

María del Pilar Castillo
Sveriges lantbruksuniversitet
Institutionen för mikrobiologi
Box 7025
750 07 Uppsala

Slutrapport

MINSKAD BEKÄMPNINGSMEDELSUTLAKNING FRÅN BIOBÄDDAR – EFFEKT AV HALMLÄNGD STUDERAD I LAB OCH FÄLT

1. MÅL

Att studera effekten av halmlängd på bekämpningsmedelsnedbrytning i labbiomixar och beredning av biomixar på gårdsnivå.

Hypoteser

- Halmlängden påverkar biomixens förmåga att samla upp och bryta ned bekämpningsmedelsrester.
- Mer halm i biomixen ger en ökad mikrobiell aktivitet för bindning och nedbrytning av bekämpningsmedelsrester.
- Halmlängden påverkar biomixens homogenitet.
- Halmlängden påverkar volymvikten och kan därför ändra lämplig mängd halm i biomixen.
- Mesta möjliga halmmängd är önskvärd i biomixen.

2. INTRODUKTION

2.1 Biobäddar eliminerar punktkällor

Risken för förorening av grundvatten är stor vid påfyllning av sprutan. Biobädden är en effektiv och billig lösning för att undvika vattenförorening från punktkällor av pesticider eftersom de binds och bryts ned. Biobädden består av en 60 cm djup grop med ett lerlager i botten för att minska risken för utlakning. Bädden fylls med en blandning av halm, torv och jord med en volymprocent av respektive 50-25-25%. Halmen stimulerar tillväxt av vitrötesvampar som bryter ner många olika kemikalier, torven håller fukten och jord tillför ytterligare nedbrytande mikroorganismer. Överst finns gräs som reglerar fukten och som visar skador när kemikalierna spills.

Vitrötesvampar och deras ligninnedbrytande enzymer är kända för att bryta ned en lång rad olika kemiska bekämpningsmedel (Castillo, et al., 1997, Castillo, et al., 2000, Castillo, et al., 2001).

Våra labstudier har visat en stark korrelation mellan halminnehåll, basrespiration och fenoloxidasaktivitet (ligninbrytande enzymer) (Castillo, et al., 2007). Fältbiobäddar visar samma tendens. Figur 1 visar fenoloxidasaktivitet i två fältbiobäddar med olika halminnehåll i biomixen. Högre aktivitet fanns i biobädden med högre halminnehåll.

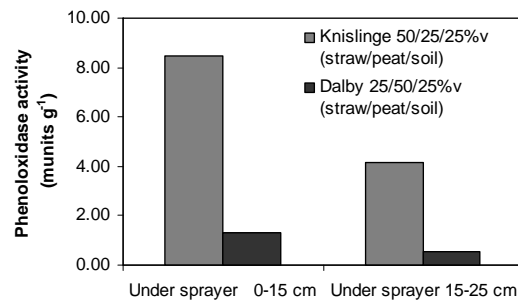


Fig. 1 Fenoloxidasaktivitet i två fältbiobäddar.

2.2 Biobäddar-- Effektivitet och halmlängd

Hög mikrobiell aktivitet för en effektiv kemikalienedbrytning eftersträvas i en biobädd. Biomixens homogenitet är en faktor som kan påverka effektiviteten. Halmlängden kan i sin tur påverka homogeniteten. Lång halmlängd, som i ohackad halm, kan a) ge heterogenitet i biomixen och bilda "fickor" med olika mikrobiell aktivitet, b) minska specifik yta i biomixen och därför minska sorptionskapaciteten och den mikrobiella aktiviteten, c) öka risken för preferentiellt flöde och utlakning av bekämpningsmedel. Dessutom ger längre halm minskad volymvikt och ger mindre mängd halm i biomixen.

Målet var att i) studera effekten av halmlängden på mikrobiell aktivitet och nedbrytning av bekämpningsmedel i lab-biomixar, och ii) hur halmhackningen påverkar volymvikten i fältbiomixar.

Biomixarna gjordes genom att använda halm i olika längder men med konstant 1) halmvikt eller 2) med konstant halmvolum.

3. MATERIAL OCH METODER

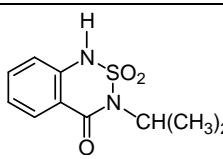
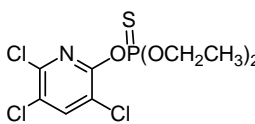
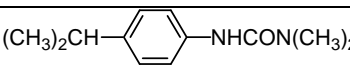
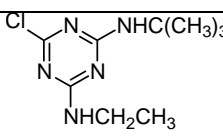
3.1 Substrat

Åkerjord från Ulleråker, Uppsala (14% lera, 1.0% organiskt material, pH 6.6); torv (*Sphagnum*) från Econova Garden AB, Sverige; vetehalm från en gård nära Uppsala (labförsök). Vete- och kornhalm från en gård i Skåne (fältförsök).

3.2 Kemikalier

Omärkt klorpyrifos (*O,O*-diethyl *O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate), isoproturon (3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea), och bentazon (3-isopropyl-1*H*-2,1,3-benzothiadiazin-4(3*H*)-one 2,2-dioxide) från Sigma Aldrich, Riedel-de Haëh, Tyskland. Omärkt terbutylazin (6-chloro-*N*-(1,1-dimethylethyl)-*N'*-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) från VWR International AB. Märkt ¹⁴C-klorpyrifos, ¹⁴C-isoproturon och ¹⁴C-bentazon från Institute of Isotopes Co.; Budapest. Märkt terbutylazin var en gåva från Syngenta. Insta-Gel Plus från Perkin Elmer, USA. Övriga kemikalier från VWR International AB.

Tabell 1 Kemikalier i studien.

Aktiv substans	Formel
Bentazon	
Klorpyrifos	
Isoproturon	
Terbutylazin	

3.3 Labstudier

a) Halmlängden och nedbrytning av bekämpningsmedel i biomixen – Konstant halmvikt

Tre halmlängder testades: 5 cm, 2 cm och < 0.2 cm. Blandningen med den längsta halmlängden förbereddes i 50/25/25 volymprocent. De andra två blandningarna bereddes genom att behålla samma vikt för alla komponenter (Tabell 2). Biomixarna lades i 3 L-plastbackar (Fig. 2).

Kemikalier. Omärkt bentazon, klorpyrifos, isoproturon och terbutylazin 50 ppm var.

Behandlingar och replikat. S1, S2 och S3 gjordes i 4 replikat. Tre replikat med pesticider och en kontroll utan pesticider (CON).

Provtagning. Inkubationstid: 93 dagar. Provtagningsstidpunkter: 0, 7, 16, 28, 50, 64, 81 och 93 dagar.

Data. Specifik nedbrytningshastighetskonstant (specific dissipation rate constants-SDRC).

Tabell 2 Vikt och volym av biobäddsmaterialen i 3 L-plastbackar.

Biomix	Behandling	Mängd					
		Halm		Jord		Torv	
		(L)	(g)	(L)	(g)	(L)	(g)
Halm 5 cm/jord/torv	S1	7	256	3.5	4149	3.5	343
Halm 2cm/jord/torv	S2	4	256	3.5	4149	3.5	343
Halm < 0.2cm/jord/torv	S3	3	256	3.5	4149	3.5	343



Fig. 2 Försöket i 3 L-plastbackar

b) Halmlängd och nedbrytning av bekämpningsmedel i biomix – Konstant halmvolymp procent

Halm hackades och siktades på lab genom en 2 och 0.5 mm nät. Biomixar med två halmlängder testades, a) biomix Sa med halm från fraktionen mellan 2-0.5 mm och b) Sb biomix med halm från fraktionen < 0.5 mm (Tabell 3). Båda biomixar förbereddes i 50/25/25 volymprocent.

Tabell 3 Vikt och volym av biobäddsmaterialen i 500 mL-glasburkar. Båda biomixar förbereddes i 50/25/25 volymprocent.

Biomix	Behandling	Mängd					
		Halm		Jord		Torv	
		(mL)	(g)	(mL)	(g)	(mL)	(g)
Biomix med halm 2- 0.5 mm	Sa	800	78	400	475	400	40
Biomix med halm < 0.5 mm	Sb	300	40	150	203	150	15

Biomixarna sattes till 500 mL-glasburkar (Fig. 3). Märkta (^{14}C) och omärkta bekämpningsmedel sattes till (Tabell 4). Basrespiration och bekämpningsmedels-mineralisering och nedbrytning mättes.



Fig. 3 System för mätning av respiration och bekämpningsmedels- mineralisering

Tabell 4 Pesticider och koncentrationer i försöket med 500-mL glasburkar.

Pesticid	Omärkt pesticid (ppm)	^{14}C -märkt pesticid (dpm)
Bentazon	50	65639
Klorpyrifos	50	71589
Isoproturon	50	351078
Terbutylazin	50	93905

Formulering. Halm/jord/torv 50/25/25 i volymprocent.

Behandlingar och replikat. Alla fyra omärkta pesticider plus en märkt pesticid sattes till varje behandling. Kontroller utan pesticider (CONa och CONb). Triplikat.

Provtagning. Inkubationstid: 30 dagar. Pesticidnedbrytning: prover från dag 0 och 30. Respiration och mineralisering: prover togs 3 gånger i veckan.

Data. Mineralisering: ackumulerad $^{14}\text{CO}_2$ som procent av total tillsatt ^{14}C . Basrespiration: ackumulerad mg CO_2 g biomix $^{-1}$.

3.4 Fältstudier

Halm (vete) hackades i en konventionell tröska. Volymvikten mättes i hackad och ohackad halm. Konstant vikt eller konstant volym användes för att bestämma effekten på volymvikten. Fält hackade halm (vete och korn) från en konventionell- och en rotortröska samlades för en visuell jämförelse. Fältförsök gjordes i samarbete med Eskil Nilsson, VISAVI.

Konstant vikt. Två 16 L-hinkar fylldes med ohackad halm. Halmen i den ena hinken hackades i en tröska (Fig. 4). Volymen mättes.

Konstant volym. Två 16 L-hinkar fylldes med hackad eller ohackad halm. Vikten mättes.



Fig. 4 Arrangemang för halmhackning i en konventionell tröska.

3.5 Analytiska metoder

Extraktion. Methanol.

HPLC. a) kolumn, Zorbax SB-C18, 150 x 4.6 mm i.d. at 40 °C; b) mobil fas, 20 mM KH₂PO₄, pH 2.5 och acetonitril, gradient 0-100% acetonitril i 17 minuter; c) flödes hastighet, 1 ml/min; d) UV 230 nm; e) injektionsvolym, 5 µL, e) retentionstider (Tabell 5).

Tabell 5 Kemikalier och retentionstider i HPLC metoden	
Kemikalie	Retentionstid (min)
Terbutyl-desetyl-2-hydroxy	5.18
Bentazon-6-hydroxy	9.67
Bentazon-8-hydroxy	9.96
Didesmetyl isoproturon	10.23
Terbutyl-desetyl	10.49
Monodesmetyl isoproturon	10.99
Bentazon	11.06
Isoproturon	11.71
TCP	11.86
Terbutylazin	13.19
Klorpyrifos	23.07

4. RESULTAT OCH DISKUSSION

4.1 Labstudier

a) Halmlängd och nedbrytning av bekämpningsmedel i biomixen – Konstant halmvikt

Volymprocenten ändrades betydligt i de tre biomixar som förbereddes med samma viktprocent men med olika halmlängder (Tabell 6). Halminnehållet i volymprocent ändrades från 50 till 35 och 31% när halmen hackades från 5 cm till 2 och <0.2 cm.

Halmlängden har effekt på pesticidnedbrytningshastighet (SDRC). Hög standardavvikelse och därför icke signifikant nedbrytning observerades i S1 behandlingen (5 cm halmlängd). Nedbrytningen var signifikant i biomixar med lägre halmlängder och inga skillnader fanns i nedbrytningshastighet mellan S2 och S3 behandlingarna (Fig. 5).

Table 6 Volym- och viktförhållanden av halm/jord/torv i behandlingarna S1, S2 och S3

Biomix	Behandling	Förhållande	Förhållande
		halm/jord/torv (volym)	halm/jord/torv (vikt)
Halm 5 cm/jord/torv	S1	50/25/25	6/87/7
Halm 2cm/jord/torv	S2	35/32.5/32.5	6/87/7
Halm < 0.2cm/jord/torv	S3	31/34.5/34.5	6/87/7

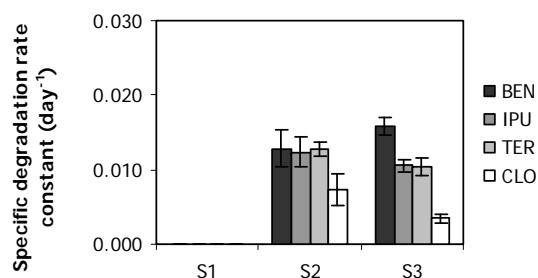


Fig. 5 Nedbrytningshastighet (specific degradation rate constant-SDRC, day⁻¹) av bentazon (BEN), isoproturon (IPU), terbutylazin (TER) och klorpyrifos (CLO) i biomixar med olika halmlängder. S1, 5 cm; S2, 2 cm; och S3 <0.2 cm. S1 behandlingen visade en hög standardavvikelse och därför en icke signifikant nedbrytning.

Halmlängden påverkar också ackumuleringen av metaboliter. Isoproturonmetaboliten MDIPU bildas fortare men bryts också ned snabbare i behandlingarna med de kortare halmlängderna (Fig. 6a).

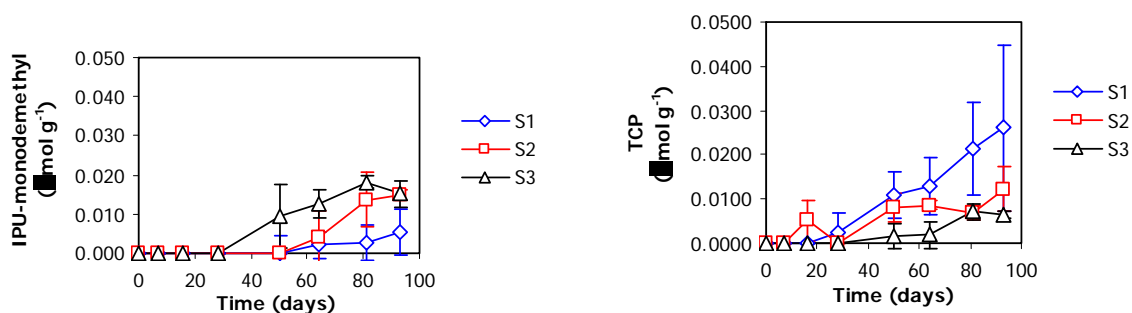


Fig. 6 Metabolitbildning a) monodesmetyl isoproturon (isoproturon) och b) TCP (klorpyrifos).

Längre halmlängd gav en högre ackumulering av TCP - en central metabolit i klorpyrifosnedbrytning (Fig. 6b).

b) Halmlängd och nedbrytning av bekämpningsmedel i biomix – Konstant halmvoly

Biomixar som bereddes med halm med kortare längd gav högre halmandel i vikt (16 % vikt) jämför med biomixar med längre halmlängd (13% vikt) (Tabell 7).

Tabell 7 Volym- och viktsförhållanden av halm/jord/torv i behandlingen Sa and Sb

Biomix	Behandling	Förhållande	Förhållande
		halm/jord/torv (vol)	halm/jord/torv (vikt)
Biomix med halm 2- 0.5 mm	Sa	50/25/25	13/80/7
Biomix med halm < 0.5 mm	Sb	50/25/25	16/78/6

Inga signifikanta skillnader observerades i pesticidnedbrytningen och mineraliseringen (Fig. 7) i båda behandlingarna (Sa och Sb), kanske för att halmlängderna överlappade varandra.

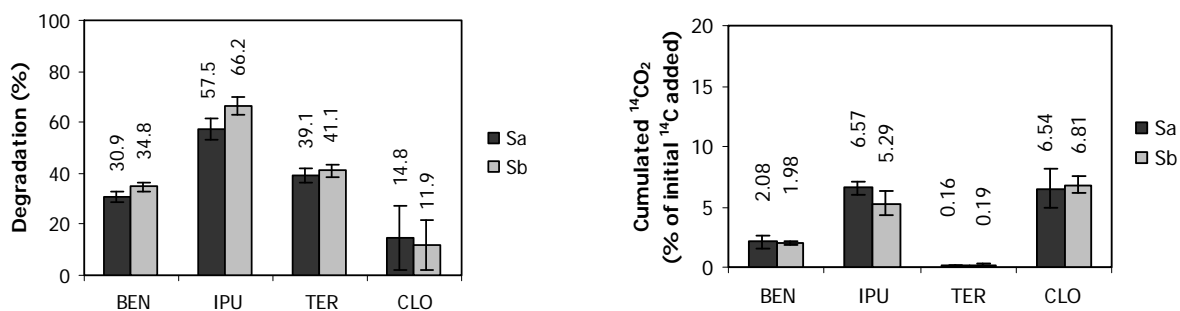


Fig. 7 Nedbrytning och mineralisering i Sa and Sb behandlingarna. Inga signifikanta skillnader observerades mellan Sa och Sb behandlingar.

Däremot högre halminnehåll som i Sb biomixen ökade den mikrobiella aktiviteten uttryckt som basrespiration jämför med Sa som innehåller lägre halmmängd (Fig 8). Tidigare resultat har också visat att lignin nedbrytande enzymaktivitet ökar med högre halmmängd (Castillo et al, 2007).

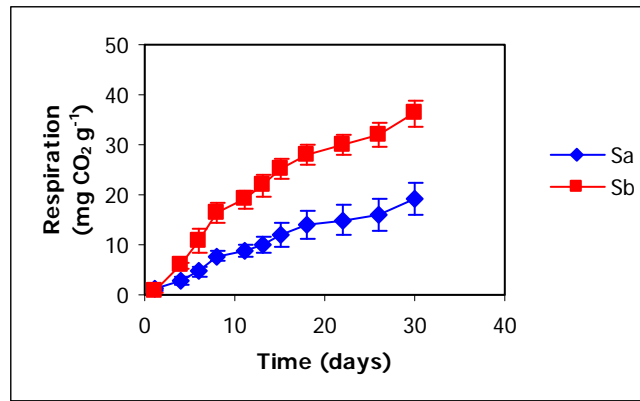


Fig. 8 Basrespiration i Sa och Sb behandlingar. Högre basrespiration observeras i behandlingen Sb som består av en biomix med kortare halmlängd och därför högre halmvikt (Tabell 7)

4.2 Fältförsök

Konstant vikt. Fältförsöket visar att volymen minskar till hälften om samma mängd halm (i vikt) hackas (Tabell 8, Fig. 9). Volymvikten ökade från 13 g L⁻¹ i ohackad halm till 26 g L⁻¹ i hackad halm.

Tabell 8 Resultat från fältförsöket – konstant vikt

Halmlängd	Vikt (g)	Volym (L)	Volymvikt (g L ⁻¹)
Ohackad	210	16	13
Hackad	210	8	26

Konstant volym. Fältförsöket visar att samma volym av hackad och ohackad halm ger olika vikter. Vikten ökar med 30% när man använder hackad jämför med ohackad halm (Tabell 9). Volymvikten ökade från 13 g L⁻¹ i ohackad halm till 19 g L⁻¹ i hackad halm.

Tabell 9 Resultat från fältförsöket – konstant volym

Halmlängd	Vikt (g)	Volym (L)	Volymvikt (g L ⁻¹)
Ohackad	210	16	13
Hackad	310	16	19

Observera att volymvikten i hackad halm i båda försök varierade mellan 19-26 g L⁻¹ (se Slutsatser).



Fig. 9 Två bilder som visar att volymen ändras för samma mängd (i vikt) av hackad och ohackad halm.

En visuell observation mellan hackad vetehalm från en konventionelltröska (Fig. 10) och hackad kornhalm från en konventionell- och en rotortröska visar att vetehalmen kan bestå av mindre partiklar. Ingen direkt skillnad observerades mellan hackad kornhalm från de två tröskmodeller.



Fig. 10 Fäلتplockad halm, 1) ohackade vetehalm, 2) hackad vetehalm (konventionell tröska), 3) hackad kornhalm (konventionell tröska) och 4) hackad kornhalm (rotor tröska).

5. SLUTSATSER

I Tabell 10 sammanfattas volymvikterna i alla behandlingar. Kortare halmlängd ger högre volymvikt. Värdena är ungefärliga eftersom det finns många faktorer som påverkar volymvikten, t ex hur tätt halmen är packad. Det är dock tydligt att halmlängden påverkar volymvikten och kan därför ändra lämplig mängd halm i biomixen.

Resultaten visar att en biomix som bereds med ohackad halm kommer att ha mindre halmmängd (i vikt) jämfört med en biomix med hackad halm. Mindre halminnehåll kan minska den mikrobiella aktiviteten i en biobädd för bindning och nedbrytning av bekämpningsmedelsrester.

Tabell 10 Volymvikt av alla halmfraktioner som användes.

Halmlängd	Volymvikt (g L⁻¹)
Halm <0.05 cm	133
Halm 0.05 - 0.2 cm	98
Halm <0.2 cm	85
Halm 2 cm	64
Halm 5 cm	37
Hackad halm	19-26
Ohackad halm	13

Kortare halmlängd gav en mer homogen blandning (låga standardavvikelse i nedbrytningshastigheten och en mer signifikant nedbrytning).

Vad betyder det här för fältbiobäddar?

- En biobädd måste effektivt binda upp och bryta ned bekämpningsmedel. För att öka biobäddens binding och nedbrytningsförmåga mesta möjliga halmmängd är önskvärd i biomixen. Högre halmmängd i en biomix kan åstadkommas om man använder halm med kort längd. Därför, hackad halm kommer att ge en effektivare biomix jämfört med ohackad halm. Men högre binding och nedbrytning effektivitet kan åstadkommas om lägre halmlängd används. En utökad binding effektivitet är ännu viktigare i unga biobäddar (Henriksen, et al., 2003).
- Inga tydliga längd skillnader observerades i halm hackade med en konventionell- eller rotortröska.
- Lab-biomixar med en halmlängd av 5 cm har visat en långsammare nedbrytning, heterogen aktivitet, potentiell ackumulering av metaboliter och lägre mikrobiell aktivitet. Alla de här effekterna kan bli mer uttalade i fältbiobäddarna där halmlängden är ännu längre.
- Den minsta halmlängd som kan uppnås på ett billigt och praktiskt sätt på gårdarna är hackad halm (tröska). Därför vore det intressant att prova andra ligninrika material, t e x såg- eller kutterspån.

Ytterligare studier rekommenderas för att testa bekämpningsmedelsnedbrytning i fältbiomixar som består av halm med olika längder, a) ohackad halm, b) hackad halm (tröska), c) hackad halm (halmhackare) och d-e) två biomixar med kutter- eller sågspån som fjärde komponent.

6. TACK

Tack till Eskil Nilsson, VISAVI för gott samarbete i fältförsöket.

7. LITTERATUR

Castillo, M.d.P. & Torstensson, L. (2007) Effect of biobed composition, moisture and temperature on the degradation of pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 5725-5733.

Castillo, M.d.P., Ander, P. & Stenström, J. (1997) Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnology Techniques*. 11, 701-706.

Castillo, M.d.P., Ander, P., Stenström, J. & Torstensson, L. (2000) Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a solid substrate fermentation system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16, 289-295.

Castillo, M.d.P., von Wirén-Lehr, S., Scheunert, I. & Torstensson, L. (2001) Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biology and Fertility of Soils*. 33, 521-528.

Henriksen, V.V., Helweg, A., Spliid, N.H., Fielding, G. & Stevang, L. (2003) Capacity of model biobeds to retain and degrade mecoprop and isoproturon. *Pest Management Science*. 59, 1076-1082.