

EKOTOKSYCZNOŚĆ I FITOTOKSYCZNOŚĆ ŚRODKÓW OCHRONY ROŚLIN WOBEC GRZYBÓW RYZOSFEROWYCH I SIEWEK PSZENICY OZIMEJ

Anna Daria Stasiulewicz-Paluch¹, Urszula Wachowska¹

¹ Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie, ul. Prawocheńskiego 17, 10-721 Olsztyn, e-mail: urszula.wachowska@uwm.edu.pl

STRESZCZENIE

Procedura rejestracji środków ochrony roślin wymaga analizy ich ubocznego działania na mikroorganizmy glebowe. Do gleby trafia najczęściej pozostałości tych preparatów, jednak ich oddziaływanie na grzyby jest stosunkowo słabo poznane. W badaniach prowadzonych w warunkach szklarniowych oceniono wpływ wybranych środków ochrony roślin na liczebność grzybów zasiedlających ryzosferę siewek pszenicy ozimej oraz rozwój roślin. Zastosowane środki ochrony roślin działały inhibicyjnie na ryzosferowe grzyby strzępkowe, drożdże były odporne na ich doglebową aplikację. Tebukonazol wyróżnił się najsilniejszym redukcyjnym działaniem wobec grzybów strzępkowych, a propikonazol wykazywał największą fitotoksyczność w stosunku do siewek pszenicy ozimej. Azoksystrobina miała najsłabsze działanie eko- i fitotoksyczne, po jej aplikacji w glebie najczęściej bardzo dynamicznie wzrastała liczba grzybów rodzaju *Acremonium*.

Słowa kluczowe: fungicydy, stymulator i regulator wzrostu roślin, chitozan, gleba, *Acremonium* spp., drożdże.

ECOTOXICITY AND PHYTOTOXICITY OF PLANT PROTECTION PRODUCTS TO RHIZOSPHERE FUNGI AND WINTER WHEAT SEEDLINGS

ABSTRACT

Registration of plant protection products involves the analysis of their effects on soil microorganisms. The residues of plant protection products penetrate the soil, but their impact on fungi remains scarcely researched. In this study, the influence of selected plant protection products on the abundance of rhizosphere-dwelling fungi and the growth of winter wheat seedlings was evaluated under greenhouse conditions. The analysed plant protection products had an inhibitory effect on the growth of filamentous fungi in the rhizosphere, whereas yeasts were resistant to those products applied to soil. Tebuconazole exerted the strongest suppressive effect on the growth of filamentous fungi, and propiconazole was characterized by the greatest phytotoxic activity against winter wheat seedlings. Azoxystrobin had the weakest ecotoxic and phytotoxic effects, and its application to soil usually led to a rapid increase in the counts of fungi of the genus *Acremonium*.

Keywords: fungicides, plant growth stimulator and regulator, chitosan, soil, *Acremonium* spp., yeasts.

WSTĘP

Zgodnie z obowiązującymi wytycznymi, podczas procedury rejestracji środków ochrony roślin, w tym fungicydów, badany jest ich uboczny wpływ na mikroorganizmy glebowe [Cycóń i in. 2010, Rozporządzenia 1907/2006, 1107/2009]. Oddziaływanie preparatów fungicydowych i biotechnicznych na mikroorganizmy związane z rośliną uprawną niebędące przedmiotem ich zwalczania jest słabo poznane, na ogół fungicydy silniej modyfikują ich rozwój niż pre-

paraty biotechniczne [Sapieha-Waszkiewicz i in. 2010]. Poszczególne fungicydy różnią się między sobą budową chemiczną, sposobem działania na patogeny, a także trwałością i sposobem zachowania w środowisku. Triazole są największą klasą fungicydów stosowaną powszechnie w medycynie i rolnictwie. W badaniach Kim i innych [2002] wykazano, że pozostałości propikonazolu utrzymywały się w górnych warstwach gleby i jego duża część wiązała się z jej agregatami, stąd związek ten należy uznać za długo zalegający w środowisku (okres połowicznego rozkładu szaco-

wany jest na 214 dni). Skłania to do podejmowania badań modelowych nad zachowaniem innych triazoli (tebukonazolu i penkonazolu) w środowisku na podstawie budowy i właściwości chemicznych tych związków [Čadková i in. 2013]. Syntetyczne strobiluryny weszły do powszechnego stosowania w latach 90-tych i od tego czasu cieszą się dużą popularnością [Sauter i in. 1999, Wachowska 2010]. Strobiluryny charakteryzują się małą trwałością, okres połowicznego rozkładu trifloksystrobiny w glebie według Wang i innych [2015] wynosi 0,54 i 8,80 dni, w zależności od rodzaju gleby. Fungicydy benzimidazolowe zostały wprowadzone na rynek w 1960 roku a na początku 1970 zakres ich stosowania obejmował zabiegi nalistne, zaprawianie nasion, stosowano je także po zbiorach [Sauter i in. 1999]. Trwałość tiofanatu metylu w glebie jest uzależniona od aktywności bakterii glebowych, okres jego połowicznego rozkładu DT_{50} Cycoń i inni [2011] oszacowali na poziomie 6,3 i 5,1 dnia. Produktem rozkładu tego związku jest karbendazym, a następnie 2-aminobenzimidazol. Biologiczna i fizykochemiczna degradacja środków ochrony roślin zachodzi głównie w glebie. Szacuje się także, że właśnie do tego środowiska trafia najwięcej pozostałości środków ochrony roślin [Komańek i in. 2010, Muñoz-Leoz i in. 2011, 2013], a ich oddziaływanie na grzyby jest stosunkowo słabo poznane [Adetutu i in. 2008]. Celem badań była ocena wpływu wybranych środków ochrony roślin na grzyby zasiedlające ryzosferę siewek pszenicy ozimej oraz analiza ich fitotoksycznego oddziaływania na rośliny.

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Do doniczek o wymiarach 4,5×4,5 cm, wypełnionych 36 gramami ziemi ogrodniczej wymieszanej z piaskiem w proporcjach 1:1, wysiano po pięć, powierzchniowo odkażonych 1% podchlorynem sodu, ziarniaków pszenicy ozimej odmiany Bogatka. Po 14 dobach rozwoju roślin, wyrastające siewki inokulowano, poprzez podlewanie, zawiesiną izolatu *Aureobasidium pullulans*. Do każdej doniczki wprowadzono po 20 cm³ zawiesiny jego komórek o gęstości 2° w skali McFarlanda. Po kolejnych 48 godzinach wzrostu siewki pszenicy ozimej potraktowano wybranymi środkami ochrony roślin. Preparaty w doświadczeniu wprowadzono dogłębowo do doniczek w dawkach roboczych (rob), podanych w tabeli 1.

Dodatkowo do każdego dolka wprowadzono po 20 cm³ czystych preparatów (cz). Zastosowano także dziesięciokrotność dawki roboczej (10×) oraz 50 krotność tej dawki (50×). Doświadczenie założono w pięciu powtórzeniach. Kontrolę stanowił siewki podlewane wodą.

W eksperymencie zastosowano fungicydy, regulator wzrostu roślin, stymulator wzrostu roślin oraz induktor odporności roślin wymienione i scharakteryzowane w tabeli 1. Azoksystrobina o współczynniku połowicznego rozkładu w glebie (DT_{50}) oszacowanym na poziomie 78 dni, jest związkiem stosunkowo długo rozkładającym się. Za trwałe należy uznać także flusilazol (DT_{50} = 300) i propikonazol (DT_{50} = 214). Z kolei tiofanat metylu i trineksapak etylu ulegają połowicznej degradacji w glebie już po 0,6 i 0,33 dniach. Flusilazol wyróżnia się wysoką wartością współczynnika adsorpcji skorygowanego względem zawartości węgla organicznego w glebie K_{oc} , czyli jest on substancją mającą tendencję do zalegania w glebie, nie podatną na wymywanie i przemieszczania się w glebie wraz z wodą. Wymieniony współczynnik jest ważnym parametrem adsorpcji, który definiuje się jako stosunek substancji aktywnej w glebie do stężenia tej substancji w fazie wodnej w stanie równowagi. Współczynnik rozproszenia K_d definiowany jest jako stosunek równoważnych stężeń rozpuszczonej badanej substancji w układzie dwufazowym składającym się z sorbenta (gleba) i fazy wodnej. Współczynnik adsorpcji Freundlicha K_f jest to stężenie danej substancji w glebie, gdy równoważne stężenie w wodzie jest równe jeden. Propikonazol wyróżnił się bardzo wysokim współczynnikiem K_f (tabela 1).

Liczebność drożdży i grzybów strzępkowych w ryzosferze roślin analizowano dwukrotnie, po 48 godzinach i 8 dobach od wprowadzenia do doniczek testowanych preparatów. Do izolacji zastosowano technikę posiewu wgłębnego odpowiednich rozcieńczeń glebowych na płytki Petriego [Wachowska i in. 2006, Martyniuk, Martyniuk 2003]. Z każdej kombinacji pobrano dwukrotnie po 10 g korzeni wraz z przykorzeniową warstwą gleby. Pobrany materiał przełożono do 250 cm³ kolb wypełnionych 90 cm³ sterylnej wody i wytrząsano 40 minut na wytrząsarce stołowej typu 358 S (Elpin, Polska, 180 rpm). Następnie uzyskaną zawiesinę wodną rozcieńczono czterokrotnie. Pipetą naniesiono po 100 μl zawiesiny na płytki Petriego, które wypełniono pożywką Martina [Martin 1950]. Posiewy wykonano w trzech powtórzeniach, grzyby inkubowano 7 dni

Tabela 1. Preparaty zastosowane w doświadczeniu szklarniowym (przeliczone na ilość substancji aktywnej preparatu na 1 gram gleby), trwałość i mobilność substancji aktywnej w glebie [PPDB: Pesticide Properties DataBase, BPDB: Bio-Pesticides DataBase]

Table 1. Plant protection products used in greenhouse experiment (recalculated to active substance amount per 1 gram of soil), persistence and mobility of active substance in soil [PPDB: Pesticide Properties DataBase, BPDB: Bio-Pesticides DataBase]

Preparat	Substancja aktywna	Dawka robocza dla pszenicy ozimej (% stężenie preparatu)	Dawka robocza preparatu na 1 g gleby (mg)	Współczynnik połowicznego rozpadu w glebie DT ₅₀ (dni)	Współczynniki adsorpcji i mobilności w glebie			
					K _{d'}	K _{oc}	K _f	K _{foc}
Amistar 250 SC	azoksystrobina	1 dm ³ /ha (0,25)	34.7	78	8.39	589	7.35	423
Corbel 750 EW	fenpropimorf	1 dm ³ /ha (0,25)	34.7	35	bd*	bd	44.2	4382
Alert 375SC	karbendazym	1 dm ³ /ha (0,25)	34.7	40	bd	bd	3.4	225
	flusilazol			300	bd	1664	bd	bd
Tarcza Łan 250 EW	tebukonazol	1dm ³ /ha (0,25)	34.7	63	bd	bd	12.7	769
Topsin M 500 SC	tiofanat metylu	1,4 dm ³ /ha (0,35)	48.6	0.6	bd	bd	0.47	bd
Bumper 250 EC	propikonazol	0,5 dm ³ /ha (0,125)	17.4	214	33.7	1086	447	2252
Moddus 250 EC	trineksapak etylu	0,4 dm ³ /ha (0,1)	1.4	0.33	bd	bd	5.15	280
Asahi SL	orto-nitrofenol	0,6 dm ³ /ha (0,15)	20.8	szybki rozkład	bd			
	para-nitrofenol							
	5-nitroguajakol							
Biochikol 020 PC	chitozan	3 dm ³ /ha (0,75)	104.2	bd	bd			

* – objaśnienia w tekście, explanations in the text, ** – brak danych, no data.

w temperaturze 24 °C, a następnie policzono liczebność ich kolonii. Kontrolę stanowiła gleba ryzosferowa pochodząca z doniczek nietraktowanych preparatami. Liczebności mikroorganizmów określono stosując wzór zawarty w opracowaniu Mikš-Krajnik (2014).

Po 48 godzinach od naniesienia badanych ksenobiotyków obserwowano objawy ich fitotoksycznego oddziaływania na roślinach. Ocena przeprowadzona została według metody przedstawionej w wytycznych Międzynarodowej Organizacji Ochrony Roślin (European and Mediterranean Plant Protection Organisation, EPPO PP 1/135, 3, *Phytotoxicity assessment*). Określono liczbę roślin martwych w każdej kombinacji oraz występowania innych objawów, takich jak zmiana koloru (np. chloroza, bielienie, zmiana intensywności barwy liści, brązowienie, czerwienienie, nekrozy lub deformacje – tkanka roślinna bez uszkodzeń). Do oceny nasilenia objawów zaburzeń rozwoju siewek zastosowano 4-stopniową skalę: 0 – brak objawów fitotoksyczności, 1 – lekkie oddziaływanie fitotoksyczne, 2 – umiarkowane objawy fitotoksycznego oddziaływania środka, 3 – wyraźne oddziaływanie fitotoksyczne/roślina zamierająca.

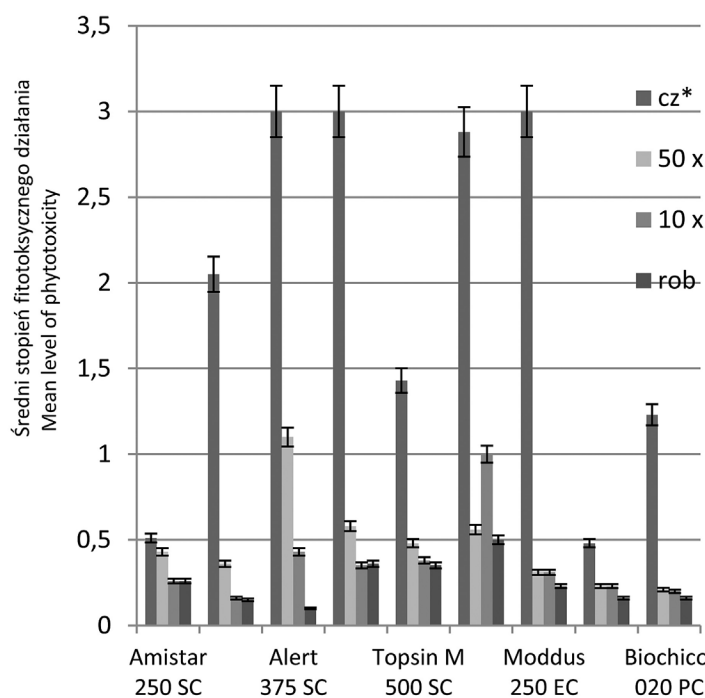
Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano z wykorzystaniem programu Statistica 9.0 [2009].

Dane liczbowe dotyczące liczebności grzybów transformowano według wzoru $\log(jtk+1)$. Wyniki przedstawiono w postaci $\log(jtk+1)$ w 1 gramie świeżej masy gleby. Dane poddano analizie wariancji, a istotność różnic między średnimi wyznaczono przy pomocy wielokrotnego testu Studenta Newmana-Keulsa (SNK).

WYNIKI

Zbiorowisko grzybów ryzosferowych było typowe dla tego środowiska, dominowały tu grzyby strzępkowe (*Acremonium* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp., *Fusarium* spp. *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Aspergillus* spp. i inne). Liczebność drożdży była mała, a gatunek *A. pullulans* wprowadzony dogłębowo słabo adaptowały się do warunków panujących w ryzosferze siewek pszenicy ozimej.

Żaden z zastosowanych preparatów w stężeniu roboczym (polowym) nie miał istotnego wpływu na liczebność drożdży w glebie ryzosferowej siewek pszenicy ozimej (tabela 2). Z kombinacji, w której zastosowano czysty fungicyd z karbendazymem i flusilazolem (Alert 375 SC) i z azoksystrobina (Amistar 250 SC) oraz prepa-



Rys. 1. Fitotoksyczne oddziaływanie środków ochrony roślin na siewki pszenicy ozimej

Fig. 1. Plant protection products phytotoxicity to winter wheat seedlings

* – objaśnienia w tekście, explanations in the text

rat Asahi SL oraz pięćdziesięciokrotność dawki roboczej preparatów Asahi SL i Moddus 250 EC wyizolowano istotnie więcej kolonii drożdży w porównaniu z kontrolą. Ten stymulujący efekt utrzymywał się także po ośmiu dniach po aplikacji dwóch pierwszych fungicydów. Dodatkowo w drugim terminie oceny z ryzosfery siewek podlewanych 10-krotnością dawki polowej fungicydu z tebukonazolem (Tarcza Łan 250 EW) uzyskano więcej kolonii drożdży w porównaniu z kontrolą.

Większość stosowanych środków ochrony roślin istotnie ograniczało rozwój zbiorowiska grzybów strzępkowych 48 godzin po ich aplikacji (tabela 1). Fungicyd zawierający tebukonazol (Tarcza Łan 250 EW) wyróżnił się silnym toksycznym działaniem na tę grupę grzybów w dawce roboczej, a także jej 10 i 50 krotności. Jednak już po kilku dniach zbiorowiska te odbudowywały się. W kilku przypadkach po zastosowaniu środków ochrony roślin w ryzosferze gromadziły się grzyby saprotroficzne rodzaju *Acremonium* lub patogeny rodzaju *Fusarium*, *Verticillium* i *Aphanocladium* (tabela 3). W przypadku azoksystrobiny (Amistar 250 SC) wzrost liczebności saprotroficznych gatunków rodzaju *Acremonium* nastąpił już po 48 godzinach od jego doglebowej aplikacji.

Oprócz azoksystrobiny (Amistar 250 SC) wszystkie fungicydy stosowane bez rozcień-

czenia wykazały fitotoksyczne działanie (rys. 1). Najbardziej toksyczny okazał się propikonazol (Bumper 250 SC), ograniczający rozwój roślin we wszystkich testowanych stężeniach. Większość stosowanych preparatów zaburzała rozwój siewek pszenicy po zastosowaniu pięćdziesięciokrotności dawki roboczej, wyjątek stanowiły preparaty biotechniczne (Moddus 250 EC, Asahi SL i Biochicol 020 PC).

DYSKUSJA

W prezentowanych badaniach liczebność drożdży w glebie ryzosferowej była mała a wprowadzenie doglebowe zawiesiny izolatu *A. pullulans* tylko w niewielkim stopniu wpłynęło na zwiększenie liczebności drożdży w tym środowisku. We wcześniejszym opracowaniu Glushakova i innych [2011] odnotowano, że w środowisku naturalnym drożdże liczniej zasiedlają powierzchnię roślin niż glebę, a oba zbiorowiska drożdży są całkowicie odmienne. Zbiorowisko grzybów strzępkowych uzyskane w prezentowanych badaniach nie odbiegało od wcześniej opisywanych zbiorowisk w tym środowisku [Majchrzak i in. 2008].

W naszych badaniach celowo rozpatrywany był przypadek skrajny, w którym doszłoby do

Tabela 2. Liczebność zbiorowisk drożdży i grzybów strzępkowych w glebie ryzosferowej siewek pszenicy ozimej traktowanych środkami ochrony roślin

Table 2. Abundance of yeast and filamentous fungi communities originating from treated winter wheat seedling rhizosphere

Preparat	Stężenie preparatu	Drożdże		Grzyby strzępkowe	
		po 48 godzinach	po 8 dniach	po 48 godzinach	po 8 dniach
		Log (jtk*+1) w 1 gramie świeżej masy gleby			
Kontrola	0	0,00 ^{a**}	0,00 ^a	5,78 ^b	5,96 ^{cde}
Amistar 250 SC	cz ^{***}	3,65 ^{ab}	6,47 ^b	5,23 ^b	6,91 ^e
	50 x	1,87 ^{ab}	3,33 ^a	5,56 ^b	5,50 ^{be}
	10 x	0,00 ^a	5,62 ^{ab}	5,66 ^b	6,69 ^e
	rob	0,00 ^a	0,00 ^a	3,83 ^{ab}	6,85 ^e
Corbel 750 EC	cz	0,00 ^a	0,00 ^a	1,77 ^{ab}	5,10 ^{be}
	50 x	1,82 ^{ab}	1,83 ^a	0,00 ^a	5,40 ^{be}
	10 x	0,00 ^a	0,00 ^a	5,10 ^b	1,67 ^a
	rob	1,67 ^{ab}	0,00 ^a	5,49 ^b	3,43 ^{ab}
Alert 375 SC	cz	5,26 ^b	6,65 ^b	3,33 ^{ab}	5,30 ^{be}
	50 x	3,53 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	3,57 ^{abc}
	10 x	1,67 ^{ab}	1,67 ^a	5,52 ^b	6,19 ^e
	rob	0,00 ^a	1,67 ^a	5,20 ^b	6,32 ^e
Tarcza Łan 250 EW	cz	3,63 ^{ab}	1,67 ^a	3,43 ^{ab}	6,34 ^e
	50 x	0,00 ^a	1,83 ^a	0,00 ^a	6,66 ^e
	10 x	0,00 ^a	6,22 ^b	0,00 ^a	7,07 ^e
	rob	0,00 ^a	1,67 ^a	0,00 ^a	3,57 ^{abc}
Topsin M 500 SC	cz	0,00 ^a	3,33 ^{ab}	3,43 ^{ab}	5,33 ^{bce}
	50 x	0,00 ^a	1,67 ^a	0,00 ^a	5,00 ^{be}
	10 x	1,77 ^{ab}	1,67 ^a	0,00 ^a	5,72 ^{be}
	rob	0,00 ^a	3,33 ^{ab}	3,59 ^{ab}	6,03 ^{de}
Bumper 250 EC	cz	3,75 ^{ab}	0,00 ^a	1,77 ^{ab}	5,70 ^{be}
	50 x	0,00 ^a	0,00 ^a	3,33 ^{ab}	5,10 ^{be}
	10 x	1,77 ^{ab}	1,67 ^a	3,43 ^{ab}	6,24 ^e
	rob	1,95 ^{ab}	0,00 ^a	3,43 ^{ab}	6,59 ^e
Moddus 250 EC	cz	3,53 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	3,65 ^{a-d}
	50 x	5,42 ^b	0,00 ^a	3,43 ^{ab}	5,20 ^{b-e}
	10 x	3,43 ^{ab}	0,00 ^a	5,42 ^b	5,30 ^{be}
	rob	3,72 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	5,10 ^{b-e}
Asahi SL	cz	5,20 ^b	0,00 ^a	3,33 ^{ab}	5,10 ^{b-e}
	50 x	5,66 ^b	5,48 ^{ab}	3,33 ^{ab}	6,28 ^e
	10 x	3,33 ^{ab}	6,01 ^{ab}	1,77 ^{ab}	6,61 ^e
	rob	0,00 ^a	0,00 ^a	3,59 ^{ab}	5,20 ^{b-e}
Biochicol 020 PC	cz	0,00 ^a	0,00 ^a	5,20 ^b	5,30 ^{b-e}
	50 x	0,00 ^a	0,00 ^a	3,59 ^{ab}	5,30 ^{be}
	10 x	1,67 ^{ab}	0,00 ^a	3,49 ^{ab}	5,59 ^{cde}
	rob	0,00 ^a	1,67 ^a	1,77 ^{ab}	6,79 ^e

* – jednostki tworzące kolonie (jtk), colony forming units (cfu)

** – jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie w kolumnach według testu Newmana Keulsa (p=0,001). Values with no significant differences in columns according to Newman Keuls (p=0.001) were marked with the same letter ,

*** – objaśnienia w tekście, explanations are in the text

Tabela 3. Struktura zbiorowiska grzybów strzępkowych zasiedlających ryzosferę siewek pszenicy ozimej traktowanej środkami ochrony roślin**Table 3.** Structure of filamentous fungi community originating from treated winter wheat seedling rhizosphere

Preparat	Stężenie preparatu	<i>Acremonium</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.		Patogeny*		<i>Mucor</i> spp.		<i>Trichoderma</i> spp.	
		48 h	8 dni	48 h	8 dni	48 h	8 dni	48 h	8 dni	48 h	8 dni
Liczba kolonii w 1 gramie świeżej masy gleby											
Kontrola	0		12	1		15		4			2
Amistar 250 SC	cz **	217		9							
	50 x		2	3		1	1				
	10 x	162		6				5		1	
	rob	1	92	4	3					1	
Corbel 750 EC	cz			1	2						
	50 x								1		
	10 x	1	3	1		2		1			
	rob		2			2					
Alert 375 SC	cz		31								1
	50 x				5			3			
	10 x	5	10		1						
	rob	45	45							1	1
Tarcza Łan 250 EW	cz		40								
	50 x		150						1		
	10 x							1			
	rob		5		2						
Topsin M 500 SC	cz	4	5								
	50 x		3		3						
	10 x		3		2		2				
	rob	16		1							
Bumper 250 EC	cz		1								
	50 x				50			1			
	10 x			1	1		15		1		
	rob		65					2			
Moddus 250 EC	cz				3				1		
	50 x	1		1	1		1	1			
	10 x	1			1						
	rob				2				1		
Asahi SL	cz			2	2			1			
	50 x		1				1				
	10 x	80						1			
	rob	3			2			1	1		
Biochicol 020 PC	cz						5				
	50 x		6		2			4			
	10 x	31	7	1				1			
	rob	64		1			100		1		

* - *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Aphanocladium* spp.; ** - objaśnienia w tekście, explanations in the text

silnego zanieczyszczenia środowiska glebowego środkiem ochrony roślin podczas czyszczenia opryskiwacza lub niekontrolowanego wylania środka ochrony roślin z wadliwego opakowa-

nia. Drożdże ryzosferowe były pobudzane do rozwoju po wprowadzeniu wyższych koncentracji wybranych preparatów, co pośrednio prowadzi możliwości wykorzystania tych miesza-

nin związków przez badane mikroorganizmy jako źródło węgla w tym środowisku. Badania Salam i innych [2014] wykazały, że szczep drożdży *Candida* sp. VITJzN04 wyizolowany z trzciny cukrowej może wykorzystać lindan (insektycyd) jako jedyne źródło węgla do wzrostu w pożywce mineralnej. Związek ten (600 mg L^{-1}) był degradowany w ciągu sześciu dni, a po wprowadzeniu do podłoża mineralnego H_2O_2 w ciągu trzech dni. Cytowani autorzy dowiedli, że w proces degradacji lindanu zaangażowane były liczne enzymy: dechlorinaza, dehalogenaza, dichlorohydrochinon i peroksydazy. Drożdże wymieniane są także jako mikroorganizmy zdolne do degradacji atrazyny (*Pichia kudriavzevi*), jednak ich potencjał do biodegradacji środków ochrony roślin jest niewielki w porównaniu z bakteriami [Verma i in. 2014]. W naszych badaniach na uwagę zasługiwał także grzyb strzępkowy rodzaju *Acremonium* izolowany obficie po zastosowaniu niektórych fungicydów. Ma i inni [2015] opisali izolat *Acremonium* sp., który współdziałając w konsorcjum z izolatem *B. subtilis* był niezwykle efektywny w biodegradacji oleju w glebie.

Należy zauważyć, że w przeprowadzonych badaniach ze względu na stosowanie dogłębne preparatów nie uwzględniono intercepcji, czyli procesu zatrzymywania wody opadowej przez szatę roślinną, która w przypadku zbóż ozimych wynosi od 0 do nawet 90% [FOCUS 2000]. Jednak wyniki uzyskane w tym eksperymencie, z uwagi na szerokie spektrum zastosowanych środków ochrony roślin, mogą stać się przyczynkiem do poznania oddziaływania fungicydów na grzyby ryzosferowe. Systemy biologiczne do biodegradacji środków ochrony roślin, opracowywane w wielu krajach Unii Europejskiej, powinny chronić zbiorniki wód przed zanieczyszczeniem fungicydami i innymi preparatami na poziomie gospodarstwa, głównie w trakcie czyszczenia i napełniania opryskiwaczy. Doświadczenie laboratoryjne przeprowadzone przez Coppola i innych [2011] z mieszaniną kompostu, słomy i mikroorganizmów oraz fungicydów, stosowanych najczęściej w winnicach, udowodniły dużą skuteczność tej mieszanki w degradacji wprowadzonych ksenobiotyków. Po zakończeniu doświadczenia (po 112 dniach) stężenie większość pestycydów było zbliżone do zera, a bioróżnorodność drobnoustrojów po dodaniu środków grzybobójczych zmieniała się [Coppola i in. 2011].

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W prezentowanych badaniach propikonazol i fenprppimorf najprawdopodobniej były słabo dostępne dla mikroorganizmów glebowych. Wynikało to z małej mobilności tych preparatów w glebie, o czym świadczyły wysokie współczynniki K_{loc} wynoszące kolejno 2252 i 4382. Po ośmiu dobach z gleby ryzosferowej traktowanej tymi fungicydami nie wyosobniono kolonii drożdży. Dodatkowo propikonazol wyróżnia się bardzo długim okresem połowicznego rozpadu (214 dni), co przyczyniało się do długiego zalegania tego fungicydu w glebie. Stąd siewki pszenicy ozimej rosnące w jego obecności gorzej się rozwijały a istotne fitotoksyczne oddziaływanie tego fungicydu było widoczne we wszystkich zastosowanych stężeniach.

W badaniach wykazano, że środki ochrony roślin działają redukcyjnie na ryzosferowe grzyby strzępkowe, a drożdże są odporne na ich dogłębnową aplikację. Silne ekotoksyczne działanie preparatów na ogół korelowało z ich dużą fitotoksycznością w stosunku do siewek pszenicy ozimej.

LITERATURA

1. Adetutu E.M., Ball A.S., Osborn A.M., 2008. Azoxystrobin and soil interactions: degradation and impact on soil bacterial and fungal communities. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1777–1790.
2. Čadková E., Komárek M., Debord J., Puppa L.D., Bordas F., Bollinger J.C. 2013. pKa constant determination of two triazole pesticides: tebuconazole and penconazole. *J Solution Chem*, 42, 1075–1082.
3. Coppola L., Comitini F., Casucci C., Milanovic V., Monaci E., Marinozzi M., Vischetti C. 2011. Fungicides degradation in an organic biomixture: impact on microbial diversity. *New Biotechnology*, 29 (1), 99–106.
4. Cycoń M., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z. 2011. Biodegradation kinetics of the benzimidazole fungicide thiophanate-methyl by bacteria isolated from loamy sand soil. *Biodegradation*, 22, 573–583.
5. Focus, 2000. FOCUS groundwater scenarios in the EU review of active substances. Report of the FOCUS Groundwater Scenarios Workgroup, EC Document Reference Sanco/321/2000 rev.2, 202.
6. Glushakova M., Kachalkin A.V., Chernov I. Y. 2011. Specific Features of the Dynamics of Epiphytic and Soil Yeast Communities in the Thickets of Indian Balsam on Mucky Gley Soil. *Eurasian Soil Science*, 44 (8), 886–892.

7. Kim I.S., Beaudette L.A., Shim J.H., Trevors J.T., Suh Y.T. 2002. Environmental fate of the triazole fungicide propiconazole in a rice-paddy-soil lysimeter. *Plant and Soil*, 239, 321–331.
8. Komárek M., Čadková E., Chrástný V., Bordas F., Bollinger J.C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment International*, 36(1), 138–151.
9. Ma X.-K., Ding N., Peterson E.C. 2015. Bioaugmentation of soil contaminated with high-level crude oil through inoculation with mixed cultures including *Acromonium* sp. *Biodegradation*, 26, 259–269.
10. Majchrzak B., Kurowski T., Okorski A., 2008. Fungi isolated from the roots and stem bases of spring wheat grown after different cruciferous plants as forecrops. *Polish Journal of Natural Sciences*, 23 (2), 299–309
11. Martin J.P. 1950. Use of acid, rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi, *Soil Science*, 38, 215–220.
12. Martyniuk S., Martyniuk M. 2003. Occurrence of *Azotobacter* spp. in Polish soil *Polish Journal of Environmental Studies*, 12 (3), 371–374.
13. Mikš-Krajník M. 2014. Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii. [www.uwm.edu.pl/wnz/v3/fck_files/MZ_TZ_rokII_cw1\(1\)](http://www.uwm.edu.pl/wnz/v3/fck_files/MZ_TZ_rokII_cw1(1))
14. Muñoz-Leoz B., Ruiz-Romera E., Antigüedad I., Garbisu C. 2011. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(10), 2176–2183.
15. Muñoz-Leoz B., Garbisu C., Charcosset J.Y., Sánchez-Pérez J.M., Antigüedad I., Ruiz-Romera E. 2013. Non-target effects of three formulated pesticides on microbially-mediated processes in a clay-loam soil. *Science of the Total Environment*, 449, 345–354.
16. Rozporządzenie (WE) NR 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) i utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów.
17. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczącym dopuszczania do obrotu środków ochrony roślin.
18. Salam A.J., Nilanjana Das N. 2014. Lindane degradation by *Candida* VITJzN04, a newly isolated yeast strain from contaminated soil: kinetic study, enzyme analysis and biodegradation pathway. *World J Microbiol Biotechnol*, 30, 1301–1313.
19. Sapięha-Waszkiewicz A., Marjańska-Cichoń B., Miętkiewski R., 2010. Porównanie wpływu preparatów biotechnicznych Biocos S, Biosept 33 SL i syntetycznych pestycydów na kiełkowanie zarodników grzybów owadobójczych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 46, 117–125.
20. Sauter H., Steglich W., Anke T. 1999. Strobilurine: evolution einer neuen wirkstoffklasse. *Angew Chemie*, 111, 1416–1438.
21. Verma J.P., Jaiswal D.K., Sagar R. 2014. Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 13, 429–466.
22. Wachowska U. 2010. Charakterystyka fungicydów strobilurynowych z uwzględnieniem problemu odporności fitopatogenów (artykuł przeglądowy). *Postępy Nauk Rolniczych*, 30, 77–88.
23. Wachowska U., Okorski A., Głowacka K. 2006. Population structure of microorganisms colonizing the soil environment of winter wheat. *Plant, Soil and Environ*, 52, 39–44.
24. Wang C., Wu J., Zhang Y., Wang K., Zhang H. 2015. Field dissipation of trifloxystrobin and its metabolite trifloxystrobin acid in soil and apples. *Environ Monit Assess* (2015) 187, 4100 DOI 10.1007/s10661-014-4100-3.
25. Wytyczne EPP0 PP 1/135(3), Phytotoxicity assessment. W: *Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin* 2014 44 (3), 265–273.