

EFFECT OF SOME ORGANOPHOSPHOROUS INSECTICIDES ON SOIL MICROORGANISMS

THE EFFECT OF SOME ORGANOPHOSPHOROUS INSECTICIDES ON SOIL MICROORGANISMS

DIACONU MARIANA¹, DIACONU ALECU²

¹Universitatea Tehnică „Gh. Asachi” Iași, ²Institutul de Cercetări Biologice Iași

Abstract. *The paper deals with the response of the soil microorganism populations after the application of three organophosphoric insecticides. The researches were carried out “ex situ” and the soil samples from a corn crop were analyzed. There has been investigated the effect of insecticides on the total aerobic and anaerobic micro-flora, proteolytic bacterium, actinomycetes, cellulolytic microorganisms and yeast. The effect of insecticides depends on the groups of microorganisms studied and the incubation period of soil and insecticide mixture.*

Solul este un ecosistem foarte complex și dinamic, fertilitatea lui depinzând adesea de echilibrul dintre activitatea diferitelor grupe de microorganisme. Folosirea pesticidelor pe scară largă în agricultură ridică serioase și adesea controversate probleme, legate de poluarea solului ambiant și de schimbarea echilibrului biologic. În afara faptului că pesticidele acționează ca ”factor de stres”, de modificare a echilibrului microbiologic al solului, principala atenție a fost acordată până în prezent rolului microflorei în detoxifierea solului tratat cu pesticide. S-au întreprins numeroase studii privind efectele pesticidelor asupra activității metabolice generale a microorganismelor în sol evaluate de obicei prin tehnicile de numărare pe plăci, folosindu-se medii de cultură cu grade diferite de selectivitate.

În această lucrare am studiat răspunsul populațiilor microbiene din sol după aplicarea unor insecticide organofosforice. Cercetările au fost efectuate în condiții de laborator, urmărindu-se efectul insecticidelor aplicate timp de 20 zile.

MATERIAL ȘI METODĂ

Prelevarea probelor de sol. Probele de sol au fost prelevate dintr-un câmp experimental aparținând SCDA Podu Iloaiei, cultivat cu porumb.

Recoltarea probelor s-a executat cu o sondă specială, eșantioanele fiind apoi introduse în pungi de material plastic și etichetate.

S-au efectuat 10 recoltări parțiale, după îndepărtarea păturii superficiale a solului pe o adâncime de 3 – 5 cm și s-a recoltat pentru fiecare prelevare circa 100 g sol din zona subiacentă de la adâncimea de 0 – 10 cm. Probele au fost transportate la laborator în cel mai scurt timp. Acestea au fost trecute prin site metalice cu ochiurile de 5 mm și 2 mm, iar produsul obținut a fost cules pe coli de hârtie sulfurată. Fiecare probă de sol a fost tratată cu unul din următoarele insecticide organofosforice:

- Carbetox 37 CE – malation 37% (O-Dimetil-S-(1,2-dicarbetoxi)- etil ditiofosfat - $C_{10}H_{19}O_6PS_2$) – în doză de 0,5%
- Sinoratox 35 CE – dimetoat 35% (O,O-Dimetil-S-(N-metilcarbamoil)-metil-ditiofosfat. - $C_5H_{12}O_3NPS_2$) – în doză de 0,3%

- Onefon 90 – triclorfon 90% (Dimetilfosfonat de 2,2,2-tricloro-1-hidroxietyl - $C_4H_8Cl_3O_4P$) – în doză de 0,5%.

Pentru evidențierea efectului insecticidelor asupra microorganismelor din sol, în paralel cu probele s-au utilizat și martori (sol fără adaos de insecticide). Atât probele de cercetat cât și martorii au fost incubati la 28°C, timp de 20 zile în condiții controlate de aerare și agitare.

Microflora totală aerobă și anaerobă s-a determinat pe medii specifice agarizate, domeniul de diluții însămânțate fiind cuprins între 10^{-1} – 10^{-8} . Fiecare diluție s-a însămânțat în trei plăci Petri.

Numărul de actinomicete a fost determinat utilizând medii de cultură specifice cu adăugare de rifampicină și ciclohexamidă (50 mg/l), iar levurile s-au determinat prin însămânțarea suspensiilor diluții de sol pe mediu cu extract de malț agarizat.

Microflora proteolitică reprezentată în special de bacterii heterotrofe care hidrolizează în aerobioză și anaerobioză macromoleculele proteice până la peptide și acizi aminici, se apreciază prin însămânțarea cu suspensii diluții de sol (10^{-1} – 10^{-12}) a unui mediu salin la care s-a adăugat gelatină ca substrat al bacteriilor proteolitice.

Proteoliza se evidențiază prin lichefierea gelatinei în funcție de timp și diluții.

Pentru evidențierea activității celulozolitice s-a utilizat un mediu de cultură lichid la care unica sursă de carbon a fost reprezentată de fășii de hârtie de filtru Wathman. Rezultatele determinărilor cantitative s-au exprimat în numărul de microorganisme/ g sol uscat, după tabelele lui Mc Crady. În cazul acestor interpretări precizia este cu atât mai mare cu cât numărul repetițiilor este crescut. Noi am utilizat 3 și 5 tuburi pentru fiecare diluție.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Utilizarea pesticidelor organofosforice a creat numeroase probleme, contribuind la poluarea mediului. Prin testele efectuate la nivel de laborator am dorit să evidențiem efectul unor pesticide asupra microorganismelor din sol, și dacă aceste produse xenobiotice pot constitui substraturi de dezvoltare a microorganismelor, efectul indirect fiind biodegradarea acestora. Din probele de sol experimentale au fost prelevate eșantioane de 20 g (suspendate în 180 ml ser fiziologic steril) la interval de cinci zile. După efectuarea suspensiilor diluții de sol, s-au analizat microbiologic următorii parametri: bacteriile proteolitice, celulozolitice aerobe, microbiota totală, bacteriile anaerobe, actinomicetele și levurile. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 1 – 3, comparativ cu martorul. Analizând rezultatele obținute prin adăugarea malationului în sol, constatăm o creștere numerică a microflorei totale pe parcursul experimentului, indicând faptul că microorganismele sunt capabile să metabolizeze acest insecticid. În contrast, numărul total de microorganisme din martor a scăzut de-a lungul perioadei de incubare. De asemenea, numărul de bacterii celulozolitice și actinomicete a crescut cu un ordin de mărime la finalul perioadei de incubare a solului cu insecticidul malation.

În literatura de specialitate există studii ce arată capacitatea microorganismelor din sol de a utiliza unele insecticide (izofenfos, fonofos) ca sursă de carbon și energie. Creșterea numerică a microorganismelor implicate în circuitul carbonului, în probele cu malation demonstrează capacitatea acestora de a metaboliza acest insecticid.

Efectul dimetoatului asupra microflorei totale din sol precum și a altor grupe de microorganisme este prezentat în tabelul 2.

Tabelul 1

**Efectul malationului asupra numărului de microorganisme din sol
(nr. microorganisme/g sol uscat)**

Zile de incubare	Probă sol	Bacterii proteolitice	Bacterii celulozolice	Microbiota totală	Bacterii anaerobe	Levuri	Actino micete
0	Martor	$3,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
	Malation	$3,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
5	Martor	$3,6 \times 10^4$	$7,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
	Malation	$5,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^5$
10	Martor	$3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$
	Malation	$4,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^8$	$6,2 \times 10^2$	$3,6 \times 10^5$	$9,4 \times 10^5$
15	Martor	$2,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^2$	$9,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
	Malation	$3,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$	$3,6 \times 10^5$	$6,6 \times 10^5$
20	Martor	$2,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$
	Malation	$7,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5$

Tabelul 2

**Efectul dimetoatului asupra numărului de microorganisme din sol
(nr. microorganisme/g sol uscat)**

Zile de incubare	Probă sol	Bacterii proteolitice	Bacterii celulozolice	Microbiota totală	Bacterii anaerobe	Levuri	Actino micete
0	Martor	$3,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
	Dimetoat	$3,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
5	Martor	$3,6 \times 10^4$	$7,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
	Dimetoat	$3,0 \times 10^4$	$6,7 \times 10^5$	$6,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$
10	Martor	$3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$
	Dimetoat	$3,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^5$	$7,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$
15	Martor	$2,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^2$	$9,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
	Dimetoat	$2,8 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$	$4,4 \times 10^2$	$4,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
20	Martor	$2,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$
	Dimetoat	$3,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^3$	$3,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$

Tabelul 3

**Efectul triclorfonului asupra numărului de microorganisme din sol
(nr. microorganisme/g sol uscat)**

Zile de incubare	Probă sol	Bacterii proteolitice	Bacterii celulozolice	Microbiota totală	Bacterii anaerobe	Levuri	Actino micete
0	Martor	$3,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
	Triclorfon	$3,2 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$	$9,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$
5	Martor	$3,6 \times 10^4$	$7,2 \times 10^5$	$4,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^2$	$2,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
	Triclorfon	$4,2 \times 10^3$	$4,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^2$	$6,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$
10	Martor	$3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4$
	Triclorfon	$3,8 \times 10^3$	$6,0 \times 10^4$	$6,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$
15	Martor	$2,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$2,4 \times 10^2$	$9,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
	Triclorfon	$6,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^3$	$4,6 \times 10^5$	$4,8 \times 10^1$	$7,4 \times 10^3$	$7,5 \times 10^2$
20	Martor	$2,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^6$	$3,0 \times 10^2$	$4,2 \times 10^4$	$3,8 \times 10^3$
	Triclorfon	$3,6 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^1$	$3,5 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$

Așa cum reiese din datele obținute, adăugarea dimetoatului în doză de 0,3%, a avut un ușor efect asupra numărului de microorganisme din sol. Majoritatea grupelor de microorganisme studiate au crescut numeric, comparativ cu martorul. Bacteriile proteolitice s-au menținut la același ordin de mărime pe perioada derulării experimentului, în timp ce

bacteriile celulozolice, bacteriile anaerobe și actinomicetele au crescut cu un ordin de mărime la finalul perioadei de incubare, comparativ cu t_0 . Rezultatele obținute prin incubarea solului cu dimetoat, demonstrează că microorganismele pot biodegrada acest insecticid, utilizându-l ca sursă de carbon și energie (creșterea numerică a celulozolicilor).

În experimentul realizat, triclofonul a avut o acțiune ușor inhibantă asupra creșterii și dezvoltării microorganismelor (tab. 3). Microflora totală a scăzut cu un ordin de mărime pe perioada de incubare a probei sol – triclofon, ceea ce sugerează că anumite grupe de microorganisme sunt afectate de prezența acestui pesticid în mediu. După 20 zile de incubare a solului cu triclofon, numărul de bacterii proteolitice, celulozolice și actinomicete s-a redus cu două ordine de mărime.

CONCLUZII

Utilizarea pe scară largă a pesticidelor organofosforice a creat numeroase probleme, unele având efecte negative asupra microorganismelor din sol. Experimentele efectuate pe probe de sol cu adaos de insecticide organofosforice, având ca scop evidențierea răspunsului populațiilor de microorganisme prezente în sol la acțiunea acestor pesticide, au condus la următoarele concluzii:

1. Tratarea probelor de sol cu malation a dus la creșterea microbiotei totale pe perioada de incubare, comparativ cu martorul. Sub acțiunea malationului numărul de bacterii celulozolice și actinomicete a crescut cu un ordin de mărime la finalul perioadei de incubare a solului cu insecticid

2. Dimetoatul are o acțiune ușor stimulantă asupra numărului de microorganisme. Sub acțiunea dimetoatului bacteriile anaerobe și actinomicetele au crescut cu un ordin de mărime la finalul perioadei de incubare, comparativ cu t_0 .

3. Triclofonul are acțiune ușor inhibantă asupra creșterii și dezvoltării microorganismelor, microflora totală a scăzut cu un ordin de mărime, iar numărul de bacterii proteolitice, celulozolice și actinomicete s-a redus cu două ordine de mărime.

4. Ca o concluzie generală putem spune că insecticidele organofosforice utilizate în experiment nu prezintă efecte inhibitorii asupra grupelor de microorganisme studiate.

BIBLIOGRAFIE

1. Drak M., Ozelik S., 1995 - *Degradation of ethion and methadion by some microorganisms*. 35th IUPAC Congress, Istanbul, p 84.
2. Drak M., Kirbag S., 1996 – *Bazi pestistlerin toprak mikroorganizmalan uzerine etkisi*, Tr. J. Agric. Forestry, 20, 165 – 173.
3. Gauger W.K., MacDonald J.M., Adrian N.R., 1986 – *Characterization of a Streptomyces growing on organophosphate and carbamate insecticides*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15, 137 – 140
4. Racke K.D., Coats J.R., 1988 – *Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: Specificity of enhanced microbial degradation*. J. Agric. Food Chem., 36, 193 – 199.
5. Sharmila M., Ramanand K., Sethunathan N., 1989 - *Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures*. Can. J. Microbiol., 35, 1105 – 1110
6. Wootton M.A., Kremer R.J., 1993 – *Effects of carburefuran and the corn rhizosphere on growth of soil microorganisms*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 50, 49 – 56.