

ANDRZEJ BORKOWSKI<sup>1</sup>, MATEUSZ SZALA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych  
Uniwersytet Warszawski

<sup>2</sup>Zakład Materiałów Wybuchowych  
Wojskowa Akademia Techniczna w Warszawie

## WPLYW POCHODNYCH 1,2,4,5-TETRAZYNY NA WZROST BAKTERII GLEBOWYCH ORAZ AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNĄ W GLEBIE\*

**Streszczenie.** W pracy badano wpływ pochodnych 1,2,4,5-tetrazyny: 3,6-dihydrazynotetrazyny (DHTz), 3,6-bis(3,5-dimetylopirazylo)1,2,4,5-dihydrotetrazyny (DMPDHT) oraz N,N'-bis(1,2,4,5-tetrazyno-6-(3,5-dimetylopirazylo))hydrazyny (BDMPT) na wzrost wyizolowanych z gleby szczepów bakterii Gram-dodatniej i Gram-ujemnej (*Bacillus halodurans* i *Pseudomonas stutzeri*) oraz na aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej i dehydrogenazy w glebie. Największy efekt toksyczny wobec wyizolowanych szczepów bakterii wykazywała 3,6-dihydrazynotetrazyna, natomiast najmniejszy – 3,6-bis(3,5-dimetylopirazylo)1,2,4,5-dihydrotetrazyna. W oznaczeniach aktywności fosfatazy kwaśnej w glebie stwierdzono, że największy wpływ na aktywność enzymatyczną miała 3,6-dihydrazynotetrazyna. Początkowo notowano nieznaczny wzrost aktywności fosfatazy (przy stężeniu DHTz w mieszaninie reakcyjnej około 40 mg·l<sup>-1</sup>), a następnie istotny spadek – do poziomu około 2/3 pierwotnej aktywności w glebie, oznaczanej bez obecności DHTz.

**Słowa kluczowe:** aktywność enzymatyczna, bakterie glebowe, tetrazyny

### Wstęp

Związki wysokoazotowe mają istotne znaczenie w produkcji pirotechnicznej (poduszki powietrzne, napinacze pasów bezpieczeństwa) oraz w produkcji nowoczesnych materiałów wybuchowych. Możliwość biodegradacji niektórych związków chemicznych stosowanych jako materiały wybuchowe była badana przede wszystkim na przy-

---

\*Badania dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu nr O N204-000834.

kładzie 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacykloheksanu (RDX), 1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetraazacyklooktanu (HMX), a także 2,4,6,8,10,12-heksanitro-2,4,6,8,10,12-heksaazaizowurtzitanu (CL-20) (BHUSHAN i IN. 2002, FOURNIER i IN. 2002, CROCKER i IN. 2006). Zdolność biodegradacji tych związków stwierdzano u różnych bakterii, zarówno w warunkach tlenowych, jak i ściśle beztlenowych, np. u bakterii z rodzajów *Pseudomonas*, *Clostridium* i *Desulfovibrio* (BHUSHAN i IN. 2003, ZHAO i IN. 2003).

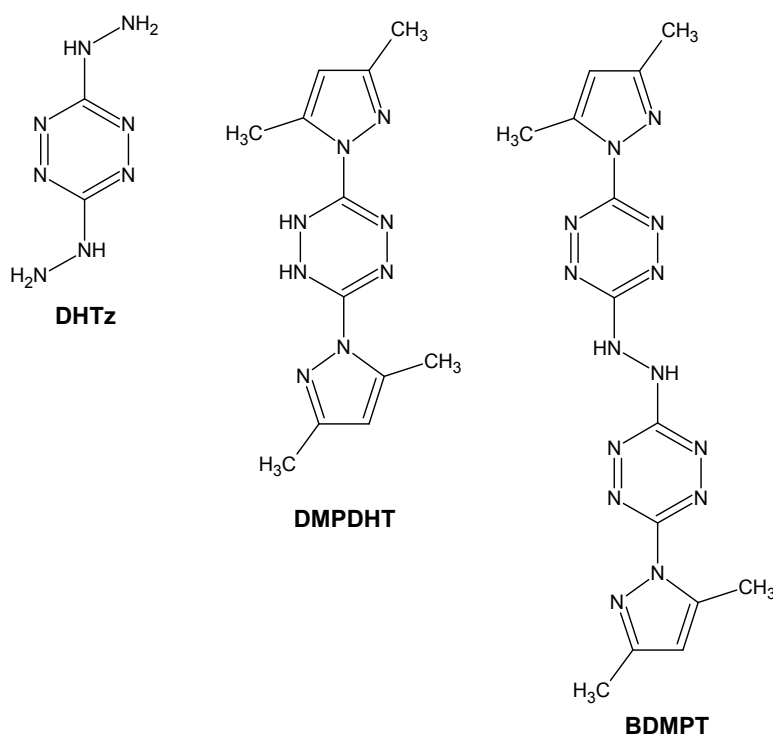
Celem prezentowanych w tej pracy badań było oznaczenie toksyczności wybranych pochodnych 1,2,4,5-tetrazyny w stosunku do wyizolowanych z gleby bakterii Gram-dodatniej i Gram-ujemnej (*Bacillus halodurans* i *Pseudomonas stutzeri*) oraz zbadanie wpływu pochodnych tetrazyny na aktywność enzymatyczną w glebie. Gatunki należące do rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* oraz liczne promieniowce są podawane w literaturze jako potencjalnie użyteczne w procesie bioremediacji środowisk skażonych ksenobiotykami, w tym także materiałami wybuchowymi (JAIN i IN. 2005). Badane pochodne nie były przedmiotem wielu studiów mikrobiologicznych i enzymatycznych, jedynie nieliczne prace wskazują na możliwe antibakteryjne właściwości związków zawierających pierścień tetrazynowy (KHAN i IN. 1992, PANDEY i IN. 2009).

## Material i metody

**Synteza pochodnych 1,2,4,5-tetrazyny.** W badaniach wykorzystano następujące pochodne tetrazyny (rys. 1): 3,6-dihydrzynotetrazynę (DHTz), 3,6-bis(3,5-dimetylopirazylo)1,2,4,5-dihydotetrazynę (DMPDHT) oraz N,N'-bis(1,2,4,5-tetrazyno-6-(3,5-dimetylopirazylo))hydrazynę (BDMPT). Badane pochodne zostały zsyntetyzowane zgodnie z danymi literaturowymi (MARCUS i REMANICK 1963, COBURN i IN. 1993, CHAVEZ i IN. 2000). Struktura otrzymanych produktów została potwierdzona metodą spektroskopii NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  (Bruker, DRX 500). Czystość związków oznaczono metodą HPLC (Shimadzu LC 20A). Rozpuszczalność badanych pochodnych w wodzie jest różna, jednak w zakresie stężeń 0-100 mg·l<sup>-1</sup> zarówno DHTz, jak i BDMPT są stosunkowo dobrze rozpuszczalne. DMPDHT jest związkiem najtrudniej rozpuszczalnym, ale w roztworze wodnym łatwo ulega utlenieniu do dobrze rozpuszczalnej 3,6-bis(3,5-dimetylopirazylo)1,2,4,5-tetrazyny (DMPT).

**Mikroorganizmy i stosowane podłoża.** W pierwszym etapie prac wyizolowano zespół bakterii glebowych na podłożu z glukozą o składzie: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5 g, NH<sub>4</sub>Cl 0,1 g, MgSO<sub>4</sub> 0,1 g, CaCl<sub>2</sub> 0,1 g, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> · H<sub>2</sub>O 5 g, woda destylowana 1000 ml, pH 6,8-7,0. Glebę ogrodową (1 g) wprowadzano do 50 ml podłoża i inkubowano przez 48 h w temperaturze 25°C w warunkach tlenowych. Następnie 1 ml otrzymanej hodowli ponownie wprowadzano do 50 ml podłoża i inkubowano 24 h. Z tak otrzymanej hodowli wyizolowano na płytkach z agarem odżywcym dwa szczepy bakterii: *Bacillus halodurans* i *Pseudomonas stutzeri*, których identyfikację przeprowadzono metodami molekularnymi (16S rRNA). Bakterie te były szczepami dominującymi w wyizolowanym z badanej gleby zespole mikrobiologicznym.

**Oznaczenie toksyczności badanych pochodnych tetrazyny.** Test przeprowadzono na płytkach z agarem odżywcym metodą studzienkową. Do testu zastosowano wyizolowane wcześniej dwa szczepy bakterii glebowych, które wysiewano w postaci gęstej



Rys. 1. Struktura badanych pochodnych 1,2,4,5-tetrazyny  
Fig. 1. The chemical structure of investigated 1,2,4,5-tetrazine derivatives

hodowli w ilości 100  $\mu\text{l}$  na płytkę. Następnie w agarze wykonywano jałowo studzienki o średnicy 0,5 cm, po czym do studzienek wprowadzano roztwór badanego związku o stężeniu 1 mg/ml w ilości 200  $\mu\text{l}$  do jednej studzienki. Gotowe płytki pozostawiano na 1 h w temperaturze 4°C, a następnie inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 h. Po inkubacji oznaczano strefy zahamowania wzrostu.

**Oznaczenia fosfatazy kwaśnej.** Badania przeprowadzono w kolbkach o pojemności 100 ml w trzykrotnym powtórzeniu. Do kolbek wprowadzano 0,5 g gleby ogrodowej powietrznie suchej, 2 ml buforu octanowego o pH 5,3, 2 ml roztworu badanej pochodnej tetrazyny oraz 2 ml substratu – soli sodowej fosforanu nitrofenolu (PNP) do finalnego stężenia 0,625, 1,25, 2,5, 3,75, 5,0 mM PNP. Aktywność oznaczano przy różnych stężeniach badanej pochodnej tetrazyny: 0 mg·l<sup>-1</sup> (kontrola), 20 mg·l<sup>-1</sup>, 41 mg·l<sup>-1</sup>, 83 mg·l<sup>-1</sup>, 104 mg·l<sup>-1</sup>. Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 10 min, a następnie reakcję przerywano, dodając 40 ml wody, całość filtrowano przez sącdek, do przesączu dodawano 0,5 ml roztworu 1M NaOH, dopełniano do 50 ml i oznaczano stężenie nitrofenolu (NP) spektrofotometrycznie (Thermo Scientific).

Do wyznaczenia podstawowych parametrów charakteryzujących aktywność enzymatyczną zastosowano model Michaelisa-Menten według wzoru:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

gdzie:

- $V_{\max}$  – szybkość maksymalna powstawania produktu – nitrofenolu ( $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$ ),  
 $K_m$  – stała Michaelisa,  
 $[S]$  – stężenie substratu (PNP).

**Oznaczenia dehydrogenazy w glebie.** Oznaczenia przeprowadzono, opierając się na metodzie opisanej przez CASIDA i IN. (1964). Do próbek wprowadzano 2 g powietrznie suchej gleby ogrodowej, następnie dodawano około 50 mg  $\text{CaCO}_3$  i roztworu badanej pochodnej tetrazyny (DHTz lub BDMPT) do finalnego stężenia 375 lub 750  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  gleby, a następnie dodawano 0,5 ml roztworu trifenylotetrazolu (TTC) o stężeniu 3%. Końcowa objętość roztworu inkubacyjnego wynosiła 3,5 ml. Probówki zamykano szczelnie korkiem i prowadzono inkubację w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 24 h. Wyniki przedstawiono jako ilość powstałego formazanu (TFC) na gram gleby w jednostce czasu ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  w czasie 24 h). Oznaczeniem kontrolnym był układ, w którym zamiast roztworu badanych związków zastosowano wodę destylowaną. Badanie wykonano w trzykrotnym powtórzeniu.

**Wyznaczenie długości trwania lag-fazy w hodowli *Bacillus halodurans* w obecności badanych pochodnych tetrazyny.** Do wyznaczenia wpływu pochodnych tetrazyny na długość trwania lag-fazy zastosowano hodowlę szczepu *Bacillus halodurans*. Hodowlę prowadzono w kolbkach o pojemności 100 ml w dwukrotnym powtórzeniu. Do opisanego wcześniej podłoża z glukozą dodawano badanej pochodnej tetrazyny w stężeniu: 10, 20, 40 i 100  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Inokulum (1 ml) stanowiła 12-godzinna hodowla szczepu *Bacillus halodurans* na tym samym podłożu. Układem kontrolnym była hodowla bez badanego związku chemicznego. Inkubację prowadzono w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  przez 80 h. W tym czasie badano gęstość optyczną (OD) hodowli w spektrofotometrze przy długości fali 550 nm. Z otrzymanych danych sporządzono półlogarytmiczny wykres zależności wartości OD od czasu hodowli. Początek prostoliniowego wzrostu OD w czasie wyznaczał koniec trwania lag-fazy w badanej hodowli.

## Wyniki i dyskusja

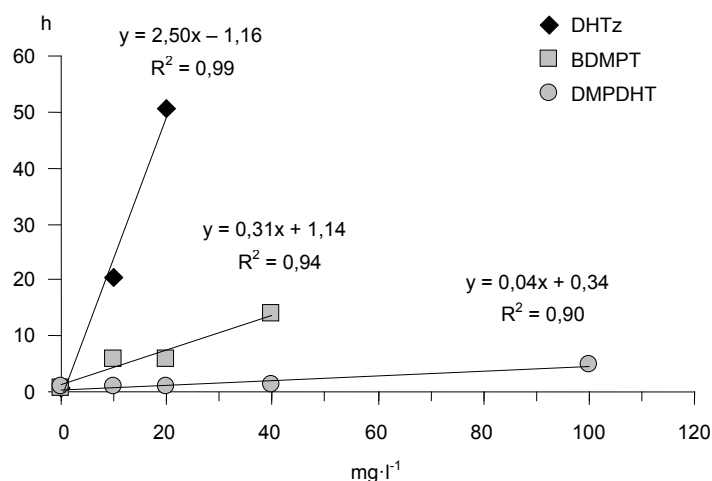
Oznaczenie toksyczności badanych pochodnych tetrazyny wobec wyizolowanych szczepów bakterii glebowych (tab. 1) wykazało, że największym efektem toksycznym charakteryzowała się dihydrazynotetrazyna (DHTz) wobec szczepu *Pseudomonas stutzeri*. Znacznie mniejszy efekt toksyczny wykazała BDMPT, natomiast w przypadku DMPDHT nie wykazano żadnego efektu toksycznego. Dużą toksyczność DHTz można tłumaczyć obecnością dwóch grup hydrazynowych w cząsteczce i najlepszą rozpuszczalnością w wodzie w stosunku do pozostałych dwóch związków. Hydrazyna jest związkiem silnie toksycznym i mutagennym, a także wykazuje znaczną reaktywność chemiczną (PARODI i IN. 1981, ROGAN i IN. 1982, POSO i IN. 1995). Otrzymane wyniki testu toksyczności potwierdza eksperyment, w którym oznaczono długość trwania lag-fazy w hodowli *Bacillus halodurans* w obecności badanej substancji chemicznych

Tabela 1. Oznaczenie toksyczności badanych pochodnych tetrazyny wobec wyizolowanych szczepów bakterii glebowych

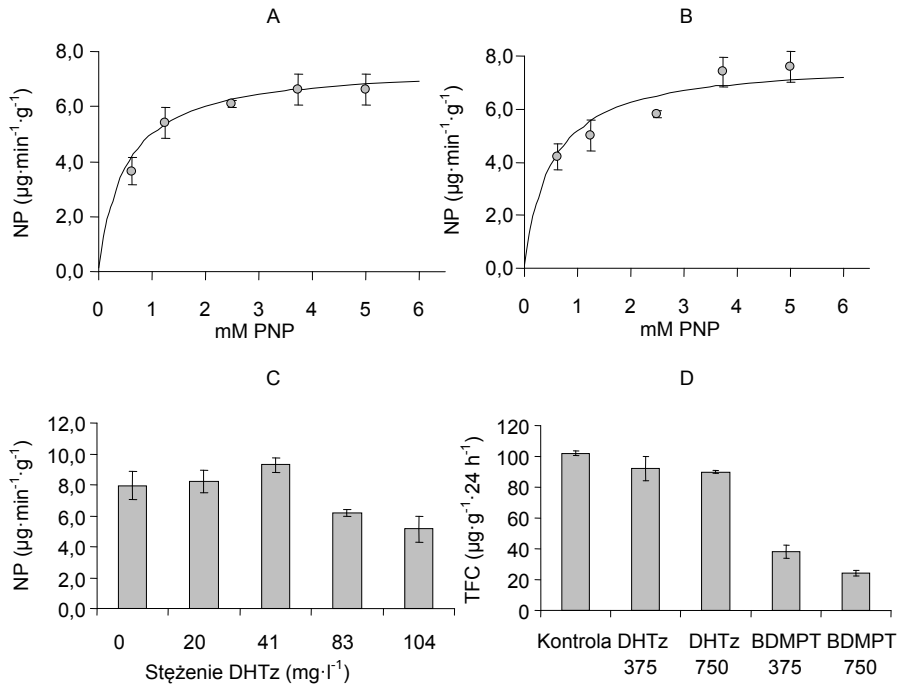
Table 1. The toxicity indication of investigated tetrazine derivatives to isolated strains of soil bacteria

Związek chemiczny	Strefy zahamowania (mm)	
	<i>Bacillus halodurans</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
DHTz	10	14
BDMPT	1-2	2
DMPDHT	–	–

(rys. 2). W badaniach tych wykazano, że dodatek DHTz do hodowli w ilości  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  powoduje wydłużenie lagfazy do 20 h, natomiast stężenie  $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  powoduje całkowite zahamowanie wzrostu w hodowli płynnej. Mniejszym wpływem na wydłużenie lagfazy charakteryzowała się pochodna BDMP – dodanie tego związku w ilości  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  powodowało wydłużenie lagfazy mniej więcej o 5 h. Prawie zupełnym brakiem wpływu na kinetykę wzrostu bakterii w hodowli charakteryzowała się DMPDHT oraz produkt jej utleniania w roztworze wodnym – DMPT.

Rys. 2. Długość trwania lagfazy w zależności od stężenia badanych pochodnych tetrazyny w hodowli *Bacillus halodurans*Fig. 2. The length of lag-phase depending on concentration of investigated tetrazine derivatives in culture of *Bacillus halodurans*

Oznaczenia aktywności fosfatazy kwaśnej w glebie w obecności DHTz przedstawiono na rysunku 3 (3 a, 3 b, 3 c). W zakresie stężeń DHTz  $20\text{-}40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  mieszaniny reakcyjnej nie zanotowano istotnych różnic w stosunku do układu kontrolnego. Szybkość maksymalna reakcji enzymatycznej utrzymywała się na poziomie  $8 \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .



Rys. 3. Oznaczenia enzymatyczne. Aktywność fosfatazy kwaśnej w próbkach gleby w obecności DHTz (A, B, C) oraz aktywność dehydrogenaz w glebie (D). A – układ kontrolny – próbki gleby bez DHTz, B – próbka gleby z DHTz (20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), C – maksymalna szybkość powstawania produktu aktywności fosfatazy kwaśnej w próbkach gleby przy różnym stężeniu DHTz; ciągłą linią zaznaczono przebieg badanej zależności według modelu Michaelisa-Menten; D – aktywność dehydrogenaz w glebie w obecności DHTz i BDMPT (375 i 750  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Zaznaczono odchylenia standardowe

Fig. 3. Enzymatic analyses. Activity of acid phosphatase in soil samples with DHTz (A, B, C) and activity of dehydrogenases in soil (D). A – control – soil samples without DHTz, B – soil sample with DHTz (20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), C – maximal activity of acid phosphatase in soil with a different concentration of DHTz; solid line marks the course of the investigated dependence according to Michaelis-Menten model; D – activity of dehydrogenases in soil with DHTz and BDMPT (375 and 750  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Standard deviations have been marked

Zwiększenie stężenia DHTz do 83 i 104  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  powodowało znaczny spadek szybkości reakcji, do poziomu odpowiednio 6 i 5  $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . W przypadku aktywności fosfatazy kwaśnej w glebie w obecności BDMPT oraz DMPDHT nie zanotowano zmian w stosunku do układu kontrolnego w zakresie badanych stężeń. W prezentowanym układzie eksperymentalnym zatem DHTz wykazała właściwości zmniejszające aktywność fosfatazy kwaśnej w glebie, w przeciwieństwie do BDMPT. Odwrotną zależność stwierdzono podczas oznaczania aktywności dehydrogenaz w glebie (rys. 3 d). W tym przypadku BDMPT wykazywała znacznie większy efekt hamujący w porównaniu z DHTz. Jest to interesujące w kontekście wcześniej prezentowanych wyników, jednak przy interpretacji otrzymanych danych trzeba mieć na uwadze także rolę samej próbki glebowej i jej

właściwości. Można przypuszczać, że o ile DHTz wykazuje znaczny efekt toksyczny w czystych hodowlach szczepów bakterii glebowych, o tyle w samej glebie już nie musi dochodzić do tak silnych oddziaływań na mikroorganizmy i – co za tym idzie – na aktywność dehydrogenaz. Może być to związane z większą adsorpcją DHTz do cząstek glebowych, jak również z większą nietrwałością tego związku w glebie. Przeciwnie BDMPT – z powodu np. słabszej adsorpcji do powierzchni cząstek glebowych może silniej oddziaływać na mikroorganizmy gleby i zmniejszać w ten sposób aktywność dehydrogenaz. Proponowane tu wytłumaczenie tego efektu jest tylko teoretycznym założeniem, brakuje bowiem literatury na temat adsorpcji badanych pochodnych tetrazyny do cząstek glebowych i biomasy, a także na temat ich stabilności w glebie. Znaczna część dostępnych prac skupia się na możliwościach biodegradacji związków nitroaromatycznych i innych bogatych w azot przez mikroorganizmy glebowe. Dla niektórych związków nitroaminowych, takich jak RDX, HMX i CL-20, opracowano potencjalne szlaki biodegradacji, jakim podlegają one w warunkach laboratoryjnych (FOURNIER i IN. 2002, CROCKER i IN. 2006). Biodegradacja związków nitroaromatycznych oraz możliwość bioremediacji środowisk nimi zanieczyszczonych została jeszcze lepiej zbadana (SPAIN 1995, RODGERS i BUNCE 2001, SNELLINX i IN. 2002), jednak w dalszym ciągu brakuje prac określających wpływ tego typu związków na środowisko glebowe.

## Podsumowanie

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że największą toksycznością w stosunku do dwóch wyizolowanych z gleby szczepów bakterii charakteryzowała się 3,6-dihydrazynotetrazyna (DHTz), a znacznie mniejszą BDMPT. Wydłużenie trwania lagfazy w hodowli *Bacillus halodurans* w obecności DHTz potwierdza dodatkowo antibakteryjny charakter tego związku. Badania aktywności fosfatazy kwaśnej w obecności pochodnych tetrazyny pokazały, że jedynie DHTz wykazuje hamujący wpływ na tempo reakcji katalizowanej przez ten enzym. Z kolei w badaniach nad aktywnością dehydrogenaz w glebie stwierdzono, że DHTz nie wykazuje znacznych efektów hamujących, w przeciwieństwie do BDMPT, co może być spowodowane różną trwałością tych związków w glebie, jak i różnym stopniem adsorpcji do cząstek glebowych.

## Literatura

- BHUSHAN B., HALASZ A., SPAIN J., HAWARI J., 2002. Diaphorase catalyzed biotransformation of RDX via N-denitration mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 779-784.
- BHUSHAN B., PAQUET L., SPAIN J.C., HAWARI J., 2003. Biotransformation of 2,4,6,8,10,12-hexanitro-2,4,6,8,10,12-hexaazaisowurtzitane (CL-20) by denitrifying *Pseudomonas* sp. strain FA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5216-5221.
- CASIDA L.E., KLEIN D.A., SANTORO T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98: 371-376.
- CHAVEZ D., HISKEY M., GILARDI D., 2000. 3,3'-Azobis(6-amino-1,2,4,5-tetrazine): a novel high-nitrogen energetic material. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39: 1791-1793.
- COBURN M., HISKEY M., LEE K., OTT D., STINECIPHER M., 1993. Oxidation of 3,6-diamino-1,2,4-tetrazine and 3,6-bis(S,S-dimethylsulfilimino)-1,2,4,5-tetrazine. *J. Heterocycl. Chem.* 30: 1593-1595.

- CROCKER F.H., INDEST K.J., FREDRICKSON H.L., 2006. Biodegradation of the cyclic nitroamine explosives RDX, HMX, and CL-20. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 274-290.
- FOURNIER D., HALASZ A., SPAIN J., FIURASEK P., HAWARI J., 2002. Determination of key metabolites during biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine with *Rhodococcus* sp. strain DN22. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 166-172.
- JAIN R.K., KAPUR M., LABANA S., LAL B., SARMA P.M., BHATTACHARYA D., THAKUR I.S., 2005. Microbial diversity: application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Curr. Sci. (Bangalore)* 89, 1: 101-112.
- KHAN M.W.Y., MUSTAFA J., RAUF A., SAEED M.T., OSMAN S.M., 1992. Long-chain derivatives with a hexahydrothioxotetrazine moiety as potential antimicrobial agents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 11: 1160-1161.
- MARCUS H., REMANICK A., 1963. The reaction of hydrazine with 3,6-diamino-s-tetrazine. *J. Org. Chem.* 28, 9: 2372-2375.
- PANDEY S.K., SINGH A., SINGH A., NIZAMUDDIN, 2009. Antimicrobial studies of some novel quinazolinones fused with [1,2,4]-triazole, [1,2,4]-triazine and [1,2,4,5]-tetrazine rings. *Eur. J. Med. Chem.* 44: 1188-1197.
- PARODI S., FLORA S.D., CAVANNA M., PINO A., ROBBIANO L., BENNICELLI C., BRAMBILLA G., 1981. DNA-damaging activity *in vivo* and bacterial mutagenicity of sixteen hydrazine derivatives as related quantitatively to their carcinogenicity. *Cancer Res.* 41: 1469-1482.
- POSO A., VON WRIGHT A., GYNTHNER J., 1995. An empirical and theoretical study on mechanisms of mutagenic activity of hydrazine compounds. *Mutat. Res.* 332: 63-71.
- RODGERS J.D., BUNCE N.J., 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Res.* 39, 5: 2101-2111.
- ROGAN E.G., WALKER B.A., GINGELL R., NAGEL D.L., TOTH B., 1982. Microbial mutagenicity of selected hydrazines. *Mutat. Res.* 102: 413-424.
- SNELLINX Z., NEPOVIM A., TAGHAVI S., VANGRONSVELD J., VANEK T., VAN DER LELIE D., 2002. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 1: 48-61.
- SPAIN J.C., 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 523-555.
- ZHAO J.-S., SPAIN J., HAWARI J., 2003. Phylogenetic and metabolic diversity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)-transforming bacteria in strictly anaerobic mixed cultures enriched on RDX as nitrogen source. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46: 189-196.

## INFLUENCE OF 1,2,4,5-TETRAZINE DERIVATIVES ON GROWTH OF SOIL BACTERIA AND SOIL ENZYMATIC ACTIVITY

**Summary.** The paper presents the results of laboratory studies of the influence of tetrazine derivatives on the growth of bacteria isolated from soil: *Bacillus halodurans* and *Pseudomonas stutzeri*. 3,6-Dihydrazinotetrazine (DHTz), 3,6-bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)-dihydro-1,2,4,5-tetrazine (DMPDHT) and N,N'-bis(1,2,4,5-tetrazine-6-(3,5-dimethylpirazylo))hydrazine (BDMPT) were applied. 3,6-Dihydrazinotetrazine had the largest influence on the growth of isolated bacteria, reflected in a significant lengthening of the lag-phase. This compound had also the largest toxicity in relation to other investigated compounds. Acid phosphatase and dehydrogenase activity were also determined in soil exposed to the tetrazine derivatives.

**Key words:** enzymatic activity, soil bacteria, tetrazines



Borkowski A., Szala M., 2010. Wpływ pochodnych 1,2,4,5-tetrazyny na wzrost bakterii glebowych oraz aktywność enzymatyczną w glebie. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #70.

---

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

*Andrzej Borkowski, Katedra Ochrony Środowiska i Zasobów Naturalnych, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa, Poland, e-mail: andrzejborkowski2@gmail.com*

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print:*

*18.10.2010*

*Do cytowania – For citation:*

*Borkowski A., Szala M., 2010. Wpływ pochodnych 1,2,4,5-tetrazyny na wzrost bakterii glebowych oraz aktywność enzymatyczną w glebie. *Nauka Przyr. Technol.* 4, 6, #70.*