

***Trichoderma harzianum* RIFAI JAKO KOLONIZATOR GLEB SKAZONYCH NIKLEM I OŁOWIEM**

Krzysztof Gediga¹, Krzysztof Matkowski², Elżbieta Płaskowska²

¹ Katedra Chemii Rolniczej, Akademia Rolnicza we Wrocławiu

² Katedra Fitopatologii, Akademia Rolnicza we Wrocławiu

Wstęp

Gleba, podobnie jak powietrze i woda, narażona jest na niekorzystny wpływ zanieczyszczeń emitowanych przez przemysł. Do metali ciężkich, które stanowią największe zagrożenie dla środowiska należą: ołów, kadm, miedź, cynk oraz nikiel. Od wielu lat poszukuje się nowych rozwiązań umożliwiających rekultywację zdegradowanych gleb. Jedną z metod jest wykorzystanie mikroorganizmów, naturalnie występujących w glebie.

W środowisku glebowym występują liczne grzyby i bakterie, które wykazują dużą odporność na obecność metali ciężkich w glebie. W glebach skażonych tymi pierwiastkami bardzo często grzyby są prekursorami życia biologicznego i od tempa ich rozwoju zależy sukcesja innych organizmów, np. roślin.

Wśród mikroorganizmów żyjących w glebie, grzyby z rodzaju *Trichoderma*, znane są ze swej dużej aktywności metabolicznej [SIEROTA 1982]. Są to gatunki o dużych zdolnościach adaptacyjnych, występują w różnych środowiskach i cechują się szybkim tempem wzrostu. Badania nad rodzajem *Trichoderma* przyniosły już aspekt praktyczny – grzyby te ze względu na łatwość hodowli są wykorzystywane w ochronie przed niektórymi chorobami.

Ze względu na opisywane powyżej cechy postanowiono sprawdzić czy przedstawiciele *Trichoderma* sp. Mogą mieć wpływ na kondycję roślin rosnących na glebach skażonych. Niniejsza praca miała na celu poznanie zdolności przeżywania *T. harzianum* w glebie skażonej niklem i ołowiem oraz poznanie wpływu tego gatunku na wzrost rajgrasu angielskiego.

Materiał i metody

We wstępnym doświadczeniu szalkowym materiałem do badań było 10 izolatów *Trichoderma harzianum* RIFAI. Izolaty pochodziły z kolekcji kultur Katedry Fitopatologii AR we Wrocławiu. Wyosobniono je w 1997 r. z gleby zanieczyszczonej osadami ściekowymi.

W doświadczeniu szalkowym, jako podłoże do wzrostu grzybów zastosowano pożywkę glukozowo-ziemniaczaną (PDA) zawierającą różne dodatki soli ołowiu i niklu w następujących ilościach: 1000, 500, 250, 50 mg Pb·kg⁻¹ w postaci Pb(NO₃)₂ oraz 1000, 500, 250, 50 mg Ni·kg⁻¹ w postaci NiNO₃·6 H₂O. Do części

pożywki nie dodano soli metali traktując ją jako kontrolę doświadczenia. Tak przygotowane podłoże do wzrostu grzybów rozlano na płytki Petriego o średnicy 10 cm i na każdą z nich wyłożono czteromilimetrowy krążek grzybni wycięty korkoborem z wcześniej wyszczepionych 4 dniowych kultur *T. harzianum*. Krążki te wykładano w środku każdej z 4 szalek, dla każdego ze stężeń soli niklu i ołowiu oraz dla próby kontrolnej. W miarę wzrostu kolonii mierzono jej średnicę, aby ocenić tempo wzrostu i zdolność przeżywania *T. harzianum*. Wybrane w doświadczeniu szalkowym izolaty *T. harzianum*: T₁₅ i T₂₁, charakteryzujące się najszybszym tempem wzrostu posłużyły do sporządzenia szczepionki glebowej użytej w doświadczeniu wazonowym. Do kolbek o pojemności 250 ml dodano po 30 g ziarniaków pszenicy i po 25 ml wody destylowanej, po czym całość sterylizowano w autoklawie. Następnie, do części kolb dodano po 3 krążki pożywki PDA przerośniętej grzybnią szczepu T₁₅ lub TH₂₁, o średnicy 4 mm i grubości 1 mm. Dodatkowo, w celu przyspieszenia wzrostu kolonii grzyba na ziarniakach, do każdej z kolb dodano po 10 ml wody zawierającej zawiesinę zarodników z każdego szczepu w ilości 10⁴ zarodników w 1 ml. Część kolb pozostawiono bez grzybów. Tak przygotowane składniki codziennie mieszano w celu równomiernego przerośnięcia substratu przez grzybnie. Po 10 dniach zawartość kolb zmiksowano, uprzednio dolewając do każdej po 200 ml wody destylowanej i tak spreparowaną zawiesinę zastosowano do podlewania w wazonach.

Tabela 1; Table 1

Schemat doświadczenia
Scheme of experiment

Wazon-y z rajgrasem włoskim; Pots with italian rye-grass:			
Kontrola Control	bez grzybów; without fungi		
	z <i>T. harzianum</i> – szczep T ₁₅ ; with <i>T. harzianum</i> – strain T ₁₅		
	z <i>T. harzianum</i> – szczep T ₂₁ ; with <i>T. harzianum</i> – strain T ₂₁		
Dawka; Dose (mg Ni·kg ⁻¹)	Szczep; Strain	Dawka; Dose (mg Pb·kg ⁻¹)	Szczep; Strain
30	– *	200	–
30	T ₁₅	200	T ₁₅
30	T ₂₁	200	T ₂₁
75	–	500	–
75	T ₁₅	500	T ₁₅
75	T ₂₁	500	T ₂₁
120	–	2000	–
120	T ₁₅	2000	T ₁₅
120	T ₂₁	2000	T ₂₁
Wazon-y bez roślin; Pots without plants:			
Kontrola Control	bez grzybów; without fungi		
	z <i>T. harzianum</i> – szczep T ₁₅ ; with <i>T. harzianum</i> – strain T ₁₅		
	z <i>T. harzianum</i> – szczep T ₂₁ ; with <i>T. harzianum</i> – strain T ₂₁		

–* bez grzybów; without fungi

W doświadczeniu wegetacyjnym zastosowano wazon-y Wagnera napelniając je 5 kg gleby brunatnej wytworzonej z piasku gliniastego mocnego (pH w roztworze KCl o stężeniu 1 mol·dm⁻³ = 6,8). Nawożenie azotowe realizowano w każ-

dym z pokosów w ilości 0,75 g N na wazon jako NH_4NO_3 w 3 dawkach po 0,25 g, ze względu na bardzo wysoką zasobność użytej gleby nie stosowano nawożenia P i K. Przewidziane dodatki niklu w dawkach 30, 75 i 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby oraz ołowiu 200, 500 i 2000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ zastosowano w postaci wodnych roztworów ich soli azotanowych. Wybrane zgodnie ze schematem wazonny (tab. 1) podlano szczepionkami po 200 ml, również te stanowiące kontrolę bez grzybów, podlano zawiesiną nie zawierającą zarodników.

Rośliną testową był rajgras włoski „Stadion” (*Lolium multiflorum* LAM.), powschodowo przerwany do 20 roślin w wazonie, 12 wazonów pozostawiono bez roślin. W przeprowadzonym doświadczeniu wegetacyjnym oceniono plony rajgrasu z dwóch pokosów, zawartość metali w roślinach, oraz koncentrację ich form rozpuszczalnych, ponadto skład gatunkowy i liczebność grzybów w glebie.

Glebę do analizy mikologicznej pobrano, z zachowaniem względnej aseptyki, po II pokosie. Izolacje grzybów z gleby wykonano metodą MAŃKI [1974], zwaną też metodą piaskową. Wyrastające kolonie odszczepiano i oznaczano do gatunku. Zawartość Ni i Pb w roślinach po ich uprzednim spaleniu „na sucho” w piecu muflowym i rozтворzeniu popiołu w 1 mol $\text{HNO}_3\cdot\text{dm}^{-3}$ oznaczono metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA).

Wyniki i dyskusja

Obserwacje tempa wzrostu grzybów na pożywce zawierającej sole ołowiu i niklu wykazały duże zróżnicowanie we wrażliwości *T. harzianum* na obecność obydwu pierwiastków w podłożu. Nikiel był mniej toksyczny niż ołów, a w niektórych stężeniach azotan niklu wręcz stymulował wzrost tego gatunku. Z badań ZABAWSKIEGO i in. [1987] wynika, że największą odporność na metale ciężkie takie jak cynk, miedź, kadm i nikiel wykazały *T. harzianum* oraz niektóre gatunki z rodzaju *Penicillium*. Wzrost tych grzybów był w większości stymulowany zwłaszcza przez cynk, miedź i kadm, a częściowo również przez nikiel.

W doświadczeniu wazonowym w którym oceniano plony rajgrasu uprawianego w obecności dwóch szczepów *T. harzianum* (tab. 2) stwierdzono istotny wpływ zarówno stosowanych dawek obu metali jak i szczepienia grzybami.

Najwyższe dawki niklu i ołowiu skutkowały znaczną redukcją plonów rajgrasu, zwłaszcza w pierwszym pokosie. Drugi pokos charakteryzował się ogólnie wyższym poziomem plonów, mogło to być wynikiem immobilizacji stosowanych metali jak i korzystnego wpływu grzybów. Wzrastające dawki niklu powodowały przyrost koncentracji tego pierwiastka w rajgrasie (tab. 3).

Należy zwrócić uwagę, że rośliny z obiektów gdzie stosowano 30 i 75 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby w drugim pokosie zawierały średnio więcej niklu niż w pokosie pierwszym. Odwrotną zależność stwierdzono w roślinach uprawianych na glebie o najwyższej zawartości metalu. W obydwu pokosach niezależnie od dawki niklu szczepienie grzybami powodowało obniżenie koncentracji Ni w tkankach roślin od kilku do kilkunastu procent. Podobny wynik ochronny zanotowali BAJARCZUK i RUDAWSKA [1993] u sadzonek sosny szczepionych *Trichoderma viride*. Zależności takiej nie stwierdzono w przypadku ołowiu, gdzie zawartość Pb w roślinach z obiektów na niskiej i średniej dawce ołowiu praktycznie nie różniła się, natomiast na dawce najwyższej szczepienie grzybami wyraźnie sprzyjało kumulacji tego pierwiastka. Potwierdza to wyraźny spadek plonów roślin uprawianych w tych obiektach.

Tabela 2; Table 2

Plony rajgrasu włoskiego w g z wazonu
Yield of italian rye-grass in g per pot

Dawka Dose (mg Ni·kg ⁻¹)	Szczep Strain	Pokos I I cut	Pokos II II cut	Dawka Dose (mg Pb·kg ⁻¹)	Szczep Strain	Pokos I I cut	Pokos II II cut
30	–*	18,2	24,4	200	–	20,55	22,27
30	T ₁₅	19,1	23,55	200	T ₁₅	19,95	24,07
30	T ₂₁	19,15	24,4	200	T ₂₁	19,32	31,17
75	–	18,15	20,0	500	–	19,82	27,47
75	T ₁₅	20,5	20,4	500	T ₁₅	18,35	25,47
75	T ₂₁	20,1	20,8	500	T ₂₁	18,47	18,55
120	–	8,1	25,9	2000	–	4,35	15,97
120	T ₁₅	10,9	22	2000	T ₁₅	4,0	16,57
120	T ₂₁	9,4	20	2000	T ₂₁	1,82	8,25
Kontrola; Control	–	17,4	26,37	Kontrola; Control	–	17,4	26,37
	T ₁₅	17,87	28,15		T ₁₅	17,87	28,15
	T ₂₁	18,35	25,57		T ₂₁	18,35	25,57
NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}		r.n.; n.s.	1,86	NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}		1,35	2,71
0		17,87	26,7	0		17,87	26,70
30		18,82	24,12	200		19,94	25,84
75		19,57	20,46	500		18,88	23,83
120		9,47	22,08	2000		3,39	13,6
NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}		1,07	1,25	NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}		0,91	1,83
0		15,46	23,78	0		15,53	23,02
T ₁₅		17,09	23,52	T ₁₅		15,04	23,57
T ₂₁		16,75	22,72	T ₂₁		14,49	20,89
NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}		0,84	0,98	NIR _{0,05} ; LSD _{0,05}		0,71	1,43

–* bez grzybów; without fungi

Tabela 3; Table 3

Zawartość niklu i ołowiu w rajgrasie włoskim (mg·kg⁻¹ s.m.)
Nickel and lead contents in italian rye-grass (mg·kg⁻¹ DM)

Dawka Dose (mg Ni·kg ⁻¹)	Szczep Strain	Pokos I I cut	Pokos II II cut	Dawka Dose (mg Pb·kg ⁻¹)	Szczep Strain	Pokos I I cut	Pokos II II cut
30	–*	21,5	37,9	200	–	11,9	9,4
30	T ₁₅	23,4	35,0	200	T ₁₅	11,2	10,4
30	T ₂₁	25,0	34,2	200	T ₂₁	11,0	11,0
75	–	63,0	68,5	500	–	24,8	25,5
75	T ₁₅	56,8	65,2	500	T ₁₅	27,4	28,0
75	T ₂₁	51,2	64,2	500	T ₂₁	28,7	30,2
120	–	171,0	99,5	2000	–	82,0	100
120	T ₁₅	113,5	84,2	2000	T ₁₅	87,5	125
120	T ₂₁	129,2	84,5	2000	T ₂₁	90,5	116
Kontrola Control	–	1,4	3,8	Kontrola Control	–	4,0	3,7
	T ₁₅	1,3	3,5		T ₁₅	4,0	4,4
	T ₂₁	1,3	3,5		T ₂₁	3,9	4,3

–* bez grzybów; without fungi

cd. tab. 4; Table 4 continued	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
<i>Humicola fuscoatra</i> TRAAEN	2			2		2										2		1	1					
<i>Otidodendron cerealis</i> (THUM.) BARRON	1																							
<i>Otidodendron echinulatum</i> BARRON				1		1	1				1		1		3			2			3			1
<i>Penicillium frequentans</i> WESTLING	2		2	3																				
<i>Penicillium janthinellum</i> BOURGE	3																							
<i>Penicillium notatum</i> WESTLING	3	1	1	4	1	1								2								1		1
<i>Penicillium urticae</i> BAIN				1																				
<i>Penicillium variabile</i> SOPP.				1		2	1	3			1		1		1	3			1					
<i>Penicillium velutinum</i> v. BEYMA									1															
<i>Penicillium vermiculatum</i> DANG	2	1		4	5				1	1						1				1				3
<i>Penicillium wakmani</i> ZALEWSKI	3	1		2	1		3									5	1	1	1	1				4
<i>Phoma medicaginis</i> (L.K. JONES) BOEREMA							1									1								
<i>Pyrenochaeta terrestris</i> (HANS.) GORENZ, WALKER	1																							
<i>Ulocladium borytyis</i> PREUSS	2																							
<i>Trichoderma harzianum</i> RIFAI	38	142	168	8	175	43	31	239	153	681	612	514	670	931	337	23	209	104	44	194	258	767	146	98
Razem; Total	68	148	174	33	187	50	45	239	155	683	613	515	674	932	339	48	211	105	52	197	264	767	147	103

T₁₅, T₂₁ - izolaty *Trichoderma harzianum* RIFAI; isolates of *T. harzianum* RIFAI

b.m. - gleba bez metali; soil without metals

K - gleba bez *Trichoderma harzianum* RIFAI; soil without *Trichoderma harzianum* RIFAI

Badania WIDERY i in. [1996] dowodzą, że plony tymotki łąkowej w uprawie na glebie skażonej ołowiem w ilości 50, 100 i 200 mg·kg⁻¹ utrzymywały się na zbliżonym poziomie. Podobny wynik uzyskali również CIEĆKO i WYSZKOWSKI [1996], informując, że dawka do 45 mg Ni·kg⁻¹ nie powoduje spadku plonów kukurydzy. Natomiast sprzeczne z powyższymi wyniki podaje KUDUK [1996], który stwierdził, że ołów w dawkach do 500 mg·kg⁻¹ nie miał większego wpływu na wzrost i masę zebranych roślin lucerny. Natomiast dopiero wprowadzenie 1000 i 5000 mg·kg⁻¹ ołowiu do podłoża spowodowało znaczne obniżenie plonu.

Wyniki analizy mikologicznej gleby i korzeni wykazały wyraźną kompensację *T. harzianum* w glebie przy równoczesnym zubożeniu innych gatunków (tab. 4).

Więcej przedstawicieli *T. harzianum* wyizolowano z wazonów z dodatkiem niklu. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że grzyby bardziej tolerowały nikiel niż ołów. Ponad połowę wszystkich wyizolowanych gatunków (bez *T. harzianum*) stanowiły grzyby z rodzaju *Penicillium*. Występowanie tych grzybów w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi oraz grzybów z rodzajów *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Phoma*, *Scopulariopsis* i *Trichoderma* potwierdza wielu autorów [ZABAWSKI 1979; ZABAWSKI i in. 1987; KOWALIK 1995].

Wnioski

1. Gleby skażone nikiem i ołowiem sprzyjają rozwojowi *T. harzianum* RIFAI.
2. Metale ciężkie ograniczają różnorodność gatunków grzybów w glebach skażonych.
3. Nikiel jest mniej toksyczny dla *T. harzianum* niż ołów.
4. W obrębie gatunku *T. harzianum* poszczególne izolaty różniły się tolerancją na obecność soli niklu i ołowiu w podłożu.

Literatura

BOJARCZUK K., RUDAWSKA M. 1993. Rozwój sadzonek wybranych drzew leśnych w podłożach o różnym stopniu skażenia przy zastosowaniu grzyba antagonistycznego *T. harzianum* Rifai. Mat. z IV konf. Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego pt. „Grzyby ryzosferowe a zdrowotność roślin”, 22–23 IV 1993, Skierniewice: 35–36.

CIEĆKO Z., WYSZKOWSKI M. 1996. Reakcje owsa i kukurydzy na zróżnicowane dawki niklu w warunkach dodatku do gleby substancji organicznej i wapnowania. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 434: 801–805.

KOWALIK M. 1995. Zbiorowiska grzybów glebowych zasiedlających rekultywowane grunty zwalówiskowe górnictwa siarki. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 418: 738–742.

KUDUK C. 1996. Wpływ ołowiu na wzrost lucerny i biologiczne właściwości gleby lekkiej. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 434: 910–912.

MAŃKA K. 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 160: 12–28.

SIEROTA Z. 1982. Wpływ niektórych soli mineralnych na rozwój *T. viride* in vitro.

Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa: 70–74.

WIDERA M., WŁODEK S., GEDIGA K. 1996. *Wzrost i plonowanie trzech gatunków roślin w drugim roku po skażeniu gleby ołowiem i kadmem*. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 434: 917–924.

ZABAWSKI J. 1979. *Grzyby glebowe jako wskaźnik zubożenia mikroflory w strefie sanitarnej Huty Miedzi „Legnica”*. Mat. konf. pt. „Ocena degradacji naturalnego środowiska ziem południowo-zachodnich Polski”, 11–20 XI 1977, PAN Wrocław, Komisja Nauk o Ziemi: 432–438.

ZABAWSKI J., BORATYŃSKI J., PŁASKOWSKA E. 1987. *Wpływ zróżnicowanych dawek cynku, miedzi, kadmu i niklu na wzrost niektórych mikrogrzybów glebowych*. Archiwum Ochrony Środowiska: 130–131.

Słowa kluczowe: metale ciężkie, *Trichoderma harzianum* RIFAI, skażenie gleby

Streszczenie

W doświadczeniu badano wrażliwość izolatów *T. harzianum* RIFAI na obecność ołowiu i niklu zarówno w warunkach *in vitro* – na pożywce glukozowo-ziemniaczanej (PDA) jak i w glebie w której uprawiano rajgras włoski. Obserwacje tempa wzrostu grzybów na pożywce zawierającej sole ołowiu i niklu wykazały duże zróżnicowanie wrażliwości izolatów *T. harzianum* na obecność obydwu pierwiastków w podłożu. Nikiel był mniej toksyczny niż ołów, a w niektórych stężeniach azotan niklu wręcz stymulował wzrost tego gatunku. W doświadczeniu wazonomowym oceniano plony rajgrasu uprawianego w obecności *T. harzianum*, zawartość metali w tkankach roślin oraz skład gatunkowy i liczebność grzybów w glebie. Wyniki analizy mikologicznej wykazały wyraźną kompensację gatunku *T. harzianum* w glebie przy równoczesnym zubożeniu innych gatunków. Istotny wpływ na wysokość plonu trawy miała szczepionka grzyba, zwłaszcza w przypadku obecności niklu w glebie.

Trichoderma harzianum RIFAI AS A COLONIZER OF SOILS POLLUTED WITH NICKEL AND LEAD

Krzysztof Gediga¹, Krzysztof Matkowski², Elżbieta Płaskowska²

¹ Department of Agricultural Chemistry, Agricultural University, Wrocław

² Department of Plant Pathology, Agricultural University, Wrocław

Key words: heavy metals, *Trichoderma harzianum* RIFAI, soil pollution

Summary

Influence of nickel and lead, and fungus *Trichoderma harzianum* RIFAI on the growth of and yield rye-grass was investigated. In *in vitro* experiment, on potato dextrose agar (PDA) with nickel and lead salts, 2 fungal strains were selected for inoculation of soil polluted with metals. Analysis of growing rate of

the fungi that was obtained, indicates a significant differentiation in their sensitivity to investigated heavy metals. Nickel nitrate appeared to be much less toxic than the lead: in same concentrations it stimulated the growth of *T. harzianum*. The metal contents in plants, fungal composition in soil were estimated in pot experiment. The results of mycological analysis showed the compensation of *T. harzianum* in soil with a simultaneous reduction another species. The inoculum of fungus stimulated grass yield especially at nickel presences in the soil.

Dr Krzysztof **Matkowski**
Katedra Fitopatologii
ul. Cybulskiego 32
50-205 WROCŁAW
e-mail: mat@ozi.ar.wroc.pl