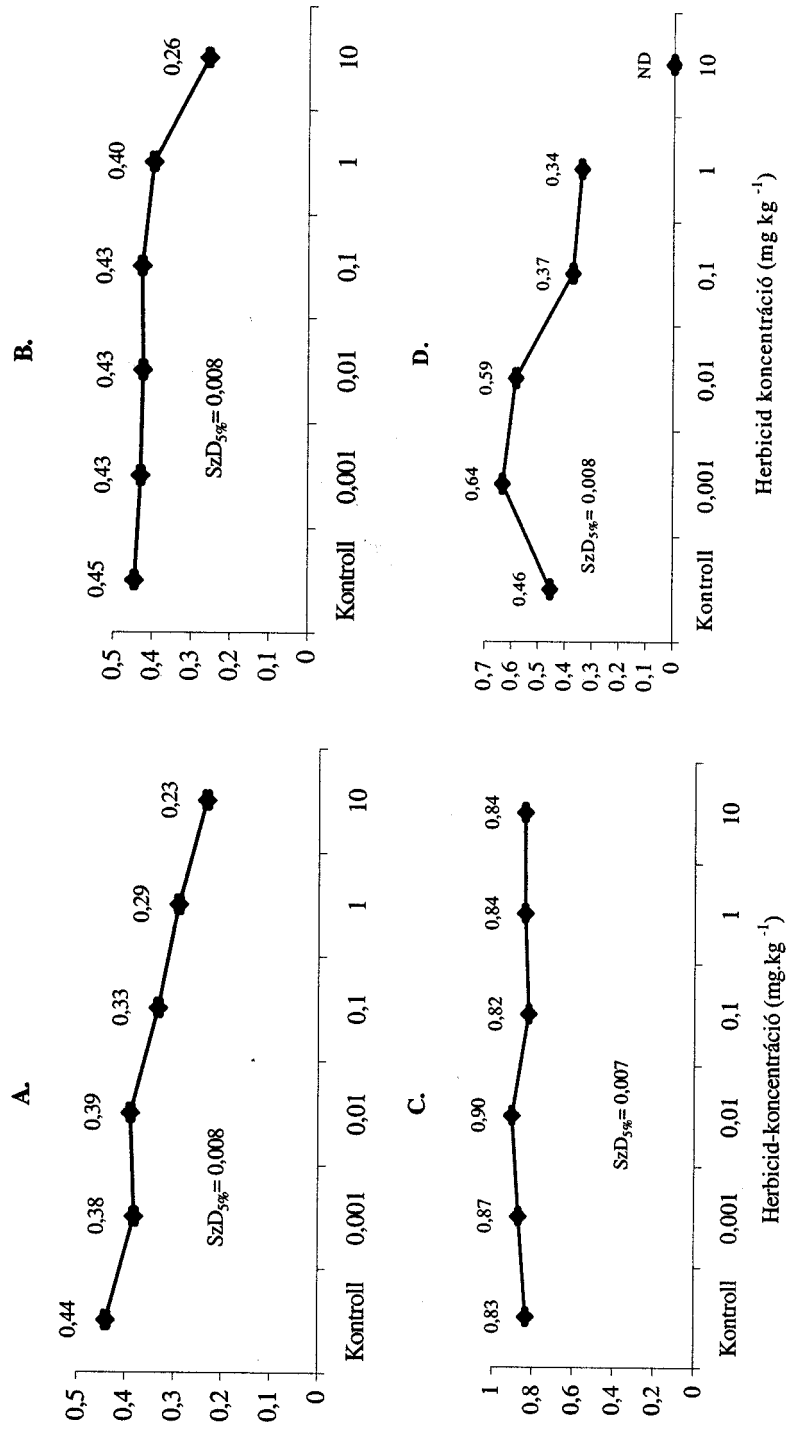
A rázatásos, mikrofermentoros kísérletben tesztelt mikroorganizmusok a klórszulfuron gyomirtó szer eltérő koncentrációira egyéni érzékenységüktől függően reagáltak. A vizsgált mikroorganizmusok közül a legérzékenyebbek a rhizobiumok (*R. trifolii* Lóhere 73/3, és *R. meliloti* LuK) bizonyultak (2. ábra), amelyeknél szignifikáns szaporodás-gátlás következett be a herbicid növekvő adagjai hatására. Szaporodást a fokozatos csökkenés ellenére a legnagyobb herbiciddózisoknál is ki lehetett mutatni. A két rhizobium törzs között a szaporodás mértékében lényeges különbség adódott a *R. meliloti* LuK javára, amely törzsnek a szaporodását csak a legnagyobb herbicid-koncentráció gátolta. A klórszulfuron a másik rhizobium törzsnél a dózis függvényében egyenletesen csökkentette a szaporodás mértékét.

A *Bacillus cereus* var. *mycoides* spórás baktérium a $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ herbicidkoncentrációnál a szaporodóképesség növekedésével reagált (2. ábra). Ennek mértéke megközelítőleg 20 %-osnak adódott a herbicid nélküli kontrollhoz viszonyítva. Erős, szignifikáns szaporodás-serkentést figyelhettünk még meg a *Streptomyces griseus* törzsnél is, elsősorban az alacsony, gyakorlati alkalmazási dózisoknál (2. ábra). A szaporodás-serkentés mértéke lényegesen meghaladta a spórás bacillusnál tapasztaltakat és a dózisfüggés is nagyobb szélsőségeket eredményezett.

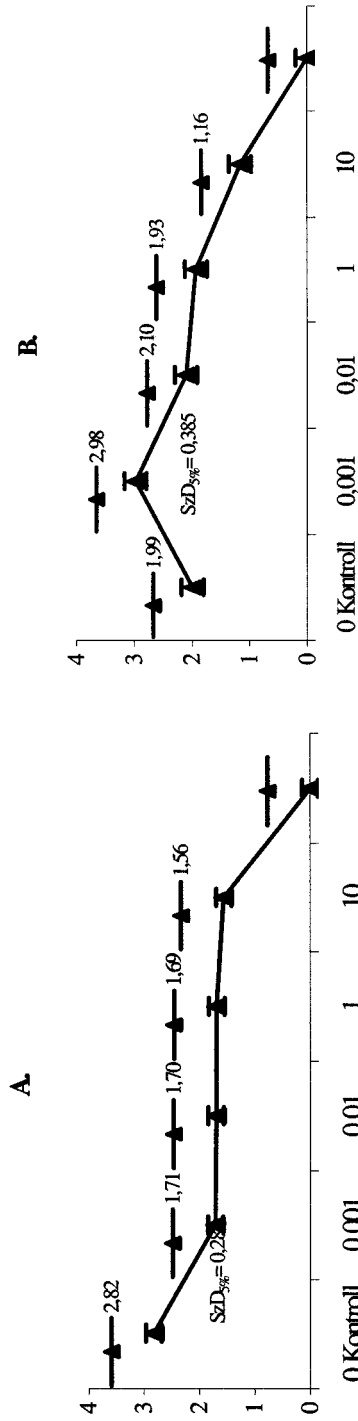
Ugyanakkor ezzel a módszerrel a *Streptomyces griseus* törzs szaporodása nehezen volt mérhető, mert a nagyobb koncentrációknál jelentkező poliszacharid termelés miatt a sejtek flokkulálódásra lettek hajlamosak, ezért a $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ koncentrációnál az extinkciós értéket nem lehetett pontosan meghatározni. A herbicid 0,1; 1 és $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dózisainak a szaporodásra kifejtett kedvezőtlen hatásai a rhizobium baktériumokhoz hasonlóan megnyilvánultak.

Mikrobacsoportok klórszulfuron érzékenysége talajinkubációs modellkísérletben in vivo

A klórszulfuron-tartalmú Glean herbicid növekvő adagjait talajinkubációs modellkísérletben is teszteltük. Ennek során különféle mikrobacsoportok abundanciáját állapítottuk meg a herbicid-adagolás után egy vegetációs időszakot alapul véve 3 heti, illetve 3 hónapi inkubációt követően. A 3. ábrán a kitenyészhető N_2 -kötő baktériumok számának alakulását tüntettük fel a növekvő herbiciddózisok függvényében. Megállapíthattuk, hogy 3 hét után a klórszulfuron minden általunk alkalmazott dózisa nagyon jelentős, szignifikáns sejtszám-csökkenést eredményezett a kongóvörös indikátort tartalmazó Ashby agaron (KA). A különféle koncentrációk között (amit a szántóföldi gyakorlat 10000-szereséig növeltünk), a sejtszám-csökkentő hatásban szignifikáns különbség a 10000-szeres dózis kivételével nem adódott. Három hónap elteltével azonban a herbicid gyakorlatban is alkalmazott szántóföldi dózisa szignifikáns stimulációt okozott a kitenyészhető csíraszámában, és a legnagyobb koncentrációknál tapasztaltuk ismét az abundancia lecsökkenését. A szántó-

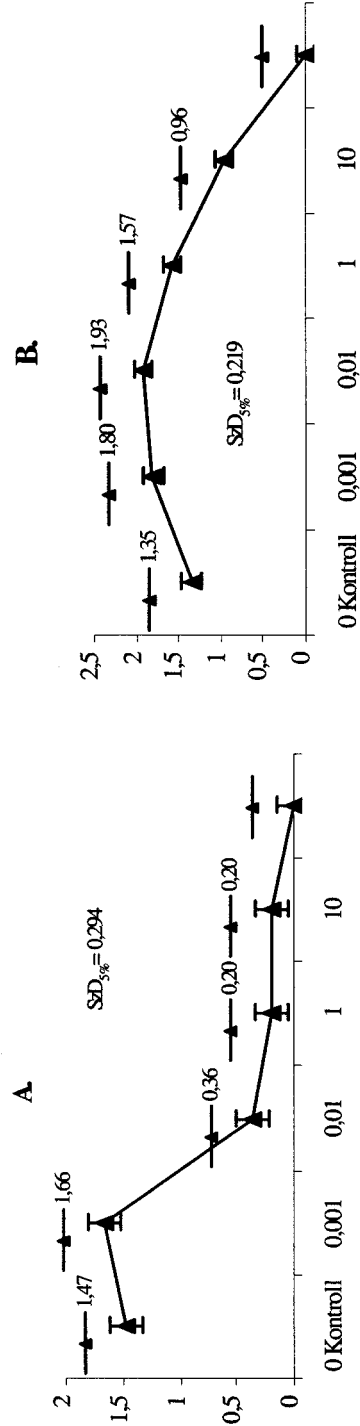


2. ábra
 A *Rhizobium trifolii* Lóhere 73/3 (A), a *Rhizobium meliloti* LuK (B), a *Bacillus cereus* var. *mycooides* (C) és a *Streptomyces griseus* (D) baktériumtörzsek szaporodása (OD 560 nm-nél mért denzitás) klórszulfuron herbicid különböző dózisaiban in vitro



3. ábra

A talajból kitenyészthető szabadon-élő N_2 -kötő baktériumok száma (log CFU átlag \pm szórás) a 75% klórszulfuron tartalmú Glean herbicid különböző dózisaival (A), illetve 3 hónapi (B) inkubáció után



4. ábra

A talajból kitenyészthető *Bacillus cereus* var. *mycoides* baktériumok (A) és a sugárgombák (B) számának alakulása, a 75% klórszulfuron-tartalmú Glean herbicid különböző dózisaival ($mg \cdot kg^{-1}$) hatására talajinkubációs modellkísérletben 3 hónapi hatóidő után

földi mennyiség 10000-szeres nagyságrendjénél nitrogénkötőket kimutatni az adott táptalaj segítségével nem tudtunk.

A 4. ábrán a kitenyészhető spórás *Bacillus cereus* var. *mycoides* telepszám-változását és az arginin-glicerin agar táplemezekén kitenyésző sugárgombák telepszámértékeit mutatjuk be az inkubációs modellkísérlet 3 hónapi inkubációja során. Megállapítottuk, hogy a kétféle mikrobacsoport érzékenysége a klórszulfuron-tartalmú Glean herbicid különböző adagjai hatására eltérő mértékű. Amíg a bacillusok abundanciája a gyakorlati adag hatására nem változik, addig ugyanez a mennyiség, és annak még 10-szerese is serkentőleg hat a sugárgombák szaporodására. A spórásoknál a gyakorlati mennyiséget meghaladó minden dózis erősen csökkenteti a kimutatható mennyiségeket, a sugárgombáknál ugyanakkor a mennyiségi csökkenés csak a $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ talaj értéknél következik be. Az általunk alkalmazott legnagyobb mennyiség mindkét mikrobacsoport sejtszámát az általunk alkalmazott módszerrel a kimutathatóság alá csökkentette.

Az eredmények értékelése

Amint azt az irodalmi adatok, valamint korábbi eredményeink is jelezték, egyes mikroorganizmus-csoportok számszerű értékei, vagy a talaj–növény rendszerekben megnyilvánuló működőképességük alkalmas lehet az agrokemikáliák, vagy egyéb xenobiotikumok hatásának az ökotoxikológiai előrejelzésére (KÁTAI, 1998; BIRÓ & ANGERER, 1997; BIRÓ, 2003). A mikroorganizmusok között különösen a nitrogénkötő baktériumok és a sugárgombák használhatók érzékeny indikátorszervezetekként számos peszticid, így a klórszulfuron-tartalmú Glean herbicid mezőgazdasági alkalmazása során is (JOSHI et al., 1985).

A talajok mikrobiális aktivitásában ugyanakkor számos mikrobacsoport tevékenysége is megnyilvánul. A fenntartható mezőgazdasági szemléletnek megfelelően általában a növény–talaj rendszerekben tevékenykedő, a növénytermesztés és a talajtermékenység szempontjából is „hasznos” mikrobacsoportokat kísérjük különös figyelemmel (BIRÓ, 2003). Ezek közül az egyszerű eszközökkel kitenyészhető mikroorganizmusok mennyiségi értékelése a leginkább kivitelezhető. A talajokban a biológiai N_2 -kötésre képes baktériumok, a szerves anyagok lebontásában közreműködő sugárgombák és gombák, vagy a spóráképzésük miatt a környezeti stresszkörülményeket túlélni képes (ún. „I” strategista) *Bacillus* genus tagjai funkcionális jelentőségűek. Ezeknek a csoportoknak a kitenyészhető módszerrel történő mennyiségi számbavétele alapján következtetéseket vonhatunk le a talajállapotról még akkor is, ha irodalmi adatok szerint ez a frakció az összes mikrobiális közösségnek csak 1–2 %-os mennyiségét jelentheti. Ezek mellett a talajbióta „nem kitenyészhető, de életképes” (ún. „VBNC”) frakciójának a számbavétele (MÁRIALIGETI et al., 2003), az összmikrobás, közösségi válaszreakciók biológiai indikációban való alkalmazásai (SZILI-KOVÁCS et al., 1997), és a PCR-alapú tesztelő eljárások is terjedőben vannak (KÖDÖBÖCZ et al., 2005).

A tanulmányban vizsgált mikrobacsoportok környezeti stressztényezőkkel, így a klórszulfuron herbiciddel szembeni érzékenysége különbözőképpen nyilvánult meg,

a korábbi adatokhoz hasonlóan (JEVCSÁK et al., 2000). Az érzékenység mikroba-csoportra jellemző tulajdonságai mellett az egyazon csoporton belül a törzsek közötti különbségek is igazolódtak, amit a kétféle rhizobium toleránsabb, vagy kevésbé toleráns viselkedése igazolt az *in vitro* teszt során. A nitrogénkötő baktériumoknál a talajinkubációs kísérletben is hasonló, koncentrációfüggő sejtszám-csökkenést mutattunk ki. Míg a folyékony táptalajban ez fokozatosan jött létre, addig a kísérleti talaj bizonyos koncentrációk károsító hatását pufferalni tudta és csak az extrém nagy adagnál csökkent le a sejtszám hirtelen. A tanulmányozott mikrobacsoportok közül a sugárgombák és a spórások mennyiségi értékeit a Glean herbicid gyakorlati adagjai általában nem befolyásolták, illetve enyhe stimuláló hatást is ki tudtunk mutatni. A kis koncentrációban történő alkalmazás esetén a kedvező hatást a talajok tápanyag-szegény körülményeivel magyarázhatjuk, aminek eredményeképpen a talaj-mikroorganizmusok az „életidegen” kemikáliákat képesek szén- és nitrogénforrásként hasznosítani (JOZEPOVITS et al., 1980). Hasonló eredményt mutatott ki SAWICKA és SELWET (1998) is a linuron herbicid felhasználásával az összcsíraszám vonatkozásában. BOLDT és JACOBSEN (1998) ugyanakkor a *Pseudomonas fluorescens* baktérium számának csökkenését jelentették a klórszulfuron herbicid, az ajánlottnál nagyobb dózisainál. BURNET és munkatársai (1991) szerint a szulfonilkarbamid herbicid tartós alkalmazása az őshonos mikrobiális közösségek egyensúlyának megbomlását okozta alkalikus talajokban, ahol a szer mikrobiológiai lebomlása korlátozottnak bizonyult. Ezzel ellentétben a *Streptomyces griseus* sugárgomba törzs laboratóriumi körülmények között képes volt elbontani a ¹⁴C izotóppal megjelölt klórszulfuron gyakorlati mennyiségeit (JOSHI et al., 1985). BOSCHIN és munkatársai (2003), tanulmányozva a klórszulfuron biológiai lebontását, megállapították, hogy az *Aspergillus niger* mikroorganizmusok a talajból képesek eliminálni a klórszulfuron-tartalmú gyomirtó szereket. Feltételezzük, hogy az általunk vizsgált Glean 75 DF hatóanyagát bizonyos idő eltelté után (3 hónap alatt) a mikroorganizmusok, így a nitrogénkötők és a sugárgombák is képesek voltak hasznosítani az adott talajban, amit a kimutatható sejtszám-gyarapodás jelzett. A fentiek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az ilyen degradatív képességű mikroorganizmusokkal a talajok klórszulfuron-terhelése a talajbiológiailag kevésbé aktív körülmények között is irányítottan csökkenthető.

Összefoglalás

Ráztatásos, mikrofermentoros *in vitro* kísérletben elemeztük különböző mikroba-törzsek klórszulfuron herbicid toleranciáját. A mikroorganizmusokat a klórszulfuron megfelelő dózisait (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 mg·L⁻¹) is tartalmazó szelektív folyékony tápoldatokban (nutrient leves, arginin-glicerin tápoldat, élesztő-mannit leves) tenyésztettük. Az inkubáció után a sejtszaporodás mértékét a kontollhoz viszonyítva az optikai denzitás (OD 560 nm) alapján adtuk meg. Az eredményeket egytényezős varianciaanalízissel értékeltük, majd az extinkció átlagértékeit ábrázoltuk a szignifikancia-értékek megjelölésével.

Talajinkubációs modellkísérletben „egy új generációs” herbicid, a 75% klórszulfuron-tartalmú Glean gyakorlatban alkalmazott dózisának ($20 \text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$) hatását tanulmányoztuk mészlepedékes csernozjom talaj mikrobiális közösségeire. A $0,001 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ talajdózis mellett annak 10-szeres, 1000-szeres és 10000-szeres ($0,01$; 1 és $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) mennyiségeit is alkalmaztuk. A szántóföldi vízkapacitás 60%-os értékénél, $28 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten 3 heti és 3 havi inkubációs periódust vizsgáltunk három ismétlésben. A szabadon élő nitrogénkötők, a sugárgombák és a spóraképző *Bacillus cereus* var. *mycoides* kitenyésztesére került sor Arginin-glicerin, Kongóvörös-Ashby és Nutrient agar-lemezekben. A talajokból mikrobaszámokat az általunk módosított eljárással talajhígítási sorozatból állapítottuk meg és a telepképző egységek számát 1 g száraz talajra számítottuk át. Az átlagadatok \log_{10} -transzformált adatait ábrázoltuk, ahol a varianciaanalízis eredményeként jelentkező szignifikáns ($P_{0,5\%}$) értékeket is jelöltük.

A kísérletek során megállapítást nyert, hogy a vizsgált mikroszervezetek közül a *Rhizobium trifolii* Lóhere 73/3 és a *Rhizobium meliloti* LuK jelű törzsek érzékenyen, koncentrációfüggő módon reagáltak a klórszulfuronra. A *Streptomyces griseus* törzsnél ugyanakkor erős szaporodás-serkentést figyelhettünk meg a herbicid szántóföldi és 10-szeres dózisánál. A törzs irodalmi adatok szerint képes a klórszulfuron bontására. A gyomirtó szer bizonyos dózisaik serkentették a *Streptomyces griseus*, de a *Bacillus mycoides* szaporodását is.

Talajinkubációs kísérlettel bizonyítást nyert, hogy az alkalmazott „új generációs” herbicid mezőgazdasági gyakorlatnál nagyobb koncentrációi szignifikánsan csökkentik a heterotróf mikroorganizmusok számát. A szabadon élő nitrogénkötő baktériumok a leginkább érzékeny mikrobacsoportot képviselik. A klórszulfuron bizonyos dózisaik a sugárgombák is kevésbé tolerálták, a gyakorlati, $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ adag ugyanakkor számos mikrobacsoportnál stimuláló hatásúnak bizonyult. A vegetációs időszakra vonatkozó 3 hónapi hatóidő után a kontroll és a gyakorlati adag között a kitenyészthető csíraszámokban nem volt statisztikailag igazolható eltérés. Feltételezzük, hogy a szántóföldön alkalmazott dózist a mikrobák szén- és nitrogénforrásként tudták hasznosítani. Az eredmények a mikrobacsoportok és a herbicidek, valamint a környezet közötti kölcsönhatások további, tartamhatású kutatását indokolják.

A vizsgálatokat az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA T0 46610) támogatta. A hasznos mikroszervezetekre kifejtett környezeti stressz-hatásokat bilaterális együttműködések (CSIC-HAS, RAS-HAS, BOKU-RISSAC), a mezőgazdasági talajok tápanyagforgalmi javítási lehetőségeit pedig a GVOP KÖR-KOMP projektje kutatja. Jelen kutatást a Dunaújváros Megyei Jogú Város Polgármesteri Hivatala is támogatta.

Kulcsszavak: klórszulfuron, sugárgombák, nitrogénkötő baktériumok, *Bacillus*, *Rhizobium*, herbicid-érzékenység

Irodalom

- ANGERER, I. P., BIRÓ, B. & KÖVES-PÉCHY, K., 1998. Indicator microbes of chlorsulfuron addition detected by a simplified soil dilution method. *Agrokémia és Talajtan.* **47.** 297–305.
- ANGERER, I. P., RAUSCH, P. & BIRÓ, B., 2006. Specificity of microbial sensitivities to chlorsulfuron *in vitro* and in soil-incubation experiment. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **53.** 239–240.
- BAYOUMI, H. E. A. F., TÍMÁRI, S. & KECSKÉS, M., 1988. Side-effect of different pesticides on *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains. *Acta Microbiol. Hung.* **35.** 161–162.
- BERGER, B. M. & WOLFE, N. L., 1996. Hydrolysis and biodegradation of sulfonylurea herbicides in aqueous buffers and anaerobic water-sediment systems assessing fate pathways using molecular descriptors. *Environm. Toxicol. Chemistry.* **15.** (9) 1500–1507.
- BIRÓ B., 2003. Talaj- és rhizobiológiai eszközökkel a fenntartható növénytermesztés és a környezetminőség szolgálatában. *Acta Agronom. Hung.* **50.** 77–95.
- BIRÓ B. & ANGERER I. P., 1997. Módosított talajhígításos, szelektív kitenyésztés környezetvédelmi szempontú állapotfelmérésre. In: *Proc. IX. Országos Környezetvédelmi Konferencia, Siófok.* (Szerk.: ELEK GY. & VÉCSI B.) p. 287–293.
- BIRÓ, B., BAYOUMI, H. E. A. F. & BALÁZSY, S., 1993. Metal sensitivity of some symbiotic N₂-fixing bacteria and *Pseudomonas* rhizobacterium strains. *Acta Biol. Hung.* **46.** 9–17.
- BIRÓ, B. & KECSKÉS M., 1984. Herbicide sensitivity of *Coronilla Rhizobium* and *Pseudomonas Rhizobacterium* strains. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* **31.** 302–303.
- BOLDT, T. S. & JACOBSEN, C. S., 1998. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Letters.* **161.** 29–32.
- BOSCHIN, G., D'AGOSTINA, A. & ARNOLDI, A., 2003. Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by *Aspergillus niger* in laboratory conditions. *J. Envir. Sci. Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes.* **38.** 737–746.
- BURNET, M. & HODGSON, B., 1991. Differential effects of the sulfonylurea herbicides chlorsulfuron and sulfometuron-methyl on microbes. *Arch. Microbiol.* **155.** 521–525.
- DELORENZO, M. E., SCOTT, G. I. & ROSS, P. E., 2000. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: A review. *Environm. Toxicol. Chemistry.* **20.** 84–98.
- ELEFHEROHRINOS, J. G., 1987. Phytotoxicity and persistence of chlorsulphuron as affected by activated charcoal. *Weed Res.* **27.** 443–452.
- FAO, 2003. The Chlorsulfuron FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. FAO. Rome. p. 24.
- FLETCHER, J. et al., 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants *Environm. Toxicol. Chemistry.* **15.** 1189–1196.

- INUI, H. et al. 2001. Herbicide metabolism and tolerance in the transgenic rice plants expressing human CYP2C9 and CYP2C19. *Pesticide Biochem. Physiol.* **71**. 156–169.
- JEVCSÁK, I., BIRÓ, B. & BAYOUMI H. E. A. F., 2000. PGPR effect and herbicide sensitivity of some pseudomonads depending on their origin and plant hosts. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **47**. 307–308.
- JOSHI, M. M., BROWN, H. M. & ROMESSER, I. A., 1985. Degradation of chlorsulfuron by soil microorganisms. *Weed Science*. **33**. 888–893.
- JOZEPOVITS, GY. et al., 1980. Decomposition of azioprotine by *Coronilla Rhizobium*. *Rhizobium Newsletter*. **25**. 151–152.
- JUNNILA, S., HEINONEN-TANSKI, H. & ERVIÖ, L. R., 1996. Phytotoxic persistence and microbiological effect of chlorsulfuron in Finnish soils. *Weed Res.* **34**. 413–423.
- KÁTAI, J., 1998. The effect of herbicides on the quantity and activity of microbes in the soil. In: *Soil Pollution* (Ed.: FILEP, GY.) 159–168. Debrecen University Press. Debrecen.
- KÁTAI, J., BORBÉLY, M. & GYÖRI, Z., 2002. Study of atrazine degradation in a ring test of an international project. In: *Proc. 1st Alps-Adria Sci. Workshop*, Opatija, Croatia. 95–99. Agroinform Kiadó. Budapest.
- KECSKÉS M., 1976. Mikroorganizmusok, magasabbrendű növények és xenobiotikumok közötti kölcsönhatások értékelése. Akadémiai doktori értekezés és tézisei. Budapest
- KÖDÖBÖCZ, L., PACSUTA, P. & HALBRITTER, A., 2005. Ocenka populjácij rizobij sz iszpolzovanyiem BOX-PCR kak perszpektivnűj insztrument dlja usztojcsivogo zemlegyelija . In: *Molekularnie Mechanizmi vzaimodejstvia mikroorganizmov i rasteņij: Fundamentalnie i prikladnie aspekti* (Eds.: KONNOVA et al.). 81–84. Szaratov.
- KÖVES-PÉCHY, K. et al., 1996. Nodulation and N₂-fixation of various *Rhizobium*-legume systems (alfalfa, clover and pea) affected by field applied heavy metal salts. In: *Transactions of the 9th Nitrogen Workshop*, Braunschweig, Germany. 165–168.
- MÁRIALIGETI, K. et al., 2003. Investigations on the ratio of culturable and VBNC bacteria in beef as a function of preservation treatments. In: *Abstracts, 14th Int. Congress of the Hung. Soc. for Microbiology*, Balatonfüred. 130–131.
- NAÁR, Z., KISS, Z. & BAYOUMI, H. E. A. F., 1997. Colonization of *Trichoderma* strains in different soil types affected by microbicides. In: *Proc. Int. Reg. Seminar Transcarpathian Region on Environment Protection*, May 13–16, 1997, Uzhgorod, Ukraine. 22–27. Uzhgorod National University.
- NAGY I., 1989. Extenderek, tiokarbamát herbicidek, mikroorganizmusok és növények közötti kölcsönhatások. Kandidátusi értekezés. Gödöllői Agrártudományi Egyetem. Gödöllő.
- SAWICKA, A. & SELWET, M., 1998. Effect of active ingredients on *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* legume dinitrogen fixation. *Polish J. Environm. Studies*. **7**. (5) 317–320.
- SMITH, A. E., 1986. Persistence of the herbicides chlorsulfuron in prairie soils under laboratory conditions. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* **37**. 698–704.

- SZILI-KOVÁCS, T. et al., 1997. Application of some biological methods for the indication of the soil environmental quality. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **44**, 100–101.
- SZEGI J., 1979. Talajmikrobiológiai vizsgálati módszerek. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest.
- VINCENT, J. M., 1970. A Manual for the Practical Study of Nitrogen-fixing Bacteria. Oxford Press. Sidney.

Érkezett: 2007. február 13.

Chlorsulfuron herbicide tolerance of some microbes *in vitro* and in a soil incubation experiment

^{1,3}P. ANGERER, ²K. KÖVES-PÉCHY, ¹M. KECSKÉS and ²B. BIRÓ

¹PhD School of Agricultural and Environmental Microbiology and Biotechnology, Szent István University, Gödöllő, ²Research Institute for Soil Science and Agricultural Chemistry (RISSAC) of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest and ³Mayor's Office, Dunaujváros (Hungary)

Summary

The *in vitro* chlorsulfuron herbicide tolerance of various soil microbes was examined in a rotary shaker, where different rates of chlorsulfuron (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg·L⁻¹) were mixed into selective substrates (nutrient, yeast-mannite and arginine-glycerine broth). After a 24–48-hour incubation period, the optical density (OD 560 nm) of the suspensions was examined and growth was compared as a % of the unamended controls. The results were evaluated by single-factor analysis of variance and significant differences were labelled on the mean.

A model soil incubation experiment was set up to study the effect of recommended rates (20 g·ha⁻¹) of Glean, one of a new generation of herbicides containing 75% chlorsulfuron, on microbial communities in a pseudomyceliar chernozem soil. Apart from the recommended rate (equivalent to 0.001 mg·kg⁻¹ soil), ten, a thousand and ten thousand times this rate (0.01, 1 and 10 mg·kg⁻¹) were also tested. Incubation periods of 3 weeks and 3 months at 28°C and 60% field moisture capacity were tested in three replications. Free-living nitrogen fixers, Actinomycetes and spore-forming *Bacillus cereus* var. *mycooides* were incubated on arginine-glycerine, Congo Red Ashby and nutrient agar plates, respectively. The number of soil microbes was determined from a soil dilution series using a modification of the standard technique and the number of colony-forming units was converted to 1 g dry soil. The log₁₀-transformed mean data were plotted, indicating the least significant differences (at the 5% level).

Among the microorganisms tested, the *Rhizobium trifolii* strain Lóhere 73/3 and the *Rhizobium meliloti* strain LuK proved to be the most sensitive *in vitro*, and growth was retarded in parallel with the increasing doses of the herbicide. The lowest rates of chlorsulfuron significantly stimulated the growth of *Streptomyces griseus*, which has been reported to be for the ability of chlorsulfuron decomposition. Certain rates of the herbicide also stimulated the multiplication of *Bacillus cereus* var. *mycooides*.

The soil incubation experiment proved that Glean concentrations higher than the practical rates has resulted significant reduction in the abundance of heterotrophe microorganisms. Free-living nitrogen fixers proved to be the most sensitive microbes and Actinomycetes also had poor tolerance of some rates. Nevertheless, the field rate of 0.01 mg·kg⁻¹ had a stimulating effect on several types of microbes. There was no significant difference between the control and the recommended rates in the colony-forming units after the 3 months of incubation, equivalent with the length of the vegetation period. It is assumed that the microbes are able to utilize the field rates of chlorsulfuron as carbon and nitrogen sources. Further long-term research are recommended on the interactions between microbes, herbicides and the environment.

Fig. 1. Chemical structure of chlorsulfuron, a member of the sulfonyleurea group of herbicides (2-chloro-[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)-aminocarbonyl]-benzo-sulfonamide).

Fig. 2. Effect of various rates ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) of the herbicide Glean (75% chlorsulfuron) on the growth (density recorded at OD 560 nm) of the bacterium strains *Rhizobium trifolii* Lóhere 73/3 (A), *Rhizobium meliloti* LuK (B), *Bacillus cereus* var. *mycoides* (C) and *Streptomyces griseus* (D) *in vitro*.

Fig. 3. Effect of various rates ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) of the herbicide Glean (75% chlorsulfuron) on the abundance of free-living nitrogen-fixing microbes (log CFU mean \pm deviation) after a 3-week (A) or 3-month (B) incubation period.

Fig. 4. Effect of various rates ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) of the herbicide Glean (75% chlorsulfuron) on the abundance of *Bacillus cereus* var. *mycoides* (A) and Actinomycetes (B) after 3 months of incubation.