

Wpływ nanocząstek miedzi i srebra na wzrost wybranych gatunków grzybów patogenicznych i mykoryzowych w badaniach *in vitro*

Adam Szaniawski, Jacek Olchowik, Marta Aleksandrowicz-Trzczińska

Abstrakt. Niektóre badania wskazują, że nanocząstki metali mogą znaleźć zastosowanie w hodowli roślin jako fungicydy i stymulatory wzrostu. Celem pracy było określenie wpływu nanocząstek miedzi (nCu) i srebra (nAg) na wzrost grzybów i grzybobodobnych *in vitro*. Do badań wybrano 4 gatunki grzybów patogenicznych (5 szczepów): *Rhizoctonia solani* 5648.01 i 1195.00, *Fusarium oxysporum* 103, *Fusarium redolens* 229, *Giberella* sp. 168), jeden grzybobodobny *Phytophthora cactorum* 351.13 oraz jeden (2 szczepy) mykoryzowy *Hebeloma crustuliniforme* W40 i 111/08. Zastosowano cztery stężenia nanocząstek: 5 ppm, 15 ppm, 25 ppm i 35 ppm. Badania pokazały zróżnicowany wpływ nanocząstek miedzi i srebra na wzrost radialny grzybni testowanych gatunków. *P. cactorum* charakteryzował się całkowitym brakiem wrażliwości. Wzrost pozostałych gatunków był w różnym stopniu hamowany. Nanocząstki srebra powodowały silniejszą inhibicję wzrostu grzybni niż nanocząstki miedzi. Wykazano duże różnice szczepowe we wrażliwości na nanocząstki miedzi i srebra szczepów *H. crustuliniforme* i *R. solani*.

Słowa kluczowe: nanocząstki, grzyby patogeniczne, Oomycetes, grzyby mykoryzowe

Abstract. Effect of copper and silver nanoparticles on the growth of selected species of pathogenic and mycorrhizal fungi *in vitro*. Some studies indicate that nanoparticles of metals can be used in plant breeding as fungicides and growth promoters. The aim of the study was to determine the impact of copper (CuNPs) and silver (AgNPs) nanoparticles on growth of pathogenic fungi and Oomycetes *in vitro*. Four pathogenic species of fungi were selected for the study (5 strains): *Rhizoctonia solani* 5648.01 and 1195.00, *Fusarium oxysporum*, 103, *Fusarium redolens* 229, sp *Giberella* sp. 168), one Oomycetes *Phytophthora cactorum* 351.13 and one (2 strains) mycorrhizal *Hebeloma crustuliniforme* W40 and 111/08. Four concentrations of nanoparticles: 5 ppm 15 ppm 25 ppm to 35 ppm were applied. The studies have shown differentiated effects of copper and silver nanoparticles on radial growth of tested species mycelia. *P. cactorum* was characterized by the complete lack of sensitivity. Growth of other species was restricted to various degrees. Nanoparticles of silver caused a stronger inhibition of fungal growth than copper nanoparticles. Big differences were proved in strains sensitivity to copper and silver nanoparticles of *H. crustuliniforme* and *R. solani* strains.

Keywords: nanoparticles, pathogenic fungi, Oomycetes, mycorrhizal fungi

Wstęp

Nanocząstki to agregaty atomów lub molekul, których przynajmniej jeden wymiar zawiera się w przedziale 1-100 nm (Ball 2002, Roco 2003). Małe rozmiary i duża zewnętrzna powierzchnia nanocząstek powoduje, że posiadają one znacząco różną właściwość od materiałów litych tego samego rodzaju (Nel i in. 2006). W zależności od ich pochodzenia wyróżniamy nanocząstki naturalne, przypadkowe i inżynieryjne. Obecność w środowisku nanocząstek naturalnych wynika z procesów zachodzących na Ziemi historycznie i obecnie (pył księżycowy, pył wulkaniczny). Nanocząstki przypadkowe nazywane są również odpadowymi lub antropogenicznymi, powstają jako uboczny, nie pożądaný efekt procesów przemysłowych. Synteza nanocząstek inżynieryjnych polega na procesach chemicznych lub fizycznych oraz na wykorzystaniu materiału biologicznego (bakterii, glonów, grzybów, roślin naczyniowych) (Mohanpuria i in. 2008, Monica i Cremoni 2009).

Unikalne właściwości elektroniczne, optyczne, mechaniczne, magnetyczne i chemiczne powodują szerokie możliwości zastosowania nanocząstek w medycynie, farmacji, kosmologii, elektronice, przemyśle budowlanym, jubilerskim, fotograficznym i rolnictwie (Pulit i in. 2008, Masarovičová i Kráľová 2013). Wiele badań wskazuje na właściwości antybakteryjne (Klaine i in. 2008) i antygrzybowe nanocząstek (Jo i in. 2009, Kim i in. 2009, Aguilar-Méndez i in. 2011).

Nowoczesna gospodarka leśna w Unii Europejskiej i w Polsce poszukuje rozwiązań technologicznych bliskich naturze. Obejmuje to również produkcję szkółkarską gdzie prowadzone są próby stosowania nie chemicznych środków ochrony roślin. Stąd celem pracy była wstępna, skryningowa ocena wpływu nanocząstek srebra (nAg) i miedzi (nCu) na szczepy grzybów i organizmów grzybopodobnych sprawców chorób oraz szczepy grzybów ektomykoryzowych.

Metodyka badań

Do badań wybrano 5 gatunków (6 szczepów) grzybów i grzybopodobnych patogenicznych, należących do różnych grup systematycznych: *Rhizoctonia solani* J.G.Kühn szczep 5648.01 i 1195.00, *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Single szczep 103, *Fusarium redolens* Wollenw. szczep 229, *Giberella* sp. szczep 168, *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt. szczep 351.13 oraz dwa szczepy ektomykoryzowego gatunku *Hebeloma crustuliniforme*.

Tab. 1. Pozycja systematyczna badanych gatunków grzybów i Oomycetes
Table 1. Systematic position of the studied species of fungi and Oomycetes

Gatunek	Pozycja systematyczna
<i>Rhizoctonia solani</i>	Fungi/Basidiomycota/Ceratobasidiaceae
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fungi/Ascomycota/Nectriaceae
<i>Fusarium redolens</i>	Fungi/Ascomycota/Nectriaceae
<i>Giberella</i> sp.	Fungi/Ascomycota/Nectriaceae
<i>Phytophthora cactorum</i>	Chromista/Oomycota/Peronosporales
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	Fungi/Basidiomycota/Ceratobasidiaceae

niforme (Bull.) Quél. W40 i 111/08. Pozycję systematyczną poszczególnych gatunków podano w tabeli 1. *Fusarium redolens* i *Giberella* sp. otrzymano z Freie Universitaet Berlin, Instytut fuer Biologie, pozostałe szczepy pochodzą z kolekcji Zakładu Fitopatologii Leśnej, Mykologii i Fizjologii Drzew Instytutu Ochrony Ekosystemów Leśnych Wydziału Leśnego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

W badaniach wykorzystano komercyjne nanocząstki srebra i miedzi firmy Nano Koloid Sp. z o.o. Jak podaje producent nanocząstki wytwarzane są w procesie fizycznym, składają się z około 100 atomów i zawieszane są w zdemineralizowanej wodzie. Zastosowano cztery stężenia 5, 15, 25, 35 ppm.

Grzyby hodowano w szalkach Petriego o średnicy 9 cm, na trzech rodzajach pożywek: PDA (*R. solani*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, *Giberella*), V8 (*P. cactorum*) i Melin-Norkans'a (*H. crustuliniforme*). Każdą kombinację doświadczenia (szczep grzyba i stężenie nanocząstek) powtarzano 10 razy tj. w 10 szalkach. Inokulum stanowiły wycinki 2 tygodniowej kultury grzyba o średnicy 3 mm. Grzyby inkubowano w ciemności, w termostatach, w temperaturze 22 °C. Pomiaru średnicy grzybni dokonywano po 7 dniach, wyjątek stanowiły szczepy *H. crustuliniforme*, dla których ten okres wydłużył się do 21 dni, co spowodowane było dłuższym tempem wzrostu tych kolonii. Odczyt dwóch pomiarów „na krzyż” wykonywano na spodniej ścianie szalki z dokładnością do 1 mm.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wskaźnik inhibicji/stymulacji według wzoru:

$$i = k-a/k \times 100\%$$

i – wskaźnik inhibicji/stymulacji wzrostu grzybni (%),

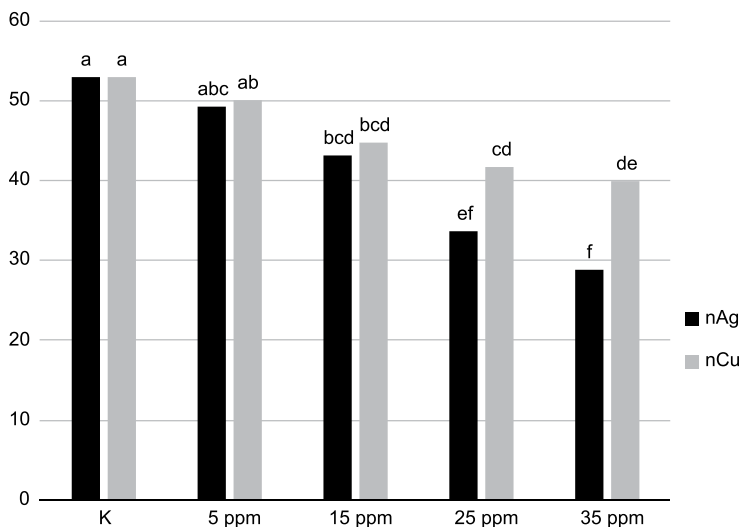
k – średnica kolonii grzybni wyrosłej na podłożu z dodatkiem określonego stężenia nanocząstek.

Przed przystąpieniem do analiz statystycznych sprawdzono zgodność rozkładu analizowanej cechy – wielkości średnicy kolonii z rozkładem normalnym stosując test W Shapiro Wilka oraz porównano jednorodność wariancji testem Levene'a. Ponieważ rozkład testowanego parametru nie różnił się istotnie od rozkładu normalnego oraz wariancje porównywanych ze sobą wariantów badawczych były jednorodne, do testowania wartości średnich cechy wykorzystano dwuczynnikową (rodzaj nanocząstek i stężenie) analizę wariancji (ANOVA) oraz zastosowano test Duncana.

Wyniki

Dwuczynnikowa analiza wariancji wykazała istotny wpływ na wzrost kultur testowanych gatunków grzybów zarówno rodzaju nanocząstek ($p=0,0075$) jak i ich stężenia ($p<0,0001$) oraz brak istotnego wpływu współdziałania tych czynników ($p=0,1084$). Oba rodzaje nanocząstek ograniczały radialny wzrost grzybni w stężeniu 25 i 35 ppm. Silniejszą inhibicję obserwowano w wyniku zastosowania nanocząstek srebra, istotną w przypadku stężeń 25 i 35 ppm (ryc. 1).

W tabelach 2 i 3 przedstawiono wskaźniki inhibicji/stymulacji wzrostu grzybni badanych szczepów grzybów w zależności od rodzaju nanocząstki i jej stężenia. Nieznaczna stymula-



Ryc. 1. Wpływ stężenia nanocząstek srebra (nAg) i miedzi (nCu) na wielkość średnicy kolonii badanych grzybów. Ta sama litera nad słupkami wskazuje brak różnic istotnych statystycznie (test Duncana; $p=0,05$)

Fig. 1. The impact of the concentration of silver nanoparticles (AgNPs) and copper nanoparticles (CuNPs) on the diameter of the fungal colony. The same letter of the bars indicates the lack of statistically significant differences (Duncan test; $p = 0.05$)

Tab. 2. Wskaźnik inhibicji/stymulacji wzrostu grzybni (%) w zależności od stężenia nanocząstek srebra (ppm)

Table 2. Inhibition/stimulation ratio of fungal growth (%) depending on the concentration of silver nanoparticles (ppm)

Szczep/stężenie	5	15	25	35	średnia
<i>Rhizoctonia solani</i> 5648.01	-3,13	-1,91	26,96	69,44	22,84
<i>Rhizoctonia solani</i> 1195.00	12,51	34,94	69,82	81,32	49,65
<i>Fusarium oxysporum</i> 103	4,27	-13,65	25,55	32,59	12,19
<i>Fusarium redolens</i> 229	4,98	20,23	32,87	41,24	24,83
<i>Giberella</i> sp 168	4,7	55,91	63,32	61,71	46,41
<i>Phytophthora cactorum</i> 351.13	-6,65	-3,5	-0,98	-0,85	-3,00
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> W40	25,94	34,68	31,66	21,14	28,36
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> 111/08	55,25	54,99	55,98	62,49	57,18
średnia	12,23	22,71	38,15	46,14	29,81

cię obserwowano w wyniku zastosowania wszystkich stężeń obu nanocząstek w stosunku do *P. cactorum* i 2 lub 3 najniższych stężeń obu nanocząstek w stosunku do *R. solani* 5648.01 i *F. oxysporum*. Wzrost pozostałych gatunków grzybów był w różnym stopniu hamowany. Najsilniejszą inhibicję obserwowano w przypadku *H. crustuliniforme* 111/08 i *R. solani* 1195.00.

Tab. 3. Wskaźnik inhibicji/stymulacji wzrostu grzybni (%) w zależności od stężenia nanocząstek miedzi (ppm)

Table 3. Inhibition/stimulation ratio of fungal growth (%) depending on the concentration of cooper nanoparticles (ppm)

Szczep/stężenie	5	15	25	35	średnia
<i>Rhizoctonia solani</i> 5648.01	-19,02	-6,53	-0,78	2,69	-5,91
<i>Rhizoctonia solani</i> 1195.00	26,4	78,76	81,23	37,88	56,07
<i>Fusarium oxysporum</i> 103	-10,16	-9,69	3,3	19,04	0,62
<i>Fusarium redolens</i> 229	6,21	7,32	9,51	21	11,01
<i>Giberella sp</i> 168	4,93	14,52	28,36	41,22	22,26
<i>Phytophthora cactorum</i> 351.13	-0,49	-1,59	-0,34	-0,21	-0,66
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> W40	21,66	35,06	31,98	45,73	33,61
<i>Hebeloma crustuliniforme</i> 111/08	60,23	56,47	58,92	73,17	62,20
średnia	11,22	21,79	26,52	30,07	22,40

Dyskusja

Nasze badania pokazały zróżnicowany wpływ nanocząstek miedzi i srebra na wzrost grzybów patogenicznych i mykoryzowych oraz łęgniowców *in vitro*. Wybrane do badań gatunki różnią się pozycją systematyczną co jednocześnie warunkuje różnice w budowie i składzie chemicznym ściany komórkowej. Ściana komórkowa jest barierą chroniącą przed strepsami biotycznymi i abiotycznymi oraz mającą wpływ na przemieszczanie się cząstek pomiędzy środowiskiem zewnętrznym i komórką. Całkowitym brakiem wrażliwości na wszystkie stężenia obu nanocząstek wykazał się *P. cactorum*, sprawca zgorzeli siewek w szkółkach leśnych. Jest to jedyny z badanych gatunków, należący do typu *Oomycota* i charakteryzujący się obecnością celulozy w ścianie komórkowej. Pozostałe gatunki, należące do typów *Ascomycota* lub *Basidiomycota*, posiadające w ścianie komórkowej chitynę, wykazały się wrażliwością na działanie nanocząstek, chociaż w bardzo zróżnicowanym zakresie.

Obecnie niewiele jeszcze wiadomo o mechanizmach antymikrobiologicznego działania nanocząstek, chociaż w przypadku bakterii kilka mechanizmów zostało już dość dobrze poznanych. Nanocząsteczki mogą powodować powstawanie w komórkach reaktywnych form tlenu (ROS), powodujących uszkodzenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych (Nel i in. 2006, Hwang i in. 2008). Innym mechanizmem jest łączenie się nanocząstki metalu z grupą tiolową (-SH) białek co prowadzi do ich dezaktywacji (Pulit i in. 2011). Nanocząstki mogą też przyłączać się do powierzchni komórki i naruszać integralność i funkcjonowanie błony komórkowej (Klaine i in. 2008). Znacznie słabiej są poznane antygrzybowe mechanizmy nanocząsteczek. Jo i in. (2009) wiąże antygrzybową aktywność nanocząstek srebra z przyłączaniem się ich i przenikaniem błon komórkowych grzybów. W badaniach Kima i współautorów (2009) inhibicja wzrostu grzybni patogenicznego workowca *Raffaelea* sp., powodującego zamieranie dębów w Korei, wiązała się z uszkodzeniem ścian komórkowych przez nanocząstki srebra. Nasze badania wskazują, że wrażliwość grzybów na nanocząstki może wiązać się z budową i składem ściany komórkowej.

Grzyby mogą charakteryzować się dużą zmiennością szczepową w reakcji na różne czynniki m. in. na działanie fungicydów (Rudawska 2000). Podobne różnice we wrażliwości na nanocząstki stwierdzono w naszych badaniach. Szczep *H. crustuliniforme* 111/08 okazał się dwukrotnie bardziej wrażliwy na oba rodzaje nanocząstek w porównaniu ze szczepem W40. Na szczepie W40 oparta jest szczepionka mykoryzowa stosowana w polskich szkołkach kontenerowych (Szabla 2007). Nasze badania potwierdziły stosunkowo wysoką (w porównaniu z innymi szczepami tego gatunku) odporność szczepu wybranego do szczepionki. Podobnie duże różnice we wrażliwości na nanocząstki stwierdzono w przypadku szczepów *R. solani*, gatunku powodującego pasożytniczą zgorzel siewek. Szczep 5648.01 okazał się niewrażliwy na nanocząstki miedzi i niskie stężenia (5, 15 ppm) nanocząstek srebra w przeciwieństwie do szczepu 1195.00, który wykazał się jedną z najwyższych wrażliwości na oba rodzaje nanocząstek.

Nasze badania pokazały, że nanocząstki srebra charakteryzują się wyższymi właściwościami antygrzybowymi w porównaniu z nanocząstkami miedzi, szczególnie w wyższych stężeniach (25, 35 ppm). Oba metale znane są od wieków ze swoich antymikrobiologicznych właściwości, również antygrzybowych (Pulit i in. 2011). Na obecnym etapie badań trudno wskazać czynniki powodujące wystąpienie wykazanych różnic.

Wnioski

1. Badania pokazały zróżnicowany wpływ nanocząstek miedzi i srebra na wzrost radialny grzybni testowanych gatunków. *P. cactorum* charakteryzował się całkowitym brakiem wrażliwości. Wzrost pozostałych gatunków był w różnym stopniu hamowany. Prawdopodobną przyczyną zróżnicowania wrażliwości grzybów na nanocząstki mogą być różnice w budowie i składzie ściany komórkowej poszczególnych grup systematycznych.
2. Nanocząstki srebra silniej inhibowały wzrost grzybni *in vitro* w porównaniu z nanocząstkami miedzi.
3. Wykazano duże różnice szczepowe we wrażliwości na nanocząstki miedzi i srebra szczepów *H. crustuliniforme* i *R. solani*.

Podziękowania

Autorzy dziękują Pani prof. Hannie Stępniewskiej, Panu prof. Stefanowi Kowalskiemu oraz doktorowi Carlosowi Aguilar za udostępnienie do badań kultur grzybów.

Badania zostały sfinansowane z dotacji celowej MNiSzW służącej rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Leśnym SGGW w Warszawie, w ramach grantów: 505-10-030400-L00373-99 i 505-10-030400-L00374-99.

Literatura

- Aguilar-Méndez M. A., Martín-Martínez E. S., Ortega-Arroyo L., Cobián-Portillo G., Sánchez-Espíndola E. 2011. Synthesis and characterization of silver nanoparticles: effect on phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. J. Nanopart. Res. 13: 2525–2532.
- Ball P. 2002. Natural strategies for the molecular engineer. Nanotechnology 13: 15-28.
- Hwang E.T., Lee J. H., Chae Y. J., Kim Y. S., Kim B. C., Sang B. I., Gu M. B. 2008. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. Small 4: 746-750.
- Jo Y.-K., Kim B. H., Jung G. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. Plant Dis. 93: 1037-1043.
- Kim S. W., Kim K. S., Lamsal K., Kim Y.-J., Kim S. B., Jung M., Sim S.-J., Kim H. S., Chang S.-J., Kim J. K., Lee Y. S. 2009. An *in vitro* study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaella* sp. J. Microbiol. Biotechnol. 19(8): 760-764.
- Klaine S. J., Alvarez J.J., Batley G. E., Fernandes T. F., Handy R. D., Lyon D. Y., Mahendra S., McLaughlin J., Lead J.R. 2008. Nanomaterials in the environmental: Behavior, fate, bioavailability, and effects. Environ. Toxicol. Chem. 27: 1825-1851.
- Masarovičová E., Kráľová K. 2013. Metal nanoparticles and plants. Ecol. Chem. Eng. S 20(1): 9-22.
- Mohanpuria P., Rana N.K, Yadav S.K. 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. J. Nanopart. Res. 10: 507-517.
- Monica C. R., Cremona R. 2009. Nanoparticles and higher plants. Caryologia, 62(2): 161-165.
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials as the nanolevel. Science, 311: 622-627.
- Pulit J., Banach M., Kowalski Z. 2011. Właściwości nanocząstek miedzi, platyny, srebra, złota i palladu. Chemia – Czasopismo Techniczne Politechniki Krakowskiej 108(10): 1-13.
- Roco M.C. 2003. Broader societal issues of nanotechnology. J. Nanopart. Res. 5: 181–189.
- Rudawska M. 2000. Ektomikoryza, jej znaczenie i zastosowanie w leśnictwie. Kórnik, Instytut Dendrologii PAN.
- Szabla K. 2007. Sterowana mikoryzacja sadzonek różnych gatunków drzew leśnych hodowanych techniką kontenerową. W: Kowalski S. (red.). Ektomikoryzy. Nowe biotechnologie w polskim szkolnictwie leśnym. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych: 73-92.

Adam Szaniawski, Jacek Olchowik, Marta Aleksandrowicz-Trzcńska

Katedra Ochrony Lasu i Ekologii, Wydział Leśny,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
adamszaniawski89@gmail.com, olchowik.jacek@gmail.com,
marta_aleksandrowicz_trzcinska@sggw.pl