

**Tomasz R. Sekutowski**

*Institut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach*

STANDARDOWE ORAZ ALTERNATYWNE TESTY ROŚLINNE JAKO  
CENNE NARZĘDZIA W BADANIACH EKOTOKSYKOLOGICZNYCH\*

*...nauka prowadzi nas do zrozumienia tego, jaki jest świat, a nie tego,  
jaki chcielibyśmy, by był...*  
Carl Edward Sagan (1934–1996)

**Wstęp**

Nadmierna chemizacja środowiska rolniczego, spowodowana stosowaniem przez rolników często w sposób niekontrolowany środków ochrony roślin, doprowadziła do pojawienia się niepokojących zjawisk. Jednym z nich jest coraz częściej obserwowany problem związany z przedostawaniem się do gleby, osadów, wód gruntowych oraz produktów spożywczych pozostałości pochodzących ze środków ochrony roślin (17, 18, 36, 38, 39, 40).

Każda substancja chemiczna, która dostaje się do środowiska glebowego podlega zarówno procesom biofizycznym, jak i biochemicznym. W momencie przedostania się do gleby następuje jej rozdzielenie na fazę stałą oraz wodną. Nie inaczej jest z substancjami aktywnymi herbicydów. W środowisku glebowym dla rośliny dostępna jest jedynie ta część substancji aktywnej, która znajduje się w fazie ciekłej. Natomiast cząsteczki herbicydu zaadsorbowane lub związane chemicznie z fazą stałą tworzą tzw. pozostałości związane (ang. bond residue), które nie są w tym momencie dla rośliny dostępne. Jednak w wyniku zjawiska desorpcji pozostałości te mogą być uwalniane z fazy stałej do fazy ciekłej lub gazowej. Równowaga pomiędzy zjawiskiem sorpcji i desorpcji jest stale zakłócana, występuje tutaj tzw. zjawisko histerezy, świadczące o nierównocенności tych dwóch procesów. Efekty tego zjawiska bardzo dobrze są widoczne w warunkach polowych, gdzie równowaga ta jest stale zakłócana w wyniku działalności edafonu (drobnych organizmów roślinnych i zwierzęcych, żyjących w warstwie ornej gleby, których obecność wpływa na strukturę i żyzność gleby) oraz poprzez zmiany warunków wilgotnościowo-termicznych gleby (24, 32, 35, 58, 63).

---

\* Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.6 w programie wieloletnim IUNG - PIB

W zależności od zawartości koloidów glebowych (frakcja ilasta), substancji organicznej, zastosowanej agrotechniki oraz warunków wilgociowo-termicznych panujących w danym sezonie wegetacyjnym tylko część pozostałości herbicydów znajdujących się w glebie może być dostępna dla roślin. W zależności od warunków mogą one wykazywać mniejszą lub większą fitotoksyczność niż produkt wyjściowy w odniesieniu do roślin wrażliwych (wskaźnikowych); (5, 37, 41, 64, 66, 67).

Przy wyborze techniki detekcji za najważniejsze kryterium oceny uważa się poziom stężenia pozostałości, w jakim występuje badana substancja w próbce gleby. Metody instrumentalne, takie jak chromatografia gazowa (GC) z detektorem masowym oraz cieczowa (HPLC) z detektorem spektrofotometrycznym (UV) pozwalają na oznaczenie całkowitej zawartości substancji w glebie w momencie aplikacji lub w okresie po zastosowaniu herbicydów (1, 22, 26, 35, 36). Problem pojawia się wtedy, kiedy herbicyd jest stosowany jedno- lub kilkakrotnie w sezonie wegetacyjnym w niewielkich dawkach podstawowych lub zredukowanych ( $<50 \text{ g} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), ponieważ już w momencie aplikacji poziom pozostałości substancji aktywnej herbicydu jest niewielki i nie przekracza wartości  $10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (19, 27, 37, 49, 50, 56, 59).

Metody chemiczne do oceny stopnia pozostałości herbicydów w agrocenozie mogą być z dużym powodzeniem uzupełniane przez badania ekotoksykologiczne. W badaniach tych poziom pozostałości herbicydów ocenia się na podstawie specyficznej całościowej reakcji standardowych organizmów wskaźnikowych na zróżnicowaną pod względem chemicznym substancję aktywną oraz na poziom jej stężenia w badanej próbce. W tego rodzaju badaniach stosuje się metodę biotestu z wykorzystaniem np. biodetektora roślinnego. Metody te mają za zadanie określenie efektywnego biologicznego stężenia substancji aktywnej zaraz po aplikacji, jak również śledzenie dynamiki zanikania tej substancji w środowisku w perspektywie kolejnych kilku czy kilkunastu miesięcy. Biotesty pozwalają również ocenić w sposób obiektywny poziom pozostałości ze względu na fakt posiadania przez wszystkie rośliny wyższe swoistej wrażliwości na różne ksenobiotyki znajdujące się w środowisku. Fitotoksyczny wpływ substancji chemicznych można stwierdzić na podstawie dynamiki kiełkowania, wzrostu siewek, redukcji suchej i świeżej masy korzeni lub koleoptyla roślin testowych. Na podstawie niektórych parametrów, takich jak np. obniżenie zdolności kiełkowania, można określić fitotoksyczny wpływ badanej substancji już po upływie około 24 h od momentu rozpoczęcia testu. Natomiast dynamikę wzrostu korzeni po 2-3 dniach, podczas gdy redukcję świeżej i suchej masy łodyg oraz liści po upływie około 10-14 dni (4, 9, 10, 12, 16, 37, 45, 46, 48, 49, 52, 54, 56, 57).

### **Metody wykorzystywane w badaniach środowiskowych**

Metody analityczne wykorzystujące materiał biologiczny stają się powoli konkurencją dla klasycznych metod analitycznych, a w niektórych przypadkach mogą wręcz je zastąpić (20). Powszechne zastosowanie zawdzięczają głównie swojej specyficzności oraz niskim kosztom jednostkowym.

Gadzała - Kopicuch i in. (14) w badaniach toksykologicznych wyróżniają dwie grupy zastosowań metod biologicznych w ocenie wpływu ksenobiotyków na agrocenozę:

- bioanalityka, która związana jest z wykorzystaniem organizmów biologicznych jako receptorów określonych substancji chemicznych, np. herbicydów. Ze względu na sposób wykorzystania składnika biologicznego wyróżniamy:
  - bioczujniki, których elementem aktywnym jest część biologiczna (np. enzym, przeciwciała – test ELISA, IMA, RIA, EIA); (21, 25, 31, 61),
  - biotesty (fitotesty), których elementem kontrolno-pomiarowym jest cały organizm roślinny lub jego część (np. nasiona, korzenie, koleoptyl); (19, 20, 52, 65).
- biomonitoring, który może przebiegać dwutorowo:
  - poprzez tworzenie pasywnych próbników akumulacyjnych w oparciu o typowe badania chemiczne próbek biologicznych (9, 62),
  - poprzez obserwację bioindykatorów roślinnych czy zwierzęcych (2, 13).

### Biotesty

Biotest (gr. *bios* – życie + łac. *testari* – świadczyć) można zdefiniować jako eksperymentalną próbkę biologiczną (cały organizm lub jego część), której celem jest wykrycie toksycznej substancji znajdującej się w środowisku lub poznanie jej szkodliwego działania poprzez ilościowe oznaczenie wpływu badanej substancji w porównaniu z obiektem kontrolnym (niepoddanym działaniu ksenobiotyków).

W literaturze spotyka się również pojęcie fitotesu (gr. *phyton* – roślina + łac. *testari* – świadczyć), które jest zawężeniem pojęcia biotestu, gdyż odnosi się tylko do roślin jako biodetektorów służących do wykrywania różnych związków chemicznych.

W badaniach prowadzonych z użyciem biotestów powszechnie uznawane są trzy sposoby ich przeprowadzania, dwa prowadzone są w warunkach kontrolowanych, natomiast trzeci sposób przeprowadzany jest z wykorzystaniem populacji organizmów żyjących w warunkach naturalnych.

- testy fitotoksyczności wykonywane w laboratorium – substancja wykazująca działanie fitotoksyczne wprowadzana jest sztucznie do badanego obiektu (np. gleby). Następnie zostaje wykonany test z odpowiednio dobranym organizmem wskaźnikowym, np. roślinnym (fitotest). Uzyskane w ten sposób wyniki są źródłem informacji na temat toksyczności danej substancji w warunkach kontrolowanych. Głównym celem takiego testu jest przeprowadzenie wzorcowania (kalibracji) biotestu, który następnie będzie wykorzystany do oszacowania fitotoksyczności próbek właściwych (np. pobranych z obszarów zanieczyszczonych); (51).

- testy fitotoksyczności wykonywane w laboratorium na bazie próbek właściwych (np. glebowych) pobranych z obszarów zanieczyszczonych. Fitotoksyczność takich próbek jest porównywana z fitotoksycznością próbek (biotestów) wzorcowych. Na tej podstawie ustala się przedział, w którym pozostałości, np. herbicydów, mogą wywierać niekorzystny wpływ na rośliny uprawne (np. następcze); (15, 42, 43).

- testy fitotoksyczności przeprowadzane w miejscu występowania populacji organizmów wrażliwych (warunki naturalnego występowania); (23, 28).

W ekotoksykologii do badań pozostałości różnych ksenobiotyków (np. herbicydów) najczęściej wykorzystywane są rośliny i ich nasiona, ze względu na specyfikę działania badanych preparatów oraz ze względu na aspekt humanitarny, ekonomiczny i praktyczny.

Na podstawie zależności dawka a jej wpływ na roślinę, który może być wyrażony np. redukcją świeżej lub suchej masy rośliny testowej (w porównaniu z obiektem kontrolnym), można wyznaczyć wartości wskaźników będących ilościową miarą fitotoksyczności badanej substancji. Fitotoksyczne oddziaływanie substancji aktywnych herbicydów można określić przy użyciu wskaźników  $ED_{10}$ ,  $ED_{50}$  czy  $ED_{90}$  (ang. effective dose), czyli wyznaczenia stężenia substancji aktywnej w wysokości 10%, 50% czy 90% powodującej określoną reakcję rośliny. Innym stosowanym wskaźnikiem jest index  $IC_{50}$  lub  $IC_{90}$  (ang. inhibitor concentration), czyli stężenie np. herbicydu w środowisku glebowym, które powoduje redukcję świeżej lub suchej masy rośliny testowej (korzeni, łodyg, liści) o 50% lub 90% w porównaniu z obiektem kontrolnym (45, 47, 55).

Zależność dawka – reakcja rośliny może również służyć przewidywaniu ryzyka, tzn. wyznaczeniu dawki i czasu zalegania pozostałości substancji aktywnej herbicydu, przy której prawdopodobieństwo wystąpienia objawów szkodliwego wpływu badanych substancji jest odpowiednio duże lub niewielkie. Przykładem ukazującym tę zależność są badania przeprowadzone przez S a d o w s k i e g o i n. (42) oraz S a d o w s k i e g o i S e k u t o w s k i e g o (43), odnoszące się do fitotoksycznego działania pozostałości substancji aktywnych herbicydów na rośliny następcze. Autorzy ci za pomocą biotestów dowiedli, że pozostałości herbicydów w glebie mogą stwarzać zagrożenie dla upraw następczych w dwu krytycznych momentach. Pierwszy odnosi się do przesiewów, czyli sytuacji, kiedy to z różnych przyczyn, najczęściej niezależnych od plantatora, następuje likwidacja plantacji i wprowadzenie następnej rośliny uprawnej. Natomiast drugi moment odnosi się do pozostałości zalegających w glebie i wykazujących fitotoksyczne działanie tuż po zbiorze rośliny uprawnej lub nawet jeszcze przez kilka kolejnych miesięcy. Na polach, na których był stosowany chlorosulfuron i metasulfuron obserwowano podobne zjawisko w postaci rozległego zniszczenia zasiewów buraka cukrowego i rzepaku ozimego występujące w okresie kolejnych 2 lat (59, 60). Obserwowanie szkodliwego wpływu tych substancji było możliwe tylko dlatego, że rośliny uprawne, tj. burak cukrowy i rzepak ozimy, odznaczają się bardzo dużą wrażliwością na herbicydy z grupy ALS. Gatunki roślin o wąskim zakresie tolerancji (stenobionty) wykazujące dużą wrażliwość na określone grupy substancji określa się jako gatunki wskaźnikowe lub bioindykatory. Stąd biotesty bardzo często wykorzystywane są w biomonitoringu do oceny skutków jakie ksenobiotyki mogą wywierać na poszczególne elementy agrofitocenozy (np. roślinę uprawną, glebę czy wodę); (6, 9).

### **Jakie kryteria powinien spełniać bioindykator roślinny**

Gatunki roślin wskaźnikowych powinny charakteryzować się wąskim zakresem reakcji oraz wykazywać wysoką wrażliwość na konkretne substancje chemiczne, a ich reakcja powinna być specyficzna i adekwatna do stężenia substancji chemicznej i łatwa do zaobserwowania (np. silne zahamowanie wzrostu korzeni).

Bioindykatory roślinne (fitotesty) powinny posiadać następujące cechy:

- małe i równe nasiona,
- wyrównaną siłę i energię kiełkowania nasion,
- krótki okres wschodów (24-48 h),
- krótki okres wegetacji,
- dużą biomasę łodyg, liści i korzeni,
- wysoką czułość względem określonej grupy substancji,
- stałość i powtarzalność reakcji,
- niski koszt jednostkowy i łatwość w hodowli laboratoryjnej (10, 49, 53).

### **Biotesty I generacji – klasyczne (kuwetowe, doniczkowe)**

Konwencjonalny biotest, który służy do wykrywania obecności substancji aktywnych herbicydów w glebie polega na wysianiu nasion rośliny testowej (odpowiednio wrażliwej na pojedynczą substancję lub grupę substancji) w badaną próbkę glebową. Czas trwania biotestu konwencjonalnego zależy w dużej mierze od rośliny testowej, a właściwie testowanej części bioindykatora (korzenie, liście) i substancji aktywnej herbicydu, i może wahać się od 7 do 14 dni (test doniczkowy); (fot. 1-2) lub od 21 do 28 dni (test kuwetowy); (fot. 3). Po okresie 7-14 lub 21-28 dni od momentu założenia testu określa się świeżą, a później suchą masę korzeni lub liści i łodyg (poprzez ścięcie i wysuszenie w temperaturze 105°C oraz zważenie na wadze analitycznej). Następnie oblicza się procentowy ubytek świeżej i suchej masy w stosunku do roślin kontrolnych, a otrzymane w ten sposób wyniki zależności pomiędzy ubytkiem masy rośliny testowej a stężeniem substancji aktywnej herbicydu w glebie mogą posłużyć do graficznego przedstawienia tej zależności. Przykładem wykorzystania biotestów klasycznych mogą być badania przeprowadzone przez D o m a r a d z k i e g o i in. (11), R o l e i S e k u t o w s k i e g o (33), S a d o w s k i e g o i S e k u t o w s k i e g o (44) oraz S e k u t o w s k i e g o i S a d o w s k i e g o (49).

### **Biotesty II generacji – mikrobiotest Phytotoxkit**

Konieczność wykonywania analiz wielu próbek glebowych w stosunkowo krótkim czasie doprowadziła do pojawienia się zminiaturyzowanych testów fitotoksyczności zwanych mikrobiotestami lub testami drugiej generacji, jako alternatywa dla testów klasycznych. Przykładem takiego mikrobiotestu jest szybki (72 h) test Phytotoxkit™ (8, 30, 51, 52). Zasada działania tego fitotestu oparta jest na kiełkujących nasionach *Sorghum saccharatum*, *Lepidium sativum* i *Sinapis alba*, które w wyniku kontaktu

roślina testowa: *Pisum sativum*roślina testowa: *Cucumis sativus*

Fot. 1. Klasyczny biotest I generacji (doniczkowy) – wyznaczanie progów fitotoksyczności

roślina testowa: *Fagopyrum esculentum*roślina testowa: *Sinapis alba*

Fot. 2. Klasyczny biotest I generacji (doniczkowy) – wyznaczanie dynamiki rozkładu



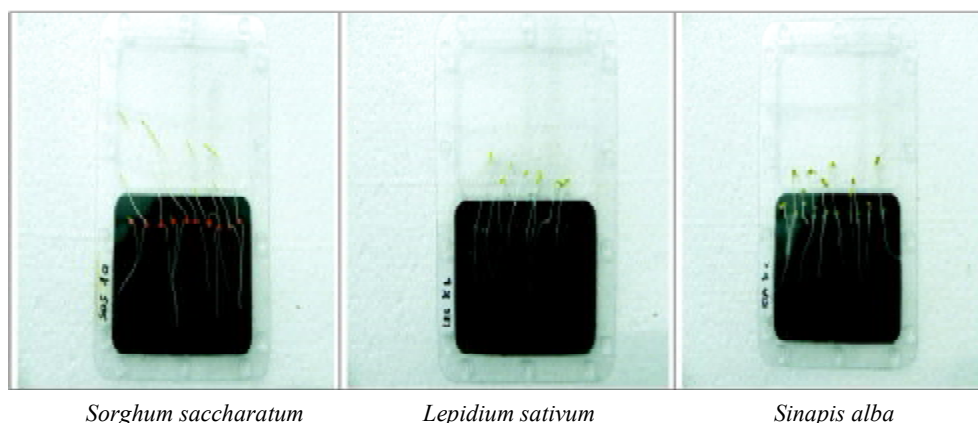
kontrola

pendimetalina (100% dawki)

pendimetalina (50% dawki)

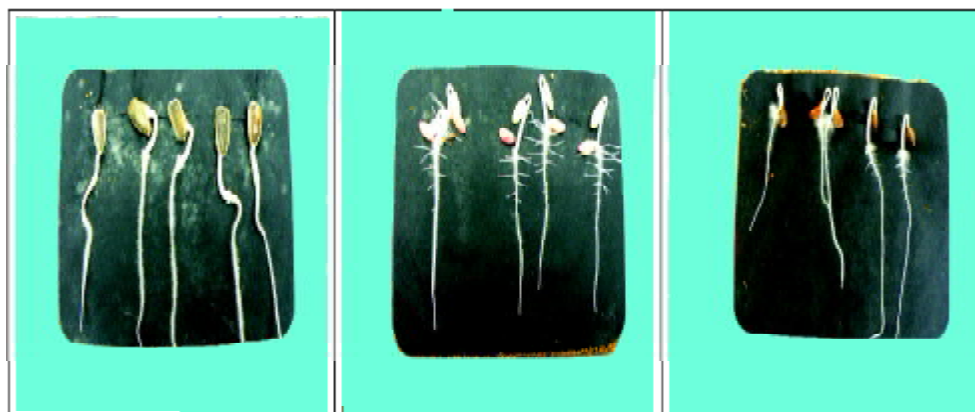
Fot. 3. Klasyczny biotest I generacji (kuwetowy) – wyznaczanie progu wrażliwości

z badaną substancją aktywną herbicydu znajdującą się w glebie wykazują specyficzną reakcję (brak kiełkowania lub redukcja długości korzeni). Wykorzystanie zalecanych nasion (dostarczonych wraz z testem) umożliwia standaryzację testu i otrzymanie powtarzalnych wyników niezależnie od laboratorium, w którym wykonywane są badania (3). Specyfika testu Phytotoxkit omija wszystkie pracochłonne czynności związane z biotestami klasycznymi, przez co znacznie skraca się czas, jaki jest potrzebny do uzyskania odczytu (z 14 do 3 dni). Ponadto test ten umożliwia bezpośredni pomiar długości korzeni lub koleoptyla metodą analizy obrazu (image tools), przez co graficzne przedstawienie zależności pomiędzy redukcją długości korzeni fitodetektorów a fitotoksycznym stężeniem badanych substancji aktywnych herbicydów jest szybsze i zdecydowanie łatwiejsze w porównaniu z biotestem klasycznym (I generacji). Przykładowy test Phytotoxkit wykonany przy użyciu standardowego zestawu roślin przedstawiono na fotografii 4.



Fot. 4. Biotest II generacji – Phytotoxkit ze standardowymi roślinami testowymi

Zróżnicowany charakter chemiczny herbicydów uniemożliwia stosowanie tylko jednego rodzaju mikrobiotestu Phytotoxkit zawierającego standardowe fitodetektory dostarczone w zestawie. Ze względu na specyficzną reakcję różnych gatunków roślin na obecność substancji aktywnych herbicydów należących do różnych grup chemicznych konieczne staje się uzupełnienie wiedzy na temat możliwości wykorzystania innych roślin. Dlatego bardzo często przeprowadza się modyfikację testu, polegającą na zastąpieniu standardowych roślin testowych innymi gatunkami, np. *Helianthus annuus*, *Cucumis sativus* czy *Fagopyrum esculentum* (7). Przykładowy test Phytotoxkit wykonany przy użyciu alternatywnego zestawu roślin przedstawiono na fotografii 5.

*Helianthus annuus**Cucumis sativus**Fagopyrum esculentum*

Fot. 5. Biotest II generacji – Phytotoxkit z alternatywnymi roślinami testowymi

### A może przyszłość leży w „bateriach” różnych testów?

Wybór odpowiedniego biotestu do badań agrofitycenozy zależy od rodzaju poszukiwanych informacji, stężenia pozostałości substancji aktywnych herbicydów w analizowanej próbce gleby, osadu czy wody oraz wrażliwości gatunkowej testowanej rośliny. W przypadku zastosowania tylko jednego gatunku detektora roślinnego oszacowana fitotoksyczność odzwierciedla wrażliwość tego jednego testowanego gatunku. Postępowanie takie stwarza możliwość popełnienia błędu niedoszacowania wyniku fitotoksyczności zespołu czynników w odniesieniu do całej agrocenozy. Ryzyko to można zminimalizować poprzez zastosowanie zestawu biotestów, których działanie oparte jest na wykorzystaniu gatunków roślin o różnej wrażliwości na ksenobiotyki. Takie zestawy testów mogą być tworzone w obrębie jednego testu (np. Phytotoxkit), który może obejmować kilka gatunków roślin testowych o różnej wrażliwości na daną grupę ksenobiotyków. Ponadto mogą być tworzone grupy zestawów w obrębie kilku testów wykorzystujących różne biodetektory o zmiennej czułości na tę samą grupę substancji (20, 29, 34).

### Podsumowanie

W ekotoksykologii powszechnie przyjętymi metodami oznaczania stopnia pozostałości różnych ksenobiotyków w środowisku glebowym są biotesty. Testy z zastosowaniem szybko kiełkujących nasion posiadają kilka bardzo ważnych zalet, a mianowicie są tanie i łatwe w użyciu, nie wymagają drogiego sprzętu laboratoryjnego oraz są proste do obserwacji i dają powtarzalne wyniki. Fitotoksyczny wpływ substancji chemicznych można stwierdzić na podstawie dynamiki kiełkowania, wzrostu siewek, redukcji suchej i świeżej masy korzeni lub koleoptyla roślin testowych. Na podstawie niektórych parametrów, takich jak redukcja długości korzeni i toksyczny wpływ kse-

nobiotyków można określić już po upływie około 24 h, dynamikę wzrostu korzeni po 3 dniach, a redukcję długości koleoptyla po 5 dniach od momentu rozpoczęcia testu (mikrobiotest Phytotoxkit). Podczas gdy redukcję świeżej lub suchej masy nadziemnych części roślin (łodygi, liście) po upływie około 7-14 dni (biotest doniczkowy) lub 21-28 dni (biotest kuwetowy).

Do mankamentów tego rodzaju metod należy zaliczyć przede wszystkim brak możliwości identyfikacji czynnika fitotoksycznego. Problem ten można jednak rozwiązać poprzez wykorzystanie różnych czynników biologicznych tworzących zestawy biotestów, które pozwolą na dokładne określenie różnych ksenobiotyków.

Przypuszczalnie obszar zastosowania biotestów I i II generacji w ciągu najbliższych kilku lat będzie się sukcesywnie zwiększał, a uzyskane w ten sposób informacje będą mogły stanowić podstawę do podjęcia badań z wykorzystaniem klasycznych metod analitycznych, takich jak chromatografia gazowa (GC) i cieczowa (HPLC).

### Literatura

1. Ahmad I., Crawford G.: Trace residual analysis of the sulfonylurea herbicide chlorsulfuron in soil by gas chromatography-electron capture detection. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, **38**: 138-141.
2. Alonso-Prados J.L., Hernandez-Sevillano E., Llanos S., Villarroja M., Garcia-Baudin J.M.: Effects of sulfosulfuron soil residues on barley (*Hordeum vulgare*), sunflower (*Helianthus annuus*) and common vetch (*Vicia sativa*). *Crop Protect.*, 2002, **21**: 1061-1066.
3. Baudó R.: Report on the international interlaboratory comparison on the Phytotoxkit. CNR. Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Italy, 2011, pp. 115.
4. Blacklow W.M., Pheloung P.C.: Sulfonylurea herbicides applied to acidic sandy soils: a bioassay for residues and factors affecting recoveries. *Aust. J. Agric. Res.*, 1991, **42**: 1205-1216.
5. Blasioli S., Braschi I., Gessa C.E.: The fate of herbicides in soil. *Herbicides and environment*. Ed. A. Kortekamp. Rijeka, InTech, 2011, 175-194.
6. Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G.: Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 1998, **37**: 2935-2947.
7. Bortniak M., Sekutowski T.: Wykorzystanie mikrobiotestu Phytotoxkit w badaniach pozostałości w glebie herbicydów z grupy inhibitorów syntetazy ALS. W: Wielokierunkowość badań w rolnictwie i leśnictwie. Kraków, UR, 2008, **2**: 201-206.
8. Czerniawska-Kulesza I., Cieszelczuk T., Kusza G., Cichoń A.: Comparison of the Phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments. *Wiley Periodicals, Inc. Environ. Toxicol.*, 2006, **21**: 367-372.
9. Dećkowska A., Pierścieniak M., Gworek B., Maciaszek D.: Wybrane gatunki roślin jako wskaźniki zmian w środowisku. *Ochr. Środ. Zasob. Nat.*, 2008, **37**: 128-138.
10. Demczuk A., Sacała E., Grzyś E.: Zmiany aktywności syntazy acetylomleczanowej (ALS) pod wpływem herbicydu Titus 25 DF u różnych odmian ogórka. *Progr. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.* 2004, **44(2)**: 645-647.
11. Domaradzki K., Sekutowski T., Rola H.: Agroekologiczne skutki stosowania herbicydów sulfonilomocznikowych. *Progr. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2005, **45(1)**: 100-107.
12. Eliason R., Schoenau J.J., Szmigielski A.M., Lavery W.M.: Phytotoxicity and persistence of flucarbazone-sodium in soil. *Weed Sci.*, 2004, **52**: 857-862.
13. Fahl G.M., Kreft L., Altenburger R., Faust M., Boedeker W., Grimme L.H.: pH-Dependent sorption, bioconcentration and algal toxicity of sulfonylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.*, 1995, **31**: 175-187.

14. Gadzała-Kopciuch R., Berecka B., Bartoszewicz J., Buszewski B.: Some considerations about bioindicators in environmental monitoring. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2004, **13(5)**: 453-462.
15. Geisel B.G.L., Schoenau J.J., Holm F.A., Johnson E.N.: Interactions of ALS inhibiting herbicide residues in three prairie soils. *Weed Sci.*, 2008, **56**: 624-627.
16. Günther P., Pestemer W., Rahman A., Nordmeyer H.: A bioassay technique to study the leaching behaviour of sulfonylurea herbicides in different soils. *Weed Res.*, 1993, **33**: 177-185.
17. Gnusowski B., Nowacka A.: Pozostałości środków ochrony roślin w polskich płodach rolnych pochodzących z różnych systemów gospodarowania. *Fragm. Agron.*, 2007, **3(95)**: 121-125.
18. Gnusowski B., Nowacka A., Łozowicka B., Szpyrka E., Walorczyk S.: Pozostałości środków chemicznej ochrony roślin w roślinnej produkcji ekologicznej. *J. Res. Appl. Agric. Eng.*, 2011, **56(3)**: 102-107.
19. Hernández-Sevillano E., Villarroja M., Alonso-Prados J.L., García Baudín J.M.: Bioassay to detect sulfosulfuron and triasulfuron residues in soil. *Weed Res.*, 2001, **15**: 447-452.
20. Hollaway K.L., Kookana R.S., McQuinn D.J., Moerkerk M.R., Noy D.M., Smal M.A.: Comparison of sulfonylurea herbicide residue detection in soil by bioassay, enzyme-linked immunosorbent assay and HPLC. *Weed Res.*, 1999, **39**: 383-397.
21. Jun-Dong W., Hua-Jun B., Hai-Yan S., Ming-Hua W.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of cyhalofop-butyl. *Pest. Bioch. Physiol.*, 2010, **98**: 68-72.
22. Kucharski M., Sadowski J.: Wpływ wilgotności gleby na rozkład herbicydu – badania laboratoryjne. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2006, **46(2)**: 750-753.
23. Kuczyńska A., Wolska L., Namieśnik J.: Application of biotests in environmental research. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2005, **35(2)**: 135-154.
24. Lesan H.M., Bhandari A.: Atrazine sorption on surface soils: time-dependent phase distribution and apparent desorption hysteresis. *Water Res.*, 2003, **37**: 1644-1654.
25. Maargit S., Erich D., Klaus B.: Enzyme immunoassay and fluoroimmunoassay for the herbicide diclofop-methyl. *J. Agric. Food Chem.*, 1984, **32**: 734-741.
26. Michel M.: Łączone techniki chromatograficzne w badaniach pozostałości środków ochrony roślin. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2002, **42(1)**: 249-253.
27. Moyer J.R.: Sulfonylurea herbicide effects on following crops. *Weed Tech.*, 1995, **9**: 373-379.
28. Namieśnik J., Szefer P.: Analytical measurements in aquatic environments. CRC Press, 2010, pp. 489.
29. Pandard P., Devillers J., Charissou A.M., Pouisen V., Jourdain M.J., Féraud J.F., Grand C., Bispo A.: Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.*, 2006, **363**: 114-125.
30. Phytotoxkit.: Seed germination and early growth microbiotest with higher plants. Standard Operational Procedure. Nazareth, Belgium, MicroBioTest Inc., 2004, pp. 24.
31. Płaza G., Ulfing K., Tien A.J.: Immunoassays and environmental studies. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2000, **9(4)**: 231-236.
32. Praczyk T., Skrzypczak G.: Herbicydy. PWRiL, Poznań, 2004, ss. 274.
33. Rola H., Sekutowski T.: Wpływ systemów uprawy na dynamikę rozkładu wybranych herbicydów sulfonylomocznikowych stosowanych w kukurydzy. *Pam. Puł.*, 2005, **140**: 239-243.
34. Rojickova-Padrtova R., Marsálek B., Holoubek I.: Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, 1998, **37(3)**: 495-507.
35. Sadowski J.: Wpływ terminu stosowania na dynamikę rozkładu herbicydów w glebie. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2001, **41(1)**: 134-139.

36. Sadowski J., Kucharski M., Rola H.: Pozostałości herbicydów w środowisku glebowo-wodnym. *Biul. Nauk.*, 2001, **12**: 23-32.
37. Sadowski J., Rola H., Kucharski M.: Zastosowanie biotestów do oceny poziomu pozostałości herbicydów w glebie. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2002, **42(1)**: 152-158.
38. Sadowski J., Kucharski M.: Zagrożenia powodowane pozostałościami herbicydów w wodach powierzchniowych i gruntowych. X Kraj. Sem. „Stosowanie ciekłych agrochemikaliów”, cz. 2. Upowszechnianie Zasad Dobrej Praktyki Rolniczej, IUNG, Puławy, 2002, 117-132.
39. Sadowski J., Kucharski M.: Monitoring of herbicidal pollution in ground and surface water on arable land of South-West Poland. *J. Plant Prot. Res.*, 2003, **43(3)**: 241-245.
40. Sadowski J., Kucharski M.: Pozostałości herbicydów w roślinach zbożowych. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2003, **43(1)**: 359-369.
41. Sadowski J., Kucharski M.: Wpływ czynników agrometeorologicznych na pobieranie i fitotoksyczność pozostałości herbicydów zawartych w glebie. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2004, **44(1)**: 355-363.
42. Sadowski J., Kucharski M., Sekutowski T.: Ocena zagrożeń upraw następczych przez pozostałości wybranych herbicydów stosowanych w uprawach rzepaku. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2007, **47(3)**: 246-253.
43. Sadowski J., Sekutowski T.: Ocena ryzyka fitotoksycznego działania pozostałości herbicydów na uprawy następcze. W: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*. PZITS, Wrocław, 2008, **884**: 349-354.
44. Sadowski J., Sekutowski T.: Wpływ uproszczeń w technice uprawy na degradację i transport pozostałości w glebie herbicydów z grupy pochodnych sulfonilomocznika. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2008, **48(4)**: 1241-1249.
45. Sandín-España P., Loureiro I., Escorial C., Chueca C., Santín-Montañán I.: The bioassay technique in the study of the herbicide effects. *Herbicides, theory and applications*. Ed. S. Soloneski, M. L. Larramendy. Rijeka, InTech, 2011, 431-454.
46. Sarmah A.K., Kookana R.S., Alston A.M.: Degradation of chlorsulfuron and triasulfuron in alkaline soil under laboratory conditions. *Weed Res.*, 1999, **39**: 83-92.
47. Seefeldt S.S., Jensen J.E., Fuerst E.P.: Log-logistic analysis of herbicide dose response relationships. *Weed. Technol.*, 1995, **9**: 218-227.
48. Sekutowski T., Sadowski J.: Wpływ technologii uprawy na dynamikę rozkładu pozostałości nikosulfuronu. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Rośl.*, 2005, **45(2)**: 1065-1068.
49. Sekutowski T., Sadowski J.: Use of bioassays for assessment of residues level of herbicides active ingredients in soil. *Pesticides/Pestycydy*, 2006, **(1-2)**: 59-64.
50. Sekutowski T.: Effect of different tillage systems on maize yield and degradation dynamics of rimsulfuron in soil. *Acta Sci. Pol., Agricul.*, 2009, **8(2)**: 9-20.
51. Sekutowski T., Bortniak M.: Ocena przydatności *Fagopyrum sagittatum* jako fitodetektora w wykrywaniu pozostałości herbicydów w glebie. *Pam. Puł.*, 2009, **149**: 65-72.
52. Sekutowski T., Sadowski J.: PHYTOTOXKIT™ microbiotest used in detecting herbicide residue in soil. *Environ. Prot. Eng.*, 2009, **35(1)**: 105-110.
53. Shim S.I., Lee B.M., Ryu E.J., Kang B.H.: Response of leaf acetolactate synthase from different leaf positions and seedling ages to sulfonylurea herbicide. *Pesti. Biochem. Physiol.*, 2003, **75**: 39-46.
54. Stork P., Hannah M.C.: A bioassay method for formulation testing and residue studies of sulfonylurea and sulfonamide herbicides. *Weed Res.*, 1996, **36**: 271-280.
55. Streibig J.C., Rudemo M., Jensen J.E.: Dose-response curves and statistical models. *Herbicide bioassays*. Ed. J. C. Streibig, P. Kudsk. Boca Raton, FL: CRC Press., 1993, 29-55.
56. Szmigielski A.M., Schoenau J.J., Geisel B.G.L., Holm F.A., Johnson E.N.: Application of a laboratory bioassay for assessment of bioactivity of ALS-inhibiting herbicides in soil. *Herbicides and environment*. Ed. A. Kortekamp. Rijeka, InTech, 2011, 217-228.
57. Vasilakoglou I.B., Eleftherohorinos I.G., Dhima K.B.: Activity, adsorption and mobility of three acetanilide and two new amide herbicides. *Weed Res.*, 2001, **41**: 535-546.

58. Vicari A., Catizone P., Zimdahl R. L.: Persistence and mobility of chlorsulfuron and metsulfuron under different soil and climatic conditions. *Weed Res.*, 1994, **34**: 147-156.
59. Walker A., Welch S. J.: The relative movement and persistence in soil of chlorsulfuron, metsulfuron-methyl and triasulfuron. *Weed Sci.*, 1989, **29**: 375-383.
60. Walker A., Cotterill E. G., Welch S. J.: Adsorption and degradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl and triasulfuron. *Weed Sci.*, 1989, **29**: 281-287.
61. Wang J. D., Shi H. Y., Ye Y. H., Wang M. H.: An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of fenoxaprop-p-ethyl. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2009, **37**: 82-86.
62. Wardencki W., Namieśnik J.: Biomonitoring zanieczyszczeń środowiska. *Inż. Ochr. Środ.* (Eng. Prot. Environ.), 2001, **4(3-4)**: 301-322.
63. Woźnica Z.: *Herbologia. Podstawy biologii, ekologii i zwalczania chwastów*. PWRiL, Poznań, 2008, ss. 430.
64. Wyszowska J., Kucharski J.: Biochemical and physicochemical properties of soil contaminated with herbicide Triflurotox 250 EC. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2004, **13(2)**: 223-231.
65. Van Wyk L. J., Reinhardt C. F.: A bioassay technique detects imazethapyr leaching and liming-dependent activity. *Weed Technol.*, 2001, **15(1)**: 1-6.
66. Ye Q., Sun J., Wu J.: Causes of phytotoxicity of metsulfuron-methyl bound residues in soil. *Environ. Pollut.*, 2003, **126**: 417-423.
67. Zawaadzki B., Jabłczyński W.: Adsorpcja i desorpcja chlorosulfuronu w dwu glebach określona biotestem z rośliną *Wolffia arhiza* (L.) *Wim. Rocz. Nauk Rol.*, 1994, **110(3-4)**: 41-51.

Adres do korespondencji:

dr Tomasz R. Sekutowski  
Zakład Herbologii i Techniki Uprawy Roli  
IUNG-PIB  
ul. Orzechowa 61  
50-540 Wrocław  
e-mail: t.sekutowski@iung.wroclaw.pl