

Krzysztof FRĄCZEK¹, Helena BIS¹, Jacek GRZYB¹, Dariusz ROPEK²
i Jerzy WIECZOREK³

WYSTĘPOWANIE GRZYBÓW TOKSYNOTWÓRCZYCH I PATOGENNYCH NA POWIERZCHNI NASION ORAZ BULW ROŚLIN ROLNICZYCH UPRAWIANYCH W OKOLICY SKŁADOWISKA ODPADÓW KOMUNALNYCH

OCCURRENCE OF TOXIN FORMING AND PATHOGENIC FUNGI ON THE SURFACE OF SEEDS AND TUBERS OF PLANTS CULTIVATED IN THE VICINITY OF MUNICIPAL LANDFILL SITE

Abstrakt: Badania związane z tematem pracy prowadzono w warunkach doświadczenia polowego założonego w sąsiedztwie składowiska komunalnego w Tarnowie. Próbkę nasion pszenicy i bobiku oraz bulw ziemniaka do badań pobierano w okresie zbioru plonów (w latach 2006 i 2007), z poletek doświadczalnych położonych z każdej strony od badanego obiektu, w dwóch strefach 50-200 i 250-500 metrów od jego granic. Jak wynika z uzyskanych danych, występowanie najwyższej średniej liczebności grzybów mikroskopowych - *Micromycetes* odnotowano na powierzchni bulw ziemniaków 382 jtk/g⁻¹ suchej masy (min 10 - max 1100 jtk/g⁻¹), a najniższej na nasionach pszenicy 201 jtk/g⁻¹ (min 10 - max 900 jtk/g⁻¹). Wśród wyizolowanych grzybów pleśniowych stwierdzono szczepy potencjalnie toksynotwórcze np.: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium rugulosum* czy *Trichoderma viride*. Najsilniejszym działaniem fitotoksycznym odznaczały się szczepy: *Alternaria alternata*, *Penicillium rubum* i *Penicillium lanosum* (wyizolowane z bulw ziemniaków), a najslabszym działaniem szczepy *Alternaria alternata* i *Fusarium oxysporum* (wyizolowane z nasion pszenicy). Choroby grzybowe atakujące nasiona i bulwy występowały w największym nasileniu na roślinach uprawianych na terenie zrehabilitowanego sektora oraz w bezpośrednim sąsiedztwie czynnego sektora składowiska.

Słowa kluczowe: grzyby toksynotwórcze, składowisko odpadów komunalnych, bulwy ziemniaka, ziarno pszenicy
jarej

Wprowadzenie

Składowiska odpadów komunalnych lokalizowane są poza terenem zabudowanym. Powoduje to, że w wielu przypadkach znajdują się one w pobliżu pól uprawnych. Z terenu składowiska emitowane są znaczne ilości szkodliwych związków, takich jak: pyły wzbogacone w metale ciężkie, związki organiczne, związki nieorganiczne azotu, siarki, węgla i inne, a także bioaerozole, które w swoim składzie mogą zawierać grzyby i ich wtórne metabolity zwane mikotoksynami [1]. Są to najczęściej niskocząsteczkowe substancje, w stosunku do których organizm nie może wytworzyć żadnych przeciwciał. Większość z nich jest stabilna w środowisku naturalnym i zabiegi fizyczne nie powodują ich degradacji [2]. Obok działania toksycznego, związki te wykazują również właściwości rakotwórcze, mutagenne, teratogenne i estrogenne, a ich szkodliwe działanie stwierdza się już w przypadku występowania w niewielkich stężeniach. Substancje te mogą powstawać

¹ Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy, al. A. Mickiewicza 24/28, 30-058 Kraków, email: rfracze@cyf-kr.edu.pl

² Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego, Uniwersytet Rolniczy, al. A. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków, tel. 12 662 44 02, email: rropek@cyf-kr.edu.pl

³ Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej, Uniwersytet Rolniczy, al. A. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków, tel. 12 662 43 49, email: rrwieczo@cyf-kr.edu.pl

w wielu produktach rolnych. Według niektórych danych, nawet 25% płodów rolnych na naszej planecie jest skażonych mikotoksynami [3]. Stąd też celem niniejszej pracy było poznanie składu potencjalnie toksynotwórczych grzybów pleśniowych - *Micromycetes* i patogennych wyizolowanych z powierzchni nasion oraz bulw roślin rolniczych uprawianych w okolicy składowiska komunalnego oraz sprawdzenie fitotoksyczności ich metabolitów.

Materiał i metody

Badania terenowe prowadzono w latach 2006-2007 w sąsiedztwie składowiska odpadów komunalnych w Tarnowie. Z każdej strony od badanego obiektu w dwóch strefach 50-200 i 250-500 metrów od jego granic wyznaczono 8 stanowisk badawczych, w których założono poletka doświadczalne. Dodatkowy punkt dziewiąty zlokalizowano na terenie sektora zrehabilitowanego składowiska odpadów. Każde poletko podzielono na mikropoletka o powierzchni 25 m². Doświadczenie założono w czterech powtórzeniach. We wszystkich punktach wysiano i wysadzono te same odmiany roślin uprawnych przy zastosowaniu tej samej agrotechniki. Na poletkach wysiano bobik odmiany Nadwiślański, pszenicę jarą odmiany Żura oraz wysadzono ziemniaki odmiany Kuklik.

Próbki nasion pszenicy i bobiku oraz bulw ziemniaka do badań pobierano z każdego mikropoletka jednorazowo w latach 2006 i 2007 w okresie zbioru plonów. Pobrane próbki przewożono do laboratorium mikrobiologicznego Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, gdzie wykonano średnie próbki zbiorcze z danego poletka doświadczalnego i następnie przeprowadzono analizy mykologiczne metodą posiewu rozcieńczeń. Hodowlę grzybów prowadzono na podłożu Malt Extract Agar (MEA, Difco) w temperaturze 28°C przez 5 dni. Po okresie inkubacji liczbę jednostek tworzących kolonie jtk (*colony forming units*) przeliczono na jeden gram suchej masy nasion i bulw ziemniaka. Identyfikacja grzybów dokonywana była na podstawie analizy makro- i mikroskopowych cech kolonii, korzystając z dostępnych kluczy taksonomicznych [4-7]. Po oznaczeniu przynależności systematycznej wyizolowanych gatunków grzybów gatunki potencjalnie toksynotwórcze przeszczepiano na płynne podłoże Eldrige'a, chcąc stwierdzić fitotoksyczność ich metabolitów. Zdolność tę określono, przeprowadzając test biologiczny z nasionami zielonego groszku [8]. Hodowlę tych szczepów prowadzono w temperaturze pokojowej przez 14 dni na 100 cm³ płynnego podłoża w kolkach Erlenmayera. Jako rośliny testowej użyto nasion zielonego grochu o numerze serii 1567 TB („POLAN” Krakowska Hodowla i nasiennictwo Ogrodnicze sp. z o.o.) o sprawdzonej szybkości i zdolności kiełkowania. Nasiona groszku moczone przez 24 godziny w przygotowanym uprzednio płynie pohodowlanym, a następnie wysiewano na płytki wyłożone wilgotną watą. Kontrolę stanowiły nasiona groszku moczone w 25% roztworze wodnym pożywki i wysiewane w ten sam sposób. Działanie metabolitów przyjmowano za fitotoksyczne, gdy spowodowały zahamowanie energii kiełkowania i zdolności kiełkowania nasion grochu powyżej 30% w stosunku do kontroli.

W celu zbadania zdrowotności nasion i bulw roślin uprawnych z każdego poletka pobierano próbkę nasion lub bulw. W przypadku nasion bobiku i pszenicy jarej do analizy pobierano po 100 nasion z każdego poletka. Natomiast w przypadku ziemniaka z każdego

poletka pobierano do analizy po 25 bulw. Następnie oceniano procent nasion i bulw z objawami porażenia przez patogeny grzybowe.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono duże zróżnicowanie grzybów mikroskopowych - *Micromycetes* na powierzchni nasion pszenicy, bobiku oraz bulwach ziemniaka. Analizując ilościowo występowanie grzybów, można stwierdzić, że ich liczba na nasionach pszenicy wahała się od 50 do 900, nasionach bobiku od 10 do 1000, a na bulwach ziemniaków od 60 do 1100 jtk/g⁻¹ suchej masy. W okresie prowadzonego doświadczenia maksymalną liczbę grzybów stwierdzono na bulwach ziemniaków uprawianych na poletku położonym na północ od składowiska. Natomiast najniższą liczbę grzybów przypadającą na g⁻¹ suchej masy nasion lub bulw oznaczono w próbce bobiku pobranej z poletka położonego w części zreakultuowanej składowiska. Porównując średnie liczebności grzybów pomiędzy badanymi nasionami i bulwami, zaobserwowano, że największe różnice występowały między bulwami ziemniaka (382 jtk/g⁻¹) a nasionami bobiku (201 jtk/g⁻¹) - tabela 1. Można przypuszczać, że uprawiane rośliny wywierały selekcyjną wpływ na skład ilościowy mikroflory badanych nasion i bulw [9].

Tabela 1

Liczebność grzybów na powierzchni nasion pszenicy i bobiku oraz bulw ziemniaka

Table 1

Number of fungi on wheat and field bean seeds and potato tuber surface

Stanowisko	Lokalizacja poletek względem składowiska		[cfu·g ⁻¹ s.m.]		
	Kierunek	Strefa [metry]	Ziemniak	Pszenica	Bobik
W I	Zachód/West	Do 250	460	300	400
W II	Zachód/West	250-500	400	900	300
N I	Północ/North	Do 250	120	100	245
N II	Północ/North	250-500	165	200	100
E I	Wschód/East	Do 250	300	110	1000
E II	Wschód/East	250-500	1100	80	150
S I	Południe/South	Do 250	100	80	180
S II	Południe/South	250-500	320	60	700
Z	Sektor zreakultuowany	0	565	100	150

Z powierzchni nasion i bulw wyizolowano przedstawicieli grzybów z klasy *Phycomycetes*, *Ascomycetes* i *Deuteromycetes* (tab. 2). Oznaczono w sumie 29 gatunków grzybów należących do 14 rodzajów. Wśród nich najliczniej reprezentowane były grzyby z rodzajów *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* i *Verticillium*. Najbardziej zróżnicowaną pod względem składu gatunkowego mikoflorę zaobserwowano na powierzchni bulw ziemniaka, a najmniej liczną na nasionach bobiku, bez względu na pochodzenie próbki. Wśród wyizolowanych grzybów pleśniowych stwierdzono również szczepy potencjalnie toksynotwórcze [2]. Rozpatrując ich udział w ogólnej liczbie wyizolowanych grzybów, należy zauważyć, że na powierzchni bulw ziemniaka stwierdzono szczepy 6 gatunków grzybów (25%), na nasionach pszenicy

5 gatunków (26,3%), a bobiku 9 gatunków (52,9%). Mikoflora nasion pszenicy jarej i bobiku oraz bulw ziemniaka obejmowała również gatunki powodujące choroby roślin z rodzajów *Alternari* i *Fusarium*.


Tabela 2

Wyizolowane gatunki grzybów (*Micromycetes*) z powierzchni nasion pszenicy i bobiku oraz bulw ziemniaka

Table 2

Isolated fungi (*Micromycetes*) from wheat and field bean seeds and potato tuber surface

Lp.	Gatunek grzyba	Rośliny uprawne		
		Ziemniak	Pszenica	Bobik
1	<i>Absidia glauca</i> , Hagem	+	-	+
2	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl	+	+	+
3	<i>Alternaria geophila</i> , Daszewska	+	+	-
4	<i>Alternaria tenuissima</i> , Wiltshire	-	+	+
5	<i>Aspergillus flavus</i> , Link	-	+	+
6	<i>Aspergillus niger</i> , van Thieghen	+	+	+
7	<i>Aspergillus ochraceus</i> , Wilh.	+	-	+
8	<i>Botrytis cinerea</i> , Pers. Ex Fr.	+	+	-
9	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , de Vries	+	+	+
10	<i>Cladosporium herbarium</i> , Link	+	+	+
11	<i>Fusarium graminearum</i> , Schwabe	+	-	+
12	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , Cesati	-	+	-
13	<i>Fusarium oxysporum</i> , Schlecht	-	+	+
14	<i>Fusarium sp.</i>	+	-	-
15	<i>Fusidium sp.</i>	+	-	+
16	<i>Humicola grisea</i> , Traen	+	-	+
17	<i>Mucor hiemalis</i> , Wehmer	+	+	+
18	<i>Penicillium lanosum</i> , Westling	+	-	-
19	<i>Penicillium notatum</i> , Westling	+	-	+
20	<i>Penicillium patulum</i> , Bain	-	-	+
21	<i>Penicillium rubrum</i> , Stoll	+	-	-
22	<i>Penicillium rugulosum</i> , Thom	-	-	+
23	<i>Penicillium sp.</i>	-	+	-
24	<i>Rhizopus sp.</i>	+	+	+
25	<i>Trichoderma viride</i> , Pres et Fr.	-	-	+
26	<i>Verticillium chlamyosporium</i> , Godd.	+	+	-
27	<i>Verticillium glaucum</i> , Bonorden	+	-	+
28	<i>Verticillium cellulosae</i> , Daszewska	+	-	-
29	<i>Zygorrhynchus heterogamus</i> , Vuill	+	-	+
Razem		24	19	17

 - toksynotwórcze szczepy wyizolowanych grzybów

Toksyczne metabolity szczepów grzybów wyizolowanych z bulw ziemniaka powodowały zmniejszenie szybkości kiełkowania nasion zielonego groszku w granicach 49-94%, a zdolności kiełkowania od 44 do 88% (tab. 3). Toksyczne metabolity grzybów wyizolowanych z powierzchni nasion pszenicy hamowały szybkość kiełkowania nasion w granicach 31-81%, a zdolność kiełkowania nasion od 27 do 74%, natomiast metabolity

grzybów potencjalnie toksynotwórczych wyizolowanych z nasion bobiku zmniejszały szybkość hamowania nasion rośliny testowej w granicach od 52 do 83%, a zdolność kiełkowania od 43 do 74%.

Tabela 3

Wpływ metabolitów grzybów toksynotwórczych na kiełkowanie nasion zielonego groszku

Table 3

The effect of metabolites of toxin forming fungi on the germination ability of pea seeds

Grzyby toksynotwórcze	Rośliny uprawne					
	Ziemniak		Bobik		Pszenica	
	a*	b**	a	b	a	b
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	88	84	52	43	39	27
<i>Aspergillus flavus</i> Link.	-	-	74	65	81	74
<i>Aspergillus ochraceus</i> , Whil.	81	79	72	69	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> , de Vries	69	59	65	60	63	57
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	49	44	83	74	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> , Schlecht	-	-	78	69	31	28
<i>Fusarium sporotrichioides</i> , Sherb.	-	-	-	-	63	59
<i>Penicillium lanosum</i> , Westling	94	88				
<i>Penicillium patulum</i> , Bain	-	-	59	52	-	-
<i>Penicillium rubum</i> Stoll	92	87	-	-	-	-
<i>Penicillium rugulosum</i> , Thom	-	-	68	64	-	-
<i>Trichoderma viride</i> , Pers et Fr.	-	-	73	62	-	-

*a - zmniejszenie szybkości kiełkowania nasion [%]

**b - zmniejszenie zdolności kiełkowania nasion [%]

Tabela 4

Procentowy udział bulw i nasion porażonych przez choroby grzybowe

Table 4

Percentage of seeds and tubers infected with fungal diseases

Stanowisko	Lokalizacja poletek względem składowiska		Procent porażonych nasion		
	Kierunek	Strefa [metry]	Ziemniak	Pszenica	Bobik
W I	Zachód	Do 250	6,5	2,5	7,0
W II	Zachód	250-500	6,6	1,9	5,0
N I	Północ	Do 250	13,3	3,5	12,9
N II	Północ	250-500	10,9	4,3	9,5
E I	Wschód	Do 250	12,0	6,4	13,6
E II	Wschód	250-500	12,3	5,1	11,5
S I	Południe	Do 250	7,5	3,5	13,8
S II	Południe	250-500	7,3	3,4	9,9
Z	Sektor zrekultywowany	0	15,8	5,1	15,6

Nasiona bobiku i pszenicy jarej oraz bulwy ziemniaka były porażane przez patogeny grzybowe (tab. 4). Są to przede wszystkim przedstawiciele z klasy *Deuteromycetes*, wśród których stwierdzono gatunki zaliczane do potencjalnie toksynotwórczych [10]. W przypadku ziemniaka największy procent porażonych przez choroby grzybowe bulw zaobserwowano na poletkach zlokalizowanych na terenie zrekultywowanego sektora. Znaczny odsetek porażonych bulw był również na poletkach, które były zlokalizowane po wschodniej i północnej stronie składowiska, a więc najbliższej czynnego sektora. Podobne

zależności zaobserwowano w przypadku występowania chorób grzybowych na nasionach bobiku i pszenicy jarej. Nie stwierdzono zależności pomiędzy występowaniem objawów chorób grzybowych na nasionach i bulwach a liczebnością izolowanych z ich powierzchni grzybów.

Wnioski

1. Na powierzchni nasion pszenicy, bobiku oraz bulw ziemniaka stwierdzono występowanie grzybów potencjalnie toksynotwórczych.
2. Z przebadanych w teście biologicznym szczepów gatunków potencjalnie toksynotwórczych ponad połowa okazała się szczepami toksycznymi.
3. Najsilniejszym działaniem fitotoksycznym odznaczały się szczepy: *Alternaria alternata*, *Penicillium rubum* i *Penicillium lanosum*, które wyizolowano z bulw ziemniaków.
4. Nasiona pszenicy i bobiku oraz bulwy ziemniaka były najczęściej porażane przez choroby grzybowe na poletkach zlokalizowanych na terenie zrehabilitowanego sektora składowiska oraz w jego bezpośrednim sąsiedztwie.

Literatura

- [1] Wiszniewska M, Walusiak J, Gutarowska B, Żakowska Z, Pałczyński C. Grzyby pleśniowe w środowisku komunalnym i w miejscu pracy - istotne zagrożenie zdrowotne. *Medycyna Praca*. 2004;55(3):257-266.
- [2] Grajewski J. Mikotoksyny i mikotoksykozy zagrożeniem dla człowieka i zwierząt. In: Grajewski J, editor. *Mikotoksyny i grzyby pleśniowe - zagrożenia dla człowieka i zwierząt*. Bydgoszcz: Wyd UKW; 2006;117-147.
- [3] Czerwiecki L. Mikotoksyny i pleśnie - zagrożenie jakości zdrowotnej ziarna zbóż i ich przetworów oraz pieczywa. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*. 2005;8:11-13.
- [4] Raper KB, Thom C, Fennel D. *A manual of the Penicillia*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company; 1949.
- [5] Raper KB, Fennel DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company; 1965.
- [6] Fassati O. *Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej*. Warszawa: WNT; 1983.
- [7] Samson R, Frisvad J. *Penicillium subgenus Penicillium; new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites*. *Stud. Mycol*. 2004;49:1-257.
- [8] Mirczink TG. O gribach obustwliwajuszczich toksicznost diernowo podzolistnoj poczwy rozlicznoj stiepieni okulturiennosti. *Mikrobiologia*. 1957;26:78-86.
- [9] Bis H, Marcinowska K, Zając T. Wpływ różnych przedplonów na występowanie grzybów toksynotwórczych w rykosferze pszenicy ozimej i pszenicy jarej uprawianej w Prusach koło Krakowa. *Acta Agraria et Silvestria Ser Agraria*. 2005;XLV:19-25.
- [10] Bis H, Frączek K, Mędreła-Kuder E. Produkcja mikotoksyn przez grzyby wyizolowane z warzyw okopowych. *Nauka Przyroda Technologie*. 2010;4:6:69.

OCCURRENCE OF TOXIN FORMING AND PATHOGENIC FUNGI ON THE SURFACE OF SEEDS AND TUBERS OF PLANTS CULTIVATED IN THE VICINITY OF MUNICIPAL LANDFILL SITE

¹Department of Microbiology

²Department of Agricultural Environment Protection

³Department of Agricultural and Environmental Chemistry
University of Agriculture in Krakow

Abstract: The investigation was carried out as a field experiment in the vicinity of municipal landfill site in Tarnow. Samples of spring wheat seeds and potato tubers were taken at the harvest time (in 2006 and 2007), from plots located on each side of landfill site in two zones: up to 250 m and 250-500 m from its boundaries. Considering the results of the research on the occurrence of *Micromycetes* it was found that the highest number of these microorganisms was on the surface of potato tubers - 382 cfu·g⁻¹ d. m. (min 10 - max 1100 cfu·g⁻¹), and the lowest on spring wheat seeds 201 cfu·g⁻¹ (min 10 - max 900 cfu·g⁻¹). Among isolated molds were potentially toxin forming strains eg *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium rugulosum* and *Trichoderma viride*. The most toxic were strains of *Alternaria alternata*, *Penicillium rubum* and *Penicillium lanosum* - isolated from potato tubers, and the least toxic were strains of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* - isolated from spring wheat seeds. Fungal diseases of seeds and tubers predominated on plants cultivated on plots located in the area of reclaimed sector and in the vicinity of active sector of landfill site.

Keywords: toxins producing fungi, municipal landfill site, potato tubers, spring wheat seeds

