

Nedbrytningsstudie av bekämpningsmedel i näringslösning

BEATRIX ALSANIUS, KARL-JOHAN BERGSTRAND, PER NORDMARK

Sammanfattning

I vattendrag i växthusåta områden har bekämpningsmedelsrester kunnat spåras. En trolig väg är att bekämpningsmedelsrester tar sig ur växthus via dräneringslösningen. För slutna odlingssystem skulle det kunna innebära att bekämpningsmedel som rinner ner i odlingssubstratet, öppna uppsamlingskanaler av dräneringsvatten eller direkt in i näringslösningen inte – som förutsatt – bryts ner, utan förekommer i näringslösningen efter karenstidens slut. Bekämpningsmedel i en recirkulerande näringslösning kan endast försvinna genom kemisk eller biologisk nedbrytning. Vi testade i en inledande studie

- om bekämpningsmedelsrester finns efter karenstidens slut och
- hur snabbt de eventuellt kan brytas ner.

Teldor WG 50 används mot gråmögel i tomatodling. Vi använde Teldor WG50 som modellsubstans (aktiv substans: fenhexamid) i en hundradelskoncentration av en vanlig sprutlösning. Undersökningen pågick under 21 dagar, dvs sju gånger längre än preparatets karenstid. Prover togs vid 6 tillfällen, nämligen 0, 1, 2, 4, 8 eller 21 dagar efter tillsats av substansen. Utöver detta följde vi halten av organiska ämnen, ledningstal och pH samt förekomsten av bakterier och svampar (levande celltal) i medier utan och med Teldor samt dynamiken av mikrobiella samhällen under inkubationen. Vi undersökte också om det fanns bakterier och svampar som kan växa till med Teldor som enda energikälla. Vi konstaterade att

- halten fenhexamid inte förändrades under observationsperioden;
- halten löst organiskt kol inte förändrades under observationsperioden;
- ledningstalet och pH ökade något under observationsperioden;
- levande celltal (CFU/ml) av bakterier och svampar varierade inte nämnvärt under observationsperioden;
- levande celltal av fluorescerande pseudomonader ökade något under observationsperioden;

- levande celltal av svampar påverkades signifikant då de odlades i medium med fenhexamid;
- organismer från dräneringslösningen överlevde väl under de näringsfattiga betingelserna på vattengår med tillsats av Teldor;
- sammansättningen av mikrobiella samhällen i dräneringslösningen förändrades över tid i närvaro av Teldor.

Vi drar slutsatsen att fenhexamid inte bryts ner i näringslösning under den tre dagar långa karenstiden, att rester av Teldor kan kvarstå under en lång tid i näringslösning och att mikroorganismer i dräneringslösningen inte bidrog till nedbrytningen av det tillsatta bekämpningsmedlet.

Nyckelord: bekämpningsmedelsrester, fenhexamid, hydroponiska odlingssystem, grönsaker, slutna system, Teldor WG 50, växthus

Bakgrund

Målsättningen med denna studie var att undersöka nedbrytningshastigheten för en fungicid i näringslösning från ett kommersiellt, slutet odlingssystem, samt hur mikrofloran i näringslösningen påverkas av fungiciden. Denna studie har sin utgångspunkt i att granska och optimera i slutna odlingssystem ur ett miljöperspektiv. Rester av Teldor har inte kunnat påvisas i uppdragsgivarens produkter. Däremot har det visats spår av bekämpningsmedel i vattendrag i växthusåta områden (Kreuger et al., 2010). En trolig väg ur växthus är via dräneringslösning, som (1) berikas med bekämpningsmedel som en följd av att



Figur 1. I miljövänliga hortikultuella odlingssystem i växthus samlas den använda näringslösningen upp i öppna (denna bild) eller slutna kanaler. Öppna kanaler kan vara en port för, och anledning till, att bekämpningsmedelsrester i den uppsamlade näringslösningen kvarstår över tid. (foto: B. Alsanius)

dessa tillsatts direkt i bevattningsvattnet (t.ex. Imidacloprid eller Propamocarb), eller (2) avrinnande sprutlösning från blad som droppar ner på odlingssubstratet eller fångas upp av öppna uppsamlingsrännor (Löfkvist et al., 2009). Enligt holländska uppgifter fångas 4% av sprutlösningen upp i bevattningsvattnet och 3% i odlingssubstratet.

I slutna odlingssystem recirkuleras näringslösningen inkl lösta ämnen, t.ex. bekämpningsmedelsrester. (Hatzilazarou et al. 2004, Patakoutas et al. 2007). Detta innebär att kulturen exponeras på nytt och att karenstiden på så sätt överskrids.

Slutna odlingssystem blir allt vanligare vid odling av växthusgrönsaker på grund av myndighetskrav om minskade utsläpp av nä-



Figur 2: Försöksuppställningen i konstantrummet (foto: K.-J. Bergstrand)

ringsämnen (Vattendirektivet, 2000), samt av ekonomiska skäl då de innebär en avsevärd besparing av vatten och gödselmedel. I näringslösningen i ett slutet odlingsystem förekommer en rik mikroflora som livnär sig på organiska ämnen såsom rotexsudater och döda celler från rötterna (Waechter-Kristensen et al., 1999). Halten av lösta organiska ämnen i dräneringslösningen i kommersiella odlingsystem ligger på 10–40 ppm (Furtner et al., 2007; Waechter-Kristensen et al., 1999). Levande cellhalter på bakterier och svampar är vanligtvis runt 10^5 (log 5) resp. 10^2 (log 2) CFU/ml (Furtner et al., 2007).

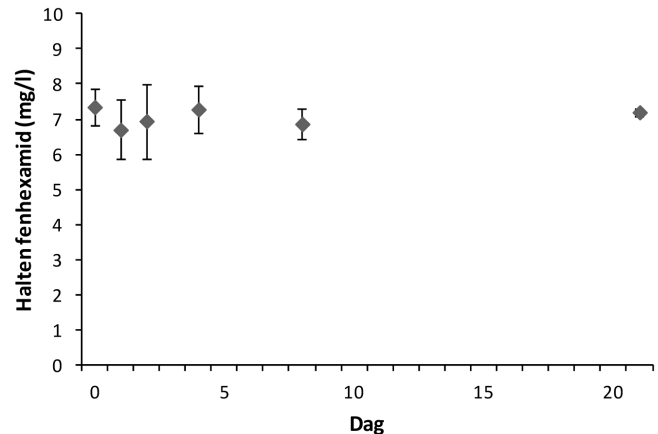
Mikroorganismer är huvudaktörerna vid biologisk nedbrytning av organiska ämnen, då de utnyttjar organiska ämnen som energikälla. De kan leva fria i lösning, eller fästade som en biofilm vid ytor i systemet som t.ex. odlingssubstrat och innerväggar i ledningar och tankar. Mikrofloras sammansättning och aktivitet varierar beroende på tillgång på och form av organiska ämnen. Den är också beroende av andra yttre faktorer, såsom temperatur, pH, syrehalt samt ledningstal.

Målsättningen med denna inledande studie var att följa nedbrytningshastigheten för en fungicid i näringslösning från ett kommersiellt, slutet odlingsystem, samt fungicidresterans inverkan på mikrofloran i näringslösningen.

Material och metoder

Förstudie

För att bestämma adekvata provtagningstillfällen under huvudförsöket genomfördes ett förförsök. Näringslösning samlades in enligt nedan i vecka 36. Teldor tillsattes i koncentrationen 0.15 g/l. Lösningen inkuberades i flaskor med luftning på samma sätt som beskrivs för huvudförsöket. Prover för analys av resthalt togs vid start samt efter 2, 4, 6, 8 och 10 samt 21 dagar.



Figur 3: Halten fenhexamid i näringslösning under 21 dagar av observation. Dräneringslösning hade samlats in från ett kommersiellt slutet odlingsystem med tomat i slutet av odlingsäsongen. Teldor (0.015 mg/l, aktiv substans fenhexamid 0.0075mg/l) tillsattes vid försöksstarten. Inkubationen skedde under laboratoriebetingelser i individuella 1-l-flaskor vid 20 °C och mörker samt konstant syresättning. (n=6).

Försöksuppställning

Dräneringslösningen samlades in från en kommersiell tomatodling med slutet bevattningssystem. Lösningen samlades upp från uppsamlingstanken i växthuset. I laboratoriet fördelades näringslösningen i 72 st 1 l sterila glasflaskor. Till varje flaska tillsattes 0.015 g Teldor WG 50 (Bayer Crop Science, Tyskland), aktiv substans fenhexamid (50% w/w). I vårt försök spädde vi ut sprutlösningen 100 gånger. Detta för att simulera en rimlig nivå för bladavrinning ner i näringslösningen. Flaskorna placerades i klimatkammare vid konstant 20°C och mörker. Lösningen i flaskorna luftades och omrördes kontinuerligt med hjälp av sterilfiltrerad luft. Prover togs 0, 1, 2, 4, 8 och 21 dagar efter tillsatsen av bekämpningsmedlet. Vid varje provtagning "skördades" 2 x 6 flaskor. Resterande flaskor påverkades alltså inte av provtagningen.

Analys

Proven analyserades med hänsyn till halten av fenhexamid, mikroorganismer och sammansättning av mikrobiella samhällen, halten löst organiskt kol (DOC), ledningstal och pH.

Prover för analys av bekämpningsmedel förvarades i frysen till analys. De analyserades med hjälp av vätskekromatografi. Mikrofloran analyserades både med och utan tillsats av fenhexamid med hänsyn till den generella svamp- (malteextraktagar, MA) och bakteriefloran (R2A), fluorescerande pseudomonader (King Agar B, KB; King et al., 1954) samt på vattenaagar (WA). Proven spädde seriellet och inokulerades på respektive mikrobiologiskt medium.

Vid varje provtagningstillfälle membranfiltrerades (porstorlek: 0.45 µm) 1 l lösning

från varje replikat. Pelletten tvättades genom upprepade centrifugering och resuspendering. Bakteriella samhällen analyserades med hjälp av en DNA-baserad metod (denaturering gradient gel electrophoresis, DGGE) av PCR-amplifierad bakteriell 16S rDNA. För standardstegen användes följande bakterier: *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida* samt *Bacillus subtilis*.

För analys av löst organiskt kol membranfiltrerades (porstorlek: 0.22 µm) provet och analyserades sedan med hjälp av testkit LCK 385 (Hach-Lange AG, Tyskland) Ledningstal och pH mättes vid varje analystillfälle.

Beräkning och statistisk analys

Försöket är baserat på en enfaktoriell ansats med sex oberoende replikat. Resultat från mikrobiologiska analyser log-transformerades före statistisk analys (Angle et al., 1996). Samtliga resultat bearbetades med variansanalys (ANOVA) följt av Tukey-test (Minitab vers. 16; Minitab inc., USA) där $p \leq 0.05$ ansågs som signifikant skilda resultat.

Resultat och diskussion

Karenstider för bekämpningsmedel är ett sätt att minimera förekomsten av bekämpningsmedelsrester på de odlade växterna, växtprodukterna eller de behandlade områdena i syfte att skydda konsumenten, personalen samt husdjur. För Teldor (fenhexamid) är karenstiden 3 dagar efter behandlingen. Fenhexamid används vid odling av växthustomater mot gråmögel. Preparatet har en lokalsystemisk effekt. För en god effekt bör hela växten täckas jämt av preparatet. Detta innebär att det finns

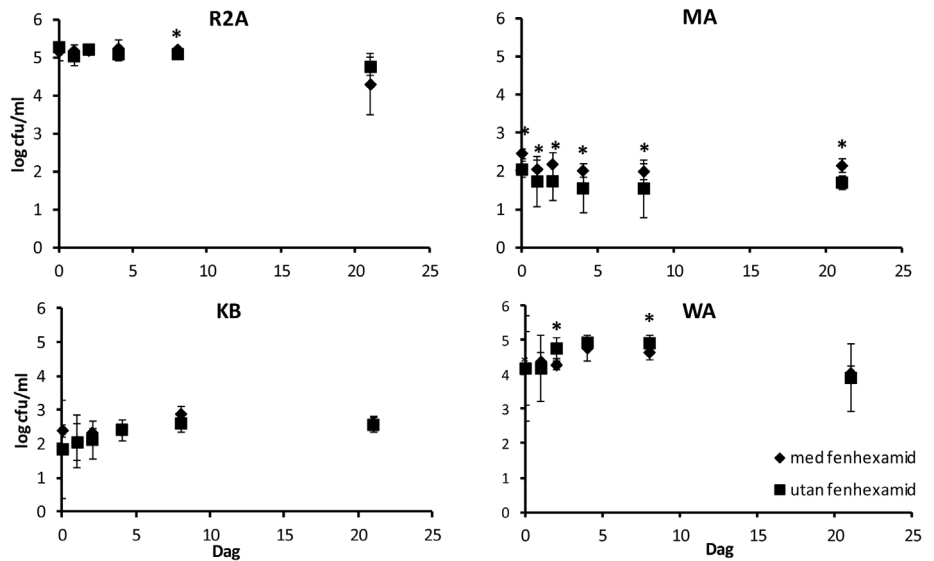
förutsättningar för en hög avrinning av preparatet, som kan infiltrera dräneringslösningen via odlingssubstratet (3%) eller som fångas upp i öppna uppsamlingskanaler (4%).

Resultaten från förförsöket indikerade att nedbrytningen var låg, efter 21 dagar fanns fortfarande 72% av den ursprungligen tillsatta halten kvar. Som ett resultat av detta beslöts att reducera koncentrationen i huvudförsöket från 0.15 mg/l till 0.015 mg/l. Fenhexamidhalten, tillsatt i en hundraledskoncentration av sprutlösning, förändrades inte signifikant under observationsperioden på 21 dagar (fig. 3).

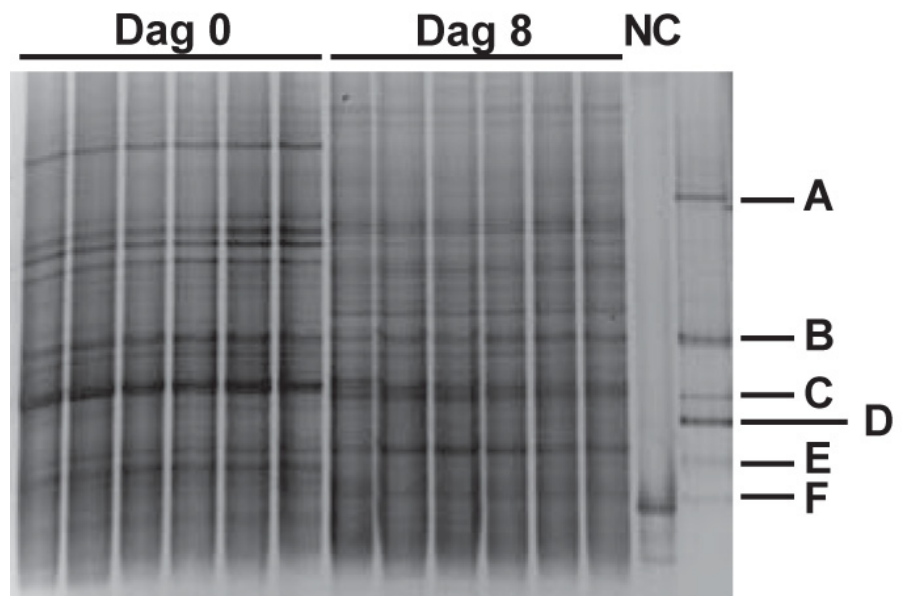
Organiska ämnen i vatten/näringslösningen kan brytas ner biologiskt eller kemiskt. I föreliggande undersökning lades fokus på den biologiska nerbrytningen. Resultaten, både vad gäller fenhexamidhalter, halten löst organiskt kol, samt levande celltal av mikroorganismer, visade att ingen nedbrytning ägt rum (se figur 4 och 5) samt att förekomsten av odlingsbara mikroorganismer (levande celltal) inte genomgick några större förändringar, även när Teldor tillsattes till de mikrobiologiska odlingsmedierna. Detta resultat stöds av tidigare studier liknande denna, fast där vatten från år istället för dräneringslösning använts (Abbate et al., 2007). I Abbate et al.'s studie (2007) fanns fortfarande efter 100 dagars inkubation mellan 77 och 94% av tillsatt fenylhexamid kvar, beroende på vattnets pH-värde. Vid biologisk nedbrytning av organiska ämnen kan både bakterier och svampar ha en aktiv roll. Vi valde i föreliggande undersökning dräneringslösning från ett slutet kommersiellt odlingsystem med tomat, därför att den har den mest etablerade mikrofloran. Den mikrobiella koloniseringen av den använda lösningen var mycket god och motsvarade tidigare kvantificerade mängder (Alsanius & Bergstrand, 2007). Analyserna i den föreliggande studien visade inga nämnvärda förändringar av levande celltal, förutom att svampfloran påverkades negativt av fenhexamid tillsats – en förväntad effekt när man tillför ett fungicid. Det fanns också viss påverkan på förekomsten av fluorescerande pseudomonader. En sådan förändring av mikrofloras sammansättning i som respons på tillsatsen av fenhexamid har tidigare påvisats av Borzi et al. (2007).

Alsanius & Jung (2004) visade att fenoliska ämnen i näringslösningen från slutna odlingsystem kunde effektivt brytas ner inom loppet av 54 timmar. Enligt dessa författare är icke-mineraliserbarhet av organiska ämnen en förutsättning för anrikning av organiska ämnen i näringslösningen; utöver detta nämnde de att anrikning kan förekomma om

1) ämnet inte är lösligt i näringslösningen,



Figur 4: Mikrofloran i dräneringslösningen, uppmätt genom levande celltal (CFU/ml), där R2A representerar allmän bakterieflora, MA allmän svampflora, KB fluorescerande pseudomonader och WA allmän bakterieflora. "utan fenhexamid" är standardmedium, "med fenhexamid" är medium med tillsats av 0.015 g fenhexamid/l. Asterisk (*) över datapunkterna markerar signifikant ($p < 0.05$) skillnad mellan avläsningar från medium med resp. utan fenhexamid.



Figur 5. DGGE mönster av bakteriepopulationen i näringslösningen direkt (dag 0) efter och 8 (dag 8) dagar efter tillsats av Teldor WG 50 (0.015 mg/l). Varje band motsvarar en fylotyp. *Enterobacter cloacae* (A), *Pseudomonas fluorescens* (B), *Listeria innocua* (C), *Stenotrophomonas maltophilia* (D), *Pseudomonas putida* (E) samt *Bacillus subtilis* (F) användes som markörer i standardstegen.

- 2) platsen där mikroorganismer som är kapabla att bryta ner det organiska ämnet vistas inte överensstämmer med platsen där det organiska ämnet finns och
- 3) om den befintliga mikrofloran inte kan producera adekvata enzymer eller enzymkomplexer för att bryta ner det organiska ämnet i frågan.

Fenhexamid i form av Teldor WG är ett granulat som finfördelas i vatten (Bayer Crop

Science, 2011). Genom ständig tillförelse av sterilfiltrerad luft var lösningen stadigt i omrörning vilket skapade förutsättningar för att substansen och mikroorganismer fanns på samma plats. Utifrån föreliggande studie är det inte möjligt att bedöma vilken av anledningarna i listan ovan är avgörande för resultatet.

Vid inkubation i fuktig jord fastställde Abbate et al. (2007) att fenhexamid reducerades med upp till 75% inom fem dagar, vilket är

ett mycket intressant resultat för föreliggande frågeställning i vidare perspektiv. I dagens läge föreligger inga resultat om liknande effekt kan förväntas av infiltration genom odlingssubstrat eller ett biologiskt filter. Kunskap om detta är dock ett viktigt nästa steg för att kunna sätta dessa resultat i rätt sammanhang. Halten av löst organiskt kol förändrades inte under inkubationsperioden. Lösningens pH-värde stabiliserades inom 24 timmar efter tillsats av Teldor till ca 7.8. Ledningstalet steg signifikant från 2.66 till 2.91 mS/cm under försökets gång.

Den molekylärbiologiska analysen av bakteriella samhällen visade att vissa bakteriegrupper reducerades påtagligt under de första 8 dagarna av inkubationen, medan andra ökade (figur 5). Detta är i synnerhet intressant i och med att varken mängden aktiv substans eller löst organiskt kol förändrades. I denna undersökning tillsattes Teldor WG 50 som modellsubstans. Den ena hälften utgörs av den aktiva substansen fenhexamid, den andra är en organisk bärare, vilket kan betyda att bäraren fungerade som energikälla. Det faktum att många mikroorganismer förmådde att växa i närvaro av fenhexamid är intressant. Särskilt intressanta kandidater för att stimulera nedbrytning av Teldor WG 50 är de organismer som förökades under observationstiden.

Slutsatser

Föreliggande studien har sin utgångspunkt i att granska och optimera slutna odlingsystem. Rester av Teldor har inte kunnat påvisas i uppdragsgivarens produkter. Bekämpningsmedelsresters öde i näringslösning i slutna odlingsystem är dock en förbisedd fråga. Nya strategier för minskning av bekämpningsmedelsrester i slutna odlingsystem bör utvecklas. Det bör också studeras huruvida den förlängda exponeringstiden leder till anrikning av

Teldor i skördade grönsaker. Det är också viktigt att följa upp om rester av andra bekämpningsmedel kvarstår över tid i recirkulerande näringslösning.

Litteratur

- Abbate, C., Borzi, D., Caboni, P. & Baglieri, A. (2007). Behavior of fenhexamid in soil and water. *Journal of Environmental Science and Health* 42, 843-849.
- Alsanius, B.W. & Jung, V. (2004). Potential of utilization of selected organic compounds by the microflora inhabiting the effluent nutrient solution of closed greenhouse irrigation system. *European Journal of Horticultural Sciences* 69(1), 96-103.
- Alsanius, B. & Bergstrand, K.-J. (2007). Make the difference - om att sluta systemet. Resultat från ett demonstrationsförsök i tre skånska tomatodlingar. Alnarp ISBN 978-91-576-7210-0.
- Angle, J.S., Gagliardi, J.V., McIntosh, M.S. & Levin, M.A. (1996). Enumeration and expression of bacterial counts in the rhizosphere. Stolzky G. and Bollag J.-M. (eds): *Soil and Biochemistry*. Marcel Dekker, Inc. N.Y., 233-251.
- Bayer Crop Science (2011). <http://www.bayercropscience.se/verktyg/vad-betyder-forkortningen/> (nedladdat 2011-12-16).
- Borzi, D., Abbate, C., Martin-Laurent, F., El Azhari, N. & Gennari, M. (2007). Studies on the response of soil microflora to the application of the fungicide fenhexamid. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 87, 949-956.
- Furtner, B., Bergstrand, K.-J., Brand, T., Jung, V. & Alsanius, B.W. (2007). Abiotic and biotic factors in slow filters integrated to closed hydroponic systems. *European Journal of Horticultural Sciences* 72, 104-112.
- Hatzilazarou, S., Charizopoulos, M., Papadopoulou-Mourkidou, E. & Economou, A.S. (2004). Pesticide dissipation in the greenhouse environment during hydroponic cultivation of Gerbera. *Acta Horticulturae* 639, 347-353.
- King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of laboratory and clinical medicine* 44 (2), 301-307.
- Kreuger, J., Graaf, S., Patring, J. & Adielsson, S. (2010). Pesticides in surface water in areas with open ground and greenhouse horticultural crops in Sweden 2008. Uppsala.
- Löfkvist, K., Hansson, T. & Svensson, S.A. (2009). Förluster av växtskyddsmedel till omgivande mark och vatten vid användning i svenska växthus -en genomgång av möjliga riskmoment. In: *Landskap Trädgård Jordbruk*. Alnarp.
- Patakioutas, G., Savvas, D., Matakoulis, C., Sakellariades, T. & Albanis, T. (2007). Application and fate of cyromazine in a closed-cycle hydroponic cultivation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9928-9935.
- Vattendirektivet Water Framework Directive, 2010/60/EG
- Waechter-Kristensen, B., Caspersen, S., Adalsteinsson, S., Sundin, P. & Jensén, P. (1999). Organic compounds and micro-organisms in closed hydroponic culture: occurrence and effects on plant growth and mineral nutrition. *Acta Horticulturae* 481, 197-204.

Faktabladet är utarbetat inom LTJ-fakultetens område Hortikultur (www.microhort.se)

Projektet är finansierat av Partnerskap Alnarp; projekt 580 i samarbete med Sydgrönt ek. för.

Projektansvarig/författare: Beatrix Alsanius; email: beatrix.alsanius@slu.se;
Enhet för Hortikulturell Mikrobiologi, Box 103. 230 53 Alnarp

Övrig publicering inom projektet: Alsanius BW, Bergstrand K-J, Burleigh S, Gruyer N, Rosberg A-K, 2012.
Fate of fenhexamide in the nutrient solution of a closed hydroponic cropping system. (submitted manuscript)

<http://epsilon.slu.se>