



WYDZIAŁ
NAUK O ŻYWNOSCI
I BIOTECHNOLOGII

SPRAWOZDANIE

z prowadzenia w 2015 r. badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego w zakresie rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2015 r. poz. 1170)

pt.: Sadownictwo metodami ekologicznymi: Określenie dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami w ekologicznych uprawach sadowniczych.

Realizowany przez: **Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie**

finansowany zgodnie z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2015 r. poz. 1170) na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 15.10.2015 r. nr: HORre-msz-780-13/15(458)

Kierownik tematu: **prof. dr hab. Ewa Solarska**

Główni wykonawcy: mgr inż. Izabela Podgórska, mgr inż. Marzena Marzec, dr hab. inż. Dominik Sz wajgier, dr inż. Kamila Borowiec, mgr inż. Marcelina Olszak, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, EM-Farming Sebastian Podstawka

Cel realizacji tematu:

Celem badań było opracowanie dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami w ekologicznej uprawie truskawki, maliny i czarnej porzeczki.

Badania nad opracowaniem dobrych praktyk ochrony przed chorobami i szkodnikami przeprowadzone zostały na ekologicznych plantacjach maliny, truskawki i czarnej porzeczki, na których występowały problemy z ograniczaniem niektórych szkodników i chorób. Doświadczenia dla każdego z badanych gatunków roślin sadowniczych zrealizowano w układzie bloków losowych, w czterech powtórzeniach, na poletkach wielkości 20 m². Na każdej uprawie przeprowadzono co najmniej 6 zabiegów ochronnych przy użyciu probiotycznych mikroorganizmów z ekstraktami roślinnymi. Liczba zabiegów ochronnych uzależniona była od nasilenia występowania agrofagów na plantacji. Środki ochrony były zastosowane w doświadczeniu obejmującym zaplanowane poletka oraz na całej plantacji, gdyż takie postępowanie pozwoliło ocenić działanie najefektywniejszych środków na bazie ekstraktów z wrotyczu i innych roślin na dużej powierzchni oraz ograniczenie rozprzestrzeniania się agrofagów, a szczególnie szkodników glebowych.

Na plantacjach truskawki i maliny zastosowano następujące warianty zabiegów ochronnych:

1. Kontrola – bez żadnych zabiegów ochronnych.
2. Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II.
3. Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.
4. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM zastosowany na początku wegetacji doglebowo, a w kolejnych zabiegach dolistnie.
5. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

Na plantacji czarnej porzeczki zastosowano następujące kombinacje:

1. Kontrola – bez żadnych zabiegów ochronnych.
2. Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany

w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II.

3. Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

4. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy do stosowania doglebowego i dolistnego.

5. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

Ilość cieczy roboczej wymaganej do oprysku doglebowego wyniosła od 400 do 1000 l/ha w zależności od wilgotności gleby, natomiast do oprysku dolistnego od 500 do 900 l/ha.

Została określona faza rozwojowa (BBCH) każdej badanej rośliny sadowniczej każdorazowo w dniu zastosowania preparatu i zbierania danych służących do oceny jego skuteczności.

Przed założeniem doświadczenia na każdej plantacji z badanymi owocami miękkimi została przeprowadzona lustracja w celu określenia stopnia zagrożenia przez szkodniki glebowe. Na polu o powierzchni 1 ha wyznaczono, po przekątnych pola, 32 punkty. W miejscach tych kopano dołki o wymiarach 25 cm (szerokość) x 25 cm (długość) x 30 cm (głębokość) w celu pobrania próbek ziemi, co odpowiadało to 2m² pola. Wybraną ziemię przesiewano przez sito i liczone szkodniki. W ten sposób określano zagęszczenie szkodników na 1 m² pola. Przyjęto, że próg ekonomicznej szkodliwości to 0,5 pędraka na 1m², 0,5 drutowca na 1m² i 5 larw opuchlaka na 1m² powierzchni.

Dla maliny oraz porzeczki przeprowadzono 2 zabiegi ochronne przed kwitnieniem, 1 zabieg w trakcie kwitnienia i 1 zabieg po kwitnieniu oraz 2 zabiegi po zbiorze.

Obecność pędraków i drutowców została oceniona wiosną oraz pod koniec sierpnia na podstawie pobranych prób glebowych, pobranych w liczbie 32 na każdy 1 ha plantacji.

Ocena występowania na malinie szarej pleśni, zamierania pędów malin oraz antraknozy malin została przeprowadzona od kwitnienia do zbioru owoców.

Obecność kwieciaka malinowca oraz kistnika malinowca została oceniona tuż przed kwitnieniem roślin. Oceny przeprowadzono pobierając 4 próby po 50 losowo wybranych

kwiatostanów z plantacji o powierzchni 1 ha i strząsając z nich chrząszcze na podstawioną płytkę. Ocena występowania mszyc na malinach została przeprowadzona w dwóch terminach: przed kwitnieniem oraz po pełni kwitnienia pobierając każdorazowo 4 próby po 50 losowo wybranych pąków z plantacji o powierzchni 1 ha. W przypadku przyszczarka namaliniaka lodygowego obserwacje prowadzono w 3 terminach: w maju, w czerwcu oraz w pierwszej połowie lipca, natomiast efektywność zabiegów przeciwko temu agrofagowi oceniono po opadnięciu liści, około początku października. Ocena występowania tego szkodnika przeprowadzono w oparciu o każdorazowe pobranie 4 prób po losowo wybranych 50 pędów jednorocznych na plantacji 1 ha, natomiast ocena efektywności zabiegów polegała na przejrzaniu 200 losowo wybranych pędów (pod skórka w spękaniach i zranieniach pędów) na obecność jaj i larw szkodnika z powierzchni 1 ha.

Obecność wielkopąkowca porzeczkowego oceniono przed kwitnieniem na przełomie marca/kwietnia przeglądając losowo wybrane krzewy na obecność „galasowych” pąków zasiedlonych przez szkodnika. Ocena występowania przyszczarka porzeczkowiaka kwiatowego polegająca na przejrzaniu 100 losowo wybranych kwiatostanów na plantacji 1 ha przeprowadzono podczas kwitnienia. Na początku maja oraz w połowie czerwca oceniono występowanie mszyc. Ocenie każdorazowo poddano 200 losowo wybranych pędów na 1 ha plantacji. Do ograniczania przeziernika porzeczkowca wykorzystano również dyspensery feromonowe, które we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez autorów niniejszego wniosku wykazały bardzo dobrą skuteczność. Po kwitnieniu, od końca maja do początku sierpnia prowadzone były odłowory przeziernika porzeczkowca z użyciem pułapek feromonowych typu delta trójkątna. Ilość odłowionych motyli sprawdzano co tydzień. Od połowy czerwca do sierpnia/września oceniono występowanie przyszczarka porzeczkowca pędowego każdorazowo na 200 losowo wybranych pędach jednorocznych porzeczek.

Próby 200 liści z losowo wybranych krzewów z plantacji 1 ha porzeczek na obecność przędziorka chmielowca pobierano dwa razy w miesiącu, od czerwca do września. Ocena występowania na roślinach porzeczek czarnej amerykańskiego mączniaka agrestu, antraknozy liści porzeczek, białej plamistość liści oraz rdzy wejmutkowo-porzeczkowej przeprowadzono w połowie lipca oraz w drugiej połowie sierpnia z zastosowaniem 5-stopniowej skali bonitacyjnej (1-brak objawów porażenia, 5- bardzo silne porażenie roślin). Ocena występowania szarej pleśni przeprowadzono podczas zbiorów owoców.

Analizę zdrowotności truskawki pod względem stopnia porażenia przez patogeny i uszkodzenia przez szkodniki przeprowadzono w następujący sposób:

a) Ograniczanie szkodników

Efektywność zabiegów ochronnych w aspekcie ograniczania szkodników glebowych oceniono pod koniec zbioru lub tuż po zbiorze owoców. Na każdym poletku wykopywano 6 losowo wybranych roślin. Rośliny wraz z glebą wrzucano na sito i przesiewano, co umożliwiło policzenie larw drutowców i pędraków oraz larw, poczwerek i chrząszczy opuchlaków. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą metody analizy wariancji po przekształceniu wartości rzeczywistych wg funkcji $y = \log(x+1)$, gdzie x – liczba osobników na sześciu roślinach.

Przed kwitnieniem i na początku kwitnienia przeprowadzono obserwacje ograniczania przez stosowane preparaty kwieciaka malinowca. Ocenę tę przeprowadzono licząc strząśnięte chrząszcze z losowo wybranych kwiatostanów na podstawioną płytkę (3-4 próby po 50 kwiatostanów). Przyjęto, że próg ekonomicznej szkodliwości to 1-2 chrząszcze na 150-200 kwiatostanów.

W celu oceny liczebności przedziorka chmielowca pobrano 3-4 próby po 50 liści (po 1 liściu z rośliny). Liczbę znalezionych przedziorków dzielono przez liczbę zlustrowanych liści.

Skuteczność stosowanej ochrony wyliczono według wzoru Abbotta.

b) Ograniczanie chorób

Ocena skuteczności ograniczania szarej pleśni:

Dla każdego poletka, w każdym dniu pobierania próbek obliczono średnią liczbę zdrowych owoców (szacunkowo na podstawie ekstrapolacji liczby owoców określonej w próbkach o znanej masie) oraz średnią liczbę porażonych owoców (brązowe plamy, szara pleśń).

Na podstawie tych danych oszacowano skuteczność badanych preparatów.

Pierwszą ocenę występowania szarej pleśni przeprowadzono podczas pierwszego zbioru owoców, a kolejne podczas każdego następnego zbioru owoców, aż do końca głównych zbiorów. Ocenę skuteczności badanych biopreparatów w ograniczaniu białej plamistości liści truskawki wykonano w pierwszej dekadzie lipca według 6-stopniowej skali (0-brak porażenia, 5-porażenie ponad 50% powierzchni liścia) pobierając losowo po 30 liści z każdego poletka.

W celu oceny występowania mączniaka prawdziwego truskawki pobrano 50 liści. Liście zebrano z młodych pędów wybranych losowo z roślin ze środka każdego poletka. Oceniono porażoną powierzchnię każdego liścia wyrażoną w procentach i na tej podstawie określono średnią powierzchnię porażenia liści dla każdego poletka. Ocenę przeprowadzono jednorazowo 8-10 dni po ostatnim zabiegu.

truskawka

Cel realizacji tematu:

Celem badań było opracowanie dobrych praktyk ochrony ekologicznej plantacji truskawki przed szkodnikami i chorobami z wykorzystaniem preparatów z probiotycznymi mikroorganizmami oraz fermentowanych ekstraktów roślinnych.

Omówienie przebiegu badań:

Doświadczenie wykonano na produkcyjnej plantacji truskawki (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne) uprawianej w ekologicznym systemie produkcji. Jako środek ochrony rośliny użyto probiotyczne mikroorganizmy z ekstraktem roślinnym z pokrzywy. Doświadczenie wykonano w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 20 m². Dla każdego obiektu wykonano 6 zabiegów ochronnych dolistnie oraz doglebowo: 2 zabiegi ochronne przed kwitnieniem, 1 zabieg w trakcie kwitnienia i 1 zabieg po kwitnieniu oraz 2 zabiegi po zbiorze. Zastosowano następujące warianty zabiegów ochronnych:

1. Kontrola – bez żadnych zabiegów ochronnych.
2. Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II.
3. Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.
4. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM zastosowany na początku wegetacji doglebowo, a w kolejnych zabiegach dolistnie.
5. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

Zabiegi wykonywano wieczorem lub wcześniej rano, gdyż środki biologiczne wykazują mniejszą skuteczność, gdy są aplikowane przy świetle słonecznym. Dokładne i częste lustracje plantacji pozwoliły na precyzyjne określanie występowania agrofagów i podjęcie decyzji o sposobie ich zwalczania.

Zabiegi ochronne na truskawce przeprowadzono w następujących dniach i fazach BBCH:

I zabieg - 07.05.2015 BBCH 54-55

II zabieg - 14.05.2015 BBCH 59-60

III zabieg - 28.05.2015 BBCH 70-71

IV zabieg – 04.06.2015 BBCH 80-81

V zabieg - 11.06.2015 BBCH 86

VI zabieg - 18.06.2015 BBCH 88

Przed założeniem doświadczenia została przeprowadzona lustracja w celu określenia stopnia zagrożenia przez szkodniki glebowe. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji znaleziono średnio 3 pędraki na 1m², przy progu szkodliwości wynoszącym 0,5 szt./1m². Szkodnik w takiej liczebności spowodował placowe zamieranie roślin, które obserwowano do końca maja. Na częściach nadziemnych stwierdzono żerowanie kwieciaka malinowca (*Anthonomus rubi*). Próg zagrożenia tym szkodnikiem wynosi 2 chrząszcze na 200 kwiatostanów. Na obiektach objętych doświadczeniem próg zagrożenia został przekroczony. Skuteczność zwalczania tego szkodnika przy użyciu badanych preparatów była bardzo dobra, przy czym najlepsza z wykorzystaniem „Ema5 z wrotyczem” oraz preparatu sporządzonego poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą i po ostudzeniu dodanie probiotycznych mikroorganizmów.

Zastosowanie badanych biopreparatów znacznie obniżyło procent uszkodzonych kwiatów przez larwy kwieciaka malinowca. Najlepszą skuteczność w ograniczaniu żerowania kwieciaka malinowca (*Anthonomus rubi*) wykazały „Ema5 z wrotyczem”, preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą i po ostudzeniu dodanie probiotycznych mikroorganizmów oraz preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą. Skuteczność tych preparatów była wysoka i wynosiła powyżej 82%.

Tabela A-1. Skuteczność zwalczania kwieciaka malinowca (*Anthonomus rubi*) na truskawce odmiany Senga Sengana

Lp.	Obiekt	% uszkodzonych kwiatów	skuteczność [%]
1	Kontrola	20	-
2	„Ema5 z wrotyczem”	1	95
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	1,5	92,5

4	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM	5,5	72,5
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą	3,5	82,5

Ocenę występowania szarej pleśni przeprowadzono podczas zbiorów. W celu określenia skuteczności działania preparatów probiotycznych liczono wszystkie porażone owoce na 25 roślinach/poletko w 4 powtórzeniach w porównaniu do kombinacji ochronnej.

Tabela A-2. Skuteczność badanych preparatów w zwalczaniu szarej pleśni truskawki odmiany Senga Sengana

Lp.	Obiekt	07.06.2015 BBCH 84		14.06.2015 BBCH 87		21.06.2015 BBCH 89	
		% porażonych owoców	skuteczność [%]	% porażonych owoców	skuteczność [%]	% porażonych owoców	skuteczność [%]
1	Kontrola	4,5	-	4,75	-	5	-
2	„Ema5 z wrotyczem”	0,5	88,89	0,5	89,47	0,25	95
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	0,5	88,89	0,5	89,47	0,25	95
4	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM	0,75	83,33	0,75	84,21	0,5	90
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą	0,5	88,89	0,5	89,47	0,25	95

Najlepszą efektywność w ograniczaniu szarej pleśni wykazały: Preparat „Ema5 z wrotyczem”, preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu wrotyczu z wodą z dodatkiem PM, oraz preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty naprzemiennie z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu wrotyczu z wodą. Skuteczność tych preparatów przy ostatniej obserwacji wynosiła 95%.

Biologiczną efektywność badanych preparatów w zwalczaniu białej plamistości liści truskawki oceniano na podstawie porażonych liści wg 6- stopniowej skali: 0 – rośliny zdrowe,

1 – (1%powierzchni liścia z plamami), 2 – (1-5%), 3 – (5-20%), 4 – (20-50%), 5 – (powyżej 50%).

Tabela A-3. Skuteczność badanych preparatów w zwalczaniu białej plamistości liści truskawki odmiany Senga Sengana

Lp.	Obiekt	% porażonych liści	skuteczność [%]
1	Kontrola	13,5	-
2	„Ema5 z wrotyczem”	1,75	87,03
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	2	85,19
4	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM	1,75	87,03
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą	2,5	81,48

Wszystkie zastosowane preparaty biologiczne skutecznie ograniczały występowanie białej plamistości liści truskawki oraz szarej pleśni na owocach. Najwyższą skuteczność w ograniczaniu białej plamistości liści truskawki wykazał preparat „Ema5 z wrotyczem” oraz kombinacja preparatu: „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM. Skuteczność tych preparatów wynosiła ponad 87%. Dobre wyniki wykazał również preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM), jego skuteczność wyniosła ponad 85%.

Tabela A-4. Skuteczność badanych preparatów w zwalczaniu czerwonej plamistości liści truskawki odmiany Senga Sengana

Lp.	Obiekt	% porażonych liści	Skuteczność [%]
1	Kontrola	9	-
2	„Ema5 z wrotyczem”	2	77,78
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	2,5	72,22
4	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM	1,5	83,33
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą	1,5	83,33

Najwyższą skuteczność w ograniczaniu czerwonej plamistości liści truskawki wykazały preparaty: „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM oraz

preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty naprzemiennie z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą. Najkorzystniejszym działaniem przeciwko chorobom i szkodnikom truskawki cechuje się preparat „Ema5 z wrotyczem” lub preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą i po ostudzeniu dodanie probiotycznych mikroorganizmów (PM). W przypadku występowania białej plamistości liści truskawki wskazane jest stosować „Ema5 z wrotyczem” z dodatkiem fermentowanego ekstraktu z pokrzywy z PM przed kwitnieniem i w okresie kwitnienia truskawki, gdyż ten preparat wykazał największą efektywność przeciw tej chorobie. Efektywnym preparatem ograniczającym występowanie czerwonej plamistości liści jest preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM. Preparat ten daje dobre wyniki również przy stosowaniu naprzemiennym z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą.

malina

Cel realizacji tematu:

Celem badań było opracowanie dobrych praktyk ochrony ekologicznej plantacji maliny przed szkodnikami i chorobami z wykorzystaniem preparatów z probiotycznymi mikroorganizmami oraz fermentowanych ekstraktów roślinnych.

Omówienie przebiegu badań:

Doświadczenie wykonano na produkcyjnej plantacji maliny (*Rubus* L.) uprawianej w ekologicznym systemie produkcji. Jako środek ochrony rośliny użyto probiotyczne mikroorganizmy z ekstraktem roślinnym z pokrzywy. Doświadczenie wykonano w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 20 m². Dla każdego obiektu wykonano 6 zabiegów ochronnych dolistnie oraz doglebowo: 2 zabiegi ochronne przed kwitnieniem, 1 zabieg w trakcie kwitnienia i 1 zabieg po kwitnieniu oraz 2 zabiegi po zbiorze. Zastosowano następujące warianty zabiegów ochronnych:

1. Kontrola – bez żadnych zabiegów ochronnych.
2. Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II.
3. Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.
4. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM zastosowany na początku wegetacji doglebowo, a w kolejnych zabiegach dolistnie.
5. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

Zabiegi wykonywano wieczorem lub wcześniej rano, gdyż środki biologiczne wykazują mniejszą skuteczność, gdy są aplikowane przy świetle słonecznym. Dokładne i częste lustracje plantacji pozwoliły na precyzyjne określanie występowania agrofagów i podjęcie decyzji o sposobie ich zwalczania.

Obecność pędraków, drutowców i opuchlaków została oceniona wiosną oraz pod koniec sierpnia na podstawie pobranych prób glebowych, pobieranych w liczbie 32 na każdy 1 ha plantacji.

Przed kwitnieniem roślin na przełomie maja i czerwca oceniono obecność kwieciaka malinowca (*Anthonomus rubi*) i kistnika malinowca (*Byturus tomentosus*) pobierając 4 próby po 50 losowo wybranych kwiatostanów z plantacji strząsając z nich chrząszcze na podstawioną płytkę.

Ocena występowania mszycy malinowej (*Aphis idaei*) zastała przeprowadzona w dwóch terminach przed kwitnieniem i w pełni kwitnienia, pobierając każdorazowo 4 próby po 50 losowo wybranych pąków z plantacji o powierzchni 1 ha. W przypadku przyszczarka namalinika łądogowego (*Resseliella theobaldi*) obserwacje przeprowadzono w trzech terminach w końcu maja, połowie czerwca i połowie lipca, natomiast efektywność zabiegów przeciwko temu agrofagowi została oceniona po opadnięciu liści, na początku października. Ocena występowania tego szkodnika została przeprowadzona w oparciu o każdorazowe pobranie 4 prób po losowo wybranych 50 pędów jednorocznych na plantacji 1 ha, natomiast ocena efektywności zabiegów polegała na przejrzaniu 200 losowo wybranych pędów (pod skórka w spękaniach i zranieniach pędów) na obecność jaj i larw szkodnika z powierzchni 1 ha.

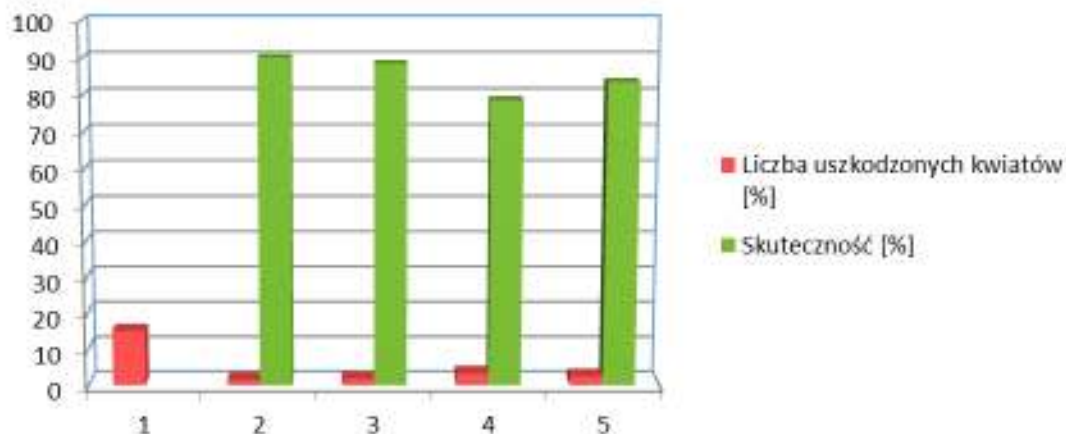
Ocenę występowania chorób: zamieranie pędów maliny (*Didymella applanota*) antraknozy (*Plectodiscella veneta* Burkh), szarej pleśni (*Bortyitis cirenea*) i rdzy malin (*Phragmidium rubi*) przeprowadzono w połowie lipca oraz w drugiej połowie sierpnia.

Przed założeniem doświadczenia została przeprowadzona lustracja w celu określenia stopnia zagrożenia przez szkodniki glebowe. Na plantacji maliny nie stwierdzono obecności drutowców i opuchlaków. Zagęszczenie pędraków na 1 m² plantacji wynosiło 0,21 szt. co było poniżej progu ekonomicznej szkodliwości. Obecność kwieciaka malinowca (*Anthonomus rubi*) i kistnika malinowca (*Byturus tomentosus*) oceniono przed kwitnieniem roślin. Kwieciaka malinowa nie stwierdzono, a skuteczność ograniczania kistnika malinowa przedstawiono w tabeli B-1.

Tabela B-1. Skuteczność zwalczania kistnika malinowca (*Byturus tomentosus*) w malinie odmiany odmiany Polana

Lp.	Obiekt	Liczba uszkodzonych kwiatów [%]	Skuteczność [%]
1	Kontrola	15,25	-
2	„Ema5 z wrotyczem”	1,50	90,16
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	1,75	88,52

4	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM	3,00	80,33
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą	2,5	83,61



Rys. B-1. Skuteczność badanych preparatów w zwalczania kistnika malinowca (*Byturus tomentosus*) w malinie odmiany odmiany Polana

Zastosowanie badanych biopreparatów znacznie obniżyło liczbę uszkodzonych kwiatów. Największą skuteczność w ograniczaniu kistnika malinowca (*Byturus tomentosus*) ponad 90 % wykazał preparat „Ema5 z wrotyczem”. Efektywny okazał się również preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM), który ograniczał kistnika malinowca w 88,52 %. Mszyce i przyszczarek namaliniak łodygowy nie wystąpiły na plantacji.

Obserwacje chorób maliny były prowadzone od połowy lipca do drugiej połowy sierpnia. Obserwowano antraknozę w niewielkim nasileniu do 2%, nie stwierdzono zamierania pędów maliny i szarej pleśni. Chorobą, która wystąpiła na plantacji była rdza malin. Biologiczną efektywność badanych preparatów w zwalczaniu rdzy malin oceniano na podstawie porażonych liści wg 5-stopniowej skali: 0 – rośliny zdrowe, 1 – (1% powierzchni liścia z plamami), 2 – (1-5%), 3 – (5-20%), 4 – (20-50%), 5 – (powyżej 50%).

Tabela B-2. Skuteczność badanych preparatów w zwalczaniu rdzy malin (*Phragmidium rubi*) na roślinach maliny odmiany Polana

Lp.	Obiekt	23.07.2015		25.08.2015	
		% porażonych liści	skuteczność [%]	% porażonych liści	skuteczność [%]
1	Kontrola	29	-	49	-
2	„Ema5 z wrotyczem”	4,5	84,48	8,25	83,16

3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	4,75	83,62	8,5	82,65
4	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM	1	96,55	4,75	90,31
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą	0,75	97,41	4,25	91,33

Najlepszą efektywność w zwalczaniu rdzy maliny wykazały preparaty „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą oraz „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM). W przypadku tych preparatów skuteczności wynosiły kolejno 97,41% i 96,55% (tabela B-2).

Podsumowując, badane preparaty efektywnie działały przeciwko chorobom i szkodnikom maliny. Ich skuteczność była wysoka i w każdym przypadku wynosiła ponad 80 %. W zwalczaniu szkodników najlepszym preparatem był „Ema5 z wrotyczem”, natomiast w ograniczaniu rdzy maliny preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą, ze skutecznością ponad 97%.

czarna porzeczka

Cel realizacji tematu:

Celem badań było opracowanie dobrych praktyk ochrony ekologicznej plantacji czarnej porzeczki przed szkodnikami i chorobami z wykorzystaniem preparatów z probiotycznymi mikroorganizmami oraz fermentowanych ekstraktów roślinnych.

Omówienie przebiegu badań:

Doświadczenie wykonano na produkcyjnej plantacji czarnej porzeczki (*Ribes nigrum* L.) uprawianej w ekologicznym systemie produkcji. Jako środek ochrony rośliny użyto probiotyczne mikroorganizmy z ekstraktami roślinnymi z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego oraz pokrzywy. Doświadczenie wykonano w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 20 m². Dla każdego obiektu wykonano 6 zabiegów ochronnych dolistnie oraz doglebowo: 2 zabiegi ochronne przed kwitnieniem, 1 zabieg w trakcie kwitnienia i 1 zabieg po kwitnieniu oraz 2 zabiegi po zbiorze. Zastosowano następujące warianty zabiegów ochronnych:

1. Kontrola – bez żadnych zabiegów ochronnych.
2. Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawa Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II.
3. Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.
4. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy do stosowania doglebowego i dolistnego.
5. Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

Ilość cieczy roboczej do oprysku doglebowego wynosiła od 400 do 1000 l/ha w zależności od wilgotności gleby, natomiast do oprysku dolistnego od 500 do 900 l/ha.

Dodatkowo w badaniu użyto dispenserów feromonowych w celu ograniczania liczebności przeziernika porzeczkowca w ilości 300 szt./ha rozwieszanych równomiernie na całym obszarze doświadczenia, ze wzmocnionymi skrajnymi rzędami, bezpośrednio przed wiosennym lotem motyli.

Przed założeniem doświadczenia na plantacji przeprowadzono lustrację w celu określenia stopnia zagrożenia przez szkodniki glebowe oraz występujące na roślinach. Obecność opuchlaków nie została stwierdzona. Oceniono obecność wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyes ribis* / *Eriophyes ribis* / *Phytoptus ribis*) przed kwitnieniem na przełomie marca/kwietnia przeglądając losowo wybrane krzewy na obecności "galasowych" pąków zasiedlonych przez szkodnika. Ocena występowania przyszczarka porzeczkowiaka kwiatowego (*Dasineura ribis*) polegająca na przejrzaniu 100 losowo wybranych kwiatostanów na plantacji 1 ha została przeprowadzona podczas kwitnienia. Na początku maja oraz w połowie czerwca oceniono występowanie mszyc, każdorazowo oceniając 200 losowo wybranych pędów na 1 ha plantacji. Od połowy czerwca do sierpnia/września oceniano występowanie przyszczarka porzeczkowca pędowego (*Thomasiniana ribis*) każdorazowo na 200 losowo wybranych pędach jednorocznych porzeczek. Próby 200 liści z losowo wybranych krzewów z plantacji 1 ha porzeczek na obecność przedziorka chmielowca (*Tetranychus urticae*) pobierano dwa razy w miesiącu, od czerwca do września. Do ograniczania przeziernika porzeczkowca (*Synanthedon tipuliformis* Clerck) wykorzystano dodatkowo dispensery feromonowe. Po kwitnieniu, od końca maja do początku sierpnia prowadzono odłowienie przeziernika porzeczkowca z użyciem pułapek feromonowych typu delta - trójkątna. Ilość odłowionych motyli sprawdzano co tydzień. Jesienią prowadzono dodatkowo analizę występowania larw wewnątrz pędów jedno- oraz wieloletnich oraz oceniono uszkodzenia pędów.

Ocena występowania amerykańskiego mączniaka agrestu, antraknozy, białej plamistości liści oraz rdzy wejmutkowo-porzeczkowej została przeprowadzona wg 5-punktowej skali (1 - brak objawów porażenia, 5 - bardzo silne porażenia roślin) została przeprowadzona w połowie lipca oraz w drugiej połowie sierpnia. Przeprowadzono również ocenę występowania szarej pleśni podczas zbioru owoców.

Wyniki badań:

Obecność wielkopąkowca porzeczkowego stwierdzono na początku sezonu wegetacyjnego i określono ją, jako bardzo niski poziom bez istotnych różnic między poletkami. Nie udało się stwierdzić jaki wpływ mają badane preparaty na wielkość populacji szkodnika. Kompleksowa ocena ograniczenia zasiedlania pędów czarnej porzeczeki będzie możliwa dopiero wiosną

przyszłego roku. Pryszczarek porzeczkowiec pędy oraz pryszczarek porzeczkowiak kwiatowego nie został zaobserwowany. Obecność przędziorka chmielowca została określona jako średni poziom z tendencją do niskiego.

Tabela C-1. Skuteczność w ograniczaniu występowania przędziorka chmielowca.

obiekt	czerwiec		lipiec		sierpień		wrzesień	
	średnia wystąpienia agrofaga	skuteczność wg Abbotta [%]	średnia wystąpienia agrofaga	skuteczność wg Abbotta [%]	średnia wystąpienia agrofaga	skuteczność wg Abbotta [%]	średnia wystąpienia agrofaga	skuteczność wg Abbotta [%]
1	5,25		6,00		5,25		4,75	
2	2,25	57,14	1,25	79,17	0,50	90,48	0,25	94,74
3	1,75	66,67	2,00	66,67	0,75	85,71	0,25	94,74
4	1,25	76,19	1,25	79,17	1,25	76,19	1,00	78,95
5	1,50	71,43	1,50	75,00	1,25	76,19	0,50	89,47

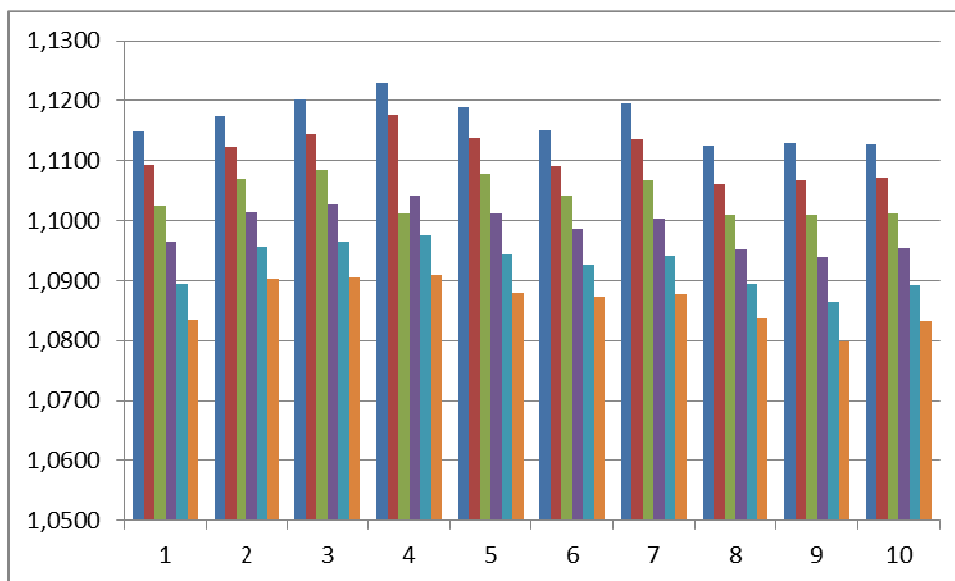
Dla preparatu 2 wykazano najwyższą skuteczność w zwalczaniu przędziorka chmielowca. Mszyce, (*Aphis schneideri*) oraz (*Cryptomyzus ribis* L.), nie były obserwowane. Zastosowanie dyspenserów feromonowych na plantacjach czarnej porzeczki ograniczyło występowanie przeziernika porzeczkowego. Nie stwierdzono odłowionych owadów w pułapki feromonowe po wywieszeniu dyspenserów na terenie objętym doświadczeniem.

Tabela C-2. Skuteczność stosowania dyspenserów feromonowych [%]

Skuteczność stosowania dyspenserów feromonowych [%] liczona równaniem Abbotta	larwy		uszkodzenia pędów	
	pędy > 1 rok	pędy < 1 rok	pędy > 1 rok	pędy < 1 rok
wiosna 2015	75,25	79,85	87,45	100,00
jesień 2015	86,43	100,00	95,30	100,00

Tabela C-3. Średnia ilość agrofaga na 1 krzewie z 5 ocenianych pędów na każdym z 20 krzewów porzeczki czarnej

Ilość	larwy		uszkodzenia pędów	
	pędy > 1 rok	pędy < 1 rok	pędy > 1 rok	pędy < 1 rok
wiosna 2015	1,20	0,35	1,55	0,6
jesień 2015	0,45	0,05	0,8	0,15



Rysunek C-1. Spadek masy dozowników feromonowych od czerwca do października 2015 [g].

Obserwacje chorób czarnej porzeczki były prowadzone od końca maja, natomiast zbiór porzeczki odbył się na początku lipca. Przed zbiorami antraknoza, rdza wejmutkowo-porzeczkowa, amerykański mączniak agrestu oraz biała plamistość liści porzeczki były obserwowane. Ocenę występowania szarej pleśni przeprowadzono bezpośrednio przed zbiorem owoców. Choroba nie została stwierdzona. Antraknoza doprowadziła silnego porażenia liści porzeczki. Nie stwierdzono znaczącego ograniczenia wzrostu roślin spowodowanego występowaniem chorób, a jedynie ich słabszy rozwój, a właściwie zahamowanie wzrostu związane z niesprzyjającymi warunkami pogodowymi tj. bardzo wysokimi temperaturami oraz suszą.

Tabela C-4. Skuteczność w ograniczaniu antraknozy czarnej porzeczki.

obiekt	przed zbiorem		lipiec		druga połowa sierpnia	
	średnie porażenie wg skali oceny	skuteczność wg Abbotta [%]	średnie porażenie wg skali oceny	skuteczność wg Abbotta [%]	średnie porażenie wg skali oceny	skuteczność wg Abbotta [%]
1	4,00		4,50		4,50	
2	3,75	16,67	4,00	11,11	4,00	11,11
3	3,75	16,67	3,75	16,67	3,75	16,67
4	2,50	44,44	2,75	38,89	2,75	38,89
5	2,25	50,00	2,50	44,44	2,75	38,89

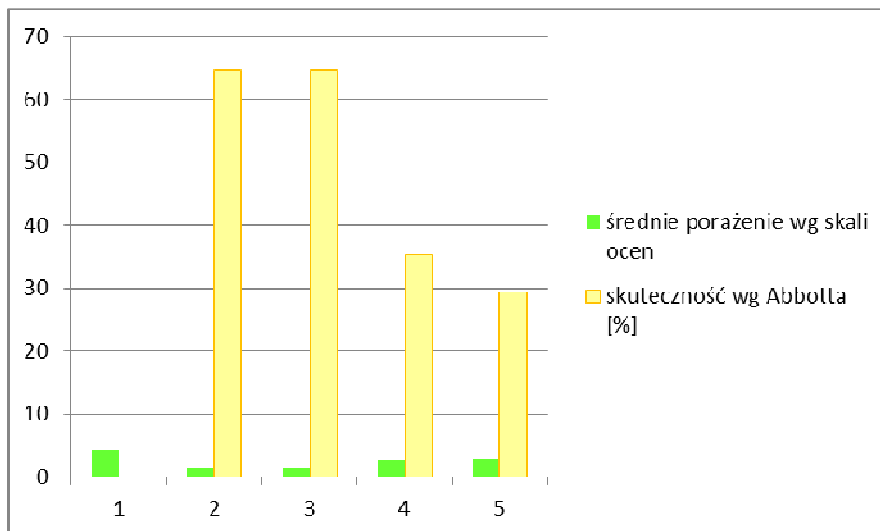
Rdza wejmutkowo-porzeczkowa nie była dominującą chorobą w sezonie wegetacyjnym 2015 r. na obiektach doświadczalnych. Jej poziom oceniono jako niski.

Tabela C-5. Skuteczność w ograniczaniu rdzy wejmutkowo-porzeczkowej.

obiekt	przed zbiorem		lipiec		druga połowa sierpnia	
	średnie porażenie wg skali oceny	skuteczność wg Abbotta [%]	średnie porażenie wg skali oceny	skuteczność wg Abbotta [%]	średnie porażenie wg skali oceny	skuteczność wg Abbotta [%]
1	2,00		2,25		2,25	
2	1,75	12,5	1,75	12,5	1,75	12,5
3	1,25	37,5	1,25	37,5	1,50	25,0
4	1,25	37,5	1,50	25,0	1,50	25,0
5	1,25	37,5	1,25	37,5	1,50	25,0

W obu przypadkach najlepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu kombinacji 5 tj. preparatu „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.

Przed zbiorem nie zaobserwowano porażenia amerykańskim mączniakiem agrestu. Występowały pojedyncze ogniska choroby do 15% porażenia liścia na pojedynczych roślinach, bez istotnych różnic pomiędzy poletkami. Również w niewielkim stopniu wystąpiła biała plamistość liści porzeczki. Najskuteczniejszym preparatem w jej ograniczaniu był preparat „Ema5 z wrotyczem” oraz preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego wykazując skuteczność na poziomie prawie 65 %.



Rys C-2. Skuteczność w ograniczaniu białej plamistości liści porzeczki.

Podsumowując, najlepsze działanie zarówno przeciwko chorobom jak i szkodnikom miało zastosowanie preparatu „Ema5 z wrotyczem” oraz preparatu „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania dogłębowego i dolistnego. Również metoda dezinformacji samców przeziernika porzeczki przy użyciu dyspenserów feromonowych okazała się efektywna.

Określenie zdolności do hamowania aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez wystandaryzowane wyciągi wodne z owoców maliny, truskawki i porzeczki czarnej.

Badania polegały na wytworzeniu wodnych wyciągów z próbek owoców, które zostały wyprodukowane w ramach projektu. Wodne wyciągi są odpowiednikiem produktów spożywanych przez człowieka (dżemy, kompoty, marmolady itp. oparte są na wodzie jako rozpuszczalniku), przy czym została określona zawartość związków fenolowych ogółem w każdej próbce. Zostało zbadane hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez każdy wodny wyciąg z owocu (metoda spektrofotometryczna). Na podstawie uzyskanych wyników określono korelację danego zabiegu agrotechnicznego ze zdolnością do hamowania aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy.

Ponadto, wykonano ekstrakty etanolowe z próbek owoców, w celu wyczerpującej (całkowitej) ekstrakcji związków fenolowych do roztworu. Określono korelację danego zabiegu agrotechnicznego z zawartością związków fenolowych ogółem. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji.

Cel analizy:

- określenie zawartości związków fenolowych ogółem w próbkach owoców truskawki, maliny i czarnej porzeczki
- określenie zdolności do hamowania aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez wodne wyciągi z owoców truskawki, maliny i czarnej porzeczki
- określenie, czy istnieje związek pomiędzy zawartością związków fenolowych ogółem w próbkach owoców i zdolnością do hamowania aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez wodne wyciągi z owoców
- wytworzenie wodno-etanolowego ekstraktu z owocu charakteryzującego się najlepszym stosunkiem: **hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy / zawartość związków fenolowych ogółem**
- jakościowa analiza chromatograficzna wodno-etanolowego ekstraktu z owocu charakteryzującego się najlepszym stosunkiem: **hamowanie aktywności**

acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy / zawartość związków fenolowych ogółem (w skali preparatywnej i analitycznej)

Przygotowanie wodnych wyciągów z owoców

Naważkę ok. 50 g owoców truskawki (odważoną z dokładnością 0,02 g) roztarto w moździerzu do formy jednolitej masy. Następnie w probówce polipropylenowej (10 cm³) odważono 1 g miazgi owocu (z dokładnością do 0,01 g) i dodano 2 cm³ buforu Tris-HCl (50 mmol/dm³, pH 8,0, odważone z dokładnością 0,01). W przypadku dwóch pozostałych owoców, do ok. 50 g naważki owocu (odważonej z dokładnością 0,02 g) dodano taką samą naważkę buforu Tris-HCl (50 mmol/dm³, pH 8,0) i roztarto w moździerzu do formy jednolitej masy. Następnie w probówce polipropylenowej (10 cm³) odważono 2 g miazgi owocu (z dokładnością do 0,01 g) i dodano 1 cm³ buforu Tris-HCl (50 mmol/dm³, pH 8,0, odważoną z dokładnością 0,01 g), aby w przypadku wszystkich trzech owoców uzyskać takie samo rozcieńczenie (3x m/m). Homogenne próbki rozcieńczone buforem wirowano w probówkach typu Eppendorf (1,5 cm³, 12 000g, 4 °C, 10 min). Klarowny supernatant użyto do badań bezpośrednio po wytworzeniu.

Oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych

Analizę wykonano wg metody Folin i Ciocalteu (1927) z niewielkimi modyfikacjami. Próbkę klarownego supernatantu (0,003 cm³) zmieszano z 0,3 cm³ odczynnika Folina-Ciocalteu (0,2 mol/dm³) a po minucie dodano 1,2 cm³ 20% (w/v) roztworu Na₂CO₃, następnie próbki inkubowano w ciemności przez 2 godziny i zmierzono absorbancję przy długości fali 760 nm. Zawartości związków fenolowych obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej o wzorze $y=0,0661x$ (y = absorbancja, x = zawartość kwasu galusowego $\mu\text{g}/0,003 \text{ cm}^3$), wykonanej w oparciu o serię rozcieńczeń kwasu galusowego w zakresie od 0 do 21,8 μg kwasu/0,003 cm³. Analizę wykonano w ośmiu powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczalnego. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu STATISTICA 6.0, (StatSoft, Kraków, Polska). Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi. Różnice między średnimi z grup analizowano testem jednoczynnikowej analizy wariancji (test Tukey'a) z P przyjętym na poziomie $< 0,05$.

Najwyższą zawartość związków fenolowych stwierdzono w ekstraktach z różnych plantacji porzeczki czarnej. Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie ($P < 0,05$) różnic między zawartością związków fenolowych ogółem pomiędzy ekstraktami przygotowanymi z owoców porzeczki z poszczególnych plantacji, tj. kontrolnej oraz plantacji, w których

wykorzystywano ekologiczne zabiegi ochronne. Na uwagę zasługuje jednak podwyższona zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach z owoców porzeczki z plantacji ekologicznych wykorzystujących preparat "Ema5 z wrotyczem" łącznie z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) ($13,28 \pm 0,24 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$) w porównaniu do owoców z plantacji kontrolnej ($11,33 \pm 0,59 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$).

W przebadanych ekstraktach z owoców maliny najwyższą zawartość związków fenolowych stwierdzono w przypadku owoców z plantacji kontrolnej ($6,53 \pm 0,06 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$). Zawartość związków fenolowych ogółem nie różniła się w sposób istotny statystycznie ($P < 0,05$) od kontroli w przypadku plantacji owoców, na których wykorzystywano ekologiczne zabiegi ochronne: preparat „Ema5 z wrotyczem” ($5,85 \pm 0,18 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$) oraz preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM używany na przemian z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM ($5,51 \pm 0,17 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$). W przypadku pozostałych plantacji wykorzystujących ekologiczne zabiegi ochronne, tj. preparat z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM lub preparat "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM, stwierdzono statystycznie istotnie ($P < 0,05$) niższą zawartość związków fenolowych ogółem.

Brak istotnych statystycznie ($P < 0,05$) różnic między zawartością związków fenolowych ogółem w ekstraktach przygotowanych z owoców truskawki z plantacji kontrolnej, a ekstraktami z owoców z plantacji, w których wykorzystywano ekologiczne zabiegi ochronne. Na uwagę zasługuje jednak podwyższona zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach z owoców truskawek z plantacji ekologicznych wykorzystujących następujące zabiegi: użycie preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM ($2,55 \pm 0,18 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$) oraz zastosowanie preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM na przemian z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM ($2,51 \pm 0,00 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$) w porównaniu do przebadanej plantacji kontrolnej ($2,22 \pm 0,17 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$).

Tabela 1. Wpływ wybranych ekologicznych zabiegów ochronnych na zawartość związków fenolowych ogółem w ekstraktach z owoców truskawki, maliny i porzeczki czarnej

Zawartość związków fenolowych ogółem [μg związków fenolowych/3 μL badanego ekstraktu]					
Truskawka		Malina		Porzeczka czarna	
T1	$2,22 \pm 0,17^a$	M1	$6,53 \pm 0,06^c$	P1	$11,33 \pm 0,59^a$
T2	$2,10 \pm 0,18^a$	M2	$5,85 \pm 0,18^{bc}$	P2	$10,72 \pm 0,63^a$
T3	$2,16 \pm 0,12^a$	M3	$4,25 \pm 0,06^a$	P3	$11,87 \pm 0,63^a$
T4	$2,55 \pm 0,18^a$	M4	$5,00 \pm 0,12^{ab}$	P4	$10,61 \pm 0,41^a$
T5	$2,51 \pm 0,00^a$	M5	$5,51 \pm 0,17^{bc}$	P5	$13,28 \pm 0,24^a$

Zastosowane ekologiczne zabiegi ochronne w przypadku uprawy truskawki (T) i maliny (M): **1.** Uprawa kontrolna, bez zabiegów ochronnych; **2.** Zastosowanie preparatu mikrobiologiczny z wrotyczem ("Ema5 z wrotyczem"); **3.** Zastosowanie preparatu z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM); **4.** Zastosowanie preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM; **5.** Zastosowanie preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM. Zastosowane ekologiczne zabiegi ochronne w przypadku uprawy porzeczki czarnej: **P1.** Uprawa kontrolna, bez zabiegów ochronnych; **P2.** Zastosowanie preparatu "Ema5 z wrotyczem"; **P3.** Zastosowanie preparatu z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM; **P4.** Zastosowanie preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy; **P5.** Zastosowanie preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM.

Oznaczenie zdolności do hamowania aktywności ChE (cholinoesteraz)

Do oznaczenia wykorzystano metodę Ellmana [Ellman i in. 1961] z własnymi modyfikacjami. Roztwory odczynników sporządzano w buforze Tris-HCl (100 mmol/dm³, pH 8,0). Składnikami mieszaniny reagującej były: 0,035 cm³ analizowanej próby (wodne wyciągi z owoców truskawki, maliny i porzeczki czarnej), 0,035 cm³ acetylotiocholiny (ATCh) albo butyrylotiocholiny (BTCh; 1,5 mmol/dm³), 0,194 cm³ kwasu 5,5'-ditio-2-nitrobenzenowego (0,3 mmol/dm³ DTNB z 10 mmol/dm³ NaCl i 2 mmol/dm⁻³ MgCl₂ · 6 H₂O), 0,020 cm³ acetylocholinoesterazy (AChE) lub butyrylocholinoesterazy (BChE; 0,28 U/cm³), 0,086 cm³ buforu Tris-HCl (100 mmol/dm³, pH 8,0). Pomiar absorbancji ($\lambda = 405 \text{ nm}$, 22 °C; czytnik mikropłytek Sunrise, Tecan, Austria) wykonano po 15 min. (BChE) lub 30 min. (AChE). Równocześnie analizowano: (1) kontrolę pozytywną, zawierającą wzorcowy inhibitor ChE – eserynę (Es; 181,5 $\mu\text{mol/dm}^3$), (2) kontrolę negatywną, w której próbę badaną lub roztwór Es zastąpiono buforem Tris-HCl. Zdolność do hamowania aktywności ChE przez badaną próbę wyrażono w procentach [%]. Oznaczenia wykonano w ośmiu powtórzeniach. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu STATISTICA 6.0, (StatSoft, Kraków, Polska). Wyniki przedstawiono jako średnie z odchyleniami standardowymi. Różnice między średnimi

z grup zanalizowano testem jednoczynnikowej analizy wariancji Tukey'a z P przyjętym na poziomie $< 0,05$.

Najwyższą zdolność do hamowania aktywności AChE i BChE stwierdzono w przypadku ekstraktów z owoców maliny. Ekstrakt z owoców z plantacji kontrolnej charakteryzował się najwyższą zdolnością do hamowania aktywności AChE ($60,99 \pm 0,02\%$). Analizowana aktywność w przebadanych ekstraktach z owoców poddanych ekologicznym zabiegom ochronnym uległa obniżeniu. Istotną statystycznie niższą inhibicję AChE stwierdzono jedynie w przypadku ekstraktu z malin z plantacji, na której wykorzystano preparat z granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM ($43,74 \pm 0,06\%$).

Ekstrakt z malin z plantacji kontrolnej charakteryzował się także wysoką zdolnością do hamowania aktywności BChE ($50,40 \pm 0,06\%$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie ($P < 0,05$) różnic między owocami kontrolnymi a owocami z plantacji ekologicznych. Niemniej jednak, na uwagę zasługuje pozytywny wpływ uprawy z użyciem preparatu "Ema5 z wrotyczem" z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM na przemian z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM na zdolność do hamowania aktywności BChE ($51,30 \pm 0,08\%$). Z drugiej strony, obniżenie zdolności do inhibicji względem BChE ($39,16 \pm 0,04\%$) stwierdzono w przypadku owoców maliny uprawianych z wykorzystaniem preparatu "Ema5 z wrotyczem" łącznie z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z dodatkiem PM.

W przypadku ekstraktu z owoców porzeczki czarnej z plantacji kontrolnej stwierdzono $24,44 \pm 0,02\%$ inhibicję AChE i $24,84 \pm 0,05\%$ inhibicję BChE. Jednak najwyższą zdolność do hamowania ChE stwierdzono w przypadku ekstraktu z owoców porzeczki z plantacji, na której wykorzystywano wyłącznie preparat mikrobiologiczny "Ema5 z wrotyczem". W omawianym przypadku stwierdzono inhibicję AChE ($45,68 \pm 0,05\%$) i BChE ($41,80 \pm 0,03\%$) bez istotnych różnic względem kontroli, ale wyższych w sposób istotny statystycznie ($P < 0,05$) od ekstraktów z owoców uzyskanych z plantacji opartych o inne sposoby ekologicznej ochrony roślin.

Zdolność do hamowania aktywności AChE przez ekstrakt z owoców truskawki z plantacji kontrolnej wyniosła $16,78 \pm 0,03\%$. Istotną statystycznie ($P < 0,05$) niższą inhibicję AChE stwierdzono w przypadku ekstraktu z owoców z plantacji prowadzonej z wykorzystaniem wyłącznie preparatu "Ema5 z wrotyczem". W przypadkach pozostałych ekologicznych zabiegów ochronnych nie stwierdzono ich istotnego ($P < 0,05$) wpływu na omawianą aktywność owoców truskawki.

Ekstrakt z owoców truskawki z plantacji kontrolnej hamował aktywność BChE na poziomie $13,45 \pm 0,03\%$. Analizowane zabiegi ochronne wpływały na obniżenie wspomnianej zdolności, ale tylko w przypadku użycia preparatu "Ema5 z wrotyczem" łącznie z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM stwierdzono istotnie ($P < 0,05$) niższą inhibicję BChE ($7,00 \pm 0,03\%$).

Tabela 2. Wpływ wybranych ekologicznych zabiegów ochronnych na zdolność do hamowania aktywności AChE przez ekstrakty z owoców truskawki, maliny i porzeczki czarnej.

Zdolność do hamowania aktywności AChE [%]					
Truskawka		Malina		Porzeczka czarna	
T1	$16,78 \pm 0,03^b$	M1	$60,99 \pm 0,02^b$	P1	$24,44 \pm 0,02^{ab}$
T2	$9,96 \pm 0,05^a$	M2	$51,47 \pm 0,02^{ab}$	P2	$45,68 \pm 0,05^b$
T3	$16,91 \pm 0,03^b$	M3	$43,74 \pm 0,06^a$	P3	$16,75 \pm 0,04^a$
T4	$12,21 \pm 0,03^{ab}$	M4	$47,13 \pm 0,03^{ab}$	P4	$21,16 \pm 0,03^a$
T5	$12,65 \pm 0,03^{ab}$	M5	$59,78 \pm 0,02^{ab}$	P5	$9,70 \pm 0,04^a$

Tabela 3. Wpływ wybranych ekologicznych zabiegów ochronnych na zdolność do hamowania aktywności BChE przez ekstrakty z owoców truskawki, maliny i porzeczki czarnej

Zdolność do hamowania aktywności BChE [%]					
Truskawka		Malina		Porzeczka czarna	
T1	$13,45 \pm 0,03^b$	M1	$50,40 \pm 0,06^{ab}$	P1	$24,84 \pm 0,05^{ab}$
T2	$11,34 \pm 0,06^{ab}$	M2	$43,03 \pm 0,09^{ab}$	P2	$41,80 \pm 0,03^b$
T3	$10,55 \pm 0,02^{ab}$	M3	$39,72 \pm 0,06^{ab}$	P3	$17,24 \pm 0,07^a$
T4	$7,00 \pm 0,03^a$	M4	$39,16 \pm 0,04^a$	P4	$19,85 \pm 0,07^a$
T5	$7,75 \pm 0,03^{ab}$	M5	$51,30 \pm 0,08^b$	P5	$14,18 \pm 0,04^a$

Podsumowanie wyników dotyczących oznaczania zawartości związków fenolowych, hamowania aktywności cholinoesteraz i związku między zawartością związków fenolowych i aktywnością antycholinoesterazową

Nie stwierdzono jednoznacznego i istotnego (na poziomie $P < 0,05$) wpływu przeprowadzonych zabiegów ochrony ekologicznej na zawartość związków fenolowych ogółem i aktywności przeciw-cholinoesterazowych wybranych owoców. Niemniej jednak należy podkreślić, że ekstrakty z owoców porzeczki czarnej stanowiły najcenniejsze źródło związków fenolowych ogółem (Tab. 4), a na szczególną uwagę zasługują owoce z plantacji, na której wykorzystano preparat "Ema5 z wrotyczem" łącznie z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem PM ($13,28 \pm 0,24 \mu\text{g zw. fenol./3 } \mu\text{L ekstraktu}$). Jednak

najwyższe zdolności do hamowania aktywności ChE stwierdzono w przypadku wodnych wyciągów z owoców maliny, którym odpowiadają także najwyższe wartości współczynnika k . Współczynnik ten obrazuje procentową zdolność do hamowania aktywności ChE przez 1 μg związków fenolowych zawartych w badanym ekstrakcie owocowym. Na tej podstawie sugeruje się, że istotniejszą rolę w kształtowaniu aktywności anty-ChE należy przypisać nie ogólnej zawartości związków fenolowych w badanym surowcu roślinnym, ale konkretnym substancjom w nim występującym. Dlatego też w następnej kolejności postanowiono wykorzystać chromatograficzne metody analizy jakościowej w celu wstępnej identyfikacji związków fenolowych warunkujących wysokie zdolności do hamowania aktywności cholinoesteraz przez ekstrakt z owoców maliny.

Tabela 4. Wpływ wybranych ekologicznych zabiegów ochronnych na zawartość związków fenolowych ogółem oraz zdolność do hamowania aktywności ChE przez ekstrakty z owoców truskawki, maliny i porzeczki czarnej – porównanie wszystkich próbek owoców

Próbka	Zawartość zw. fenol. ogółem [μg zw. fenol./3 μL ekstraktu]	Zdolność do hamowania aktywności AChE [%]	k_A	Zdolność do hamowania aktywności BChE [%]	k_B
T1	2,22 \pm 0,17 ^{ab}	16,78 \pm 0,03 ^a	7,56	13,45 \pm 0,03 ^{ab}	6,06
T2	2,10 \pm 0,18 ^a	9,96 \pm 0,05 ^a	4,74	11,34 \pm 0,06 ^{ab}	5,40
T3	2,16 \pm 0,12 ^{ab}	16,91 \pm 0,03 ^a	7,83	10,55 \pm 0,02 ^{ab}	4,88
T4	2,55 \pm 0,18 ^{ab}	12,21 \pm 0,03 ^a	4,79	7,00 \pm 0,03 ^a	2,75
T5	2,51 \pm 0,00 ^{ab}	12,65 \pm 0,03 ^a	5,04	7,75 \pm 0,03 ^a	3,09
M1	6,53 \pm 0,06 ^d	60,99 \pm 0,02 ^c	9,34	50,40 \pm 0,06 ^d	7,72
M2	5,85 \pm 0,18 ^{cd}	51,47 \pm 0,02 ^c	8,80	43,03 \pm 0,09 ^d	7,36
M3	4,25 \pm 0,06 ^{bc}	43,74 \pm 0,06 ^{bc}	10,29	39,72 \pm 0,06 ^{cd}	9,35
M4	5,00 \pm 0,12 ^{cd}	47,13 \pm 0,03 ^c	9,43	39,16 \pm 0,04 ^{cd}	7,83
M5	5,51 \pm 0,17 ^{cd}	59,78 \pm 0,02 ^c	10,85	51,30 \pm 0,08 ^d	9,31
P1	11,33 \pm 0,59 ^{ef}	24,44 \pm 0,02 ^{ab}	2,16	24,84 \pm 0,05 ^{bc}	2,19
P2	10,72 \pm 0,63 ^e	45,68 \pm 0,05 ^c	4,26	41,80 \pm 0,03 ^d	3,90
P3	11,87 \pm 0,63 ^{ef}	16,75 \pm 0,04 ^a	1,41	17,24 \pm 0,07 ^{ab}	1,45
P4	10,61 \pm 0,41 ^c	21,16 \pm 0,03 ^a	1,99	19,85 \pm 0,07 ^{ab}	1,87
P5	13,28 \pm 0,24 ^f	9,70 \pm 0,04 ^a	0,73	14,18 \pm 0,04 ^{ab}	1,07

k_A [% inhibicji AChE/ μg zw. fenolowych]; k_B [% inhibicji BChE/ μg zw. fenolowych]

Wodno-etanolowe wyciągi z owoców maliny

Porcję 100 g owoców maliny zhomogenizowano (Thermomix, Vorwerk, Niemcy) w temperaturze pokojowej (4 min, przy maksymalnej prędkości). Następnie, dodano 100 cm^3 mieszaniny wody dejonizowanej z etanolem (1:1 v/v) i ponownie homogenizowano przez

4 min. Próbkę odwirowano (Sigma 4K15, Sigma Laboratory Centrifuges, Polygen, 30 min, 4 °C, 9000 g). Pozostałość po wirowaniu została ponownie zhomogenizowana w Thermomix-ie z 50 cm³ mieszaniny ekstrakcyjnej i odwirowana (30 min, 4 °C, 9000 g) jak opisano powyżej, po czym homogenizację i wirowanie powtórzono dwa razy. Wszystkie supernatanty połączono (ok. 300 cm³). Próbkę następnie nieznacznie rozcieńczono etanolem z wodą dejonizowaną (1:1 v/v) w stosunku: ekstrakt : woda jak 4:1 (v:v) i ultrafiltrowano (4 °C), przez 4 dni (membrany Vivaflow 50, w następującej kolejności (średnia porowatość membran): 0,2 μm → 5 kDa → 3 kDa, Sartorius Stedim, France) przy użyciu pomp Masterflex L/STM Economy Drive (Cole-Palmer, USA). Próbka po ultrafiltracji została poddana próżniowemu odparowaniu wody (35 °C, ok. 5-krotnie, podciśnienie -0,09 MPa, wyparka Büchi, Switzerland).

Chromatografia preparatywna HPLC- C18

Użyto system do chromatografii BioLogic DuoFlow (Bio-Rad, USA) złożony z pomp BioLogic, detektora QuadTec UV-VIS i kolektora frakcji BioFrac. Użyto kolumnę Eurospher 100-5 C18 (Knauer 250 x 20 mm). Próbka po zagęszczeniu (5 cm³, o zawartości związków fenolowych 0,3 – 0,4 mg /cm³ (oznaczono metodą Folina i Ciocalteu'a, 1927, z modyfikacjami własnymi), została wprowadzona do kolumny. Testowano różne warunki rozdziału (szczegółowo nie podano wariantów optymalizacyjnych), zaś ostateczny gradient był następujący: woda dejonizowana (A) i 100% etanol o czystości do HPLC (B): 0 – 10 min 0% B, 10 – 14 min 20 → 30% B, 14 – 30 min 30% B, 30 – 33 min 30 → 90% B, 33 – 43 min 90 → 0% B, 43 – 50 min 0% B. Detekcję UV prowadzono przy 245 nm, 280 nm, 365 nm i 530 nm. Przepływ utrzymano na poziomie 10 cm³/min (16 °C). Sygnały analizowano za pomocą programu BioLogic DuoFlow V.5.10 Build 2. Związki fenolowe (formy glikozydowane i aglikony) analizowano na podstawie czasów retencji zarejestrowanych pików chromatograficznych. Wybrane frakcje uzyskane z rozdziału analizowano w zestawie do chromatografii wysokociśnieniowej w skali analitycznej ze złożem C18 jak opisano poniżej.

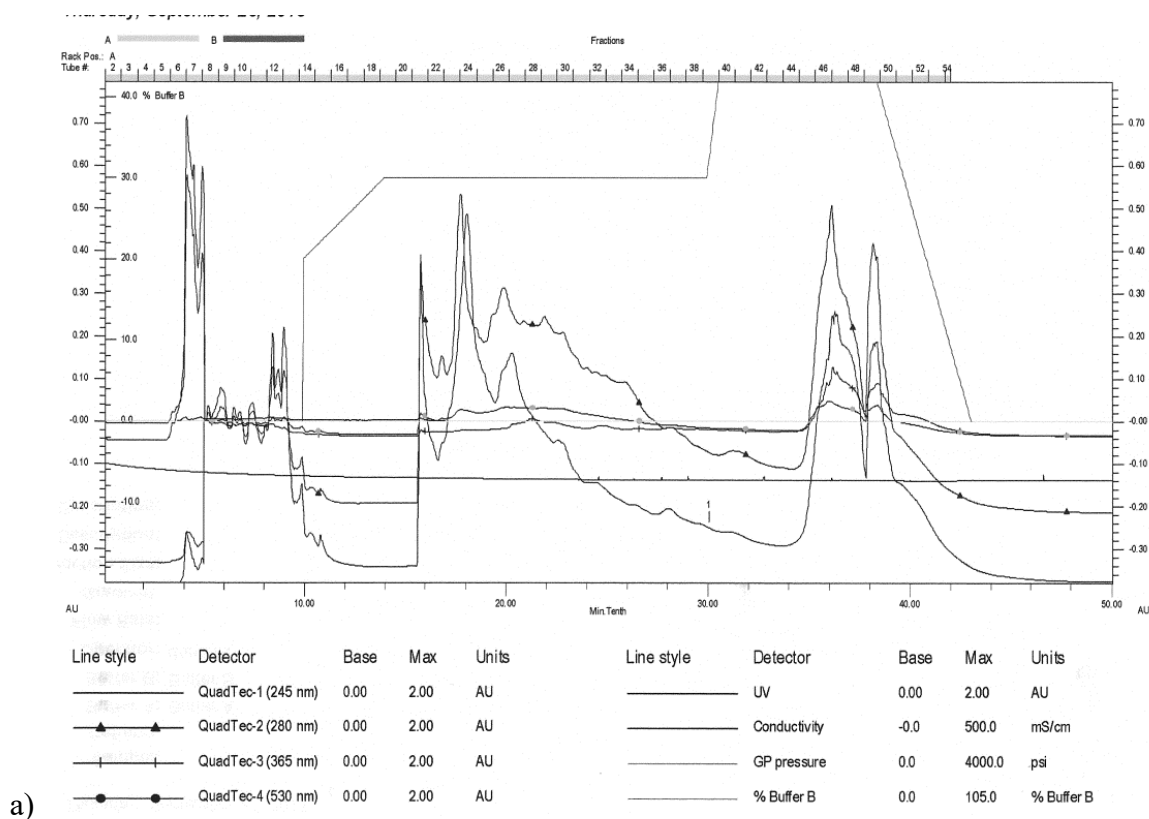
Chromatografia analityczna HPLC- C18

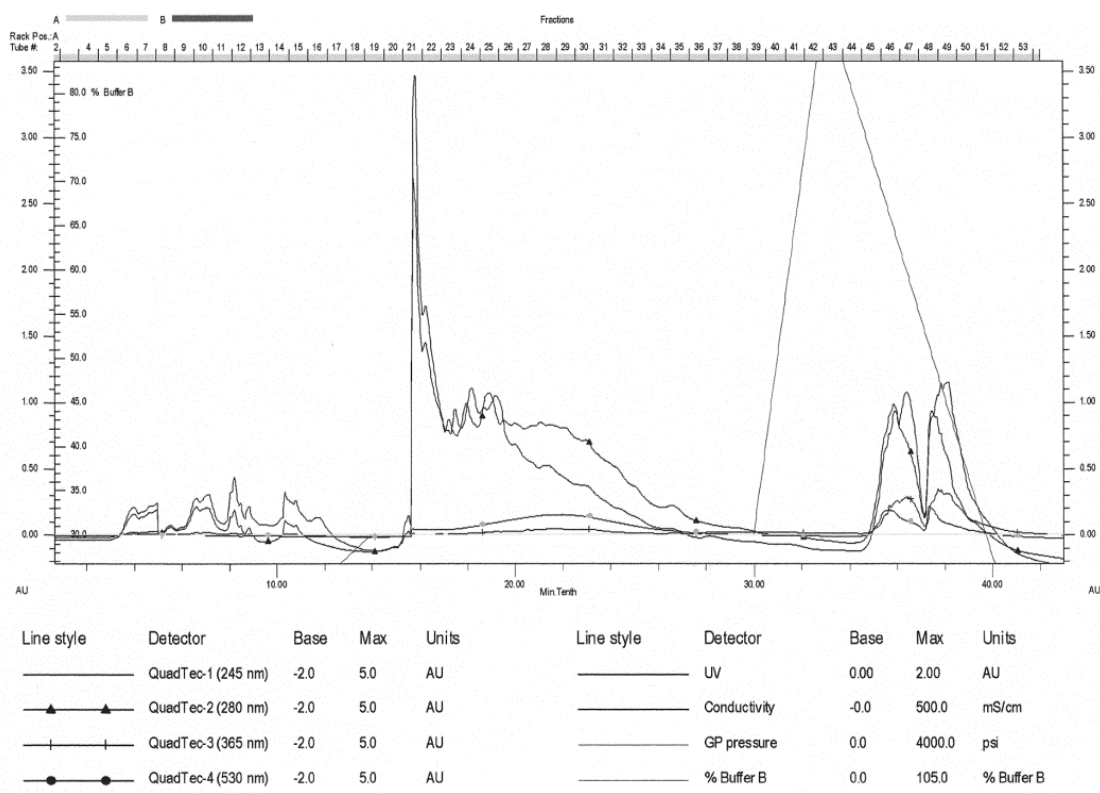
Próbki uzyskane w chromatografii preparatywnej filtrowano w filtrach 0,45 μm (Merck Millipore, Germany). Używano zestaw do HPLC firmy Knauer: dwie pompy Smartline 100, dynamiczny mikser, pętla 0,1 cm³, kolektor frakcji Retriever 500. Detekcję (280, 320, 365 lub 520 nm) prowadzono przy użyciu detektora UV-VIS (Linear, California, USA) z przetwornikiem IF2 (Knauer). Testowano następujące kolumny do HPLC: Hypersil ODS-2

(250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), Hypersil Gold (150 mm x 4.6 mm, 5 μ m), Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (150 mm x 4.6 mm, 3 μ m), Waters Symmetry (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), Macherey-Nagel LiChospher 100 RP18 (250 mm x 4.0 mm, 5 μ m). Do rozdzielania użyto kolumnę Hypersil ODS-2 połączoną z kolumną LiChospher 100 RP18 i odpowiadające im prekolumny (maks. ciśnienie 30 MPa). Przepływ wynosił 1 cm³/min (temp. pokojowa). Zoptymalizowany gradient tworzyła woda dejonizowana (A) i 90% etanol o czystości do HPLC (B): 0 – 10 min 0% B, 10 – 70 min 0 – 100% B, 70 – 76 min 100% B, 76 – 80 min 100 – 0 % B, 80 – 95 min 0% B, jednak testowano różne gradienty widoczne na rysunkach 3 i 4. Sygnały analizowano przy użyciu programu Eurochrom 3.05 P5 (2000 Basic Edition). Identyfikację jakościową pików przeprowadzono na podstawie porównania czasów retencji pików w próbce z pikami rzeczywistych związków fenolowych będących wzorcami do HPLC o czystości 95% i wyższej.

Wyniki oznaczeń chromatograficznych

Na rysunku 1 przedstawiono dwa przykładowe rozdzielania preparatywne ultrafiltratu z owoców maliny, w pełni reprezentatywne dla wyników uzyskanych w niniejszym doświadczeniu z wykorzystaniem rozdzielaczy chromatograficznych. Jak można zauważyć, w ultrafiltracie można wyróżnić 3 główne frakcje. Pierwsze związki niefenolowe zawarte we frakcjach od 2 do 16 (Rysunek 1a) i od 2 do 19 (Rysunek 1b) (co potwierdzono negatywnym wynikiem reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu, szczegółowe wyniki nie są przedstawione).



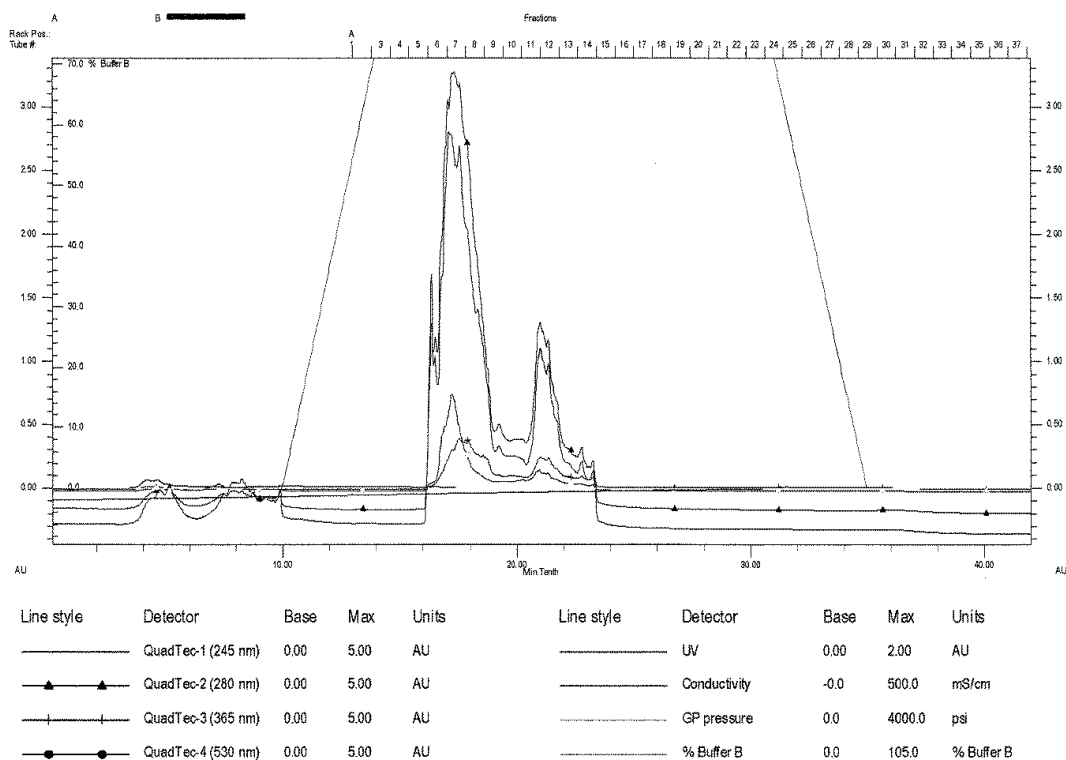


Rysunek 1. Przykładowe rozdziały preparatywne ultrafiltratów z owoców maliny.

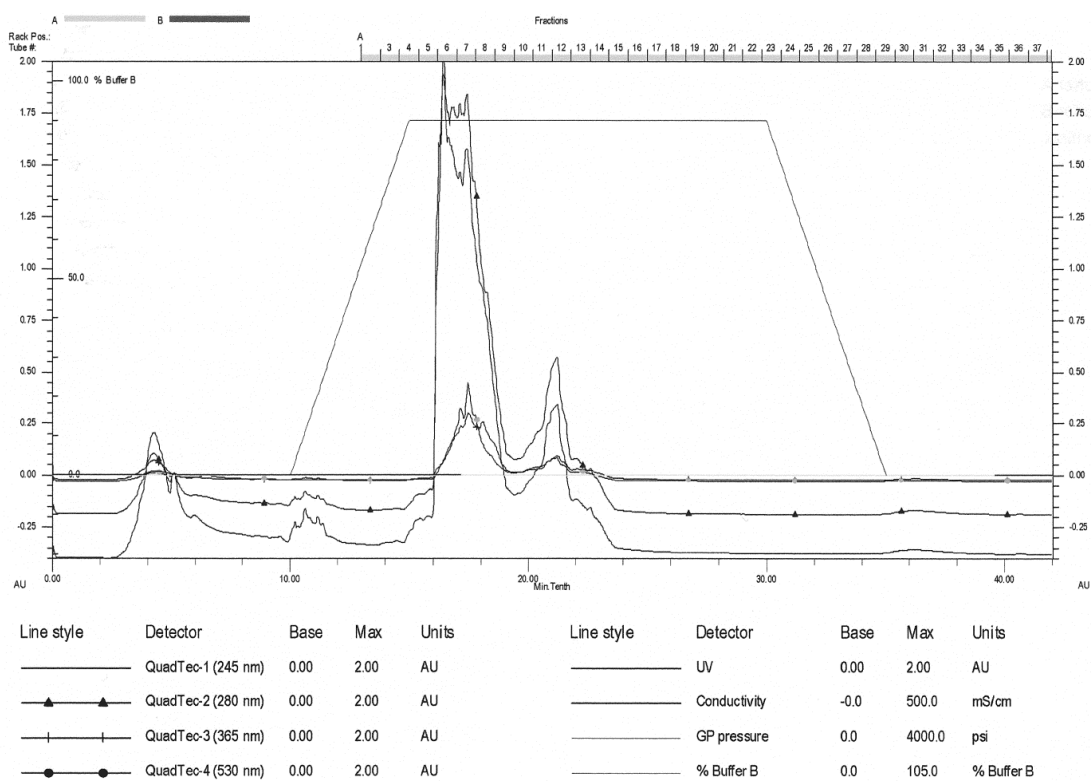
Druga frakcja obejmuje glikozydowe formy polifenoli (frakcje od 17 do 42 na Rysunek 1a i od 20 do 42 na Rysunek 1b), co stwierdzono poddając wybrane frakcje z tego zakresu hydrolizie kwasowej w celu uwolnienia aglikonów (przykładowe chromatogramy analityczne na Rysunek 3 i 4). Podobnie, poniżej można przeanalizować chromatogramy (w skali analitycznej) związków zawartych w pozostałych frakcjach przedstawionych na rysunkach 1a i 1b (od frakcji 43 do końca).

Z punktu widzenia biologicznej aktywności związków polifenolowych z owoców maliny, najważniejsze ilościowo są związki zawarte we frakcjach od 17 do 42 na Rysunek 1a i od 20 do 42 na Rysunek 1b. W związku z tym przeprowadzono próby powtórnego rozdziału (w skali preparatywnej) tych frakcji, w celu ich wydzielenia, pogłębionej charakterystyki i możliwości wykorzystania w formie preparatu biologicznie czynnego (Rysunek 2a-2h). Oczywiście, w chromatogramach zobrazowanych na Rysunek 2a-2h należy zauważyć obecność frakcji związków niefenolowych (początkowe frakcje) oraz aglikonów (ostatnie frakcje), powstałe po spontanicznej hydrolizie części związków glikozydowanych, będących

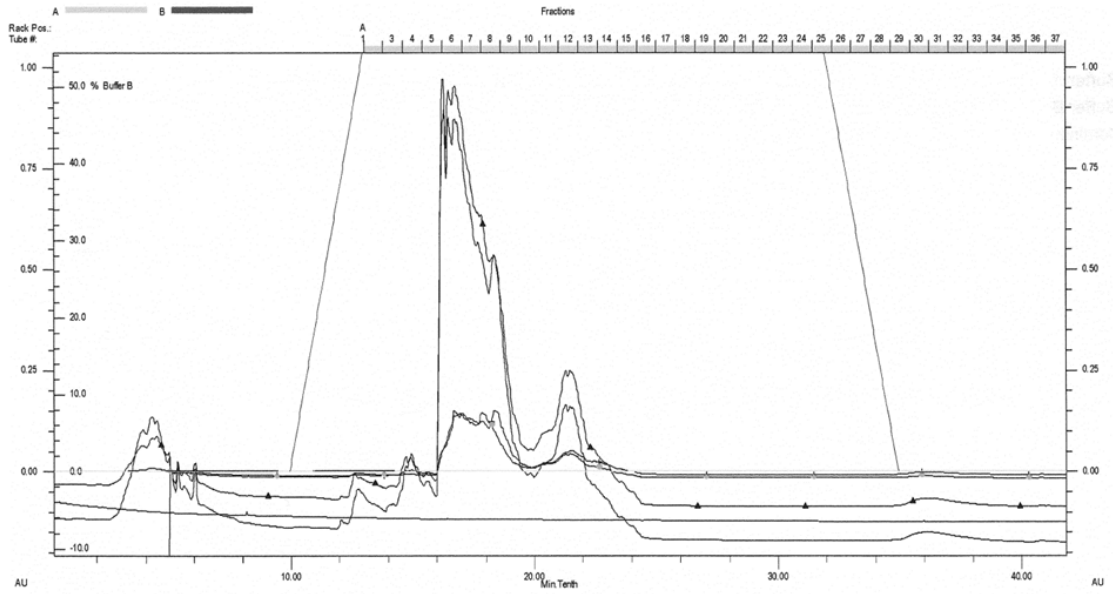
w centrum uwagi. Przedstawione chromatogramy (Rysunek 2a-2h) uzyskano za pomocą zmian gradientu eluentów jak opisano powyżej (opis metody badawczej).



a)

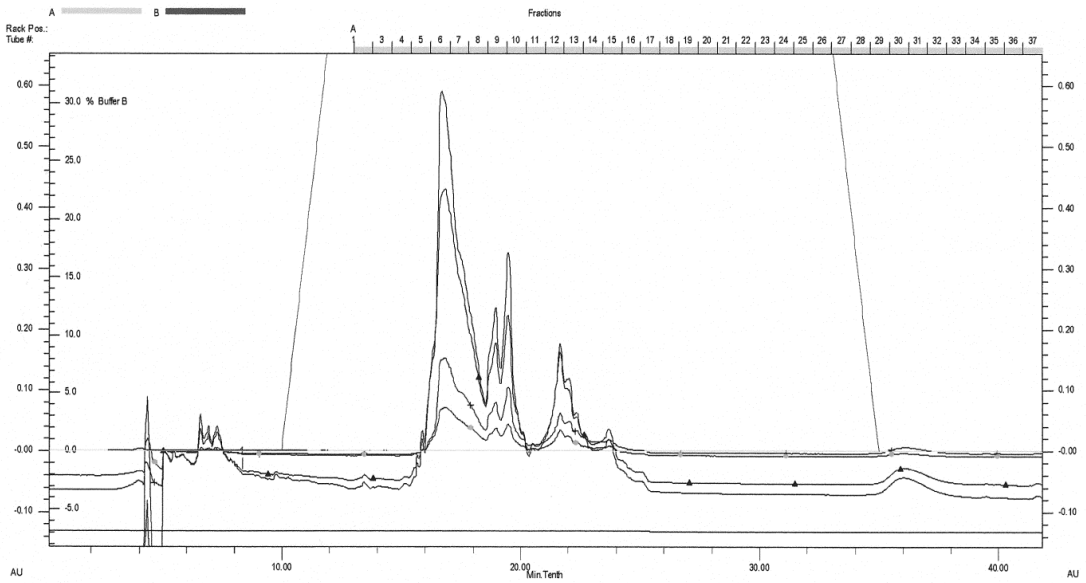


b)



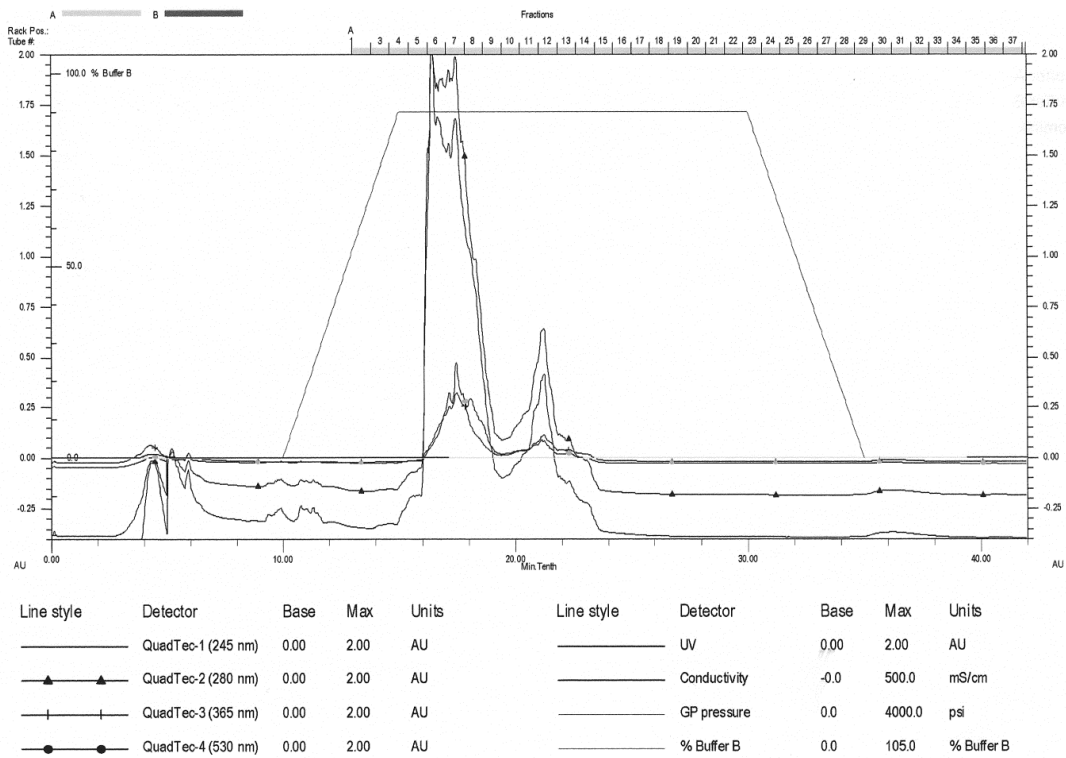
Line style	Detector	Base	Max	Units	Line style	Detector	Base	Max	Units
—	QuadTec-1 (245 nm)	0.00	2.00	AU	—	UV	0.00	2.00	AU
▲	QuadTec-2 (280 nm)	0.00	2.00	AU	—	Conductivity	-0.0	500.0	mS/cm
+	QuadTec-3 (365 nm)	0.00	2.00	AU	—	GP pressure	0.0	4000.0	psi
●	QuadTec-4 (530 nm)	0.00	2.00	AU	—	% Buffer B	0.0	105.0	% Buffer B

c)

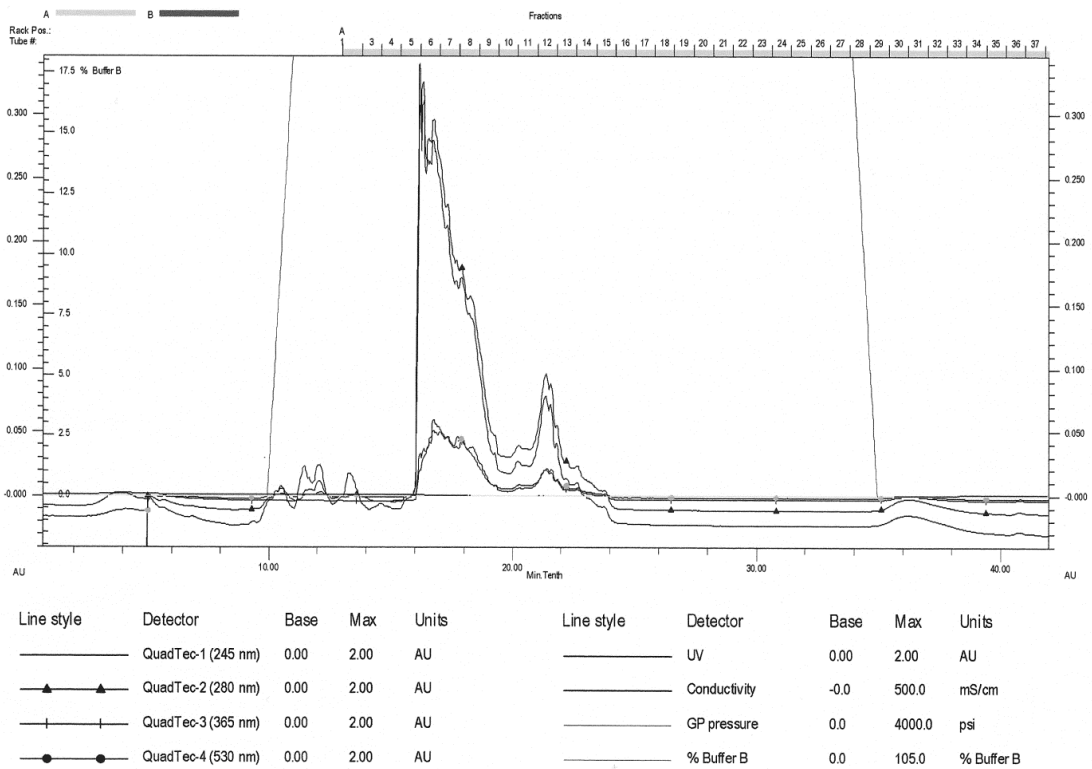


Line style	Detector	Base	Max	Units	Line style	Detector	Base	Max	Units
—	QuadTec-1 (245 nm)	0.00	2.00	AU	—	UV	0.00	2.00	AU
▲	QuadTec-2 (280 nm)	0.00	2.00	AU	—	Conductivity	-0.0	500.0	mS/cm
+	QuadTec-3 (365 nm)	0.00	2.00	AU	—	GP pressure	0.0	4000.0	psi
●	QuadTec-4 (530 nm)	0.00	2.00	AU	—	% Buffer B	0.0	105.0	% Buffer B

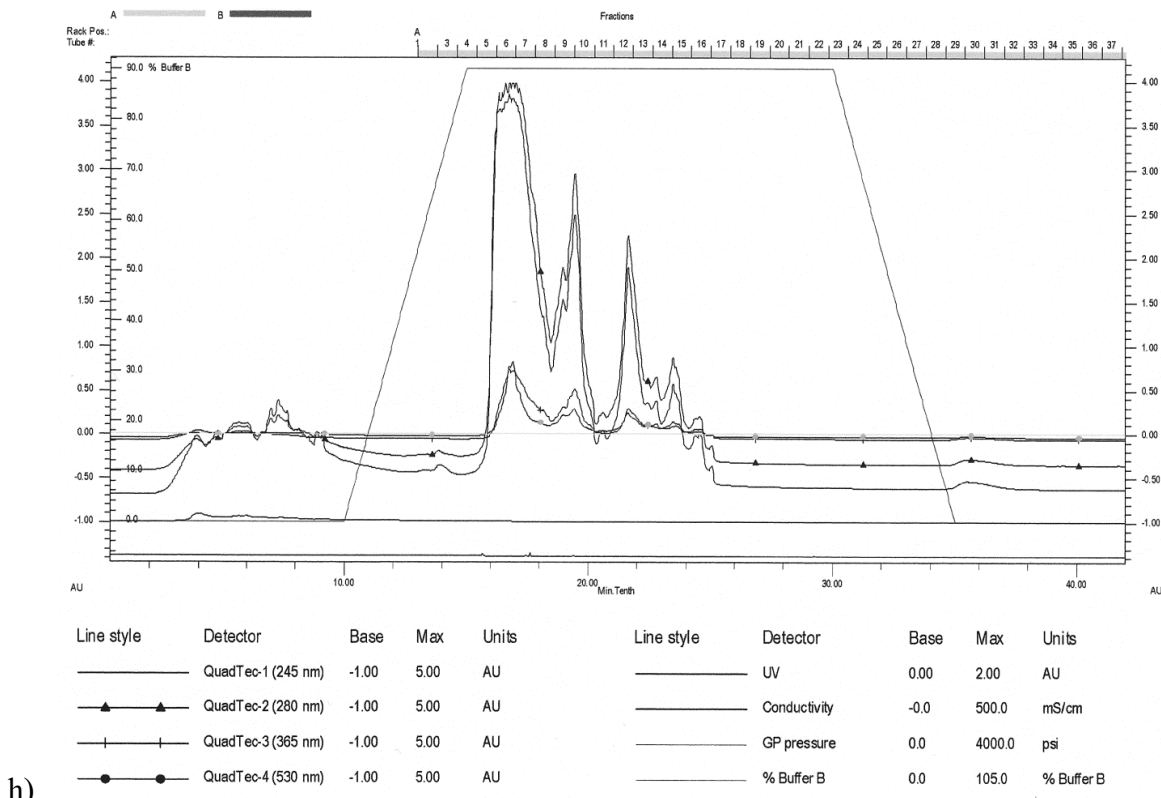
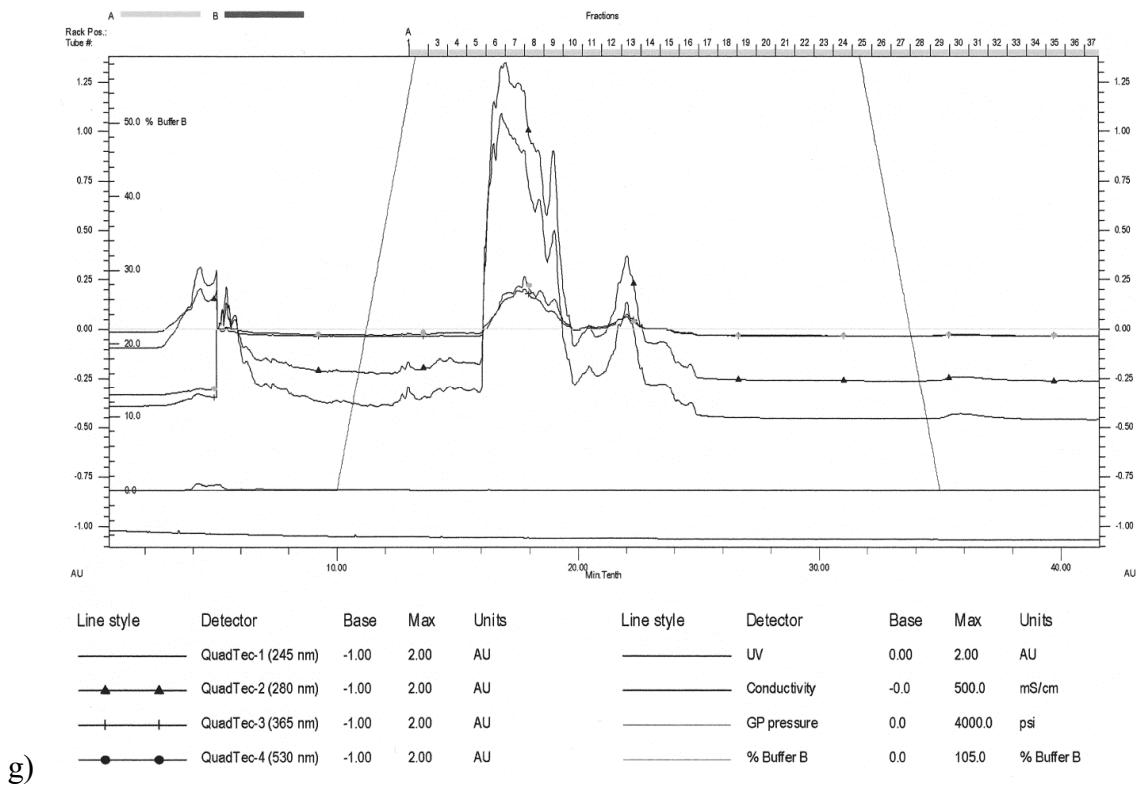
d)



e)



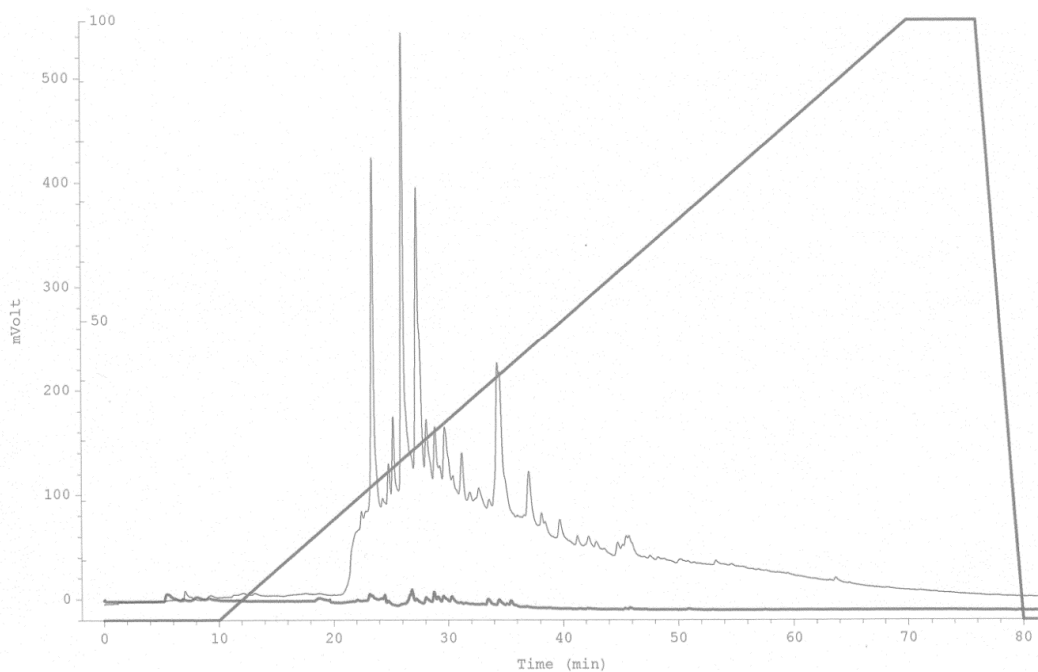
f)



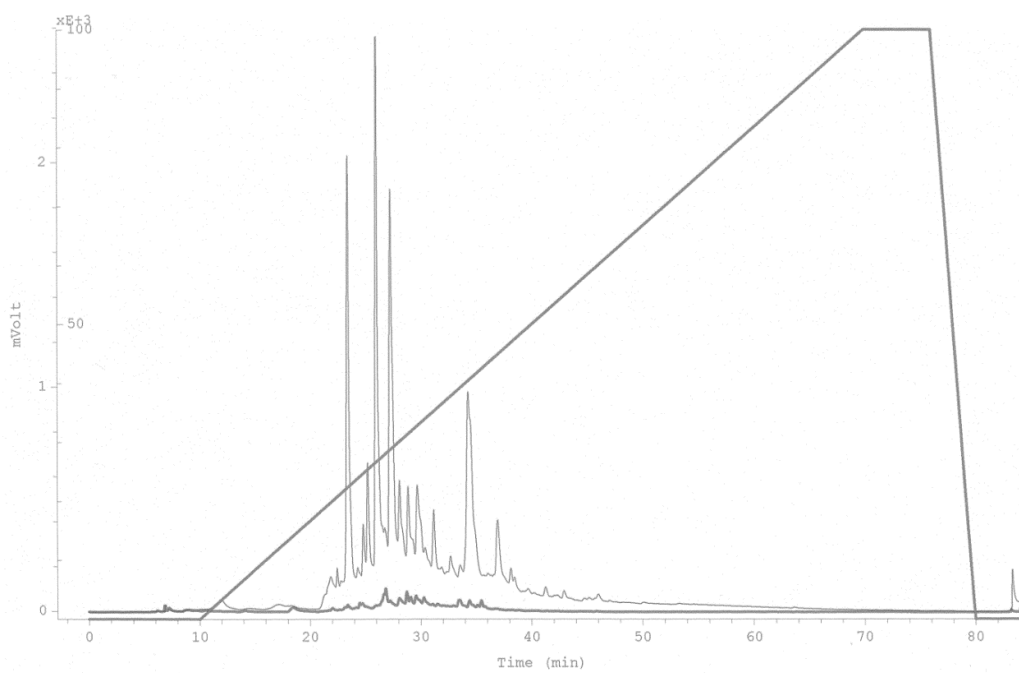
Rysunek 2. Przykładowe rozdziały preparatywne wybranych biologicznie czynnych frakcji uzyskanych z ultrafiltratów z owoców maliny (frakcje od 17 do 42 na Rysunek 1a i od 20 do 42 na Rysunek 1b).

Jak można zauważyć (Rysunek 2a-2h), próby zwiększenia rozdzielczości układu chromatograficznego dały ograniczone efekty i dalszych analiz zaniechano, przechodząc do

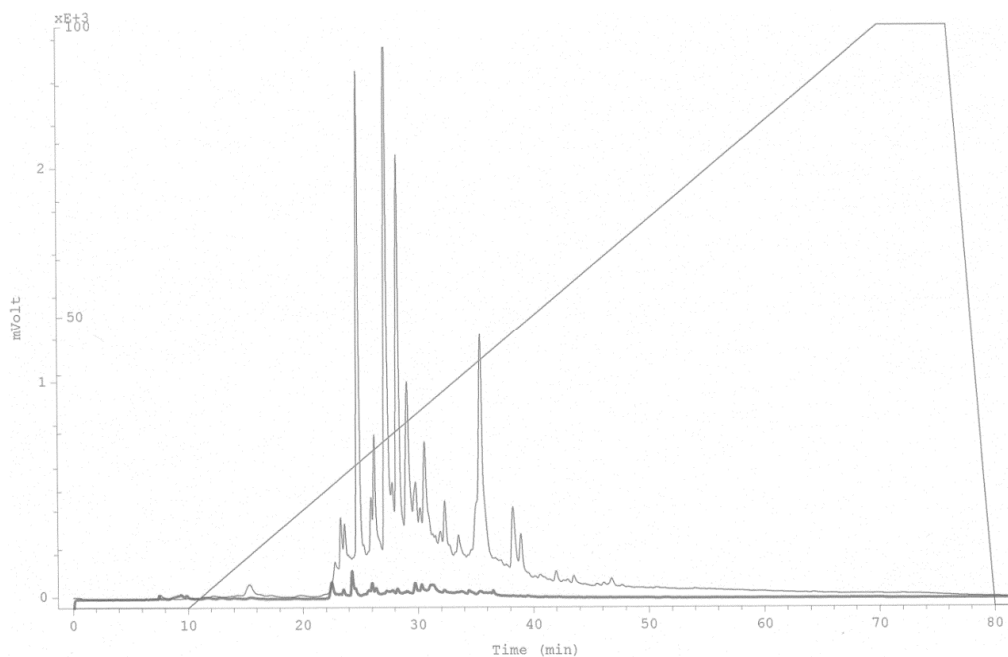
rozdziółów w skali analitycznej (Rysunek 3 i 4). Chromatografia analityczna frakcji oznaczonych jako 17 do 42 (Rysunek 1a) i od 20 do 42 (Rysunek. 1b) wykazała obecność szeregu związków fenolowych (wymienione w Tabeli 1).



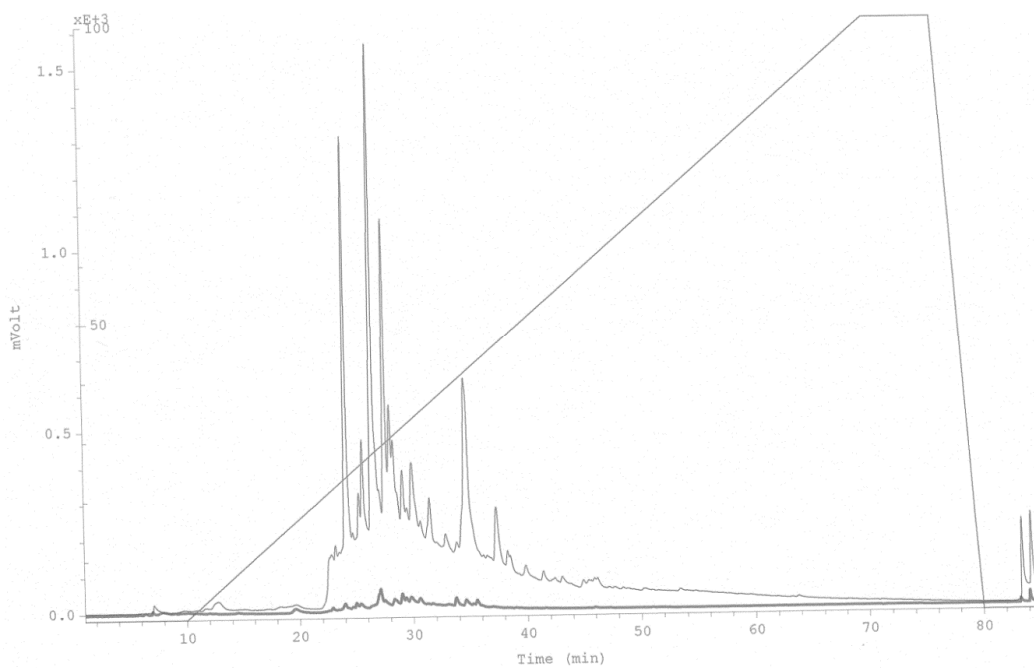
a)



b)



c)



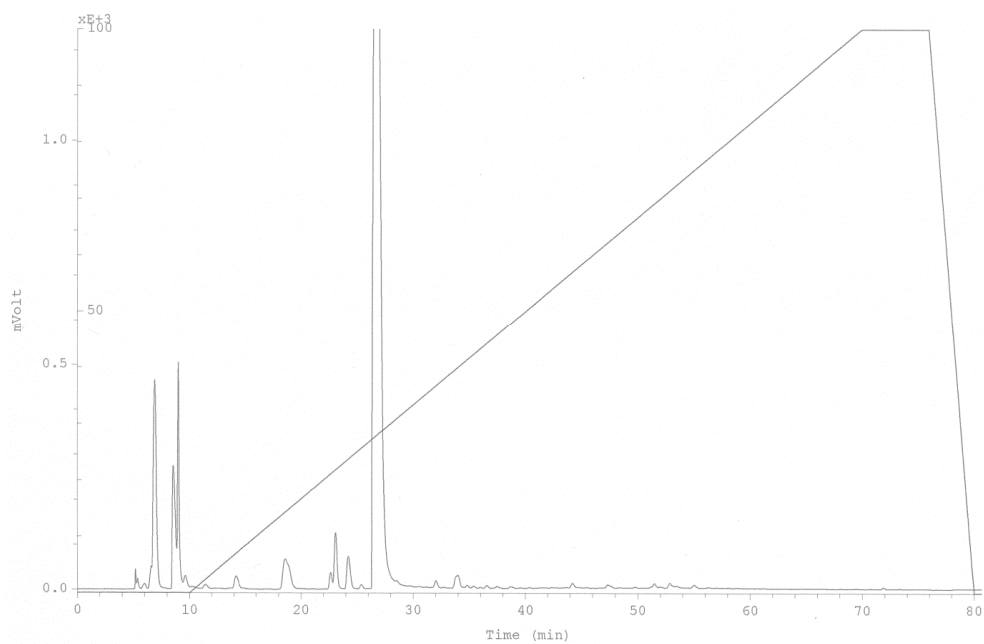
d)

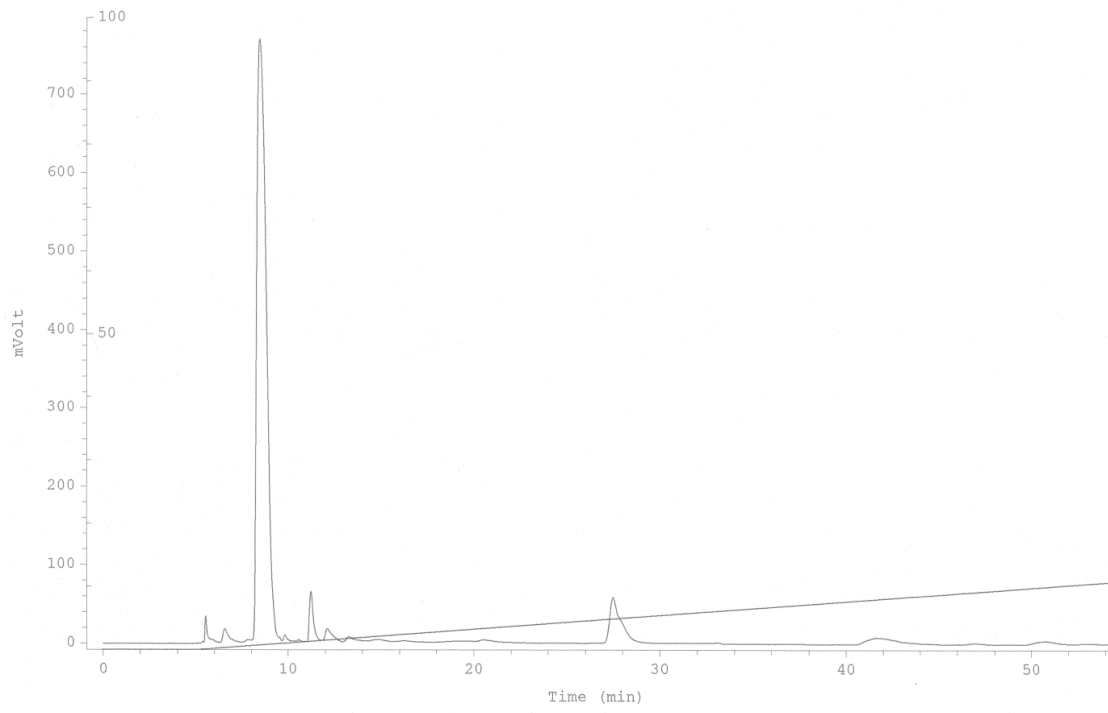
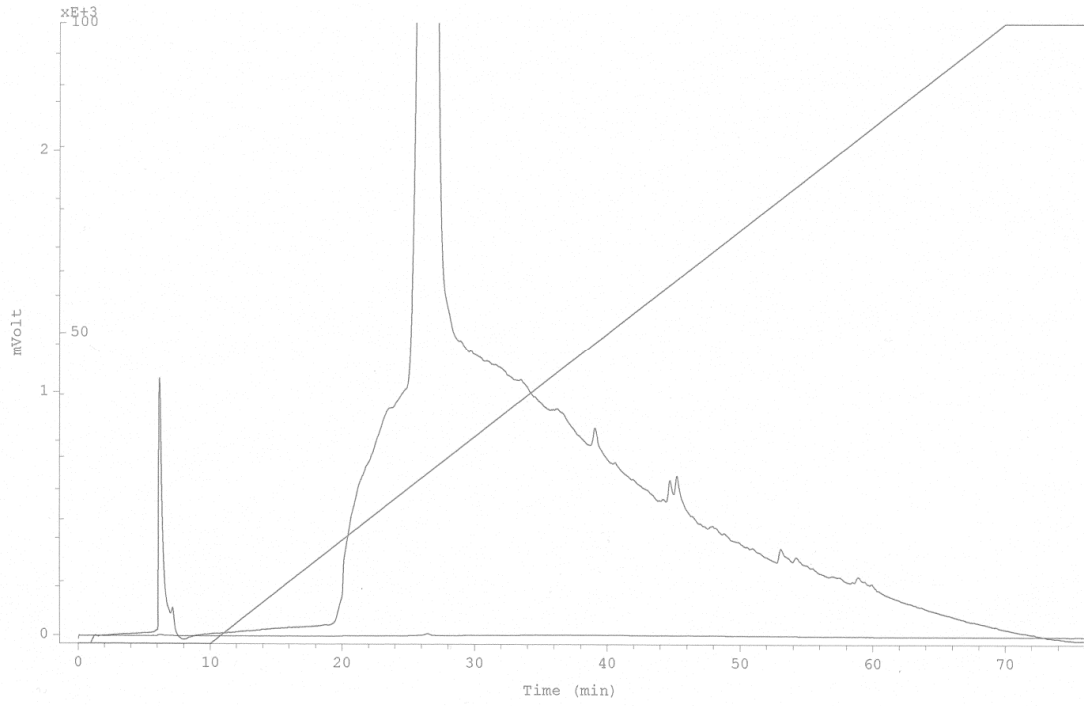
Rysunek 3. Przykładowe rozdziały analityczne wybranych biologicznie czynnych frakcji uzyskanych z ultrafiltratów z owoców maliny (frakcje od 17 do 42 na Rysunek 1a i od 20 do 42 na Rysunek 1b).

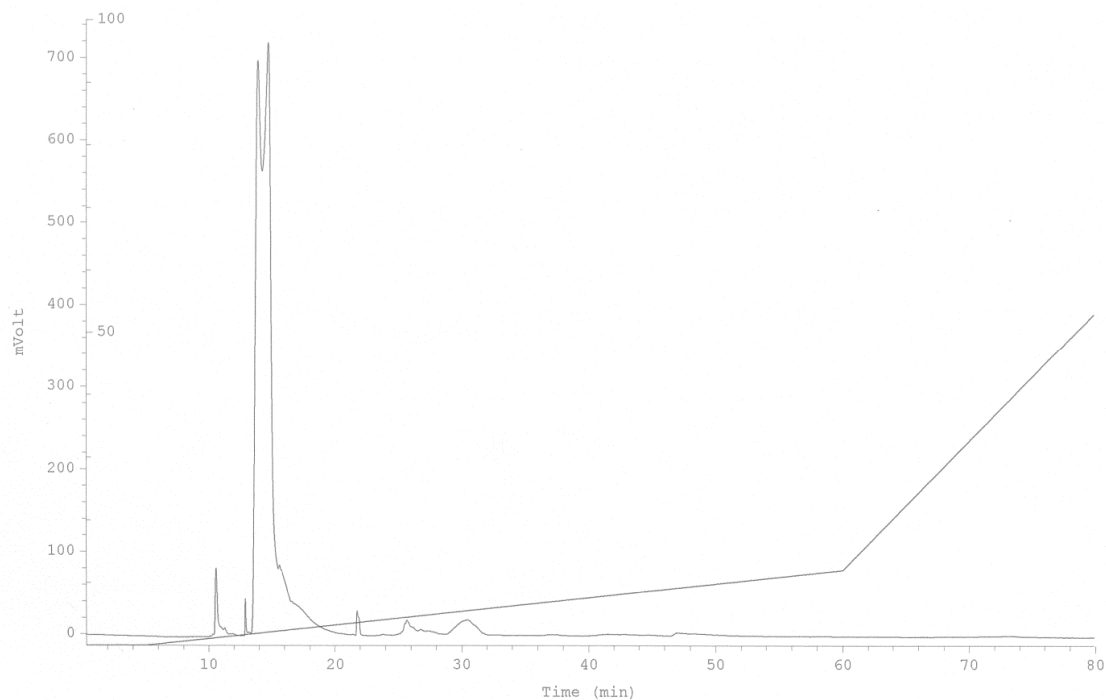
Tabela 5. Czasy retencji autentycznych związków fenolowych zidentyfikowanych w ekstrakcie z owoców malin.

Lp	Związek fenolowy	Czas retencji (min)
1.	3,4,5-trihydroxybenzoic acid (Gallic acid)	7,06
2.	3,4-di-OH-Benzoic acid (Protocatechuic acid)	24,21
3.	2,5-di-OH-Benzoic acid (Gentisic acid)	25,13
4.	(+)-Catechin	27,22
5.	3-Caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid)	28,09

6.	4-OH-3-OCH ₃ -Benzoic acid (Vanillic acid)	28,44
7.	(-)-Epicatechin	28,83
8.	4-OH-Benzoic acid	30,90
9.	3,4-di-OH-Cinnamic acid (Caffeic acid)	32,00
10.	4-OH-3,5-di-OCH ₃ -Benzoic acid (Syringic acid)	34,09
11.	4-OH-Cinnamic acid (p-Coumaric acid)	34,41
12.	4-OH-3-OCH ₃ -Cinnamic acid (Ferulic acid)	37,01
13.	Cyanidin 3- glucoside	38,11
14.	Cyanidin 3-rutinoside	39,50
15.	Ellagic acid	40,55
16.	Pelargonidin 3- <i>O</i> -glucoside	41,95
17.	Phloretin 2'-β-D-glucoside (Phloridzin)	42,16
18.	Ellagic Acid	43,00
19.	Myricetin	43,93
20.	2-OH-Benzoic acid (Salicylic acid)	45,34
21.	Quercetin 3-rutinoside (Rutin)	47,18
22.	Quercetin 3-glucoside	50,77
23.	Quercetin 3-galactoside	51,63
24.	Quercetin	52,94
25.	Delphinidin	53,44
26.	Pelargonidin	55,07
27.	Cyanidin	72,00
28.	Kaempferol	74,12







Rysunek 4. Przykładowe rozdziały analityczne wybranych biologicznie czynnych frakcji uzyskanych z ultrafiltratów z owoców maliny (frakcje od 2 do 41 na Rysunek 1a i od 2 do 19 na Rysunek 1b).

Podsumowanie wyników analiz chromatograficznych

Analiza jakościowa składu wyciągu wodno-etanolowego z owoców maliny wskazuje na bardzo wysoką zawartość wielu cennych związków biologicznie aktywnych w tym produkcie. Przeprowadzono identyfikację 28 polifenoli (flawonoidów i kwasów fenolowych), wskazującą, że wysoka aktywność antycholinoesterazowa wyciągu z owoców maliny jest spowodowana obecnością tych związków, zwłaszcza niezwykle aktywnych inhibitorów cholinoesteraz: katechiny, epikatechiny, cyjanidyny, pelargonidyny, florydżyny, mirycetyny, kwercetyny, delfinidyny, kempferolu oraz pochodnych cukrowych niektórych z tych aglikonów (Tab. 5). Sugeruje się, aby kontynuować doświadczenia z owocami maliny z uwagi na wysoki potencjał badawczy tych owoców, możliwy do wykorzystania w ograniczaniu stanu zapalnego organizmu i powstawania zmian neurodegeneracyjnych o charakterze zwyrodnień charakterystycznych dla choroby Alzheimera.

Literatura

1. Folin O., Ciocalteu V. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 27, 627–650.
2. Ellman G.L., Lourtney D.K., Andres V., Gmelin G. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95.

Podzadanie I

Określenie dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami w ekologicznej winorośli.

Cel realizacji podzadania:

Celem badań było opracowanie dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami w ekologicznej uprawie winorośli oraz poznanie mikrobiomu tej rośliny.

Badania nad określeniem dobrych praktyk ochrony przed szkodnikami i chorobami w ekologicznej winorośli przeprowadzono w ekologicznej winnicy w Podgórzu w gminie Wilków, w której uprawiane są trzy odmiany: Blaufrankisch, Rotgipfer oraz Rhenriesling. W obrębie odmiany Blaufrankisch są dwa klony: 3 i A4-1.

Doświadczenie z winoroślą wykonano w układzie bloków losowych, w czterech powtórzeniach, na poletkach wielkości 20 m². Na każdej z czterech odmian tej rośliny przeprowadzono co najmniej 6 zabiegów ochronnych przy użyciu probiotycznych mikroorganizmów z ekstraktami roślinnymi. Liczba zabiegów ochronnych uzależniona była od nasilenia występowania agrofagów na plantacji. Zastosowano następujące warianty zabiegów ochronnych:

1. Kontrola – bez żadnych zabiegów ochronnych.
2. Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II.
3. Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawkach 5 i 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego.
4. Sporządzenie fermentowanego ekstraktu na bazie granulatu z wrotyczu z PM w dawkach 5 i 10 kg granulatu na 1 ha do stosowania doglebowego i dolistnego.
5. Preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i fermentowany ekstrakt z pokrzywy z PM do stosowania dolistnego.
6. Preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego z PM do stosowania dolistnego.

7. Preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania dolistnego.

Wykaz preparatów zastosowanych w doświadczeniu oraz ich dawki przedstawiono w Tabeli I-1.

Tabela I-1. Preparaty biologiczne stosowane podczas trwania doświadczenia oraz stosowane dawki.

Obiekt	Preparat		Dawka	
	doglebowo	dolistnie	doglebowo	dolistnie
1	-	-	-	-
2	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	10 l/ha	15 l/ha
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)	10 l/ha	20 l/ha
4	Sporządzenie fermentowanego ekstraktu na bazie granulatu z wrotyczu z PM	Sporządzenie fermentowanego ekstraktu na bazie granulatu z wrotyczu z PM	10 l/ha	20 l/ha
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z pokrzywy z PM	10 l/ha	15 l/ha
6	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego z PM	10 l/ha	15 l/ha
7	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania	10 l/ha	15 l/ha

Doświadczenie przeprowadzono zgodnie z opisem zamieszczonym w niniejszym sprawozdaniu dotyczącym truskawki, maliny i czarnej porzeczki. Określono również stopień zagrożenia przez szkodniki glebowe. Przed założeniem doświadczenia została przeprowadzona lustracja w celu określenia stopnia zagrożenia przez te szkodniki. Nie stwierdzono obecności drutowców, opuchlaków, a zagęszczenie pędaków na 1 m² plantacji wynosiło 0,008 szt. co było poniżej progu ekonomicznej szkodliwości.

Zabiegi wykonywano wieczorem lub wcześniej rano, gdyż środki biologiczne wykazują mniejszą skuteczność, gdy są aplikowane przy świetle słonecznym. Dokładne i częste lustracje plantacji pozwoliły na precyzyjne określanie występowania agrofagów i podjęcie decyzji o sposobie ich zwalczania. Zabiegi ochronne na winorośli przeprowadzono w odstępach 10-dniowych rozpoczynając od połowy maja. Na początku czerwca na częściach nadziemnych stwierdzono obfite występowanie mączlika szklarniowego. Występował on licznie na liściach winorośli. Skuteczność zwalczania tego szkodnika przy użyciu badanych preparatów była bardzo dobra, przy czym najlepsza z wykorzystaniem „Ema5 z wrotyczem”

oraz preparatu sporządzonego poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą i po ostudzeniu dodanie probiotycznych mikroorganizmów. Po pierwszym zabiegu skuteczność zwalczania tego szkodnika wynosiła ponad 66 %. Preparaty działały już po pierwszym oprysku, a po drugim ich skuteczność wynosiła blisko 100% (Tabela I-2).

Tabela I-2. Skuteczność zwalczania mączlika szklarniowego na winorośli.

Obiekt	Preparat		Data			
	doglebowo	dolistnie	05.06.2015		16.06.2015	
			Liczba szkodników na roślinie	Skuteczność [%]	Liczba szkodników na roślinie	Skuteczność [%]
1	-		6	-	5	
2	Preparat „Ema5 z wrotyczem”		1	83,33	0	100
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)		1	83,33	0	100
4	Sporządzenie fermentowanego ekstraktu na bazie granulatu z wrotyczu z PM		2	66,67	0,25	95
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z pokrzywy z PM	2	66,67	0	100
6	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego z PM	2	66,67	0	100
7	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania	1	83,33	0	100

Podczas trwania doświadczenia nie zaobserwowano występowania pilśniowca winoroślowego oraz zwójek. Sporadycznie natomiast wystąpiły mszyce, które żerowały szczególnie w części wierzchołkowej oraz na liściach. Mszyce osłabiały wzrost liści wierzchołkowych. Szkodniki te pojawiły się jedynie na 12 roślinach z całej plantacji. Zastosowanie preparatów biologicznych poprawiło wygląd roślin i ograniczyło deformację liści wierzchołkowych. Najlepiej działały preparaty: „Ema5 z wrotyczem”, preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) oraz fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania jako oprysk dolistny. Na plantacji nie zaobserwowano również przędziorków, gdyż stosowanie wymienionych preparatów ogranicza skutecznie również tego szkodnika. Ocena występowania mączniaka rzekomego oraz mączniaka prawdziwego została przeprowadzona w okresie od maja do sierpnia, ze szczególnym

uwzględnieniem czerwca i lipca, kiedy objawy chorób występują w największym nasileniu. Na zielonych częściach roślin nie zaobserwowano występowania mączniaka rzekomego ani mączniaka prawdziwego. Podobnie podczas obserwacji winorośli w okresie od maja do połowy sierpnia nie zaobserwowano objawów występowania szarej pleśni.

Na plantacji zaobserwowano objawy antraknozy. Choroba jednak wystąpiła w niewielkim nasileniu wynoszącym do 2% i nie obserwowano ograniczenia wzrostu roślin. Najwyższą skuteczność w ograniczaniu tej choroby wykazał preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i dolistnie oraz preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) – Tabela I-3. Biologiczną efektywność badanych preparatów w zwalczaniu antraknozy oceniano na podstawie porażonych liści wg 6-stopniowej skali: 0 – rośliny zdrowe, 1 – (1% powierzchni liścia z plamami), 2 – (1-5%), 3 – (5-20%), 4 – (20-50%), 5 – (powyżej 50%).

Tabela I-3. Skuteczność zwalczania antraknozy w uprawie winorośli.

Objekt	Preparat		Data					
	doglebowo	dolistnie	30.06.2015		17.07.2015		20.08.2015	
			% porażonych liści	Skuteczność [%]	% porażonych liści	Skuteczność [%]	% porażonych liści	Skuteczność [%]
1	-		1	-	2	-	2	-
2	Preparat „Ema5 z wrotyczem”		0,25	75	0,5	75	0,5	75
3	Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM)		0,25	75	0,5	75	0,3	85
4	Sporządzenie fermentowanego ekstraktu na bazie granulatu z wrotyczu z PM		0,5	50	0,75	62,5	0,5	75
5	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z pokrzywy z PM	0,5	50	0,75	62,5	0,75	62,5
6	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego z PM	0,5	50	0,75	62,5	0,75	62,5
7	Preparat „Ema5 z wrotyczem”	Fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania	0,5	50	0,75	62,5	0,5	75

Podsumowując, badane preparaty dobrze ograniczały występowanie chorób i szkodników na winorośli. Najlepsze działanie zarówno przeciwko chorobom jak i szkodnikom miało zastosowanie preparatu „Ema5 z wrotyczem”, preparatu sporządzonego poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) oraz fermentowanego ekstraktu z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania jako oprysk dolistny.

W celu określenia mikrobiomu winorośli ekologicznej i konwencjonalnej przeprowadzono badania morfologiczne oraz genetyczne identyfikacji drobnoustrojów. Materiałem badawczym były rośliny winorośli, występujące w czterech odmianach (w celu zminimalizowania źródeł zmienności) hodowane w warunkach ekologicznych oraz te same odmiany winorośli uprawiane w systemie konwencjonalnym w winnicy znajdującej się w sąsiedztwie ekologicznej. Materiał do badań obejmował następujące organy winorośli tj. liście oraz łodygi. Pobrane zostały zdrowe (bezoobjawowe) części roślin. Identyfikacja morfologiczna polegała na wyizolowaniu kultur mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych oraz określeniu ich liczebności. Liczba uzyskanych z roślin drobnoustrojów została oznaczona metodą płytkową (Tabela I-4 i I-5). W technice tej liczy się kolonie wyrosłe na odpowiednim podłożu mikrobiologicznym, przyjmując założenie, że z każdej komórki wyrośnie pojedyncza kolonia. Uzyskane wyniki odniesiono do 1cm³.

Tabela I-4. Liczebność mikroorganizmów wyizolowanych z liści na podłożu mikrobiologicznym.

Obiekt	Rozcieńczenie	Liczba kolonii	Liczba kolonii/cm³
Uprawa ekologiczna - 1	10 ⁻²	810	8,1*10 ⁴
	10 ⁻³	89	8,9*10 ⁴
Uprawa ekologiczna – 2	10 ⁻²	1231	12,31*10 ⁴
	10 ⁻³	128	12,8*10 ⁴
Uprawa ekologiczna - 3	10 ⁻²	1003	10,03*10 ⁴
	10 ⁻³	89	8,9*10 ⁴
Uprawa ekologiczna - 4	10 ⁻²	923	9,23*10 ⁴
	10 ⁻³	89	8,9*10 ⁴
Uprawa ekologiczna - 5	10 ⁻²	998	9,98*10 ⁴
	10 ⁻³	91	9,1*10 ⁴

Uprawa ekologiczna - 6	10^{-2}	1058	$10,58 \cdot 10^4$
	10^{-3}	98	$9,8 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 7	10^{-2}	1512	$15,12 \cdot 10^4$
	10^{-3}	162	$16,2 \cdot 10^4$
Uprawa konwencjonalna	10^{-2}	856	$8,56 \cdot 10^5$
	10^{-3}	71	$7,1 \cdot 10^5$

Tabela I-5. Liczebność mikroorganizmów wyizolowanych z łodyg na podłożu mikrobiologicznym.

Obiekt	Rozcieńczenie	Liczba kolonii	Liczba kolonii/cm ³
Uprawa ekologiczna - 1	10^{-2}	389	$3,89 \cdot 10^4$
	10^{-3}	43	$4,3 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 2	10^{-2}	457	$4,57 \cdot 10^4$
	10^{-3}	57	$5,7 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 3	10^{-2}	449	$4,49 \cdot 10^4$
	10^{-3}	39	$3,9 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 4	10^{-2}	412	$4,12 \cdot 10^4$
	10^{-3}	47	$4,7 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 5	10^{-2}	398	$3,98 \cdot 10^4$
	10^{-3}	42	$4,2 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 6	10^{-2}	449	$4,49 \cdot 10^4$
	10^{-3}	49	$4,9 \cdot 10^4$
Uprawa ekologiczna - 7	10^{-2}	498	$4,98 \cdot 10^4$
	10^{-3}	60	$6 \cdot 10^4$
Uprawa konwencjonalna	10^{-2}	371	$3,71 \cdot 10^5$
	10^{-3}	42	$4,2 \cdot 10^5$

Wyizolowano większą liczbę mikroorganizmów z roślin uprawianych metodami ekologicznymi w porównaniu z konwencjonalnymi. Ponadto najwięcej mikroorganizmów zarówno w przypadku izolacji z liści jak i z łodyg wyosabniano z roślin poletka doświadczalnego, na którym stosowano preparaty biologiczne: Ema5 z wrotyczem” jako oprysk doglebowy wraz z fermentowanym ekstraktem z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM stosowanych naprzemiennie jako oprysk dolistny. Również dużą liczebnością mikroorganizmów charakteryzowały się rośliny rosnące na poletkach traktowanych preparatem mikrobiologicznym „Ema5 z wrotyczem” dolistnie i doglebowo oraz preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów stosowanym dolistnie i doglebowo.

Następnie poprzez posiew redukcyjny oraz ocenę makroskopową i mikroskopową pojedynczych kolonii uzyskano czyste kultury wykorzystane w dalszych etapach badań. W ocenie makroskopowej brano pod uwagę wzrost, wielkość, kształt, profil i brzeg kolonii oraz jej przejrzystość, barwę i strukturę. Ocena mikroskopowa opierała się głównie na analizie kształtu pojedynczych komórek mikroorganizmów. Na podstawie powyższych badań do dalszych analiz wybrano 147 kolonii.

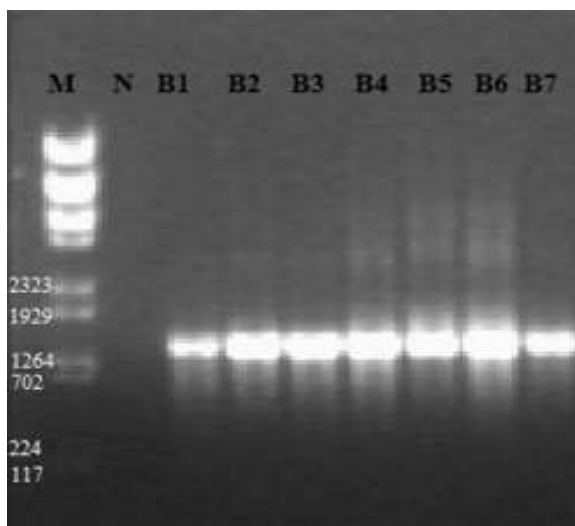


Ryc. I-1 Przykładowe zdjęcia płytek Petriego z mikroorganizmami wyizolowanymi z uprawy ekologicznej (po lewej) oraz z uprawy konwencjonalnej (po prawej).



Ryc. I-2. Przykładowe zdjęcie obrazujące barwienie bakterii metodą Grama.

Przynależność rodzajową mikroorganizmów określono metodami klasycznymi. Oprócz nich wykonano wstępną identyfikację genetyczną, która polegała na izolacji całkowitego genomowego DNA z poszczególnych kultur przeprowadzoną za pomocą kitów do izolacji materiału genetycznego zgodnie z wytycznymi producenta dołączonymi do zestawu oraz jego amplifikacji techniką PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) z użyciem specyficznych starterów.



Ryc. I-3. Przykładowy żel agarozowy przedstawiający rozdzielanie elektroforetyczne produktów reakcji 16 S rRNA bakterii z użyciem starterów uniwersalnych. M- Lambda DNA/Eco91I Marker (BstII); N- kontrola negatywna; B1-B7 – badane mikroorganizmy.



Ryc. I-4. Przykładowy żel agarozowy przedstawiający rozdzielanie elektroforetyczne produktów reakcji PCR drożdży z użyciem starterów uniwersalnych. M- DNA Marker (100-1000); D8-D14 – badane mikroorganizmy.

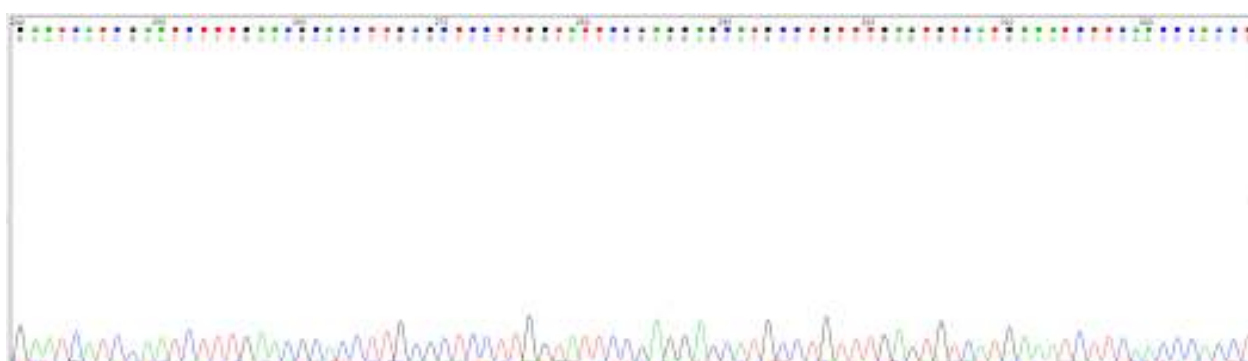
W wyniku przeprowadzonych analiz spośród wyizolowanych mikroorganizmów zidentyfikowano 9 rodzajów bakterii, 8 rodzajów drożdży i 2 grzyby. Rodzajami dominującymi w winorośli ekologicznej były *Cryptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aureobasidium* oraz *Rhodotorula*. W obrębie obiektu 2 - preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” i 7- preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany dogłębowo i fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania dolistnego, wyizolowano pojedyncze bakterie *Leuconostoc* oraz *Lactobacillus*. W winorośli z uprawy konwencjonalnej dominowały rodzaje: *Chrysebacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Cryptococcus*, *Candida* i *Enterococcus*. W winorośli ekologicznej drożdże stanowiły większy udział niż w konwencjonalnej (Tabela I-6).

Tabela I-6. Mikroorganizmy wyizolowane z winorośli ekologicznej i konwencjonalnej.

Ekologiczna uprawa winorośli	Konwencjonalna uprawa winorośli
<i>Alternaria</i> sp	<i>Alternaria</i> sp
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Candida sake</i> , <i>C. apis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i>
<i>Candida sake</i> , <i>C. laurenti</i> , <i>C. apis</i> , <i>C. parapsilosis</i>	<i>Chrysebacterium</i> sp.
<i>Chrysebacterium</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp.
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>

<i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Pichia</i> sp. <i>Proteobacteria</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R. rubra</i> <i>Sacharomyces elipsoideus</i> <i>Trichosporon</i> sp.	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Streptococcus</i> sp.
---	--

Następnie po ocenie amplifikacji na żelu agarozowym wybrane uzyskane produkty wysłano do sekwencjonowania. Sekwencjonowanie umożliwia odczytanie sekwencji nukleotydowej w odpowiednio przygotowanym materiale genetycznym.



Ryc. I-5. Przykładowy wycinek chromatogramu otrzymanego po sekwencjonowaniu.

Podsumowując stosowanie preparatów biologicznych przynosi dobre efekty zarówno w zakresie ochrony winorośli przed chorobami i szkodnikami jak również wpływa na skład mikrobiomu rośliny. W celu oceny wpływu sposobu nawożenia na skład mikrobiomu winorośli należy wykonać dodatkowo selekcję mikroorganizmów o cechach antagonistów w stosunku do gatunków patogennych.

Podzadanie II

Selekcja bakterii endofitycznych i ryzosferowych promujących wzrost roślin jagodowych.

Badania prowadzone w ramach projektu obejmowały izolację bakterii endofitycznych z korzeni, łodyg i liści zdrowych truskawek, malin i czarnej porzeczki oraz ryzosferowych z gleby ryzosferowej zdrowych roślin jagodowych, a następnie ocenę zdolności wyizolowanych bakterii do potencjalnego promowania wzrostu tych roślin tj. do biosyntezy fitohormonu stymulującego wzrost roślin - kwasu indolilo-3-octowego (IAA) - metodą kolorymetryczną, do rozpuszczania fosforanów - metodą płytkową, do biosyntezy sideroforów - metodą płytkową oraz do biosyntezy cyjnowodoru - metodą płytkową. Wyizolowane zostały również grzyby patogeniczne porażające badane rośliny jagodowe. Zdolność wyizolowanych bakterii endofitycznych i ryzosferowych do potencjalnej ochrony roślin przed szkodliwym wpływem wyizolowanych patogenów została zbadana. Zbadano i oceniono zdolności wytypowanych izolatów do ponownej kolonizacji roślin na podstawie wybranych mechanizmów tj. na podstawie zdolności do ruchu - metodą płytkową oraz do biosyntezy enzymów celulolitycznych - metodą płytkową. Izolaty o najbardziej obiecujących właściwościach wytypowano do dalszych badań. Przeprowadzono identyfikację wybranych izolatów do gatunku metodami genetycznymi w celu wyeliminowania powtarzających się szczepów. Możliwość ich zastosowania w formie szczepionki mikrobiologicznej została oceniona i zaproponowano wstępny skład potencjalnej szczepionki oraz podłoża hodowlanego również w oparciu o dane literaturowe.

Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły całe rośliny gatunków roślin jagodowych: truskawki, maliny i czarnej porzeczki pochodzące z upraw ekologicznych (Fot. II-1 i II-2).



Fot. II-1. Po lewej stronie roślina truskawki; po prawej stronie roślina maliny.

płukania posiano na podłoża agarowe jako kontrolę skuteczności powierzchniowej sterylizacji tkanki roślinnej. Kolejnym etapem było rozcieranie materiału w wysterylizowanych moździerzach z dodatkiem sterylnej soli fizjologicznej tak by zostały uwolnione bakterie endofityczne z wnętrza tkanek (Fot. II-5). Płynny homogenat rozsiewano metodą powierzchniową po 200 µl na podłoża stałe TSA, LB oraz KING B tak by uzyskać pojedyncze kolonie bakterii endofitycznych. Po 3 dniach inkubacji w temperaturze 28°C kolonie różniące się morfologicznie przesiano metodą posiewu reducyjnego na płytki agarowe celem uzyskania pojedynczych szczepów (Fot. II-6). Wyizolowane mikroorganizmy zostały zamrożone w -80°C do dalszych analiz. Jako krioprotektanta użyto 10% roztworu glicerolu.



Fot. II-5. Ucieranie tkanek roślinnych w moździerzach.



Fot. II-6. Wyselekcjonowane izolaty bakteryjne na podłożu agarowym.

Skład podłoży stosowanych podczas analiz:

PODŁOŻE TSA (ANG. TRYPTIC SOY AGAR, AGAR TRYPTOZOWO-SOJOWY)		PODŁOŻE LB (ANG. LYSOGENY BROTH)		PODŁOŻE KING B	
SKŁADNIK	Ilość	Składnik	Ilość	Składnik	Ilość
PEPTON TRYPTON	15,0 g	Pepton Trypton	10,0 g	Pepton K	20,0 g
PEPTON SP	5,0 g	Ekstrakt drożdżowy	5,0 g	K ₂ HPO ₄	1,5 g
NACL	5,0 g	NaCl	10,0 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,8 g
AGAR	15,0 g	Agar	15,0 g	Agar	14,0 g
WODA DEMINERALIZOWANA	1,0 l	Woda demineralizowana	1,0 l	Glicerol	0,01 l
				Woda demineralizowana	1,0 l

Charakterystyka wybranych cech wyizolowanych mikroorganizmów

Biosynteza fitohormonu stymulującego wzrost roślin – kwasu indolilo-3-octowego (IAA) – metodą kolorymetryczną

Wyizolowane szczepy inkubowano na podłożu płynnym LB z dodatkiem tryptofanu w stężeniu 500 µg/ml przez 4 dni w temperaturze 28°C. Następnie hodowle odwirowywano i do 2 ml supernatantu z każdej hodowli dodawano 100 µl 10 mM kwasu ortofosforowego oraz 4ml odczynnika Salkowskiego. Próby inkubowano przez 25 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Po inkubacji zmierzono absorbancję próbek przy długości fali równej 530 nm. Różowe zabarwienie wskazywało na obecność IAA. Wyniki odnoszono do krzywej wzorcowej.

Ocena zdolności izolatów do rozpuszczania fosforanów

Ocena zdolności izolatów bakteryjnych do uwalniania fosforu z jego nierozpuszczalnych związków przeprowadzono na płytkach z podłożem wg Pikovskaya [Bogumił, 2013]. Bakterie nanoszono metodą punktową w trzech powtórzeniach na płytkę Petriego. Po 14 dniach inkubacji w temperaturze 28°C dokonano pomiaru promienia przejaśnienia wokół miejsca posiewu bakterii. Przykłady uzyskanych rezultatów przedstawiono na Fot. II-7.

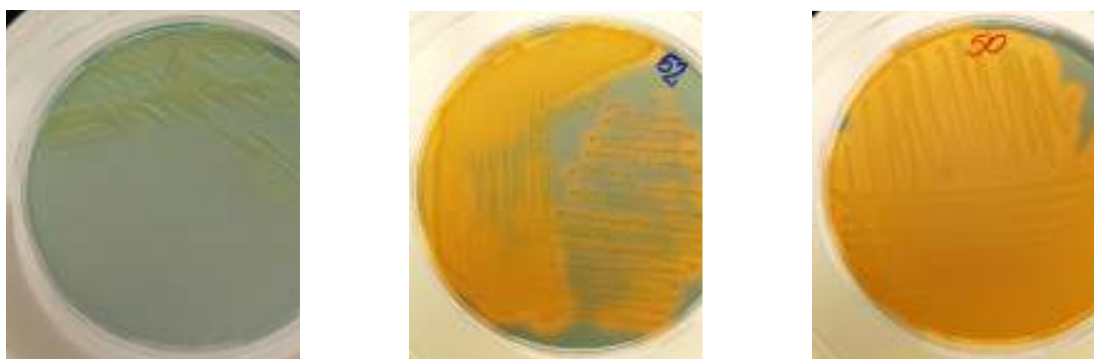


Fot. II-7. Przykładowe wyniki badania zdolności do rozpuszczania związków fosforu; od lewej: szczep 102/TR – wynik negatywny, szczep 92/TEŁ – wynik pozytywny (wzrost kolonii i widoczna strefa przejaśnienia), szczep 56/MR – wynik pozytywny (widoczna strefa przejaśnienia).

Ocena zdolności izolatów do syntezy sideroforów

Ocenę zdolności izolatów do syntezy sideroforów przeprowadzono na płytkach z podłożem CAS (ang. Chrome Azurol S) [Schwyn, Neilands, 1987]. Czyste kultury bakterii posiewano na płytki metodą posiewu redukcyjnego. Po 72-96h inkubacji w temperaturze 28°C obserwowano zmianę zabarwienia podłoża z niebieskiej na żółto-pomarańczową. Zmiana zabarwienia pożywki świadczyła o zdolności mikroorganizmów do wytwarzania sideroforów.

Wyniki pozytywnych reakcji przedstawiono w dwu stopniowej skali: (+) umiarkowana synteza sideroforów, (++) bardzo dobra synteza sideroforów. Przykładowe wyniki przedstawiona na Fot. II-8.



Fot. II-8. Przykładowe wyniki badania zdolności do syntezy sideroforów; od lewej: szczep 8/MEK – wynik negatywny (wzrost szczepu bez strefy przebarwienia podłoża), szczep 52/MR – wynik pozytywny (+), szczep 50/MR – wynik pozytywny (++)

Ocena zdolności izolatów do syntezy cyjanowodoru (HCN)

W celu oceny zdolności do syntezy HCN czyste kultury bakterii posiewano na podłoże płynne LB z dodatkiem glicyny. Po 72h inkubacji w temperaturze 28°C hodowlę płynną przenoszono w ilości 100 µl na podłoże stałe LB metodą posiewu powierzchniowego. Na tak przygotowane płytki nanoszono kwadrat sterylnej bibuły uprzednio nasączonej w roztworze 2% Na₂CO₃ w 0,5% roztworze kwasu pikrynowego. Płytki uszczelniono parafilmem i inkubowano przez 96h w temperaturze 28°C. Następnie oceniono zmianę zabarwienia bibuły z żółtego na pomarańczowo-brązowe, świadczące o zdolności izolatu do syntezy HCN. Wyniki pozytywne zmiany zabarwienia oceniono w trzy stopniowej skali: (+) słabe, (++) średnie, (+++) mocne. Przykładowe wyniki przedstawiono na Fot. II-9.



Fot. II-9. Przykładowe wyniki badania zdolności do syntezy HCN; od lewej: szczep 122/PR – wynik pozytywny (+++), szczep 111/TEŁ – wynik pozytywny (++) , szczep 41/MR – wynik pozytywny (+), szczep 114/TR – wynik negatywny.

Ocena zdolności izolatów do ruchu

Zdolność izolatów do ruchu oceniono na podłożu LB zestalonym agarem o stężeniu 0,2%. Szczepy nanoszono punktowo na środek płytki Petriego i inkubowano bez odwracania przez

48h w temperaturze 28°C. Po okresie inkubacji określono wzrost bakterii, oceniając ich zdolność do ruchu. Przykładowe wyniki przedstawiają Fot. II-10.



Fot. II-10. Przykładowe wyniki badania zdolności do ruchu; od lewej: wynik negatywny, wynik pozytywny.

Ocena zdolności izolatów do biosyntezy enzymów celulolitycznych

Zdolność izolatów do biosyntezy enzymów celulolitycznych oceniano na podłożu z karboksymetylocelulozą (CMC).

Skład podłoża z CMC [ang. Carboxymethylcellulose (CMC) Agar]:

SKŁADNIK	ILOŚĆ
CMC	10,0 g
FECL ₃	0,004 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
NACL	0,6 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MGSO ₄ X 7H ₂ O	0,5 g
CACL ₂ X 2H ₂ O	0,002 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
EKSTRAKT DROŹDŹOWY	0,1 g
AGAR	15,0 g
WODA DEMINERALIZOWANA	1,0 l

Każdy wyizolowany szczep nanoszono metodą punktową na pożywkę w trzech powtórzeniach. Po 2 tygodniach inkubacji w temperaturze 28°C płytki zalewano płynem Lugola. Po 15 minutach inkubacji usuwano płyn z powierzchni płytek i mierzono promień przejaśnień powstały wokół miejsca posiewu. Przykładowe wyniki pozytywne przedstawiono na Fot. II-11.



Fot. II-11. Przykładowe wyniki badania aktywności celulolitycznej; od lewej: szczep 166/TEK – wynik pozytywny, szczep 82/TR – wynik pozytywny.

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec czynników chorobotwórczych upraw roślin jagodowych

Badanie aktywności przeciwpleśniowej względem grzybów patogennych wykonywano metodą studzienkową na podłożu z agarem glukozowo-ziemniaczanym (PDA) (Fot. II-12). Pleśnie fitopatogenne względem roślin jagodowych (Tab. II-1.) posiano równomiernie metodą powierzchniową na podłożu agarowe w ilości 300 μ l. Po wchłonięciu zawiesiny przez agar w pożywce wycinano w sposób aseptyczny studzienki o średnicy ok. 0,5 cm.

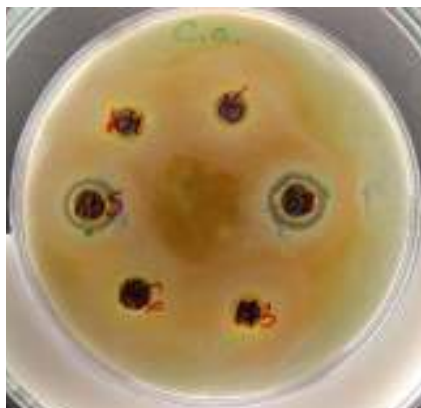
Aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec szczepów bakteryjnych reprezentujących rodzaje fitopatogenne dla roślin badano metodą studzienową w podłożu LB z agarem. Na powierzchnię podłoża nanoszono 300 μ l zawiesiny szczepu fitopatogennego (10^6 jtk/ml), a następnie wycinano studzienki o średnicy ok. 0,5 cm. W tabeli II-1 wymieniono szczepy bakteryjne stosowane jako mikroorganizmy wskaźnikowe.

Tab. II-1. Szczepy fitopatogenne izolowane z różnych organów gatunków roślin jagodowych:

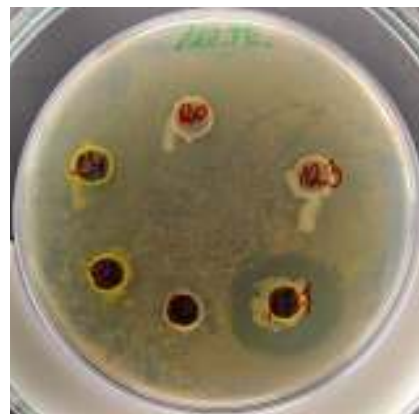
Fitopatogeny grzybowe	Źródło izolacji	Fitopatogeny bakteryjne	Źródło izolacji
<i>Alternaria</i> sp. INHORT ^{a)}		<i>Erwinia billingiae</i> 56/MR ITM ^{c)}	Korzenie maliny
<i>Aspergillus</i> sp. ITM ^{c)}	Liście czarnej porzeczki	<i>Erwinia rhapontici</i> 189/PR ITM ^{c)}	Korzenie czarnej porzeczki
<i>Botrytis cinerea</i> INHORT ^{a)}		<i>Rhodococcus</i> sp. 102/TR ITM ^{c)}	Korzenie truskawki
<i>Botrytis cinerea</i> SGGW ^{b)}	Owoce truskawki		

<i>Botrytis cinerea</i> ITM ^{c)}	Liście czarnej porzeczki	a) Szczepy oznaczone „INHORT” pochodzą z kolekcji Pracownia Ryzosfery (Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice). b) Szczepy oznaczone „SGGW” pochodzą z kolekcji Samodzielnego Zakładu Fitopatologii (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa). c) Szczepy oznaczone „ITM” pochodzą z kolekcji Działu Mikrobiologii (Instytut Technologii Mikrobiologicznych, Turek).
<i>Colletotrichum acutatum</i> SGGW ^{b)}	Liście borówki wysokiej	
<i>Fusarium oxysporum</i> INHORT ^{a)}		
<i>Fusarium oxysporum</i> A INHORT ^{a)}		
<i>Fusarium oxysporum</i> AH INHORT ^{a)}		

W obu opisanych testach do studzienek наносono po 100 µl 48-godzinnej hodowli izolatów bakteryjnych z pożywki LB. Płytki inkubowano przez 2 lub 5 dni (odpowiednio w testach oceniających aktywność wobec bakterii lub pleśni) codziennie monitorując wzrost mikroorganizmów. Strefa przejaśnienia liczona od brzegu studzienek świadczyła o aktywności przeciwdrobnoustrojowej danego izolatu bakteryjnego wobec analizowanego fitopatogenu.



A



B

Fot. II-12. Przykładowe wyniki badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Fot. A: test na aktywność szczepów bakteryjnych wobec *C. acutatum* SGGW; w studzienkach 38 i 135 znajdują się szczepy 38/MR oraz 135/TR, które zahamowały wzrost pleśni; szczepy znajdujące się w pozostałych studzienkach wykazują aktywność sporostatyczną; w centrum płytki znajduje się fragment murawki plechy rozwijającej się poza zasięgiem oddziaływania szczepów bakteryjnych. Fot. B: test na aktywność przeciwdrobnoustrojową szczepów bakteryjnych wobec fitopatogenicznego szczepu 102/TR; w studzience 177 znajduje się szczep 177/PEK, który zahamował wzrost szczepu wskaźnikowego (widoczna strefa przejaśnienia w murawce).

Ocena przynależności gatunkowej metodami genetycznymi:

Z wytypowanych szczepów izolowano DNA genomowy zestawem AX Bacteria SPIN+. Oczyszczony DNA poddawano analizie spektrofotometrycznej, a stężenie roztworu standaryzowano w każdej próbce do 30 ng. Tak przygotowany materiał poddawano reakcji PCR genu 16S rDNA w obecności polimerazy Phire (Thermo Scientific). Otrzymane produkty poddawano trawieniu mieszaniną enzymów restrykcyjnych HaeIII i HinfI. Wyniki cięcia analizowano za pomocą Bioanalyzera 2100 (Agilent Technologies).

Szczepy przedstawiające podobne wzory poddawano kolejnej analizie wykonując reakcję RAPD. Mieszanina reakcyjna zawierała 1,0 μ M primera M13 oraz końcowe stężenie jonów magnezu na poziomie 6,5 mM.

Spośród szczepów charakteryzujących się jednakowymi wzorami RAPD wybierano po jednym reprezentatywnym i razem z pozostałymi szczepami generującymi unikatowe wzory w analizie RAPD i RFLP poddawano sekwencjonowaniu genu 16S rDNA. Odczytane sekwencje składano w kontigi przy pomocy programu BioEdit, które następnie poddawano analizie porównawczej w bazie GenBank przy zastosowaniu programu BLAST [Zhang i in., 2000]. Przynależność gatunkową badanych szczepów ustalano na podstawie wyników wskazujących na co najmniej 97%-owy stopień identyczności analizowanych sekwencji z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank.

WYNIKI I INTERPRETACJA

Izolacja szczepów endofitycznych i ryzosferowych z różnych gatunków roślin jagodowych uprawianych metodami ekologicznymi

Ze świeżo pobranego materiału roślinnego wyizolowano 246 szczepów bakteryjnych. W toku przeprowadzanych kolejnych pasaży, celem otrzymania czystych kultur mikroorganizmów, do dalszych badań wytypowano populację 146 szczepów charakteryzujących się dobrym wzrostem na podłożach mikrobiologicznych (Tab. II-2.). Cecha ta jest jednym z czynników sugerujących możliwość uzyskiwania dobrych wydajności w namnażaniu biomasy tych szczepów w procesach półtechnicznych lub technicznych, celem uzyskania bioszczepionek.

Tab. II-2. Symbole szczepów ryzosferowych i endofitycznych izolowanych z różnych gatunków roślin jagodowych:

Czarna porzeczka					
Szczepy ryzosferowe		Szczepy endofityczne korzeni		Szczepy endofityczne łądyg	
21/PR	173/PR	120/PEK	180/PEK	127/PEŁ	
23/PR	189/PR	121/PEK	181/PEK	128/PEŁ	
119/PR	191/PR	125/PEK	182/PEK	129/PEŁ	
122/PR	199/PR	126/PEK	198/PEK	187/PEŁ	
123/PR	215/PR	130/PEK	209/PEK	188/PEŁ	
131/PR	216/PR	174/PEK	214/PEK	224/PEŁ	
152/PR	217/PR	175/PEK	222/PEK	225/PEŁ	
160/PR	220/PR	176/PEK	223/PEK	226/PEŁ	
161/PR	221/PR	177/PEK	228/PEK		
172/PR		178/PEK	229/PEK		
		179/PEK			

Malina				
Szczepy ryzosferowe		Szczepy endofityczne korzeni		
14/MR	48/MR	1/MEK	28/MEK	
15/MR	49/MR	2/MEK	29/MEK	
34/MR	50/MR	3/MEK	30/MEK	
35/MR	51/MR	4/MEK	31/MEK	
36/MR	52/MR	5/MEK	53/MEK	
37/MR	55/MR	7/MEK	54/MEK	
38/MR	56/MR	8/MEK	60/MEK	
39/MR	116/MR	9/MEK	63/MEK	
40/MR	196/MR	25/MEK	64/MEK	
41/MR	197/MR	26/MEK	66/MEK	
42/MR	201/MR	27/MEK	67/MEK	
Truskawka				
Szczepy ryzosferowe		Szczepy endofityczne korzeni		Szczepy endofityczne łądyg
24/TR	135/TR	75/TEK		70/TEŁ
79/TR	136/TR	76/TEK		71/TEŁ
81/TR	137/TR	77/TEK		72/TEŁ
82/TR	138/TR	83/TEK		91/TEŁ
100/TR	139/TR	85/TEK		92/TEŁ
102/TR	140/TR	86/TEK		93/TEŁ
103/TR	141/TR	109/TEK		95/TEŁ
104/TR	142/TR	110/TEK		96/TEŁ
108/TR	144/TR	113/TEK		97/TEŁ
114/TR	145/TR	164/TEK		111/TEŁ
115/TR	146/TR	165/TEK		112/TEŁ
132/TR	147/TR	166/TEK		240/TEŁ
133/TR	148/TR	167/TEK		
134/TR	195/TR	168/TEK		

Wśród szczepów wytypowanych do dalszych badań znajdują się ekotypy izolowane z ryzosfery oraz endofity korzeniowe i łądyg; brak jest natomiast endofitów liści, które utraciły zdolność do wzrostu na podłożach mikrobiologicznych na etapie wyprowadzania czystych kultur lub po próbach zabezpieczenia w -80°C .

Ocena zdolności wyizolowanych bakterii endofitycznych i ryzosferowych do potencjalnego promowania wzrostu roślin

Selekcja szczepów pod kątem możliwości ich zastosowania jako naturalnych stymulatorów wzrostu roślin jagodowych prowadzono analizując następujące cechy:

- Zdolność do biosyntezy fitohormonu – kwasu indolilo-3-octowego (IAA),
- Zdolność do rozpuszczania fosforanów,
- Zdolność do biosyntezy sideroforów,
- Zdolność do biosyntezy cyjanowodoru.

IAA jest jednym z hormonów roślinnych klasyfikowanych do grupy auksyn, który wywiera wpływ na wzrost roślin. W wypadku szczepów bakteryjnych zdolnych do syntezy IAA szczególnie istotne jest uwalnianie tego związku przez szczepy ryzosferowe i endofity korzeniowe, co w efekcie korzystnie oddziałuje na rozwój systemu korzeniowego roślin, zwiększa powierzchnię systemu korzeniowego i poprawia proces pobierania składników pokarmowych z gleby [Kuklinsky-Sobral i wsp., 2004; Li i wsp., 2010].

Fosfor i żelazo są ważnymi pierwiastkami, których odpowiednia dostępność warunkuje prawidłowy rozwój roślin. Pożądaną cechą wśród bakterii lub grzybów promujących wzrost roślin jest zdolność do rozpuszczania związków fosforu przez co pierwiastek staje się dostępny dla roślin. Efekt taki zachodzi poprzez uwalnianie zewnątrzkomórkowych fosfataz rozpuszczających organiczne kompleksy fosforu lub poprzez syntezę kwasów organicznych i uwalnianie ortofosforanu ze związków złożonych [Kucey i wsp., 1989].

Na pewnych stanowiskach dostępność żelaza dla roślin jest ograniczona poprzez występowanie tego pierwiastka w postaci związków utlenionych. Pewne szczepy bakteryjne wykształciły zdolność do syntezy i uwalniania do środowiska sideroforów, czyli związków, które umożliwiają pobieranie i wykorzystywanie jonów Fe^{3+} [Dilworth i wsp., 1998; Jin i wsp., 2006]. W przypadku upraw roślin jagodowych stosowanie szczepów syntetyzujących siderofory może być kluczowe dla upraw truskawek, malin i porzeczek, w odróżnieniu od borówki amerykańskiej, której uprawa wymaga zakwaszenia gleby, a w tych warunkach przeważa udział rozpuszczalnych w wodzie jonów Fe^{2+} .

Siderofory razem z cyjanowodorem są czynnikami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Zdolność do syntezy cyjanowodoru przez bakterie, będące w mutualistycznych interakcjach z roślinami, promuje wzrost roślin poprzez ograniczanie rozwoju konkurencyjnej mikroflory, w tym również drobnoustrojów fitopatogennych [Rosenblueth i Martínez-Romero, 2006].

W toku przeprowadzanej selekcji wykazano zdolność do syntezy cyjanowodoru, sideroforów i rozpuszczania związków fosforu z wysoką częstością, przy czym tylko około 18% izolatów ryzosfery i endofitycznych wykazywało potencjał do promowania wzrostu roślin poprzez wszystkie trzy wymienione cechy. Szczepy takie pochodziły z każdego z trzech gatunków roślin jagodowych [Tab. II-3a-c].

Rzadziej opisywaną właściwością analizowanych szczepów była zdolność do syntezy fitohormonu IAA, którą częściej wykazywały szczepy izolowane z ryzosfery lub endofity korzeniowe niż endofity pędów. Łącznie z pozostałymi cechami (synteza sideroforów, cyjanowodoru oraz rozpuszczanie związków fosforu), tylko ok. 9% izolatów charakteryzowało się pełnym zakresem analizowanych mechanizmów promowania wzrostu roślin [Tab. II-3a-c].

Dane literaturowe potwierdzają rzadką izolację szczepów zdolnych do promowania wzrostu roślin poprzez kilka mechanizmów jednocześnie i sugerują komponowanie kilku symbiotycznych szczepów, z których każdy może wykazywać pozytywny wpływ na rozwój roślin poprzez inne rodzaje oddziaływań. W pracy Zaidi i wsp. [2006] opisany został szczep *Bacillus subtilis*, który łącznie z innymi izolatami z rodzaju *Bacillus* wykazywał najwyższą wydajność syntezy fitohormonu IAA (55 µg/ml), co było negatywnie skorelowane ze zdolnością do syntezy sideroforów. Z kolei szczepy *Enterobacter* sp. EMB-65 oraz *Pseudomonas punctata* NA-132, syntetyzujące duże ilości sideroforów, nie wykazywały podobnie wysokiej wydajności syntezy IAA [Dias i wsp., 2009].

Tab. II-3a. Analiza zdolności szczepów izolowanych z roślin czarnej porzeczki do promowania wzrostu roślin:

	Symbol szczepu	Biosynteza IAA [µg/ml]	Rozpuszczanie fosforanów, wielkość strefy [mm]	Synteza sideroforów	Synteza cyjanowodoru
Szczepy ryzosferowe	21/PR	0,010		++	+
	23/PR			+	
	119/PR			++	
	122/PR			++	+++
	123/PR	0,375	5,00 ± 0,00	++	+++
	131/PR			+++	
	152/PR				+
	160/PR				
	161/PR				
	172/PR			++	+++
	173/PR	0,389	5,33 ± 0,29	+	+
	189/PR	0,157	3,50 ± 0,00	++	+
	191/PR		2,16 ± 0,29		
	199/PR	0,021	4,66 ± 0,29	++	
	215/PR				
216/PR			++		
217/PR			++	+	

	220/PR	3,592	2,83 ± 0,29	++	
	221/PR			+	
Szczepy endofityczne korzeni	120/PEK	0,217		++	+++
	121/PEK				
	125/PEK		5,33 ± 0,58		++
	126/PEK		1,33 ± 1,52	++	+
	130/PEK		5,33 ± 0,29	++	
	174/PEK	0,424		++	
	175/PEK		4,33 ± 0,76		
	176/PEK		3,00 ± 0,00		
	177/PEK	0,025	4,16 ± 0,29	+	+
	178/PEK		3,16 ± 0,29		+
	179/PEK	1,131	6,16 ± 0,76	++	+++
	180/PEK			++	++
	181/PEK			+	+
	182/PEK			++	+
	198/PEK			+	+
	209/PEK			+	+
	214/PEK			+	
	222/PEK		5,00 ± 0,50	++	
	223/PEK				
228/PEK		0,66 ± 0,29		+	
229/PEK				+	
Szczepy endofityczne łodyg	127/PEŁ		5,16 ± 0,29	++	+
	128/PEŁ		6,66 ± 0,29	++	+
	129/PEŁ			++	
	187/PEŁ			+	+
	188/PEŁ			+	+
	224/PEŁ				
	225/PEŁ		4,00 ± 0,87	++	
	226/PEŁ				+

Synteza HCN: (+) słaba, (++) średnia, (+++) silna.

Synteza sideroforów: (+) umiarkowana, (++) bardzo dobra.

Tab. II-3b. Analiza zdolności szczepów izolowanych z roślin malin do promowania wzrostu roślin:

	Symbol szczepu	Biosynteza IAA [µg/ml]	Rozpuszczanie fosforanów, wielkość strefy [mm]	Synteza sideroforów	Synteza cyjanowodoru
Szczepy ryzosferowe	14/MR				
	15/MR	1,250	5,66 ± 0,29	+	+
	34/MR			+	++
	35/MR			++	++

	36/MR		3,16 ± 0,29		+
	37/MR				+
	38/MR	0,259	6,16 ± 0,29	+	+
	39/MR			+	++
	40/MR		2,33 ± 0,76	++	+
	41/MR		4,00 ± 0,50	++	+
	42/MR			++	+
	48/MR				+
	49/MR	7,658	5,66 ± 0,29	++	
	50/MR			+++	
	51/MR	0,798		+	
	52/MR	0,701	5,50 ± 0,50	+	
	55/MR	0,029		+	
	56/MR		7,50 ± 0,00	+	+
	116/MR		2,50 ± 0,50		
	196/MR	0,253	9,83 ± 0,29	++	
	197/MR				
201/MR			++		
Szczepy endofityczne korzeni	1/MEK	0,282	3,83 ± 0,29	++	+
	2/MEK		3,33 ± 0,29		
	3/MEK	0,142	2,00 ± 0,00		
	4/MEK			++	
	5/MEK				++
	7/MEK		4,50 ± 0,00	++	
	8/MEK				
	9/MEK		1,16 ± 0,29		
	25/MEK				++
	26/MEK	0,940	4,33 ± 0,29	++	++
	27/MEK			++	++
	28/MEK				
	29/MEK		3,83 ± 0,29		
	30/MEK				+
	31/MEK			++	
	53/MEK	0,212	4,33 ± 0,58	++	+
	54/MEK	0,989	2,66 ± 0,29	++	+
	60/MEK	0,323	1,33 ± 0,29		
	63/MEK	0,049		++	
64/MEK			++		
66/MEK	0,138	3,83 ± 0,29	++		
67/MEK			++	++	

Synteza HCN: (+) słaba, (++) średnia, (+++) silna.

Synteza sideroforów: (+) umiarkowana, (++) bardzo dobra.

Tab. II-3c. Analiza zdolności szczepów izolowanych z roślin truskawki do promowania wzrostu roślin:

	Symbol szczepu	Biosynteza IAA [µg/ml]	Rozpuszczanie fosforanów, wielkość strefy [mm]	Synteza sideroforów	Synteza cyjanowodoru
Szczepy ryzosferowe	24/TR	1,537	5,17 ± 0,29	+	++
	79/TR		3,50 ± 0,50	++	+
	81/TR			+	
	82/TR		6,50 ± 0,00	+	
	100/TR			++	
	102/TR				
	103/TR			+	+
	104/TR	0,256	4,67 ± 0,76		+
	108/TR		2,00 ± 0,00	++	
	114/TR		1,83 ± 0,29		
	115/TR			++	
	132/TR				++
	133/TR		5,50 ± 0,50		++
	134/TR		5,00 ± 0,00	++	
	135/TR	0,098	3,83 ± 0,29	+	+
	136/TR			++	+
	137/TR		2,50 ± 0,50		++
	138/TR				+
	142/TR		4,17 ± 0,29		
	144/TR				
145/TR				+	
146/TR	0,899			+	+
147/TR		1,83 ± 0,29			
148/TR		4,67 ± 0,29		++	
195/TR				++	
Szczepy endofityczne korzeni	75/TEK				+
	76/TEK				+++
	77/TEK			+	+
	83/TEK			++	++
	85/TEK				+++
	86/TEK		3,50 ± 0,87	+	+
	109/TEK		2,00 ± 0,00	++	++
	110/TEK		7,50 ± 0,50	+	++
	113/TEK			++	+++
	164/TEK				++

	165/TEK		2,17 ± 0,29	++	+
	166/TEK			++	++
	167/TEK				+
	168/TEK		5,67 ± 0,29	+	+
Szczepy endofityczne lodyg	70/TEŁ	0,441		++	++
	71/TEŁ		3,50 ± 0,50	+	
	72/TEŁ	0,974			
	91/TEŁ		2,16 ± 0,29		+
	92/TEŁ	1,769	8,00 ± 0,86	++	+
	93/TEŁ		3,00 ± 0,00		
	95/TEŁ		3,16 ± 0,29		
	96/TEŁ		7,00 ± 0,50	++	+
	97/TEŁ			++	++
	111/TEŁ			+	++
	112/TEŁ		4,00 ± 0,00		
	240/TEŁ			++	+

Synteza HCN: (+) słaba, (++) średnia, (+++) silna.

Synteza sideroforów: (+) umiarkowana, (++) bardzo dobra.

Ocena zdolności wyizolowanych bakterii endofitycznych i ryzosferowych do ponownej kolonizacji roślin

Szczepy selekcjonowane pod kątem ich potencjału do promowania wzrostu roślin wymagają przeprowadzenia wstępnej oceny zdolności do ponownej kolonizacji roślin, co w przypadku szczepów endofitycznych określane jest jako infekowanie rośliny. Szczepy bakteryjne wykazują zróżnicowaną zdolność kolonizacji roślin, która jest uzależniona od następujących uwarunkowań:

- Zdolności do ruchu,
- Biosyntezy enzymów celulolitycznych.

Analiza ruchliwości szczepów ma znaczenie dla sposobu stosowania inokulatu. Kontaktowe stosowanie bioszczepionek zawierających szczepy pozbawione zdolności do ruchu wydaje się być najskuteczniejszym sposobem aplikacji, podczas gdy szczepy wykazujące zdolność ruchu mogą być stosowane również doglebowo. Ważniejszą cechą warunkującą kolonizację rośliny wydaje się być zdolność do syntezy enzymów celulolitycznych lub pektynolitycznych [Hallmann i wsp., 1997].

Większość testowanych izolatów wykazywała zdolność do ruchu, natomiast 1/3 całej puli szczepów wykazywała jednoczesną zdolność do rozkładu celulozy w podłożu agarowym [Tab. II-4a-c]. Najwyższa aktywność celulolityczna była obserwowana w przypadku szczepów 178/PEK, 228/PEK oraz 79/TR.

Tab. II-4a. Analiza zdolności szczepów izolowanych z roślin czarnej porzeczki do ponownej kolonizacji roślin:

	Symbol szczepu	Zdolność do ruchu	Aktywność celulolityczna, wielkość strefy [mm]
Szczepy ryzosferowe	21/PR		
	23/PR		
	119/PR		
	122/PR		
	123/PR	+	
	131/PR		
	152/PR	+	1,83 ± 0,29
	160/PR		
	161/PR		
	172/PR	+	22,17 ± 0,29
	173/PR	+	
	189/PR	+	2,00 ± 0,00
	191/PR	+	26,83 ± 0,29
	199/PR	+	
	215/PR		
	216/PR		
	217/PR	+	3,83 ± 0,58
	220/PR	+	2,83 ± 0,29
221/PR	+		
Szczepy endofityczne korzeni	120/PEK	+	
	121/PEK		
	125/PEK		26,00 ± 0,50
	126/PEK		7,17 ± 1,04
	130/PEK	+	3,17 ± 0,76
	174/PEK	+	2,83 ± 0,29
	175/PEK	+	
	176/PEK	+	21,50 ± 1,32
	177/PEK	+	5,50 ± 0,50
	178/PEK	+	32,00 ± 0,50
	179/PEK	+	
	180/PEK	+	5,83 ± 1,44
	181/PEK		24,17 ± 0,58
	182/PEK	+	5,33 ± 0,58
	198/PEK	+	
209/PEK	+		

	214/PEK	+	
	222/PEK	+	7,83 ± 0,29
	223/PEK	+	
	228/PEK	+	30,67 ± 0,58
	229/PEK		
Szczepy endofityczne lodyg	127/PEŁ		21,50 ± 0,87
	128/PEŁ	+	1,00 ± 0,00
	129/PEŁ		22,33 ± 0,29
	187/PEŁ	+	
	188/PEŁ		22,67 ± 0,29
	224/PEŁ	+	
	225/PEŁ	+	
	226/PEŁ		21,50 ± 0,87

Tab. II-4b. Analiza zdolności szczepów izolowanych z roślin malin do ponownej kolonizacji roślin:

	Symbol szczepu	Zdolność do ruchu	Aktywność celulolityczna, wielkość strefy [mm]
Szczepy ryzosferowe	14/MR		18,50 ± 0,50
	15/MR	+	
	34/MR	+	
	35/MR	+	7,33 ± 1,61
	36/MR	+	11,33 ± 2,02
	37/MR	+	
	38/MR	+	1,67 ± 0,29
	39/MR		11,5 ± 0,50
	40/MR	+	
	41/MR	+	
	42/MR	+	
	48/MR		27,00 ± 0,00
	49/MR	+	2,50 ± 0,00
	50/MR	+	
	51/MR		4,50 ± 0,50
	52/MR	+	
	55/MR	+	21,00 ± 0,00
	56/MR	+	
	116/MR		13,67 ± 1,26
	196/MR	+	3,67 ± 0,29
197/MR	+		
201/MR		14,33 ± 0,29	
S z	1/MEK	+	

	2/MEK	+	12,17 ± 0,58
	3/MEK		10,83 ± 1,44
	4/MEK		3,33 ± 0,29
	5/MEK	+	
	7/MEK	+	25,00 ± 0,00
	8/MEK		1,16 ± 1,04
	9/MEK		
	25/MEK	+	
	26/MEK	+	4,33 ± 0,29
	27/MEK	+	4,67 ± 1,15
	28/MEK		2,83 ± 0,29
	29/MEK		
	30/MEK	+	
	31/MEK	+	1,00 ± 0,00
	53/MEK	+	5,00 ± 2,18
	54/MEK	+	
	60/MEK		
	63/MEK	+	4,83 ± 0,29
	64/MEK		4,17 ± 0,76
	66/MEK	+	6,67 ± 0,29
	67/MEK	+	26,50 ± 0,00

Tab. II-4c. Analiza zdolności szczepów izolowanych z roślin truskawek do ponownej kolonizacji roślin:

	Symbol szczepu	Zdolność do ruchu	Aktywność celulolityczna, wielkość strefy [mm]
Szczepy ryzosferowe	24/TR	+	3,83 ± 0,29
	79/TR	+	27,33 ± 0,29
	81/TR	+	
	82/TR		21,17 ± 0,29
	100/TR	+	
	102/TR		
	103/TR		
	104/TR	+	
	108/TR	+	5,33 ± 0,29
	114/TR	+	7,17 ± 0,29
	115/TR		10,17 ± 0,29
	132/TR	+	
	133/TR	+	2,00 ± 0,00
	134/TR	+	3,33 ± 0,29

	135/TR	+	
	136/TR		13,33 ± 0,58
	137/TR		13,17 ± 0,76
	138/TR	+	2,00 ± 0,00
	142/TR	+	22,33 ± 0,29
	144/TR	+	14,50 ± 0,50
	145/TR	+	
	146/TR	+	2,00 ± 0,00
	147/TR	+	4,83 ± 0,29
	148/TR		
	195/TR	+	
Szczepy endofityczne korzeni	75/TEK	+	
	76/TEK	+	
	77/TEK	+	2,00 ± 0,00
	83/TEK		22,50 ± 0,00
	85/TEK		
	86/TEK	+	31,67 ± 0,29
	109/TEK		10,50 ± 0,50
	110/TEK		21,83 ± 0,76
	113/TEK	+	3,33 ± 0,29
	164/TEK	+	
	165/TEK		9,17 ± 1,04
	166/TEK		10,17 ± 0,29
	167/TEK	+	
168/TEK	+		
Szczepy endofityczne łodyg	70/TEŁ	+	4,17 ± 0,76
	71/TEŁ		2,67 ± 0,29
	72/TEŁ	+	8,83 ± 0,29
	91/TEŁ	+	1,17 ± 1,04
	92/TEŁ	+	6,33 ± 3,21
	93/TEŁ	+	10,17 ± 0,29
	95/TEŁ	+	11,67 ± 0,76
	96/TEŁ	+	1,00 ± 0,50
	97/TEŁ	+	
	111/TEŁ		2,00 ± 0,00
	112/TEŁ	+	16,00 ± 3,46
	240/TEŁ	+	

Spośród szczepów 146 szczepów wybranych do testów opisujących ich potencjał do promowania wzrostu roślin wybrano 46 szczepów, które wykazywały zestaw najkorzystniejszych właściwości (Tab. II-5). Szczepy te zostały poddane badaniu aktywności

przeciwdrobnoustrojowej wobec mikrobiologicznych czynników chorobotwórczych upraw roślin jagodowych oraz poddano identyfikacji genetycznej.

Tab. II-5. Symbole wyselekcjonowanych szczepów ryzosferowych i endofitycznych izolowanych z różnych gatunków roślin jagodowych, potencjalnie zdolne do promowania wzrostu roślin:

Czarna porzeczka				
Szczepy ryzosferowe		Szczepy endofityczne korzeni		Szczepy endofityczne łądyg
123/PR		120/PEK	179/PEK	128/PEŁ
172/PR		130/PEK	180/PEK	
173/PR		174/PEK	182/PEK	
189/PR		177/PEK	220/PEK	
217/PR		178/PEK		
Malina				
Szczepy ryzosferowe		Szczepy endofityczne korzeni		
15/MR	55/MR	1/MEK	54/MEK	
38/MR	56/MR	7/MEK	66/MEK	
40/MR	109/MR	26/MEK	63/MEK	
49/MR	196/MR	27/MEK	67/MEK	
		53/MEK		
Truskawka				
Szczepy ryzosferowe		Szczepy endofityczne korzeni		Szczepy endofityczne łądyg
24/TR	135/TR	110/TEK		70/TEŁ
79/TR	146/TR	165/TEK		92/TEŁ
102/TR	199/TR	168/TEK		96/TEŁ
104/TR				

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii endofitycznych i ryzosferowych

Pożądaną cechą szczepów bakteryjnych promujących wzrost roślin jest zdolność do kontroli rozwoju mikroorganizmów patogennych naturalnie występujących w środowisku. Znane są przypadki stosowania bakterii Gram-ujemnych w celu biokontroli rozwoju pleśni fitopatogennych, a aktywność przeciwdrobnoustrojowa takich szczepów wynika z jednego lub kilku mechanizmów takich jak: uwalnianie enzymów litycznych na zewnątrz komórki, synteza sideroforów, uwalnianie kwasu salicylowego antybiotyków lub związków lotnych (np. HCN). Pierwsze szczepy opisywane jako czynniki biokontrolne w rozwoju pleśni należą jednak do rodzaju *Bacillus* [Powell i Jutsum; 1993] np. szczepy *Bacillus subtilis* wchodzi w skład biofungicydu stosowanego w ochronie roślin uprawnych przed chorobami bakteryjnymi powodowanymi przez *Erwina*, *Pseudomonas* i *Xanthomonas*.

W toku prowadzonych analiz obserwowano zróżnicowane dowody aktywności przeciwdrobnoustrojowej szczepów bakteryjnych. Ich aktywność objawiała się zupełnym zahamowaniem wzrostu mikroorganizmów wskaźnikowych lub ograniczeniem wzrostu poprzez konkurencję o składniki pokarmowe (badane izolaty przerastały podłoże wokół studzienki uniemożliwiając wzrost murawki szczepu wskaźnikowego) lub ograniczeniem rozwoju (np. wstrzymanie zarodnikowania pleśni). Aktywność przeciwdrobnoustrojową częściej wykazywały szczepy izolowane z ryzosfery i endofity korzeniowe (Tab. II-6a-c).

Pośród szczepów selekcionowanych pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec pleśni i bakterii fitopatogennych dziewięć wyróżniało się szerokim zakresem aktywności obejmującym większość stosowanych mikroorganizmów wskaźnikowych. Szczepy te, w zależności od stopnia aktywności, można umownie podzielić trzy grupy. Do pierwszej grupy o niskiej aktywności zaliczyć można szczepy 172/PR i 177/PEK (Tab. II-6a). Wysoką aktywność wobec większości analizowanych pleśni wykazywały szczepy 174/PEK, 220/PEK (Tab. 6a), 7/MEK i 49/MR (Tab. 6b). Szczepy 24/TR, 135/TR i 70/TEŁ charakteryzowały się pośrednim stopniem aktywności. Ostatni ze szczepów jest jedynym spośród izolatów endofitycznych pędów nadziemnych, którego aktywność obejmowała szerokie spektrum fitopatogenów wskaźnikowych.

Tab. II-6a. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów ryzosferowych i endofitycznych izolowanych z czarnej porzeczki wobec szczepów bakterii i pleśni fitopatogennych:

		Pleśnie									Szczepy bakteryjne		
		<i>Alternaria</i> sp. INHORT	<i>Aspergillus</i> sp. ITM	<i>B. cinerea</i> INHORT	<i>B. cinerea</i> SGGW	<i>B. cinerea</i> ITM	<i>C. acutatum</i> SGGW	<i>F. oxysporum</i> INHORT	<i>F. oxysporum</i> A INHORT	<i>F. oxysporum</i> AH INHORT	<i>E. billingiae</i> 56/MR ITM	<i>E. rhaponici</i> 189/PR ITM	<i>Rhodococcus</i> sp. 102/TR ITM
		Wielkość strefy [mm]											
Szczepy ryzosferowe	123/PR												
	172/PR	1				2	1	2	2				
	173/PR				3		12 ^{a)}				1		
	217/PR					4							
Endofity korzeni	120/PEK												
	130/PEK												
	174/PEK		5	6	4	5	3	6	4	2			
	177/PEK	2	1	3	2	2	1	1	3			1	10

	179/PEK						1 ^{a)}						
	180/PEK												
	182/PEK							3					
	220/PEK	7	3	4		6			4				4
Endofity fodyg	128/PEŁ										2		1

^{a)} podano rozmiar strefy wykazującej efekt sporostacyjny.

Tab. II-6b. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów ryzosferowych i endofitycznych izolowanych z malin wobec szczepów bakterii i pleśni fitopatogennych:

		Pleśnie								Szczepy bakteryjne			
		<i>Alternaria</i> sp. INHORT	<i>Aspergillus</i> sp. ITM	<i>B. cinerea</i> INHORT	<i>B. cinerea</i> SGGW	<i>B. cinerea</i> ITM	<i>C. acutatum</i> SGGW	<i>F. oxysporum</i> INHORT	<i>F. oxysporum</i> A INHORT	<i>F. oxysporum</i> AH INHORT	<i>E. billingiae</i> 56/MR ITM	<i>E. rhapontici</i> 189/PR ITM	<i>Rhodococcus</i> sp. 102/TR ITM
		Wielkość strefy [mm]											
Szczepy ryzosferowe	15/MR						10 ^{a)}						
	38/MR		2	3	4		2						
	40/MR					3	2 ^{a)}						
	49/MR	6	6	11			2	10					2
	55/MR												
	109/MR												3
	196/MR						4 ^{a)}					1	3
Endofity korzeni	1/MEK						4 ^{a)}						3
	7/MEK	5	2	7	4	5	4	3	2	2	3	4	14
	26/MEK						4 ^{a)}						2
	27/MEK												
	53/MEK												
	54/MEK						5 ^{a)}						
	63/MEK	3				3							
	66/MEK					3	4 ^{a)}						2
67/MEK						2				4	2	4	

^{a)} podano rozmiar strefy wykazującej efekt sporostacyjny.

Tab. II-6c. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa szczepów ryzosferowych i endofitycznych izolowanych z truskawek wobec szczepów bakterii i pleśni fitopatogennych:

		Pleśnie									Szczepy bakteryjne		
		<i>Alternaria</i> sp. INHORT	<i>Aspergillus</i> sp. ITM	<i>B. cinerea</i> INHORT	<i>B. cinerea</i> SGGW	<i>B. cinerea</i> ITM	<i>C. acutatum</i> SGGW	<i>F. oxysporum</i> INHORT	<i>F. oxysporum</i> A INHORT	<i>F. oxysporum</i> AH INHORT	<i>E. billingiae</i> 56/MR ITM	<i>E. rhapontici</i> 189/PR ITM	<i>Rhodococcus</i> sp. 102/TR ITM
		Wielkość strefy [mm]											
Szczepy ryzosferowe	24/TR	4	5		5	5	4	3	3	3	3		
	79/TR										3	2	13
	104/TR						10 ^{a)}						
	135/TR	5	3	3	5	4	2				2		
	146/TR		4				12 ^{a)}				2		
	199/TR										2		
Endofity korzeni	86/TEK												2
	110/TEK												2
	113/TEK												
	165/TEK												3
	168/TEK	2										1	10
Endofity łodyg	70/TEŁ	2	1	4			4	3	4				2
	92/TEŁ						10 ^{a)}					1	
	96/TEŁ						3 ^{a)}						

^{a)} podano rozmiar strefy wykazującej efekt sporostacyjny.

Identyfikacja wybranych bakterii endofitycznych i ryzosferowych

Wstępnym etapem identyfikacji była ocena stopnia zróżnicowania populacji na poziomie rodzaju/gatunku poprzez analizę restrykcyjną genu 16S rDNA. W ten sposób wyodrębniono 13 szczepów, z których każdy charakteryzował się unikatowym wzorem produktów trawienia w żelu oraz siedem grup mikroorganizmów, z których każda zawierała od dwóch do dziesięciu szczepów reprezentujących układ produktów trawienia jednakowy w obrębie każdej grupy (Fot. II-13 – górny żel). Następnie, szczepy reprezentujące powtarzające się wzory, poddano analizie RAPD celem przeprowadzenia dokładniejszego różnicowania wewnątrz grupy. W ten sposób, do identyfikacji gatunkowej poprzez analizę sekwencji genu

16S rDNA, wybrano 30 szczepów, których identyfikacja umożliwiła zidentyfikowanie pozostałych 16 szczepów.

W ten sposób spośród 30 identyfikowanych izolatów rozpoznano obecność 11 rodzajów spośród których łącznie wyodrębniono 17 różnych gatunków. 16 szczepów zaklasyfikowano do rodzaju *Pseudomonas*. W obrębie tego rodzaju często opisywane są szczepy promujące wzrost roślin, zwłaszcza gatunki *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas putida* [de Melo Pereira i wsp., 2012; Asis i Adachi, 2003; Surette i wsp., 2003], których reprezentanci zostali wyizolowani również w toku opisywanych analiz. Kolejnym często izolowanym taksonem jest *Pantoea agglomerans* oraz gatunki *Bacillus cereus*, *Bacillus simplex* i *Bacillus megaterium* oraz inne *Bacillus* sp.

Przeprowadzenie identyfikacji gatunkowej umożliwiło wskazanie szczepów patogennych dla roślin (*Erwinia billingiae* 56/MR, *Erwinia rhapontici* 189/PR i *Rhodococcus* sp. 102/TR) lub oportunistycznie patogennych dla ludzi (wszystkie szczepy z rodzaju *Pantoea* sp.), co wyklucza sens dalszego rozważania możliwości stosowania tych szczepów jako składników przyszłej wieloskładnikowej bioszczepionki wspomagającej rozwój upraw roślin jagodowych. Największą bioróżnorodnością mikroflory charakteryzują się populacje izolowane z czarnych porzeczek oraz truskawek. W przypadku porzeczek szczepy potencjalnie promujące wzrost roślin należą do rodzajów *Pseudomonas* (5 szczepów) i *Agrobacterium* (3 szczepy); dodatkowo zidentyfikowano po jednym szczepie z rodzaju *Pantoea* sp., *Variovorax* sp., *Chryseobacterium* sp., *Lysobacter* sp. i *Erwinia* sp. Najczęściej pozytywnie selekcjonowane szczepy z truskawek przynależą do rodzaju *Pantoea* sp. (5 szczepów), *Bacillus* sp. (4 szczepy) i *Pseudomonas* sp. (2 szczepy), a bioróżnorodność mikroflory tych upraw została oceniona jako zróżnicowana ze względu na zidentyfikowanie w tej populacji również pojedynczych reprezentantów *Agrobacterium* sp., *Variovorax* sp., *Paenibacillus* sp. i *Rhodococcus* sp. Około połowę szczepów analizowanych genetycznie stanowiły szczepy izolowane z malin, jednak zróżnicowanie taksonomiczne mikrobioty tej populacji jest zdominowane przez szczepy *Pseudomonas* sp. (9 szczepów) i *Bacillus* sp. (4 szczepy). Pojedyncze izolaty zaklasyfikowano do *Pantoea* sp., *Variovorax* sp. i *Erwinia* sp.

Od strony przynależności rodzajowej szczepy ryzosferowe, mimo pozytywnych wyników na etapie selekcji, nie rokują jako składniki bioszczepionki ze względu na przynależność do fitopatogenicznego rodzaju *Erwinia* sp. (2 szczepy) lub rodzaju oportunistycznie patogennego dla człowieka *Pantoea* sp. (7 szczepów). Po 3 szczepy zaklasyfikowano do *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. Endofityczna mikroflora korzeniowa reprezentowana była głównie przez szczepy z rodzaju *Pseudomonas* sp. (10 szczepów) i *Bacillus* sp. (5 szczepów).

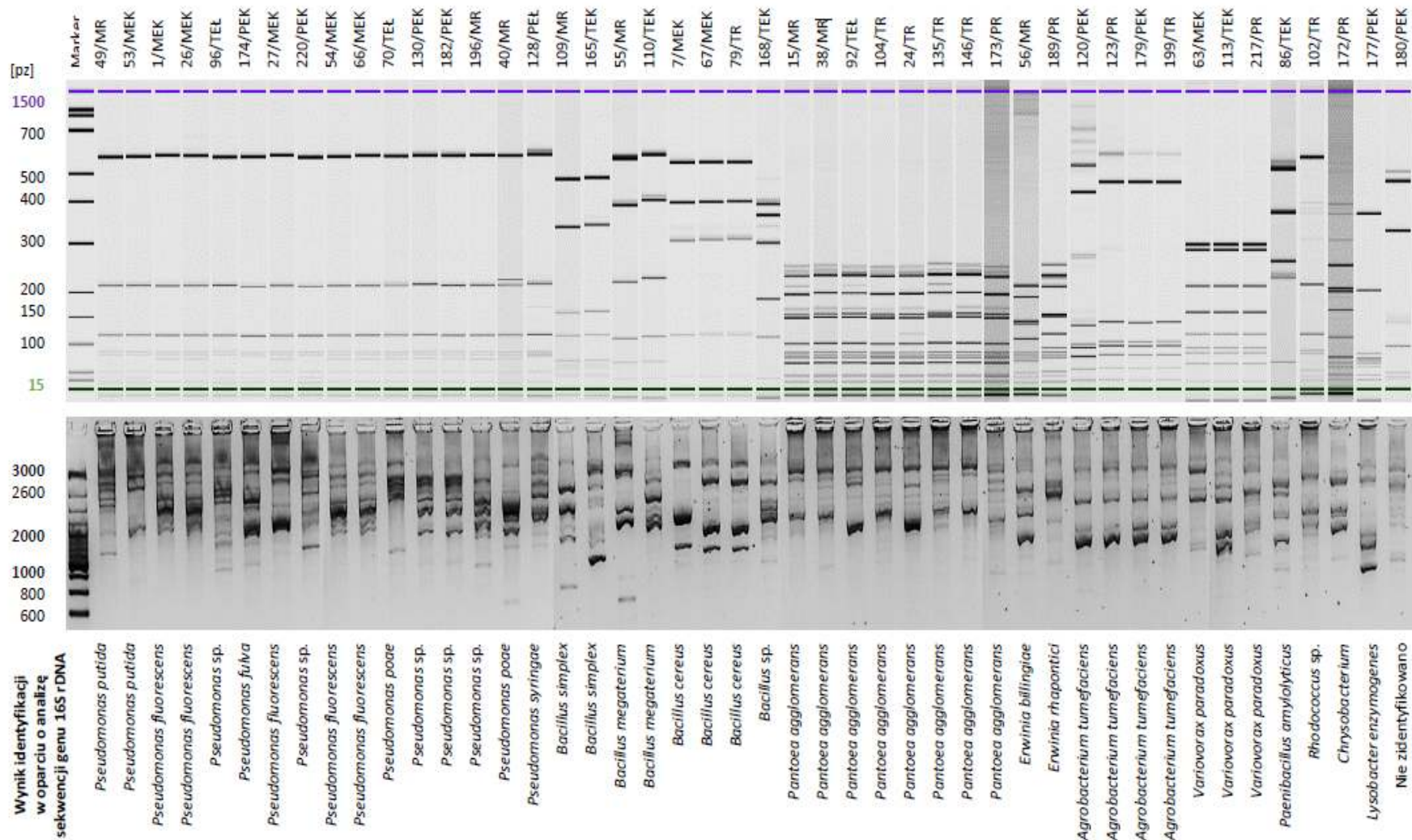


Foto II-13. Typowanie i różnicowanie molekularne szczepów endofitycznych i ryzosferowych odpowiednio metodą RFLP genu 16S rDNA z zastosowaniem enzymów HaeIII i HinfI (górny żel) oraz RAPD (dolny żel). Podano oznaczenia szczepów oraz wynik identyfikacji genetycznej.

Nowa szczepionka dedykowana dla roślin jagodowych

Skład podłoża produkcyjnego

Podczas opracowywania składu bioszczepionki przeznaczonej do stosowania w uprawach roślin jagodowych główną rolę odgrywają dwa aspekty: pozyskanie odpowiedniej jakości mikroorganizmów, które prócz cech bezpośrednio wpływających na promowanie wzrostu roślin jak np. produkcja fitohormonów, będą posiadały właściwości pożądane wśród mikroorganizmów produkcyjnych takie jak: stabilność cech, zdolność mikroorganizmów do wzrostu w aparaturze przemysłowej, produktywność, łatwość wydzielania produktu, brak toksycznych produktów metabolizmu oraz odpowiedni dobór podłoża hodowlanego. Odpowiedni dobór podłoża jest bardzo ważny, ponieważ powinno ono zapewnić dostateczną ilość substancji odżywczych do wzrostu mikroorganizmów oraz stabilne środowisko umożliwiające im przeżywalność przez określony czas. Biorąc pod uwagę ostateczną skalę procesu produkcji bioszczepionki, do namnażania najlepiej jest zastosować odpad z przemysłu rolno-spożywczego uwzględniając aspekty ekologiczne i ekonomiczne procesu. Odpady z przemysłu rolno-spożywczego charakteryzują się wysoką zawartością substancji organicznych i mineralnych niezbędnych do wzrostu bakterii. Wykorzystywanie tego typu materiałów jako głównego składnika podłoża produkcyjnego jest trudne ze względu na skład, który nie jest w pełni powtarzalny, a zależy od pochodzenia surowców oraz warunków klimatycznych. Głównymi substratami stosowanymi w podłożach produkcyjnych jako źródło węgla są melasa, syropy glukozowe (odpady przemysłu cukrowniczego), serwatka (odpad przemysłu mleczarskiego) oraz odpady zbożowe. Melasa oraz syropy glukozowe zawierają ok. 2% związków azotowych. Jako dodatkowe źródło azotu mogą być stosowane wytloki sojowe, mączka rybna oraz namok kukurydziany, które w przypadku problemów ze wzrostem szczepów stanowią dodatkowe źródło witamin, aminokwasów oraz soli mineralnych.

Wybór szczepów o największym potencjale biotechnologicznym

Szereg przeprowadzonych analiz umożliwiający określenie licznych cech biochemicznych oraz przynależności gatunkowej uzyskanych izolatów bakteryjnych pozwolił na wyodrębnienie trzech szczepów o najbardziej korzystnych cechach. Szczep *Pseudomonas putida* 49/MR, wyizolowany ze strefy ryzosferowej maliny oraz szczep *P. putida* 53/MEK endofit wyizolowany z korzeni maliny. Gatunek ten jest dość szeroko opisywany w literaturze, między innymi badania Glick i innych polegające na wyciszeniu genu deaminazy ACC u *Pseudomonas putida* w celu porównania wpływu oddziaływania mutanta

na promowanie wzrostu roślin w stosunku do szczepu dzikiego, potwierdziły, iż bakterie *Pseudomonas putida* wpływają korzystnie na ukorzenie oraz długość pędów roślin [Glick i wsp., 1997]. Szczep oznaczony jako nr 177/PEK endofit wyizolowany z korzeni czarnej porzeczki został zidentyfikowany jako *Lysobacter enzymogenes*. Jego zdolności do zwalczania chorób roślin zostały opisane stosunkowo niedawno [Sullivan i wsp., 2003; Folman i wsp., 2003]. Do tej pory najlepiej zarówno pod względem biologicznym jak i molekularnym scharakteryzowany został szczep *Lysobacter enzymogenes* C3, który wykazuje szereg mechanizmów wykazujących reakcje antagonistyczne wobec patogenów [Kilic-Ekici i wsp., 2004] oraz kontrolę biologiczną. Szczep ten wytwarza szereg zewnątrzkomórkowych enzymów, które zwiększają jego aktywność biologiczną, w tym wiele form beta-1,3-glukanaz i chitynaz [Palumbo i wsp., 2005; Zhang i wsp., 2001].

Hodowle bioreaktorowe

Po wyborze mikroorganizmów oraz doborze odpowiedniego podłoża hodowlanego kolejnym etapem prac nad nową bioszczepionką jest rozpoczęcie hodowli bioreaktorowych (Fot. II-14). Badania te mają na celu określenie optymalnych parametrów procesu produkcji bioszczepionki takich jak: temperatura, pH, szybkość mieszania, napowietrzanie, ciśnienie oraz objętość cieczy. W czasie hodowli, oprócz ciągłej kontroli warunków fizyko-chemicznych procesu, cyklicznie pobierane są próbki hodowli. Następnie próbki poddawane są analizom mikrobiologicznym oraz chemicznym. Badania te mają na celu określenia liczby i żywotności mikroorganizmów, stopnia zużycia substancji pokarmowych oraz produkcji metabolitów czyli monitorowanie składu podłoża hodowlanego. W trakcie hodowli bakteryjnych ważny jest monitoring wzrostu drobnoustrojów na przykład poprzez pomiary gęstości optycznej – analiza spektrofotometryczna oraz kontrola liczby żywych mikroorganizmów w hodowli. Kontrola liczby żywych mikroorganizmów w hodowli może być wykonywana za pomocą tradycyjnych metod - posiewy mikrobiologiczne oraz przy użyciu nowoczesnych metod takich jak analiza cytometryczna. Cytometria przepływowa umożliwia szybką ocenę kondycji dużej liczby mikroorganizmów na podstawie intensywności zabarwienia oraz sygnału fluorescencji emitowanego przez odpowiednio wybarwione komórki drobnoustrojów.



Fot. II-14. Przykładowa hodowla bioreaktorowa (21) zawierająca podłoże melasowe.

Skład nowej szczepionki dedykowanej dla roślin jagodowych

Izolaty bakteryjne

Na podstawie zebranych danych literaturowych oraz badań własnych proponuje się by w skład nowej szczepionki dedykowanej do promowania roślin jagodowych wchodziły poniższe izolaty:

1. *Pseudomonas putida* 49/MR;
2. *Pseudomonas putida* 53/MEK;
3. *Lysobacter enzymogenes* 177/PEK.

Wytyczne dotyczące sposobu przygotowania inokulum do hodowli bioreaktorowych: szczepy należy przygotowywać oddzielnie, każdy na podłożu płynnym LB i inkubować w temperaturze 28°C przez 24h. Zaszczepkę stanowi mieszanina izolatów w stosunku równym 1:1:1, której objętość wynosi 10% końcowej objętości bioreaktora.

Skład podłoża hodowlanego

1. 4% melasa buraczana,
2. 1% inulina,
3. Woda demineralizowana.

Podłoże hodowlane należy sterylizować, ponieważ mikroflora autochroniczna pochodząca z poszczególnych składników proponowanego podłoża produkcyjnego może ograniczać wzrost wytypowanych izolatów. Inulina jako polisacharyd będzie stanowiła dodatkowe źródło węgla dla wzrostu szczepów bakteryjnych.

Kontrola warunków hodowli:

- Temperatura hodowli: 28°C,
- Szybkość mieszania: 60 rpm,
- pH 7,0 – regulacja za pomocą 0,5M H₂SO₄ lub 1M KOH.

Literatura:

- Asis C.A., Adachi K.: Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph
- Bogumił A., Sas Paszt L., Lisek A., Trzciński P., Harbuzová A.: Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Hort.* 2013, 25/2:123-132.
- de Melo Pereira G.V., Magalhães K.T., Lorenzetti E.R., Souza T.P., Schwan R.S.: A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacteria in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. *Microb Ecol* 2012, 63:405–417.
- Dias A.C.F., Costa F.E.C., Andreote F.D., Lacava P.T., Teixeira M.A., Assumpção L.C., Araújo W.L., Azevedo J.L., Melo I.S.: Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J Microbiol Biotechnol* 2009, 25:189–195.
- *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 2003, 38:19-23.
- Folman L.B., Postma J., van Veen J.A.: Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. *Microbiological Research* 2003, 158:107-115.
- Glick Bernard R, Changping Liu, Sibdas Ghosh, Erwin B Dumbroff: Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Soil Biology and Biochemistry* Volume 29, Issue 8, August 1997, Pages 1233–1239.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kloepper J. W.: Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 1997, 43:895-914.
- Kilic-Ekici O., Yuen G.Y.: Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. *Biological Control* 2004, 30:446-455.
- Kuklinsky-Sobral J., Araújo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner A.L., Azevedo J.L.: Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ Microbiol* 2004, 12:1244–1251.
- Li C-H, Zhao M-W, Tang C-M, Li S-P: Population dynamics and identification of endophytic bacteria antagonistic toward plant-pathogenic fungi in cotton root. *Microb Ecol* 2010, 59:344–356.
- Palumbo J.D., Yuen G.Y., Jochum C.C., Tatum K., Kobayashi D.Y.: Mutagenesis of β -1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward *Bipolaris* leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugar beet. *Phytopathology* 2005, 95:701-707.
- Powell K.A., Jutsum A.R.: Technical and commercial aspects of biological control products. *Pestic Sci* 1993, 37: 315-321.
- Rosenblueth M., Martínez-Romero E.: Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microb Interact* 2006, 19:827–837.
- Schwyn B., Neilands J.B.: Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 1987, 160s. 47-56.
- Sullivan R.F., Holtman M.A., Zylstra G.J., White J.F., Kobayashi D.Y.: Taxonomic positioning of two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter*

enzymogenes based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid composition and phenotypic characteristics. Journal of Applied Microbiology 2003, 94:1079-1086

- Surette M.A., Sturz A.V., Lada R.R., Nowak J.: Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. Plant Soil 2003, 253:381-390.
- Zaidi S., Usmani S., Singh B.R., Musarrat J.: Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. Chemosphere 2006, 64:991–997.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W.: A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 2000, 7: 203-14.
- Zhang Z., Yuen G.Y., Sarath G., Penheiter A.R.: Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Phytopathology 2001, 91:204-211.

Podzadanie III

Ocena składu chemicznego ekstraktów roślinnych z preparatami mikrobiologicznymi stosowanych do ochrony roślin ekologicznych.

Badania w ramach projektu obejmowały przeprowadzenie analizy porównawczej niskocząsteczkowych związków wykazujących aktywność biologiczną (m.in. związków polifenolowych, terpenoidowych itp.) w preparatach ochrony roślin na bazie ekstraktów roślinnych wykorzystanych na ekologicznych plantacjach owoców jagodowych tj. truskawki, maliny oraz czarnej porzeczki, analizę porównawczą składu chemicznego naturalnych środków ochrony roślin w chwili ich sporządzenia oraz w trakcie przechowywania w kontrolowanych warunkach testu starzeniowego, analizę porównawczą składu chemicznego roślin poddanych działaniu naturalnych środków ochrony roślin oraz analizę zawartości metali ciężkich występujących w naturalnych preparatach ochrony roślin.

Cel analizy:

- Chromatograficzna analiza związków organicznych zawartych w przekazanych do badań naturalnych preparatach ochrony roślin oraz owocach poddanych ich działaniu (malina porzeczka, truskawka)
- Analiza zawartości wybranych metali ciężkich wchodzących w skład naturalnych preparatów ochrony roślin

Opis materiału badawczego:

Zawarte w dalszej części sprawozdania z podzadania III oznaczenia odnoszą się do następujących materiałów badawczych:

NATURALNE ŚRODKI OCHRONY ROŚLIN:

1. EKSTRAKT #1 – Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania dogłębowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II;

2. EKSTRAKT #2 – Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawkach 5 i 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego;
3. EKSTRAKT #3 – Fermentowany ekstrakt na bazie granulatu z wrotyczu z PM w dawkach 5 i 10 kg granulatu na 1 ha do stosowania doglebowego i dolistnego;
4. EKSTRAKT #4 – Preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i fermentowany ekstrakt z pokrzywy z PM do stosowania dolistnego;
5. EKSTRAKT #5 – Preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego z PM do stosowania dolistnego;
6. EKSTRAKT #6 – Preparat „Ema5 z wrotyczem” stosowany doglebowo i fermentowany ekstrakt z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM do przemiennego stosowania dolistnego.

MATERIAŁ ROŚLINNY (OWOCE):

1. MALINA #1 – owoce maliny niepoddane działaniu środka ochrony roślin (materiał odniesienia);
2. MALINA #2 – owoce maliny poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II);
3. MALINA #3 – owoce maliny poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego);
4. MALINA #4 – owoce maliny poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM zastosowany na początku wegetacji doglebowo, a w kolejnych zabiegach dolistnie);
5. MALINA #5 – owoce maliny poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce

- 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego);
6. PORZECZKA #1 - owoce porzeczki niepoddane działaniu środka ochrony roślin (materiał odniesienia);
 7. PORZECZKA #2 – owoce porzeczki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II);
 8. PORZECZKA #3 – owoce porzeczki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego);
 9. PORZECZKA #4 – owoce porzeczki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy do stosowania doglebowego i dolistnego);
 10. PORZECZKA #5 – owoce porzeczki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego);
 11. TRUSKAWKA #1 - owoce truskawki niepoddane działaniu środka ochrony roślin (materiał odniesienia);
 12. TRUSKAWKA #2 – owoce truskawki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat mikrobiologiczny z wrotyczem o nazwie „Ema5 z wrotyczem” produkowany w firmie EM-Farming Podstawka Sebastian do stosowania doglebowego i dolistnego w dawkach 10 l i 15 l na 1 ha, dopuszczony do stosowania w rolnictwie ekologicznym na podstawie rozporządzenia Komisji (WE) nr 889/2008 z dnia 5 września 2008 roku zał. nr II);
 13. TRUSKAWKA #3 – owoce truskawki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego);

14. TRUSKAWKA #4 – owoce truskawki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM zastosowany na początku wegetacji doglebowo, a w kolejnych zabiegach dolistnie);
15. TRUSKAWKA #5 – owoce truskawki poddane działaniu środka ochrony roślin (Preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów (PM) do stosowania doglebowego i dolistnego).

Przebieg badań

A. Analiza lotnych związków organicznych w badanych środkach ochrony roślin

- 1) Pobranie 2 ml próbki do naczynka zawierającego 2 ml octanu etylu.
- 2) Ekstrakcja próbki z wykorzystaniem termostатовanej łaźni ultradźwiękowej przez okres 30 min. w temperaturze 40 °C
- 3) Odwirowanie ekstraktu i poddanie supernatantu analizie chromatograficznej
- 4) Analiza jakościowa otrzymanego ekstraktu prowadzona była z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas firmy Shimadzu QP2010 wyposażonego w kolumnę chromatograficzną ZB5-MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm, pokrytą filmem fazy stacjonarnej o grubości 0,25 µm. Jako gaz nośny zastosowano hel, którego prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Temperatura dozowania wynosiła 310°C, a objętość dozowanej próbki 1 µl. Dozowanie wykonywano techniką split (czas otwarcia splitu – 0,7 min). W spektrometrze masowym wykorzystano jonizację elektronową (70 eV). Temperatura źródła jonów wynosiła 220°C. Zastosowany analizator kwadropolowy pracował w trybie SCAN. Zakres analizowanych jonów to 35 – 360 m/z, a szybkość zbierania widma 0,1 s. Identyfikację analitów prowadzono na podstawie biblioteki NIST14.

B. Analiza nielotnych związków organicznych w badanych środkach ochrony roślin

- 1) Pobranie środka ochrony roślin do naczynka i poddanie odwirowaniu w celu usunięcia stałych zanieczyszczeń.
- 2) Analiza uzyskanego supernatantu przy wykorzystaniu chromatografu cieczowego sprzężonego z detektorem MS oraz PDA. Do rozdziału chromatograficznego

wykorzystywano kolumnę Gemini C18 (4,6 x 100 mm, 3 μ m) (Phenomenex, USA). Rozdział przeprowadzono przy użyciu elucji gradientowej. Skład fazy ruchomej: składnik A – 25mM kwasu mrówkowego w wodzie, składnik B – 25mM kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Program gradientu: izokrat 3% B (5 min), od 3% do 95% B (46 min), izokrat 95% B (9 min). Całkowity czas analizy – 60 minut. Prędkość przepływu fazy ruchomej – 0,5 ml/min. Podczas wszystkich analiz zbierano w sposób ciągły widma z detektora PDA w zakresie od 190 do 600 nm, a z detektora MS od 100 do 1000 *m/z*.

C. Test starzeniowy środka ochrony roślin - analiza lotnych związków organicznych

- 1) Umieszczenie 100 ml badanej próbki w szczelnie zamkniętym naczyniu i umieszczenie go w piecu w temperaturze 50 °C na okres 2 tygodni.
- 2) Pobranie 2 ml próbki do naczynka zawierającego 2 ml octanu etylu.
- 3) Ekstrakcja próbki z wykorzystaniem termostатовanej łaźni ultradźwiękowej przez okres 30 min. w temperaturze 40 °C
- 4) Odwirowanie ekstraktu i poddanie supernatantu analizie chromatograficznej
- 5) Analiza jakościowa otrzymanego ekstraktu prowadzona była z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas firmy Shimadzu QP2010 wyposażonego w kolumnę chromatograficzną ZB5-MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm, pokrytą filmem fazy stacjonarnej o grubości 0,25 μ m. Jako gaz nośny zastosowano hel, którego prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Temperatura dozowania wynosiła 310°C, a objętość dozowanej próbki 1 μ l. Dozowanie wykonywano techniką split (czas otwarcia splitu – 0,7 min). W spektrometrze masowym wykorzystano jonizację elektronową (70 eV). Temperatura źródła jonów wynosiła 220°C. Zastosowany analizator kwadrupolowy pracował w trybie SCAN. Zakres analizowanych jonów to 35 – 360 *m/z*, a szybkość zbierania widma 0,1 s. Identyfikację analitów prowadzono na podstawie biblioteki NIST14.

D. Test starzeniowy środka ochrony roślin - analiza nielotnych związków organicznych

- 1) Umieszczenie 100 ml badanej próbki w szczelnie zamkniętym naczyniu i umieszczenie go w piecu w temperaturze 50 °C na okres 2 tygodni.

- 2) Pobranie próbki środka ochrony roślin do naczynka i odwirowanie w celu usunięcia stałych zanieczyszczeń.
- 3) Analiza uzyskanego supernatantu przy wykorzystaniu chromatografu cieczowego sprzężonego z detektorem MS oraz PDA. Do rozdziału chromatograficznego wykorzystywano kolumnę Gemini C18 (4,6 x 100 mm, 3 μ m) (Phenomenex, USA). Rozdział przeprowadzono przy użyciu elucji gradientowej. Skład fazy ruchomej: składnik A – 25mM kwasu mrówkowego w wodzie, składnik B – 25mM kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Program gradientu: izokrat 3% B (5 min), od 3% do 95% B (46 min), izokrat 95% B (9 min). Całkowity czas analizy – 60 minut. Prędkość przepływu fazy ruchomej – 0,5 ml/min. Podczas wszystkich analiz zbierano w sposób ciągły widma z detektora PDA w zakresie od 190 do 600 nm, a z detektora MS od 100 do 1000 m/z.

E. *Analiza zawartości lotnych związków organicznych w roślinach poddanych działaniu preparatów ochrony roślin*

- 1) Pobranie 2 g próbki zhomogenizowanego owocu do naczynka zawierającego 2 g octanu etylu.
- 2) Ekstrakcja próbki z wykorzystaniem termostатовanej łaźni ultradźwiękowej przez okres 30 min. w temperaturze 40 °C
- 3) Odwirowanie ekstraktu i poddanie supernatantu analizie chromatograficznej
- 4) Analiza jakościowa otrzymanego ekstraktu prowadzona była z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas firmy Shimadzu QP2010 wyposażonego w kolumnę chromatograficzną ZB5-MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm, pokrytą filmem fazy stacjonarnej o grubości 0,25 μ m. Jako gaz nośny zastosowano hel, którego prędkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Temperatura dozowania wynosiła 310°C, a objętość dozowanej próbki 1 μ l. Dozowanie wykonywano techniką split (czas otwarcia splitu – 0,7 min). W spektrometrze masowym wykorzystano jonizację elektronową (70 eV). Temperatura źródła jonów wynosiła 220°C. Zastosowany analizator kwadropolowy pracował w trybie SCAN. Zakres analizowanych jonów to 35 – 360 m/z, a szybkość zbierania widma 0,1 s. Identyfikację analitów prowadzono na podstawie biblioteki NIST14.

F. ***Analiza zawartości nielotnych związków organicznych w roślinach poddanych działaniu preparatów ochrony roślin***

- 1) Pobranie 2 g próbki zhomogenizowanego owocu do naczynka i odwirowanie cząstek stałych.
- 2) Analiza uzyskanego supernatantu przy wykorzystaniu chromatografu cieczowego sprzężonego z detektorem MS oraz PDA. Do rozdzielania chromatograficznego wykorzystywano kolumnę Gemini C18 (4,6 x 100 mm, 3 µm) (Phenomenex, USA). Rozdział przeprowadzono przy użyciu elucji gradientowej. Skład fazy ruchomej: składnik A – 25mM kwasu mrówkowego w wodzie, składnik B – 25mM kwasu mrówkowego w acetonitrylu. Program gradientu: izokrat 3% B (5 min), od 3% do 95% B (46 min), izokrat 95% B (9 min). Całkowity czas analizy – 60 minut. Prędkość przepływu fazy ruchomej – 0,5 ml/min. Podczas wszystkich analiz zbierano w sposób ciągły widma z detektora PDA w zakresie od 190 do 600 nm, a z detektora MS od 100 do 1000 m/z.

- ***Oznaczenie zawartości suchej masy metodą suszarkową w temp. 105°C***

Czyste, suche naczynko wagowe z przykrywką wstawiono do suszarki nagrzanej do temperatury 105°C ±2 °C i wysuszono. Do suchego naczynka odważono 20 g ±0,001 g homogenizowanej próbki badanego owocu. Naczynko wstawiono do suszarki nagrzanej do temperatury 105°C ±2 °C. Materiał suszono do stałej masy przenosząc go okresowo do eksykatora celem ostudzenia i zważenia. Proces wygrzewania prowadzono, aż dwa kolejne oznaczenia nie różniły się więcej niż o 0,004 g.

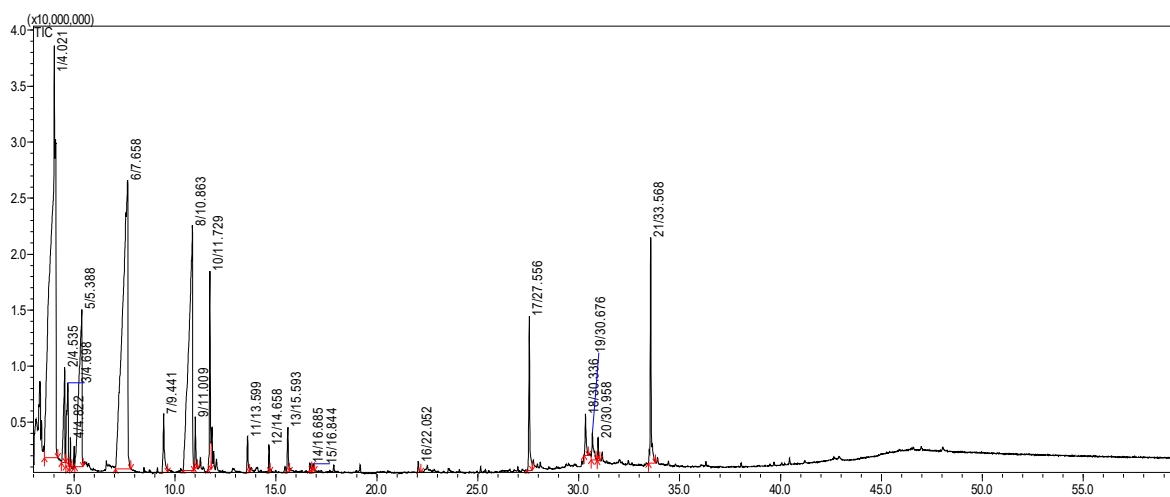
- ***Analiza zawartości wybranych metali ciężkich w badanych środkach ochrony roślin***

Badania zawartości metali ciężkich wykonano zgodnie z normami CLA/ESA/1/2014 wersja 3 z dn. 03.03.2014 oraz CLA/ASA/5/2013 wersja 4 z dn. 06.08.2013 wykorzystując w tym celu sprzężenie spektrometrii mas ze wzbudzoną indukcyjnie plazmą (ICP-MS - ang. Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry)

A. Analiza lotnych związków organicznych wchodzących w skład środków ochrony roślin

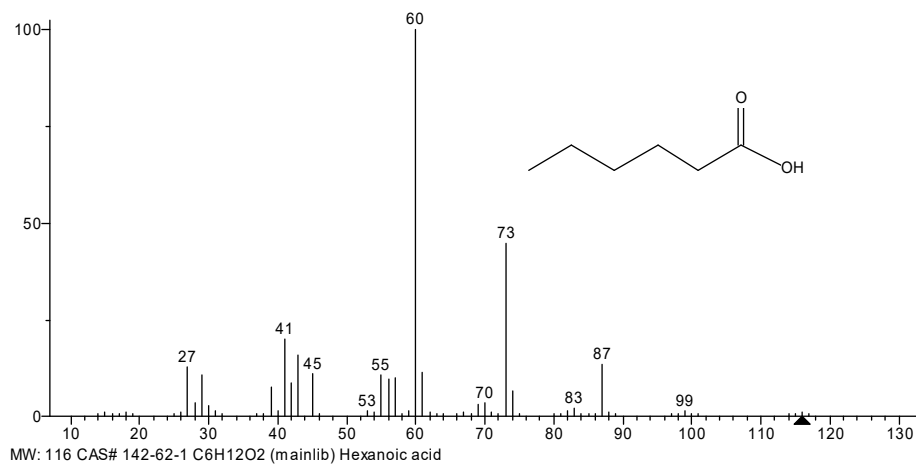
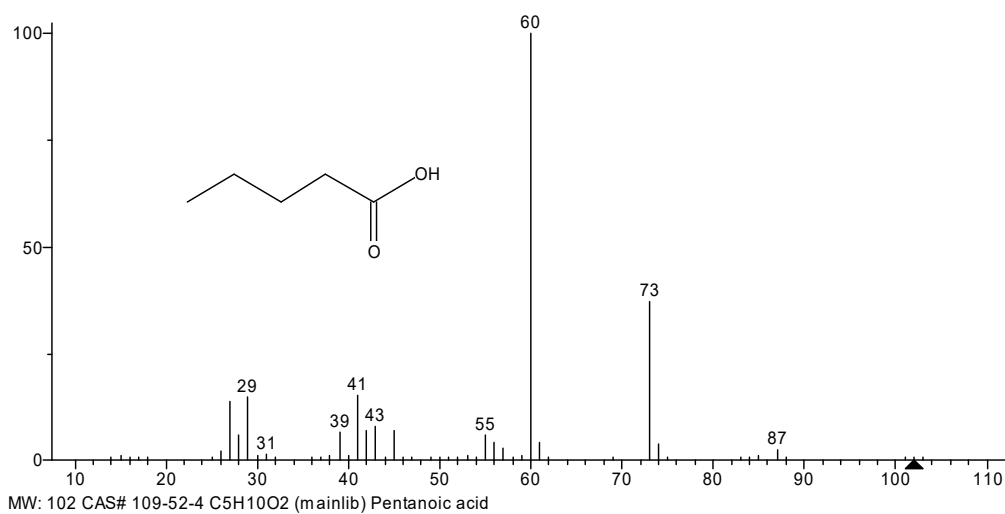
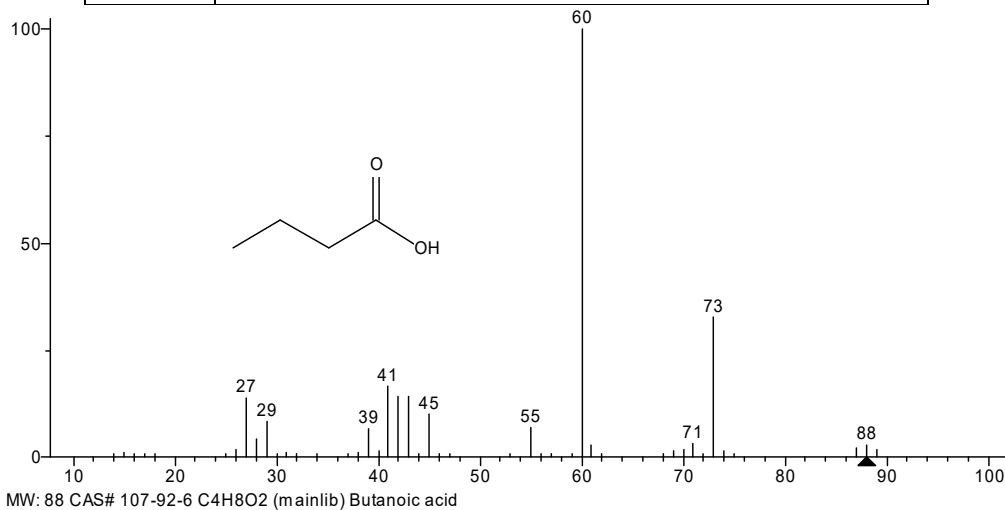
EKSTRAKT #1

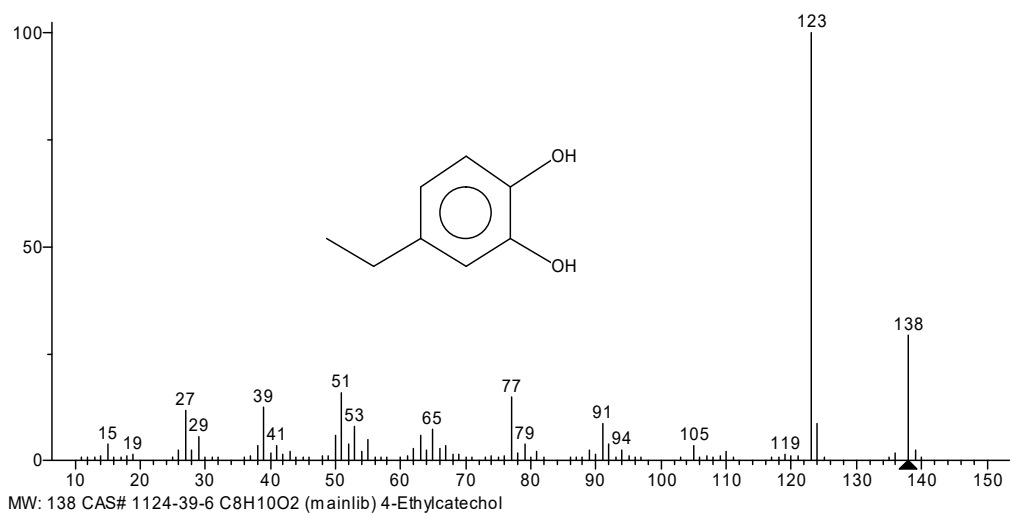
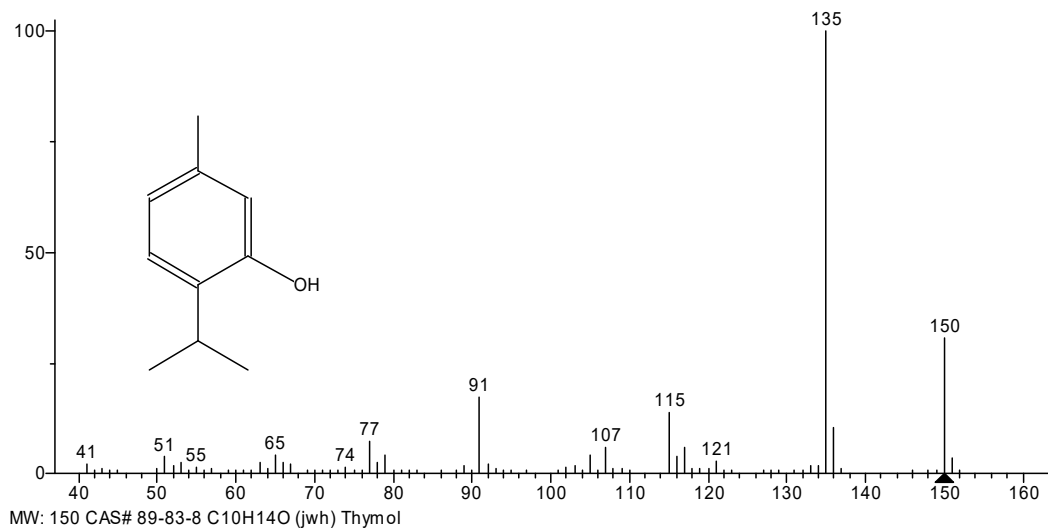
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas butanowy
2	Kwas 3-metylobutanowy
3	Kwas 2-metylobutanowy
4	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol
5	Kwas pentanowy
6	Kwas heksanowy
7	m-krezol
8	Kwas cykloheksanokarboksylowy
9	trans-chryzantenol
10	2-etylofenol
11	Kwas fenylloctowy
12	Tymol
13	Kwas hydrocynamonowy
14	4-etylokatechol
15	2-metylo-1H-indol
16	Aldehyd koniferylowy
17	Kwas pentanodekanowy

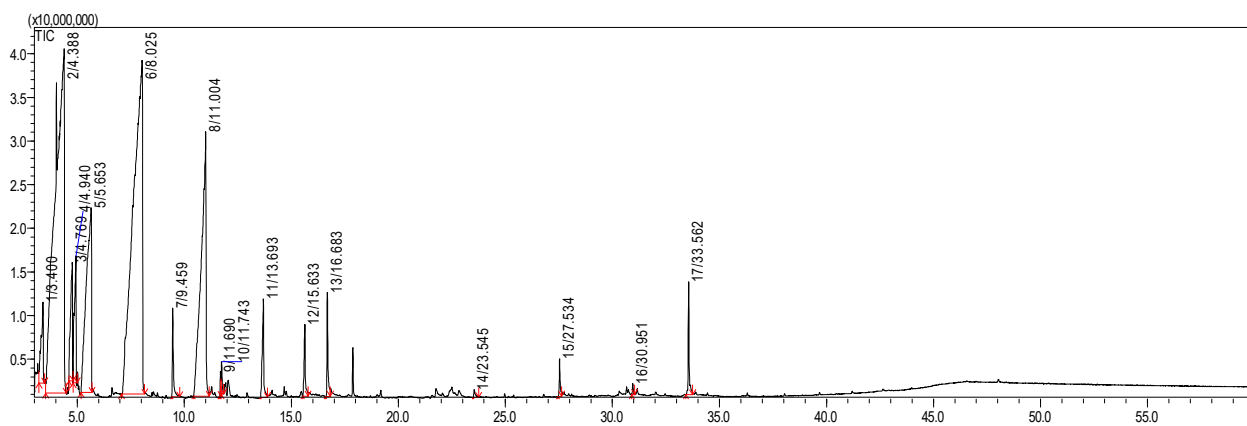
18	Kwas cis-wakceny
19	9-oktadekanamid
20	Tetradekanamid
21	cis-13-dokosenamid



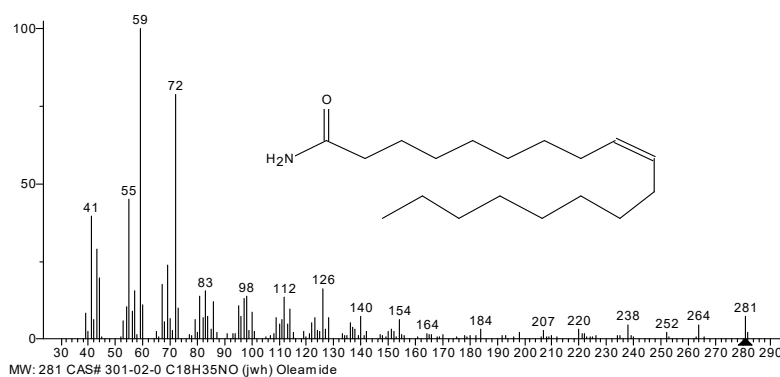
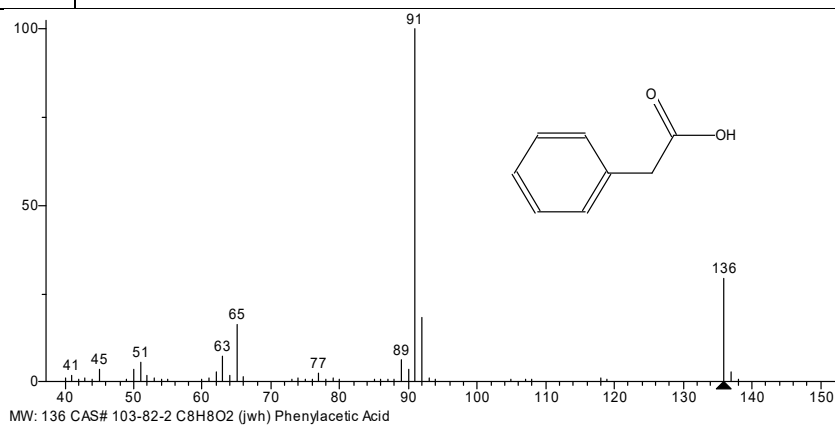


EKSTRAKT #2

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.

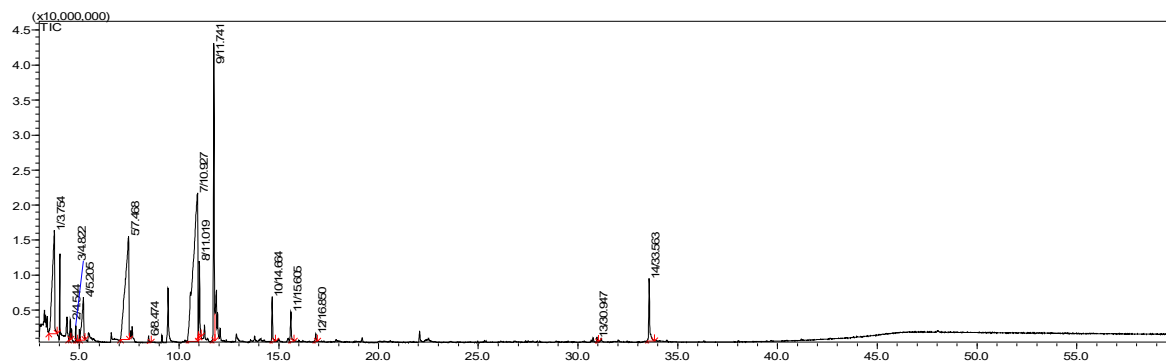


Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	3-metylo-3-pentanol
2	Kwas butanowy
3	Kwas 3-metylobutanowy
4	Kwas 2-metylobutanowy
5	Kwas 2-propylopropanowy
6	Kwas heptanowy
7	p-krezol
8	Kwas cykloheksanodekanowy
9	4-etylofenol
10	2,3-dimetylofenol
11	Kwas fenylloctowy
12	Kwas hydrocynamonowy
13	4-etylokatechol
14	7a-metylo-2,3,7,7a-tetrahydro-1H-indene-1,5(6H)-dion
15	Kwas pentadekanowy
16	Heksadekanamid
17	cis-9-oktadekanamid

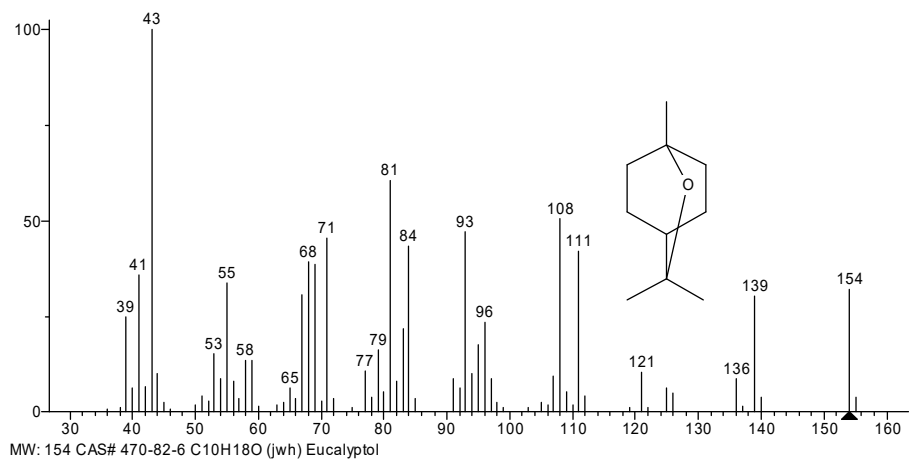


EKSTRAKT #3

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.

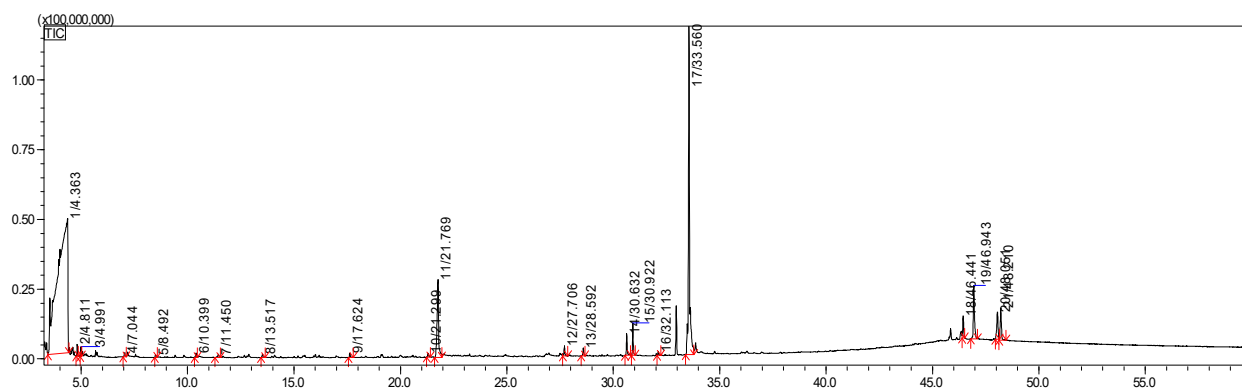


Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas butanowy
2	Kwas 2-metylobutanowy
3	2,3-dimetylo-3-buten-3-ol
4	Kwas pentanowy
5	Kwas heksanowy
6	Eukaliptol
7	Kwas cykloheksanokarboksylowy
8	2,2,4-trimetylo-3-cykloheksene-1-karbaldehyd
9	2,3-dimetylofenol
10	Tymol
11	Kwas hydrocynamonowy
12	3-metyloindol
13	Tetradekanamid
14	cis-9-oktadekanamid



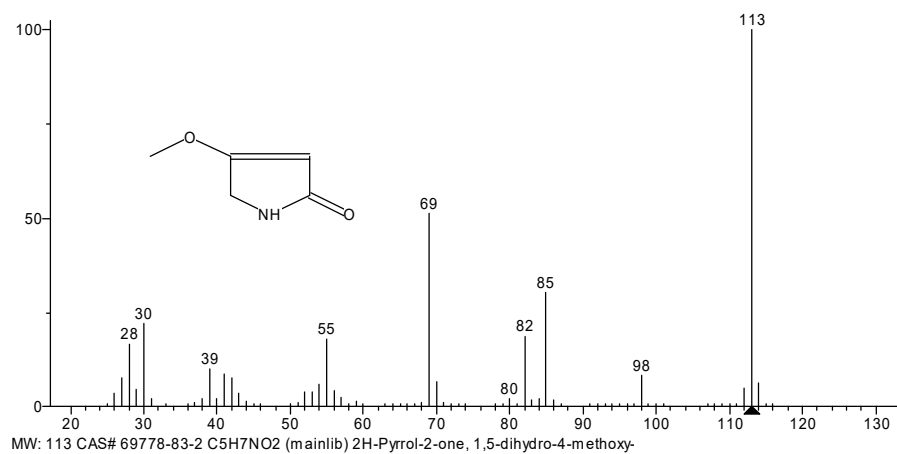
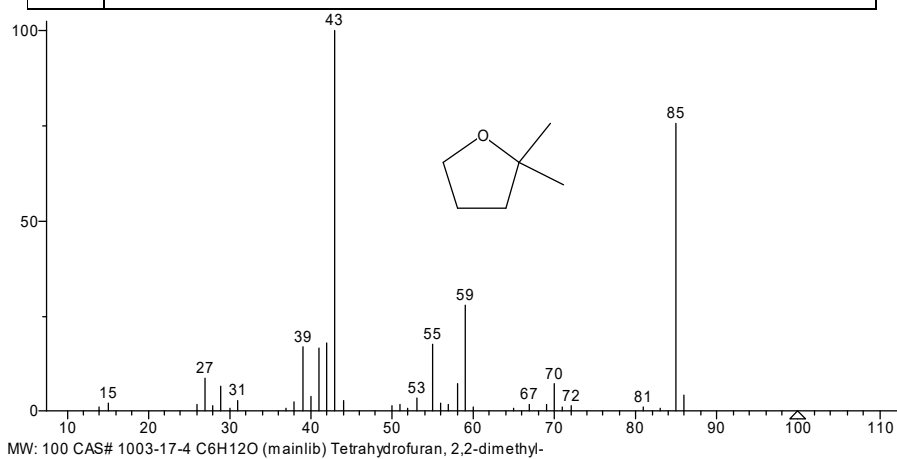
EKSTRAKT #4

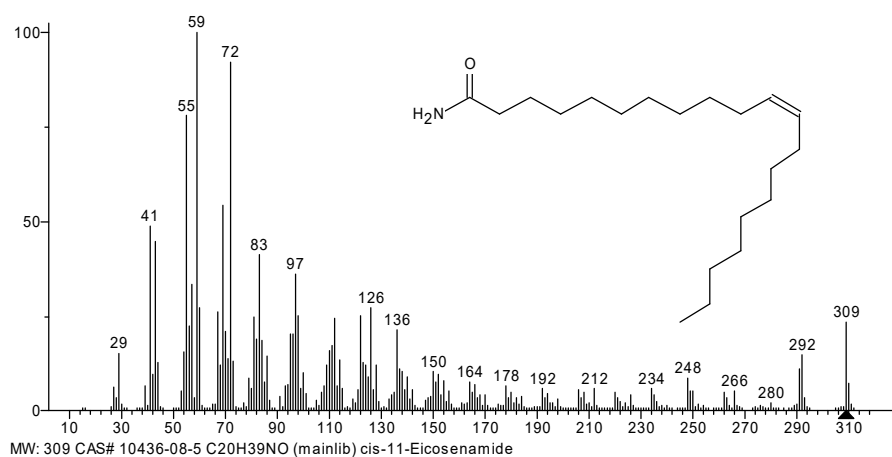
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	(S)-2,3-dihydroksypropanal
2	2,3-dimetyloterahydrofuran
3	1,5-dihydro-4-metoksy-2H-pirol-2-on
4	Kwas heksanowy
5	Alkohol benzylowy
6	Kwas cykloheksanokarboksylowy
7	Kwas benzoesowy
8	Kwas fenylloctowy
9	3,4-dimetoksyfenol-
10	3,4,5-trimetoksyfenol
11	Kwas 3-(3-hydroksyfenilo)-propanowy

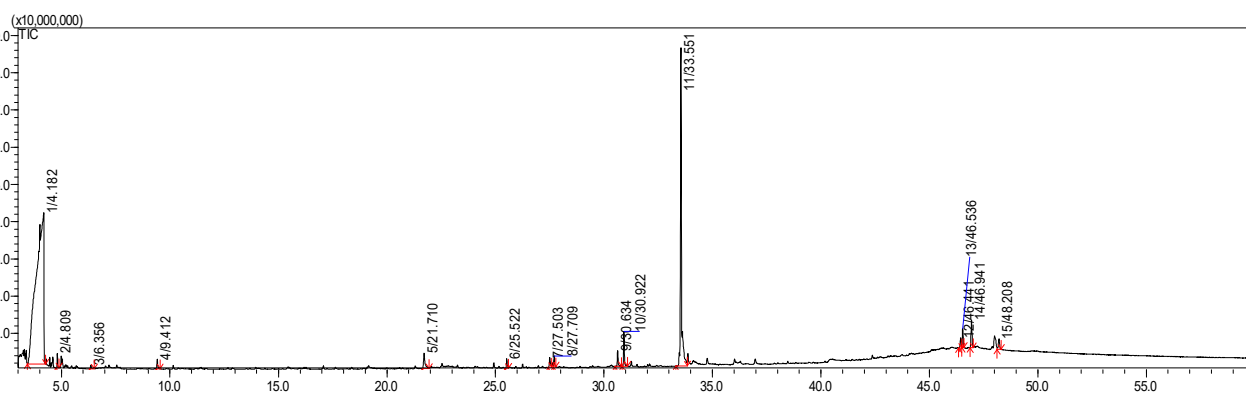
12	Tetradekanamid
13	Ilangenol
14	cis-13-dokosenamid
15	Oktadekanamid
16	cis-13-dokosenamid
17	cis-11-eicosenamid
18	beta-oktanolean-12-en-3-ol
19	24-norursa-3,12-dien
20	A'-Neogammacer-22(29)-en-3-one
21	Octan aldehydu betulinowego





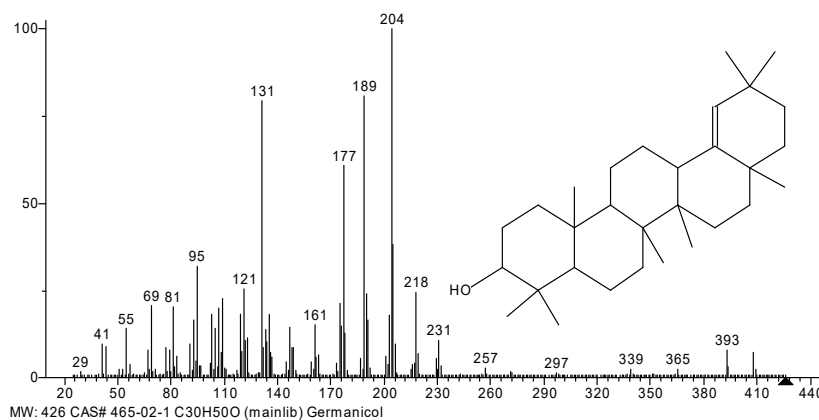
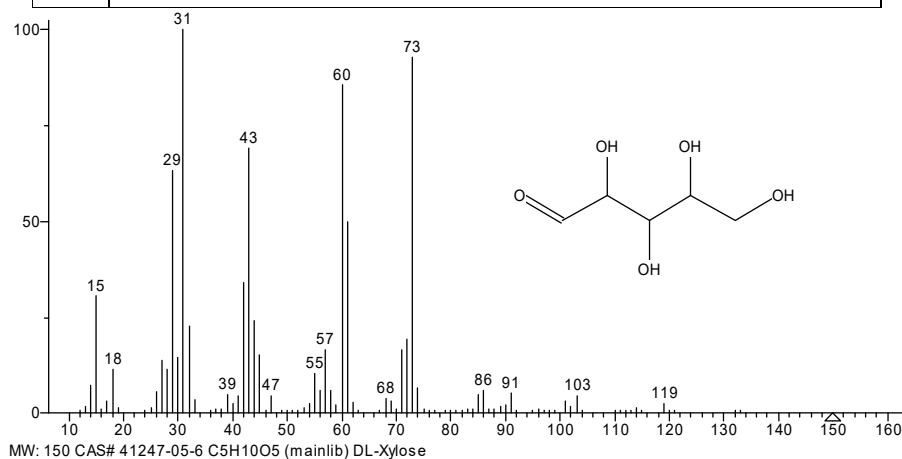
EKSTRAKT #5

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.



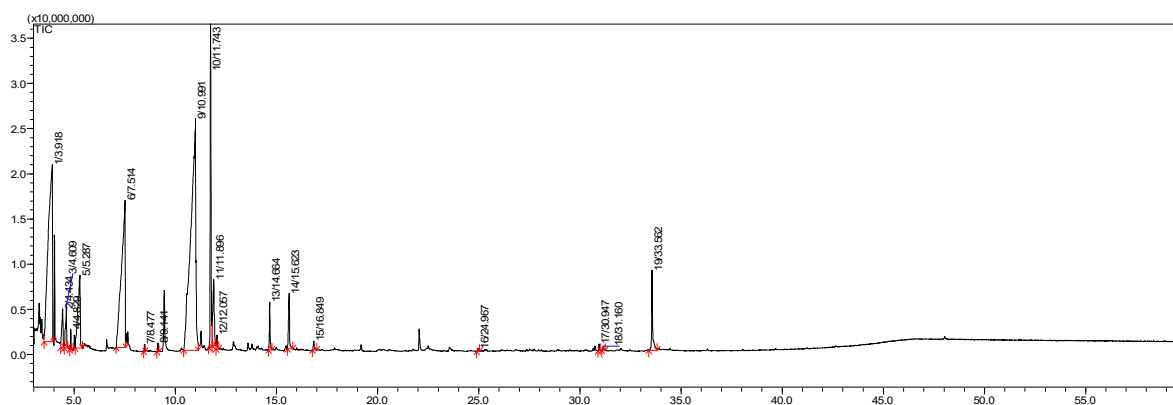
Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Ksyloza
2	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol
3	Kwas 4-metylo walerianowy
4	p-krezol
5	Kwas 3-(3-Hydroksyfenylo)propanowy
6	Neofitadien
7	Kwas pentanodekanowy
8	Tetradekanamid
9	cis-oktadekanamid
10	Steramid
11	cis-13-dokosenamid

12	beta oktanamyrenyl
13	Germanikol
14	24-Norursa-3,12-dien
15	Octan aldehydu betulinowego

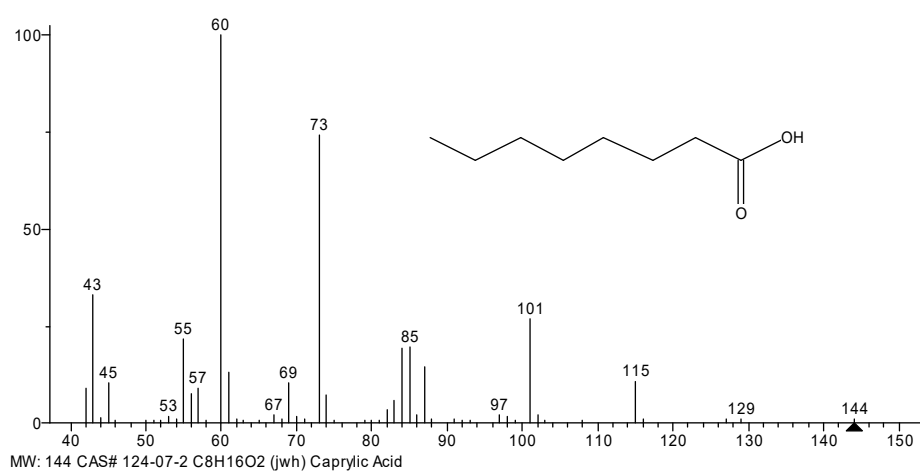


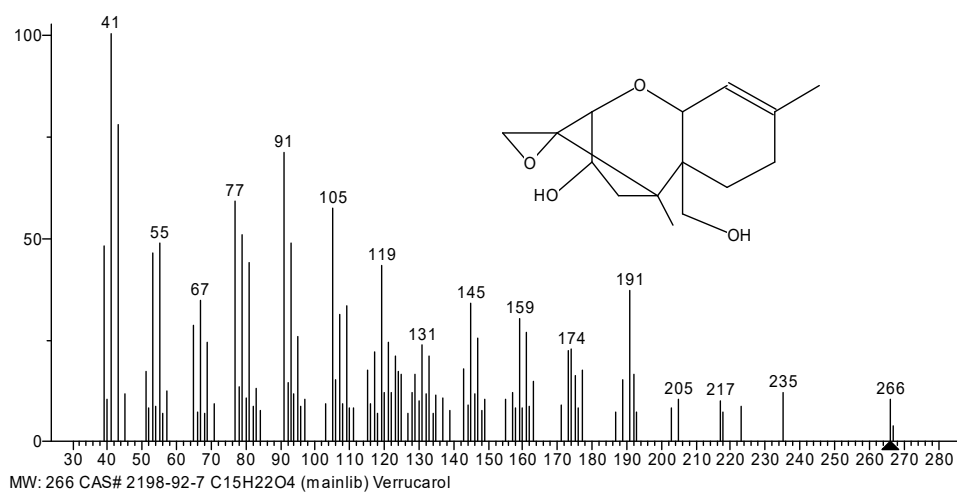
EKSTRAKT #6

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane analyty oraz wybrane widma masowe.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas butanowy
2	Kwas 3-metylobutanowy
3	Kwas 2-metylobutanowy
4	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol
5	Kwas pentanowy
6	Kwas heksanowy
7	Eukaliptol
8	3,3,6-trimetylo-1,5-heptadien-4-on
9	Kwas cykloksnokarboksylowy
10	2,3-dimetylofenol
11	Kwas oktanowy
12	4-metylo-1-(1-metyloetylo)-3-cykloheksen-1-ol
13	Tymol
14	Kwas hydrocynamonowy
15	3-metyloindol
16	trans-2-fenylo-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftol
17	Heksadekanamid
18	Werrukarol
19	cis-9-oktadekenamid

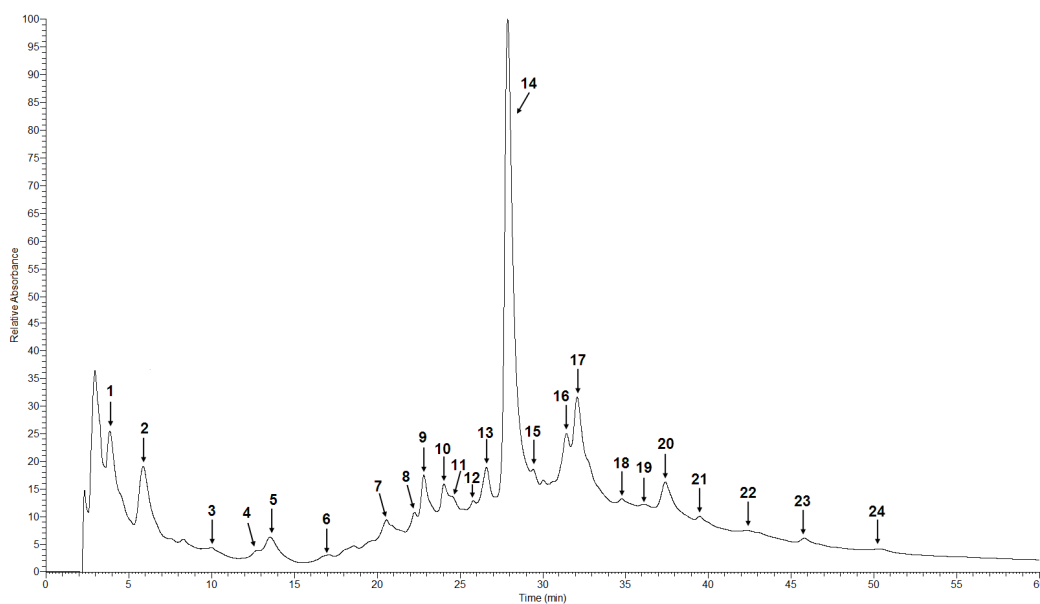




B. Analiza nielotnych związków organicznych wchodzących w skład środków ochrony roślin

EKSTRAKT #1

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.

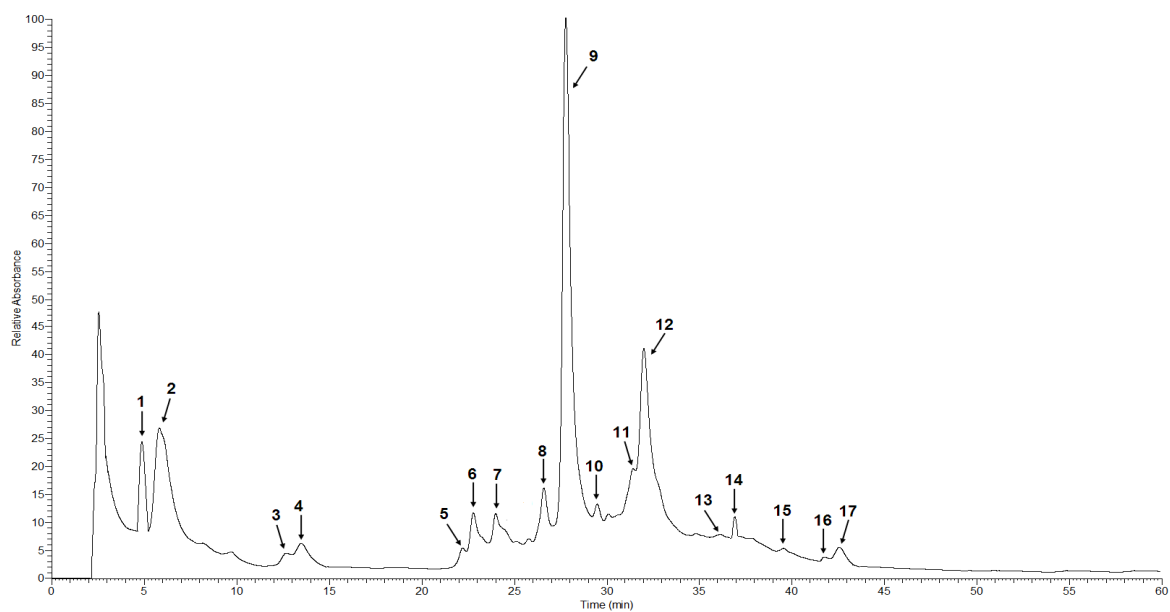


Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas fumarowy
2	Kwas galusowy
3	Kwasu kawowego pentozyd
4	Katechina
5	Kwas wanilinowy

6	Kwasu kawowego heksozyd
7	Apigetryna
8	Kwas chlorogenowy
9	Kwas kawowy
10	Kwercetyny pentozyloheksocyd izomer 1
11	Kwercetyny pentozyloheksocyd izomer 2
12	Ester melaninowy kwasu kawowego
13	Kwas p-kumarowy
14	Kwas ferulowy
15	Jaceozydyna
16	Rutyna
17	Eupatuliny glukozyd
18	Apigenina
19	Diosmetyna
20	Akacetyna
21	Jaceidyna
22	Eupatylina
23	Kwas taninowy

EKSTRAKT #2

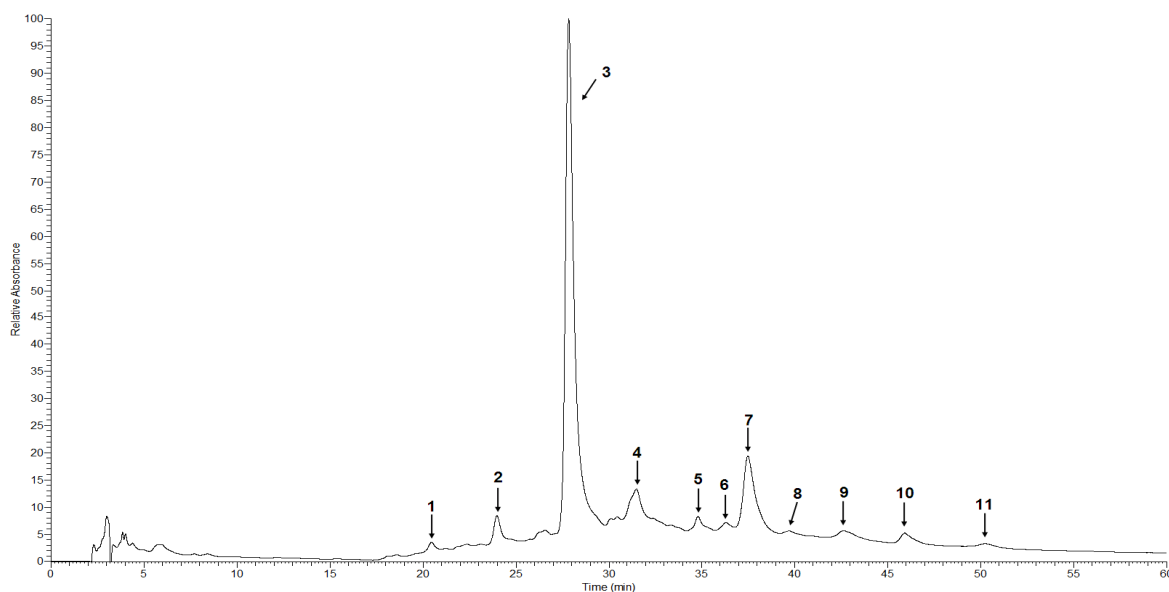
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas fumarowy
2	Kwas galusowy
3	Katechina
4	Kwas wanilinowy
5	Kwas chlorogenowy
6	Kwas kawowy
7	Kwas syringowy
8	Ester melaninowy kwasu kawowego
9	Kwas p-kumarowy
10	Kwas ferulowy
11	Naringenina
12	Rutyna
13	Kwas elagowy
14	Miricetyna
15	Kwercetyna
16	Kemferol
17	Izoharmetyna

EKSTRAKT #3

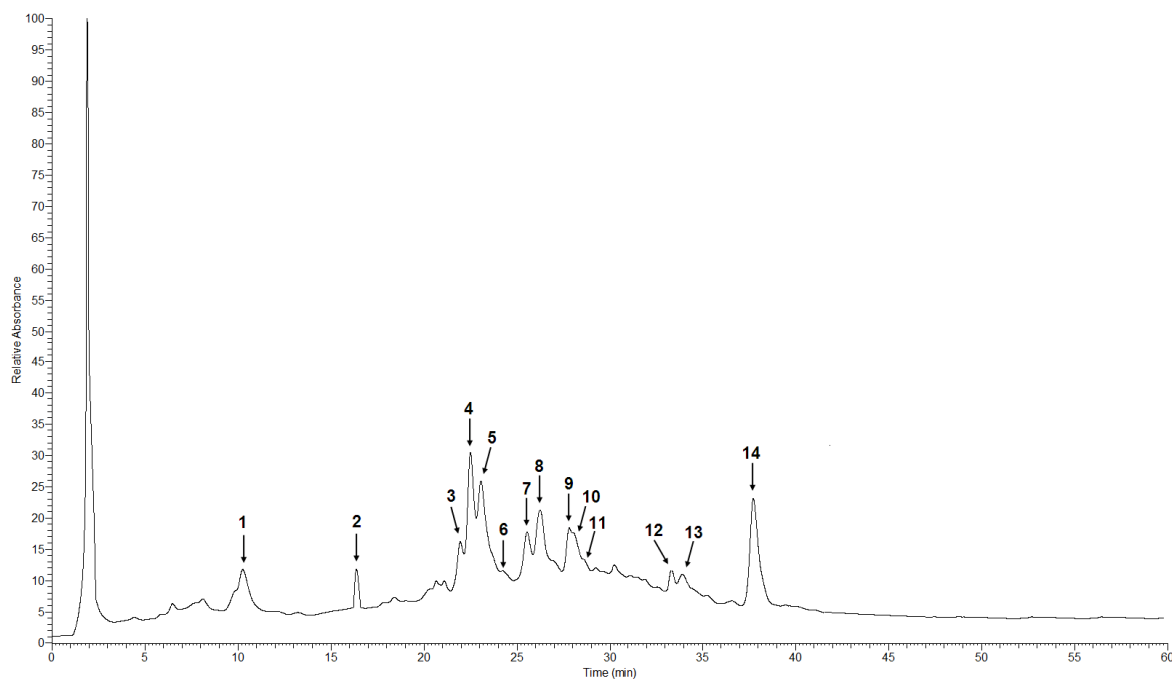
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Apigetryna
2	Diosmina
3	Kwas p-kumarowy
4	Jaceozydyna
5	Eupatuliny glukozyd
6	Apigenina
7	Diosmetyna
8	Akacetyna
9	Jaceidyna
10	Eupatylina
11	Kwas taninowy

EKSTRAKT #4

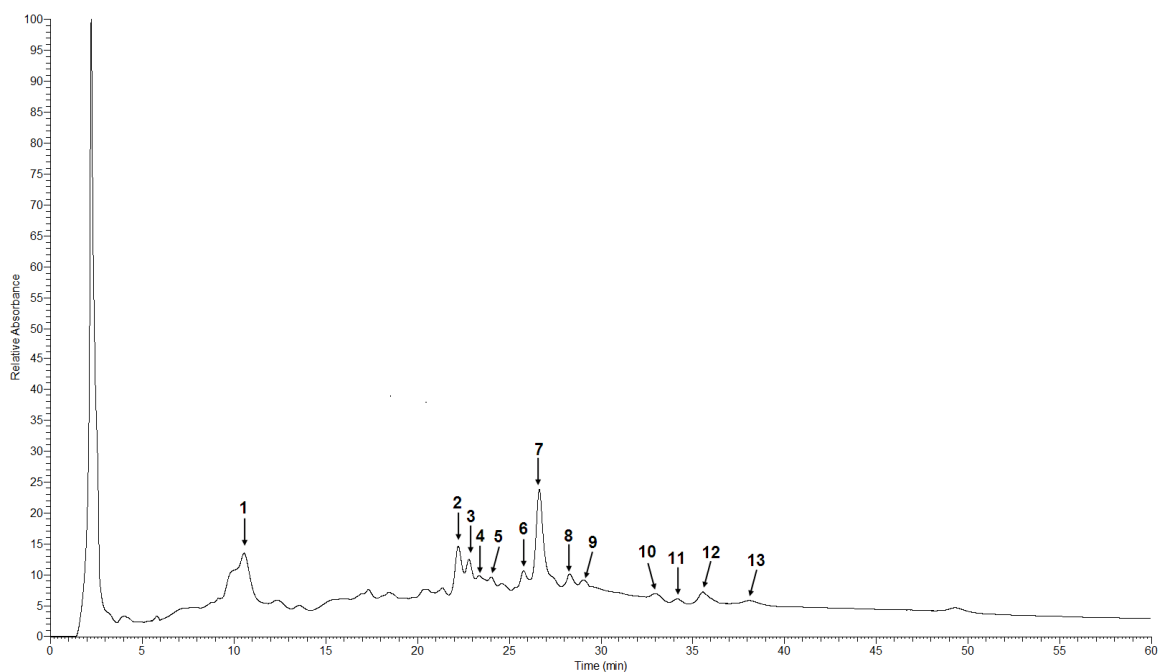
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwasu kawowego pentozyd
2	Kwasu kawowego heksozyd
3	Kwas chlorogenowy
4	Kwasu cykoriowego heksozyd
5	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 1
6	Kwas kawowy
7	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 2
8	Kwercetyny heksozydoacetyl
9	Kwas cykoriowy
10	Luteoliny rutozyd
11	Kwercetyny pentozyd
12	Luteoliny glukozyd
13	Kwercetyny acetyloheksozyd
14	Kwas dikawowy

EKSTRAKT #5

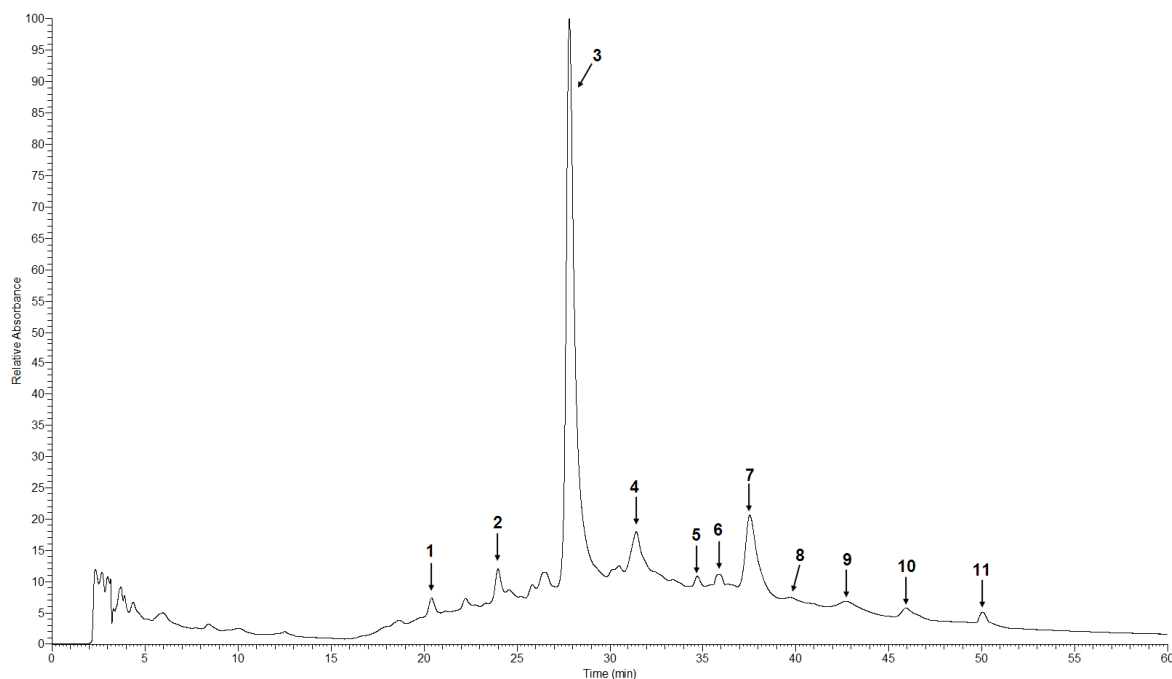
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwasu kawowego pentozyd
2	Kwas chlorogenowy
3	Kwasu cykoriowego heksozyd
4	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 1
5	Kwas kawowy
6	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 2
7	Kwercetyny heksozydoacetyl
8	Kwas cykoriowy
9	Kwercetyny pentozyd
10	Luteoliny glukozyd
11	Kwercetyny acetyloheksozyd
12	Luteoliny pentozyd
13	Kwas dikawowy

EKSTRAKT #6

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Apigetryna
2	Diosmina
3	Kwas p-kumarowy
4	Jaceozydyna
5	Eupatuliny glukozyd
6	Apigenina
7	Diosmetyna
8	Akacetyna
9	Jaceidyna
10	Eupatylina
11	Kwas taninowy

**C. Test starzeniowy środka ochrony roślin - analiza lotnych związków organicznych
EKSTRAKT #1**

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwas butanowy	-2,62±0,13
2	Kwas 3-metylobutanowy	-18,77±0,91
3	Kwas 2-metylobutanowy	-14,26±0,71
4	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol	4,08±0,19
5	Kwas pentanowy	-27,49±1,33
6	Kwas heksanowy	-45,87±2,21
7	m-krezol	-44,42±2,15
8	Kwas cykloheksanokarboksyłowy	-6,13±0,35
9	trans-chryzantenol	73,97±3,25
10	2-etylofenol	8,62±0,40
11	Kwas fenylloctowy	-5,70±0,31
12	Tymol	78,32±3,78
13	Kwas hydrocynamonowy	14,82±0,71

14	4-etylokatechol	-27,15±1,31
15	2-metylo-1H-indol	36,32±1,75
16	Aldehyd koniferylowy	-21,42±1,05
17	Kwas pentanodekanowy	17,82±0,86
18	Kwas cis-wakcenowy	28,76±1,36
19	9-oktadekanamid	31,08±1,50
20	Tetradekanamid	-2,46±0,13
21	cis-13-dokosenamid	15,75±0,76

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #2

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	3-metylo-3-pentanol	-1,12±0,05
2	Kwas butanowy	-1,48±0,08
3	Kwas 3-metylobutanowy	-32,10±1,54
4	Kwas 2-metylobutanowy	-14,25±0,70
5	Kwas 2-propylopropanowy	-6,13±0,29
6	Kwas heptanowy	2,41±0,12
7	p-krezol	17,62±0,85
8	Kwas cykloheksanodekanowy	0,79±0,03
9	4-etylofenol	-14,56±0,65
10	2,3-dimetylofenol	60,50±2,31
11	Kwas fenylloctowy	9,88±0,26
12	Kwas hydrocynamonowy	7,18±0,27
13	4-etylokatechol	67,17±3,01
14	7a-metylo-2,3,7,7a-tetrahydro-1H-indene-1,5(6H)-dion	20,66±0,89
15	Kwas pentadekanowy	-84,42±3,99
16	Heksadekanamid	-47,30±2,12
17	cis-9-oktadekanamid	-38,17±1,59

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #3

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwas butanowy	9,72±0,39
2	Kwas 2-metylobutanowy	-45,34±2,19
3	2,3-dimetylo-3-buten-3-ol	-0,15±0,01
4	Kwas pentanowy	-2,77±0,12
5	Kwas heksanowy	5,93±0,28
6	Eukaliptol	23,10±1,10
7	Kwas cykloheksanokarboksyłowy	-0,98±0,04
8	2,2,4-trimetylo-3-cykloheksene-1-karbaldehyd	81,01±3,64
9	2,3-dimetylofenol	10,88±0,59
10	Tymol	84,40±4,00
11	Kwas hydrocynamonowy	37,92±1,81
12	3-metyloindol	71,70±3,24
13	Tetradekanamid	-54,83±2,15
14	cis-9-oktadekanamid	-33,67±1,09

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #4

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	(S)-2,3-dihydroksypropanal	21,06±0,84
2	2,3-dimetylotetrahydrofuran	16,41±0,64
3	1,5-dihydro-4-metoksy-2H-pirol-2-on	49,07±1,69

4	Kwas heksanowy	-13,82±0,51
5	Alkohol benzytowy	39,27±1,56
6	Kwas cykloheksanokarboksyłowy	91,82±3,49
7	Kwas benzoesowy	97,64±3,89
8	Kwas fenylloctowy	12,29±0,51
9	3,4-dimetoksyfenol-	92,72±3,49
10	3,4,5-trimetoksyfenol	67,06±2,47
11	Kwas 3-(3-hydroksyfenilo)-propanowy	75,64±3,01
12	Tetradekanamid	39,14±1,26
13	Ilangenol	85,34±3,11
14	cis-13-dokosenamid	56,10±2,56
15	Oktadekanamid	39,62±1,39
16	cis-13-dokosenamid	63,25±2,64
17	cis-11-eicosenamid	45,15±1,34
18	beta-oktanolean-12-en-3-ol	44,79±1,49
19	24-norursa-3,12-dien	67,12±2,67
20	A'-Neogammacer-22(29)-en-3-one	88,54±3,49
21	Octan aldehydu betulinowego	12,45±0,51

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #5

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Ksyloza	71,61±2,85
2	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol	20,27±0,79
3	Kwas 4-metylo walerianowy	-48,08±1,94
4	p-krezol	-15,34±0,64
5	Kwas 3-(3-Hydroksyfenilo)propanowy	94,55±3,64
6	Neofitadien	61,44±2,95
7	Kwas pentanodekanowy	66,11±2,49
8	Tetradekanamid	20,99±0,94

9	cis-oktadekanamid	4,11±0,15
10	Steramid	20,01±0,91
11	cis-13-dokosenamid	15,87±0,56
12	beta oktanamyrenyl	94,77±3,47
13	Germanikol	88,59±3,36
14	24-Norursa-3,12-dien	87,79±3,25
15	Octan aldehydu betulinowego	90,51±3,71

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #6

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwas butanowy	-22,50±1,23
2	Kwas 3-metylobutanowy	-7,48±0,41
3	Kwas 2-metylobutanowy	-12,39±0,68
4	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol	-22,03±1,23
5	Kwas pentanowy	-12,11±0,61
6	Kwas heksanowy	-14,76±0,85
7	Eukaliptol	95,16±4,01
8	3,3,6-trimetylo-1,5-heptadien-4-on	87,52±3,64
9	Kwas cyklokesnokarboksylowy	9,67±0,44
10	2,3-dimetylofenol	15,09±0,79
11	Kwas oktanowy	62,60±3,26
12	4-metylo-1-(1-metyloetylo)-3-cykloheksen-1-ol	8,12±0,32
13	Tymol	89,24±2,65
14	Kwas hydrocynamonowy	37,06±1,99
15	3-metyloindol	63,65±2,78
16	trans-2-fenyl-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftol	69,00±3,01
17	Heksadekanamid	-7,02±0,31

18	Werrukarol	34,12±1,54
19	cis-9-oktadekenamid	-1,50±0,07

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

D. *Test starzeniowy środka ochrony roślin - analiza nietlotnych związków organicznych*

EKSTRAKT #1

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwas fumaranowy	-10,89±0,61
2	Kwas galusowy	-23,61±1,42
3	Kwasu kawowego pentozyd	-27,04±1,65
4	Katechina	-49,39±2,89
5	Kwas wanilinowy	-4,56±0,26
6	Kwasu kawowego heksozyd	-26,64±1,56
7	Apigetryna	0,76±0,04
8	Kwas chlorogenowy	-7,83±0,42
9	Kwas kawowy	-0,90±0,06
10	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 1	3,50±0,22
11	Kwas kawowy	4,69±0,29
12	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 2	-30,10±1,82
13	Ester melaninowy kwasu kawowego	-2,19±0,14
14	Kwas p-kumarowy	-5,59±0,33
15	Kwas ferulowy	-2,16±0,12
16	Jaceozydyna	-13,81±0,84
17	Rutyna	-55,48±3,36
18	Eupatuliny glukozyd	-76,07±4,16
19	Apigenina	-58,12±3,24
20	Diosmetyna	-57,20±3,45
21	Akacetyna	-56,26±3,64

22	Jaceidyna	1,40±0,07
23	Eupatylina	65,53±3,14
24	Kwas taninowy	-9,80±0,59

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #2

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwas fumaranowy	-40,60±2,44
2	Kwas galusowy	-13,64±0,81
3	Katechina	-86,24±5,16
4	Kwas wanilinowy	-76,49±4,55
5	Kwas chlorogenowy	24,78±1,51
6	Kwas kawowy	-32,19±1,95
7	Kwas syringowy	-77,46±4,66
8	Ester melaninowy kwasu kawowego	8,32±0,52
9	Kwas p-kumarowy	-6,08±0,37
10	Kwas ferulowy	-73,52±4,16
11	Naringenina	-33,12±2,01
12	Rutyna	-15,03±0,94
13	Kwas elagowy	-17,78±1,09
14	Miricetyna	-53,65±3,33
15	Kwercetyna	-70,85±4,21
16	Kemferol	-64,61±3,14
17	Izoharmetyna	-44,44±2,08

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

KSTRAKT #3

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Apigetryna	-54,43±3,16
2	Diosmina	-48,46±3,01
3	Kwas p-kumarowy	-14,36±0,88
4	Jaceozydyna	-4,60±0,24
5	Eupatuliny glukozyd	3,38±0,19
6	Apigenina	-10,90±0,64
7	Diosmetyna	9,93±0,56
8	Akacetyna	-33,48±2,02
9	Jaceidyna	-20,00±1,26
10	Eupatylina	-18,60±1,32
11	Kwas taninowy	-79,40±3,69

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #4

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwasu kawowego pentozyd	8,45±0,51
2	Kwasu kawowego heksozyd	-42,48±2,59
3	Kwas chlorogenowy	-59,11±3,55
4	Kwasu cykoriowego heksozyd	-23,30±1,39
5	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 1	-18,29±1,09
6	Kwas kawowy	-20,54±1,25
7	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 2	-5,03±0,31
8	Kwercetyny heksozydoacetyl	-34,95±2,15
9	Kwas cykoriowy	-13,04±0,79
10	Luteoliny rutozyd	-46,46±2,64
11	Kwercetyny pentozyd	-29,30±1,77
12	Luteoliny glukozyd	14,45±0,84

13	Kwercetyny acetyloheksozyd	39,06±2,49
14	Kwas dikawowy	2,32±0,15

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #5

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Kwasu kawowego pentozyd	-15,08±0,91
2	Kwas chlorogenowy	-69,01±4,13
3	Kwasu cykoriowego heksozyd	49,29±2,69
4	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 1	-9,09±0,54
5	Kwas kawowy	-19,21±1,13
6	Kwercetyny pentozyloheksozyd izomer 2	62,50±3,94
7	Kwercetyny heksozydoacetyl	-47,40±2,84
8	Kwas cykoriowy	-89,73±4,45
9	Kwercetyny pentozyd	-96,49±3,66
10	Luteoliny glukozyd	-6,36±0,39
11	Kwercetyny acetyloheksozyd	-57,47±3,16
12	Luteoliny pentozyd	-23,45±1,41
13	Kwas dikawowy	-0,56±0,03

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

EKSTRAKT #6

Tabela zawiera procentowe zmiany stężenia składników wchodzących w skład badanego preparatu po przeprowadzonym teście starzeniowym liczone względem ich zawartości w preparacie nie poddanych testowi starzeniowemu.

Lp.	OZNACZANY ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU * PO PRZEPROWADZONYM TEŚCIE STARZENIOWYM [%]
1	Apigetryna	-13,88±0,83
2	Diosmina	-17,81±1,10
3	Kwas p-kumarowy	-18,41±1,06

4	Jaceozydyna	0,61±0,03
5	Eupatuliny glukozyd	-56,49±3,21
6	Apigenina	-8,85±0,54
7	Diosmetyna	-86,91±4,44
8	Akacetyna	-13,46±0,80
9	Jaceidyna	-72,42±4,01
10	Eupatyлина	3,67±0,21
11	Kwas taninowy	-19,20±1,08

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek.

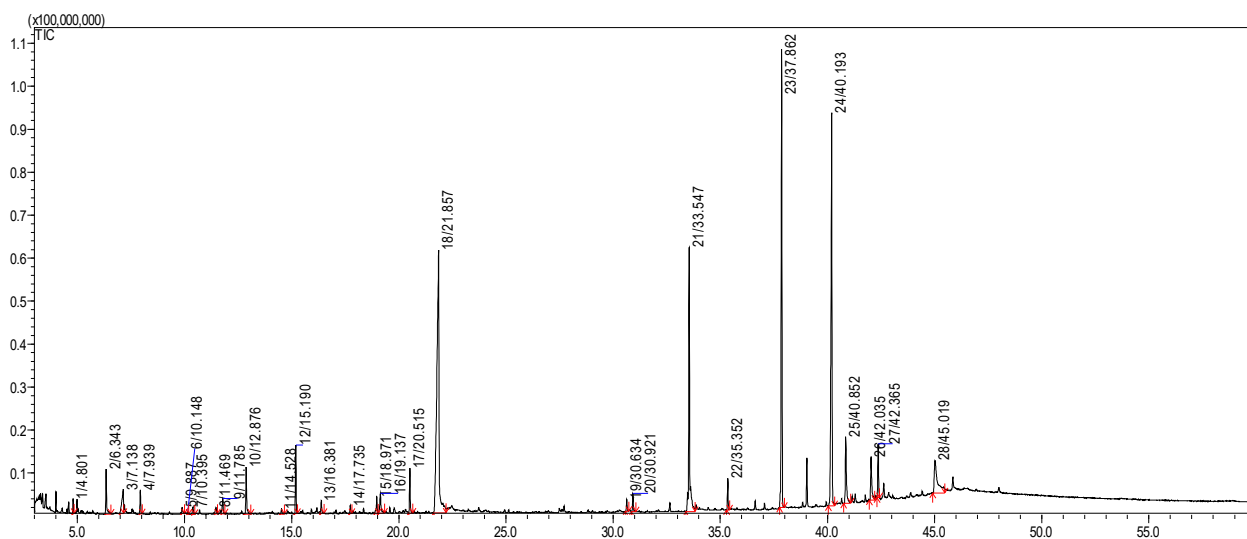
Oznaczenie zawartości wybranych metali ciężkich w badanych środkach ochrony roślin

Nr próbki	Parametr						
	Cu mg/kg	Cr mg/kg	Ni mg/kg	Cd mg/kg	As mg/kg	Pb mg/kg	Hg mg/kg
	Wynik						
(Ekstrakt #1)	0,271	0,936	1,19	<LOQ=0,02	<LOQ=0,1	<LOQ=0,01	<LOQ=0,005
(Ekstrakt #2)	0,140	<LOQ=0,05	0,188	<LOQ=0,02	<LOQ=0,1	<LOQ=0,01	<LOQ=0,005
(Ekstrakt #3)	0,082	<LOQ=0,05	0,083	<LOQ=0,02	<LOQ=0,1	<LOQ=0,01	<LOQ=0,005
(Ekstrakt #4)	0,484	<LOQ=0,05	<LOQ=0,05	<LOQ=0,02	<LOQ=0,1	<LOQ=0,01	<LOQ=0,005
(Ekstrakt #5)	0,435	<LOQ=0,05	<LOQ=0,05	<LOQ=0,02	<LOQ=0,1	<LOQ=0,01	<LOQ=0,005
(Ekstrakt #6)	0,110	<LOQ=0,05	<LOQ=0,05	<LOQ=0,02	<LOQ=0,1	<LOQ=0,01	<LOQ=0,005
Metoda badania	CLA/ESA/1/2014 wersja 3 z dn. 03.03.2014						CLA/ASA/5/2013 wersja 4 z dn. 06.08.2013

E. Analiza zawartości lotnych związków organicznych w roślinach poddanych działaniu preparatów ochrony roślin

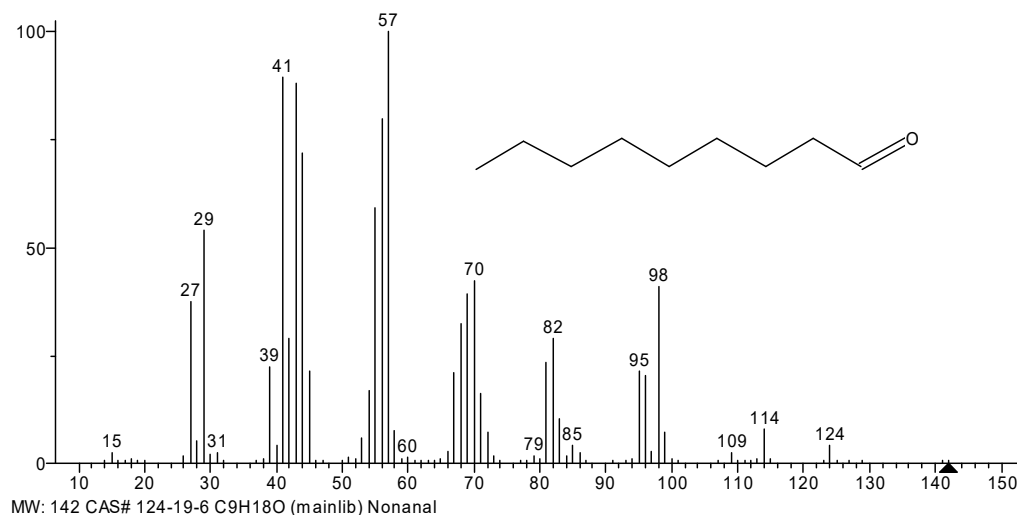
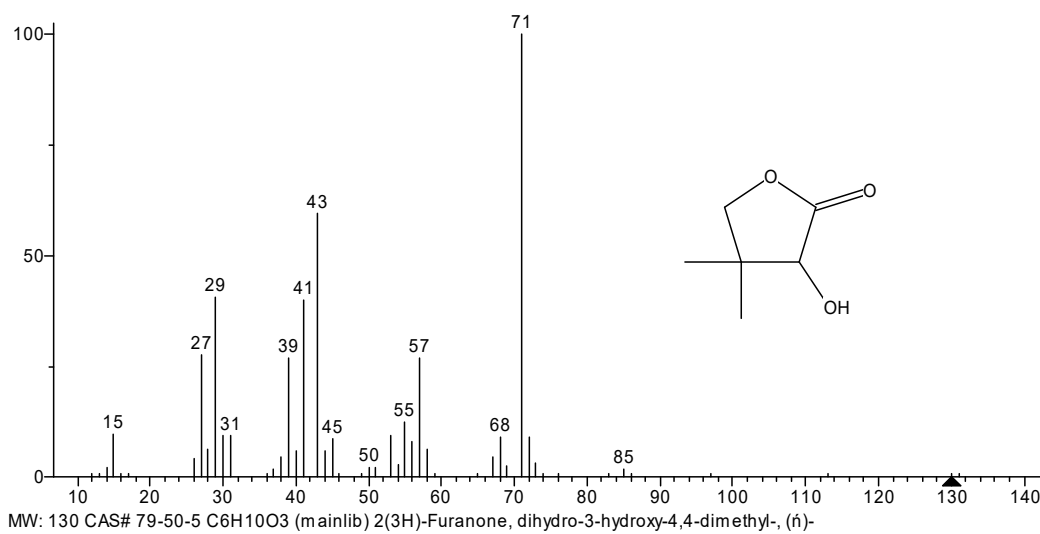
MALINA #1 – (MATERIAŁ ODNIESIENIA)

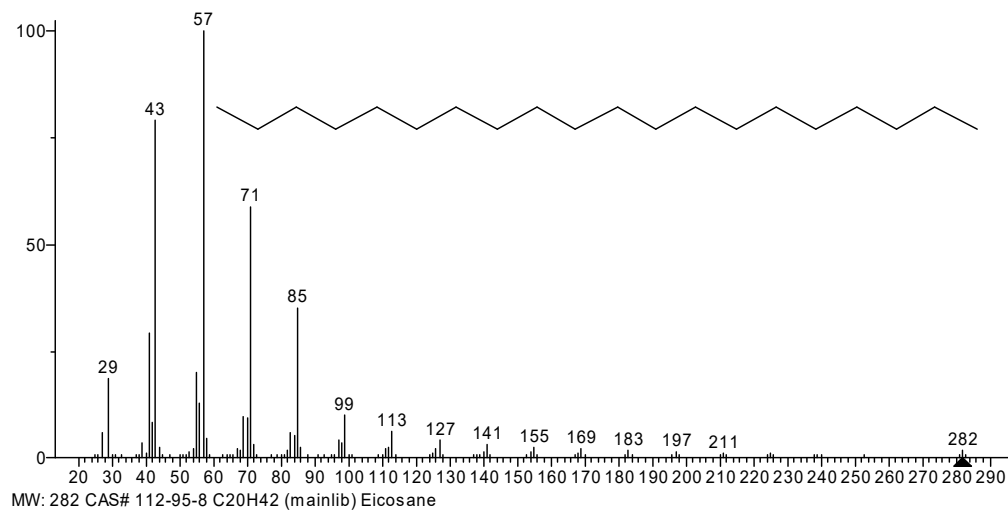
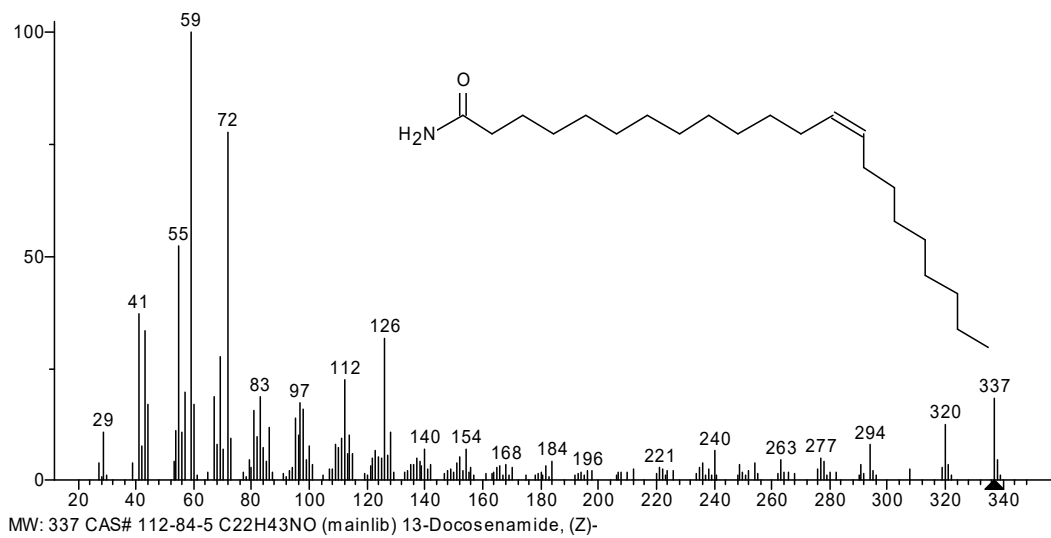
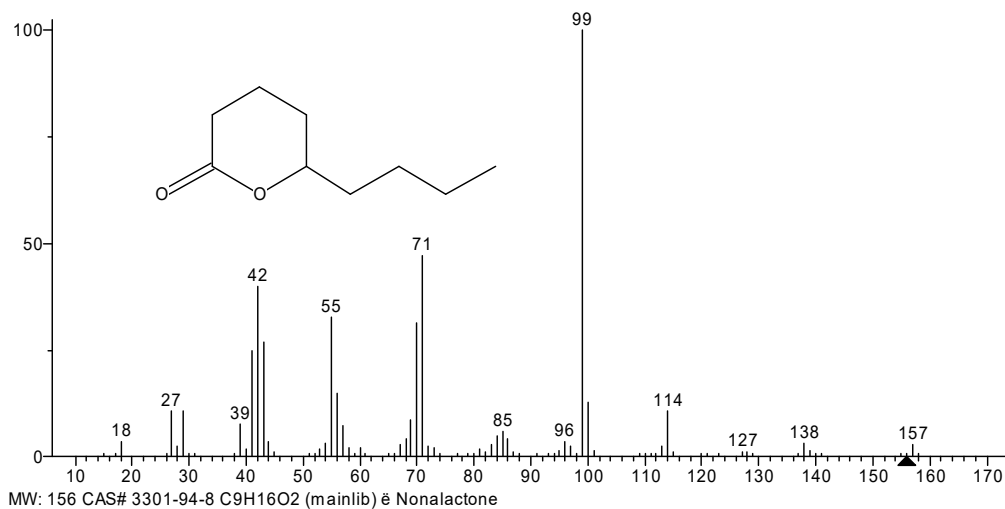
Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram uzyskany dla ekstraktu z badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.

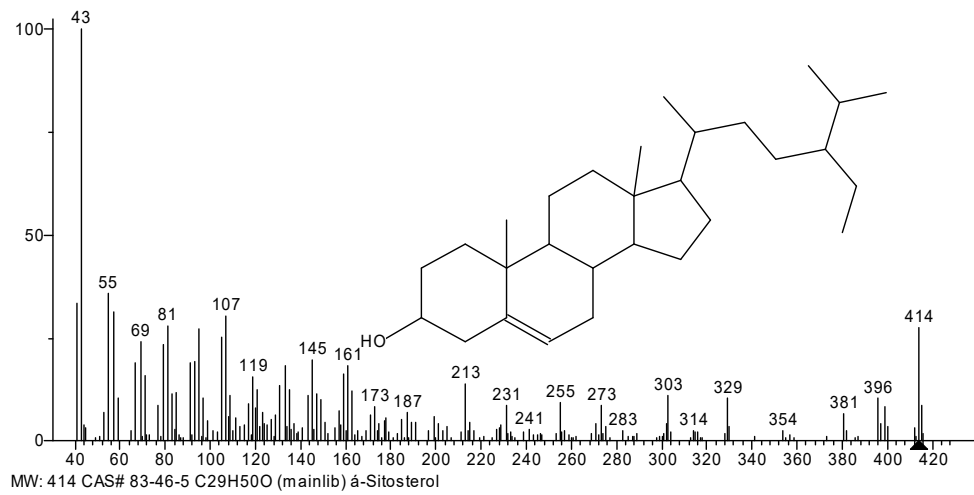
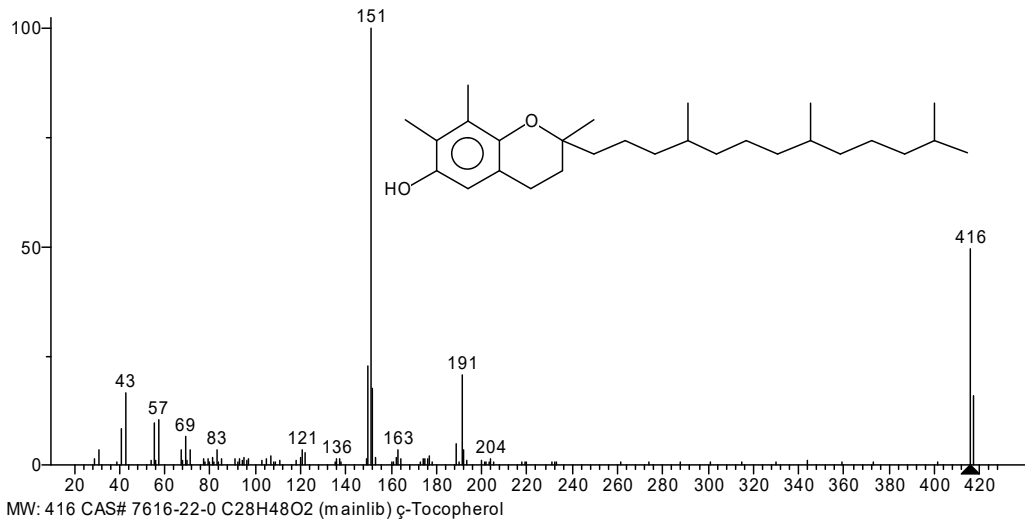
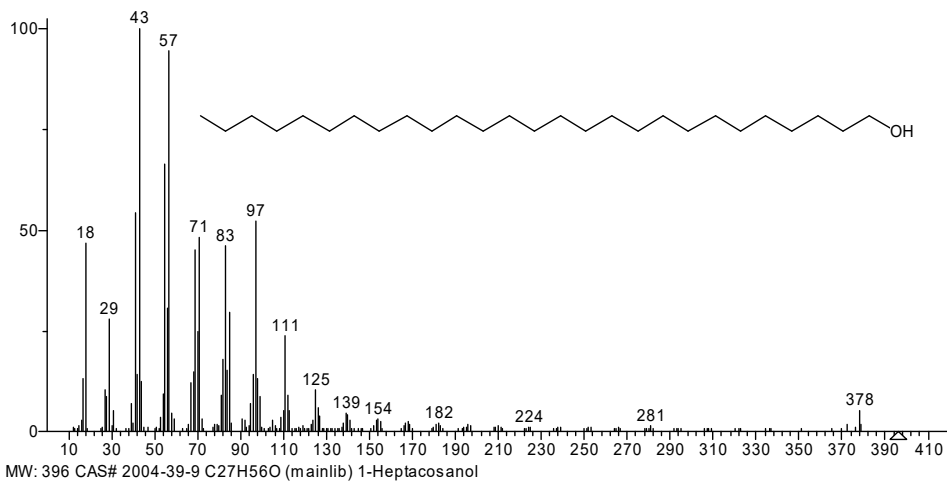


Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol
2	2,5-dihydro-3-metylenofurandion
3	Kwas heksanowy
4	Diazoetan
5	DL-Pantolakton
6	Nonanal
7	Kwas cykloheksanokarboksylowy
8	Kwas benzoesowy
9	4-metyloitakonat
10	2,3-dihydrobenzofuran
11	Tetrahydro-6-propylo-2H-piran-2-on
12	2-metoksy-4-winylofenol
13	2-propylofenol
14	4-(2,6,6-trimetylo-2-cykloheksen-1-yl)-3-buten-2-on
15	4-(2,6,6-trimetylo-1-cykloheksen-1-yl)-3-buten-2-on
16	delta Nonalaktone
17	3',5'-dimethoksyacetofenon
18	Kwas 3-(3-hydroksyfenylo)propanowy
19	cis-9-oktadekenamid
20	Oktadekanamide
21	cis-13-Dokosenamid

22	Eikosan
23	Ester decylowy kwasu dekanowego
24	Heptakosanol
25	delta tokoferol
26	Gamma tokoferol
27	2-methyl-oktakosan
28	beta sitosterol







Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą procentową zmianę składników w próbkach malin poddanych, w warunkach polowych, działaniu naturalnych środków ochrony roślin.

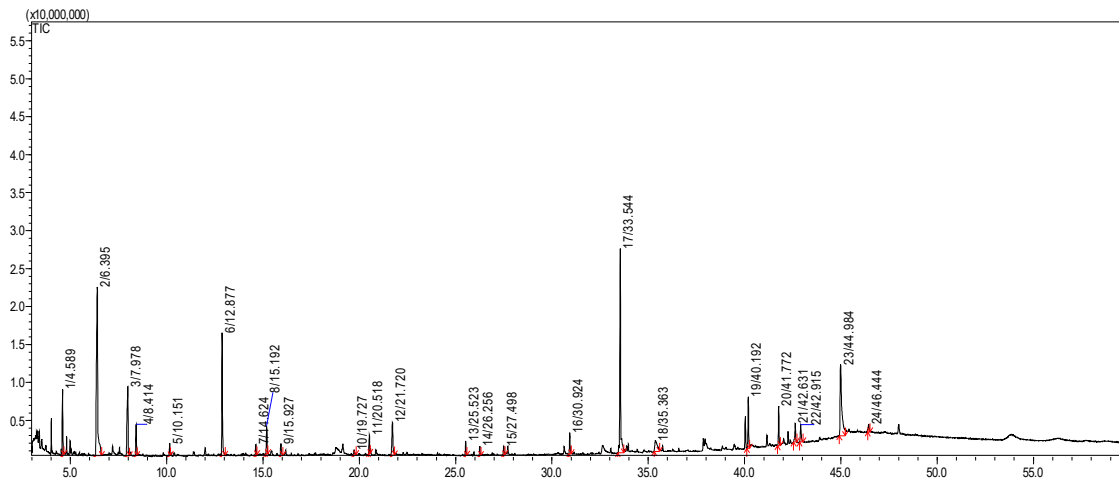
Lp.	ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU* [%]			
		MALINA #2	MALINA #3	MALINA #4	MALINA #5
1	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol	12,62 ± 0,57	1,02 ± 0,05	-14,77 ± 0,67	-3,62 ± 0,16
2	2,5-dihydro-3-metylenofurandion	55,49 ± 2,51	76,90 ± 3,47	42,64 ± 1,93	66,90 ± 2,99
3	Kwas heksanowy	3,63 ± 0,16	-55,24 ± 2,49	-50,23 ± 2,21	-34,87 ± 1,15
4	Diazoetan	115,99 ± 5,21	130,75 ± 5,90	70,88 ± 3,01	117,48 ± 4,51
5	DL-Pantolakton	10,86 ± 0,46	-9,92 ± 0,45	-33,75 ± 1,52	-26,83 ± 1,11
6	Nonanal	17,44 ± 0,68	-18,10 ± 0,82	17,27 ± 0,78	53,35 ± 2,16
7	Kwas cykloheksanokarboksylowy	-43,69 ± 1,94	-67,66 ± 3,05	-68,50 ± 2,36	-71,55 ± 3,12
8	Kwas benzoesowy	5,45 ± 0,25	-14,72 ± 0,66	-28,26 ± 1,21	-4,86 ± 0,12
9	4-metyloitakonat	8,11 ± 0,37	-31,97 ± 1,44	-47,89 ± 2,15	-38,83 ± 1,57
10	2,3-dihydrobenzofuran	3,62 ± 0,16	-18,96 ± 0,86	-43,47 ± 1,99	-28,94 ± 1,17
11	Tetrahydro-6-propylo-2H-piran-2-on	18,62 ± 0,85	-46,90 ± 2,12	-43,64 ± 1,13	-24,36 ± 1,09
12	2-metoksy-4-winylofenol	17,48 ± 0,79	-31,84 ± 1,44	-44,00 ± 2,01	-41,45 ± 1,79
13	2-propylofenol	-16,54 ± 0,57	-43,56 ± 1,97	-53,53 ± 2,11	-46,05 ± 2,07
14	4-(2,6,6-trimetylo-2-cykloheksen-1-yl)-3-buten-2-on	9,11 ± 0,41	-16,80 ± 0,76	-32,33 ± 1,36	-58,19 ± 2,36
15	4-(2,6,6-trimetylo-1-cykloheksen-1-yl)-3-buten-2-on	-2,08 ± 0,08	-22,63 ± 1,02	-35,41 ± 1,46	-51,46 ± 2,22
16	delta Nonalaktone	0,76 ± 0,02	-36,36 ± 1,64	-47,88 ± 2,15	-44,61 ± 2,02
17	3',5'-dimethoksyacetofenon	12,87 ± 0,58	-27,90 ± 1,26	-44,14 ± 1,87	-37,50 ± 1,67
18	Kwas 3-(3-hydroksyfenylo)propanowy	-73,48 ± 3,32	-90,67 ± 4,09	-96,81 ± 3,01	-97,91 ± 3,01
19	cis-9-oktadekenamid	-1,83 ± 0,08	-25,40 ± 1,15	-65,02 ± 2,66	-56,41 ± 2,66

20	Oktadekanamide	-9,41 ± 0,25	-13,23 ± 0,60	-41,64 ± 1,58	-29,79 ± 1,44
21	cis-13-Dokosenamid	4,61 ± 0,21	-12,34 ± 0,56	-59,64 ± 2,31	-50,88 ± 2,15
22	Eikosan	-36,85 ± 1,65	-37,77 ± 1,71	-74,27 ± 3,02	-90,49 ± 2,69
23	Ester decylowy kwasu dekanowego	-25,11 ± 1,11	-14,18 ± 0,61	-63,63 ± 2,78	-91,82 ± 2,79
24	Heptakosanol	-19,04 ± 0,88	-7,98 ± 0,36	-66,83 ± 2,88	-92,74 ± 3,32
25	delta tokoferol	-36,95 ± 1,15	-39,76 ± 1,80	-77,79 ± 3,33	-96,28 ± 2,69
26	Gamma tokoferol	-32,91 ± 1,44	-45,53 ± 2,06	-76,20 ± 3,26	-96,51 ± 2,46
27	2-methyl-oktakosan	-16,05 ± 0,75	-11,75 ± 0,65	-68,60 ± 3,09	-92,71 ± 2,14
28	beta sitosterol	33,84 ± 1,52	-41,56 ± 1,79	-53,59 ± 2,22	-67,39 ± 3,04

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek względem zawartości w próbce porównawczej – MALINA #1

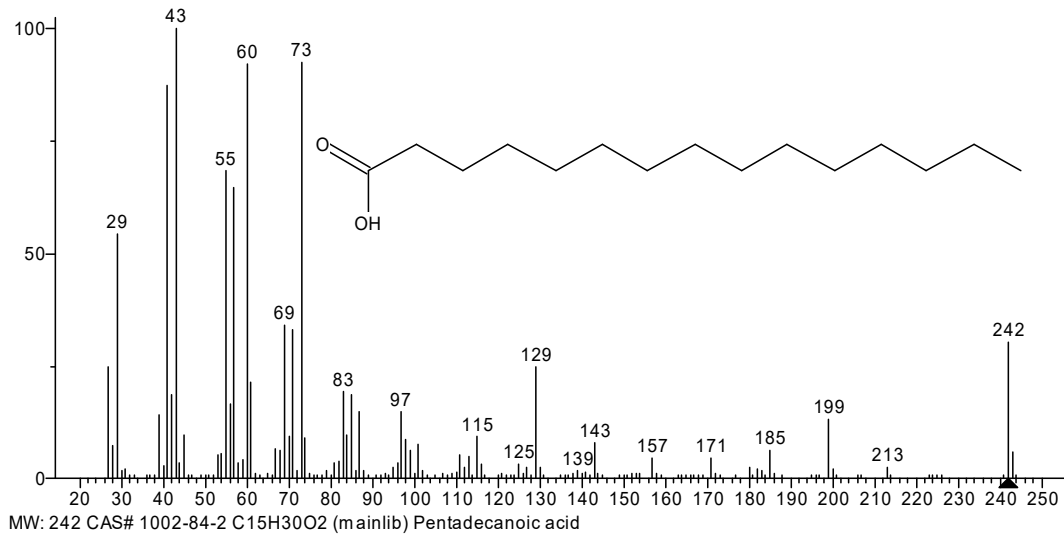
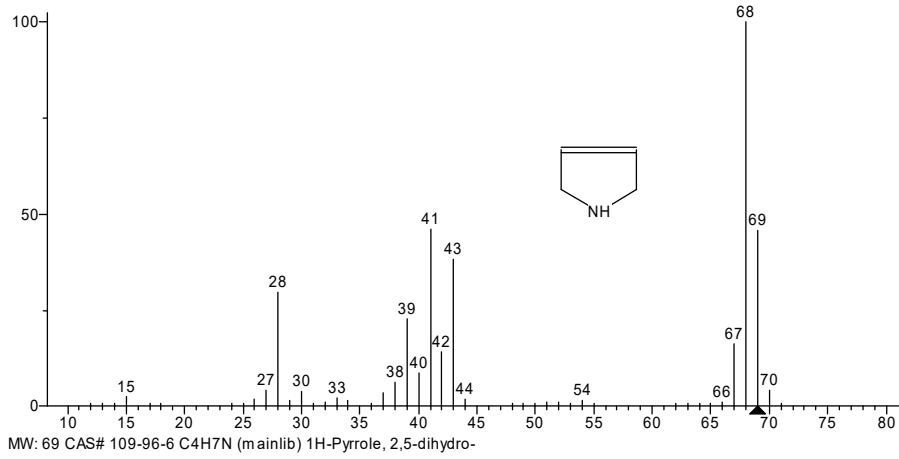
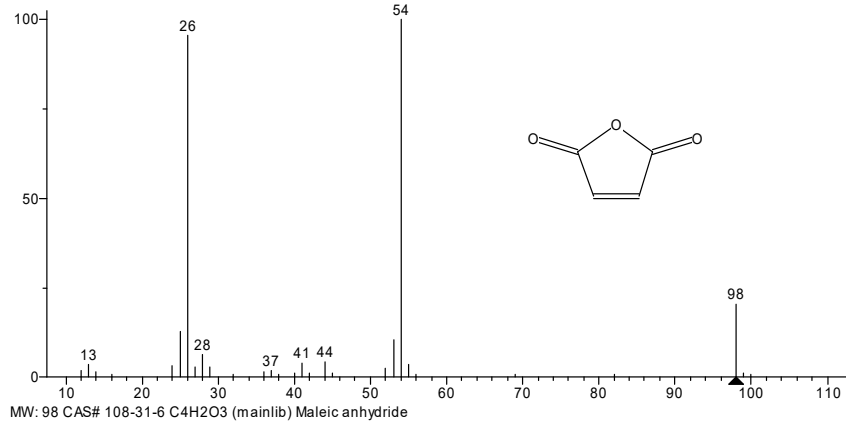
PORZECZKA #1 – (MATERIAŁ ODNIESIENIA)

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram uzyskany dla ekstraktu z badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	2,5-furandion
2	2,5-dihydropirol
3	Diazoetan
4	2,5-dihydro-3-metylofurandion
5	Nonanal
6	Dihydrobenzofuran
7	2,2-dimetylo-1-oksa-spiro[2.5]oktan
8	p-winyloguaiakol
9	4,5,6,7-tetrametylo-2,1,3-benzotiadiazol
10	Ester metylowy kwasu 2,5-dihydroksy benzoowego
11	3',5'-dimethoksyacetofenon
12	Kwas 3-hydroxy-fenylpropanowy
13	Neofitadien
14	3,7,11,15-tetrametylo-2-heksadeken-1-ol
15	Kwas pentadekanowy
16	Tetradekanamid
17	cis-13-dokosenamid
18	Nonakos-1-en
19	Tetratetrakontan

20	Eikosanal
21	Eter metylowy beta sitosterolu
22	Witamina E
23	beta sitosterol
24	beta amyron



Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą procentową zmianę składników w próbkach porzeczek poddanych, w warunkach polowych, działaniu naturalnych środków ochrony roślin.

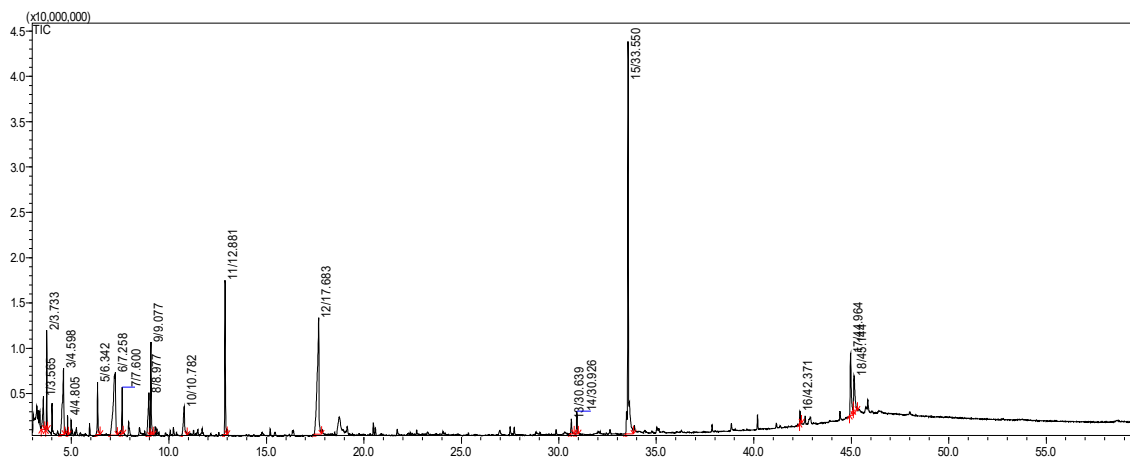
Lp.	ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU*			
		[%]			
		PORZECZKA #2	PORZECZKA #3	PORZECZKA #4	PORZECZKA #5
1	2,5-furandion	40,50 ± 1,63	27,01 ± 1,10	8,37 ± 0,46	-14,69 ± 0,73
2	2,5-dihydropirol	12,74 ± 0,51	0,88 ± 0,03	-5,84 ± 0,21	-15,36 ± 0,76
3	Diazoetan	-35,97 ± 1,16	-62,88 ± 2,56	-65,63 ± 3,32	-71,96 ± 2,69
4	2,5-dihydro-3-metylofurandion	18,70 ± 0,74	-5,72 ± 0,24	-33,10 ± 1,31	-44,34 ± 1,99
5	Nonanal	-45,17 ± 1,81	-32,68 ± 1,33	-49,57 ± 2,26	-50,40 ± 2,59
6	Dihydrobenzofuran	9,78 ± 0,39	-7,71 ± 0,33	-11,71 ± 0,57	-17,31 ± 0,64
7	2,2-dimetylo-1-oksa-spiro[2.5]oktan	39,84 ± 1,59	15,16 ± 0,69	-1,88 ± 0,08	-14,55 ± 0,49
8	p-winyloguaiakol	0,34 ± 0,01	2,93 ± 0,12	29,64 ± 1,16	-1,79 ± 0,08
9	4,5,6,7-tetrametylo-2,1,3-benzotiadiazol	-11,02 ± 0,44	-32,56 ± 1,33	-46,33 ± 2,16	-37,89 ± 1,49
10	Ester metylowy kwasu 2,5-dihydroksy benzoesowego	9,27 ± 0,34	-2,66 ± 0,08	-40,23 ± 2,08	-28,78 ± 1,43
11	3',5'-dimethoksyacetofenon	17,59 ± 0,70	35,15 ± 1,06	40,49 ± 2,09	-8,38 ± 0,41
12	Kwas 3-hydroxy-fenylpropanowy	-54,67 ± 2,19	-71,96 ± 2,64	-83,66 ± 3,16	-87,60 ± 2,99
13	Neofitadien	-1,53 ± 0,06	33,68 ± 1,33	22,03 ± 1,05	-16,60 ± 0,74
14	3,7,11,15-tetrametylo-2-heksadecen-1-ol	0,10 ± 0,001	43,12 ± 1,29	16,25 ± 0,82	-22,24 ± 1,10
15	Kwas pentadekanowy	-19,24 ± 0,77	-44,28 ± 1,84	-22,48 ± 1,02	-57,70 ± 2,05
16	Tetradekanamid	-9,76 ± 0,34	-19,42 ± 0,92	-9,35 ± 0,19	-43,79 ± 1,89
17	cis-13-dokosenamid	90,91 ± 3,55	69,78 ± 2,94	68,35 ± 3,26	-54,51 ± 2,65
18	Nonakos-1-en	167,96 ± 4,16	-39,69 ± 1,16	8,99 ± 0,45	-61,98 ± 3,05

19	Tetratetrakontan	428,51 ± 9,21	-81,20 ± 3,26	-6,71 ± 0,34	-69,63 ± 2,39
20	Eikosanal	527,78 ± 6,16	-98,90 ± 3,33	-27,38 ± 1,16	-96,28 ± 2,99
21	Eter metylowy beta sitosterolu	9,83 ± 0,33	-15,38 ± 0,61	4,39 ± 0,11	-34,46 ± 1,69
22	Witamina E	-10,99 ± 0,41	6,02 ± 0,12	35,21 ± 1,19	-51,51 ± 2,77
23	beta sitosterol	-21,84 ± 0,18	-1,03 ± 0,03	33,18 ± 1,66	-32,50 ± 1,18
24	beta amyron	6,49 ± 0,06	15,12 ± 0,44	30,50 ± 1,53	-17,67 ± 0,81

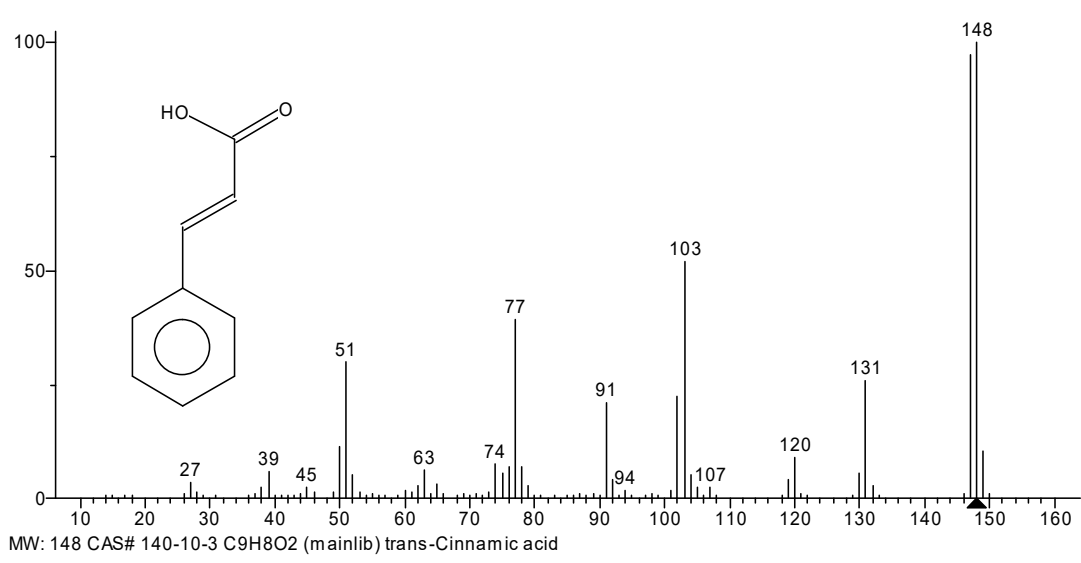
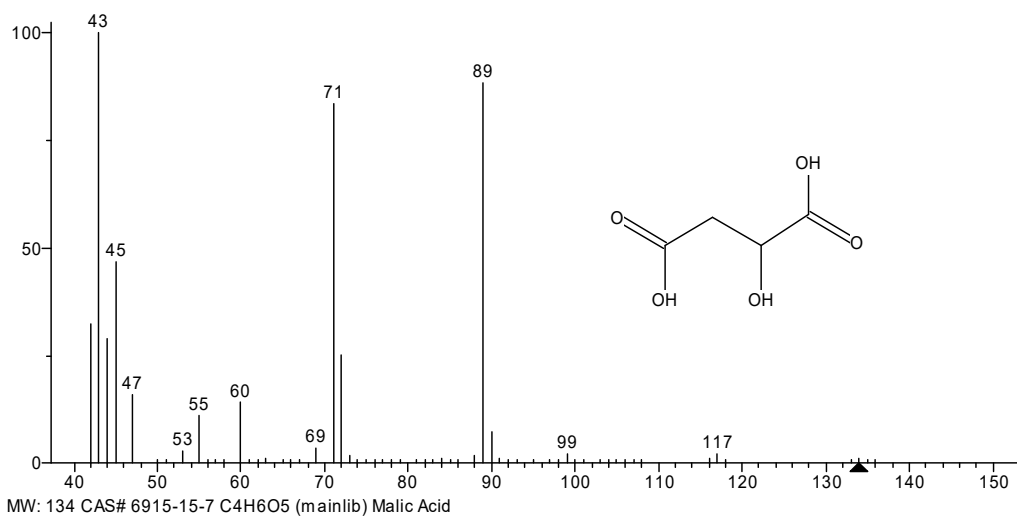
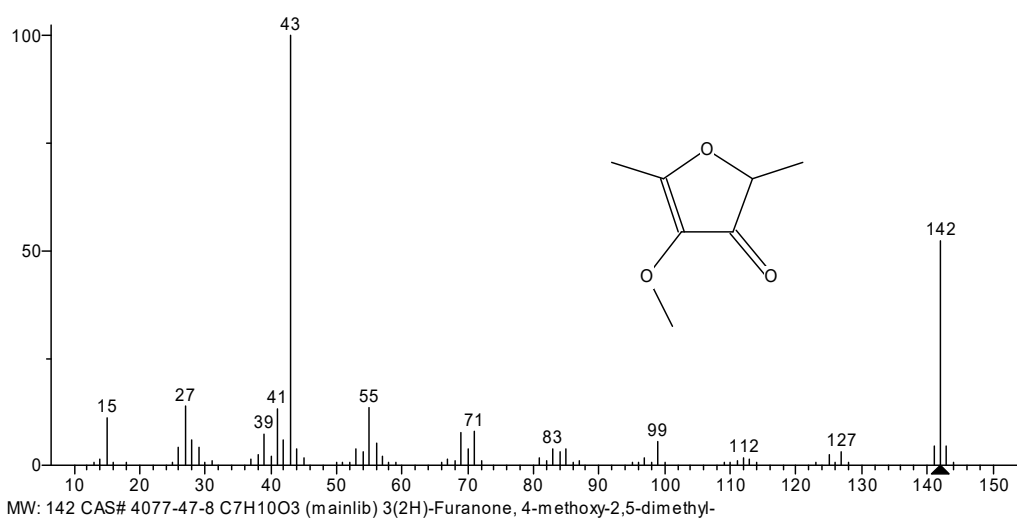
* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek względem zawartości w próbce porównawczej – PORZECZKA #1

TRUSKAWKA #1 – (MATERIAŁ ODNIESIENIA)

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram uzyskany dla ekstraktu z badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality oraz wybrane widma masowe.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas butanowy
2	Ester etylowy kwasu butanowego
3	Kwas 2-metylobutanowy
4	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol
5	2,5-dihydro-3-metylofuranodion
6	Kwas heksanowy
7	Ester etylowy kwasu heksanowego
8	2,5-dimetylofuran-3,4(2H,5H)-dion
9	2,5-dimetylo-4-metoksy-3(2H)-furanon
10	Kwas jabłkowy
11	Kumaran
12	Kwas trans-cynamonowy
13	cis-9-octadekenamid
14	Oktadekanamid
15	cis-13-dokosenamid
16	Tetratetrakontan
17	beta Sitosterol
18	beta 24-propylidenocholest-5-en-3-ol



Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą procentową zmianę składników w próbkach truskawek poddanych, w warunkach polowych, działaniu naturalnych środków ochrony roślin.

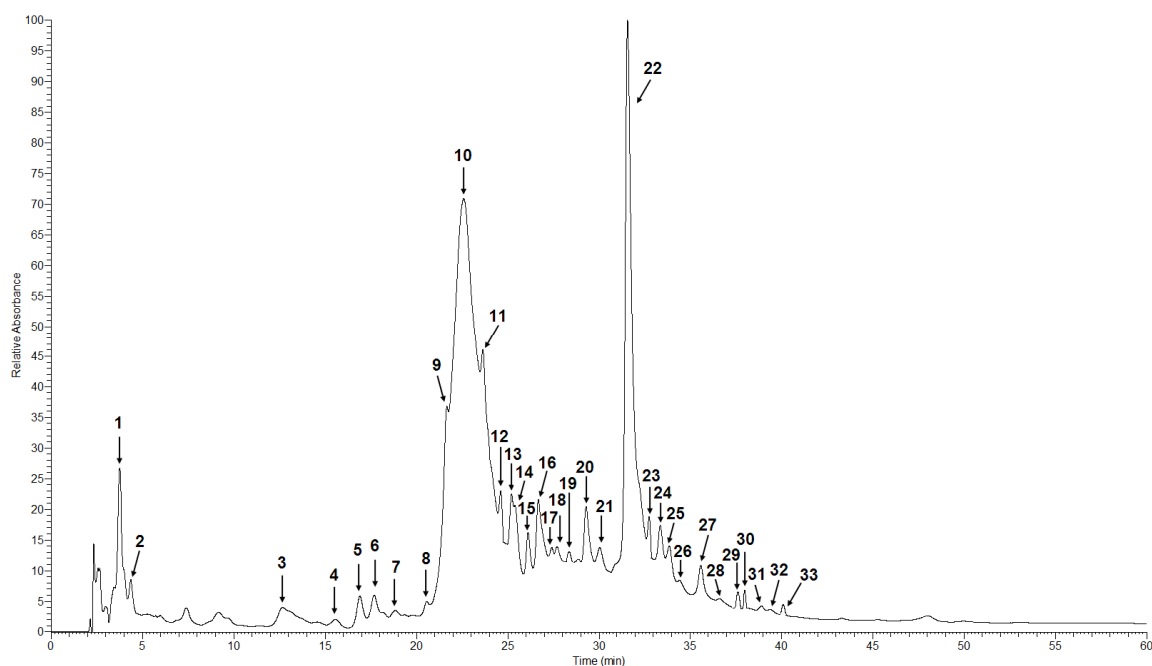
Lp.	ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU*			
		[%]			
		TRUSKAWKA #2	TRUSKAWKA #3	TRUSKAWKA #4	TRUSKAWKA #5
1	Kwas butanowy	0,15 ± 0,01	-19,85 ± 0,81	-18,55 ± 0,93	-32,97 ± 1,65
2	Ester etylowy kwasu butanowego	-10,79 ± 0,16	0,17 ± 0,01	41,69 ± 2,16	-12,47 ± 0,62
3	Kwas 2-metylobutanowy	-15,99 ± 0,61	9,03 ± 0,37	1,55 ± 0,06	-27,34 ± 1,26
4	2,3-dimetylo-3-buten-2-ol	-7,87 ± 0,32	12,32 ± 0,51	-0,12 ± 0,006	-21,25 ± 1,05
5	2,5-dihydro-3-metylofuranodion	-20,12 ± 0,74	-43,42 ± 1,11	-33,40 ± 1,67	-59,71 ± 2,26
6	Kwas heksanowy	-9,28 ± 0,39	-19,42 ± 0,71	-39,30 ± 1,99	-37,38 ± 1,26
7	Ester etylowy kwasu heksanowego	-23,19 ± 0,99	24,08 ± 0,91	9,00 ± 0,62	-8,03 ± 0,61
8	2,5-dimetylofuran-3,4(2H,5H)-dion	-38,22 ± 1,26	-34,35 ± 1,12	-25,96 ± 1,59	-43,09 ± 2,18
9	2,5-dimetylo-4-metoksy-3(2H)-furanon	-47,80 ± 1,31	-31,96 ± 1,31	-16,23 ± 0,99	-47,01 ± 1,99
10	Kwas jabłkowy	-10,11 ± 0,41	-29,74 ± 1,23	-24,69 ± 1,24	-43,01 ± 2,15
11	Kumaran	0,05 ± 0,001	-19,73 ± 0,99	-35,38 ± 1,77	-37,12 ± 1,64
12	Kwas trans-cynamonowy	-42,45 ± 1,79	-34,54 ± 1,16	-36,83 ± 1,69	-42,28 ± 2,11
13	cis-9-octadekenamid	-28,58 ± 1,26	-40,09 ± 1,17	-17,27 ± 0,89	-37,20 ± 1,49
14	Oktadekanamid	-27,75 ± 1,16	-32,25 ± 1,33	-4,81 ± 0,22	-30,78 ± 1,61
15	cis-13-dokosenamid	-17,45 ± 0,71	-36,45 ± 1,50	-11,30 ± 0,51	-34,69 ± 1,48
16	Tetratetrakontan	1,45 ± 0,06	-17,43 ± 0,73	-44,56 ± 2,21	-22,74 ± 1,12
17	beta Sitosterol	-51,06 ± 2,01	-12,40 ± 0,55	-59,68 ± 2,18	-51,98 ± 2,31
18	beta 24-propylidenocholest-5-en-3-ol	-42,41 ± 1,71	-19,82 ± 0,82	-68,94 ± 3,15	-50,39 ± 2,21

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek względem zawartości w próbce porównawczej – TRUSKAWKA #1

F. Analiza zawartości nietlotnych związków organicznych w roślinach poddanych działaniu preparatów ochrony roślin

MALINA #1 – (MATERIAŁ ODNIESIENIA)

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram uzyskany dla ekstraktu z badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas cytrynowy
2	Kwas askorbinowy
3	Cyjanidyno 3-(2'-glukosylo)rutozyd
4	Cyjanidyno 3-soforozydo-5-ramnosyd
5	Cyjanidyno 3,5-diglukozyd
6	Pelargonidyno 3-(2'-glukosylo)rutozyd
7	Cyjanidyno 3-(2'-ksylosylozo)rutozyd
8	Cyjanidyno 3-sambubiozydo-5-ramnozyd
9	Kwercetyny (2'-glukozylo)rutozyd
10	Kwercetyny galactozylramnozyd
11	Kwercetyny diglukozyd

12	Cyjanidyno 3-soforozyd
13	Cyjanidyno 3-sambubiozyd
14	Cyjanidyno 3-glukozyd
15	Cyjanidyno 3-rutozyd
16	Pelargonidyno 3-soforozyd
17	Pelargonidyno 3-rutozyd
18	Pelargonidyno 3-sambubiozyd
19	Pelargonidyno 3-glukozyd
20	Ellaginianu pentozyd izomer 1
21	Ellaginianu pentozyd izomer 2
22	Ellaginanu 4-acetylo arabinozyd
23	Ellaginianu 4-acetylo ksylozyd
24	Metylo ellaginanu pentozyd
25	Kwas ellaginowy
26	Kwercetyny glukuronid
27	Kwercetyny galaktozyd
28	Kwercetyny glukozyd
29	Metylokwercetyny glukuronid
30	Kemferolu glukuronid
31	Sangiina-H6
32	Sangiina-H10
33	Sangiina-H2

Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą procentową zmianę składników w próbkach malin poddanych, w warunkach polowych, działaniu naturalnych środków ochrony roślin.

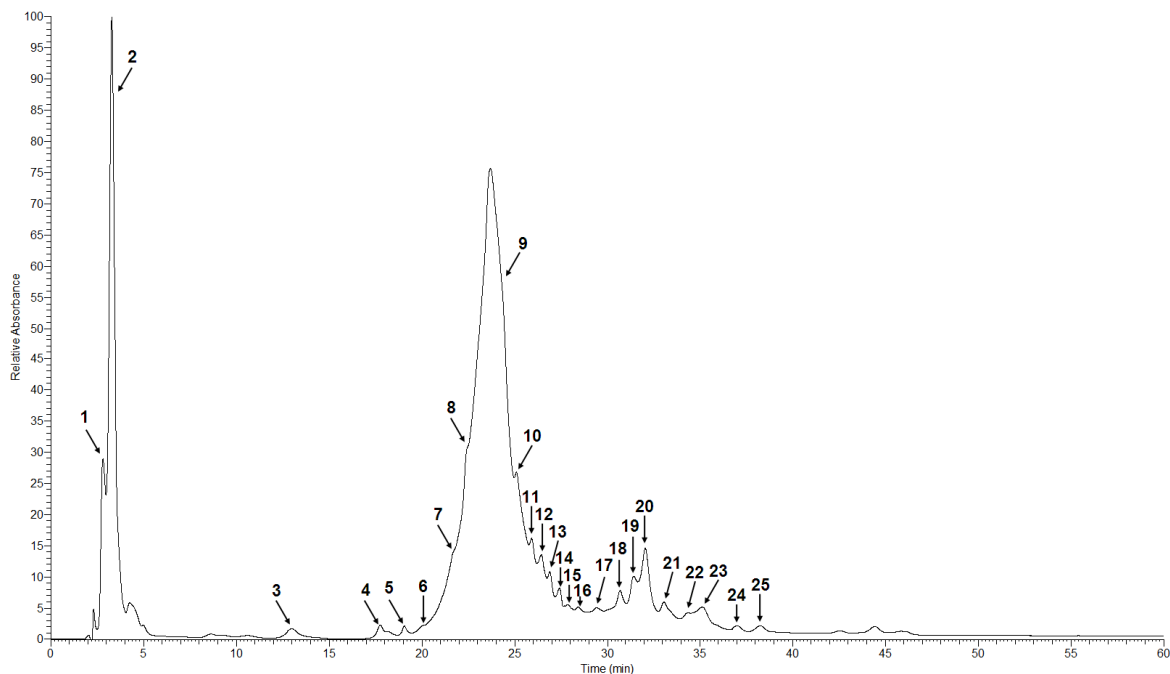
Lp.	ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU *			
		[%]			
		MALINA #2	MALINA #3	MALINA #4	MALINA #5
1	Kwas cytrynowy	-3,92 ± 0,22	0,68 ± 0,03	1,13 ± 0,06	0,26 ± 0,01
2	Kwas askorbinowy	-2,04 ± 0,11	-2,41 ± 0,11	3,96 ± 0,20	4,02 ± 0,21
3	Cyjanidyno 3-(2'-glukosylo)rutozyd	-8,67 ± 0,44	-9,02 ± 0,39	-8,29 ± 0,31	-8,16 ± 0,36
4	Cyjanidyno 3-soforozydo-5-ramnosyd	2,73 ± 0,15	-2,14 ± 0,10	2,07 ± 0,11	1,46 ± 0,07
5	Cyjanidyno 3,5-diglukozyd	7,14 ± 0,40	-1,47 ± 0,05	7,77 ± 0,39	7,99 ± 0,41
6	Pelargonidyno 3-(2'-glukosylo)rutozyd	10,77 ± 0,60	3,27 ± 0,13	5,82 ± 0,25	3,07 ± 0,12
7	Cyjanidyno 3-(2'-ksylosylozo)rutozyd	0,77 ± 0,04	-8,99 ± 0,37	-4,45 ± 0,22	-6,07 ± 0,31
8	Cyjanidyno 3-sambubiozydo-5-ramnozyd	-7,80 ± 0,44	-11,12 ± 0,46	-7,36 ± 0,34	-8,83 ± 0,44
9	Kwercetyny (2'-glukozylo)rutozyd	10,74 ± 0,60	7,09 ± 0,29	7,19 ± 0,36	-6,18 ± 0,31
10	Kwercetyny galactozylramnozyd	4,31 ± 0,24	5,62 ± 0,23	-0,33 ± 0,01	-10,04 ± 0,51
11	Kwercetyny diglukozyd	6,44 ± 0,36	5,08 ± 0,21	5,05 ± 0,24	1,94 ± 0,10
12	Cyjanidyno 3-soforozyd	-9,37 ± 0,53	-9,38 ± 0,39	-8,30 ± 0,36	-9,62 ± 0,48
13	Cyjanidyno 3-sambubiozyd	5,84 ± 0,31	1,98 ± 0,08	7,68 ± 0,34	6,79 ± 0,34
14	Cyjanidyno 3-glukozyd	4,77 ± 0,27	0,48 ± 0,02	5,14 ± 0,25	5,10 ± 0,26
15	Cyjanidyno 3-rutozyd	4,23 ± 0,24	0,31 ± 0,01	5,33 ± 0,35	5,21 ± 0,26
16	Pelargonidyno 3-soforozyd	8,43 ± 0,47	-11,22 ± 0,34	-9,90 ± 0,51	7,81 ± 0,39
17	Pelargonidyno 3-rutozyd	6,79 ± 0,38	-1,06 ± 0,03	1,59 ± 0,09	0,41 ± 0,01
18	Pelargonidyno 3-sambubiozyd	2,08 ± 0,12	-0,38 ± 0,02	-2,37 ± 0,15	-9,10 ± 0,46

19	Pelargonidyno 3-glukozyd	3,90 ± 0,22	0,97 ± 0,05	-6,04 ± 0,36	0,61 ± 0,03
20	Ellaginianu pentozyd izomer 1	-8,51 ± 0,47	-0,13 ± 0,02	-6,68 ± 0,34	-8,68 ± 0,43
21	Ellaginianu pentozyd izomer 2	-2,40 ± 0,13	-10,35 ± 0,45	-2,42 ± 0,12	-2,71 ± 0,14
22	Ellaginianu 4-acetylo arabinozyd	-6,42 ± 0,36	1,31 ± 0,03	-5,33 ± 0,27	-7,37 ± 0,37
23	Ellaginianu 4-acetylo ksylozyd	-1,50 ± 0,08	-10,11 ± 0,42	-9,09 ± 0,45	-0,52 ± 0,01
24	Metylo ellaginianu pentozyd	3,43 ± 0,12	1,25 ± 0,05	2,66 ± 0,13	1,70 ± 0,08
25	Kwas ellaginowy	-8,83 ± 0,51	-1,01 ± 0,04	4,05 ± 0,21	9,33 ± 0,41
26	Kwercetyny glukuronid	5,98 ± 0,36	6,77 ± 0,28	2,97 ± 0,15	-5,78 ± 0,26
27	Kwercetyny galaktozyd	-2,43 ± 0,15	3,13 ± 0,13	0,49 ± 0,02	1,51 ± 0,1
28	Kwercetyny glukozyd	5,39 ± 0,31	0,07 ± 0,003	3,15 ± 0,16	10,36 ± 0,25
29	Metylokwercetyny glukuronid	2,22 ± 0,21	1,58 ± 0,08	0,46 ± 0,02	-7,09 ± 0,31
30	Kemferolu glukuronid	-6,79 ± 0,34	0,72 ± 0,02	-7,16 ± 0,36	-9,57 ± 0,15
31	Sanguiina-H6	0,70 ± 0,03	1,88 ± 0,09	-1,73 ± 0,08	-4,93 ± 0,25
32	Sanguiina-H10	3,29 ± 0,18	0,80 ± 0,02	0,57 ± 0,03	0,82 ± 0,02
33	Sanguiina-H2	0,98 ± 0,05	-6,46 ± 0,25	1,62 ± 0,08	-3,27 ± 0,14

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek względem zawartości w próbce porównawczej – MALINA #1

PORZECZKA #1 – (MATERIAŁ ODNIESIENIA)

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram uzyskany dla ekstraktu z badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas cytrynowy
2	Kwas askorbinowy
3	Delfinidyny 3-galaktozyd
4	Delfinidyny 3-glukozyd
5	Delfinidyny 3-rutozyd
6	Myricetyny 3-(6''-malonylo)glukozyd
7	Kwercetyny 3-(6''-malonylo)glukozyd
8	Delfinidyny 3-(6''-kumarylo)glukozyd
9	Malwidyny 3-galaktozyd
10	Cyjanidyny 3-glukozyd
11	Cyjanidyny 3-rutozyd
12	Petunidyny 3-rutozyd
13	Peonidyny 3-galaktozyd
14	Peonidyny 3-glukozyd
15	Peonidyny 3-rutozyd
16	Isohamnetyny 3-rutozyd

17	Miricetyny 3-glukuronid
18	Miricetyny 3-rutozyd
19	Miricetyny 3-glukozyd
20	Aurezydyny glukozyd
21	Kwercetyny 3-rutozyd
22	Kwercetyny 3-glukozyd
23	Kemferolu 3-rutozyd
24	Kemferolu 3-galaktozyd
25	Kemferolu 3-glukozyd

Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą procentową zmianę składników w próbkach porzeczek poddanych, w warunkach polowych, działaniu naturalnych środków ochrony roślin.

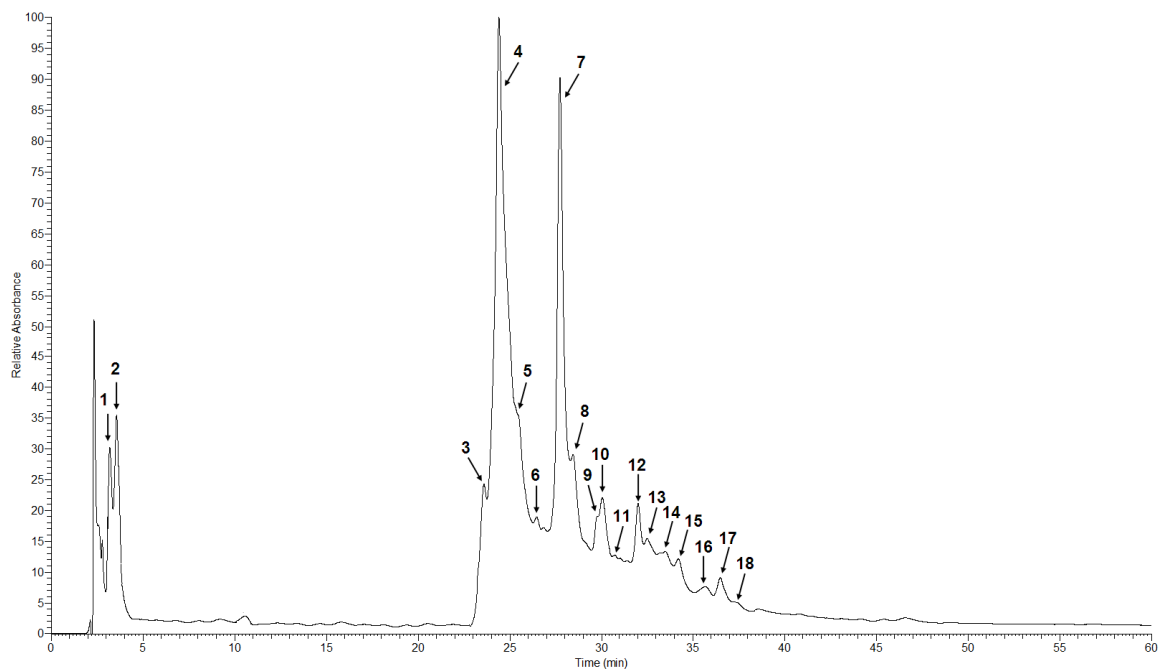
Lp.	ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU*			
		[%]			
		PORZECZKA #2	PORZECZKA #3	PORZECZKA #4	PORZECZKA #5
1	Kwas cytrynowy	2,38 ± 0,13	4,21 ± 0,17	5,11 ± 0,26	-1,40 ± 0,05
2	Kwas askorbinowy	-1,86 ± 0,10	6,90 ± 0,28	-1,37 ± 0,08	2,74 ± 0,13
3	Delfinidyny 3-galaktozyd	-0,47 ± 0,01	2,23 ± 0,09	1,93 ± 0,15	2,17 ± 0,16
4	Delfinidyny 3-glukozyd	-3,71 ± 0,003	-3,27 ± 0,16	-5,06 ± 0,25	-6,25 ± 0,34
5	Delfinidyny 3-rutozyd	0,11 ± 0,02	2,10 ± 0,12	1,69 ± 0,09	0,38 ± 0,03
6	Myricetyny 3-(6''-malonylo)glukozyd	0,01 ± 0,11	-5,14 ± 0,21	-5,80 ± 0,31	-5,88 ± 0,29
7	Kwercetyny 3-(6''-malonylo)glukozyd	0,39 ± 0,20	-3,43 ± 0,15	-4,72 ± 0,25	-6,12 ± 0,33
8	Delfinidyny 3-(6''-kumarylo)glukozyd	1,95 ± 0,13	4,12 ± 0,19	-8,18 ± 0,44	-8,22 ± 0,46
9	Malwidyny 3-galaktozyd	3,52 ± 0,03	-6,47 ± 0,31	7,59 ± 0,39	2,71 ± 0,16
10	Cyjanidyny 3-glukozyd	-2,38 ± 0,07	0,59 ± 0,03	-0,91 ± 0,07	-1,74 ± 0,10
11	Cyjanidyny 3-rutozyd	0,49 ± 0,03	1,01 ± 0,05	0,78 ± 0,04	-0,24 ± 0,02
12	Petunidyny 3-rutozyd	-1,25 ± 0,05	0,51 ± 0,03	-0,80 ± 0,05	-3,38 ± 0,14
13	Peonidyny 3-galaktozyd	-0,84 ± 0,05	3,52 ± 0,16	1,71 ± 0,09	-1,50 ± 0,09
14	Peonidyny 3-glukozyd	0,83 ± 0,03	-2,42 ± 0,11	-2,52 ± 0,15	-3,61 ± 0,21
15	Peonidyny 3-rutozyd	-3,77 ± 0,22	-0,15 ± 0,02	-9,84 ± 0,55	-3,96 ± 0,23
16	Isohamnetyny 3-rutozyd	-0,58 ± 0,01	-0,87 ± 0,06	-2,92 ± 0,16	-5,67 ± 0,33
17	Miricetyny 3-glukuronid	0,14 ± 0,006	1,00 ± 0,07	3,42 ± 0,19	-6,31 ± 0,39

18	Miricetyny 3-rutozyd	$0,15 \pm 0,01$	$-2,36 \pm 0,11$	$-2,10 \pm 0,16$	$-6,47 \pm 0,46$
19	Miricetyny 3-glukozyd	$0,74 \pm 0,05$	$-1,72 \pm 0,08$	$-1,42 \pm 0,08$	$-4,94 \pm 0,25$
20	Aurezydyny glukozyd	$-1,74 \pm 0,10$	$7,58 \pm 0,33$	$10,05 \pm 0,51$	$4,97 \pm 0,25$
21	Kwercetyny 3-rutozyd	$1,67 \pm 0,08$	$-4,18 \pm 0,19$	$-3,10 \pm 0,19$	$-6,07 \pm 0,31$
22	Kwercetyny 3-glukozyd	$2,82 \pm 0,15$	$-0,86 \pm 0,05$	$-1,11 \pm 0,07$	$-4,81 \pm 0,16$
23	Kemferolu 3-rutozyd	$-1,41 \pm 0,09$	$1,99 \pm 0,09$	$-3,02 \pm 0,16$	$-4,02 \pm 0,22$
24	Kemferolu 3-galaktozyd	$-1,30 \pm 0,08$	$-2,05 \pm 0,12$	$-1,90 \pm 0,11$	$-3,27 \pm 0,16$
25	Kemferolu 3-glukozyd	$1,68 \pm 0,12$	$-2,16 \pm 0,16$	$-2,26 \pm 0,17$	$-4,72 \pm 0,55$

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek względem zawartości w próbce porównawczej – PORZECZKA #1

TRUSKAWKA #1 – (MATERIAŁ ODNIESIENIA)

Poniżej zamieszczono przykładowy chromatogram uzyskany dla ekstraktu z badanej próbki, tabelę zawierającą zidentyfikowane anality.



Lp.	ZIDENTYFIKOWANY ANALIT
1	Kwas cytrynowy
2	Kwas askorbinowy
3	Cyjanidyny 3-soforozyd
4	Cyjanidyny 3-glukozyd
5	Cyjanidyny 3-rutozyd
6	Pelargonidyny 3-glukozyd
7	Pelargonidyny 3-rutozyd
8	Ellaginiano ramnozyd isomer 1
9	Ellaginiano ramnozyd isomer 1
10	Petunidyny 3-glukozyd
11	Pelargonidyny 3-(malonylo)glukozyd
12	Pelargonidyny 3-(6'-acetylo)glukozyd
13	Kwercetyny 3-glukuronid
14	Kemferolu 3-glukuronid
15	Kemferolu 3-kumaryloglukozyd

16	Kemferol 3-glukozyd
17	Kemferolu 3-acetyloglukozyd
18	Bis-HDDP-glukozyd

Poniżej zamieszczono tabelę przedstawiającą procentową zmianę składników w próbkach truskawek poddanych, w warunkach polowych, działaniu naturalnych środków ochrony roślin.

Lp.	ANALIT	ZMIANA STĘŻENIA ANALITU*			
		[%]			
		TRUSKAWKA #2	TRUSKAWKA #3	TRUSKAWKA #4	TRUSKAWKA #5
1	Kwas cytrynowy	1,33 ± 0,07	4,81 ± 0,21	1,66 ± 0,08	-0,93 ± 0,06
2	Kwas askorbinowy	0,18 ± 0,01	4,07 ± 0,18	-1,77 ± 0,09	1,50 ± 0,09
3	Cyjanidyny 3-soforozyd	3,88 ± 0,22	-3,07 ± 0,13	-3,69 ± 0,18	0,86 ± 0,10
4	Cyjanidyny 3-glukozyd	-4,86 ± 0,32	4,78 ± 0,21	8,64 ± 0,43	4,04 ± 0,12
5	Cyjanidyny 3-rutozyd	-4,92 ± 0,36	-5,38 ± 0,22	-0,68 ± 0,03	-3,22 ± 0,19
6	Pelargonidyny 3-glukozyd	-7,01 ± 0,46	-0,26 ± 0,02	0,77 ± 0,04	-1,21 ± 0,05
7	Pelargonidyny 3-rutozyd	3,00 ± 0,18	-2,50 ± 0,13	-2,03 ± 0,10	-3,62 ± 0,21
8	Ellaginiano ramnozyd isomer 1	0,33 ± 0,02	2,31 ± 0,12	-0,31 ± 0,01	4,52 ± 0,36
9	Ellaginiano ramnozyd isomer 1	7,00 ± 0,66	4,11 ± 0,18	3,67 ± 0,19	5,90 ± 0,15
10	Petunidyny 3-glukozyd	12,05 ± 0,58	4,12 ± 0,16	2,22 ± 0,11	5,02 ± 0,25
11	Pelargonidyny 3-(malonylo)glukozyd	-7,32 ± 0,41	-1,71 ± 0,06	-0,21 ± 0,02	-0,41 ± 0,02
12	Pelargonidyny 3-(6'-acetylo)glukozyd	-9,23 ± 0,52	-4,33 ± 0,19	-2,00 ± 0,16	-1,15 ± 0,04
13	Kwercetyny 3-glukuronid	2,30 ± 0,13	0,15 ± 0,02	1,29 ± 0,08	3,67 ± 0,16
14	Kemferolu 3-glukuronid	-2,09 ± 0,16	-3,59 ± 0,41	-4,06 ± 0,21	-0,80 ± 0,06
15	Kemferolu 3-kumaryloglukozyd	2,07 ± 0,15	-0,22 ± 0,05	3,20 ± 0,32	-0,49 ± 0,04
16	Kemferol 3-glukozyd	1,00 ± 0,08	2,50 ± 0,03	-1,08 ± 0,06	4,54 ± 0,25
17	Kemferolu 3-acetyloglukozyd	4,38 ± 0,31	1,02 ± 0,01	4,05 ± 0,33	-0,01 ± 0,001
18	Bis-HDDP-glukozyd	-3,79 ± 0,33	-0,27 ± 0,02	-5,02 ± 0,42	3,06 ± 0,19

* - wartości dodatnie oznaczają wzrost stężenia analitu, natomiast ujemne jego spadek względem zawartości w próbce porównawczej – TRUSKAWKA #1

Podsumowanie

W ekstraktach zawarte są związki lotne, spośród których pochodne fenolowe i terpenowe (m.in. chryzantenol, tymol) wykazują działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne, a także hamujące wzrost grzybów pleśniowych. Pochodne fenolowe będące z charakteru kwasami wykazują też działanie bakteriostatyczne charakterystyczne dla kwasów organicznych. Próbki zawierają wiele cennych flawonoidów z różnych grup systematycznych (aglikonów oraz glikozydowanych) oraz kwasów fenolowych. Wszystkie związki fenolowe wykazują szereg korzystnych działań biologicznych: przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, niektóre z nich przeciwwirusowe, przeciwutleniające, przeciwrodnikowe, hamujące szereg enzymów niekorzystnie działających w produkcie spożywczym oraz w organizmie, wykazują działanie wspomagające odchudzanie na skutek hamowania enzymów trawiennych przewodu pokarmowego. Praktyczne znaczenie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze wykazują liczne w pochodne fenolu oraz słabe działanie antybakteryjne i przeciwgrzybicze wykazują pochodne terpenowe (eukaliptol, tymol). W jednej z próbek obecny jest terpen ingenol o silnym działaniu przeciwwirusowym w stosunku do wirusa HIV oraz jest inhibitorem protein kinazy C. Niestety testy starzeniowe ekstraktów wykazały ok 50% degradację z wytworzeniem analitów pochodnych o krótszych łańcuchach. Poważne straty nietlotnych, bardzo cennych flawonoidów i kwasów fenolowych zawartych w ekstraktach 1-6 w teście starzeniowym sugerują, że należy znaleźć odpowiedni sposób wytwarzania i przede wszystkim przechowywania preparatów z uwagi na ich przypuszczalną krótką przydatność do użycia. Te straty wynikają z tego, że kwasy fenolowe i flawonoidy są w końcowym efekcie degradowane do chinonów i winylowych pochodnych, które wykazują o wiele niższe aktywności biologiczne.

Zalecenia dla rolników

Uwzględniając występowanie chorób i szkodników na truskawce, malinie, czarnej porzeczce i winorośli uprawianych metodami ekologicznymi najefektywniejszymi sposobami ich ograniczania było:

- w truskawce : stosowanie preparatu „Ema5 z wrotyczem” oraz naprzemienne stosowanie preparatu „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym z probiotycznymi mikroorganizmami (PM) ekstraktem z pokrzywy w mieszaninie z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą w dawce 10 kg granulatu na 1 ha i po ostudzeniu dodanie PM
- w malinie: przeciw kistnikowi malinowcowi preparat „Ema5 z wrotyczem” oraz preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem PM, natomiast przeciw rdzy maliny preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM oraz preparat „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z pokrzywy z PM użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą i po ostudzeniu dodanie PM.
- w czarnej porzeczce: przeciwko przedziorkowi chmielowcowi i rdzy wejmutkowo-porzeczkowej preparat „Ema5 z wrotyczem” oraz preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem PM, natomiast przeciw antraknozie czarnej porzeczki „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy użyty na przemian z preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem PM po ostudzeniu.
- w winorośli: preparat „Ema5 z wrotyczem” oraz preparat sporządzony poprzez gotowanie granulatu wrotyczu z wodą z dodatkiem PM po ostudzeniu.

Stosowanie preparatów biologicznych miało bardzo korzystny wpływ na skład mikrobiomu roślin. Wyizolowano większą liczbę mikroorganizmów z roślin uprawianych metodami ekologicznymi w porównaniu z konwencjonalnymi. Ponadto najwięcej mikroorganizmów zarówno w przypadku izolacji z liści jak i z łodyg wyosabniano z roślin z obiektu, na którym stosowano preparat biologiczny „Ema5 z wrotyczem” z fermentowanym ekstraktem z mniszka lekarskiego i mleczu polnego oraz z pokrzywy i wrotyczu z PM . Również dużą liczebnością mikroorganizmów charakteryzowały się rośliny rosnące na poletkach traktowanych preparatem mikrobiologicznym „Ema5 z wrotyczem” dolistnie i dogłębowo

oraz preparatem sporządzonym poprzez gotowanie granulatu z wrotyczu z wodą z dodatkiem PM stosowanym dolistnie i doglebowo.

Metoda dezinformacji samców przeziernika porzeczkowca przy użyciu dyspenserów feromonowych okazała się bardzo efektywna, gdyż pod koniec roku praktycznie nie notowano uszkodzeń jednorocznych pędów.

W ekstraktach roślinnych sporządzanych z dodatkiem PM zawarte są związki lotne, spośród których pochodne fenolowe i terpenowe (m.in. chryzantenol, tymol) wykazują działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne, a także hamujące wzrost grzybów pleśniowych. Pochodne fenolowe będące z charakteru kwasami wykazują też działanie bakteriostatyczne charakterystyczne dla kwasów organicznych. Próbkę zawierają wiele cennych flawonoidów z różnych grup systematycznych (aglikonów oraz glikozydowanych) oraz kwasów fenolowych. Wszystkie związki fenolowe wykazują szereg korzystnych działań biologicznych: przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, niektóre z nich przeciwwirusowe, przeciwutleniające, przeciwrodnikowe. Praktyczne znaczenie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze wykazują liczne pochodne fenolu oraz słabe działanie antybakteryjne i przeciwgrzybicze wykazują pochodne terpenowe (eukaliptol, tymol). W jednej z próbek obecny jest terpen ingenol o silnym działaniu przeciwwirusowym w stosunku do wirusa HIV oraz jest inhibitorem protein kinazy C. Testy starzeniowe ekstraktów wykazały ok 50% degradację z wytworzeniem analitów pochodnych o krótszych łańcuchach. Poważne straty nielotnych, bardzo cennych flawonoidów i kwasów fenolowych zawartych w ekstraktach 1-6 w teście starzeniowym sugerują, że należy znaleźć odpowiedni sposób wytwarzania i przede wszystkim przechowywania preparatów z uwagi na ich przypuszczalną krótką przydatność do użycia. Te straty wynikają z degradacji kwasów fenolowych i flawonoidów do chinonów i winylowych pochodnych, które wykazują o wiele niższe aktywności biologiczne.

Nie stwierdzono jednoznacznego i istotnego (na poziomie $P < 0,05$) wpływu przeprowadzonych zabiegów ochrony ekologicznej na zawartość związków fenolowych ogółem i aktywności przeciw-cholinoesterazowych wybranych owoców. Nie mniej w obiekcie, w którym wykorzystano preparat „Ema5 z wrotyczem” łącznie z fermentowanym ekstraktem z wrotyczu, mniszka lekarskiego, mleczu polnego i pokrzywy na przemian

z preparatem z gotowanego granulatu z wrotyczu z dodatkiem probiotycznych mikroorganizmów stwierdzono w roślinach najwięcej związków fenolowych.

Ekstrakty z owoców porzeczki czarnej stanowiły najcenniejsze źródło związków fenolowych ogółem. Jednak największą zdolność do hamowania aktywności cholinoesteraz stwierdzono w przypadku wodnych wyciągów z owoców maliny. Sugeruje się, że istotniejszą rolę w kształtowaniu aktywności anty- cholinoesterazowej należy przypisać nie ogólnej zawartości związków fenolowych w badanym surowcu roślinnym, ale konkretnym substancjom w nim występującym. Dlatego też w następnej kolejności postanowiono wykorzystać chromatograficzne metody analizy jakościowej w celu wstępnej identyfikacji związków fenolowych warunkujących wysokie zdolności do hamowania aktywności cholinoesteraz przez ekstrakt z owoców maliny.

W celu opracowania szczepionki dla roślin jagodowych zaproponowano skład pożywki dla mikroorganizmów oraz spośród wyizolowanych z roślin oraz ze strefy ryzosferowej truskawki, maliny i czarnej porzeczki bakterii endogennych i egzogennych wytypowano izolaty o największym potencjale biotechnologicznym. Dwa izolaty gatunku *Pseudomonas putida*, jeden wyizolowany ze strefy ryzosferowej maliny, a drugi endofit wyizolowany z korzeni maliny wpływają korzystnie na ukorzenie oraz długość pędów roślin. Endofit *Lysobacter enzymogenes* wyizolowany z korzeni czarnej porzeczki charakteryzuje się aktywnością antagonistyczną wobec wielu patogenów roślin.