

**WPLYW NANOKOLOIDÓW SREBRA I MIEDZI
ORAZ NADTLENKU WODORU
NA NIEKTÓRE PATOGENY GRZYBOWE WARZYW**

THE INFLUENCE OF NANO-SILVER, NANO-COPPER
AND HYDROGEN PEROXIDE
ON VEGETABLE PATHOGENS

Maria Grzegorzewska, Beata Kowalska

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Maria.Grzegorzewska@inhort.pl

Abstract

Silver nanoparticles used in concentration 100 ppm inhibited *S. sclerotiorum* development on fresh cut carrot. The best results were obtained for nano-silver with diameter 8 nm (when the spraying was done twice: before and after fungus inoculation). Nano-copper and mixture of nano-silver and nano-copper did not affect the disease development. It was found that none of used nanoparticles (nano-silver, nano-copper, and mixture of nano-silver and nano-copper) inhibited *B. cinerea* mycelium growth on fresh cut cabbage and fresh cut onion. Huwa-San TR50 appeared to be effective against *S. sclerotiorum* if the pathogen inoculation was done after two and three days of vegetable spraying. Huwa-San did not influence on *B. cinerea* growth on cabbage and onion.

Key words: vegetable, nanoparticles, storage diseases, Huwa-San TR50

WSTĘP

Nanotechnologia jest dziedziną nauki opartą na wykorzystaniu struktur, których co najmniej jeden wymiar jest wyrażony w nanometrach, czyli na poziomie atomów i cząsteczek. Struktury te wykazują osobliwe właściwości fizyczne, chemiczne oraz biologiczne, zależnie od rodzaju materiału użytego do ich wytworzenia, wielkości cząsteczek i stężenia roztworu. Nanokoloidalne roztwory metali to małe klasterki zawieszone w wodzie (Sokół 2012).

Technologia ta jest wykorzystywana w wielu sferach życia człowieka m.in. w medycynie, przemyśle tekstylnym i spożywczym, produkcji opakowań, a także w ogrodnictwie (Sharon i in. 2010; Rai i Bai 2011). Nanotechnologia umożliwiła wprowadzenie do upraw nowych, potencjalnie skutecznych, środków ochrony roślin, regulatorów wzrostu i nawozów

sztucznych (Sokół 2012). Szczególnie duże zainteresowanie naukowców wzbudzają nanokoloidy srebra (Prabhu i Poulouse 2012; Abd-Elsalam 2013).

W literaturze naukowej można znaleźć wiele doniesień na temat zastosowania nanokoloidów w ochronie roślin, jednakże w większości przypadków są to badania laboratoryjne. W Chinach i Australii prowadzono badania nad zastosowaniem nanosrebra do przedłużenia trwałości kwiatów ciętych. Według Liu i in. (2009) moczenie łodyg gerbery przez 24 godziny w roztworze nanosrebra o stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dwukrotnie przedłuża trwałość kwiatów, na skutek ograniczenia rozwoju bakterii na powierzchni cięcia łodygi. W badaniach Lu i in. (2010) traktowanie róż nanosrebrem o stężeniu 50 i $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ wyraźnie wydłużyło ich trwałość po zbiorze. Stwierdzono, że w tkance następuje częściowe zamykanie aparatów szparkowych, co powoduje zmniejszenie transpiracji. Li i in. (2012) dowiedli, że liczebność bakterii *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas* sp., *Comamonas acidovorans* i *Chryseomonas luteola* zmniejsza się na powierzchni cięcia łodyg róż po potraktowaniu nanosrebrem o stężeniu $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ o ok. 80%, natomiast o stężeniu $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ o 100%. Safavi i in. (2011) udowodnili, że dodatek koloidów srebra do kultur tkankowych całkowicie eliminuje skażenia mikrobiologiczne. Nanokoloidy srebra i chitozanu wykazywały istotne właściwości antygrzybowe w stosunku do *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus flavus* i *Alternaria alternata* (Kaur i in. 2012). Nanokoloidy węgla okazały się natomiast skuteczne w ograniczaniu patogenicznej bakterii *Ralstonia solanacearum* (Wang i in. 2013). Negatywny wpływ nanokoloidów Ag na wzrost patogena warzyw – grzyba *Sclerotium cepivorum* wykazali także naukowcy z Korei (Jung i in. 2010; Kim i in. 2012). Doświadczenia wykonywano w warunkach laboratoryjnych, dodając do pożywek mikrobiologicznych nanokoloid o różnych stężeniach. Najlepsze efekty grzybobójcze (ok. 80-100%) otrzymano po zastosowaniu nanokoloidu Ag o stężeniach 7 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm i 100 ppm, przy czym ich skuteczność wzrastała wraz ze wzrostem stężenia. Ponadto, w doświadczeniach szklarniowych po zastosowaniu nanokoloidów Ag, wykazano pozytywny wpływ tych związków na wzrost świeżej i suchej masy roślin cebuli. Jo i in. (2009), na podstawie badań przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych, wykazali że nanocząsteczki srebra mają toksyczny wpływ na grzyby *Bipolaris sorokiniana* i *Magnaporthe grisea*. Natomiast Wolny-Koładka i in. (2013) stwierdzili wysoką toksyczność nanocząstek srebra w stosunku do grzybów *Fusarium culmorum* izolowanych z pszenicy.

Zgnilizna twardzikowa oraz szara pleśń są chorobami, które wywołują duże straty podczas przechowywania wielu gatunków warzyw. Źródłem zakażenia są sklerocja zimujące w glebie lub w przechowalniach na ścianach, podłogach lub opakowaniach. W czasie przechowywania wokół zainfekowanych warzyw powstają ogniska gnilne i następuje przenoszenie choroby na zdrowe warzywa.

Celem badań było sprawdzenie w warunkach laboratoryjnych wpływu nanokolloidów srebra i miedzi na rozwój zgnilizny twardzikowej (*Sclerotinia sclerotiorum*) na marchwi oraz szarej pleśni (*Botrytis cinerea*) na kapuście białej i cebuli.

MATERIAŁY I METODY

Badania w formie biotestów przeprowadzono na trzech gatunkach warzyw: marchwi odm. Perfekcja uprawianej na polu doświadczalnym IO w Skierniewicach, kapuście głowiastej białej odm. Kamienna Głowa i cebuli odm. Armstrong F₁ – zakupionych od producenta. Korzenie marchwi umyto i pokrojono w plastry. Wewnętrzne liście kapusty pokrojono w kwadraty wielkości ok. 2 × 2 cm. Cebulę obrano z łusek suchych, a łuski mięsiste pokrojono na fragmenty wielkości ok. 2-3 cm. Następnie warzywa wysterylizowano w 0,5% roztworze podchlorynu sodu i 50% alkoholu etylowym oraz przepłukano dwukrotnie w wodzie destylowanej. W szalkach Petriego na zwilżonej bibule filtracyjnej umieszczano fragmenty warzyw, po 4 sztuki w każdej szalce. Nanokolloidy do badań zostały przygotowane w Katedrze Technologii i Chemii Materiałów Uniwersytetu Łódzkiego.

Następnie warzywa opryskano następującymi roztworami:

- nanokolloid srebra (rozmiar 8 nm) – stężenie 100 ppm;
- nanokolloid srebra (rozmiar 35 nm) – stężenie 100 ppm;
- nanokolloid srebra (rozmiar 60 nm) – stężenie 100 ppm;
- nanokolloid miedzi (rozmiar 15 nm) – stężenie 100 ppm;
- nanokolloid srebra i miedzi (rozmiar 60 nm) – stężenie 50/30 ppm;
- nanokolloid srebra i miedzi (rozmiar 100 nm) – stężenie 50/90 ppm.

Fragmenty opryskanych warzyw zainokulowano, przy użyciu igły preparacyjnej, grzybnią patogenicznych grzybów, pochodzących z kolekcji patogenów Pracowni Mikrobiologii IO. Na każdy plaster marchwi wyłożono fragment grzybni *S. sclerotiorum*, natomiast na fragmenty kapusty i cebuli – grzybni *B. cinerea*. Patogeny te namnażano na pożywce glukozowo-ziemniaczanej przez 7 dni w temperaturze 25 °C.

Po inokulacji warzywa opryskano ponownie tymi samymi roztworami. Obiekt kontrolny stanowiły warzywa zainokulowane grzybami chorobotwórczymi, ale nie traktowane preparatami.

Dodatkowo zastosowano roztwór preparatu Huwa-San TR50 w stężeniu 1%, zawierający w 1 kg 493 g nadtlenu wodoru oraz 0,32 g koloidalnego srebra rozpuszczalnego w wodzie. Wykonano inokulację warzyw patogenami w trzech terminach: bezpośrednio po opryskiwaniu preparatem Huwa-San TR-50; po 2 dniach od opryskiwania; po 3 dniach od opryskiwania.

Doświadczenie przeprowadzono dwukrotnie, każde założono w 3 powtórzeniach. Jedno powtórzenie stanowiły cztery fragmenty warzyw umieszczone w jednej szalce. Szalki umieszczono w inkubatorze w temperaturze 25 °C. Po upływie 3, 6, 9, 14 i 20 dni od momentu zainokulowania patogenami fragmentów warzyw, przeprowadzano obserwacje, określając wielkość przerośniętej grzybni w stosunku do powierzchni warzywa. Do oceny zastosowano następującą skalę: 0 – 0%, 1 – 0,1-25%, 2 – 25,1-50%, 3 – 50,1-75%, 4 – 75,1-100%. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji. Do porównania istotności średnich zastosowano test Neumana-Keuls'a ($p = 0,05$).

WYNIKI I DYSKUSJA

W biotestach rozwój zgnilizny twardzikowej na marchwi następował dużo szybciej niż szarej pleśni na kapuście i cebuli. Wzrost grzybni *S. sclerotiorum* obserwowano na marchwi już po upływie 3 dni od inokulacji, natomiast wzrost grzybni *B. cinerea* – po upływie 6 dni. Wyraźny wzrost grzybni *B. cinerea* stwierdzono dopiero po 17 dniach na cebuli i 20 dniach na kapuście.

Efekt grzybobójczy nanokoloidów srebra stwierdzono na plastrach marchwi w postaci zahamowania wzrostu grzybni *S. sclerotiorum*. Najkorzystniejsze działanie zaobserwowano w przypadku roztworu koloidów srebra o stężeniu 100 ppm i wymiarach 8 nm (tab. 1). Marchew została porażona w stopniu 0,4, podczas gdy marchew nie traktowana w stopniu 3,8. Po zastosowaniu koloidów srebra o stężeniu 100 ppm, a wymiarach 65 nm i 35 nm – stopień porażenia wynosił odpowiednio – 1,6 i 2,2. Wartości te różniły się istotnie od wartości uzyskanej dla obiektu kontrolnego.

Niestety nie wykazano fungistatycznego efektu roztworu nanokoloidu miedzi. Rozwój zgnilizny twardzikowej na marchwi był podobny jak w obiekcie kontrolnym. Również mieszanki koloidów srebra i miedzi

o różnych wymiarach oraz stężeniach okazały się nieskuteczne w ograniczaniu rozwoju zgnilizny twardzikowej.

Autorzy prowadzący badania na kwiatach ciętych (Liu i in. 2009, Lu i in. 2010, Li i in. 2012) nie odnoszą się do wymiarów nanocząstek, ale wskazują na wyraźne różnice w działaniu nanokolloidów w zależności od zastosowanego stężenia roztworu. Również negatywny wpływ kolloidów Ag, w zależności od zastosowanego stężenia, na wzrost *S. cepivorum* wykazali Jung i in. (2010) oraz Kim i in. (2012). O toksycznym wpływie jonów i nanocząstek srebra na grzyby patogeniczne donosili także Jo i in. (2009) oraz Wolny-Koładka i in. (2013).

W doświadczeniach, opryskiwanie roztworami nanocząsteczek Ag i Cu kapusty głowiastej i cebuli zainfekowanych *B. cinerea* nie przyczyniło się do ograniczenia rozwoju szarej pleśni. W przypadku kolloidu o rozmiarze 100 nm Ag i Cu i stężeniu 50/90 ppm rozrost strzępek grzyba był intensywniejszy niż w obiekcie kontrolnym (tab. 1).

Obserwowano różnice w rozwoju *S. sclerotiorum* na plastrach marchwi traktowanych 1% roztworem preparatu Huwa-San TR50, w zależności od czasu w jakim wykonano inokulację patogenem. Na marchwi inokulowanej bezpośrednio po opryskaniu preparatem Huwa-San TR50 stwierdzono intensywny wzrost grzybni *S. sclerotiorum* po sześciu dniach. Na plastrach zainokulowanych dopiero po dwóch lub trzech dniach nie zanotowano wzrostu grzybni (tab. 2). Może to świadczyć o właściwościach profilaktycznych preparatu Huwa-San TR50 w ochronie marchwi przed zgnilzną twardzikową. Według Wojdyły (2012) nadtlenuk wodoru zawarty w preparacie Huwa-San TR50 może indukować odporność na choroby przez odkładanie kalozy w ściankach komórkowych, formowanie brodawek utrudniających infekcję patogena oraz wzrost produkcji hydroksypropiny i związków fenolowych.

Opryskiwanie preparatem Huwa-San TR50 nie miało wpływu na ograniczenie rozwoju *B. cinerea* na kapuście i cebuli, zarówno w przypadku wcześniejszej, jak i późniejszej inokulacji fragmentów warzyw patogenem.

Uzyskane wyniki nie pokrywają się z obserwacjami przeprowadzonymi przez Bill i Orlikowskiego (2012), którzy stwierdzili, że dwukrotne opryskanie chryzantem i wrzosów preparatem Huwa-San TR50 w stężeniach 0,05 i 0,1% spowodowało znaczne ograniczenie rozwoju szarej pleśni na pędach sadzonek i starszych roślin. Pozytywne efekty tego środka w ochronie roślin ozdobnych przed patogenami nalistnymi wykazał także Wojdyła (2012).

Tabela 1. Wpływ nanokolloidów srebra i miedzi na wzrost grzybni patogenów na fragmentach warzyw
 Table 1. The growth of pathogen mycelium after silver and copper nanoparticles treatments in the fresh cut vegetable tissue

Traktowanie Treatment	Stopień porażenia fragmentów warzyw przez grzyby patogeniczne (skala 0-4) The grade of vegetable affected by pathogenic fungus (grade scale 0-4)		
	Marchew zainokulowana <i>S. sclerotiorum</i> , po 6 dniach w temp. 25 °C Carrot inoculated by <i>S. sclerotiorum</i> , after 6 days at 25 °C	Kapusta głowiasta zainokulowana <i>B. cinerea</i> , po 20 dniach w temp. 25 °C White cabbage inoculated by <i>B. cinerea</i> , after 20 days at 25 °C	Cebula zainokulowana <i>B. cinerea</i> , po 17 dniach w temp. 25 °C Onion inoculated by <i>B. cinerea</i> , after 17 days at 25 °C
Koloid Ag (8 nm) – stężenie 100 ppm	0,4 a	1,8 a	1,5 b
Nano-silver (8 nm) – solution 100 ppm			
Koloid Ag (35 nm) – stężenie 100 ppm	2,2 b	2,0 b	1,5 b
Nano-silver (35 nm) – solution 100 ppm			
Koloid Ag (60 nm) – stężenie 100 ppm	1,6 b	1,7 a	1,2 a
Nano-silver (60 nm) – solution 100 ppm			
Koloid Cu (15 nm) – stężenie 100 ppm	3,8 c	2,2 b	1,5 b
Nano-copper (15 nm) – solution 100 ppm			
Koloid Ag i Cu (60 nm) – stężenie 50/30 ppm	3,8 c	2,0 b	1,3 a
Nano-silver and nano copper (60 nm) – solution 50/30 ppm			
Koloid Ag i Cu (100 nm) – stężenie 50/90 ppm	3,7 c	3,3 c	2,7 c
Nano-silver and nano-copper (100 nm) – solution 50/90 ppm			
Kontrola – nietraktowana, infekowana Control – not treated, infected	3,8 c	1,8 a	1,2 a

Objaśnienia: Explanation

Skala oceny wzrostu grzybni: 0 – 0%, 1 – 0,1-25%, 2 – 25,1-50%, 3 – 50,1-75%, 4 – 75,1-100%

The grade scale of mycelium growth: : 0 – 0%, 1 – 0.1-25%, 2 – 25.1-50%, 3 – 50.1-75%, 4 – 75.1-100%

Liczby w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią istotnie wg testu Newmana-Keuls'a (p = 0,05)

Means in the same column followed by the same letter do not differ significantly according to Newman-Keuls (p = 0,05) test

Tabela 2. Wzrost grzybni patogenów na fragmentach warzyw traktowanych 1% preparatem Huwa-San TR50
 Table 2. The growth of pathogen mycelium after Huwa-San TR50 (1%) treatment in the fresh cut vegetable

Termin inokulacji patogenem Pathogen infection time	Stopień porażenia fragmentów warzyw przez grzyby patogeniczne (skala 0-4) The grade of vegetable affected by pathogenic fungus (grade scale 0-4)		
	Marchew zainokulowana <i>S. sclerotiorum</i> , po 6 dniach w temp. 25 °C Carrot inoculated by <i>S. sclerotiorum</i> , after 6 days at 25 °C	Kapusta głowista zainokulowana <i>B. cinerea</i> , po 20 dniach w temp. 25 °C White cabbage inoculated by <i>B. cinerea</i> , after 20 days at 25 °C	Cebula zainokulowana <i>B. cinerea</i> , po 17 dniach w temp. 25 °C Onion inoculated by <i>B. cinerea</i> , after 17 days at 25 °C
Bezpośrednio po opryskiwaniu preparatem Huwa-San TR50 Immediately after Huwa-San TR50 spraying	4,0 b	2,0 b	1,7 b
Po 2 dniach po oprysku Huwa-San TR50 2 days after Huwa-San TR50 spraying	0,0 a	2,1 b	1,7 b
Po 3 dniach po oprysku Huwa-San TR50 3 days after Huwa-San TR50 spraying	0,0 a	1,5 a	1,0 a
Kontrola – nie opryskana Huwa-San TR50, zakazana patogenem Control – not sprayed, pathogen infected	3,8 b	1,8 a	1,2 ab

Objaśnienia; Explanation
 Patrz tabela 1, sec Table 1

Według Sharona i in. (2010) oraz Ghormade i in. (2011) nanokoloidy srebra znajdują w przyszłości zastosowanie w ochronie roślin przed chorobami grzybowymi i bakteryjnymi. Są to środki przyjazne środowisku i mogą przyczynić się do zmniejszenia zużycia środków chemicznych. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy zostaną wykorzystywane w kolejnych badaniach, nad zastosowaniem w praktyce ogrodniczej nanokoloidów srebra w ochronie roślin przed patogenami.

WNIOSKI

1. Nanokoloidy srebra skutecznie ograniczyły wzrost *S. sclerotiorum* na plastrach marchwi w temperaturze 25 °C.
2. Nanokoloidy srebra i miedzi oraz ich mieszanki nie miały wpływu na wzrost grzybni *B. cinerea* na fragmentach liści kapusty głowiastej białej i łuskach mięsistych cebuli.
3. Opryskiwanie preparatem Huwa-San TR50 hamowało wzrost grzybni *S. sclerotiorum* na plastrach marchwi, w przypadku gdy inokulację patogenem przeprowadzono po 2 i 3 dniach od zabiegu.

Podziękowanie

Autorzy dziękują Karolowi Fabiszewskiemu za pomoc w prowadzeniu badań i napisaniu publikacji.

Literatura

- Abd-Elsalam K. 2013. Nanoplatforms for plant pathogenic fungi management. *Fungal Genom. Biol.* 2(2): e107. DOI: 10.4172/2165-8056.1000e107.
- Bill B., Orlikowski L.B. 2012. III Konferencja Naukowa – Nowe patogeny i choroby roślin. Skierniewice, s. 62.
- Ghormade V., Deshpande M.V., Paknikar K.M. 2011. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnol. Adv.* 29: 792-803.
- Jo Y., Kim B.H., Jung G. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant Dis.* 93: 1037-1043.
- Jung J., Kim S., Min J., Kim Y., Lamsal K., Kim K.S., Lee Y.S. 2010. The effect of nano-silver liquid against the white rot of the green onion caused by *Sclerotium cepivorum*. *Mycobiology* 38(1): 39-45.
- Kaur P., Thakur R., Choudhary A. 2012. An in vitro study of the antifungal activity of silver/chitosan nanoformulations against important seed borne pathogens. *International Journal of Scientific & Technology Research* 1(6): 83-86.

- Kim S.W., Jung J.H., Lamsal K., Kim Y.S., Min J.S., Lee Y.S. 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology* 40(1): 53-58.
- Li H., Huang X., Li L., Liu J., Joyce D.C., He S. 2012. Efficacy of nano-silver in alleviating bacteria-related blockage in cut rose cv. Movie Star stems. *Postharvest Biol. Tec.* 74: 36-41.
- Liu J., He S., Zhang Z., Cao J., Lu P., He S., Cheng G., Joyce D.C. 2009. Nano-silver pulse treatments inhibit stem-end bacteria on cut gerbera cv. Ruikou flowers. *Postharvest Biol. Tec.* 54: 59-62.
- Lu P., Cao J., He S., Liu J., Li H., Cheng G., Ding Y., Joyce D.C. 2010. Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose cv. Movie Star flowers. *Postharvest Biol. Tec.* 57: 196-202.
- Prabhu S., Poulouse E.K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int. Nano Lett.* 2: 32-41.
- Rai R.V., Bai J.A. 2011. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. In: Mendez-Vilas A. (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 197-209.
- Safavi K., Esfahanizadeh M., Mortazaeinezhad F., Dastjerd H. 2011. The study of nano silver (NS) antimicrobial activity and evaluation of using NS in tissue culture media. *International Conference on Life Science and Technology. IPCBEE* 3: 159-161.
- Sharon M., Choudhary A.K., Kumar R. 2010. Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytology* 2(4): 83-92.
- Sokół J.L. 2012. Nanotechnologia w życiu człowieka. *Economy and Management* 1: 18-29.
- Wang X., Liu X., Han H. 2013. Evaluation of antibacterial effects of carbon nanomaterials against copper-resistant *Ralstonia solanacearum*. *Colloid. Surface. B.* 103: 136-142.
- Wojdyła A.T. 2012. Możliwość wykorzystania środka Huwa-San TR-50 w ochronie roślin ozdobnych przed patogenami nalistnymi. *Prog. Plant Protect./Post. Ochr. Rośl.* 52(1): 106-111.
- Wolny-Koładka K., Malina D., Sobczak-Kupiec A., Wzorek Z. 2013. Analiza toksyczności nanocząstek srebra w stosunku do grzybów z gatunku *Fusarium culmorum* izolowanych z pszenicy. 47 Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Mikroorganizmy – roślina – środowisko w warunkach zmieniającego się klimatu, s. 269.

Praca została wykonana w ramach Programu Wieloletniego „Rozwój zrównoważonych metod produkcji ogrodniczej w celu zapewnienia wysokiej jakości biologicznej i odżywczej produktów ogrodniczych oraz zachowania bioróżnorodności środowiska i ochrony jego zasobów”, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.