

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych,
w szczególności określonych w art. 16 ust. 2 ustawy
w języku polskim**

1. Imię i nazwisko Anna Gorczyca

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania

magister inżynier ogrodnictwa, specjalizacja ochrona roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Ogrodniczy, 1994

Tytuł pracy: Wpływ jonów manganu w zróżnicowanych temperaturach na nicienie owadobójcze

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Magdalena Jaworska

Recenzent: prof. dr hab. Andrzej Wnuk

doktor nauk rolniczych z zakresu agronomii, specjalność naukowa: ochrona roślin, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Rolniczy, 2001

Tytuł rozprawy: Wpływ jonów metali na wybrane mikroorganizmy owadobójcze

Promotor: prof. dr hab. Magdalena Jaworska

Recenzenci: prof. dr hab. Cecylia Bajan
prof. dr hab. Lesław Badura

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

1995 – 1996 starszy referent techniczny, Zakład Ochrony Środowiska Rolniczego, Wydział Rolniczy, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

1996 – 2002 asystent naukowo-dydaktyczny, Zakład Ochrony Środowiska Rolniczego, Wydział Rolniczy, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

od 2002 – obecnie adiunkt naukowo-dydaktyczny, Zakład Ochrony Środowiska Rolniczego, (obecnie Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego), Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie (obecnie Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

jednotematyczny cykl publikacji pt.:

Reakcja grzybów owadobójczych na wielościenne nanorurki węglowe

b) publikacje wchodzące w zakres osiągnięcia naukowego:

Autor/autorzy, data wydania, tytuł, wydawca lub czasopismo, tom, strony

b. 1. Gorczyca A., Kasprowicz M., Lemek T., Jaworska M. 2009. Influence of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on viability of *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown & Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes) fungus spore. Ecol Chem Eng 16 (7), 765 – 770. **IF = 0; punkty MNiSW: 6**

b. 2. Gorczyca A., Kasprowicz M.J., Lemek T. 2009. Physiological effect of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on conidia of the entomopathogenic fungus, *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *J Environ Sci Heal A* 44 (14), 1592 – 1597. **IF = 1,363; punkty MNiSW: 20**

b. 3. Gorczyca A., Kasprowicz M.J., Lemek T. 2014. The physiological effects of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on conidia and the development of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *J Environ Sci Heal A* 49 (6), 741 – 752. **IF = 1,135; punkty MNiSW: 20**

b. 4. Gorczyca A., Kasprowicz M.J., Lemek T. 2014. Physiological aspects of the interaction of multi-walled carbon nanotubes with *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in entomopathogenic spores. *J Environ Sci Heal A* 49 (7), 863 – 868. **IF = 1,135; punkty MNiSW: 20**

b. 5. Gorczyca A., Kasprowicz M.J., Lemek T. 2015. Bioactivity of MWCNT in conidia of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Water Air Soil Pollut* 226: 75. **IF = 1,685; punkty MNiSW: 25**

Sumaryczny IF prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **5,318**. Suma punktów według ujednoliconego wykazu czasopism punktowanych MNiSW z dnia 31 grudnia 2014 r. wynosi **91**. Prace i oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w ich powstanie stanowią **załącznik 4** wniosku.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Alfabetyczny wykaz zastosowanych skrótów:

AFM - (ang. atomic force microscope) mikroskop sił atomowych

CFU - (ang. colony forming unit) jednostka tworząca kolonię

CNT - (ang. carbon nanotubes) nanorurki węglowe

DDT - dichlorodifenylotrichloroetan

LAI - wskaźnik pokrycia liściowego (ang. Leaf Area Index)

LT50 - (ang. the median Lethal Time) średni czas zamierania

MWCNT - (ang. multi-walled carbon nanotubes) wielościenne nanorurki węglowe

MWCNT(COOH)_x - (ang. multi-walled carbon nanotubes functionalized COOH) wielościenne nanorurki węglowe funkcjonalizowane COOH

ROS - (ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu

SEM - (ang. scanning electron microscope) skaningowy mikroskop elektronowy

SWCNT - (ang. single-walled carbon nanotubes) jednościenne nanorurki węglowe

TEM - (ang. transmission electron microscope) elektronowy mikroskop transmisyjny

Wprowadzenie i cel badań

Istotnym ograniczeniem globalnej produkcji rolniczej są straty powodowane przez agrofagi. Ocenia się, że straty te stanowią 40% i pomimo wzrostu zużycia pestycydów utrzymują się stale na wysokim poziomie (Oerke 2006). Dwie podstawowe współczesne strategie walki z agrofagami to ochrona chemiczna i uprawa roślin transgenicznych (Welsh i in. 2002). Jednak według wielu naukowców duże znaczenie dla ochrony roślin ma dokładne poznanie i właściwe sterowanie składowymi ekosystemów rolniczych (Vega i in. 2009). Biotyczne czynniki regulacji liczebności agrofagów, w tym organizmy entomopatogenne badane są od dawna, ale nadal pełnią marginalną

rolę w praktycznej ochronie roślin. Nie doceniając możliwości entomopatogenów zbyt mało uwagi poświęca się ich protekcji.

Obecnie potencjał grzybów owadobójczych jest wiązany nie tylko z możliwością redukcji szkodników roślin. Stwierdzono, że grzyby entomopatogenne są efektywnymi endofitami, antagonistami fitopatogenów, jak i mogą bytować w ryzosferze wspomagając wzrost roślin (Vega i in. 2009).

Grzyby endofityczne rozwijają się w nadziemnych tkankach roślin, a ich obecność skutkuje wzrostem odporności roślin na fitopatogeny i szkodniki. Gatunki grzybów, tradycyjnie zaliczane do entomopatogenów z rodzajów *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* i *Isaria* pełnią rolę endofitów, co podkreśla Vega (2008). Behie i in. (2012) wykazali aktywną translokację azotu z owada żywiciela do rośliny przez grzyb owadobójczy z rodzaju *Metharizium*.

Antagonizm względem fitopatogenów wynika z wytwarzania metabolitów (antybiotyki, bioaktywne związki lotne, enzymy); konkurencji o miejsce i składniki pokarmowe; pasożytnictwa oraz hipowirulencji. Obecność grzybów antagonistycznych względem fitopatogenów wpływa na odporność roślin, a w konsekwencji na lepszy wzrost. Entomopatogeny z rodzaju *Beauveria* i *Lecanicillium* poprzez antybiozę, konkurencję oraz wzbudzanie odporności systemowej roślin są antagonistami dla fitopatogenów (Kim i in. 2008, Ownley i in. 2008).

Zakażone przez entomopatogeny martwe lub umierające owady stanowią w glebie potencjalne źródło energii dla drobnoustrojów oportunistycznych (Strasser i in. 2000).

Kolejną funkcją entomopatogenów jest ich obecność w ryzosferze i korzystny wpływ na wzrost roślin (Hu i St. Leger 2002). Elliot i in. (2000) przypisali grzybom entomopatogennym swoistą funkcję „bodyguard” roślin. Zjawisko to polega na dostarczaniu składników pokarmowych grzybom przez rośliny oraz indukcji namnażania grzybów przez substancje semiochemiczne w przypadku uszkodzenia roślin przez owady.

Niewątpliwie jednak podstawą pożytecznej roli grzybów entomopatogennych w agrocenozach jest redukcja wielu groźnych szkodników roślin. Grzybami pełniącymi taką rolę są m. in. gatunki należące do rzędu Hypocreales (powszechny składnik mikrobioty glebowej). Rodzaje *Beauveria* i *Isaria* (Cordycipitaceae) oraz *Metharizium* (Clavicipitaceae) są najczęściej izolowane z gleby. Zagęszczenie ich diaspor w glebie może przekraczać 1000 CFU·g⁻¹ (Meyling i Eilenberg 2007, Scheepmaker i Butt 2010). Obszerne badania wykonane przez Medo i Cagan (2011) potwierdzają pospolite występowanie Hypocreales w glebach umiarkowanej strefy klimatycznej. Zbadano ponad 900 prób glebowych i stwierdzono obecność tych grzybów w 70% prób oraz dominację gatunków *Metarhizium anisopliae* (obecny w 37% prób), *Beauveria bassiana* (36%) i *Isaria fumosorosea* (9%). Według w/w autorów *B. bassiana* preferuje siedliska naturalne, często lasy; *I. fumosorosea* siedliska seminaturalne, a *M. anisopliae* agrocenozy. Podobne badania przeprowadzone w Polsce (Tkaczuk i in. 2014) wykazały powszechne występowanie tych samych gatunków. Stwierdzono, że nawet intensywna agrotechnika nie eliminuje grzybów owadobójczych z gleby.

Gatunek *B. bassiana* może być izolowany z różnych gleb, przykładowo górskich, sawanny, lasów, gruntów uprawnych oraz wrzosowisk i torfowisk. Notuje się jego obecność także w ryzosferze roślin, w tym drzew; w korze drzew; na powierzchni części nadziemnych roślin, jako endofit; często w otoczeniu ptaków dziko żyjących oraz w powietrzu i wodzie. Żywicielami tego gatunku mogą być owady i pajęczaki. *B. bassiana* redukuje populacje ważnych szkodników, np. stonki ziemniaczanej, omacnicy prosowianki, miseczników, oprzędzików, opuchlaków,

owocówek, kwieciaków i wielu innych (Zimmermann 2007a). Gatunek ten typuje się jako czynnik biologicznego zwalczania fitopatogenów. Wykazano skuteczność *B. bassiana* w zhamowaniu rozwoju ważnych gospodarczo gatunków grzybów chorobotwórczych - *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *P. debaryanum*, *Septoria nodorum*, *Rhizoctonia solani* i *Phoma betae* (Ownley i in. 2010).

Gatunek *I. fumosorosea*, dawniej znany pod nazwą *Paecilomyces fumosoroseus*, charakteryzuje się wysokim stopniem różnorodności genetycznej, a dokonane już odkrycia pozwalają określić go jako kompleks szczepów o dużym polimorfizmie oraz genotypu związanego z pasożytnictwem mączlików (Gauthier i in. 2007). *I. fumosorosea* najczęściej bywa izolowany właśnie z mączlików, a porażenie tych pluskwiaków może przybierać formę epizoocji (Lacey i in. 2008). Grzyb *I. fumosorosea* izolowano również z agrofagów należących do roztoczy i muchówek (Zimmermann 2008). Kavkova i Curn (2005) stwierdzili jego nadpasożytnictwo względem fitopatogenów – mączniaków. W Polsce *I. fumosorosea* jest bardzo często stwierdzany w glebie, w tym użytkowanej rolniczo (Miętkiewski i in. 1992, Sapięha-Waszkiewicz i in. 2003).

Gatunek *M. anisopliae* był jako pierwszy wykorzystywany do zwalczania szkodników roślin. Na przełomie XIX i XX wieku stosowano go w uprawach polowych do zwalczania *Anisoplia austriaca*, *Cleonus punctiventris*, *Tomaspis varia* i *Oryctes rhinoceros*. Obecnie *M. anisopliae* jest oceniany jako bardzo skuteczny w zwalczaniu gąsienic motyli m. in. omacnicy prosowianki i rolnic; larw chrząszczy - pędraków i drutowców; prostoskrzydłych, w tym szarańczy; termitów; karaczanów; wciornastków i komarów. Gatunek ten występuje od Arktyki do strefy tropikalnej i może być izolowany z gleby, stawonogów, ryzosfery roślin, osadów dennych, drzew i innych siedlisk (Zimmermann 2007b).

Etapy infekcji stawonogów przez gatunki z rzędu Hypocreales są takie same. Faza patogeniczna rozpoczyna się gdy zarodnik konidialny kiełkuje przez oskórek do hemocelu przełamując obronną reakcję immunologiczną, po tym dochodzi do pasywnego rozwoju strzępek lub blastospor w hemolimfie żywiciela. Po śmierci żywiciela następuje faza saprofityczna cyklu życiowego zakończona obfitym zarodnikowaniem konidialnym. Infekcja nie jest prostym procesem mechanicznym. W jej trakcie grzyby wytwarzają szereg metabolitów, w tym wtórnych, co jest cechą specyficzną danego gatunku (Amiri-Besheli i in. 2000, Vey i in. 2001).

Hydrofobowe, suche zarodniki konidialne kuliste lub owalne, o niewielkich rozmiarach (2 – 8 μm) są najczęściej rozprzestrzeniane biernie w powietrzu lub na drodze forezy przez organizmy żywe. Diaspory grzybów owadobójczych wykazują typową wrażliwość na czynniki abiotyczne tj. niską wilgotność, promieniowanie UV, temperatury w zakresie poniżej 5°C i powyżej 30°C, przy czym jest to uwarunkowane zmiennością między- i wewnątrzgatunkową (Quesada-Moraga i in. 2007, Jaronski 2010).

W aspekcie przedstawionej cennej roli grzybów entomopatogennych w agrocenozach podjęcie badań odnośnie oceny wpływu nanorurek węglowych na te organizmy są uzasadnione.

Nanotechnologia jest pojęciem relatywnie nowym w świecie nauki. Dynamiczny rozwój nanotechnologii przysporzył wielu innowacyjnych rozwiązań w licznych dziedzinach życia. Kraje Unii Europejskiej przyjęły już odpowiednie regulacje, które pozwolą na dokładne zrozumienia nowych zjawisk i właściwości związanych z nanomateriałami oraz założenia ich wdrażania w mikro- i makroskali (European Commission 2013).

Jednym z materiałów nanotechnologicznych o dużym potencjale aplikacyjnym są supramolekularne odmiany węgla o nazwie nanorurki węglowe (CNT). Wyróżniamy jednościenne

nanorurki węglowe (SWCNT) zbudowane z jednego walca grafenu o średnicy 1-2 nm i długościach nano lub mikrometrycznych, dwuścienne o mniejszym znaczeniu aplikacyjnym oraz wielościenne nanorurki węglowe (MWCNT) zbudowane z wielu koncentrycznych warstw grafenu, których średnica może osiągać do 30 nm, a długość przekraczać wymiar mikrometrów. Odkrycia nanorurek węglowych dokonał Iijima (1991).

Cechą wyróżniającą wszystkie nanomateriały jest niespotykana u materiałów klasycznych powierzchnia właściwa przypadająca na objętość (zgodnie z definicją powyżej $60 \text{ m}^2 \cdot \text{cm}^{-3}$). Wynika z tego szereg unikalnych właściwości. Przykładowo CNT charakteryzuje sprężystość wyrażona modułem Younga wynosząca 10^{12} , która w połączeniu z niewielką gęstością rzędu $1,3 - 1,4 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, daje najlepszy rezultat spośród znanych ludzkości materiałów. Dodatkowo CNT posiadają współczynnik przewodzenia ciepła λ równy $3000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ i rezystywność $\rho < 10^{-6}$ (Ando i in. 1999, Reich i in. 2004, Treacy i in. 1996).

Istnieją trzy sposoby wytwarzania CNT: ablacja laserowa, wyładowania w łuku oraz chemiczna depozycja par. Wytworzone CNT poddaje się procesom polegającym na oczyszczaniu (wyżarzanie w atmosferze powietrza lub tlenu, traktowanie kwasem, mikrofiltracja); rozagregowaniu (ultrasonikacja, elektrostatyczna obróbka plazmowa, obróbka w polu elektrycznym, frezowanie, polimeryzacja) oraz funkcjonalizacji chemicznej w celu poprawy interakcji z ciałami stałymi lub cieczami (Ramsden 2011). Funkcjonalizacja wielowarstwowych MWCNT nie powoduje naruszenia struktur wewnętrznych, co w porównaniu do SWCNT jest bardzo korzystne. Takie modyfikacje MWCNT umożliwiają zwiększenie właściwości dyspersyjnych bez znaczącej szkody dla własności mechanicznych i elektrycznych struktur wewnętrznych. Funkcjonalizowanie MWCNT eliminuje silne właściwości hydrofobowe i przynosi znaczną poprawę właściwości technologicznych. Przewiduje się, że funkcjonalizowane MWCNT będą częściej wykorzystywane w praktyce, niż surowe (Wang i in. 2005, Ma i in. 2010, Sahoo i in. 2010, Spitalsky i in. 2010, Jin i Park 2011).

Ważnymi kierunkami aplikacji CNT są obecnie medycyna i farmacja. CNT są wykorzystywane jako stabilne nośniki leków, peptydów i kwasów nukleinowych. Nanorurki są testowane w celu selektywnego niszczenia komórek nowotworowych, w terapiach genowych, w tym do wyciszania ekspresji genów we współdziałaniu z małymi, interferującymi RNA, co umożliwia selektywną modulację. Podobnie, jak w medycynie w sektorze rolniczym duże możliwości aplikacyjne CNT związane są z genetyką organizmów np. do doskonalenia genetycznego roślin, transportu genów oraz substancji terapeutycznych w organizmach roślinnych i zwierzęcych, czy też do wyciszania ekspresji genów w warunkach stresowych (Chen i in. 2014). Duży potencjał CNT związany jest z rolnictwem precyzyjnym. Nanosensory, w których stosuje się CNT mogą pomagać w detekcji organizmów lub substancji szkodliwych w agrocenozach. Te nowoczesne technologie wpłyną na lepsze zarządzanie zasobami naturalnymi, możliwość wcześniejszego wykrywania patogenów i toksyn w roślinach lub wyprodukowanej żywności (Rai i Ingle 2012, Sekhon 2014).

Ciekawym, ale wciąż kontrowersyjnym zagadnieniem jest możliwość stymulacji kiełkowania i wzrostu roślin traktowanych CNT. Lahiani i in. (2013) oceniając wpływ MWCNT na kiełkowanie i wzrost jęczmienia, soi oraz kukurydzy obserwowali stymulację w przypadku wprowadzenia nanorurek do pożywek agarowych, jak i pokrycia nimi nasion. Obecność nanorurek zobrazowali w okrywach nasiennych roślin technikami TEM i spektroskopią Ramana. Wykazali u roślin traktowanych ekspresję genów kodujących akwaporyny - białka transmembranowe tworzące kanały uczestniczące w procesie transportu wody. Autorzy wnioskowali, że CNT mogą działać jako

regulatory kiełkowania i wzrostu roślin. Podobnie entuzjastyczne podejście zaprezentował zespół Khodakovskaya i in. (2009), który w badaniach uzyskał istotną stymulację wzrostu pomidora traktowanego CNT.

Canas i in. (2008) zbadali wpływ SWCNT na kiełkowanie kapusty, marchwi, ogórka, sałaty, cebuli i pomidora. W testach wykorzystali również SWCNT funkcjonalizowane kwasem poli-3-aminobenzenosulfonowym. Reakcja roślin była zróżnicowana i zależna od rodzaju nanorurek, a wykonane obrazowanie SEM wykazało ich obecność jedynie na powierzchni tkanek roślin, co związane było z krótkim czasem ekspozycji.

Liu i in. (2009) stosując SWCNT znakowane izotiocyanianem fluoresceiny udowodnili wnikanie nanorurek do komórek roślinnych na drodze endocytozy, co stwarza możliwość wykorzystania tego nanomateriału jako nośnika trudno absorbowanych substancji przez ściany komórkowe.

Eksperymenty wykonane na zawiesinach komórek ryżu dowiodły, że MWCNT wywołują powstawanie ROS, co skutkuje śmiercią komórek (Tan i in. 2009). Negatywne skutki traktowania zawiesin komórkowych rzodkiewnika przez MWCNT wykazali Lin i in. (2009). Obserwowali spadek zawartości suchej masy, chlorofilu i wzrost aktywności dysmutazy nadtlenkowej. W doświadczeniach MWCNT indukowały nekrozy i ostatecznie apoptozę komórek. Badając stopień gromadzenia nanomateriałów węglowych przez rośliny ryżu, których nasiona traktowano SWCNT, MWCNT i fulerenami C₇₀ stwierdzono jeszcze w drugiej generacji roślin agregaty nanomateriałów w nasionach, korzeniach, pędach i liściach (Tan i in. 2009).

W dotychczasowych badaniach oceniających wpływ nanorurek węglowych na mikroorganizmy najczęściej priokariotyczne stwierdzono, że są one w stanie niszczyć ich osłonę komórkową. Autorzy prac wskazują, że są to procesy mechaniczne związane z rozmiarami i budową nanorurek, a nie wynikają one z właściwości chemicznych. Nanorurki o mniejszych rozmiarach poprzez ułatwioną penetrację osłon komórkowych wykazują silniejsze właściwości cytotoksyczne (Kang i in. 2007, Lee i in. 2004, Chipot i Tarek 2006, Mwenifumbo i in. 2007, De Nicola i in. 2007, Kang i in. 2008, Agharkar i in. 2008).

Tong i inni (2012) zbadali wpływ surowych i funkcjonalizowanych SWCNT na organizmy prio- i eukariotyczne w glebach o niskiej i wysokiej zawartości substancji organicznej. Stwierdzono, że toksyczność badanych nanomateriałów zależy od rodzaju nanorurek i gleby. Aktywność mikroorganizmów była ograniczona przez nanorurki surowe w glebie o niższej zawartości materii organicznej. Funkcjonalizacja nanorurek powodowała spadek bioaktywności względem mikroorganizmów. Zawartość materii organicznej w glebie stanowiła o jej funkcji ochronnej poprzez sorpcję nanomateriałów. Te same materiały stosowane w hodowlach płynnych bioluminescentnej *Escherichia coli* powodowały ograniczenie metabolizmu, przy czym w największym stopniu miało to miejsce dla nanorurek surowych. Autorzy sugerują, że wzmożona emisja nanorurek surowych może powodować spadek aktywności mikrobiologicznej gleby. Również Rodrigues i inni (2013) potwierdzili, że wysokie stężenia SWCNT w glebie wpływają na aktywność mikroorganizmów i mogą decydować o biogeochemicznym obiegu składników odżywczych w glebie.

W przeszłości powszechne stosowanie skutecznych substancji chemicznych (DDT), bądź mających dobre parametry techniczne (azbest), nieopowiedziane szczegółową diagnozą, skutkowało poważnymi, często nieodwracalnymi zanieczyszczeniami środowiska. Dlatego w odniesieniu do nanozwiązków posiadających duży potencjał aplikacyjny m. in. w produkcji rolniczej, należy podjąć we właściwym momencie badania oceniające ich wpływ na składowe agrocenoz.

Głównym celem prac wchodzących w skład przedstawianego osiągnięcia naukowego była ocena reakcji grzybów entomopatogennych na MWCNT. W badaniach wykorzystano konidia, gdyż inicjują one patogenezę, stanowią formę rozprzestrzeniania się w środowisku, a zarazem są oceniane, jako odporniejsze na czynniki zewnętrzne w porównaniu do komórek grzybni wegetatywnej. Do badań wytypowano gatunki dominujące w glebach użytkowanych rolniczo: *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* i *B. bassiana*. Założono, że MWCNT będą wywoływać zmiany w aktywności grzybów tj. we wzroście, sporulacji, kiełkowaniu i patogeniczności, a reakcje te mogą być zależne od czasu traktowania nanorurkami. W badaniach zastosowano komercyjne (surowe) oraz funkcjonalizowane MWCNT w celu porównania względnej aktywności biologicznej wobec badanych komórek grzybów owadobójczych.

Wyniki badań

Prace **b.1.**, **b.2.** i **b.5.** zawierają wyniki badań trzech szczepów gatunku *I. fumosorosea* (dawniej *P. fumosoroseus*) pochodzących z kolekcji własnej. We wszystkich doświadczeniach wykorzystano komercyjne (surowe) MWCNT i utlenione w kwasie azotowym (karboksylowane) MWCNT(COOH)_x. Materiał biologiczny stanowiły konidia.

W pierwszym wykonanym eksperymencie (**b. 1.**) wodne zawiesiny konidiów kontaktowano w czasie 1 h ze zdyspergowanymi roztworami MWCNT. Traktowane konidia hodowano *in vitro* i oceniono wzrost liniowy grzybni wegetatywnej, zarodnikowanie i przyrost biomasy. Stwierdzono inny charakter wzrostu liniowego grzybni z zarodników traktowanych MWCNT w porównaniu do kontroli. Wykonana analiza wzrostu wg rozkładu Gomperta wykazała różnice w szybkości przebiegu oraz czasie wysycenia. W przypadku traktowania konidiów MWCNT trend wzrostu charakteryzował się większą amplitudą, mniejszą szybkością przebiegu i istotnie dłuższym czasem wysycenia w porównaniu do kontroli. Grzybnia w kontroli rosła szybciej, ale i wcześniej następowało spowolnienie tempa jej wzrostu. Hodowla szczepu z zarodników po kontakcie z MWCNT obu rodzajów ograniczyła początkowo intensywność wzrostu liniowego w czasie, ale jego załamanie było obserwowane istotnie później i grzybnie osiągnęły większe rozmiary, szczególnie dla surowych MWCNT. Surowe MWCNT wpłynęły na istotne ograniczenie zarodnikowania szczepu w porównaniu do kontroli. Oddziaływanie MWCNT(COOH)_x było zdecydowanie słabsze, a uzyskany wzrost liniowy w końcowym etapie i zarodnikowanie grzybni nie różniły się istotnie od kontroli. Nie stwierdzono istotnego wpływu obu rodzajów MWCNT na przyrost biomasy tego szczepu.

Eksperyment, którego wyniki prezentuje praca **b. 2.** przeprowadzono wykorzystując kolejny szczep *I. fumosorosea* i stosując zróżnicowany czas traktowania nanorurkami tj. 1, 3, 7, 15, 31, 71, 144, 213 i 865 h. Analizowano wzrost liniowy i wagowy oraz zarodnikowanie grzybni w hodowli następczej. Surowe MWCNT istotnie hamowały badane parametry grzyba w 9 przypadkach, a dla MWCNT(COOH)_x obserwowano 5 inhibicji ocenianych procesów. Sporulacja grzybni była cechą szczepu najsilniej ograniczaną przez oba rodzaje MWCNT (na 18 traktowań w 10 odnotowano inhibicję). Stwierdzono, że funkcjonalizacja MWCNT, pomimo, że powoduje zmniejszenie rozmiarów nanorurek wpływa na obniżenie cytotoksyczności względem konidiów testowanego szczepu. W przypadku obu rodzajów MWCNT stwierdzono w krótkim (3 h) traktowaniu stymulację wzrostu liniowego i wagowego oraz ograniczenie procesu sporulacji szczepu. Świadczy to,

że MWCNT w roztworach wodnych mogą być źródłem węgla amorficznego dla grzybów i stymulować ich wzrost, ale w dość ograniczonym zakresie.

W ostatnim z eksperymentów wykonanych ze szczepem *I. fumosorosea* (**b. 5.**) zastosowano surowe MWCNT i dwa rodzaje MWCNT(COOH)_x. Funkcjonalizacja nanorurek polegała na zróżnicowanym czasie utlenienia w 68% HNO₃ – krótszym (60 h) i dłuższym (192 h). Dokonano szczegółowej charakterystyki oraz obrazowania nanomateriałów TEM, SEM i AFM. Przeprowadzone badania mikrobiologiczne dotyczyły tych samych parametrów, a zostały poszerzone o analizę kiełkowania konidiów i ich patogeniczności względem owadów testowych – larw mącznika młynarka *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Zróżnicowany czas traktowania konidiów wynosił 1, 24, 72 i 216 h. Zastosowane surowe MWCNT powodowały wyraźne modyfikacje wzrostu szczepu w porównaniu do kontroli. Stwierdzono, że karboksylacja MWCNT częściowo znosi niekorzystne oddziaływanie na konidia tj. obserwowano jedynie słabszą inokulację grzybni. Współczynnik tempa wzrostu liniowego dla fazy logarytmicznej, kiedy grzybnia rozwija się najintensywniej, wskazywał, że krótkie kontaktowanie konidiów z surowymi MWCNT (1 i 24 h) skutkuje zahamowaniem, w odróżnieniu od dłuższego czasu (72 i 216 h), kiedy szczep po mocno osłabionej inokulacji przyrastał intensywniej, niż w kontroli. Dla krócej utlenianych (60 h) MWCNT(COOH)_x odnotowano odwrotną tendencję współczynnika tempa wzrostu. Z kolei MWCNT(COOH)_x utleniane 192 h powodowały istotną stymulację wzrostu liniowego *I. fumosorosea* w fazie logarytmicznej hodowli. Traktowanie konidiów przez 24 h wszystkimi rodzajami nanorurek wpłynęło na stymulację sporulacji w hodowli następczej, z kolei przez 72 i 216 h na inhibicję procesu. Kiełkowanie zarodników z hodowli prowadzonej z konidiów po kontakcie z MWCNT było zbliżone do kontroli z wyjątkiem jednego obiektu - zarodniki grzybni hodowanej z konidiów traktowanych 216 h krócej utlenianymi MWCNT(COOH)_x, gdzie odnotowano stymulację. Analiza długości kiełków tworzonych przez zarodniki potwierdziła tendencję obserwowaną dla samego procesu kiełkowania. Bardzo ważnym parametrem w ocenie grzybów owadobójczych jest ich patogeniczność względem owadów testowych. Dyspersja nanorurek do środowiska może być przyczyną zmiany patogeniczności grzybów, a w efekcie zaburzeń w ekosystemach. W przeprowadzonym doświadczeniu uzyskano cenną informację odnośnie stymulacji patogeniczności szczepu traktowanego surowymi MWCNT na podstawie lepszego przebiegu śmiertelności larw mącznika młynarka i współczynnika LT50. Oba rodzaje karboksylacji obniżały bioaktywność MWCNT i nie stwierdzono dla nich zmian patogeniczności. Wykonana ocena potencjalnej szkodliwości nanorurek dla samych larw owadów bez udziału entomopatogena (śmiertelność naturalna na suspensjach nanorurek) wykazała, że MWCNT nie są toksyczne dla larw mącznika młynarka. Obserwowana śmiertelność larw w obiektach z udziałem nanorurek nie różniła się od kontroli. Z kolei wprowadzenie konidiów *I. fumosorosea* traktowanych MWCNT skutkowało uzyskaniem znaczącej śmiertelności larw testowych.

Materiałem biologicznym, który użyto w pracy **b. 3.** były dwa szczepy owadobójczego grzyba *M. anisopliae* pochodzące z kolekcji własnej (Ma73F i Ma78D). Szczepy wyizolowano w 2011 r. z gleby użytkowanej rolniczo. W doświadczeniu wykorzystano komercyjne MWCNT zdyspergowane ultradźwiękami w wodzie destylowanej oraz odwirowaną suspensję, co pozwoliło na uzyskanie frakcji nanorurek o najmniejszych rozmiarach. Obrazowanie TEM pozwoliło na udokumentowanie, iż koloid zawierający nanorurki komercyjne charakteryzował się znacznie większym zagęszczeniem w porównaniu do koloidu odwirowanego, gdzie uzyskano frakcję o najmniejszych rozmiarach i usunięcie występujących w suspensji agregatów. Po 1, 24, 72 i 240 h

traktowania konidiów Ma73F i Ma78D suspensjami MWCNT dokonano oceny wzrostu, zarodnikowania i patogeniczności szczepów. Badania mikroskopowe TEM pozwoliły na stwierdzenie, że MWCNT uszkadzają osłony komórkowe konidiów grzybów, co zilustrowano fotograficznie w pracy. Rozmiary zobrazowanych uszkodzeń osłon komórkowych mogły prowadzić do dezaktywacji konidiów. Wykonana ocena parametrów wzrostu wykazała, że wpływ MWCNT na *M. anisopliae* zależał od czasu traktowania i wrażliwości szczepu. Stwierdzono gorszą inokulację szczepów w 7 wariantach traktowań MWCNT, a lepszą w 3, na ogółem 16 zastosowanych. Szczep Ma73F był pod tym względem bardziej wrażliwy, niż Ma78D, a dłuższy czas traktowania okazał się bardziej niekorzystny. Dłuższy czas traktowania konidiów MWCNT skutkowało z kolei lepszym wzrostem w końcowym etapie hodowli szczepów, szczególnie dla Ma78D i nanorurek odwirowanych. W dużej liczbie traktowań uzyskano stymulację procesu sporulacji lub stwierdzono brak istotnego wpływu MWCNT na tworzenie zarodników. Jedyne ograniczenie sporulacji uzyskano w hodowli grzybni szczepu Ma78D z konidiów traktowanych 216 h komercyjnymi MWCNT. Krótsze traktowanie nanorurkami konidiów szczepu Ma73F powodowało nieznaczne ograniczenie jego patogeniczności względem owadów testowych (brak istotności statystycznej). Natomiast najdłuższe traktowanie (240 h) wpłynęło na istotną stymulację tej funkcji (lepsza śmiertelność larw mącznika młynarka w czasie i lepszy współczynnik LT50). Szczep Ma78D traktowany MWCNT charakteryzował się patogenicznością zbliżoną do kontroli. Stwierdzono, że czas kontaktowania konidiów i zastosowany rodzaj nanorurek nie modyfikowały w sposób istotny zdolności Ma78D do uśmiercania larw testowanego owada.

Doświadczenia dotyczące ostatniego z wytypowanych do badań gatunków tj. *B. bassiana* zostały opublikowane w pracy **b. 4**. Analizowano oddziaływanie komercyjnych MWCNT na trzy szczepy gatunku pochodzące z kolekcji własnej izolowane ze stonki ziemniaczanej *Leptinotarsa decemlineata* L. (Coleoptera: Chrysomelidae) (szczepy Bb181 i Bb65) oraz z gleby stosując mącznika młynarka (szczep Bb32). Czas traktowania konidiów nanorurkami wynosił 1, 24, 72 i 216 h. Najkrótszy czas kontaktu konidiów z MWCNT (1 h) skutkowało w przypadku wszystkich szczepów słabszą inokulacją grzybni. Konidia traktowane 24 h MWCNT ulegały częściowo dezaktywacji i cechowały się słabszą inokulacją grzybni. Dłuższe traktowanie konidiów szczepu Bb65 przyczyniło się do stymulacji wzrostu grzybni wegetatywnej w hodowli następczej, czego nie stwierdzono dla dwóch pozostałych szczepów. Intensywność sporulacji grzybni po zakończonej hodowli była wyrównana. Wyjątkiem dla tej funkcji życiowej było zastosowane 216 h traktowanie szczepu Bb181, gdzie proces zarodnikowania uległ istotnej stymulacji w porównaniu do kontroli. Odmienna reakcja konidiów testowanych trzech szczepów *B. bassiana* na MWCNT mogła wynikać zarówno z bardzo często występującej wśród mikrogrzybów zróżnicowanej wewnątrzgatunkowo wrażliwości, jak i z różnego zagęszczenia konidiów w zawiesinach. Gatunek *B. bassiana* można ocenić jako najslabiej reagujący na MWCNT zarówno w kierunku inhibicji, jak i stymulacji ocenionych procesów życiowych.

W celu podsumowania osiągniętych wyników badań w temacie „Reakcja grzybów owadobójczych na wielościenne nanorurki węglowe” dokonano zestawień tabelarycznych. Wykonano umowną 3-stopniową ocenę porównawczą do kontroli wszystkich analizowanych parametrów w przeprowadzonych badaniach. Ocenie podlegało 240 uzyskanych cząstkowych wyników badań dla 3 gatunków grzybów owadobójczych (w sumie 8 szczepów). Szczegółowe wyniki ewaluacji zamieszczono w Tabeli 1. W zestawieniu zbiorczym wartościowano takie parametry, jak inokulacja grzybni z konidiów traktowanych MWCNT, wzrost liniowy w końcowym

etapie hodowli, biomasa, sporulacja grzybni, kiełkowanie konidiów i patogeniczność względem owadów testowych. Ewaluowano również czas traktowania konidiów nanomateriałem (wybrano 1, 24, 72 i około 200 h). Wykonano zbiorcze zestawienie ilościowe i procentowe dokonanych ocen, co przedstawia Tabela 2.

W odniesieniu do zastosowanych w badaniach gatunków grzybów największy procentowy udział parametrów ograniczanych przez MWCNT stwierdzono u *I. fumosorosea* (27,9%). Dla *M. anisopliae* i *B. bassiana* udział zanotowanych inhibicji wynosił odpowiednio 23,4 i 19,4%. Najwięcej stymulacji ocenianych parametrów życiowych uzyskano w doświadczeniach z wykorzystaniem gatunku *M. anisopliae* (około 30%). Dla gatunków *I. fumosorosea* i *B. bassiana* traktowanie MWCNT powodowało stymulację odpowiednio 23,6 i 16,7% parametrów.

Gatunki *I. fumosorosea* i *M. anisopliae* można ocenić jako bardziej wrażliwe na użyte nanomateriały. Nieco mniej, niż połowa (około 47-48%) analizowanych parametrów nie była modyfikowana przez MWCNT. Gatunek *B. bassiana* nie reagował na MWCNT aż w 64% wykonanych pomiarów.

Surowe MWCNT częściej wykazywały działanie niekorzystne (blisko 29% wykonanych ocen) w porównaniu do nanorurek funkcjonalizowanych (21%). Poziom stymulacji uzyskany dla surowych i funkcjonalizowanych nanorurek wynosił odpowiednio 22,7 i 20%. Wskazuje to, że surowe MWCNT silniej oddziałują na konidia grzybów owadobójczych. Karboksylacja skutkuje osłabieniem bioaktywności nanomateriału względem konidiów.

Najczęstszą niekorzystną reakcją badanych grzybów na MWCNT była słabsza, niż w kontroli inokulacja. Świadczy to o możliwości unieczynnienia pewnej puli konidiów w roztworach pod wpływem MWCNT. Możliwy rozmiar uszkodzenia osłon komórkowych zarodników grzybów udokumentowano w pracy **b. 3**. Z kolei brak istotnych ograniczeń stwierdzono w przypadku kiełkowania i patogeniczności diaspor względem mącznika młynarka. Uzyskany efekt jest cenną informacją z punktu widzenia ochrony środowiska. Spodziewany wzrost dyspersji MWCNT związany z ich aplikacją w wielu technologiach, w tym rolniczych, potencjalnie nie będzie modyfikował najważniejszej funkcji grzybów entomopatogennych – ich aktywności w redukcji owadów będących szkodnikami roślin.

Sporulacja i przyrost biomasy grzybni hodowanej z konidiów kontaktowanych z MWCNT były cechami najczęściej stymulowanymi przez nanomateriały. Takie wyniki mogą również mieć znaczenie dla praktyki w odniesieniu do biologicznej ochrony roślin. Konidia grzybów owadobójczych są wykorzystywane w biopestycydach, jako substancja aktywna. Możliwość stymulowania procesu zarodnikowania i przyrostu biomasy mogłyby wpłynąć na podwyższenie efektywności produkcji biopestycydów. Taki kierunek wykorzystania MWCNT wymaga jednak szczegółowej analizy możliwości występowania zmian metabolicznych i genetycznych diaspor grzybów traktowanych nanomateriałami.

Nie stwierdzono jednoznacznie, aby zastosowany zróżnicowany czas traktowania konidiów nanomateriałem korelował z siłą oddziaływania MWCNT na komórki grzybów owadobójczych.

Uzyskane średnie wartości (Tabela 2) wskazują, że MWCNT w 26,4% hamowały badane parametry życiowe grzybów, a w 22,8% działały stymulująco. W 50,8% oceniane funkcje życiowe entomopatogenów nie odbiegały od kontroli.

Tabela 1. Ewaluacja oddziaływania MWCNT na konidia zastosowanych w badaniach grzybów owadobójczych w odniesieniu do kontroli (– inhibicja, 0 brak wpływu, + stymulacja) z uwzględnieniem różnic istotnych statystycznie

Badany parameter szczepów	Rodzaj MWCNT	Czas traktowania konidiów MWCNT zastosowany w doświadczeniu [h]													
		1	3	7	15	24	31	71	72	76	144	213	216	240	865
<i>I. fumosorosea</i> (szczep z pracy b. 1.)															
inokulacja	surowe	-													
	(COOH)x	-													
wzrost liniowy	surowe	+													
	(COOH)x	0													
biomasa	surowe	0													
	(COOH)x	0													
sporulacja	surowe	-													
	(COOH)x	0													
<i>I. fumosorosea</i> (szczep z pracy b. 2.)															
inokulacja	surowe	-	+	+	+			+	0			+	0		-
	(COOH)x	-	+	0	+			+	-			+	0		0
wzrost liniowy	surowe	+	+	+	0			0	0			0	0		-
	(COOH)x	-	+	0	0			0	0			0	0		0
biomasa	surowe	0	+	0	0			0	0			-	0		-
	(COOH)x	0	+	0	0			+	+			0	0		0
sporulacja	surowe	-	-	+	+			+	-			-	-		-
	(COOH)x	0	-	+	+			+	-			-	-		+
<i>I. fumosorosea</i> (szczep z pracy b. 5.)															
inokulacja	surowe	-				-								-	
	(COOH)x 60h	0				0								0	
	(COOH)x 192h	-				0								-	
wzrost liniowy	surowe	0				0								-	
	(COOH)x 60h	0				0								0	
	(COOH)x 192h	0				0								0	
sporulacja	surowe	-				+								-	
	(COOH)x 60h	+				+								-	
	(COOH)x 192h	0				+								-	
kielkowanie	surowe	0				0								+	
	(COOH)x 60h	0				0								+	
	(COOH)x 192h	0				0								0	
patogeniczność	surowe	+				+								0	
	(COOH)x 60h	0				0								0	
	(COOH)x 192h	0				0								0	
<i>M. anisopliae</i> Ma73F															
inokulacja	surowe	0				+								-	
	odwirowane	-				+								-	
wzrost liniowy	surowe	0				-				0				-	
	odwirowane	-				-				+				+	
sporulacja	surowe	+				+				0				0	
	odwirowane	0				+				+				0	
patogeniczność	surowe	0				0				0				+	
	odwirowane	0				0				0				+	
<i>M. anisopliae</i> Ma78D															
inokulacja	surowe	0				0				0				-	
	odwirowane	0				0				-				+	
wzrost liniowy	surowe	-				-				+				+	
	odwirowane	+				-				+				+	
sporulacja	surowe	+				0				0				-	
	odwirowane	+				0				0				0	
patogeniczność	surowe	0				0				0				0	
	odwirowane	0				0				+				0	
<i>B. bassiana</i> Bb32															
inokulacja	surowe	-				-				0				+	
wzrost liniowy	surowe	0				0				0				-	
sporulacja	surowe	0				0				+				0	
<i>B. bassiana</i> Bb65															
inokulacja	surowe	-				0				0				-	
wzrost liniowy	surowe	0				0				+				+	
sporulacja	surowe	0				0				0				0	
<i>B. bassiana</i> Bb181D															
inokulacja	surowe	-				-				0				0	
wzrost liniowy	surowe	0				+				0				0	
sporulacja	surowe	0				0				0				+	

Tabela 2. Zbiorcze zestawienie wyników ewaluacji oddziaływania MWCNT na grzyby owadobójcze uzyskane w wykonanych eksperymentach jednotematycznego cyklu publikacji

Wyszczególnienie		liczba analizowanych ocen	Ocena w odniesieniu do kontroli					
			inhibicja		brak wpływu		stymulacja	
			ilość	%	ilość	%	ilość	%
Gatunek grzyba owadobójczego	<i>I. fumosorosea</i>	140	39	27,9	68	48,6	33	23,6
	<i>M. anisopliae</i>	64	15	23,4	30	46,9	19	29,7
	<i>B. bassiana</i>	36	7	19,4	23	63,9	6	16,7
Rodzaj MWCNT	surowe MWCNT	128	37	28,9	62	48,4	29	22,7
	funkcjonalizowane MWCNT (COOH) _x	80	17	21,3	47	58,8	16	20,0
Badany parametr	inokulacja	60	27	45,0	20	33,3	13	21,7
	wzrost liniowy końcowego etapu hodowli	60	13	21,7	32	53,3	15	25,0
	biomasa	20	6	30,0	8	40,0	6	30,0
	sporulacja	60	19	31,7	22	36,7	19	31,7
	kiełkowanie	12	0	0,0	10	83,3	2	16,7
	patogeniczność	28	0	0,0	23	82,1	5	17,9
Czas traktowania konidiów MWCNT	1 h	56	16	28,6	31	55,4	9	16,1
	24 h	40	8	20,0	23	57,5	9	22,5
	72 h	40	11	27,5	22	55,0	7	17,5
	~200 h	48	15	31,3	22	45,8	11	22,9
suma		872	230		443		199	
średnia				26,4		50,8		22,8

Wnioski wynikające z przeprowadzonych badań z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

- i.** Badane gatunki grzybów owadobójczych charakteryzuje różna reakcja na MWCNT. Gatunek *I. fumosorosea* odznacza się nieco większym zahamowaniem aktywności życiowej pod wpływem MWCNT, z kolei *M. anisopliae* najczęściej ulega stymulacji. Najniższy stopień bioaktywności MWCNT wykazują względem gatunku *B. bassiana*.
- ii.** Charakter wzrostu liniowego grzybni wegetatywnej hodowanej z konidiów traktowanych MWCNT może ulegać zmianie. Traktowanie konidiów grzybów owadobójczych MWCNT najczęściej ogranicza proces inokulacji na podłożu stałym, przy czym obserwowany późniejszy wzrost liniowy często jest intensywniejszy, niż w hodowli standardowej.
- iii.** MWCNT nie hamują procesu kiełkowania konidiów gatunku *I. fumosorosea*. Nanomateriały te nie powodują również ograniczenia patogeniczności badanych gatunków grzybów owadobójczych względem larw mącznika młynarka w warunkach *in vitro*.
- iv.** Sporulacja i przyrost biomasy grzybów owadobójczych w hodowli laboratoryjnej z konidiów po kontakcie z MWCNT mogą ulegać wzbudzeniu. Uzyskane efekty mogą być wskazaniem w opracowaniu wydajniejszej metody hodowli biopestycydów na bazie grzybów owadobójczych.
- v.** Funkcjonalizacja MWCNT polegająca na karboksylacji, która zmniejsza rozmiary nanorurek zmieniając ich właściwości technologiczne wpływa na obniżenie bioaktywności względem konidiów testowanych grzybów owadobójczych.
- vi.** MWCNT w zawiesinie wodnej powodują mechaniczne uszkodzenie osłon komórkowych konidiów grzybów owadobójczych, co zobrazowano transmisyjną mikroskopią elektronową.
- vii.** MWCNT w bezpośrednim kontakcie nie wpływają na śmiertelność larw mącznika młynarka użytych w badaniach jako owady testowe.
- viii.** Wydłużanie czasu traktowania konidiów grzybów owadobójczych w zakresie do 865 h nie warunkuje reakcji diaspor na surowe i funkcjonalizowane MWCNT.
- ix.** Testowane nanomateriały o wysokim potencjale aplikacyjnym tj. surowe i funkcjonalizowane MWCNT nie wykazują jednoznacznie fungistatycznego wpływu na konidia pożytecznych grzybów owadobójczych. Stosowanie MWCNT w produkcji rolniczej nie powinno ograniczać aktywności konidiów posiadających znaczącą rolę w procesie patogenezы owadów szkodliwych.

Wskazania dla praktyki

Spodziewane uwalnianie MWCNT do środowiska, uwarunkowane możliwością aplikacji w wielu technologiach, w tym związanych z rolnictwem, nie powinno modyfikować najważniejszej funkcji grzybów entomopatogennych – ich aktywności w redukcji owadów będących szkodnikami

roślin. Obserwowana stymulacja patogeniczności konidiów grzybów owadobójczych przez MWCNT dowodzi, że istnieje potencjał w wykorzystaniu nanorurek węglowych do selekcji diaspor w kierunku poprawy ich zjadliwości względem owadów. Stwierdzona w badaniach opcja stymulowania procesu zarodnikowania i przyrostu biomasy grzybów entomopatogennych traktowanych MWCNT może być wykorzystana w celu poprawy efektywności produkcji biopestycydów. Wymaga to jednak szczegółowej oceny metabolicznej i genetycznej traktowanych konidiów.

Literatura

- Agharkar V.A., Bhushan A., Lai J.C.K., Daniels C.K. 2008. Cytotoxic effects of short multi-wall carbon nanotubes. *Nanotech* 2, 122–125.
- Amiri-Besheli B., Khambay B., Cameron S., Deadman M.L., Butt T.M. 2000. Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycol Res* 104, 447–452.
- Ando Y., Zhao X., Shimoyama H., Sakai G., Kaneto K. 1999. Physical properties of multiwalled carbon nanotubes. *Int J Inorg Mater* 1, 77–82.
- Behie S.W., Zelisko P.M., Bidochka M.J. 2012. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science* 336, 1576–1577.
- Canas J.E., Long M., Nations S., Vadan R., Dai L., Luo M., Ambikapathi R., Lee E.H., Olszyk D. 2008. Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environ Toxicol Chem* 27 (9), 1922–31.
- Chen H., Seiber J.N., Hotze M. 2014. ACS Select on nanotechnology in food and agriculture: a perspective on implications and applications. *J Agric Food Chem* 62 (6), 1209–12.
- Chipot C., Tarek M. 2006. Interaction of a peptide nanotube with a water-membrane interface. *Phys Biol* 3, 20–25.
- De Nicola M., Gattia D.M., Bellucci S., De Bellis G., Micciulla F., Pastore R., Tiberia A., Cerella C., D'Alessio M., Antisari M.V., Marazzi R., Traversa E., Magrini A., Bergamaschi A., Ghibelli L. 2007. Effect of different carbon nanotubes on cell viability and proliferation. *J Phys: Condens Matter* 19, 395013–395020.
- Elliot S., Sabelis M., Janssen A., van der Geest L., Beerling E., Fransen J. 2000. Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecol Lett* 3, 228–235.
- European Commission 2013. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee. Second regulatory review on nanomaterials. Brussels, 3.10.2012, COM(2012) 572 final.
- Gauthier N., Dalleau-Clouet C., Fargues J., Bon M.C. 2007. Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. *Mycologia* 99, 693–704.
- Hu G., St. Leger R.J. 2002. Field studies using recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Appl Environ Microb* 68, 6383–6387.
- Iijima S. 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354 (6348), 56–8.
- Jaronski S.T. 2010. Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *BioControl* 55, 159–185.
- Jin F-L., Park S-J. 2011. A review of the preparation and properties of carbon nanotubes-reinforced polymer composites. *Carbon Letters*, 12 (2), 57–69.
- Kang S., Herzberg M., Rodrigues D., Elimelech M. 2008. Antibacterial effects of carbon nanotubes: Size does matter! *Langmuir* 24 (13), 6409–6413.
- Kang S., Pinault M., Pfefferle L.D., Elimelech M. 2007. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity. *Langmuir* 23, 8670–8673.
- Kavkova M., Curn V. 2005. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales). *Mycopathologia* 159, 53–63.

- Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F., Biris A.S. 2009. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS Nano* 3 (10), 3221–3227.
- Kim J.J., Goettel M.S., Gillespie D.R. 2008. Evaluation of *Lecanicillium longisporum*, Vertalec for simultaneous suppression of cotton aphid, *Aphis gossypii*, and cucumber powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*, on potted cucumbers. *Biol Control* 45, 404–409.
- Lacey L.A., Wraight S.P., Kirk A.A. 2008. Entomopathogenic fungi for control of *Bemisia* spp.: foreign exploration, research and implementation. [w]: Classical biological control of *Bemisia tabaci* in the USA: A review of interagency research and implementation. Vol. 4 Progress in Biological Control. Gould J.K., Hoelmer K., Goolsby J. [red.]. Dordrecht, Springer ss. 33–69.
- Lahiani M.H., Dervishi E., Chen J., Nima Z., Gaume A., Biris A.S., Khodakovskaya M.V. 2013. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Appl Mater Interfaces* 5 (16), 7965–7973.
- Lee S.B., Koepsel R., Stolz D.B., Warriner H.E., Russell A.J. 2004. Self-assembly of biocidal nanotubes from a single-chain diacetylene amine salt. *J Am Chem Soc* 126, 13400–13405.
- Lin C., Fugetsu B., Su Y., Watari F. 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* T87 suspension cells. *J Hazard Mater* 170, 578–583.
- Liu Q., Chen B., Wang Q., Shi X., Xiao Z., Lin J., Fang X. 2009. Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells. *Nano Lett* 9, 1007–1010.
- Ma P.-C., Siddiqui N.A., Marom G., Kim J.-K. 2010. Dispersion and functionalization of carbon nanotubes for polymer-based nanocomposites: A review. *Composites: Part A*, 41, 1345–1364.
- Medo J., Cagan L. 2011. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. *Biol Control* 59, 200–208.
- Meyling N., Eilenberg J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biol Control* 43, 145–155.
- Miętkiewski R., Tkaczuk C., Zasada L. 1992. Występowanie grzybów entomopatogennych w glebie ornej i łąkowej. *Acta Mycol* 27, 197–203.
- Mwenifumbo S., Shaffer M.S., Stevens M.M. 2007. Exploring cellular behaviour with multi-walled carbon nanotube constructs. *Mater Chem* 17, 1894–1902.
- Oerke E.-C. 2006. Crop losses to pests. *J Agr Sci* 144, 31–43.
- Ownley B.H., Griffin M.R., Klingeman W.E., Gwinn K.D., Moulton J.K., Pereira R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *J Invertebr Pathol* 98, 267–270.
- Ownley B.H., Gwinn K.D., Vega F.E. 2010. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution *BioControl* 55, 113–128.
- Quesada-Moraga E., Navas-Cortes J.A., Maranhao E.A.A., Ortiz-Urquiza A., Santiago-Alvarez C. 2007. Factors affecting the occurrence and distribution of entomopathogenic fungi in natural and cultivated soils. *Mycol Res* 111, 947–966.
- Rai M., Ingle A. 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Appl Microbiol Biotechnol* 94 (2), 287–293.
- Ramsden J. 2011. Nanotechnology. An Introduction. Elsevier, Amsterdam ss. 288.
- Reich S., Thomsen C., Maultzsch J. 2004. Carbon nanotubes. Basic Concepts and Physical Properties. Wiley-VCH Verlag, Germany ss. 211.
- Rodrigues D.F., Jaisi D.P., Elimelech M. 2013. Toxicity of functionalized single-walled carbon nanotubes on soil microbial communities: implications for nutrient cycling in soil. *Environ Sci Technol* 47 (1), 625–33.
- Sahoo N.G., Rana S., Cho J.W., Li L., Chan S.H. 2010. Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Prog Polym Sci* 35, 837–67.
- Sapieha-Waszkiewicz A., Miętkiewski R., Marjańska-Cichoń B. 2003. Occurrence of entomopathogenic fungi in soil from apple and plum orchards. *IOBC/wprs Bulletin* 26, 113–116.
- Scheepmaker J.W.A., Butt T.M. 2010. Natural and released inoculum levels of entomopathogenic fungal biocontrol agents in soil in relation to risk assessment and in accordance with EU regulations, *Biocontrol Sci Technol* 20 (5), 503–552.
- Sekhon B.S. 2014. Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol Sci Appl* 7, 31–53.
- Spitalsky Z., Tasis D., Papagelis K., Galiotis C. 2010. Carbon nanotube-polymer composites: chemistry, processing, mechanical and electrical properties. *Prog Polym Sci* 35, 357–401.

- Strasser H., Abendstein D., Stuppner H., Butt T.M. 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycol Res* 104, 1227–1233.
- Tan X., Lin C., Fugetsu B. 2009. Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon* 47, 3479–3487.
- Tkaczuk C., Król A., Majchrowska-Safaryan A., Nicewicz Ł. 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *Journal of Ecological Engineering* 15 (4), 137–144.
- Tong Z., Bischoff M., Nies L.F., Myer P., Applegate B., Turco R.F. 2012. Response of soil microorganisms to As-produced and functionalized single-wall carbon nanotubes (SWNTs). *Environ Sci Technol* 46 (24), 13471–13479.
- Treacy M.M.J., Ebbesen T.W., Gibson J.M. 1996. Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature* 381, 678–680.
- Vega F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *J Invertebr Pathol* 98, 277–279.
- Vega F.E., Goettel M.S., Blackwell M., Chandler D., Jackson M.A., Keller S., Koike M., Maniania N.K., Monzon A., Ownley B.H., Pell J.K., Rangel D.E.N., Roy H. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol* 2 (4), 149–159.
- Vey A., Hoagland R., Butt T.M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. [w]: Butt T.M., Jackson C.W., Magan N. [red.] *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Wallingford, CAB International ss 311–346.
- Wang X.F., Chen X.M., Yoon K., Fang D.F., Hsiao B.S., Chu B. 2005. High flux filtration medium based on nanofibrous substrate with hydrophilic nanocomposite coating. *Env Sci Tech* 39 (19), 7684–7691.
- Welsh R., Hubbell B., Ervin D.E., Jahn M. 2002. GM crops and the pesticide paradigm. *Nat Biotechnol* 20, 548.
- Zimmermann G. 2007 a. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Techn* 17 (6), 553–596.
- Zimmermann G. 2007 b. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci Techn* 17 (9), 879–920.
- Zimmermann G. 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinose* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci Techn* 18 (9), 865–901.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Realizowana przez mnie tematyka badawcza jest od początku mojej pracy naukowej związana z szeroko pojętą ochroną roślin. Opublikowane wyniki badań naukowych dotyczą następujących zagadnień:

- analizy zdrowotności roślin rolniczych w zależności od różnych czynników agrotechnicznych;
- wpływu czynników abiotycznych na organizmy entomopatogenne w warunkach laboratoryjnych i środowiskowych;
- wpływu wybranych nanozwiązków na mikroorganizmy i rośliny.

Ocena zdrowotności roślin rolniczych była wykonywana w ścisłych doświadczeniach polowych i dotyczyła przede wszystkim pszenicy zwyczajnej i pszenicy twardej. Szereg lat uczestniczyłam w badaniach prowadzonych we współpracy z **Zakładem Szczegółowej Uprawy Roślin Instytutu Produkcji Roślinnej** mojej uczelni. Uzyskane wyniki badań dostarczyły wskazania dla praktyki rolniczej w zakresie doboru odmian pszenicy uprawianej w warunkach klimatyczno-glebowych Małopolski. Uzyskano również szereg cennych informacji na temat dominacji chorób grzybowych i szkodników zbóż w rejonie badań oraz wpływu agrotechniki i warunków klimatycznych sezonu wegetacyjnego na nasilenie występowania agrofagów. Chorobami dominującymi na pszenicy w rejonie badań były z kompleksu chorób podsuszkowych: fuzaryjna

zgorzel podstawy źdźbła i korzeni zbóż oraz łamliwość źdźbła zbóż i traw. Na liściach i kłosach dominowały septoriozy oraz fuzariozy. Szkodnikami najczęściej notowanymi były mszyce, skrzypionki, pryszczarek zbożowiec, niezmiarka paskowana i miniarki. Wyniki badań prezentowano na konferencjach branżowych organizowanych w Instytucie Ochrony Roślin PIB w Poznaniu w formie referatu i posteru (**II.K.5***, **III.B.8**). Opublikowane z tego zakresu wyniki badań wskazują na duże zróżnicowanie odmianowe w podatności na większość notowanych chorób grzybowych. Nowe w rejestrze odmiany pszenicy zwyczajnej formy jarej i ozimej wykazywały często wysoką odporność na patogeny i szkodniki. Stosowany, według metodyki badań wartości gospodarczej odmian roślin uprawnych, wyższy poziom agrotechniki ograniczał nasilenie występowania chorób, ale sprzyjał szkodliwości owadów kłująco-ssących (**II.D.12**, **II.D.16**).

Badania dotyczące pszenicy zwyczajnej polegały również na określeniu wpływu różnorodnego pod względem ilości i formy nawożenia azotowego na zdrowotność roślin. Stwierdzono, że stosowanie większych dawek nawożenia azotowego sprzyja szkodliwości owadów kłująco-ssących, ale uszkodzenia te nie wpływały w sposób istotny na ilość uzyskiwanego plonu ziarna. Uwzględniając szkodliwość mszyc korzystniejsze okazało się wyznaczenie dawki pogłówniej azotu na podstawie oznaczenia zawartości chlorofilu w liściach w porównaniu do testu zawartości azotu mineralnego w glebie do głębokości 90 cm (**II.D.19**). Z kolei wykonana ocena wpływu nawożenia azotowego pszenicy zwyczajnej na szkodliwość muchówek pozwoliła na stwierdzenie, że w większym stopniu o szkodliwości tych owadów decydują warunki klimatyczne sezonu wegetacyjnego, niż zastosowana ilość azotu (**II.D.31**).

W ocenie wpływu nawożenia pszenicy zwyczajnej azotem równoległe z wykorzystaniem Efektywnych Mikroorganizmów stwierdzono brak istotnego wpływu EM na poziom zdrowotności roślin. Czynnikiem decydującym o nasileniu występowania chorób były warunki klimatyczne sezonu badań (**II.D.30**).

Od kilku lat podejmowane przeze mnie badania z zakresu oceny zdrowotności dotyczą pszenicy twardej. Jest to gatunek budzący spore zainteresowanie wśród producentów ze względu na sposób użytkowania (produkcja makaronu) wpływający na korzystniejszą cenę ziarna na rynku w porównaniu do pszenicy zwyczajnej. Pszenicy twarda jest problematyczna w uprawie w Polsce ponieważ większość znanych odmian jest przystosowana do innych warunków klimatyczno-glebowych. Typowe rejony uprawy pszenicy twardej w Europie to rejon śródziemnomorski charakteryzujący się wyższymi temperaturami sezonu wegetacyjnego i mniejszą ilością opadów atmosferycznych. W przeprowadzonych badaniach własnych wykorzystywano polską odmianę Komnata i odmiany hodowli słowackiej oraz austriackiej. Badania prowadzono w kierunku porównania odmian pszenicy zwyczajnej i twardej oraz polskich i zagranicznych odmian pszenicy twardej. W zakresie agrotechniki w badaniach uwzględniono zróżnicowane nawożenie i ochronę roślin oraz termin i ilość wysiewu.

W 3-letnim doświadczeniu polowym, stosując dwa poziomy agrotechniki, oceniono występowanie chorób podsuszkowych na ozimej pszenicy twardej odmiany Komnata i zwyczajnej Ostka Strzelecka. W większym nasileniu stwierdzono występowanie fuzaryjnej zgorzeli podstawy źdźbła i korzeni zbóż oraz łamliwości źdźbła zbóż i traw. Analizowane odmiany charakteryzowała zbliżona podatność na występujące choroby. Istotne zróżnicowanie w porażeniu odnotowano dla

*zastosowane kody prac są zgodne z Załącznikiem 3 niniejszego Wniosku

pozostałych czynników doświadczalnych – sezonu uprawy i poziomu agrotechniki. Nasilenie występowania obu chorób podsuszkowych w sezonach badań nie wpływało na średnie ilości i jakość plonu (II.D.29). Badania dotyczące porównania szkodliwości skrzypionek w pszenicy zwyczajnej i twardej wskazały, że pszenica twarda jest preferowana przez te szkodniki, szczególnie w obiektach z zastosowanym niższym poziomem agrotechniki. Oceniony w tym eksperymencie LAI roślin był istotnie statystycznie różnicowany w zależności od warunków klimatycznych sezonu badań, intensywności uprawy i odmiany pszenicy (II.D.27). W przeprowadzonej ocenie zdrowotności odmiany Komnata w zależności od pięciu wzrastających poziomów nawożenia azotem stwierdzono, że wysoka dawka nawozów sprzyja porażeniu przez fuzaryjną zgorzel podstawy źdźbła i septoriozę plew. Najkorzystniejszą okazała się średnia dawka nawożenia azotowego, gdzie stwierdzono istotnie mniejsze nasilenie fuzariozy liści, septoriozy plew oraz czerni zbóż na kłosach (II.D.32).

W latach 2008 – 2011 przeprowadzono doświadczenie polowe w celu kompleksowej oceny zdrowotności, wskaźnika pokrycia liściowego, jakości i ilości plonu odmian pszenicy twardej w zależności od intensywności agrotechniki. Oceniane parametry były różnicowane przez warunki atmosferyczne sezonu badań i intensywność zastosowanej agrotechniki. Stosowanie intensywnej ochrony roślin i większych dawek nawożenia azotowego sprzyjało ograniczeniu występowania większości chorób grzybowych oraz ilości i jakości uzyskanego plonu w porównaniu do poziomu umiarkowanego. W badaniach własnych w intensywniejszej agrotechnice uzyskaliśmy istotny wzrost MTZ na poziomie 5 g. Świadczy to o decydującym wpływie zabiegów ochrony i nawożenia na jakość ziarna pszenicy twardej. Wyniki badań zostały opracowane i będą opublikowane.

Obecnie realizowany jest eksperyment polowy dotyczący wpływu terminu (optymalny i opóźniony) oraz ilości wysiewu (400, 500 i 600 szt · m²) na zdrowotność i wybrane parametry plonu odmian ozimych pszenicy twardej. Wyniki badań dwuletnich pozwalają na stwierdzenie, że nasilenie występowania chorób grzybowych jest zależne od odmiany. Zastosowany optymalny termin siewu sprzyja występowaniu niektórych chorób podsuszkowych. W zakresie gęstości siewu stwierdzono brak wpływu na występowanie szczegółowo analizowanych fuzarioz. W tym temacie podjęłam współpracę z pracownikami **Zakładu Genetyki Patogenów i Odporności Roślin, Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu** oraz **Katedrą Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu**. Wykonane dotychczas analizy pozwalają stwierdzić, że skład gatunkowy izolowanych z pszenicy twardej grzybów z rodzaju *Fusarium* można uznać za typowy dla Polski. Spośród stosowanych odmian dla odmiany Komnata wykazano największe zawartości podstawowych mikotoksyn.

Cząstkowe wyniki badań nad pszenicą twardą były już zaprezentowane na międzynarodowym kongresie the European Foundation for Plant Pathology: Zdrowe rośliny - zdrowi ludzie (III.B.25, III.B.24) oraz były upowszechnione przeze mnie w formie referatu zamawianego na szkoleniu dla doradców rolniczych pt. „Praktyczne wykorzystanie i wdrażanie wyników badań naukowych” przeprowadzonym w Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Radomiu (II.K.11).

W badania dotyczące oceny zdrowotności roślin rolniczych często angażowani byli przeze mnie studenci w ramach wykonywanych prac inżynierskich i magisterskich. Byli też współautorami publikowanych w tym zakresie wyników badań (II.D.26, II.D.27, II.D.29, II.D.30, II.D.31, II.D.32).

Kolejną tematyką realizowanych przez mnie badań podejmowaną od początku pracy naukowej była ocena wpływu różnych czynników abiotycznych na organizmy entomopatogenne

w warunkach laboratoryjnych i środowiskowych. Na początku pracy zawodowej uczestniczyłam w badaniach zespołu prowadzonego przez prof. dr hab. Magdalenę Jaworską i prof. dr hab. Piotra Tomasika nad oceną oddziaływania jonów metali na nicienie i grzyby owadobójcze. W badaniach wykorzystano dominujące gatunki nicieni owadobójczych *Heterorhbditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* i *S. carpocapsae*. Oceniano wpływ szesnastu jonów metali i ich interakcji na aktywność nicieni w warunkach *in vitro* w koncentracjach odpowiadających poziomom występującym w środowisku. Istotną śmiertelność *H. bacteriophora* powodował ołów, a ograniczenie patogeniczności nicieni stwierdzono dla ołowiu i niklu (II.A.1). Oceniając synergizm i antagonizm jonów metali względem *H. bacteriophora* i *S. carpocapsae* stwierdzono, że jony manganu i magnezu redukowały śmiertelność osobników traktowanych jonami metali ciężkich oraz wpływały na poprawę ich patogeniczności (II.A.2). Gatunek *S. feltiae* traktowany jonami kadmu, miedzi, ołowiu i cynku wykazywał spadek patogeniczności i reprodukcji. W przypadku jonów manganu odnotowano działanie zwiększające żywotność, patogeniczność i reprodukcję tego gatunku (II.A.3). Oceniono również interakcję wanadu z jonami wybranych metali dla gatunku *S. carpocapsae*. W większości przypadków stwierdzono charakter synergistyczny interakcji. Antagonizm występował w interakcji wanadu z chromem, ołowiem, magnezem i manganem. Wszystkie interakcje korzystnie oddziaływały na owadobójczą aktywność *S. carpocapsae* (II.D.3). Traktowanie nicieni *S. carpocapsae* triadami jonów metali wpływało na istotną zmianę oddziaływania obserwowanego dla jonów pojedynczych pierwiastków. Żaden z zastosowanych jonów metali nie znosił toksyczności ołowiu względem larw infekcyjnych *S. carpocapsae*. Toksyczność kadmu obniżał dodatek magnezu, ale nie w przypadku współdziałania z manganem, miedzią, cynkiem lub kobaltem (II.D.7). Zbadano również wpływ skażenia gleby metalami ciężkimi na aktywność *S. feltiae* (II.D.4) i *S. carpocapsae* (II.D.6). Wykazano protekcję larw inwazyjnych nicieni przez mangan w glebie skażonej metalami ciężkimi.

Badania z wykorzystaniem grzybów dowiodły, że jony metali modyfikują aktywność tych entomopatogenów. Gatunek *B. bassiana* reagował zahamowaniem przyrostu biomasy w obecności jonów kobaltu i miedzi. Wykazano zdolność bioakumulacji metali przez grzyb (II.D.8). Zarodnikowanie *B. bassiana* było hamowane przez kadm, miedź i ołów, a stymulowane przez mangan (II.D.9). Obecność jonów metali w podłożu hodowlanym powodowała spadek patogeniczności tego gatunku. Ponownie wykazano funkcję protekcyjną manganu i magnezu względem jonów metali ciężkich dla *B. bassiana* (II.D.11). Gatunek *I. fumosorosea* wykazał podobną do *B. bassiana* wrażliwość na jony metali ciężkich w podłożach hodowlanych. Jony ołowiu, kadmu, kobaltu i selenu ograniczały wzrost liniowy i wagowy grzyba (II.K.2). Z kolei grzyby owadobójcze w glebie skażonej metalami ciężkimi na poziomie wielokrotnie przekraczającym dopuszczalne normy zachowywały aktywność. Stwierdzono, że *B. bassiana* jest gatunkiem odporniejszym od *I. fumosorosea* i *I. farinosa*. W układach glebowych mangan i magnez wykazywały również funkcję ochronną względem toksycznych metali ciężkich dla wszystkich testowanych gatunków grzybów owadobójczych (II.D.10).

Przeprowadzono również doświadczenia nad oceną wpływu wybranych agrochemikaliów na aktywność grzybów owadobójczych. Testowane nawozy dolistne wpływały negatywnie na wzrost *B. bassiana*, w przypadku niskiego pH nawozu. Nawozy o odczynie zasadowym istotnie stymulowały wzrost liniowy i wagowy grzyba (II.D.17). Nawozy dolistne o zróżnicowanym odczynie i składzie nie modyfikowały sporulacji *B. bassiana* w warunkach *in vitro*. W teście tym odnotowano duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe w zakresie sporulacji, a szczep izolowany

z gleby skażonej charakteryzował się bardzo intensywnym zarodnikowaniem niezależnie od zastosowanych czynników badawczych (II.D.18). Zarejestrowane do stosowania w rolnictwie ekologicznym pestycydy biotechniczne na bazie ekstraktu z grejpfruta i miazgi czosnkowej ograniczały wzrost liniowy *B. bassiana* i *I. fumosoreosea*, a działały w zróżnicowany sposób na wzrost wagowy, zarodnikowanie i patogeniczność (II.D.20).

Kolejne badania, w których uczestniczyłam były podejmowane z mojej inicjatywy. Obecnie na stałe współpracuję z **Instytutem Chemii i Fizyki, Katedrą Fizjologii Roślin** oraz **Katedrą Chemii Rolnej i Środowiskowej** rodzimej uczelni oraz z **Instytutem Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie** oraz **Instytutem Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera PAN w Krakowie**. Pozwala to na projektowanie interdyscyplinarnych badań naukowych z wykorzystaniem nowoczesnych technik analityczno-badawczych.

Ciekawym cyklem doświadczeń przeprowadzonym we współpracy z Instytutem Chemii i Fizyki była ocena wpływu wybranych czynników fizycznych na grzyby. Metody fizyczne zwalczania agrofagów mają szereg zalet, z których podstawowe to stosunkowo niskie koszty i przy właściwym wykorzystaniu brak negatywnego wpływu na środowisko. Czynniki fizyczne mogą być również wykorzystywane w celu stymulacji organizmów pożytecznych. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że wysokie, impulsowe pole magnetyczne może być wykorzystywane do ograniczania szkodliwości *Fusarium culmorum* (II.D.23, II.D.28). Z kolei światło monochromatyczne o zróżnicowanej długości fali i w zróżnicowanym czasie traktowania stymuluje rozwój entomopatogena *I. fumosoreosea* (II.D.24). Wykazano również, że gatunek *B. bassiana* traktowany w krótkim czasie światłem spolaryzowanym ulega stymulacji w zakresie wzrostu liniowego i wagowego (II.D.22). Istotną stymulację patogeniczności nicieni *S. carpocapsae* stwierdzono w wyniku traktowania larw inwazyjnych tego gatunku światłem liniowo spolaryzowanym w czasie 1-4 godzin. Okazało się jednak, że nicienie w ten sposób traktowane gorzej się reprodukuje (III.B.12a).

Najnowsze doświadczenia, które w większości inicjuję i projektuję dotyczą wpływu różnych nanozwiązków na grzyby i rośliny. Niektóre z uzyskanych wyników zostały już opublikowane w czasopiśmie naukowych z bazy JCR.

Oceniając wpływ nanosrebra produkowanego fizyczną metodą wysokonapięciowego wyładowania łukowego na *F. culmorum* stwierdzono ograniczenie wzrostu wegetatywnego grzyba po kontakcie z nanosrebrem. Było to zależne od czasu traktowania zarodników suspensją nanosrebra i zasobności zastosowanego podłoża hodowlanego. W mniejszym stopniu decydowało o tym stężenie wagowo-wagowe nanosrebra w badanym zakresie od 0,12 do 10 ppm. Grzybnia wyhodowana z zarodników kontaktowanych z nanosrebrem zarodnikowała istotnie statystycznie lepiej w porównaniu do kontroli. Nanosrebro w stężeniu 2,5 ppm silnie ograniczało proces kiełkowania zarodników badanego szczepu grzyba (II.A.4).

W trakcie doświadczeń nad wpływem nanosrebra na grzyby z rodzaju *Fusarium* zaobserwowałam bardzo istotne zmiany zabarwienia rewersów hodowli szalkowych. Zainspirowało mnie to do pogłębienia analiz o ocenę oddziaływania tego nanozwiązku na produkcję metabolitów wtórnych. Zmiana wybarwienia rewersu następowała już w trofofazie i ulegała wzmocnieniu w idiofazie wzrostu. Specyficznymi produktami wtórnymi metabolizmu *Fusarium* nadającymi czerwone wybarwienie grzybni są między innymi poliketyny z grupy naftochinonów o nazwach aurofusaryna i rubrofusaryna. Zainteresowanie jakie budzą naftochinony wynika z ich szerokiego

spektrum aktywności biologicznej (fitotoksyczność, właściwości owadobójcze, bakterio- i fungistatyczne). Związki te wykazują działanie przeciwnowotworowe. Ze względu na ich bioaktywność, optymalizacja procesu tworzenia naftochinonów to ciekawe zagadnienie badawcze. Poszukując współpracy w tym zakresie skontaktowałam się z Prof. Rasmusem Frandsenem pracującym w **Katedrze Biologii Systemowej Duńskiego Uniwersytetu Technicznego**, specjalistą z zakresu metabolitów wtórnych *Fusarium*. Prof. Frandsen chętnie podjął współpracę, której wynikiem jest już publikacja nt. wpływu nanosrebra na zmiany w produkcji barwników u *F. culmorum* (II.A.5). W przeprowadzonych badaniach oceniających wpływ nanosrebra metodą krążkowo-dyfuzyjną na produkcję barwników przez *F. culmorum* stwierdzono silną modyfikację metabolizmu. Kontakt z koloidem nanosrebra wywoływał intensywniejszą pigmentację grzybni i było to skorelowane ze stężeniem nanosrebra, znacznie intensywniejszą biosyntezę aurofuzaryny, wzmożoną konwersję rubrofuzaryny do aurofuzaryny oraz intensywną biosyntezę niezidentyfikowanego zbliżonego do aurofuzaryny barwnika, nieprodukowanego przez grzyb w hodowli standardowej. Istotne zmiany w wybarwieniach grzybni były również stwierdzone z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu rewersu hodowli *F. culmorum* traktowanego nanosrebrem.

Ze względu na doświadczenie Prof. Frandsena i możliwości badawcze w jego jednostce podjęłam, ukończone sukcesem, starania o obycie **stażu w Katedrze Biologii Systemowej DTU**. W trakcie stażu pod kierunkiem opiekuna oraz Prof. Kristiana Fog Nielsena wykonałam szereg analiz polegających na ocenie metabolitów grzybów *Fusarium* traktowanych nanosrebrem z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Zgromadzone wyniki badań będą opracowywane i opublikowane.

Badania nad wpływem nanozwiązków na produkcję metabolitów wtórnych, a obecnie szczególnie miktotoksyn kontynuuję we współpracy z **Instytutem Fizjologii Roślin PAN** w Krakowie.

Tematyki wpływu nanozwiązków na grzyby owadobójcze nie ograniczam do oddziaływania nanorurek węglowych na diaspory tych grzybów, co stanowi przedstawione osiągnięcie naukowe. We współpracy z pracownikami Instytutu Chemii i Fizyki wykonałam ocenę oddziaływania nanosrebra na *I. fumosorosea*. Aplikacja nanosrebra na grzybnię vegetatywną *I. fumosorosea* powodowała słabą reakcję wzrostową i ograniczenie zarodnikowania. Nanosrebro uznawane jako silny bakteriostatyk nie wykazywało istotnych działań fungistatycznych dla komórek konidiów *I. fumosorosea*, co z kolei zostało stwierdzone dla formy jonowej przy wykorzystaniu azotanu srebra. Podobnie, jak w przypadku nanorurek węglowych odnotowano możliwość stymulacji patogeniczności *I. fumosorosea* traktowanego nanosrebrem (II.A.6).

Bardzo ciekawą kolejną tematyką moich obecnych badań jest oddziaływanie nanozwiązków na rośliny w układach hydroponicznych i wazonowych. Opublikowane z tego zakresu badania dotyczą wpływu nanosrebra na siewki pszenicy zwyczajnej w hydroponice z udziałem i bez fitopatogena *F. culmorum*. Stwierdzono istotne ograniczenie patogeny fuzaryjnej zgorzeli siewek pszenicy i naturalnego mikrobiomu ziarniaków traktowanych nanosrebrem. Z drugiej strony siewki w roztworach nanosrebra wykazywały gorszy wzrost oraz istotne uszkodzenie błon komórkowych korzeni i liści. Nanosrebro indukowało zmiany w fotosytemie II i aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Siewki traktowane nanosrebrem akumulowały srebro w korzeniach i było ono translokowane do liści. Obecność *F. culmorum* zmniejszała bioakumulację srebra w korzeniach i jego translokację (II.A.7).

W tematyce oddziaływania nanozwiązków na rośliny wykonano też badania wazonowe oceniające wpływ zróżnicowanych właściwości powierzchniowych nanosrebra redukowanego chemicznie na pszenicę zwyczajną, badania w układach hydroponicznych szczegółowo oceniające skalę uszkodzeń błon komórkowych siewek pszenicy zwyczajnej przez nanosrebro metodą wpływów oraz zanalizowano oddziaływanie nanorurek węglowych na siewki pszenicy zwyczajnej. Uzyskane wyniki są opracowywane.

Obecnie, jako kierownik zespołu składającego się z wykonawców (Katedra Fizjologii Roślin UR Kraków, Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni oraz Instytut Fizjologii Roślin PAN w Krakowie) kończę opracowanie **grantu na konkurs Opus NCN** na temat wpływu zróżnicowanych właściwości nanocząstek srebra redukowanego podfosforanem sodu w obecności heksametafosforanu sodowego na bioaktywność względem *F. culmorum* i pszenicy zwyczajnej w układach hydroponicznych i wazonowych. Perspektywy badań w tej tematyce oceniam jako bardzo obiecujące, a uzyskane wyniki dostarczą nowych informacji na temat oddziaływania nanozwiązków na ważne organizmy agrocenoz.

Podsumowanie bibliometryczne osiągniętego dorobku publikacyjnego

Mój dotychczasowy dorobek naukowy składa się z **57** publikacji w układzie pełnych prac naukowych, z czego **44** opublikowano w recenzowanych czasopismach naukowych, a **13** w biuletynach i monografiach pokonferencyjnych.

Tabela 3. Dane bibliometryczne osiągniętego dorobku naukowego przed i po doktoracie

Wyszczególnienie	Przed doktoratem			Po doktoracie			Łącznie		
	ilość	pkt. MNiSW	IF	ilość	pkt. MNiSW	IF	ilość	pkt. MNiSW	IF
Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego				5	91	5,318	5	91	5,318
Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie JRC	2	50	1,928	5	95	5,183	7	145	7,111
Publikacje naukowe w czasopismach innych niż znajdujące się w bazie JCR	8	40		24	158		32	198	
Publikacje w układzie pełnych prac naukowych w wydawnictwach pokonferencyjnych (monografie, biuletyny)	7			6			13		
Razem	17	90	1,928	40	344	10,501	57	434	12,429


11 prac naukowych mojego dorobku zostało opublikowanych w czasopismach z bazy JCR, ich łączna miara oddziaływania IF zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **12,429**. Są to czasopisma: Water Air and Soil Pollution (3 prace), Journal of Environmental Science and Health, Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering (3 prace), Polish Journal

of Environmental Studies (1 praca), Canadian Journal of Microbiology (1 praca), Polish Journal of Microbiology (1 praca), Biocontrol Science and Technology (1 praca) oraz European Journal of Plant Pathology (1 praca).

Zgodnie z załącznikami komunikatu MNiSW w sprawie wykazu czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r. łączna punktacja mojego dorobku naukowego wynosi **434** pkt. Po wyłączeniu 5 prac wchodzących w skład przedstawianego osiągnięcia naukowego mój pozostały dorobek naukowy stanowią **52** prace naukowe o łącznym IF **7,111** i punktacji MNiSW **343** pkt.

Przedstawione w Tabeli 3 dane bibliometryczne dokumentują mój rozwój naukowy po doktoracie. Według bazy Web of Science h-indeks prac z mojego dorobku naukowego wynosi obecnie **5**. Pozostałe osiągnięcia w zakresie pracy naukowej, dydaktycznej, popularyzatorskiej i organizacyjnej zostały przedstawione w Załączniku 3 do niniejszego wniosku.

Kraków, 17 marca 2015 r.



Podpis Wnioskodawcy