

Received: 22.02.2023 / Accepted: 29.03.2023

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Wpływ zróżnicowanych dawek miedzi i substancji organicznych na skład rodzajowy i nasilenie występowania grzybów owadobójczych w glebie

The influence of different doses of copper and organic substances on the genus composition and intensity of the occurrence entomopathogenic fungi in the soil

Anna Majchrowska-Safaryan* 

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu aplikacji miedzi w połączeniu z materiałami organicznymi na skład rodzajowy oraz nasilenie występowania grzybów entomopatogenicznych w glebie. Trzyletnie doświadczenie wazonowe przeprowadzono w warunkach szklarniowych. Eksperyment założono w układzie całkowicie losowym, z uwzględnieniem dwóch czynników: dawka miedzi i nawożenie organiczne. Próbkę gleby do badań pobrano w trzecim roku doświadczenia wiosną (przed rozpoczęciem wegetacji) i jesienią (po zebraniu ostatniego pokosu). Rośliną doświadczalną była kępka pospolita odmiana Amera. Grzyby owadobójcze z poszczególnych obiektów badawczych izolowano poprzez wysiew na podłoże selektywne. Wyniki wyrażono jako liczbę jtk każdego rodzaju grzybów owadobójczych w 1 g gleby. W glebach pobranych z obiektów doświadczalnych stwierdzono występowanie grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* i *Lecanicillium*, gdzie dominującym rodzajem był *Metarhizium* spp. W wiosennym terminie prowadzenia badań poziom aplikacji miedzi wpływał w zróżnicowany sposób na liczbę jtk, natomiast w jesiennym, zastosowanie miedzi w dawce 200 mg/kg gleby było poziomem, który nie wykazywał toksycznego działania, a nawet stymulował wzrost kolonii grzybów z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* w stosunku do dawki miedzi wynoszącej 100 mg/kg.

Słowa kluczowe: dawka miedzi, grzyby entomopatogeniczne, skład rodzajowy, liczba jtk

Abstract

The aim of the study was to determine the effect of copper application in combination with organic materials on the genus composition and the intensification of the occurrence of entomopathogenic fungi in the soil. The three-year pot experiment was carried out in greenhouse conditions. The experiment was set up in a completely random design, taking into account two factors: copper dose and organic fertilization. Soil samples for the tests were collected in the third year of the experiment, in spring (before the beginning of vegetation) and in autumn (after harvesting the last crop). The experimental plant was cocksfoot, Amera cultivar. Entomopathogenic fungi from individual research objects were isolated by sowing on a selective substrate. The results were expressed as the number of CFUs of each genus of entomopathogenic fungus in 1 g of soil. The presence of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* and *Lecanicillium* was found in the soils collected from the experimental sites, where the dominant genus was *Metarhizium* spp. In the spring period of conducting the research, the level of copper application affected the number of CFU in a different way, while in the autumn the application of copper at a dose of 200 mg/kg of soil was a level that did not show any toxic effects, and even stimulated the growth of fungal colonies of the genus *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* in relation to a copper dose of 100 mg/kg.

Key words: Cu dose, entomopathogenic fungi, genus composition, number of CFU

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
Wydział Agrobiotechnologii i Nauk o Zwierzętach, Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa
ul. Konarskiego 2, 08-110 Siedlce

*corresponding author: anna.majchrowska-safaryan@uph.edu.pl

Wstęp / Introduction

Grzyby owadobójcze były pierwszymi poznanymi patogenami owadów i jako pierwsze próbowano wykorzystywać je w biologicznym zwalczaniu szkodników roślin (Lipa 1967; Tkaczuk 2008). Głównym ich rezerwuarem jest gleba (Ignoffo i wsp. 1978; Miętkiewski i wsp. 1991; Bajan i wsp. 1995; Tkaczuk 2008) będąc jednocześnie miejscem bytowania wielu szkodników. Rozwój procesu chorobowego wywoływanego przez mikroorganizmy w populacjach owadów jest wypadkową czynników związanych z patogenem żywicielem i środowiskiem (Tkaczuk 2008). Zarówno występowanie jak i rozwój, a także patogeniczność poszczególnych gatunków warunkowana jest w środowisku przez szereg czynników biotycznych i abiotycznych oraz rolniczą i pozarolniczą działalność człowieka (Tkaczuk 2008; Hajek i Meyling 2017; Wu i wsp. 2020). Obecnie w związku z wdrażaniem unijnej strategii „od pola do stołu” (Ginter 2021) i ograniczeniem stosowania pestycydów o 50% do 2030 roku, grzyby entomopatogeniczne jako wyspecjalizowana grupa mikroorganizmów stają się skutecznymi biopestycydami (Sosnowska 2018, 2019). Lepsze zrozumienie ich kompatybilności z innymi czynnikami mikrobiologicznymi, roślinami, a także zawartością materii organicznej oraz metalami ciężkimi w glebach może wygenerować bogatszą i silniejszą pulę dostępnych narzędzi do zwalczania szkodników (Tkaczuk i wsp. 2019; Majchrowska-Safaryan 2022; Mantzoukas i wsp. 2022).

Metale ciężkie są jednymi z zanieczyszczeń przedostających się do otaczającego nas środowiska w wyniku gospodarczej działalności człowieka (przemysł, transport oraz rolnictwo). W naturalnych stężeniach są często niezbędne w funkcjonowaniu organizmów żywych, natomiast gdy występują w nadmiernych ilościach wykazują w stosunku do nich działanie toksyczne (Badura i Piotrowska-Seget 2000; Singh i Kalamdhad 2011; Kuziemska i wsp. 2020). Ich obecność w glebie ma duży wpływ na struktury komórkowe, wzrost i rozwój oraz aktywność biologiczną mikroorganizmów w niej bytujących (Tscherno i wsp. 2007; Hassn i wsp. 2014). Wpływ metali ciężkich na występowanie i aktywność biologiczną grzybów entomopatogenicznych w glebie nie jest jednak jednoznaczny. Dotychczasowe badania pokazują, że grzyby owadobójcze mogą wykazywać zdolność adaptacji do zwiększonych koncentracji tych pierwiastków w glebie (Popowska-Nowak i wsp. 2004; Tkaczuk 2008; Pečiulytė i Dirginčiūtė-Volodkienė 2012; Tkaczuk i wsp. 2019). Mobilność metali ciężkich w tym miedzi, a tym samym toksyczność można zmniejszyć poprzez zwiększenie zawartości materii organicznej w środowisku glebowym. Jej głównym źródłem w glebach uprawnych są nawozy organiczne, a także odpady organiczne wykorzystywane jako nawozy (Kwiatkowska-Malina 2017; Majchrowska-Safaryan i wsp. 2018; Kuziemska i wsp. 2022).

Celem pracy było zbadanie wpływu wzrastającego poziomu aplikacji miedzi w połączeniu z materiałami orga-

nicznymi na skład rodzajowy oraz nasilenie występowania grzybów entomopatogenicznych w glebie.

Materiały i metody / Materials and methods

Trzyletnie doświadczenie wazonowe przeprowadzono w warunkach szklarniowych w latach 2014–2016. Wazono o pojemności 10 dm³ (o wymiarach: wysokość – 220,5 mm, średnica górna – 291,5 mm, średnica dolna – 250,4 mm) napełniono 12 kg ziemi płowej pobranej z gruntu ornego (kompleks przydatności rolniczej 4 – żytni bardzo dobry, klasa bonitacyjna VIa) o składzie granulometrycznym 71% frakcji piasku, 24% frakcji pyłu i 5% frakcji iłu. Przed rozpoczęciem eksperymentu nie przeprowadzono badań pozwalających na określenie składu rodzajowego i nasilenia występowania grzybów owadobójczych. Przez trzy lata prowadzonych badań gleba w wazonach nie była wymieniana. Eksperyment założono w układzie całkowicie losowym w trzech powtórzeniach (liczba wszystkich obiektów badawczych – 60), z uwzględnieniem dwóch czynników:

- dawka miedzi: kontrola – brak zastosowania miedzi (0) oraz 100, 200 i 300 mg Cu/kg gleby. Miedź zastosowano do gleby jednorazowo, przed siewem rośliny testowej, w pierwszym roku badań, w postaci wodnego roztworu $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$,
- nawożenie organiczne: kontrola – brak stosowania materiałów organicznych (CO), podłoże popieczarkowe (SMS), kurzeniec (ChM) i obornik bydlęcy (CM). Materiały organiczne zastosowano oddzielnie, jednorazowo, w pierwszym roku badań, na dwa tygodnie przed siewem rośliny doświadczalnej, w dawce 2 g C_{org} /kg gleby.

W trakcie prowadzenia eksperymentu nie stosowano nawożenia mineralnego oraz środków ochrony roślin. We wszystkich latach badań rośliną doświadczalną była kępka pospolita (*Dactylis glomerata* L.) odmiana Amiera, którą wysiewano corocznie w pierwszej dekadzie maja. Pokosy zbierano cztery razy w roku w odstępach 30-dniowych. Wilgotność gleby w okresie wegetacji kształtowała się na poziomie 60–70% pełnej pojemności wodnej, regulowana poprzez nawadnianie.

Próby gleby do badań pobrano z poszczególnych obiektów badawczych w trzecim roku doświadczenia wiosną (przed rozpoczęciem wegetacji) i jesienią (po zebraniu ostatniego pokosu).

Grzyby owadobójcze z poszczególnych obiektów badawczych izolowano poprzez wysiew na podłoże selektywne opracowane przez Strassera i wsp. (1996). Izolowane grzyby owadobójcze przed założeniem doświadczenia nie były wprowadzane do gleby obiektów badawczych. Podłoże hodowlane składało się z 20 g glukozy, 10 g peptonu i 18 g agaru, które rozpuszczono w 1 l wody dejonizowanej, a następnie sterylizowano w autoklawie w temperaturze 120°C przez 20 minut. Do pożywki po ochłodzeniu do 50°C dodano następujące selektywne składniki: 0,6 g streptomycy-

cyny, 0,05 g tetracykliny, 0,05 g cykloheksymidu i 0,1 g dodany. Z każdej próby glebowej pobrano 2 g gleby do której dodano 18 ml wody dejonizowanej w połączeniu z preparatem zmniejszającym napięcie powierzchniowe 0,05% Triton-X. Za pomocą automatycznej pipety pobierano roztwory glebowe w ilości 0,1 ml i nanoszono na powierzchnię podłoża hodowlanego, gdzie rozprowadzono je szklaną szpatułką. Szalki Petriego umieszczono w inkubatorach w temperaturze 21°C i po 8–10 dniach liczono kolonie grzybów. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach. Wyniki wyrażono jako liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk) każdego rodzaju grzybów owadobójczych w 1 g gleby. Hodowle grzybów *in vitro* identyfikowano mikroskopowo na podstawie morfologii mikrostruktur (Rehner i Buckley 2005; Rehner i wsp. 2011; Humber 2012; Inglis i wsp. 2012). Charakterystykę izolatów grzybów przeprowadzono przez określenie wielkości i kształtu konidiów, komórek konidiogennych i morfologii kolonii. Ponieważ przy identyfikacji grzybów stosowano wyłącznie metody morfologiczne, zostały one opisane do rangi rodzaju.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i post-hoc test Tukeya. Wyliczone średnie połączone w jednorodną grupę na poziomie istotności $\alpha < 0,05$.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W próbach gleby pobranych z poszczególnych obiektów badawczych (wiosna, jesień) wyizolowano grzyby entomopatogeniczne z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* i *Lecanicillium* (tab. 1, 2). Dotychczas prowadzone badania dotyczące wpływu metali ciężkich na mikroorganizmy glebowe wykazują, że gatunki grzybów entomopatogenicznych, a niekiedy także poszczególne szczepy w obrębie danego gatunku cechują się zróżnicowaną wrażliwością w stosunku do jonów metali ciężkich (Ropek i Para 2003; Quesada-Moraga i wsp. 2007; Rajapaksha 2011; Pečiulytė i Dirginčiūtė-Volodkienė 2012; Hassn i wsp. 2014; Tkaczuk i wsp. 2019).

W wiosennym terminie prowadzenia badań (przed wysianiem rośliny testowej) z pobranych prób glebowych wyizolowano grzyby owadobójcze z rodzajów *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. i *Lecanicillium* spp. (tab. 1). Pečiulytė i Dirginčiūtė-Volodkienė (2012) badając wpływ wzrastających dawek CuSO_4 , wyizolowali z badanych gleb grzyby entomopatogeniczne, takie jak: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea*, *Paecilomyces lilacinum*, co potwierdza, iż gatunki te będące pospolitymi patogenami owadów wykazują wysoką odporność w stosunku do metali ciężkich (Kameo i wsp. 2000; Fomina i wsp. 2007). Rodzajem, który tworzył najwięcej jtk w ba-

Tabela 1. Oznaczone rodzaje oraz liczba jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych [jtk $\times 10^3$ g⁻¹] w glebach obiektów badawczych (termin wiosenny)

Table 1. Marked genus and number of colony forming units of entomopathogenic fungi [CFU $\times 10^3$ g⁻¹] in soils of the research objects (spring term)

Nawożenie organiczne Organic fertilizer	Dawka Cu Cu dose [mg/kg]	Rodzaj grzybów entomopatogenicznych Genus of entomopathogenic fungi			
		<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Cordyceps</i> spp.	<i>Lecanicillium</i> spp.
Bez nawożenia organicznego Without organic fertilization (CO)	0	0,1 a	2,5 d	0	0,1 a
	100	0,1 a	3,4 c	0	0,0 a
	200	0,2 a	7,2 b	0	0,1 a
	300	0,1 a	8,2 a	0	0,0 a
Podłoże popieczarkowe Spent mushroom substrate (SMS)	0	0,2 a	9,4 c	0	0,0 a
	100	0,2 a	13,6 a	0	0,1 a
	200	0,2 a	11,6 b	0	0,0 a
	300	0,1 a	3,6 d	0	0,0 a
Kurzeniec Chicken manure (ChM)	0	0,1 a	4,2 b	0	0,1 a
	100	0,1 a	7,2 a	0	0,1 a
	200	0,2 a	6,7 a	0	0,1 a
	300	0,1 a	4,2 b	0	0,1 a
Obornik bydlęcy Cattle manure (CM)	0	0,1 b	12,6 a	0	0,2 a
	100	0,1 b	5,5 b	0	0,1 a
	200	0,3 a	5,1 b	0	0,1 a
	300	0,2 ab	5,5 b	0	0,1 a

a – istotność na poziomie $\alpha < 0,05$, dla jednorodnych grup średnich wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie – significance at the level $\alpha < 0,05$, for homogeneous groups of means, the values marked in the columns with the same letters do not differ significantly

Tabela 2. Oznaczone rodzaje oraz liczba jednostek tworzących kolonie grzybów entomopatogenicznych [jtk $\times 10^3$ g⁻¹] w glebach obiektów badawczych (termin jesienny)**Table 2.** Marked genus and number of colony forming units of entomopathogenic fungi [CFU $\times 10^3$ g⁻¹] in soils of the research objects (autumn term)

Nawożenie organiczne Organic fertilizer	Dawka Cu Cu dose [mg/kg]	Rodzaj grzybów entomopatogenicznych Genus of entomopathogenic fungi			
		<i>Beauveria</i> spp.	<i>Metarhizium</i> spp.	<i>Cordyceps</i> spp.	<i>Lecanicillium</i> spp.
Bez nawożenia organicznego Without organic fertilization (CO)	0	0,1 a	1,9 a	0,6 ab	0,1 a
	100	0,1 a	0,6 b	0,1 b	0,1 a
	200	0,1 a	0,4 b	1,1 a	0,1 a
	300	0,0 a	0,3 b	0,7 ab	0,2 a
Podłoże popieczarkowe Spent mushroom substrate (SMS)	0	0,1 a	0,4 a	0,9 a	0,0 a
	100	0,2 a	0,4 a	0,5 b	0,1 a
	200	0,2 a	0,7 a	0,5 b	0,0 a
	300	0,1 a	0,5 a	0,4 b	0,1 a
Kurzeniec Chicken manure (ChM)	0	0,1 b	3,1 c	0,4 a	0,1 a
	100	0,2 b	8,0 b	0,1 b	0,0 a
	200	0,4 a	11,8 a	0,3 a	0,1 a
	300	0,1 b	1,2 d	0,1 b	0,1 a
Obornik bydłocy Cattle manure (CM)	0	0,1 b	3,2 a	0,2 a	0,1 a
	100	0,2 ab	0,5 c	0,1 a	0,0 a
	200	0,3 a	1,4 b	0,2 a	0,1 a
	300	0,1 b	1,1 b	0,1 a	0,1 a

a – istotność na poziomie $\alpha < 0,05$, dla jednorodnych grup średnich wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie – significance at the level $\alpha < 0,05$, for homogeneous groups of means, the values marked in the columns with the same letters do not differ significantly

danych glebach był *Metarhizium* spp. Liczba jednostek tworzących kolonie wynosiła od 2,5 jtk $\times 10^3$ g⁻¹ (obiekt bez nawożenia organicznego – CO, dawka Cu 0 mg/kg gleby) do 13,6 jtk $\times 10^3$ g⁻¹ (podłoże popieczarkowe – SMS, dawka Cu 100 mg/kg gleby). Na obiektach, na których zastosowano miedź w najwyższej dawce (Cu 300 mg/kg gleby) w połączeniu z podłożem popieczarkowym i kurzeńcem, grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp. tworzyły najmniej jednostek infekcyjnych, odpowiednio 3,6 i 4,2 jtk $\times 10^3$ g⁻¹. Pečiulytė i Dirginčiutė-Volodkienė (2012) stwierdzili, że miedź jest dla grzybów entomopatogenicznych silniejszym inhibitorem niż cynk. Liczba jtk wyizolowanych z badanych przez nich gleb zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia miedzi w pożywce. Mimo to grzyby owadobójcze były w stanie tolerować wysokie stężenia tego metalu, które były wyższe niż najwyższe stwierdzone stężenie miedzi w badanych glebach (11,4 mg/kg). W przypadku dodania do gleby obornika bydłowego, aplikacja miedzi na każdym poziomie ograniczyła liczbę jtk w odniesieniu do 0 dawki Cu mg/kg gleby (12,6 jtk $\times 10^3$ g⁻¹). Grzyby z rodzaju *Beauveria* spp. najwięcej jednostek infekcyjnych tworzyły przy zastosowaniu miedzi w dawce 200 mg/kg gleby (najwięcej 0,3 jtk $\times 10^3$ g⁻¹ – CM). Zagęszczenie jtk grzybów entomopatogenicznych z rodzaju *Lecanicillium* spp. było największe w próbach gleby pobranych z obiektu, na którym zastosowano obornik bydłocy, dawka Cu 0 mg/kg gleby (0,2 jtk $\times 10^3$ g⁻¹). Według

Zak i wsp. (2003) oraz Grishkan i Nevo (2010) różnicowanie taksonomiczne, jak i funkcjonalne grzybów patogenów owadów w glebie jest skorelowane z takimi czynnikami, jak wilgotność, temperatura, a także zawartość materii organicznej. Natomiast badania Kwiatkowskiej-Maliny (2017) oraz Kuziemskej i wsp. (2022) wskazują, że materia organiczna jest czynnikiem ograniczającym mobilność metali ciężkich, a tym samym ich biodostępność zarówno dla roślin, jak i mikroorganizmów.

Jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała, że poziom aplikacji miedzi wpływał istotnie na liczbę jtk w odniesieniu do grzybów z rodzaju *Metarhizium* spp., a także *Beauveria* spp., ale tylko na obiektach, na których zastosowano obornik bydłocy (tab. 1).

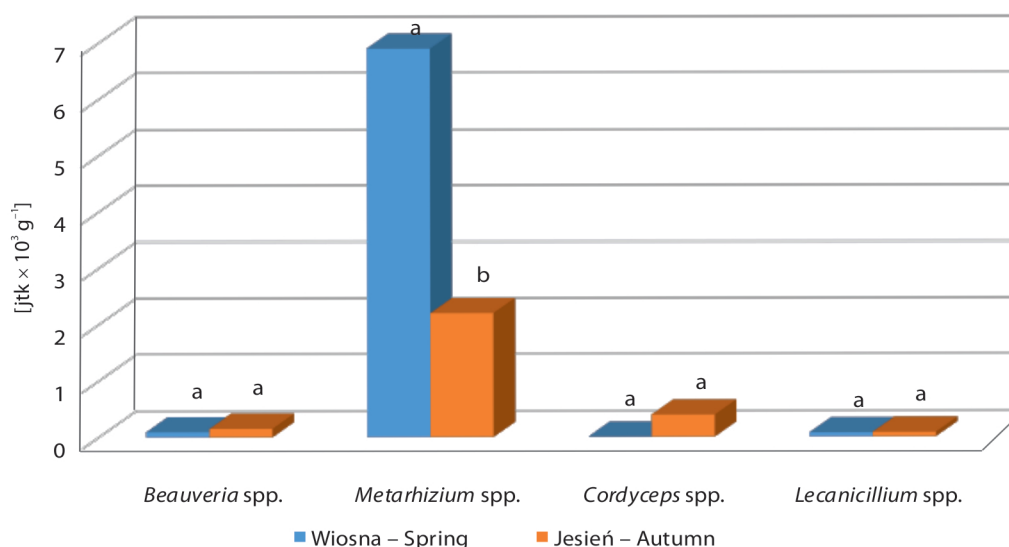
W jesiennym terminie (po zakończeniu wegetacji roślin) z prób glebowych pobranych z obiektów badawczych wyizolowano grzyby z rodzaju *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Cordyceps* spp. i *Lecanicillium* spp. (tab. 2). Zagęszczenie grzybów z rodzaju *Metarhizium* spp. było znacznie mniejsze niż w terminie wiosennym z wyjątkiem obiektu, na którym zastosowano kurzeniec (1,2–11,8 jtk $\times 10^3$ g⁻¹). Grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp. przy dawce Cu 200 mg/kg gleby, na obiektach na których zastosowano nawożenie organiczne tworzyły więcej jednostek infekcyjnych, niż przy innych poziomach aplikacji tego pierwiastka. El-Sharouny i wsp. (1988) dowiedli w swoich badaniach, iż dodawanie

do podłoża hodowlanego miedzi w różnych stężeniach było toksyczne dla testowanych gatunków grzybów entomopatogenicznych. Pečiulytė i Dirginčiūtė-Volodkienė (2012) oraz Tkaczuk i wsp. (2019) wskazują, iż niektóre gatunki grzybów owadobójczych rosnących na pożywce z dodatkiem miedzi potrzebują dłuższego przystosowania się do panujących warunków. Na podłożach modyfikowanych metalami ciężkimi, izolaty swój wzrost mogą rozpoczynać już w pierwszym dniu hodowli, a inne nawet po 57 dniach. Z pobranych prób glebowych wyizolowano również grzyby z rodzaju *Cordyceps* spp., których nie stwierdzono w terminie wiosennym. Największą liczbę jtk stwierdzono na obiekcie bez materiałów organicznych, przy dawce Cu 200 mg/kg gleby ($1,1 \text{ jtk} \times 10^3 \text{ g}^{-1}$). Na obiektach, na których zastosowano nawożenie organiczne, grzyby z rodzaju *Cordyceps* spp. tworzyły więcej jtk przy braku aplikacji miedzi. Grzyby owadobójcze cechują się stosunkowo wysoką odpornością na działanie czynników stresowych, natomiast odporność ta uzależniona jest od gatunku grzyba (Tkaczuk 2008; Tkaczuk i wsp. 2019). Jaworska i Gorczyca (2004) stwierdziły, że dopiero bardzo wysokie zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi wynoszące dla miedzi 1294 mg/kg istotnie wpływało na zmniejszenie porażenia larw *Galleria mellonella* przez *Isaria farinosa*, *B. bassiana* i *M. anisopliae*. Prowadzone badania wykazały, że zastosowane materiały organiczne wpływały na zwiększenie liczby jtk grzybów z rodzaju *Beauveria* spp. Największą liczbę jtk grzybów z rodzaju *Beauveria* spp. stwierdzono w glebie obiektu, do którego dodano kurzeniec i Cu w dawce wynoszącej 200 mg/kg gleby ($0,4 \text{ jtk} \times 10^3 \text{ g}^{-1}$). Nordgren i wsp. (1985) oraz Arnebrandt i wsp. (1987) badając w Szwecji gleby zanieczyszczone metalami ciężkim stwier-

dzi, że dwa gatunki grzybów entomopatogenicznych *I. farinosa* i *B. bassiana* wykazywały stosunkowo wysoką odporność na podwyższone stężenie miedzi i cynku. Natomiast Hassn i wsp. (2014) podają, że dawka miedzi odpowiadająca naturalnej zawartości tego pierwiastka w glebach Egiptu nie jest toksyczna dla grzyba *Isaria javanica*. Petlamul i wsp. (2015) badając wpływ siarczanu miedzi (CuSO_4) na wzrost, zarodnikowanie i kiełkowanie zarodników grzyba *B. bassiana* stwierdzili, iż stosowane przez nich stężenia uniemożliwiły całkowity wzrost grzybni. Jak podaje Zimmermann i Wolf (2002) gatunki grzybów, które wykazują wysoką odporność w stosunku do inhibicyjnego wpływu metali ciężkich najczęściej wytwarzają mutanty zdolne do tolerowania ich wysokich stężeń w glebie.

Grzyby entomopatogeniczne z rodzaju *Lecanicillium* spp. w jesiennym terminie badań wystąpiły w stosunkowo niewielkim nasileniu. Największą liczbę jtk stwierdzono na obiekcie bez nawożenia organicznego, przy dawce Cu 300 mg/kg gleby ($0,2 \text{ jtk} \times 10^3 \text{ g}^{-1}$). Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, iż w jesiennym terminie badań zastosowana dawka miedzi była czynnikiem istotnie wpływającym na liczbę jtk w odniesieniu do grzybów z rodzaju *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. i *Cordyceps* spp.

Porównując nasilenie występowania oznaczonych rodzajów grzybów entomopatogenicznych w obydwu terminach prowadzenia badań stwierdzono, iż zagęszczenie jtk grzybów z rodzaju *Metarhizium* spp. było ponad 3-krotnie większe w próbach gleby pobranych w terminie wiosennym, a różnica ta była statystycznie istotna. Pozostałe oznaczone rodzaje w nieznacznie większym nasileniu występowały w wiosennym terminie badań (rys. 1). Poziom aplikacji miedzi zarówno w terminie wiosennym, jak i jesiennym był



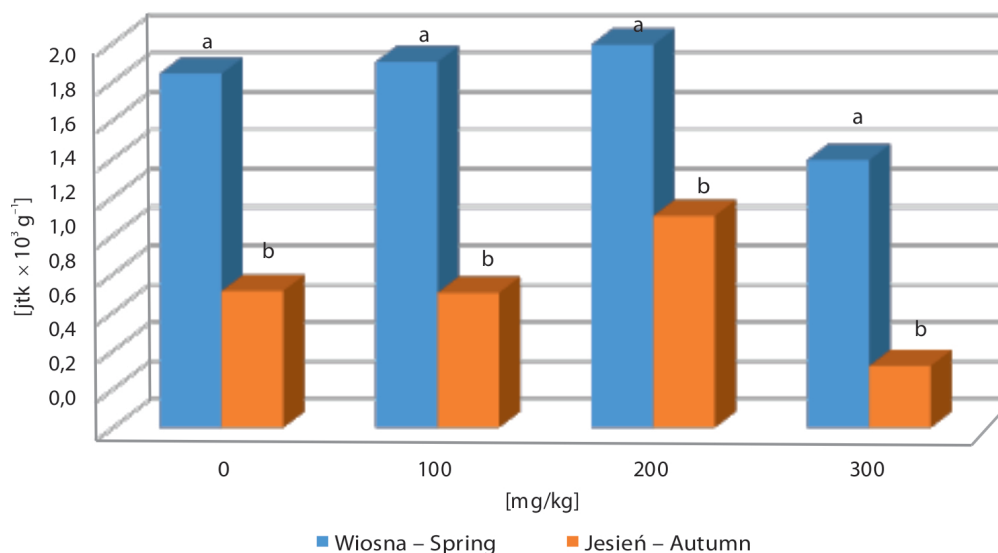
a – istotność na poziomie $\alpha < 0,05$ – significance at the level $\alpha < 0.05$

Rys. 1. Średnia liczba jednostek tworzących kolonie (jtk) grzybów entomopatogenicznych wyizolowanych z badanych gleb w terminie wiosennym i jesiennym

Fig. 1. Average number of colony-forming units (CFU) of entomopathogenic fungi isolated from the tested soils in spring and autumn

czynnikiem istotnie wpływającym na liczbę jtk oznaczonych rodzajów grzybów owadobójczych (rys. 2). Wprowadzanie do gleby materiałów organicznych w istotny sposób

wpływało na liczbę jtk grzybów entomopatogenicznych z wyjątkiem obióktów, gdzie do gleby wprowadzono obornik kurzy (rys. 3).

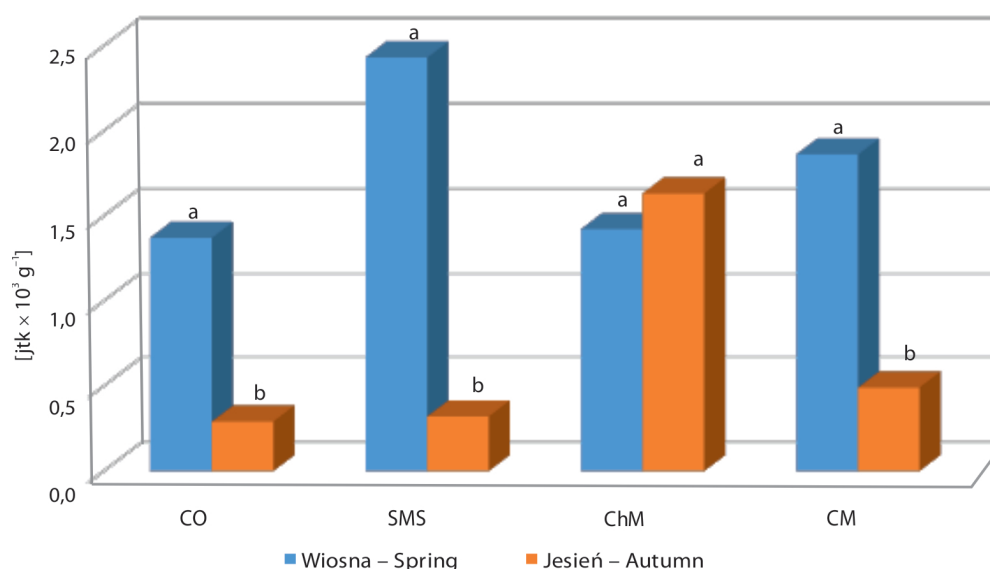


0, 100 – dawka Cu – dose Cu

a – istotność na poziomie $\alpha < 0,05$ – significance at the level $\alpha < 0.05$

Rys. 2. Średnia liczba jednostek tworzących kolonie (jtk) grzybów entomopatogenicznych w zależności od poziomu aplikacji miedzi w terminie wiosennym i jesiennym

Fig. 2. Average number of colony-forming units (CFU) of entomopathogenic fungi depending on the level of copper application in spring and autumn



CO – bez nawożenia organicznego – without organic fertilization, SMS – podłoże popieczarkowe – spent mushroom substrate, ChM – kurzeniec – chicken manure, CM – obornik bydlęcy – cattle manure

a – istotność na poziomie $\alpha < 0,05$ – significance at the level $\alpha < 0.05$

Rys. 3. Średnia liczba jednostek tworzących kolonie (jtk) grzybów entomopatogenicznych w zależności od zastosowanego materiału organicznego w terminie wiosennym i jesiennym

Fig. 3. Average number of colony-forming units (CFU) of entomopathogenic fungi depending on the organic material used in spring and autumn

Według badań prowadzonych przez Tkaczuka (2005, 2008), Zafar i wsp. (2007) oraz Pečiulytė i Dirginčiūtė-Volodkienė (2012) podwyższone stężenia metali ciężkich w glebie są jednym z takich stresorów środowiskowych, które mogą wywierać wysoką presję selekcyjną na mikroorganizmy glebowe. Zmniejszanie ich mobilności w wyniku wiązania przez materię organiczną pozwala na ograniczenie negatywnego wpływu, przyczyniając się tym samym do efektywniejszego działania grzybów entomopatogenicznych w redukowaniu populacji szkodników glebowych.

Wnioski / Conclusions

1. W próbach glebowych pobranych z obiektów badawczych stwierdzono występowanie grzybów entomopatogenicznych z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* i *Lecanicillium*.
2. Dominującym rodzajem grzybów owadobójczych, oznaczonych metodą posiewu na podłoże selektywne zarówno w terminie wiosennym, jak i jesiennym były grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp.
3. Oceniając średnie zagęszczenie jednostek tworzących kolonie wyizolowanych grzybów entomopatogenicz-

nych stwierdzono, że grzyby z rodzaju *Metarhizium* spp. liczniej występowały w terminie wiosennym o ponad 70% niż jesiennym, a różnica ta jest statystycznie istotna.

4. W wiosennym terminie prowadzenia badań poziom aplikacji miedzi wpływał w zróżnicowany sposób na liczbę jednostek tworzących kolonie, natomiast w jesiennym, zastosowanie miedzi w dawce 200 mg/kg gleby było poziomem, który nie wykazywał toksycznego działania, a nawet stymulował wzrost kolonii grzybów z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* w stosunku do dawki miedzi wynoszącej 100 mg/kg gleby.
5. Analiza statystyczna wykazała, że nasilenie występowania grzybów owadobójczych w badanych próbach, pobranych w terminie wiosennym zależy od zastosowanej dawki Cu mg/kg gleby w stosunku do rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium*, a w terminie jesiennym także rodzaju *Cordyceps*. Zastosowane w doświadczeniu materiały organiczne wpłynęły na tworzenie istotnie większej liczby jtk grzybów entomopatogenicznych w terminie wiosennym niż jesiennym z wyjątkiem gleby, do której wprowadzono obornik kurzy.

Literatura / References

- Arnebrandt K., Baath E., Nordgren A. 1987. Copper tolerance of microfungi isolated from polluted and unpolluted forest soil. *Mycologia* 79 (6): 890–895. DOI: 10.2307/3807691
- Badura L., Piotrowska-Seget Z. 2000. Heavy metals in the environment and their impact on soil microorganisms. [Metale ciężkie w środowisku i ich wpływ na mikroorganizmy glebowe]. *Ecological Chemistry and Engineering / Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 7 (11): 1135–1142.
- Bajan C., Kmitowa K., Mierzejewska E., Popowska-Nowak E., Miętkiewski R., Górski R., Miętkiewska Z., Głowacka B. 1995. The occurrence of entomopathogenic fungi in the bedding and soil of pine woods in the gradient of the forest environment pollution. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa, Seria B* 24: 87–97.
- El-Sharouny H.M.M., Bagy M.M., El-Shanawany A.A. 1988. Toxicity of heavy metals to Egyptian soil fungi. *International Biodegradation* 24 (1): 49–64. DOI: 10.1016/0265-3036(88)90074-7
- Fomina M., Podgorsky V.S., Olishavska S.V., Kadoshnikov V.M., Pisanska I.R., Hillier S., Gadd G.M. 2007. Fungal deterioration of barrier concrete used in nuclear waste disposal. *Geomicrobiology Journal* 24 (7–8): 643–653. DOI: 10.1080/01490450701672240
- Ginter A. 2021. Małe gospodarstwa rolne wobec wyzwań zrównoważonego rozwoju i Zielonego Ładu. Monografia. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, 174 ss. ISBN 978-83-66541-76-4.
- Grishkan I., Nevo E. 2010. Spatiotemporal distribution of soil microfungi in the Makhtesh Roman area, central Negev desert, Israel. *Fungal Ecology* 3 (4): 326–337. DOI: 10.1016/j.funeco.2010.01.003
- Hajek A.E., Meyling N.V. 2017. *Fungi*. s. 327–377. W: *Ecology of Invertebrate Diseases* (A.E. Hajek, D.I. Shapiro-Ilan, red.). Wiley, Oxford, UK. ISBN 9781119256014.
- Hassn W.A., Asaf L.H., Salih M.S.M. 2014. Effect of heavy metals ions on growth, sporulation and pathogenicity of *Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*). *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology* 20 (2): 1–7.
- Humber R.A. 2012. Manual of techniques in invertebrate pathology. s. 151–187. W: *Identification of Entomopathogenic Fungi* (L.A. Lacey, red.). Academic Press, London, UK. DOI: 10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3
- Ignoffo C.M., Garcia C., Hostetter D.L., Pinnel R.E. 1978. Stability of conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, in and on soil. *Environmental Entomology* 7 (5): 724–727. DOI: 10.1093/ee/7.5.724
- Inglis G.D., Enkerli J., Goettel M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. Chapter VII. s. 189–253. W: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Second Edition* (L.A. Lacey, red.). Academic Press, London, UK. ISBN 978-0-12-386899-2.
- Jaworska M., Gorczyca A. 2004. Effect of metal ions on entomopathogenic fungi pathogenicity. [Wpływ jonów metali na patogenność grzybów owadobójczych]. *Ecological Chemistry and Engineering / Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 11 (4–5): 327–339.
- Kameo S., Iwahashi H., Kojima Y., Satoh H. 2000. Induction of metallothioneins in the heavy metal resistant fungus *Beauveria bassiana* exposed to copper or cadmium. *Analisis* 28 (5): 382–385. DOI: 10.1051/analisis:2000280382

- Kuziemska B., Klej P., Wysokiński A., Jaremko D., Pakuła K. 2022. Yielding and bioaccumulation of zinc by cocksfoot under conditions of different doses of this metal and organic fertilization. *Agronomy* 12 (3): 686. DOI: 10.3390/agronomy12030686
- Kuziemska B., Wysokiński A., Klej P.E. 2020. Effect of different zinc doses and organic fertilization on soil's enzymatic activity. *Journal of Elementology* 25 (3): 1089–1099. DOI: 10.5601/jelem.2020.25.1.1927
- Kwiatkowska-Malina J. 2017. Functions of organic matter in polluted soils: The effect of organic amendments on phytoavailability of heavy metals. *Applied Soil Ecology* 123: 542–545. DOI: 10.1016/j.apsoil.2017.06.021
- Lipa J. 1967. *Zarys patologii owadów*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 341 ss.
- Majchrowska-Safaryan A. 2022. Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach murszowo-glejowych doliny rzecznej Liwca. [Occurrence of entomopathogenic fungi in muck-gial soils of the Liwiec river valley]. *Progress in Plant Protection* 62 (2): 91–99. DOI: 10.14199/ppp-2022-011
- Majchrowska-Safaryan A., Tkaczuk C., Kuziemska B. 2018. Effects of mineral fertilisation with the addition of zinc and copper salts on the occurrence and infectious potential of entomopathogenic fungi in soil. *Fresenius Environmental Bulletin* 27 (12): 8765–8772.
- Mantzoukas S., Kitsiou F., Natsiopoulos D., Eliopoulos P.A. 2022. Entomopathogenic fungi: Interactions and applications. *Encyclopedia* 2 (2): 646–656. DOI: 10.3390/encyclopedia2020044
- Miętkiewski R., Tkaczuk C., Żurek M., Bałazy S. 1991. Occurrence entomopathogenic fungi in soil arable and forest litter. *Roczniki Nauk Rolniczych, Seria E* 21 (1/2): 61–68.
- Nordgren A., Bääth E., Söderström B. 1985. Soil microfungi in an area polluted by heavy metals. *Canadian Journal of Botany* 63 (3): 448–455. DOI: 10.1139/b85-055
- Pečiulytė D., Dirginčiūtė-Volodkienė V. 2012. Effect of zinc and copper on cultivable populations of soil fungi with special reference to entomopathogenic fungi. *Ekologija* 58 (2): 65–85.
- Petlamul W., Prasertsan P., Chumthong A., Boonyapipat P. 2015. Effect of zinc sulfate and copper sulfate on mycelial growth, spore production and spore germination of an entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *ASEAN Journal of Scientific and Technological Reports* 18 (3).
- Popowska-Nowak B., Sosak-Świdarska C., Bajan C., Bieńkowska P. 2004. Response of isolates of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* to heavy metal pollution and their accumulative abilities. [Reakcje izolatów grzyba owadobójczego *Metarhizium anisopliae* na skażenie podłoża metalami ciężkimi i ich zdolności kumulacyjne]. *Ecological Chemistry and Engineering / Chemia i Inżynieria Ekologiczna* 11 (1): 71–77.
- Quesada-Moraga E., Navas-Cortés J.A., Maranhao E.A.A., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Álvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycological Research* 111 (8): 947–966. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.06.006
- Rajapaksha R.M.C.P. 2011. Heavy metal tolerance of culturable bacteria and fungi in a longterm cultivated tropical ultisol. *European Journal of Soil Biology* 47 (1): 9–15. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2010.10.00
- Rehner S.A., Buckley E.P. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97 (1): 84–98. DOI: 10.3852/mycologia.97.1.84
- Rehner S.A., Minnis A.M., Sung G.H., Luangsa-ard J.J., Devotto L., Humber R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103 (5): 1055–1073. DOI: 10.3852/10-302
- Ropek D., Para A. 2003. The effect of heavy metal ions and their complexions upon growth, sporulation and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *Polish Journal of Environmental Studies* 12 (2): 227–230. DOI: 10.1016/S0022-2011(02)00013-7
- Singh J., Kalamdhad A.S. 2011. Effects of heavy metals on soil, plants, human health and aquatic life. *International Journal of Research in Chemistry and Environment* 1 (2): 15–21.
- Sosnowska D. 2018. Konserwacyjna metoda biologiczna wsparciem integrowanej ochrony roślin i rolnictwa ekologicznego. [The contribution of conservation biological control method to integrated plant protection and organic farming]. *Progress in Plant Protection* 58 (4): 288–293. DOI: 10.14199/ppp-2018-040
- Sosnowska D. 2019. Grzyby pasożytnicze i antagonistyczne w biologicznej ochronie roślin w Polsce. [Parasitic and antagonistic fungi in biological plant protection in Poland]. *Progress in Plant Protection* 59 (4): 223–231. DOI: 10.14199/ppp-2019-029
- Strasser H., Forrer A., Schinner F. 1996. Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. s. 125–130. W: *Microbial Control of Soil Dwelling Pests* (T.A. Jackson, T.R. Glare, red.). AgResearch, Lincoln, New Zealand.
- Tkaczuk C. 2005. The effect of selected heavy metal ions on the growth and conidial germination of the aphid pathogenic fungus *Pandora neopahidis* (Remaudière at Hennebert) Humber. *Polish Journal of Environmental Studies* 14 (6): 897–902.
- Tkaczuk C. 2008. Occurrence and infective potential of entomopathogenic fungi in soils of agrocenoses and seminatural habitats in the agricultural landscape. *Scientific Dissertation No. 94*. Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce.
- Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Panasiuk T., Tipping C. 2019. Effect of selected heavy metal ions on the growth of entomopathogenic fungi from the genus *Isaria*. *Applied Ecology and Environmental Research* 17 (2): 2571–2582. DOI: 10.15666/aer/1702_25712582
- Tscherko D., Kändler E., Bárdossy A. 2007. Fuzzy classification of microbial biomass and enzyme activities in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39 (7): 1799–1808. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.02.010
- Wu S., Michael D., Toews M.D., Oliveira-Hofman C., Behle R.W., Simmons A.M., Shapiro-Ilan D.I. 2020. Environmental tolerance of entomopathogenic fungi: A new strain of *Cordyceps javanica* isolated from a whitefly epizootic versus commercial fungal strains. *Insects* 11 (10): 711. DOI: 10.3390/insects11100711
- Zafar S., Aqil F., Ahmad I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology* 98 (13): 2557–2561. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.051
- Zak D.R., Holmes W.E., White D.C., Reacock A.D., Tilman D. 2003. Plant diversity and microbial communities. *Ecology* 84 (8): 2042–2050. DOI: 10.1890/02-0433
- Zimmermann M., Wolf K. 2002. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. s. 355–363. W: *Biosorption of Metal* (N.D. Osiewicz, red.). Industrial Applications. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.