

Modyfikacja właściwości powierzchniowych bakterii glebowych w obecności wybranych preparatów grzybobójczych

Wojciech Smulek, Joanna Piotrowiak, Agata Zdarta, Ewa Kaczorek

Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska,
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań, Polska

Abstrakt: Intensyfikacja rolnictwa spowodowała wzrost użycia środków grzybobójczych w produkcji roślinnej. Środki ochrony roślin mogą zmieniać lokalne warunki środowiskowe w glebie, do której mogą się dostawać podczas oprysku roślin lub z zaprawami nasiennymi. Wśród wielu badań prowadzonych nad stosowanymi preparatami należy przeanalizować również ich wpływ na mikroflorę glebową. W przedstawionych badaniach przetestowano wpływ wybranych środków grzybobójczych: Acrobat MZ 69 WG (substancje czynne: dimetomorf 90 g·kg⁻¹ i mankozeb 600 g·kg⁻¹) i Gwarant 500 SC (substancja czynna: chlorotalonil 500 g·l⁻¹) na właściwości powierzchniowe mikroorganizmów glebowych *Rahnella aquatilis* oraz *Raoultella planticola*. Uzyskane wyniki wykazały, że zarówno Acrobat MZ 69 WG, jak i Gwarant 500 SC modyfikowały powierzchnię komórek szczepów *R. aquatilis* i *R. planticola*, zwiększając ich hydrofobowość. Ponadto dodatek Acrobatu MZ 69 WG powodował zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony komórkowej obu wybranych szczepów glebowych, czego nie zaobserwowano w przypadku preparatu Gwarant 500 SC. Wzrost stężenia obu środków grzybobójczych obniżał wartość potencjału zeta komórek szczepu *R. planticola* aż do wartości -26,2 mV (w obecności Gwarantu 500 SC), a zwiększała – szczepu *R. aquatilis* (do -16,9 mV, wobec Acrobatu MZ 69 WG). Uzyskane wyniki wskazują na znaczące modyfikacje powierzchni komórek bakterii glebowych pod wpływem badanych preparatów grzybobójczych. Kierunek oraz intensywność wywołanych zmian zależały od rodzaju oraz dawki stosowanego preparatu. Jednocześnie analiza statystyczna nie wykazała bezpośredniej korelacji między zmianami stężenia a wszystkimi analizowanymi parametrami.

słowa kluczowe: bakterie, fungicydy, hydrofobowość, potencjał zeta, przepuszczalność błony komórkowej

WSTĘP

Wzmożony popyt na żywność przyczynił się do zwiększenia produkcji rolniczej i tym samym masowego stosowania środków ochrony roślin. W uprawach warzyw i owoców szczególnie istotna jest walka z pleśniami i innymi grzybami obniżającymi plony oraz ich jakość i wartość odżywczą. W Polsce sprzedaż środków grzybobójczych stale rośnie i wyniosła w roku 2012 niemal 14,5 t (Urban, 2014).

Działanie fungicydów polega w szczególności na zaburzeniu wzrostu i rozwoju komórek budujących grzybnie, a w rezultacie prowadzi do zamierania całego organizmu grzybowego. Do fungicydów o działaniu powierzchniowym należą związki będące pochodnymi węglowodorów aromatycznych. Jedną z głównych grup fungicydów są związki zawierające pierścień benzenowy w cząsteczce. Są to głównie pochodne chlorobenzenu i chloronitrobenzenu, np. chlorotalonil (tetrachloroizoftalonytryl). Mechanizm działania tej grupy związków grzybobójczych opiera się na zakłócaniu procesów energetycznych u grzybów. Wykazują one działanie ochronne w stosunku do roślin warzywnych, okopowych oraz ozdobnych przed zarazą ziemniaka, mączniakami, alternariozą i innymi chorobami. Jednocześnie badania wskazują na niską toksyczność chlorotalonilu w stosunku do organizmów stałocieplnych (McMahon i in., 2011).

Fungicydy morfolinowe, charakteryzujące się działaniem wglębnym, powodują inhibicję syntezy biologicznej ergosteroli wchodzących w skład błon komórkowych grzybów. Podczas dłuższego ich stosowania mogą pojawiać się formy grzybów odporne na działanie tej grupy substancji. Fungicydy te znajdują zastosowanie w ochronie upraw roślin przed mączniakami rzekomymi i zarazą ziemniaka. W przypadku fungicydów morfolinowych (zawartych m.in. w preparacie Acrobat MZ 69 WP) substancjami biologicznie czynnymi mogą być fenpropimorf oraz dimetomorf (Okorski i in., 2015).

Autor do kontaktu:

Wojciech Smulek
e-mail: wojciech.smulek@doctorate.put.poznan.pl
tel./fax: +48 61 665 36 49

Dotychczas przeważająca część badań dotyczących fungicydów obejmowała określenie ich mechanizmu działania na komórki grzybów, wpływu na kondycję upraw oraz zdrowie człowieka. Należy jednak zwrócić uwagę na wpływ stosowanych preparatów grzybobójczych także na te mikroorganizmy bytujące w ekosystemie, które nie są celem działania preparatu. Należą do nich bakterie obecne w glebie, w której prowadzone są uprawy. Nawet preparaty o niskiej toksyczności i nie zaburzające znacząco równowagi mikrobiologicznej, mogą wpływać na zmiany w fizjologii i budowie komórek bakteryjnych, w tym na ich właściwości powierzchniowe odpowiadające za interakcję ze składnikami gleby czy korzeniami roślin. Jednym z głównych efektów kontaktu z fungicydami są znaczące zmiany w przepuszczalności błony komórkowej. Równocześnie obserwowana jest zwiększona akumulacja tych środków w biomase bakteryjnej (Güven i in., 2005; Shrestha i in., 2013).

Chlorotalonil wykazuje właściwości toksyczne wobec mikroorganizmów glebowych, a jego biodegradacja w glebie jest utrudniona, ze względu na silną adsorpcję do cząstek stałych (Zhang i in., 2014). Szacuje się, że okres półtrwania chlorotalonilu w glebie w klimacie umiarkowanym wynosi do sześciu miesięcy, a jednym z najważniejszych etapów jego biodegradacji jest dehalogenacja prowadząca do usunięcia atomu chloru z cząsteczki (Liang i in., 2010). W analogicznych warunkach połowiczny rozkład mankozebu trwa od pięciu do dziesięciu tygodni, a głównymi produktami jego biodegradacji są etyloiomocznik, etylomocznik i siarczan bis(izotiocyjanianu) (Cycoń i in., 2010).

Celem pracy było zbadanie wpływu dwóch wybranych komercyjnych środków grzybobójczych, Acrobat MZ 69 WG oraz Gwarant 500 SC, na właściwości powierzchniowe komórek bakterii glebowych. Badania obejmowały wyznaczenie hydrofobowości powierzchni komórek, określenie przepuszczalności błony komórek bakteryjnych oraz wyznaczenie potencjału zeta komórek bakteryjnych.

MATERIAŁY I METODY

Fungicydy

Do badań wybrano dwa preparaty grzybobójcze: Acrobat MZ 69 WG (BASF Agro B.V., Szwajcaria), który zawiera dwie substancje czynne: dimetomorf (90 g·kg⁻¹ preparatu) i mankozeb (600 g·kg⁻¹ preparatu) oraz Gwarant 500 SC (*Arysta LifeScience* Polska Sp z o.o.), w którym substancją aktywną jest chlorotalonil (500 g·l⁻¹ preparatu). Do hodowli bakteryjnych badane preparaty dodawano w postaci roztworu fungicydu w medium hodowlanym o stężeniu 4 g·l⁻¹.

Mikroorganizmy

W badaniach wykorzystano dwa szczepy bakterii glebowych pochodzące z kolekcji Zakładu Chemii Orga-

nicznej Politechniki Poznańskiej: *Rahnella aquatilis* oraz *Raoultella planticola*. Zostały one wyizolowane z próbek gleby z obszaru północno-zachodniej Polski, a ich identyfikację biochemiczną wykonano z wykorzystaniem systemu VITEK® 2 (bioMerieux Polska). Są to Gram-ujemne pałeczki powszechnie występujące w glebie. Szczepy przechowywano na płytkach agarowych z podłożem Mueller-Hinton (bioMerieux, Polska).

Prowadzenie hodowli i przygotowanie próbek do badań

Hodowle bakteryjne zawierające 50 ml medium hodowlanego (Dobslaw, Engesser, 2012) prowadzono w kolbach o objętości 250 ml. Każda z hodowli zawierała ekstrakt drożdżowy w ilości 0,4 g·l⁻¹, glukozę w ilości 0,4 g·l⁻¹ oraz badany preparat grzybobójczy dodany w ilości odpowiadającej uzyskaniu w hodowli stężenia 4; 8; 16; 24; 30; 36 lub 40 mg·l⁻¹. Próby odniesienia stanowiły hodowle nie zawierające żadnego z fungicydów. Hodowle inkubowano na platformie z wytrząsaniem (120 obr·min⁻¹) w temperaturze 30°C.

Po 7 dniach 30 ml hodowli wirowano (8000 obr·min⁻¹; 5 min, 10°C), zlewano supernatant, a biomasę dwukrotnie przemywano medium hodowlanym. Następnie biomasę zawieszano w 5 ml medium i mierzono gęstość optyczną (spektrofotometr V-650, Jasco, Japonia) zawiesiny komórek przy długości fali 600 nm. W razie potrzeby zawiesinę rozcieńczano medium, tak aby jej gęstość optyczna wyniosła 1,0.

Hydrofobowość powierzchni komórek

Pomiar hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych wykonywano metodą mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów (Rosenberg i in., 1991). W tym celu dodawano do każdej próbki 0,5 ml heksadekanu, wytrząsano przez 2 minuty i odstawiano do momentu rozdziału faz, po czym mierzono gęstość optyczną fazy wodnej. Stopień hydrofobowości H komórek obliczano ze wzoru:

$$H = [(A_0 - A_1)/A_0] \cdot 100\%$$

gdzie: A_0 i A_1 – odpowiednio gęstość optyczna zawiesiny komórek przed wprowadzeniem heksadekanu i po rozdzieleniu faz. Przedstawione wyniki to wartość średniej arytmetycznej otrzymanej z trzech pomiarów.

Pomiar potencjału zeta

W celu wyznaczenia potencjału zeta na powierzchni mikroorganizmów zawiesinę komórek wprowadzano do kuwet o pojemności 1 ml wyposażonych w elektrody pomiarowe. Pomiar potencjału zeta przeprowadzano z użyciem aparatu Zetasizer Nano ZS firmy Malvern. Przedstawione wyniki to wartość średniej arytmetycznej otrzymanej z trzech pomiarów.

Analiza przepuszczalności błony komórkowej

Oznaczenie przepuszczalności wewnętrznej błony komórkowej przeprowadzono metodą opisaną przez Zhang

i in. (2013). Do 5 ml zawiesiny komórek dodawano 250 μ l roztworu wodnego *o*-nitrofenylo- β -D-galaktopiranozydu (ONPG) o stężeniu 30 mM i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 30°C. Następnie próbkę odwirowano (5000 obr. \cdot min $^{-1}$; 10 min, 10°C) i mierzono absorbancję supernatantu przy długości fali 600 nm. Przepuszczalność błony komórkowej obliczano na podstawie stężenia *o*-nitrofenolu powstałego w wyniku hydrolizy ONPG zachodzącej z udziałem β -galaktozydazy bakteryjnej. Przedstawione wyniki stanowią średnią arytmetyczną otrzymaną z trzech pomiarów.

Analiza statystyczna wyników

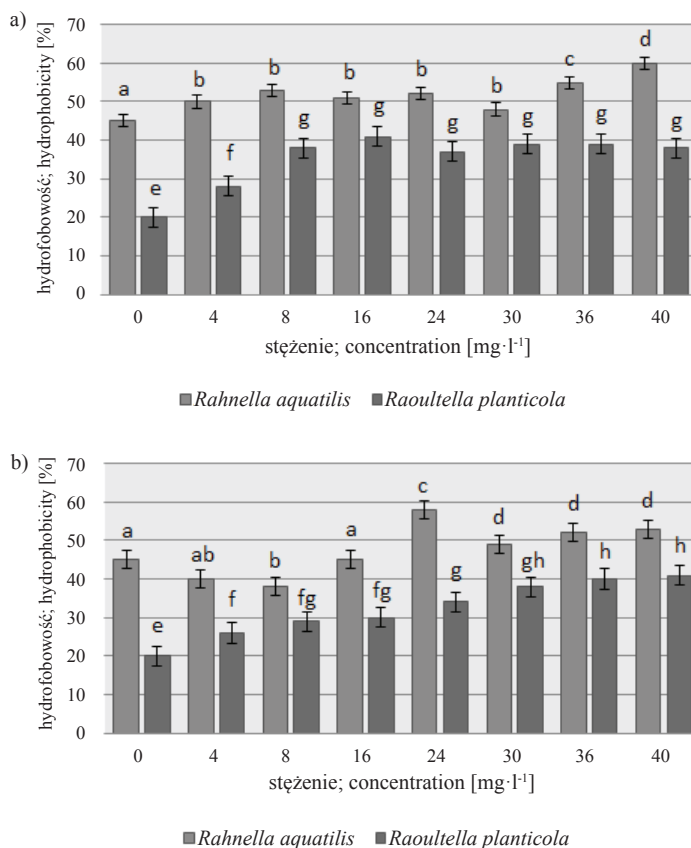
Każdy pomiar wykonywano w trzech powtórzeniach i na ich podstawie wyliczano średnią oraz odchylenie standardowe. Zebrane wyniki z pomiarów właściwości powierzchniowych poddano analizie statystycznej za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ang. *Two Way Anova*). Różnice między wynikami uzyskanymi dla różnych stężeń preparatu były określane dla każdego szczepu oddzielnie. Istotność stwierdzonych różnic oceniano testem Holm-Sidak. Przyjęto poziom istotności $P < 0,005$. Jako czynniki różnicujące uwzględniono rodzaj fungicydu oraz jego stężenie (Fay, Gerow, 2013; Krzych, 2007). Obliczenia wykonano w programie SigmaPlot 11.0, a wykresy w programie Microsoft Excel 2010.

WYNIKI

Hydrofobowość powierzchni komórek

Preparat Acrobat MZ 69 WG modyfikował powierzchnię szczepu *Rahnella aquatilis* w kierunku cech hydrofobowych (rys. 1a). Hydrofobowość komórek wzrastała wraz ze wzrostem stężenia tego fungicydu i przy stężeniu 40 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ środka grzybobójczego wyniosła 60%. Badany preparat podobnie modyfikował powierzchnię szczepu *Raoultella planticola* w kierunku bardziej hydrofobowego charakteru wraz ze wzrostem stężenia fungicydu, przy czym powyżej stężenia 8 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ hydrofobowość powierzchni komórek utrzymywała się na stałym poziomie (ok. 40%) niezależnie od stężenia preparatu.

Preparat Gwarant 500 SC również modyfikował powierzchnię komórek szczepu *Rahnella aquatilis* w kierunku cech hydrofobowych (odpowiadające hydrofobowości powyżej 40%) (rys. 1b), jednak przy niższych stężeniach fungicydu komórki stawały się bardziej hydrofilowe. Modyfikacja w kierunku hydrofobowego charakteru powierzchni komórek była obserwowana przy stężeniach Gwarantu 500 SC powyżej 16 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. W próbie kontrolnej szczep *Raoultella planticola* wykazywał właściwości hy-



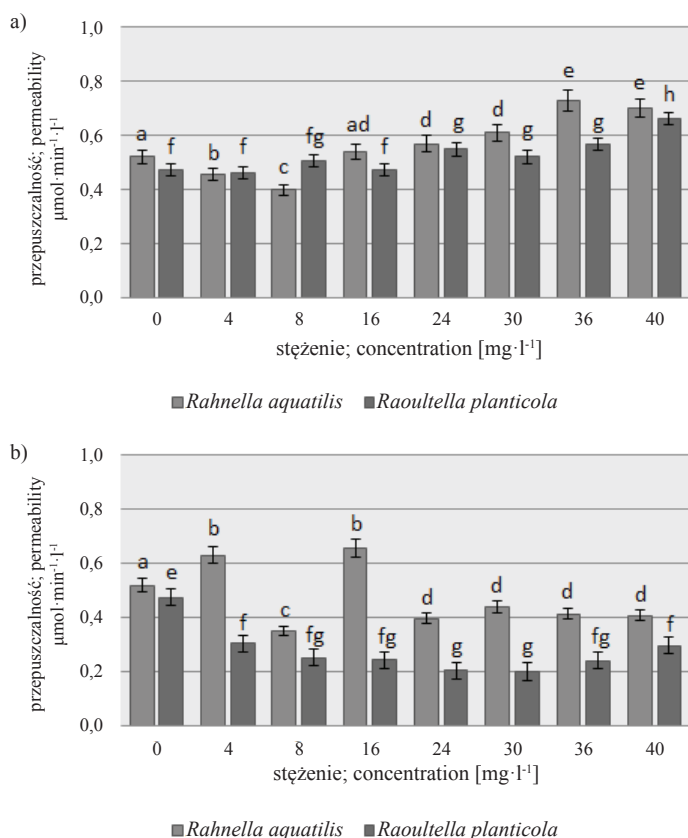
Identyczne litery na rysunku wskazują na wyniki nie różniące się statystycznie. Data marked with the same letter are not significantly different.

Rysunek 1. Zmiany hydrofobowości powierzchni komórek szczepów *Rahnella aquatilis* i *Raoultella planticola* w zależności od stężenia preparatów grzybobójczych a) Acrobat MZ 69 WG, b) Gwarant 500 SC

Figure 1. Changes of cell surface hydrophobicity of the strains *Rahnella aquatilis* and *Raoultella planticola* depending on concentration of fungicides a) Acrobat MZ 69 WG, b) Gwarant 500 SC.

drofilowe (rozumiane jako hydrofobowość poniżej 25%). Wraz ze wzrostem stężenia fungicydu wyraźnie zwiększała się hydrofobowość komórek tego szczepu. W tym przypadku odnotowano liniowy wzrost hydrofobowości wraz ze wzrostem stężenia preparatu.

Analiza wyników uzyskanych dla szczepu *R. aquatilis* wykazała, że charakteryzują się one rozkładem normalnym. Średnia wyników badanego przedziału wynosiła 51,8% w przypadku wyników uzyskanych dla preparatu Acrobat MZ 69 WG (odchylenie standardowe 4,5%) oraz 35% dla wyników uzyskanych dla preparatu Gwarant 500 SC (odchylenie standardowe 7,2%). W przypadku tego szczepu bakteryjnego występują istotne statystycznie różnice w mierzonych wartościach hydrofobowości komórek w zależności od zastosowanego fungicydu i w zależności od stężenia preparatu.



Identyczne litery na rysunku wskazują na wyniki nie różniące się statystycznie
Data marked with the same letter are not significantly different

Rysunek 2. Zmiany przepuszczalności wewnętrznej błony komórkowej szczepów *Raahnella aquatilis* i *Raoultella planticola* w zależności od stężenia preparatów grzybobójczych a) Acrobat MZ 69 WG, b) Gwarant 500 SC.

Figure 2. Changes of cell membrane permeability of the strains of *Raahnella aquatilis* and *Raoultella planticola* depending on concentration of fungicides a) Acrobat MZ 69 WG, b) Gwarant 500 SC.

W przypadku szczepu *R. planticola* wartości hydrofobowości komórek również wykazywały rozkład normalny, średnia badanego przedziału wynosiła odpowiednio dla preparatu Acrobat MZ 69 WG 35,0% (odchylenie standardowe 7,2%), a dla preparatu Gwarant 500 SC 32,3% (odchylenie standardowe 7,4%). Przeprowadzona wielokrotna analiza parami (Holm-Sidak) wykazała występowanie istotnych statystycznie różnic w zależności od rodzaju oraz stężenia zastosowanego fungicydu.

Przepuszczalność błony komórkowej

Przepuszczalność błony szczepu *Raahnella aquatilis* została zmodyfikowana przez preparat Acrobat MZ 69 WG (rys. 2a). Wraz ze wzrostem stężenia fungicydu wyraźnie zwiększała się przepuszczalność błony komórek bakteryjnych przy stężeniach powyżej 8 mg·l⁻¹. Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku szczepu *Raoultella planticola*.

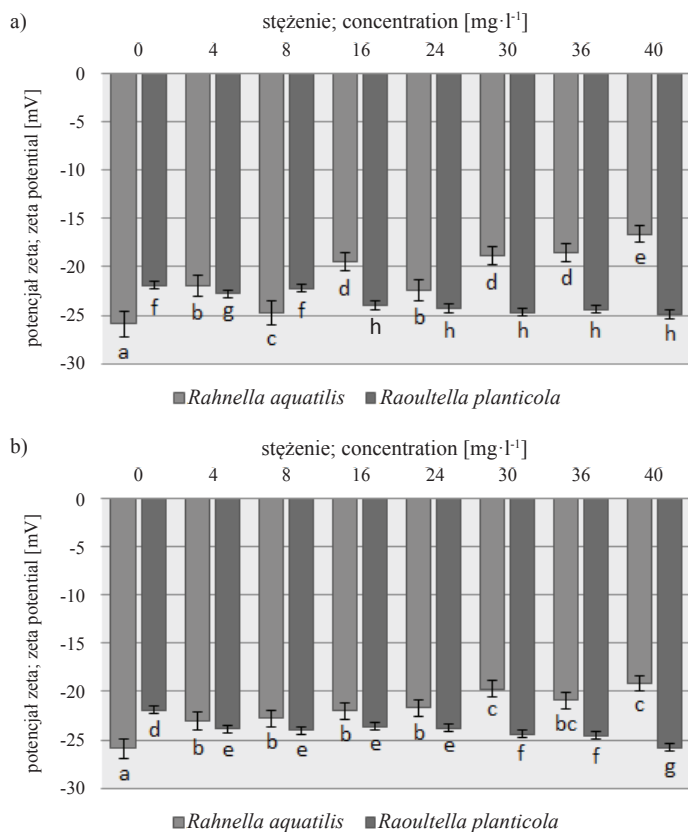
Wraz ze wzrostem stężenia preparatu Gwarant 500 SC malała przepuszczalność wewnętrznej błony komórkowej szczepu *Raoultella planticola* i najniższą wartość (0,2 µmol·min⁻¹·l⁻¹) zaobserwowano przy stężeniu 30 mg·l⁻¹ (rys. 2b). Następnie wraz ze wzrostem stężenia przepuszczalność błony nieznacznie wzrosła. W przypadku szczepu *Raahnella aquatilis* badany fungicyd początkowo zwiększył przepuszczalność (do 0,62 µmol·min⁻¹·l⁻¹) przy 4 mg·l⁻¹, jednak wraz ze wzrostem stężenia fungicydu przepuszczalność uległa obniżeniu i utrzymywała się na poziomie około 0,4 µmol·min⁻¹·l⁻¹. Jedynie przy stężeniu Gwarantu 500 SC równym 16 mg·l⁻¹ zanotowano skokowy wzrost przepuszczalności do 0,65 µmol·min⁻¹·l⁻¹.

W przypadku analiz przepuszczalności błony komórkowej uzyskane wyniki badań nie wykazywały rozkładu normalnego, a mediany wynosiły dla szczepu *R. aquatilis* 0,55 µmol·min⁻¹·l⁻¹ (Acrobat MZ 69 WG) i 0,43 µmol·min⁻¹·l⁻¹ (Gwarant 500 SC). Dla szczepu *R. planticola* mediany uzyskanych wyników były równe 0,51 µmol·min⁻¹·l⁻¹ (Acrobat MZ 69 WG) i 0,25 µmol·min⁻¹·l⁻¹ (Gwarant 500 SC). Analiza statystyczna wyników wskazuje, że zarówno rodzaj, jak i stężenie fungicydu mają istotne znaczenie w odniesieniu do zmian przepuszczalności błony komórek. Jest to obserwowane w przypadku komórek obu szczepów, co potwierdziło porównanie wyników metodą wielokrotnej analizy parami z poziomem istotności 0,05. Analogiczna analiza wyników przepuszczalności błony komórkowej wskazała na istnienie poszczególnych grup wyników różniących się statystycznie.

Potencjał zeta na powierzchni komórek

Analiza wyników pomiarów potencjału zeta szczepu *Raahnella aquatilis* w obecności preparatów Acrobat MZ 69 WG oraz Gwarant 500 SC wykazała, że potencjał zeta zależy od stężenia fungicydu (rys. 3). W miarę wzrostu stężenia analizowanych fungicydów wartość potencjału zeta wzrasta, a więc stabilność układu obniża się, ponieważ im bliższe zera wartości osiąga potencjał zeta, tym mniej trwała i szybciej sedymentująca jest zawiesina. Wyniki badań wykazują znaczący wpływ preparatów Acrobat MZ 69 WG oraz Gwarant 500 SC na obniżenie potencjału zeta komórek *Raoultella planticola* (rys. 3).

Wyniki pomiarów potencjału zeta uzyskane dla obu analizowanych szczepów wykazują rozkład normalny. Mediana dla szczepu *R. aquatilis* na podłożu zawierającym Acrobat MZ 69 WG wynosiła -20,7 mV, a na podłożu zawierającym Gwarant 500 SC -21,9 mV. Natomiast w przypadku szczepu *R. planticola* mediana wynosiła odpowiednio -24,2 mV (Acrobat MZ 69 WG) i -24,0 mV (Gwarant 500 SC).



Identyczne litery na rysunku wskazują na wyniki nie różniące się statystycznie; Data marked with the same letter are not significantly different

Rysunek 3. Zmiany potencjału zeta komórek szczepów *Rahnella aquatilis* i *Raoultella planticola* w zależności od stężenia preparatów grzybobójczych a) Acrobat MZ 69 WG, b) Gwarant 500 SC

Figure 3. Changes of zeta potential of the cells of strains of *Rahnella aquatilis* and *Raoultella planticola* depending on the concentration of fungicides a) Acrobat MZ 69 WG, b) Gwarant 500 SC.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania pokazują, że zarówno preparat Acrobat MZ 69, jak i Gwarant 500 SC wpływają na właściwości powierzchniowe wybranych szczepów bakteryjnych. Analizując wpływ testowanych fungicydów stwierdzono, że potencjał zeta, przepuszczalność błony i hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych są zależne od rodzaju oraz ilości preparatu grzybobójczego.

Oba środki grzybobójcze stosowane w badaniach modyfikują powierzchnię komórek bakteryjnych testowanych szczepów w kierunku cech hydrofobowych, co umożliwia komórkom pobieranie związków o charakterze hydrofobowym ze środowiska (Sałek i in., 2013). Spośród testowanych układów z dodatkiem fungicydów największą hydrofobowość w przypadku szczepu *Rahnella aquatilis* uzyskano podczas hodowli z dodatkiem preparatu Acrobat MZ 69 WG w ilości 40 mg·l⁻¹ hodowli (60%). Z kolei najmniejsze zmiany w hydrofobowo-

ści powierzchni komórek bakteryjnych zauważono podczas hodowli z Gwarantem 500 SC w ilości 8 mg·l⁻¹ hodowli (38%). W przypadku szczepu *Raoultella planticola* również największe modyfikacje powierzchni błony w kierunku cech hydrofobowych zanotowano dla hodowli z dodatkiem Acrobatu MZ 69 WG (41%). Uzyskanie najbardziej hydrofobowych właściwości powierzchni komórek bakterii w przypadku hodowli z dodatkiem Acrobatu MZ 69 WG może wiązać się z występowaniem w tym preparacie dwóch aktywnych substancji czynnych. W miarę wzrostu stężenia badanych preparatów wartość potencjału zeta obniżała się, w związku z tym układ był trwalszy, a komórki bakteryjne posiadały mniejszą skłonność do sedimentacji oraz asocjacji. W następstwie możliwa była intensywniejsza wymiana substancji pokarmowych i biodegradowalnych związków pomiędzy biomasą bakteryjną a roztworem hodowlanym.

Wzrost koncentracji obu środków grzybobójczych w przypadku szczepu *Rahnella aquatilis* powodował wzrost wartości potencjału zeta, co decyduje o większej skłonności komórek bakteryjnych do sedimentacji i asocjacji. Odwrotną sytuację zaobserwowano dla szczepu *Raoultella planticola*, gdzie dodatek preparatów grzybobójczych w tych samych stężeniach powodował spadek wartości potencjału zeta. Wprowadzenie fungicydów w przypadku tego szczepu powodowało wzrost trwałości układu, a co za tym idzie wymiana składników pokarmowych i innych związków między roztworem hodowlanym a biomasą była łatwiejsza i szybsza.

Wzrost przepuszczalności błony bakteryjnej w obecności preparatu Acrobat MZ 69 WG może być związany z zaburzeniem syntezy związków budujących błonę komórkową, analogicznie jak to jest obserwowane w przypadku oddziaływania fungicydów na komórki grzybów (Okorski i in., 2015). Natomiast obniżenie przepuszczalności błony w hodowlach z Gwarantem 500 SC, może wskazywać na mechanizm obronny komórki, mający na celu ograniczenie wnikania substancji czynnej do wnętrza komórki (Delcour, 2009).

Wpływ związków o działaniu grzybobójczym na bakterie glebowe był dotąd w literaturze przedmiotu analizowany głównie w zakresie zmian w populacji mikroorganizmów. W badaniach tych nie rozpatrywano zmian na poziomie właściwości powierzchniowych komórek. Jastrzębska (2010) badała, jak środek grzybobójczy Unix 75 oraz insektycydy Namolt 150 SC i Dursban 480 EC oddziałują na ilość mikroorganizmów glebowych. Powyższe pestycydy zaburzały równowagę mikrobiologiczną gleby, a co za tym idzie część populacji drobnoustrojów znacznie wzrastała, z kolei liczebność innych grup wyraźnie się zmniejszała. Jednak nie wszystkie środki ochrony

roślin wykazują tylko negatywne działanie na mikroorganizmy. Liczne badania i przykłady literaturowe pokazują, że pestycydy mogą mieć też pozytywne oddziaływanie na rozwój drobnoustrojów glebowych. W badaniach Kaszubiaka i Durskiej (2000) fungicyd Oxafun T przyczynił się do wzrostu liczebności wybranej grupy mikroorganizmów. Innym przykładem są wyniki Sebiomo i in. (2011), którzy badali przez okres 6 tygodni wpływ herbicydów na mikroorganizmy glebowe. Początkowo zanotowali znaczny spadek liczebności grzybów, bakterii, a także promieniowców w glebie, ale z upływem czasu od zastosowania herbicydu (po 2–6 tygodniach) populacja badanych mikroorganizmów glebowych znacznie wzrosła w porównaniu z glebą kontrolną. Autorzy badań ten wzrost tłumaczą wykorzystaniem stosowanych środków ochrony roślin przez mikroorganizmy glebowe jako źródło węgla.

Bakterie Gram-ujemne są otoczone przez dodatkową warstwę – membranę zewnętrzną. Głównym jej zadaniem jest zapobieganie przedostawaniu się do komórki substancji szkodliwych, a jednocześnie umożliwienie napływu cząsteczek składników odżywczych. Acrobat MZ 69 WG wyraźnie zwiększał przepuszczalność błony obu szczepów wraz ze wzrostem stężenia. Do podobnych wniosków doszli Guven i in. (2005) w swoich badaniach nad wpływem pestycydów organicznych na wewnętrzną przepuszczalność błony w szczepie bakterii *Escherichia coli* ML 35. Wykazali, że mankozeb (jedna z substancji czynnych w Acrobatie MZ 69 WG) wpływa na błonę cytoplazmatyczną bakterii zwiększając jej przepuszczalność o około 30%. Z kolei przepuszczalność błony obu szczepów w prezentowanych badaniach pod wpływem Gwarantu 500 SC w stężeniu przekraczającym $16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ zmniejszyła się w stosunku do wykazanej w obiekcie kontrolnym.

Otrzymane wyniki hydrofobowości komórek bakteryjnych pokazały, że w obecności badanych środków grzybobójczych możliwe są zmiany właściwości powierzchniowych komórek użytych w badaniach szczepów bakterii glebowych. W przypadku badanych szczepów testowane związki modyfikowały powierzchnię komórek w kierunku cech hydrofobowych.

Substancje stosowane w badanych fungicydach prowadzą do modyfikacji powierzchni komórek bakteryjnych oraz zmieniają właściwości błony komórkowej bakterii. Oznacza to, że wpływają na wzrost komórek bakteryjnych, a przez to mogą zaburzać równowagę mikrobiologiczną gleby. Dlatego ważne jest, aby obok zabiegów chemicznych, mających na celu niszczenie patogenów, dbać o właściwe nawożenie mineralne i zmianowanie upraw sprzyjające utrzymaniu odpowiedniego stanu mikroflory (Martyniuk, 2014).

WNIOSKI

1. Ze wzrostem stężenia preparatów Acrobat MZ 69 WG i Gwarant 500 SC następowała modyfikacja po-

wierzchni komórek szczepów *Rahnella aquatilis* i *Raoultella planticola* w kierunku cech bardziej hydrofobowych.

2. W przypadku obu badanych szczepów glebowych Acrobat MZ 69 WG powodował zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej, natomiast Gwarant 500 SC – jej obniżenie

3. Zarówno rodzaj, jak i stężenie fungicydu mają istotne znaczenie w odniesieniu do zmian potencjału zeta komórek badanych bakterii. Wzrost koncentracji obu środków grzybobójczych w przypadku szczepu *Rahnella aquatilis* powodował wzrost wartości potencjału zeta, a obniżenie tego parametru dla szczepu *Raoultella planticola*.

4. Uzyskane wyniki wskazują na możliwości modyfikowania powierzchni komórek bakterii glebowych przez komercyjne fungicydy. Tym samym zjawisko to powinno być uwzględniane w ocenie oddziaływania preparatów grzybobójczych na środowisko.

PIŚMIENNICTWO

- Cycoń M., Piotrowska-Seget Z., Kozdrój J., 2010. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64: 316-323.
- Delcour A. H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5): 808-816.
- Dobslaw D., Engesser K.H., 2012. Degradation of 2-chlorotoluene by *Rhodococcus* sp. OCT 10. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5): 2205-2214.
- Fay D.S., Gerow K., 2013. A biologist's guide to statistical thinking and analysis. ss. 1-54. W: The online review of *C. elegans* biology; Hobert O., WormBook, Pasadena (CA).
- Guven K., Yolcu M., Gul-Guven R., Erdogan S., Pomerai D., 2005. The effects of organic pesticides on inner membrane permeability in *Escherichia coli* ML35. *Cell Biology and Toxicology*, 2(21): 73-81.
- Jastrzębska E., 2010. Wpływ fungicydu Unix 75 WG i insektycydów: Nomolt 150 SC i Dursban 480 EC na liczebność mikroorganizmów glebowych i właściwości fizyko-chemiczne gleby. *Nauka Przyroda Technologie*, 6(4): 80.
- Kaszubiak H., Durska G., 2000. Effect of Oxafun T seed dressing on bacteria in rhizosphere and non-rhizosphere soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 5(9): 397-401.
- Krzych L.J., 2007. Interpretacja wyników analizy statystycznej danych. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*, 4(3): 315-321.
- Liang B., Li R., Jiang D., Sun J., Qiu J., Zhao Y., Li S., Jiang J., 2010. Hydrolytic dechlorination of chlorothalonil by *Ochrobactrum* sp. CTN-11 isolated from a chlorothalonil-contaminated soil. *Current Microbiology*, 61: 226-233.
- Martyniuk S., 2014. Czy rolnictwo konwencjonalne (intensywne) szkodzi mikroorganizmom glebowym? *Polish Journal of Agronomy*, 17: 25-29.
- McMahon T., Halstead N., Johnson S., Raffel T.R., Romansic J.M., Crumrine P.W., Boughton R.K., Martin L.B., Rohr J.R., 2011. The fungicide Chlorothalonil is nonlinearly associated with corticosterone levels, immunity and mortality in amphibians. *Environmental Health Perspectives*, 119: 1098-1103.

- Okorski A., Pszczółkowska A., Oszako T., Nowakowska J.A., 2015.** Aktualne możliwości i perspektywy wykorzystania fungicydów w leśnictwie. *Leśne Prace Badawcze*, 76(2): 191-206.
- Rosenberg M., Barki M., Bar-Ness R., Goldberg S., Doyle R.J., 1991.** Microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). *Biofouling*, 4(1-3): 121-128.
- Sebiomo A., Ogundero V.W., Bankole S.A., 2011.** Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. *African Journal of Biotechnology*, 5(10): 770-778.
- Salek K., Zgola-Grześkowiak A., Kaczorek E., 2013.** Modification of surface and enzymatic properties of *Achromobacter denitrificans* and *Stenotrophomonas maltophilia* in association with diesel oil biodegradation enhanced with alkyl polyglucosides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1(111): 36-42.
- Shrestha S., Grilley M., Fosso M.Y., Chang C.-W.T., Takemoto J.Y., 2013.** Membrane lipid-modulated mechanism of action and non-cytotoxicity of novel fungicide aminoglycoside FG08. *PLoS One*, 8(9): e73843.
- Urban S., 2014.** Zmiany w zużyciu środków ochrony roślin w Polsce i ich aspekty ekonomiczne. *Stowarzyszenie Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, Roczniki Naukowe*, 16(6): 505-509.
- Zhang M.-Y., Teng Y., Zhu Y., Wang J., Luo Y.-M., Christie P., Li Z.-G., Udeigwe T. K., 2014.** Isolation and characterization of chlorothalonil-degrading bacterial strain H4 and its potential for remediation of contaminated soil. *Pedosphere*, 24(6): 799-807.
- Zhang D., Zhu L., Li F., 2013.** Influences and mechanisms of surfactants on pyrene biodegradation based on interactions of surfactant with a *Klebsiella oxytoca* strain. *Bioresource Technology*, 142: 454-461.

W. Smulek, J. Piotrowiak, A. Zdarta, E. Kaczorek

MODIFICATION OF SOIL BACTERIA CELL SURFACE PROPERTIES IN THE PRESENCE OF SELECTED FUNGICIDES

Summary

The intensification of agriculture has increased the use of fungicides in plant production. Plant protection products can change the local environmental conditions in the soil, as they get leached from the surface of plants. Among the many studies conducted over the fungicides, their impact on soil microflora should be analysed. In this study the effect of two fungicides: Acrobat MZ 69 WG (active substances: dimethomorph 90 g kg⁻¹, mancozeb 600 g kg⁻¹) and Gwarant 500 SC (active substance: chlorothalonil 500 g kg⁻¹) on the modification of surface properties of soil microorganisms *Rahnella aquatilis* and *Raoultella planticola* were tested. The results showed that both Acrobat MZ 69 WG and Gwarant 500 SC modified the surface of cells of *R. aquatilis* and *R. planticola* towards more hydrophobic properties. Furthermore, the addition of Acrobat MZ 69 WG increased the cell inner membrane permeability of the selected strains of soil, which is not observed in the case of the Gwarant 500 SC. The concentration increase of the two fungicides reduced the zeta potential of the strain of *R. planticola* down to a minimum value of -26.2 mV (in the presence Gwarant 500 SC) and the increase – strain of *R. aquatilis* (up to 16.9 mV in the presence Acrobat MZ 69 WG). The results show a significant modifications of the cell surface of soil bacteria under the influence of tested fungicides. The direction and intensity of the changes depended on the type and dose of the fungicide. Simultaneously, statistical analysis did not indicate direct correlation between changes of the fungicides concentration and all analysed cell surface properties. The study illustrates the surface modification of bacterial cells in the presence of the fungicides.

Key words: bacteria, cell membrane permeability, fungicides, hydrophobicity, zeta potential

Praca została przygotowana i sfinansowana w ramach projektu badawczego Politechniki Poznańskiej nr 03/32/DSPB/0500