

Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczy
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach
ul. B. Prusa 14, 08-110 Siedlce
e-mail: robert.krzyzanowski@uph.edu.pl

ROBERT KRZYŻANOWSKI, HUBERT SYTYKIEWICZ, GRZEGORZ
CHRZANOWSKI, JOLANTA CUDZIŁO-ABRAMCZUK

**Występowanie populacji wybranych mikroorganizmów
w środowisku glebowym
orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.)**

Occurrence of the population of selected microorganisms in the soil environment
of walnut (*Juglans regia* L.)

Streszczenie. W ogrodach, a także na terenie plantacji produkcyjnych w Polsce występuje szereg odmian orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.). W trakcie sezonu wegetacyjnego drzewa te wydzielają do środowiska semiozwiązki o charakterze lotnych i nielotnych wtórnych metabolitów. Przeważają wśród nich związki fenolowe, flawonoidy, naftochinony i terpenoidy. W literaturze przedmiotu istnieją tylko szacunkowe dane dotyczące roli tych metabolitów w interakcjach środowiskowych. Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie, czy na mikroorganizmy glebowe wpływa środowisko glebowe orzecha włoskiego. Badania izolacji mikroorganizmów glebowych przeprowadzono na selektywnych podłożach mikrobiologicznych: agarze Czapek-Doxa (BTL), agarze Sabourauda z chloramfenikolem i agarze odżywczym. Wykazano, że wtórne metabolity orzecha włoskiego przedostające się do gleby w znacznym stopniu mogą wpływać na ilość mikroorganizmów występujących w glebie, ponieważ utrzymują liczbę bakterii na stałym poziomie oraz sukcesywnie zmniejszają liczbę grzybów.

Słowa kluczowe: orzech włoski, gleba, bakterie, grzyby

WSTĘP

Orzech włoski (*Juglans regia* L.) jest popularną rośliną uprawną, rosnącą zarówno w ogrodach przydomowych, jak i w sadach orzechowych [Ebrahimi i in. 2009, Rather i in. 2012, Verma i in. 2013]. Orzechy, w tym orzechy włoskie, są tradycyjną żywnością w krajach śródziemnomorskich, Ameryce Południowej i Azji, zawierają 52–70% kwasów tłuszczowych (kwas oleinowy, kwas linolowy i kwas linolenowy) oraz 14–24%

aminokwasów (arginina, leucyna) [Gómez-Caravaca i in. 2008]. Ponadto zawierają cukrowce (błonnik pokarmowy), witaminy (A, C, E), minerały (magnez, potas, fosfor, siarka, miedź, żelazo), melatoninę, sterole, kwasy fenolowe i flawonoidy [Chopra i in. 1986, Kris-Etherton i in. 1999, Labuckas i in. 2008, Pereira i in. 2008, Verma i in. 2013, Christopoulos i Tsantili 2015].

Rośliny są kolonizowane przez mikroorganizmy, zasiedlające powierzchnie organów nadziemnych i podziemnych, stanowiących nisze do powstawania różnych mikrośrodków, takich jak fylosfera lub ryzosfera [Ibekwe i Grieve 2004, Junker i in. 2011, Fuernkranz i in. 2012]. Ważną cechą wpływającą na związek mikroorganizmów z rośliną jest dostępność substancji odżywczych i ich rozmieszczenie na powierzchni rośliny [Lindow i Brandl 2003]. Wydzielane przez korzenie podstawowe metabolity pomagają tworzyć populacje pożytecznych bakterii, które z kolei wpływają pozytywnie na zdrowie roślin i hamują wzrost innych drobnoustrojów [Berg i Smalla 2009, Berendsen i in. 2012]. Wpływ wtórnych metabolitów na interakcje mikroorganizmów z roślinami jest słabo poznany. Wiele metabolitów wtórnych, takich jak terpeny, fenylopropanoidy, benzenoidy, związki zawierające azot i siarkę, emitowanych z tkanek roślinnych w postaci lotnych związków organicznych (VOCs) wchodzi w interakcje z mikroorganizmami glebowymi [Dudareva i in. 2006]. Inne VOCs obejmują związki C1, takie jak metanol, i inne związki utlenione o krótkim łańcuchu [Seco i in. 2007] oraz pochodne kwasów tłuszczowych o niskiej masie cząsteczkowej [Dudareva i in. 2006]. Udowodniono, że VOCs hamują rozwój mikroorganizmów [Kalemba i Kunicka 2003, Tripathi i in. 2011]. Obecnie istnieje coraz więcej dowodów na to, że VOCs stanowią ważny element w tworzeniu interakcji między roślinami i mikroorganizmami [Junker i in. 2011, Huang i in. 2012, Junker i Tholl 2013].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu wtórnych metabolitów orzecha włoskiego przedostających się do gleby na ogólną liczbę bytujących w niej bakterii, grzybów strzępkowych oraz drożdżoidalnych.

MATERIAŁY I METODY

Eksperyment. Aby określić wpływ metabolitów orzecha włoskiego na występowanie mikroorganizmów w glebie, wyznaczono trzy strefy kontrolne:

- strefę I – w odległości 2 m od pnia drzewa (bezpośrednio w obrębie korony drzewa),
- strefę II – w odległości 4 m od pnia drzewa (na granicy korony drzewa),
- strefę III – w odległości 6 m od pnia drzewa (poza koroną drzewa).

Obserwacje prowadzono w roku 2011 na dwóch stanowiskach orzecha włoskiego, oznaczonych jako M1 i M2, o zbliżonych parametrach wieku, rozwoju oraz wielkości, zlokalizowanych na terenie ogrodów przydomowych w Siedlcach. Charakteryzowały się one następującymi parametrami (wyznaczono je dalmierzem Leica Disto, Hexagon Group, Szwecja): M1 – wysokość całkowita 6,29 m, szerokość korony 10,04 m; M2 – wysokość całkowita 7,74 m, szerokość korony 8,43 m. Badane liście złożone występowały na podobnej wysokości: 2,8 m (M1) i 2,4 m (M2).

Przygotowanie roztworu glebowego. Każdorazowo pobierano po 5 prób na głębokości 5 cm z każdej wyznaczonej strefy. W celu otrzymania roztworu glebowego odważono 5 g badanej próby gleby i wsypano do sterylnej probówki Falcona zawierającej 45 cm³

roztworu NaCl o stężeniu 0,85%. Całość wytrząsano przez 15 min w celu wymycia mikroorganizmów z cząstek gleby. Sporządzony roztwór glebowy traktowano jako rozcieńczenie 10^{-1} . W kolejnym etapie przygotowano serię rozcieńczeń roztworu glebowego.

Oznaczanie ogólnej liczby bakterii tlenowych. Ogólną liczbę bakterii określono, stosując posiew powierzchniowy z zawiesiny gleby w roztworze NaCl o stężeniu 0,85% na podłoże agaru odżywczego. Na płytce Petriego (\varnothing 90 mm) z pożywką, wprowadzono po $0,5 \text{ cm}^3$ odpowiedniego rozcieńczenia roztworu glebowego (od 10^{-1} do 10^{-6}), który rozprowadzono na całą powierzchnię za pomocą sterylnej głaszczki. Inkubację prowadzono przez 14 dni w temperaturze 28°C [Grabińska-Łoniewska i in. 1996]. Wynik podano jako wartość średnią 3 powtórzeń ogólnej liczby bakterii w przeliczeniu na 1 g s.m. gleby.

Określanie ogólnej liczby grzybów strzępkowych. W celu określenia ogólnej liczebności grzybów w badanych próbkach glebowych wykonano posiew powierzchniowy roztworów glebowych na selektywne podłoże agarowe Czapek-Doxa (BTL). W celu zahamowania wzrostu bakterii do podłoża hodowlanego dodano streptomycynę w ilości $30 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ pożywki. Na płytce Petriego (\varnothing 90 mm) z agarem wprowadzono po $0,5 \text{ cm}^3$ odpowiedniego rozcieńczenia roztworu glebowego (od 10^{-1} do 10^{-6}), które następnie rozprowadzono po całej powierzchni jałową głaszczką. Inkubację prowadzono w 25°C przez 14 dni [PN-89/2-04111/03]. Wynik podano jako wartość średnią 3 powtórzeń ogólnej liczby grzybów w 1 g s.m. gleby.

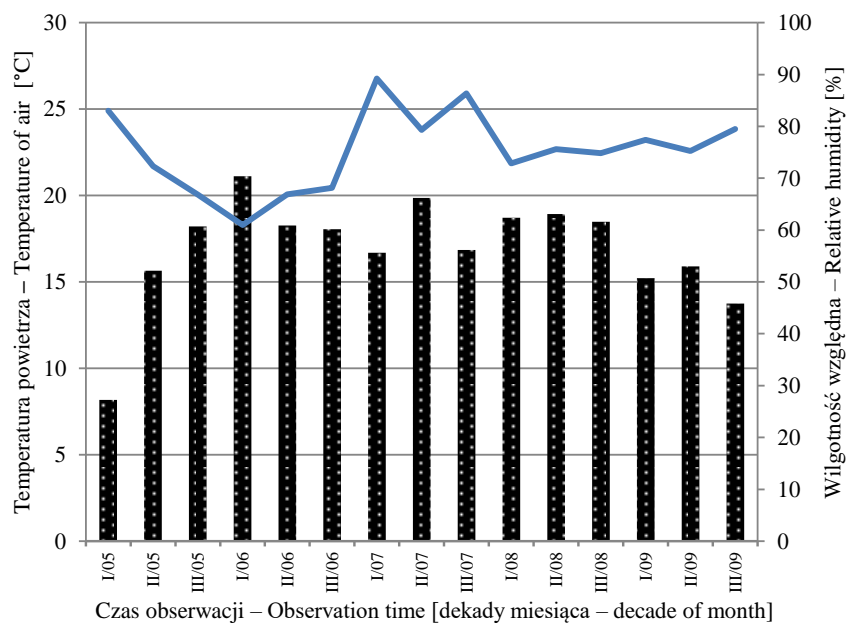
Oznaczanie liczby grzybów drożdżoidalnych. Liczebność grzybów drożdżoidalnych w badanych próbkach gleb określono wg metody opisanej przez Patel i Rajkumar [2009], z wykorzystaniem agaru Sabourauda. Na płytce Petriego (\varnothing 90 mm) z pożywką wprowadzono po $0,5 \text{ cm}^3$ odpowiedniego rozcieńczenia roztworu glebowego (od 10^{-1} do 10^{-6}), który rozprowadzono na całą powierzchnię za pomocą sterylnej głaszczki. Inkubację prowadzono przez 14 dni w temperaturze 28°C . Wynik podano jako wartość średnią 3 powtórzeń ogólnej liczby drożdżaków w przeliczeniu na 1 g s.m. gleby.

Określenie temperatury i wilgotności powietrza atmosferycznego. Warunki pogodowe (temperatura, wilgotność względna) mierzono miernikiem Kestrel 4000 (Nielsen-Kellerman, USA) i odczytywano z użyciem Kestrel Communicator Software ver. 2.5/2014 (Nielsen-Kellerman, USA). Pomiaru dokonywano w systemie ciągłym od maja do września, w odstępach 2-godzinnych.

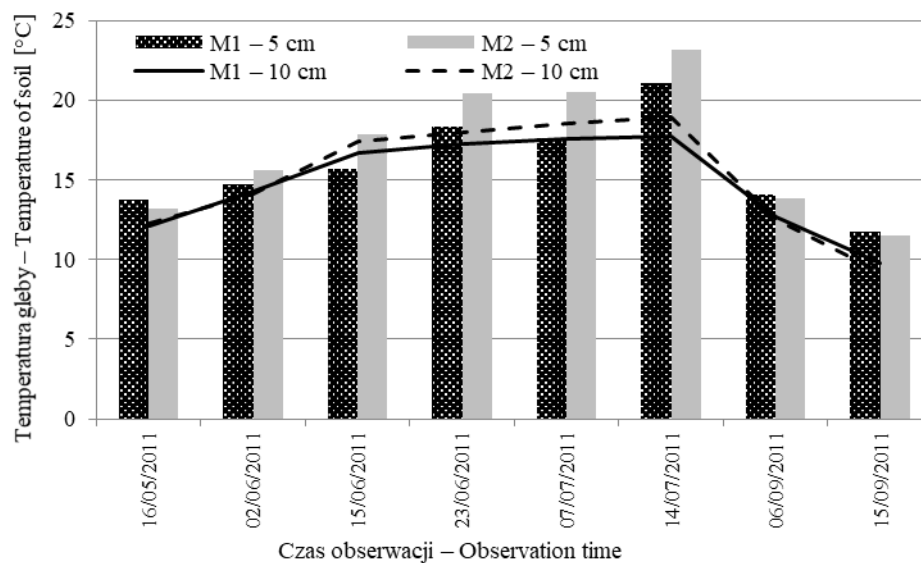
Określenie temperatury gleby. Warunki środowiska glebowego w warstwie gleby strefy korzeniowej (2 i 4 m od pnia) oraz pozakorzeniowej (6 m od pnia) określano bagnetowym miernikiem temperatury od maja do września, w odstępach tygodniowych. Odczytu dokonywano na dwóch głębokościach (5 i 10 cm), w czterech miejscach dla każdej z głębokości zgodnie ze stronami świata, odczyt powtarzano trzykrotnie.

WYNIKI

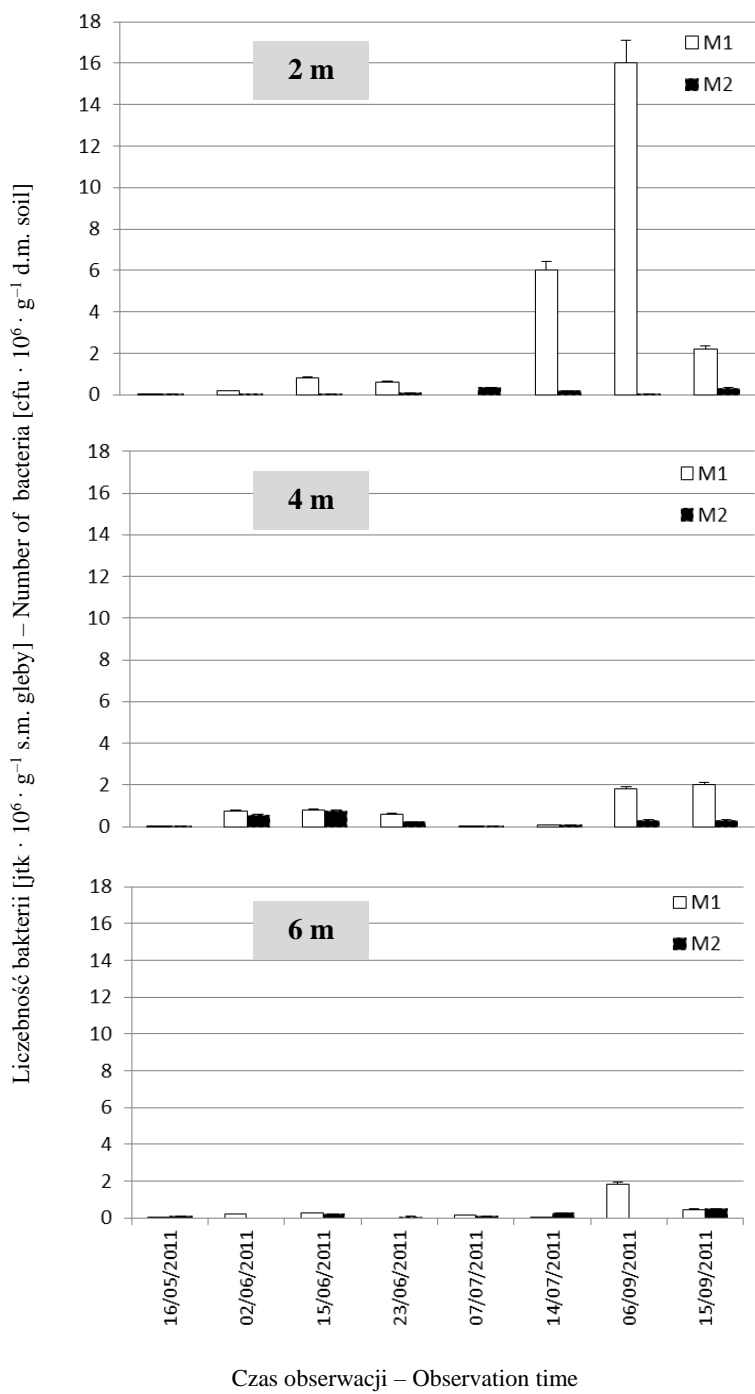
Wykazano obecność bakterii we wszystkich badanych strefach (2, 4 i 6 m) obu stanowisk orzecha włoskiego. W odległości 2 m od pnia w okresie od 16.05 do 7.07 ogólna liczba bakterii nie przekroczyła $10^6 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. gleby, w obu stanowiskach. W okresie od 7.07, kiedy wilgotność względna osiągnęła wartość powyżej 90%, a temperatura powietrza ulegała wahaniom (rys. 1), zauważono zróżnicowanie ogólnej liczby bakterii



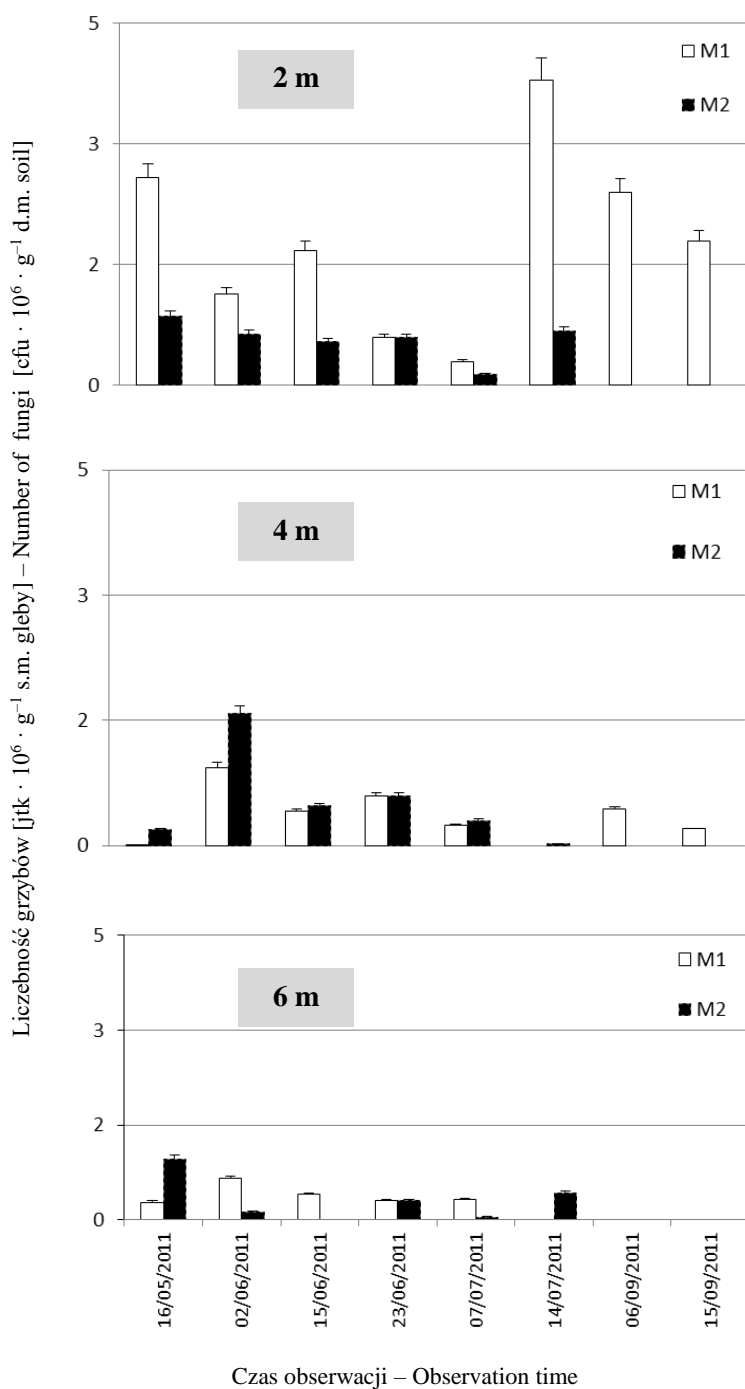
Rys. 1. Warunki pogodowe w roku 2011: wilgotność względna (linia) i temperatura powietrza (słupki)
 Fig. 1. Weather conditions in year 2011: relative humidity (line) and temperature measurement (bars)



Rys. 2. Temperatura gleby pod drzewami orzecha włoskiego M1 i M2 w roku 2011: głębokość 5 cm (słupki), 10 cm (linie)
 Fig. 2. Temperature of soil under walnut trees M1 and M2 in year 2011: depth 5 cm (bars), 10 cm (lines)

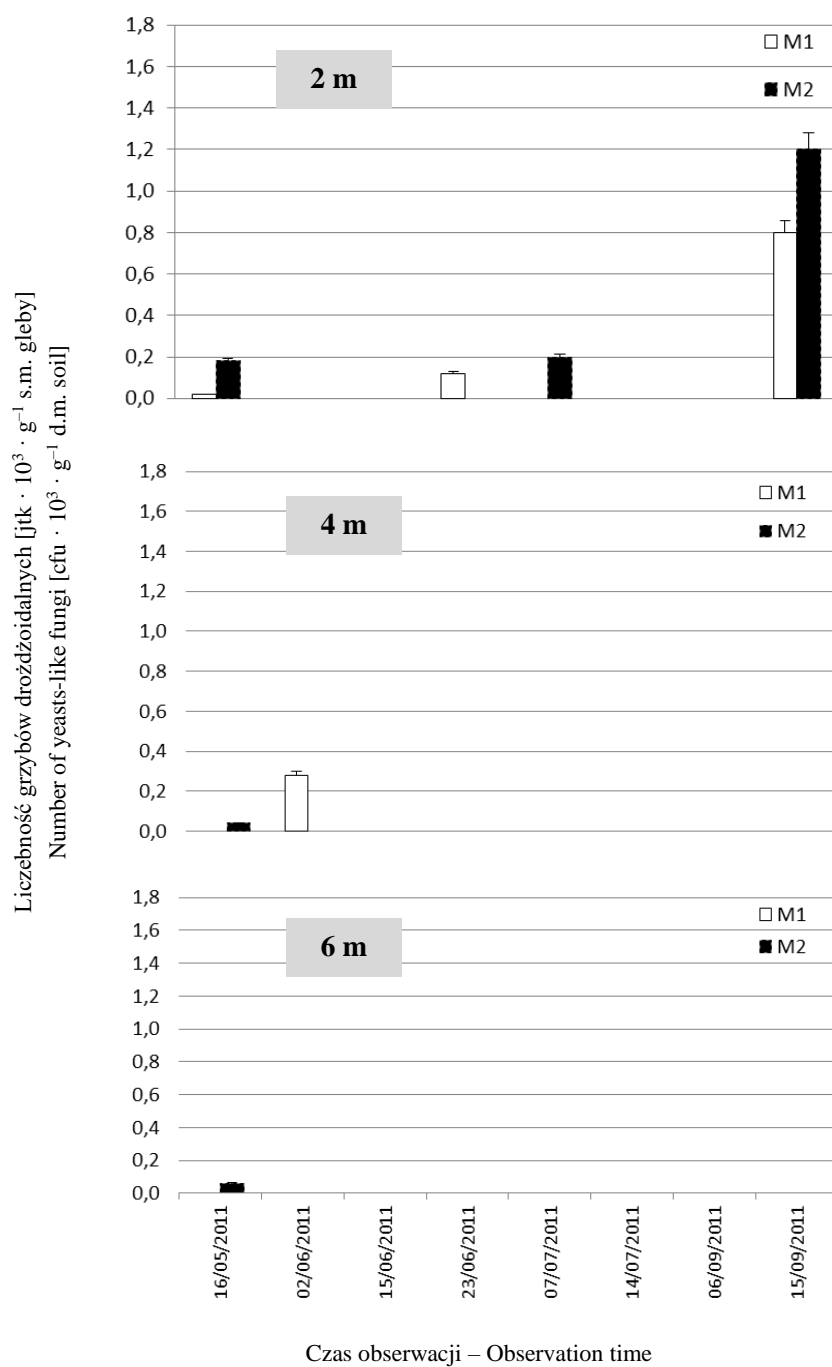


Rys. 3. Liczebność bakterii
 Fig. 3. Number of bacteria



Rys. 4. Liczebność grzybów

Fig. 4. Number of fungi



Rys. 5. Liczebność grzybów drożdżoidalnych
Fig. 5. Number of yeasts-like fungi

między dwoma stanowiskami. W stanowisku M2 ilość bakterii utrzymywała się na stałym poziomie (wyższe i stałe temperatury gleby), podczas gdy w stanowisku M1 odnotowano wzrost liczebności bakterii do $1,6 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby (niższe i skokowe temperatury gleby) – rys. 2, 3.

W odległości 4 m od pnia ilość bakterii w terminie 06.09 nie przekroczyła wartości 10^6 jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby. Dopiero w okresie jesiennym stwierdzono zróżnicowanie w ogólnej liczbie bakterii, wyraźnie związane z obniżeniem temperatury powietrza i gleby (rys. 1–3).

W strefie trzeciej, w odległości 6 m od pnia, stwierdzono najmniejszą ogólną liczbę bakterii. Przeprowadzone badania wykazały, że w obu stanowiskach, M1 i M2, w okresie 16.05–14.07 ogólna liczba bakterii nie przekroczyła wartości $0,3 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby (rys. 3). Jesienią (od 06.09 do 15.09) stwierdzono wyraźne zróżnicowanie ogólnej liczby bakterii w poszczególnych stanowiskach: w stanowisku M1 odnotowano wzrost liczebności bakterii do $1,8 \cdot 10^7$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby, a w M2 liczebność ta nie przekroczyła $0,3 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby (rys. 3).

Na podstawie przeprowadzonych badań określono ogólną liczbę grzybów strzępkowych we wszystkich profilach w okresie od 16.05 do 15.09. Najwięcej grzybów występowało w glebie w bezpośrednim sąsiedztwie orzecha włoskiego (2 m). Najmniejszą liczbę grzybów ($0,86 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby) odnotowano na stanowisku M2 (16.05), w którym sukcesywnie zmniejszała się ona do wartości $1,8 \cdot 10^5$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby (15.09). Wraz ze zwiększaniem odległości od pnia liczba grzybów malała. W odległości 4 m stwierdzono zmniejszenie ogólnej liczby grzybów z $0,5 \cdot 10^6$ do $1,8 \cdot 10^4$ (M1) oraz z $0,89 \cdot 10^6$ do 0 jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby (M2). W strefie trzeciej (6 m) dla obu stanowisk orzecha włoskiego stwierdzono najmniej grzybów w testowanym profilu (rys. 4).

Trzecim etapem oceny wpływu metabolitów orzecha włoskiego na mikroorganizmy glebowe było określenie liczby grzybów drożdżoidalnych. Wykazano obecność grzybów drożdżoidalnych tylko w strefach bezpośredniej obecności orzecha włoskiego (2–4 m), natomiast nie stwierdzono tych grzybów w strefie 6 m, czyli poza koroną drzewa (rys. 5).

DYSKUSJA

Drzewa z rodziny Juglandaceae, podobnie jak inne rośliny, uwalniają allelozwiązki do środowiska w różny sposób. Jednym z nich jest ewaporacja, czyli wydzielanie lotnych substancji przez gruczoły zlokalizowane w liściach. Innym sposobem uwalniania metabolitów jest ługowanie z powierzchni różnych organów drzew orzechowych; tą drogą są wymywane związki fenolowe i naftochinony. Allelozwiązkiem charakterystycznym dla drzew z rodziny orzechowatych, w szczególności dla takich gatunków, jak orzech czarny, orzech włoski i orzech szary, jest juglon (5-hydroksy-1,4-naftochinon) [Montenegro i in. 2010, Kozak i in. 2014]. Jego biosynteza przebiega w liściach i innych zielonych tkankach orzecha, skąd jest transportowany przez elementy sitowe łyka do pozostałych organów [Matok 2010]. W tkankach orzecha związek ten występuje w postaci nietoksycznej jako 4-glukozyd 1,4,5-trichydroksynaftalenu, a po przedostaniu się do gleby przechodzi w wolny aglikon. W pierwszym etapie β -glukozydaza powoduje hydrolizę glikozydu juglonu do hydrojuglonu, który jest utleniany do aktywnego biologicznie juglonu. Ulega on w glebie dalszym przemianom, w wyniku silnego powinowactwa grup karbonylowych

do elektronów zachodzi redukcja juglonu do semichinonów lub nawet do fenoli, które biorą udział w reakcji sprzężania oksydacyjnego z molekułami próchnicy [Von Kiparski i in. 2007, Kozak i in. 2014]. Matok [2010] wykazał zawartość juglonu w organach orzecha włoskiego ($43 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. kwiatostanów męskich, $21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. zielonych okryw owoców oraz $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. liści) oraz wskazał, że stężenie juglonu w liściach wzrasta w sezonie wegetacyjnym.

Analizy chromatograficzne przeprowadzone przez Chrzanowskiego i in. [2011] wykazały, że w męskich kwiatostanach, liściach i okrywach owoców są obecne wolne kwasy fenolowe: pochodne kwasu hydroksycynamonowego (kwasy *trans*-cynamonowy, *o*-kumarowy, *p*-kumarowy, kawowy, ferulowy i chlorogenowy), hydroksylowane pochodne kwasu benzoowego (wanilinowy, *p*-hydroksybenzoowy, syringowy, galusowy) i kwas garbnikowy. Autorzy stwierdzili, że ilość kwasu chlorogenowego w zielonych łuskach była dwukrotnie większa niż w liściach i czterokrotnie wyższa niż w kwiatostanach męskich. Kwas *p*-kumarowy i *o*-kumarowy wystąpiły w liściach i okrywach owoców w podobnych ilościach. Duże stężenie kwasów kawowego i ferulowego stwierdzono w tkankach liści orzecha włoskiego, a kwas wanilinowy był dominującym składnikiem męskich kwiatostanów. Zawartość kwasu *p*-hydroksybenzoowego była najwyższa w okrywach orzecha włoskiego. Kwas syringowy został oznaczony przez autorów prezentowanej pracy w zielonych okrywach orzecha włoskiego. Jednakże Nour i in. [2013] stwierdzili, że kwas elagowy był oprócz kwasu *trans*-cynamonowego i chlorogenowego najobficiej występującym kwasem fenolowym w liściach orzecha włoskiego. Jakopic i in. [2008] również wykryli w tkankach orzecha kwasy fenolowe: syringowy, synapinowy, chlorogenowy, wanilinowy i kawowy. Wyniki te były podobne do uzyskanych przez Pelvana i in. [2018], którzy wykryli łącznie dziesięć kwasów fenolowych, w tym sześć hydroksylowanych pochodnych kwasu benzoowego (kwas galusowy, kwas protokatechowy, kwas salicylowy, kwas syringowy, kwas wanilinowy i kwas 4-hydroksybenzoowy) oraz cztery pochodne kwasu hydroksycynamonowego (kwas kawowy, kwas ferulowy, kwas *o*-kumarowy i kwas synapinowy).

Khan [1982] wyjaśnia, że niezwiązane związki fenolowe ługowane z organów drzew mogą być z powrotem uwalniane do roztworu gleby lub zostać zmineralizowane w wyniku zmian warunków środowiskowych, jakie zachodzą dzięki obecności mikroorganizmów glebowych. Reakcje chemiczne pomiędzy wprowadzonym do środowiska glebowego związkiem lub jego metabolitami a składnikami gleby często prowadzą do tworzenia stałych chemicznych wiązań, których wynikiem może być zmniejszenie ilości materiału pozostającego w interakcji z mikroorganizmami, redukcja toksyczności związku lub redukcja ługowania [Berry i Boyd 1985]. Gevao i in. [2000] wykazali, że związki fenolowe mogą łączyć się kowalencyjnie z próchnicą. Jednym z mechanizmów łączących próchnicę jest sprzężanie tlenowe, w którym fenole tworzą wiązania typu C-C i C-O dzięki chemicznym, fotochemicznym lub enzymatycznym katalizatorom.

Liście roślin stanowią nie tylko duże biotyczne siedlisko dla mikroorganizmów [Vorholt 2012], ale silnie przyczyniają się do globalnej emisji VOCs [Guenther i in. 1995], które docierają również do środowiska glebowego. Liście emitują wiele różnorodnych związków C1, takich jak metan, mniej złożone związki, takie jak seskwiterpeny i pochodne kwasów tłuszczowych, te ostatnie stanowią typowe GLV (ang. green leave volatile) [Matsui 2006]. Zdolność radzenia sobie z metabolitami wtórnymi, w tym VOCs, które hamują wzrost niektórych szczepów, może stanowić ważną adaptację bakterii

epifitycznych. Z kolei lotne związki emitowane przez niektóre gatunki iglaste hamują wzrost bakterii przenoszonych przez powietrze, a zatem zapobiegają ich zasiedlaniu na igłach. Oprócz bezpośredniego wpływu na zbiorowiska epifityczne gęstość bakterii w powietrzu otaczającym drzewostany iglaste była znacznie zmniejszona. Szczególnie skuteczne w hamowaniu wzrostu bakterii były monoterpény, takie jak limonen i β -pinen oraz trzy związki z aldehydowymi grupami funkcyjnymi [Gao i in. 2005]. Podobnie stwierdzono, że aldehydy, takie jak aldehyd octowy, benzaldehyd i aldehyd cynamonowy, hamują wzrost bakterii epifitycznych w porównywalnych niskich dawkach [Utama i in. 2002].

Krzyżanowski [2016] wykazał, że orzech włoski jest silnym emitorem VOCs należących do czterech grup: monoterpénów, seskwiterpénów, alkoholi oraz węglowodorów alifatycznych (GLV). Wyniki badań dotyczących emisji VOCs z liści złożonych orzecha włoskiego wskazują, że w obrębie monoterpénów szczególnie istotne były cztery VOCs: (+)-/(-)- β -pinen, (+)-/(-)- α -pinen, limonen i santolina. Dwa z nich, (+)-/(-)- α -pinen oraz limonen, emitowane były przez liście złożone orzecha włoskiego w takich samych ilościach, podczas gdy emisja (+)-/(-)- β -pinenu ulegała zmniejszeniu, ponadto autor wykazał obecność santoliny w okresie letnim. Dominującymi monoterpénami emitowanymi przez liście złożone orzecha włoskiego były α -pinen i β -pinen.

Przedstawione przez autorów niniejszej pracy wyniki badań wskazują na liczebność bakterii do maksymalnej wartości $1,6 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby. Zaobserwowana stosunkowo mała liczebność bakterii prawdopodobnie związana była z wpływem metabolitów orzecha włoskiego. Badania przeprowadzone przez Selvi i in. [2017] na mikroorganizmach wyizolowanych z warstwy ryzosferowej i warstwy gleby nieryzosferowej różnych roślin strączkowych wskazały, że najwyższą liczebność populacji bakterii odnotowano w glebie spod *Tephrosia purpurea*: $50,51 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby w warstwie ryzosferowej i $21,10 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby w warstwie nieryzosferowej. Autorzy wskazali, że najniższą liczebność bakterii odnotowano w glebie spod *Lablab purpureus*: $2,11 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby w warstwie nieryzosferowej. Ponadto Vieira i Nahas [2005] wykazali liczebność promieniowców od 79,6 do $88 \cdot 10^6$ jtk \cdot g⁻¹ s.m. gleby, w różnych typach gleby.

Uzyskane przez autorów prezentowanej pracy wyniki badań wskazują na wyraźne dysproporcje liczebności populacji bakterii i grzybów strzępkowych. W porównaniu z populacją grzybów populacja bakterii w glebie strefy korzeniowej (2 i 4 m od pnia) oraz pozakorzeniowej (6 m od pnia) była około czterokrotnie większa. Wyniki ściśle korespondują z badaniami Selvi i in. [2017], którzy stwierdzili podobne proporcje liczebności obu grup mikroorganizmów.

WNIOSKI

Metabolity roślinne wydzielane przez orzech włoski i przedostające się do gleby mogą w znaczący sposób wpływać na liczebność mikroorganizmów glebowych, gdyż utrzymują liczbę bakterii na stałym poziomie oraz sukcesywnie zmniejszają liczbę grzybów.

PIŚMIENNICTWO

- Berendsen R.L., Pieterse C.M., Bakker P.A., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486.
- Berg G., Smalla K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13.
- Berry D.F., Boyd S.A., 1985. Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues. *Environ. Sci. Tech.* 19, 1132–1133.
- Chopra R.N., Nayar S.I., Chopra R.C., 1986. Glossary of Indian medicinal plants (including the Supplement). Council of Scientific & Industrial Research, New Delhi, ss. 11.
- Christopoulos M.V., Tsantili E., 2015. Oil composition in stored walnut cultivars – quality and nutritional value. *Eur. J. Lipid Sci. Techn.* 117, 338–348, DOI: 10.1002/ejlt.201400082.
- Chrzanowski G., Leszczyński B., Czerniewicz P., Sytykiewicz H., Matok H., Krzyżanowski R., 2011. Phenolic acids of walnut (*Juglans regia* L.). *Herba Pol.* 57(2), 22–29.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I., 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25, 417–440.
- Ebrahimi A., Zarei A., Fatahi R., Ghasemi Varnamkhasti M., 2009. Study on some morphological and physical attributes of walnut used in mass models. *Sci. Hortic.* 121, 490–494.
- Fuernkranz M., Lukesch B., Müller H., Huss H., Grube M., Berg G., 2012. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.* 63, 418–428.
- Gao Y., Jin Y.J., Li H.D., Chen H.J., 2005. Volatile organic compounds and their roles in bacteriostasis in five conifer species. *J. Integr. Plant Biol.* 47, 499–507.
- Gevao B., Semple K.T., Jones K.C., 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Poll.* 108, 3–14.
- Grabińska-Loniewska A., Słomczyński T., Pajor E., Kołosowska K., 1996. Occurrence of fungi degrading aromatic hydrocarbons in activated sludge biocenoses. *Acta Mycol.* 31(1), 67–75.
- Guenther A., Hewitt C.N., Erickson D., Fall R., Geron C., Graedel T., Harley P., Klinger L., Lerdau M., McKay W.A., 1995. A global-model of natural volatile organic-compound emissions. *J. Geophys. Res. Atmos.* 100, 8873–8892.
- Huang M., Sanchez-Moreiras A.M., Abel C., Sohrabi R., Lee S., Gershenzon J., Tholl D., 2012. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol.* 193, 997–1008.
- Ibekwe A.M., Grieve C.M., 2004. Changes in developing plant microbial community structure as affected by contaminated water. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, 239–248.
- Jakopic J., Solar A., Colaric M., Hudina M., Veberic R., Stampar F., 2008. The influence of ethanol concentration on content of total and individual phenolics in walnut alcoholic drink. *Acta Aliment.* 37, 233–239.
- Junker R.R., Tholl D., 2013. Volatile Organic Compound Mediated Interactions at the Plant-Microbe Interface. *J. Chem. Ecol.* 39(7), 810–825.
- Junker R.R., Loewel C., Gross R., Dötterl S., Keller A., Blüthgen N., 2011. Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves. *Plant Biol.* 13, 918–924.
- Kalemba D., Kunicka A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813–829.
- Khan S.U., 1982. Bound pesticide residues in soil and plants. *Residue Rev.* 84, 1–25.
- Kozak A., Leszczyński B., Sempruch C., Sytykiewicz H., 2014. Allelopatyczne oddziaływanie juglonu. *Kosmos* 63(4), 611–622.

- Kris-Etherton P.M., Yu-Poth S., Sabate J., Ratcliffe H.E., Zhao G., Etherton T.D., 1999. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(3), 504S–511S.
- Krzyżanowski R., 2016. Wpływ lotnych związków orzecha włoskiego *Juglans regia* L. na zachowanie mszyc *Panaphis juglandis* (Goeze, 1778) i *Chromaphis juglandicola* (Kaltenbach, 1843). Wyd. UPH w Siedlcach, Siedlce.
- Labuckas D.O., Maestri D.M., Perello M., Martinez M.L., Lamarque A.L., 2008. Phenolics from walnut (*Juglans regia* L.) kernels: antioxidant activity and interactions with proteins. *Food Chem.* 107(2), 607–612.
- Lindow S.E., Brandl M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1875–1883.
- Matok H., 2010. Wpływ wybranych metabolitów wtórnych orzecha włoskiego (*Juglans regia*) na kiełkowanie roślin. Praca doktorska, UPH w Siedlcach.
- Matsui K., 2006. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 274–280.
- Montenegro R.C., Araujo A.J., Molina M.T., Marinho Filho J.D.B., Rocha D.D., Lopez-Montero E., Goulart M.O.F., Bento E.S., Alves A.P.N.N., Pessoa C., De Moraes M.O., Costa-Lotuflo L.V., 2010. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. *Chem.-Biol. Interact.* 184, 439–448.
- Nour V., Trandafir I., Cosmulescu S., 2013. HPLC determination of phenolic acids, flavonoids and juglone in walnut leaves. *J. Chrom. Sci.* 51, 883–890.
- Patel R., Rajkumar S., 2009. Isolation and characterization of phenol degrading yeast. *J. Basic Microbiol.* 49(2), 216–219.
- Pelvan E., Öktem Olgunb E., Karadağ A., Alasalvar C., 2018. Phenolic profiles and antioxidant activity of Turkish Tombul hazelnut samples (natural, roasted, and roasted hazelnut skin). *Food Chem.* 244, 102–108.
- Pereira J.A., Oliveira I., Sousa A., Ferreira I., Bento A., Estevinho L., 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem. Toxic.* 46(6), 2103–2111.
- PN-89/Z-04111/03:1989. Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczenie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedimentacyjną.
- Rather M.A., Dar B.A., Dar M.Y., Wani B.A., Shah W.A., Bhat B.A., Ganai B.A., Bhat K.A., Anand R., Qurishi M.A., 2012. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine* 19, 1185–1190.
- Seco R., Penuelas J., Filella I., 2007. Short-chain oxygenated VOCs: Emission and uptake by plants and atmospheric sources, sinks, and concentrations. *Atmos. Environ.* 41, 2477–2499.
- Selvi K.B., Paul J.J.A., Vijaya V., Saraswathi K., 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochem. Mol. Biol. J.* 3(1), DOI: 10.21767/2471-8084.100029.
- Tripathi N.N., Mishra A.K., Tripathi S., 2011. Antibacterial potential of plant volatile oils: A review. *Proc. Nat. Acad. Sci. India, Sect. B Biol. Sci.* 81, 23–68.
- Utama I.M.S., Wills R.B.H., Ben-Yehoshua S., Kuek C., 2002. *In vitro* efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6371–6377.
- Verma R.S., Padalia R.C., Chauhan A., Thul S.T., 2013. Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya. *Ind. Crops Prod.* 42, 195–201.

- Vieira F.C.S., Nahas E., 2005. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiol. Res.* 160, 197–202.
- Von Kiparski G.R., Lee L.S., Gillespie A.R., 2007. Occurrence and fate of the phytotoxin juglone in alley soils under black walnut trees. *J. Environ. Qual.* 36, 709–717.
- Vorholt J.A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828–840.

Źródło finansowania. Badania, zrealizowane w ramach tematu badawczego nr 245/08/S, zostały sfinansowane z dotacji na naukę przyznaną przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Summary. In home gardens and in production plantations a number of varieties of walnut (*Juglans regia* L.) are cultivated in Poland. During the growing seasons trees emit semiochemicals including volatile and non-volatile secondary metabolites. They mostly include phenolic compounds, flavonoids, naphthoquinones and terpenes. In the literature of the subject there are only some scarce data on the role of these metabolites in environmental interactions. Therefore, the aim of this study was to study the impact of the soil environment of walnut on soil microorganisms. The soil microbial isolation studies were carried out on selective microbiological media (Czapek-Dox agar, Sabouraud's agar with chloramfenikol, nutritional agar). The obtained results showed that metabolites from the walnut which get through to the soil can influence the level of microorganisms in the soil, maintaining the level of bacteria at a constant number and successively reducing the number of fungi.

Key words: walnut, soil, bacteria and fungi

Otrzymano:/ Received: 19.01.2018
Zaakceptowano:/ Accepted: 13.06.2018