

# **AUTOREFERAT**

dr Robert Biczak  
Zakład Biochemii i Ekotoksykologii  
Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii  
Wydział Matematyczno-Przyrodniczy  
Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie  
Al. Armii Krajowej 13/15  
42-200 Częstochowa

## Autoreferat

### 1. Imię i nazwisko: Robert Biczak

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne:

- 2.1. 09.06.1992 – ukończenie jednolitych studiów magisterskich i uzyskanie tytułu **magistra chemii** w Wyższej Szkole Pedagogicznej w Częstochowie (obecnie Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie), Wydział Matematyczno-Przyrodniczy. Tytuł pracy magisterskiej: *Skład aminokwasowy w selerze pod wpływem pochodnych fenylohydrazynotetrazolo[2,1-c]chinoksaliny*, promotor: dr hab. Eugeniusz Gurgul
- 2.2. 11.03.1998 – uzyskanie stopnia naukowego **doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii** na Wydziale Rolniczym (obecnie Wydział Przyrodniczy) Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej (obecnie Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny) w Siedlcach. Tytuł rozprawy doktorskiej: *Wpływ nawożenia mineralnego NPK na plon, aktywność enzymatyczną i skład chemiczny wybranych warzyw*, promotor: dr hab. Eugeniusz Gurgul.

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:

- 3.1. od 1.10.1991 do 30.06.1992 – **referent techniczny**, Zakład Biochemii (obecnie Zakład Biochemii i Ekotoksykologii), Instytut Chemii (obecnie Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii), Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Częstochowie (obecnie Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie)
- 3.2. od 1.07.1992 do 30.09.1992 – **starszy referent techniczny**, Zakład Biochemii (obecnie Zakład Biochemii i Ekotoksykologii), Instytut Chemii (obecnie Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii), Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Częstochowie (obecnie Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie)
- 3.3. od 1.10.1992 do 30.04.1998 – **asystent**, Zakład Biochemii (obecnie Zakład Biochemii i Ekotoksykologii), Instytut Chemii (obecnie Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii), Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Częstochowie (obecnie Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie)
- 3.4. od 1.05.1998 do teraz – **adiunkt**, Zakład Biochemii (obecnie Zakład Biochemii i Ekotoksykologii), Instytut Chemii (obecnie Instytut Chemii, Ochrony Środowiska i Biotechnologii), Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Częstochowie (obecnie Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie)

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 15 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)**

**4.1. Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest rozprawa pod tytułem:**

***Inhibicja wzrostu i stres oksydacyjny w roślinach uprawnych rosnących na glebie zawierającej czwartorzędowe sole amoniowe, w tym ciecze jonowe***

tworząca cykl następujących prac naukowych powiązanych tematycznie:

Lp.	Publikacja	IF <sup>a</sup>	Punktacja MNiSzW <sup>b</sup>
1.	<b>Biczak Robert</b> , 2016, Quaternary ammonium salts with tetrafluoroborate anion: Phytotoxicity and oxidative stress in terrestrial plants. <i>Journal of Hazardous Materials</i> , 304: 173-185 <i>(udział własny – 100%)</i>	4,836	45
2.	Pawłowska Barbara, <b>Biczak Robert</b> , 2016, Evaluation of the effect of tetraethylammonium bromide and chloride on the growth and development of terrestrial plants. <i>Chemosphere</i> , 149, 24-33 <i>(udział własny – 80%)</i>	3,698	35
3.	<b>Biczak Robert</b> , Pawłowska Barbara, Telesiński Arkadiusz, Ciesielski Wojciech, 2016, The effect of the number of alkyl substituents on imidazolium ionic liquids phytotoxicity and oxidative stress in spring barley and common radish seedlings, <i>Chemosphere</i> , 165, 519-528 <i>(udział własny – 60%)</i>	3,698	35
4.	<b>Biczak Robert</b> , Telesiński Arkadiusz, Pawłowska Barbara, 2016, Oxidative stress in spring barley and common radish exposed to quaternary ammonium salts with hexafluorophosphate anion, <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> , 107, 248-256 <i>(udział własny – 70%)</i>	2,928	35
5.	<b>Biczak Robert</b> , Pawłowska Barbara, Feder-Kubis Joanna, 2015, The phytotoxicity of ionic liquids from natural pool (–)-menthol with tetrafluoroborate anion, <i>Environmental Science and Pollution Research</i> , 22, 11740-11754. <i>(udział własny – 60%)</i>	2,828	30
6.	<b>Biczak Robert</b> , Pawłowska Barbara, 2016, Effect of the quaternary ammonium salts, tetraethylammonium halide on		10

	<i>Rumex acetosa</i> L., <i>Chenopodium album</i> L. and <i>Galinsoga parviflora</i> cav.: inhibition of growth and changes in assimilation pigments content in plants, <i>Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica</i> , 39(3), 35-52 (udział własny – 70%)		
7.	Pawłowska B., <b>Biczak R.</b> , 2016, Toksyczność czwartorzędowych soli amoniowych z anionem jodkowym: inhibicja wzrostu i zmiany zawartości barwników asymilacyjnych w roślinach, <i>Inżynieria i Ochrona Środowiska</i> , 19(1), 51-65 (udział własny – 60%)	9	
8.	<b>Biczak Robert</b> , Pawłowska Barbara, Feder-Kubis Joanna, Inhibicja wzrostu i stres oksydacyjny w roślinach pod wpływem chiralnej imidazoliowej cieczy jonowej z anionem tetrafluoroboranowym, <i>Chemistry. Environmental. Biotechnology</i> . 2016, 19, 35-45 (udział własny – 70%)	5	
<b>Razem</b>		<b>17,988</b>	<b>204</b>

a – Impact Factor (IF) wg bazy Journal Citation Reports (JCR) zgodny z rokiem ukazania się pracy

b – według roku opublikowania i według listy MNiSzW z dn. 9.12.2016; dla publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

*Oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem ich indywidualnego wkładu w powstanie pracy stanowią załącznik 6.*

#### **4.2. Omówienie celu naukowego w/w publikacji, jak również osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

W ramach prezentowanego osiągnięcia naukowego, którym jest w myśl ustawy cykl publikacji powiązanych tematycznie, przedstawiono i omówiono wyniki badań naukowych dotyczących oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych (CSA), w tym cieczy jonowych (ILs) na wzrost i rozwój siewek jęczmienia jarego (przedstawiciel roślin jednoliściennych) i rzodkiewki zwyczajnej (przedstawiciel roślin dwuliściennych). W przeprowadzonych badaniach określono potencjalną toksyczność CSA dla tych gatunków roślin na podstawie zmian podstawowych biomarkerów fitotoksyczności. Przyczyn stwierdzonej toksyczności tych związków chemicznych upatrywano w stresie oksydacyjnym, dlatego w opisywanych badaniach, określono również poziom najważniejszych wskaźników stresu oraz zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych w badanych roślinach. Dobór do badań czwartorzędowych soli amoniowych różniących się budową chemiczną pozwolił na uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy modyfikując budowę tych soli można uzyskać z góry zakładaną fitotoksyczność, co można następnie wykorzystać np. w praktyce rolniczej. Uzyskane wyniki prac naukowych dotyczących fitotoksyczności i stresu oksydacyjnego CSA

były jednym z powodów, dla którego czwartorzędowe sole amoniowe wykorzystano także do badań, mających na celu określenie ich właściwości herbicydowych wobec popularnych w Polsce gatunków chwastów.

## WSTĘP

Pod względem budowy chemicznej czwartorzędowe sole amoniowe (CSA) należą do związków jonowych, które zawierają w cząsteczce cztery grupy organiczne, powiązane z atomami azotu. Czwartorzędowe sole amoniowe to substancje wykazujące wiele pożądanych właściwości, które pozwalają na wykorzystanie tych związków w różnych obszarach działalności ludzkiej. Przejawiając silne działanie biologiczne CSA są często stosowane w rolnictwie jako pestycydy, a także do produkcji niektórych leków, szamponów itp. Stosowane są również jako sorbenty w procesach flotacji w górnictwie, w przemyśle naftowym czy hydrometalurgii. W przemyśle włókienniczym używa się CSA przy impregnowaniu tkanin, matowaniu włókien oraz jako stabilizatory barwników. Ponadto, czwartorzędowe sole amoniowe ze względu na właściwości bakteriobójcze, wykorzystywane są jako środki dezynfekcyjne czy opatrunki antybakteryjne stosowane bezpośrednio na tkanki [1-4].

Wyjątkowo interesującą grupą substancji chemicznych zaliczanych do czwartorzędowych soli amoniowych są ciecze jonowe (ILs). Ciecze jonowe to związki chemiczne zbudowane wyłącznie z jonów, organicznego kationu i najczęściej nieorganicznego anionu, przy czym jeden lub oba jony mają dużą objętość. Możliwości połączeń anionów i kationów są praktycznie nieograniczone i sięgają wartości  $10^{18}$ . Intensywne badania naukowe nad cieczami jonowymi trwają zaledwie od kilkunastu lat, a nazwa ciecz jonowa (z ang. *Ionic Liquids*) zaistniała w literaturze fachowej w 1974 roku. W sprzedaży pierwsze ciecze jonowe pojawiły się w 1999 roku i od tego momentu nastąpił lawinowy wzrost aktywności badawczej dotyczącej syntezy i możliwości praktycznego zastosowania tych związków. Najważniejszą cechą cieczy jonowych jest możliwość uzyskania substancji o optymalnych dla danego procesu właściwościach poprzez zmianę struktury kationu i dobór odpowiedniego anionu, dlatego pojawiło się w przypadku tych soli określenie „rozpuszczalniki projektowalne” (z ang. *designer solvents*). Ponadto, wyjątkowe właściwości cieczy jonowych takie, jak niska prężność par, niepalność, stabilność termiczna i elektrochemiczna, możliwość powtórnego wykorzystania spowodowały zastosowanie tych soli w procesach (bio)katalizy, syntezie organicznej, elektrochemii, ekstrakcji i separacji, przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz przy produkcji pestycydów [5-8].

W kontekście wykorzystania czwartorzędowych soli amoniowych w rolnictwie, interesującym jest otrzymanie tzw. herbicydowych cieczy jonowych (z ang. *Herbicidal Ionic Liquids* – HILs). Herbicydowe ciecze jonowe (zwane też fitofarmaceutykami) wykazują lepsze właściwości biologiczne niż klasyczne, stosowane dotychczas środki chwastobójcze. HILs mają bardzo dobrą stabilność termiczną i chemiczną, słabiej rozpuszczają się w wodzie, co zmniejsza możliwość skażenia wód powierzchniowych i podziemnych. Na chwilę obecną zaprojektowano już i przeprowadzono badania właściwości herbicydowych czwartorzędowych związków amoniowych, pirymidyniowych i imidazoliowych z anionami 2,4-D, MCPA, MCPP i dikamba. O właściwościach herbicydowych decyduje anion, zaś odpowiedni dobór kationu kontroluje toksyczność oraz odpowiada za aktywność powierzchniową związku i inne

właściwości fizykochemiczne, wymagane dla substancji biologicznie aktywnych. Kolejną korzyścią wynikającą ze stosowania HILs, w porównaniu do konwencjonalnych herbicydów, jest możliwość zmniejszenia dawki substancji aktywnej np. przez zwiększenia długości alkilowego podstawnika, co znacznie podnosi bezpieczeństwo stosowanych preparatów i zmniejsza presję na środowisko oraz ekonomicznie uzasadnia stosowanie herbicydów w praktyce rolniczej [9-13]. Kolejną grupą fitofarmaceutyków są dwufunkcyjne herbicydowe ciecze jonowe, otrzymane poprzez połączenie np. regulatora wzrostu roślin CCC z MCPA. Otrzymana sól (CC)(MCPA) wykazuje wysoki potencjał stosowania, zachowując aktywność chwastobójczą (anion) i efekt hamowania wzrostu roślin (kation) [14].

Wszystkie opisane właściwości czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych oraz stosunkowo niski koszt produkcji może doprowadzić do sytuacji, kiedy do przemysłu, obrotu i użytku komercyjnego zostaną wprowadzone duże ilości tych chemikaliów. Wykorzystanie CSA na dużą skalę w przemyśle i rolnictwie może stanowić potencjalne zagrożenie dla środowiska glebowego. Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzie i dużą stabilność, CSA i ILs mogą łatwo dostać się do gleb ze ścieków, osadów ściekowych, ale także podczas awarii systemów produkcyjnych czy katastrof zaistniałych w czasie transportu. Sole te mogą być również wymywane np. z hałd poprodukcyjnych i w postaci odcieków, czy zrzutów poprodukcyjnych trafić do gleb. Gleba jest nie tylko naturalnym magazynem substancji odżywczych dla roślin, ale również „naturalnym śmietnikiem”, w którym akumulowane są wszystkie zanieczyszczenia. Czwartorzędowe sole amoniowe, które przedostaną się do gleby mogą zostać zatrzymane przez koloidy glebowe w wyniku sorpcji. Siła sorpcji glebowej zależy zarówno od struktury CSA i ILs, jak i właściwości fizykochemicznych różnych sorbentów. Nie bez znaczenia jest tutaj również zdolność wymiany kationów, zawartość w glebie materii organicznej oraz minerałów ilastych. Najważniejszym koloidem glebowym jest materia organiczna, w skład której wchodzi substancje o wysokiej masie cząsteczkowej, bardzo złożonej budowie i o specyficznych właściwościach. Próchnica glebowa to koloid o rdzeniu ujemnie naładowanym, mogącym z powodzeniem wiązać kationy cieczy jonowych. Aniony cieczy jonowych w takich warunkach nie są sorbowane [15-18]. Niektórzy autorzy [15,19] udowadniają ponadto, że zdolność sorpcji CSA i ILs na koloidach glebowych zależy również od długości podstawnika alkilowego. Autorzy ci proponują model dwuwarstwowej sorpcji, dla której wyznaczyli dwa współczynniki podziału: jeden dla sorpcji pierwszej warstwy cieczy jonowej na powierzchni koloidu oraz drugi dla sorpcji na wcześniej zaadsorbowanej warstwie cieczy jonowej (oddziaływania hydrofobowe). Wykazano, że nasycenie drugiej warstwy występuje w przypadku związków o dużej ilości atomów węgla w podstawniku.

Obecność czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych w glebie, czy to w postaci zaadsorbowanej na koloidach glebowych, czy w postaci rozpuszczonej w roztworze glebowym powoduje, że związki te mogą być pobierane przez rośliny lądowe. W ten sposób czwartorzędowe sole amoniowe, w tym ciecze jonowe, będą wpływać na wzrost i rozwój roślin uprawnych, a także wielkość i jakość ich plonu. Dlatego w dostępnej literaturze coraz częściej pojawiają się prace traktujące o wpływie CSA i ILs na lądowe rośliny wyższe [16,20-23]. Według niektórych autorów [16,24,25] fitotoksyczność czwartorzędowych soli amoniowych i cieczy jonowych zależy w dużym stopniu od rodzaju kationu i długości podstawnika, podczas, gdy rodzaj anionu nie ma tutaj większego wpływu [24-27].

W wymienionych pracach stopień oddziaływania badanych soli na wzrost i rozwój lądowych roślin wyższych określono na podstawie inhibicji plonu, zahamowania wzrostu korzeni, czy części nadziemnych roślin, natomiast sam mechanizm toksyczności tych substancji chemicznych nie został jeszcze dokładnie wyjaśniony.

W ostatnich latach pojawił się pogląd, że czwartorzędowe sole amoniowe mogą wywoływać u organizmów roślinnych stres oksydacyjny, co prowadzi wówczas do nadprodukcji reaktywnych form tlenu (RFT) [25,27-31]. Trzeba jednocześnie nadmienić, że na obecny stan wiedzy, większość prac opisujących zmiany fizjologiczno-biochemiczne w roślinach, zaistniałe wskutek stresu oksydacyjnego związanego z obecnością cieczy jonowych, dotyczy upraw na hydrofonicznych pożywkach z dodatkiem ILs. Nie odzwierciedla to warunków, jakie panują podczas upraw roślin prowadzonych na glebach. Gleba stanowi bowiem stosunkowo skomplikowane środowisko do badań naukowych, ponieważ na otrzymane wyniki może wpływać wiele innych czynników takich, jak: pH gleby, zawartość koloidów organicznych i mineralnych, wielkość sorpcji czy zasolenie. Występowanie stresu oksydacyjnego skutkować może bardzo poważnymi konsekwencjami dla roślin, ponieważ RFT odpowiadają za peroksydację lipidów w błonach komórkowych, uszkodzenia DNA, białek, węglowodanów, barwników asymilacyjnych czy upośledzenie aktywności enzymatycznej. Prowadzi to do przedwczesnego starzenia roślin, a w skrajnych przypadkach do ich obumarcia. W związku z powyższym, podstawowym zadaniem organizmów roślinnych jest utrzymanie stężenia RFT na zrównoważonym poziomie. W tym celu rośliny wykształciły system obrony antyoksydacyjnej. W skład pierwszej linii tej obrony wchodzi niskocząsteczkowe substancje chemiczne, takie jak: zredukowany glutation, tokoferol, kwas askorbinowy, karotenoidy i flawonoidy. Drugą linię obrony przed RFT stanowi specjalistyczny system enzymatyczny składający się z reduktazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i katalazy.

## **CEL I ZAKRES PRAC BADAWCZYCH**

W przedstawionych pracach dokumentujących osiągnięcie naukowe podjąłem badania, których celem było:

- I. Ocena oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, na wzrost wczesnych stadiów rozwojowych jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej
- II. Porównanie wpływu badanych związków na rośliny jedno- i dwuliścienne
- III. Poszukiwanie możliwości i zasadności wyboru takich CSA i ILs, których struktury chemiczne będą gwarantowały najniższą toksyczność dla roślin uprawnych z jednej strony, a z drugiej zapewnią wymaganą toksyczność w stosunku do chwastów
- IV. Oszacowanie na podstawie wskaźników i zmian aktywności enzymatycznej wielkości stresu oksydacyjnego w roślinach jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej
- V. Określenie możliwości zastosowania czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych w agrotechnice do ograniczenia wzrostu roślin niepożądanych.

Do realizacji w/w celów wykorzystałem szeroki zakres prac badawczych. Badania wpływu czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych przeprowadziłem zgodnie z przewodnikiem OECD/OCDE 208/2006 [31], w hali wegetacyjnej i laboratoriach będących na wyposażeniu Zakładu Biochemii i Ekotoksykologii, Akademii im. J.Długosza

w Częstochowie. Kontrolowane warunki kiełkowania nasion i wzrostu roślin (stała temp.  $22 \pm 2$  °C, stałe oświetlenie  $160\text{-}170 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  w systemie 16h dzień/8h noc, stała wilgotność podłoża na poziomie 70% ppw), miały na celu wyeliminowanie wpływu czynników zewnętrznych na uzyskane wyniki (aspekt naukowy prowadzonych badań). W eksperymencie wazonowym wykorzystałem roślinę jednoliścienną – jęczmień jary (*Hordeum vulgare*) odmiany „Suveren” i roślinę dwuliścienną – rzodkiewka zwyczajna (*Raphanus sativus* L. subvar. *radicula* Pers.) odmiany „Mila”. Nasiona roślin objętych eksperymentem pochodziły zawsze z tego samego źródła, w przypadku ziarna jęczmienia jarego była to Stacja Hodowli Roślin w Nieznanicach (woj. śląskie), a nasiona rzodkiewki zakupiłem w firmie PlantiCo Zielonki Sp. z o.o.. Wybór do badań jęczmienia jarego podyktowany był faktem, że zajmuje on wśród wszystkich gatunków zbóż czwarte miejsce pod względem produkcji oraz arealu uprawy i ma olbrzymie znaczenie z punktu widzenia gospodarki i żywienia człowieka. Rzodkiewka zwyczajna jest natomiast bardzo popularnym warzywem, uzupełniającym dietę człowieka w szereg makro- i mikroelementów oraz witamin [33-35].

Glebą zastosowaną w omawianych pracach badawczych był piasek luźny, o zawartości około 10% frakcji o średnicy  $< 0,002$  mm, zawartości węgla organicznego  $8,5\text{-}9,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  i pH w granicach od 5,8 do 6,1. Zgodnie z zaleceniami przewodnika OECD/OCDE 208/2006, w eksperymencie zastosowałem następujące stężenia wszystkich związków: 0, 1, 10, 100 i  $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  gleby. Chcąc jednak uzyskać bardziej reprezentatywne wyniki badań, zwłaszcza dotyczące stresu oksydacyjnego, badane sole wprowadziłem do podłoża dodatkowo w stężeniach równych 50, 400 i  $700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  gleby.

W ramach realizacji **celów I i II**, do oceny toksyczności zastosowanych CSA i ILs dla siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej posłużyłem się m.in. pomiarem plonu świeżej i suchej masy części nadziemnych tych roślin. Na podstawie uzyskanych wyników, prezentujących świeżą masę jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, określiłem wartości LOEC (*lowest observed effect concentration*) oraz NOEC (*no observed effect concentration*), lub z wielkości inhibicji plonu wyznaczałem wartości  $EC_{50}$ . Innymi biomarkerami fitotoksyczności badanych substancji, była inhibicja długości korzeni i części nadziemnych roślin, z której metodą regresji nieliniowej obliczyłem wartości  $EC_{50}$ . Istotnym elementem tych badań było określenie potencjału kiełkowania nasion (GP) po 3 dniach i zdolności kiełkowania nasion (GR) po 7 dniach od ich wprowadzenia do gleby. Za skielkowane przyjąłem te nasiona, których zarodek jest dłuższy niż 2 mm. Jako wskaźnik oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych na wzrost i rozwój siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej posłużyła również ocena wizualna zaistniałych uszkodzeń, co zaprezentowałem na zamieszczonych w artykułach odpowiednich fotografiach.

Realizując **cel III**, do badań zastosowałem czwartorzędowe sole amoniowe o różnej budowie chemicznej. Były to m.in. sole o prostej, symetrycznej budowie łańcuchowej, zawierające podstawniki o długości równej 1, 2, 4, 6 i 8 atomów węgla. Pracami badawczymi objąłem również imidazoliowe ciecze jonowe różniące się ilością podstawników przy kationie oraz chiralne imidazoliowe ciecze jonowe (związki wykazujące izomerię optyczną). Dodatkowo, chcąc określić wpływ anionów na wszystkie analizowane parametry fitotoksyczności zastosowałem halidki ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) oraz aniony zawierające atom fluoru ( $\text{BF}_4^-$  i  $\text{PF}_6^-$ ). Czwartorzędowe sole amoniowe i ciecze jonowe zostały zakupione w firmie Sigma-



Aldrich Chemical lub zsyntezowane w Zakładzie Inżynierii Chemicznej Politechniki Wrocławskiej. Wykorzystanie tych soli do badań jest związane z faktem, że prawie wszystkie te związki są bardzo popularne i dostępne w sprzedaży, co powoduje ich powszechne wykorzystanie w syntezie chemicznej do produkcji substancji aktywnych biologicznie i powierzchniowo czynnych. Związki te stosowane są już z powodzeniem w elektrochemii, ekstrakcji, a także w procesach biotechnologicznych, jako rozpuszczalniki stabilizujące środowisko reakcji, wykorzystujących enzymy i kwasy nukleinowe [36-38].

Świeży materiał roślinny posłużył do określenia wielkości stresu oksydacyjnego w badanych roślinach (realizacja **celu IV**). Jako wskaźniki zaistniałego stresu oksydacyjnego posłużyły zmiany zawartości chlorofilu *a* (Chl*a*), chlorofilu *b* (Chl*b*), chlorofilu całkowitego (Chl(*a+b*)) oraz karotenoidów (Car) w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej. Na podstawie poziomu barwników asymilacyjnych wyznaczyłem dodatkowo dwie wartości: stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b* (Chl*a*/Chl*b*) oraz stosunek chlorofilu całkowitego do zawartości karotenoidów (Chl(*a+b*)/Car), których zmiany mogą wskazywać na ewentualne uszkodzenia fotosystemów. Innymi markerami stresu oksydacyjnego w roślinach, które określiłem również w swoich badaniach, był poziom aldehydu dimalonowego (MDA), nadtlenku wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oraz wolnej proliny. Zawartość tego aminokwasu nie została jednak ujęta w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe w myśl ustawy. Badania zmian fizjologiczno-biochemicznych w roślinach eksperymentalnych uwieńczyłem określeniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich, jak: dysmutaza ponadtlenkowa [EC 1.15.1.1] (SOD), katalaza [EC 1.11.1.6] (CAT) i peroksydaza [1.11.1.7] (POD). Obiekty na których zastosowano wysokie stężenia czwartorzędowych soli amoniowych nie zostały uwzględnione w niektórych analizach. Inhibicja wzrostu części nadziemnych jęczmienia jarego i rzodkiewki była na tych obiektach tak duża, że nie udało się zebrać materiału roślinnego do badań.

Najbardziej praktycznym aspektem moich badań było wskazanie i potencjalne wykorzystanie tych czwartorzędowych soli amoniowych, które wykazywały najsilniejsze właściwości chwastobójcze dla wybranych gatunków roślin niepożądanych (realizacja **celu V**). Badaniem objąłem 3 gatunki popularnych w Polsce chwastów: żóltlica drobnokwiatowa (*Galinsoga parvilora* Cav.), szczaw zwyczajny (*Rumex acetosa* L.) i komosa biała (*Chenopodium album* L.). Nasiona tych chwastów zostały zebrane z własnych działek i pól umiejscowionych w okolicach Częstochowy. Wykorzystane do tych badań substancje chemiczne zastosowałem w formie roztworów, którym opryskałem liście chwastów oraz dogłębowo (inkorporacja). Właściwości chwastobójcze wybranych CSA określiłem na podstawie wyglądu zewnętrznego tych roślin oraz długości ich korzeni, części nadziemnych, a także zawartości suchej masy i barwników asymilacyjnych.

Otrzymane wyniki badań poddano analizie statystycznej, z wykorzystaniem jedno- lub dwuczynnikowej analizy wariancji. Do określenia istotności stwierdzonych różnic wykorzystano test Tukey'a, przy poziomie istotności  $p < 0,05$  (STATISTICA 12.5). Przedstawione w publikacjach dane stanowią średnią  $\pm$  odchylenie standardowe z 3 powtórzeń każdego pomiaru.

Nowatorstwo moich badań polega nie tylko na prowadzeniu eksperymentów w warunkach gleby, ale prawdopodobnie jako pierwszy i jedyny porównuję stopień fitotoksyczności i stresu oksydacyjnego u roślin jedno- i dwuliściennych pod wpływem

czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych. Nowością są również przeprowadzone badania, mające na celu określenie właściwości chwastobójczych tych soli, w kontekście potencjalnego ich wykorzystania w ochronie roślin uprawnych. Jednocześnie trzeba wyraźnie poinformować, że jak dotąd nigdzie w literaturze nie spotyka się badań z zakresu toksyczności dla chwastów czwartorzędowych soli amoniowych, które nie są zaliczane do herbicydowych cieczy jonowych, co jeszcze bardziej wskazuje na unikalność prezentowanych prac badawczych.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

### **Analiza fitotoksyczności czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych**

Badania dotyczące oddziaływania różnych substancji chemicznych na wzrost i rozwój roślin zielonych, mają nie tylko na celu określenie potencjalnej fitotoksyczności tych związków, ale również wyeliminowanie z produkcji, stosowania, a tym samym ze środowiska, chemikaliów najbardziej toksycznych. Zebrane w tych badaniach wyniki pozwalają ponadto dokonać oceny ryzyka skażenia środowiska po zastosowaniu tych substancji, a także ograniczają ewentualne koszty związane z późniejszym procesem oczyszczania wód czy gleb, utylizacji pozostałości oraz usuwania innych zaistniałych szkód. Uzyskane wyniki mogą być ponadto wykorzystane przy projektowaniu substancji mało toksycznych, a jednocześnie przydatnych w przemyśle i rolnictwie.

Prace badawcze dotyczące określenia oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, na wzrost i rozwój jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, rozpocząłem od zastosowania w eksperymencie wazonowym soli o prostej, symetrycznej budowie z anionami tetrafluoroboranowymi (**praca 1**). Do centralnie umieszczonego atomu azotu przyłączone były cztery różnej długości podstawniki o wzrastającej ilości atomów węgla, a mianowicie 2, 4, 6 i 8. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdziłem, że zastosowane sole charakteryzują się wyraźną fitotoksycznością, której wielkość uzależniona jest głównie od długości podstawnika i zastosowanego stężenia związku. Ze względu na wielkość plonu, najbardziej toksyczną okazała się być sól zawierająca 4 atomy węgla w podstawniku (tetrafluoroboran tetrabutylamoniowy). Zwiększanie zaś długości podstawnika do 6 i 8 atomów węgla nie powodowało już tak wyraźnych, toksycznych efektów. Kontynuując badania dotycząc CSA z anionem  $\text{BF}_4^-$ , wykorzystałem z kolei sole amoniowe zsyntezowane w Zakładzie Inżynierii Chemicznej Politechniki Wrocławskiej. Były to imidazoliowe cieczy jonowe wykazujące czynność optyczną, zawierające w swojej cząsteczce naturalny komponent – mentol. Udział mentolu w budowie tych soli, wpływa na ich właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze, właściwości antystatyczne, a także obniża koszty syntezy tych związków. W swoich badaniach wykorzystałem siedem ILs zawierających w swojej cząsteczce podstawniki alkilowe o 1, 3, 6, 8, 9, 10 i 11 atomach węgla (**praca 5**). Uzyskałem bardzo podobne wyniki, jak w poprzednim eksperymencie, okazało się bowiem, że wzrost objawów fitotoksyczności zaobserwowałem dla soli z 3 węglami w podstawniku. Dalsze wydłużanie podstawnika wyraźnie ograniczało niekorzystny wpływ ILs na wzrost siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Wnioski wysnute z tych dwóch prac zostały oparte również na wartościach NOEC i LOEC określonych dla każdej substancji. Wskaźniki te uniemożliwiają w sposób jednoznaczny stwierdzić, która

z badanych roślin wykazuje większą tolerancję na czwartorzędowe sole amoniowe. Dzieje się tak dlatego, że NOEC i LOEC wyznaczają pewien przedział stężeń substancji chemicznej, w którym to można się spodziewać wyraźnych oznak oddziaływania związku na rośliny. Pomimo niewielkiej dokładności, NOEC i LOEC mogą być z powodzeniem dalej stosowane w badaniach fitotoksyczności, ponieważ pozwalają ustalić tak niskie stężenie NOEC polutanta, które z pewnością będzie bezpieczne dla organizmu testowego [39].

Mając powyższe na uwadze, w swojej kolejnej publikacji (**praca 2**) określiłem i porównałem wartości NOEC i LOEC z wyliczoną na podstawie inhibicji plonu wartością stężenia efektywnego  $EC_{50}$ . Prace naukowe dotyczyły określania fitotoksyczności czwartorzędowych soli amoniowych z anionami  $Cl^-$  i  $Br^-$  dla siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. W prezentowanych badaniach dowiodłem, że wielkości NOEC (najniższe stężenie nie wywołujące zauważalnych skutków) było zdecydowanie niższe od wyliczonego metodą regresji nieliniowej stężenia  $EC_{50}$  i gwarantowało uzyskanie zadowalających plonów świeżej masy obu roślin. Wyliczone wskaźniki fitotoksyczności wskazały również, że rośliną bardziej odporną na zastosowane halidki była rzodkiewka zwyczajna. Anionami wykazującymi nieco większą toksyczność okazały się być natomiast chlorki, co mogło być związane z faktem, jony  $Cl^-$  jako podstawowy element zasolenia, w dużym stopniu oddziałują na metabolizm roślinny.

Chcąc dokładnie wskazać, która z roślin jest bardziej wrażliwa na tetrafluoroborany, w swoich następnych badaniach wyznaczyłem inhibicję plonu świeżej masy, długości korzeni i części nadziemnych, a więc flagowych biomarkerów fitotoksyczności, po wprowadzeniu do podłoża wzrastających stężeń chiralnej cieczy jonowej (**praca 8**). Analizując obliczone z inhibicji w/w wskaźników wartości  $EC_{50}$  stwierdziłem, że roślina dwuliścienna wykazywała wyższą odporność na zastosowaną ciecz jonową z anionem  $BF_4^-$ .

Bardzo istotnym wskaźnikiem toksyczności substancji występujących w środowisku wzrostu roślin jest długość ich korzeni, ponieważ ten organ odpowiada za pobieranie wody, składników pokarmowych oraz za utrzymanie rośliny w glebie. Wszystko to przekłada się następnie na wielkość i jakość plonu. Korzeń jest także pierwszym organem, który ma bezpośredni i ciągły kontakt z zanieczyszczeniami obecnymi w podłożu [40]. W wyniku przeprowadzonych analiz okazało się, że wszystkie z zastosowanych CSA nie tylko skracają długość korzeni, ale w przypadku jęczmienia jarego dochodziło również do widocznych zmian ich morfologii. Po zastosowaniu zaś najwyższych stężeń badanych związków obserwowałem jedynie zawiązki systemu korzeniowego, co widoczne jest to na fotografiach dołączonych do opublikowanych prac.

Kontynuując badania mające na celu określenie fitotoksyczności czwartorzędowych soli amoniowych, następnymi związkami, które wybrałem do przeprowadzenia eksperymentu wazonowego były imidazoliowe ciecze jonowe z anionem heksafluorofosforanowym (**praca 3**). Wybór kolejnej soli z udziałem fluoru w cząsteczce podyktowany był istniejącymi w dostępnej literaturze doniesieniami [41], iż pierwiastek ten wykazuje wysoką toksyczność dla organizmów roślinnych. Dotyczy to głównie ujemnego oddziaływania jonów  $F^-$  na procesy asymilacji, fotosyntezy, co w konsekwencji prowadzi do zmniejszenia się np. objętości nasion i hamowania wzrostu roślin. Zjawiska te wynikają z destrukcyjnego oddziaływania fluoru na chloroplasty. Wykorzystanie w omawianych pracach badawczych, cieczy jonowych

zawierających aniony z atomami fluoru, związane było ponadto z informacjami, że wysoka toksyczność tych związków związana jest z hydrolizą jonów  $\text{BF}_4^-$  i  $\text{PF}_6^-$  w środowisku glebowym. W wyniku tego procesu, do środowiska glebowego dostają się wówczas duże ilości toksycznych i wysoce niepożądanych jonów  $\text{F}^-$  [8]. W badaniach własnych również stwierdziłem bardzo dużą fitotoksyczność soli zawierających anion heksafluorofosforanowy dla siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, czego potwierdzeniem była zaobserwowana redukcja długości korzeni i części nadziemnych roślin oraz wyraźne obniżenie się plonu świeżej masy. Rośliną wyjątkowo wrażliwą na zastosowane cieczy jonowe był jęczmień jary. Celem omawianej pracy było także uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy modyfikacja budowy kationu poprzez dodanie do niego dodatkowego podstawnika zmniejszy toksyczność tych ILs dla organizmów roślinnych. Jednak analiza wyników jednoznacznie pokazała, że w przypadku soli zawierających aniony  $\text{PF}_6^-$ , modyfikacja budowy chemicznej kationu nie skutkuje w żaden sposób zmianą zaobserwowanej fitotoksyczności. W roślinach eksperymentalnych określiłem ponadto zawartość fluorków, a otrzymane rezultaty wskazały na akumulację tych jonów w tkankach obu roślin.

We wszystkich omawianych powyżej pracach, jako wskaźnik toksyczności dla jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej analizowałem również oddziaływanie czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, na potencjał kiełkowania (GP) i zdolność kiełkowania (GR) nasion tych roślin. W przypadku związków z anionami heksafluorofosforanowymi nie stwierdzono statystycznie udowodnionych różnic w wartościach tych wskaźników kiełkowania dla nasion rzodkiewki zwyczajnej, podczas gdy wysokie stężenia ILs obniżały zarówno wielkość GP, jak i GR ziarna jęczmienia jarego. Najwyższe stężenia CSA i ILs z anionami tetrafluoroboranowymi obniżyły zdolność i potencjał kiełkowania obu roślin, podczas gdy dla chlorków i bromków nie obserwowano podobnych tendencji.

W swoich badaniach określiłem ponadto oddziaływanie zastosowanych związków na zmiany zawartości suchej masy części nadziemnych jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Otrzymane wyniki badań jednoznacznie dowiodły, że poziom suchej masy wzrastał wraz ze zwiększeniem się koncentracji CSA i ILs w glebie. Zależności te wykazywały wyraźnie dodatnią korelację. Takiej prawidłowości nie zaobserwowałem jedynie w roślinach po wprowadzeniu do gleby soli z najdłuższymi podstawnikami. Obserwowane zwiększenie się zawartości suchej masy w roślinach uprawianych na podłożu z dodatkiem czwartorzędowych soli amoniowych związane jest z faktem, że wysokie stężenia tych substancji mogą prowadzić do zasolenia gleb, co z kolei utrudnia roślinom pobieranie wody i zaburza ich gospodarkę wodną.

Podsumowując wyniki badań opisanych w tej części autoreferatu, należy jednoznacznie stwierdzić, że zastosowane czwartorzędowe sole amoniowe, w tym cieczy jonowe, nie zasługują na przydomek „zielone rozpuszczalniki”. Praktycznie wszystkie związki dodane do gleby wykazywały toksyczne działanie na rośliny, powodując inhibicję długości korzeni i części nadziemnych, spadek świeżej masy oraz wzrost poziomu suchej masy. Bardzo istotnym czynnikiem obserwowanej fitotoksyczności było zastosowane stężenie. W niskich stężeniach związki te stymulowały wzrost siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, zachowując

się tym samym jak regulatory wzrost roślin. Wysokie zaś stężenia tych soli wykazywały bardzo destrukcyjne działanie na oba gatunki roślin użytych w eksperymencie.

Wnioskiem wskazującym na możliwość praktycznego wykorzystania analizowanych związków, również w agrochemii jest fakt, że można ograniczyć fitotoksyczność CSA i ILs, zmieniając ich budowę chemiczną, np. poprzez zmianę rodzaju anionu. Wbrew powszechnym opiniom, że za toksyczność czwartorzędowych soli odpowiada kation, a anion warunkuje jedynie właściwości fizykochemiczne tych związków, w swoich badaniach dowiodłem niezbicie, że nie ma to żadnego przełożenia na fitotoksyczność soli zawierających aniony z atomem fluoru. Zwłaszcza jon  $\text{PF}_6^-$  wykazuje tak silne działanie toksyczne dla roślin wyższych, że struktura kationu wydaje się mieć tutaj znaczenie drugorzędne. Analizując wartości  $\text{EC}_{50}$  dla zastosowanych CSA, wyliczone z inhibicji długości korzeni, części nadziemnych i plonu jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, toksyczność anionów można uszeregować następująco:  $\text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^-$ . Zmianę wielkości fitotoksyczności można uzyskać także regulując długość podstawników. Dlatego zarówno w przemyśle, jak i agrochemii należy unikać stosowania substancji o krótkich podstawnikach, ze względu na ich stosunkowo wysoką toksyczność dla roślin uprawnych. Rekomendować można natomiast do stosowania czwartorzędowe sole amoniowe z długimi łańcuchami od 8 do kilkunastu atomów węgla. Gwarantuje to brak fitotoksyczności tych substancji, wynikający m.in. z ich sorpcji na koloidach glebowych. Związki o długich podstawnikach wykazują jednocześnie wyraźne właściwości hydrofobowe, podobnie jak klasyczne surfaktanty i środki powierzchniowo czynne, co ma duże znaczenie w kontekście ich praktycznego wykorzystania.

Bardzo ważnym wnioskiem, również mogącym mieć zastawanie w praktyce, jest zaobserwowana różnica we wrażliwości rośliny jedno- i dwuliściennej na wykorzystane w badaniach czwartorzędowe sole amoniowe, w tym cieczy jonowe. Z badań wynika bowiem, że na glebach, w których stwierdzi się obecność związków o podobnej budowie chemicznej do soli zastosowanych w badaniach, nie powinno się uprawiać zbóż. W prezentowanych badaniach wykorzystałem wprawdzie tylko jęczmień jary, ale do wyciągnięcia powyższego wniosku upoważnia mnie jednak nie tylko podobna budowa systemu korzeniowego wszystkich roślin jednoliściennych, ale również wyniki analogicznego eksperymentu, przeprowadzonego z udziałem pszenicy jarej (praca wysłana do czasopisma, status – w recenzji). To zboże zareagowało na obecność cieczy jonowych w glebie w sposób identyczny, jak jęczmień jary. W związku z tym, chcąc np. poddać fitoremediacji grunty zanieczyszczone czwartorzędowymi solami jonowymi, należy zdecydowanie wykorzystywać rośliny dwuliścienne. Jednak trzeba pamiętać, że nie zawsze mogą one być po zbiorze wykorzystane jako pasza, ponieważ po zastosowaniu soli z anionami np.  $\text{BF}_4^-$  i  $\text{PF}_6^-$ , rośliny akumulują duże ilości fluoru, który jest z kolei przekształcany w bardzo toksyczny dla zwierząt fluorooctan [42].

### **Stres oksydacyjny w roślinach poddanych oddziaływaniu czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych**

O występowaniu zjawiska stresu oksydacyjnego mówimy wówczas, kiedy w roślinach następuje nadprodukcja wolnych rodników tlenowych, przez co występują one w komórkach roślinnych w dużych ilościach. Taki stan rzeczy prowadzi do znacznych uszkodzeń różnych organelli komórkowych. Łądowe rośliny wyższe będąc organizmami osiadłymi, cały czas są

narażone na oddziaływanie szeregu biotycznych i abiotycznych czynników stresowych. Do tych ostatnich zalicza się np. zasolenie, skażenie gleb metalami ciężkimi, czy pozostałościami pestycydów [35,43,44]. Podejmując się przeprowadzenia prezentowanych badań chciałem dowiedzieć, że do takich antropogenicznych czynników powodujących stres oksydacyjny u roślin zaliczyć można także czwartorzędowe sole amoniowe, w tym cieczy jonowe.

Organellami komórkowymi, wyjątkowo podatnymi na nadprodukcję RFT są chloroplasty, co jest związane z olbrzymią dawką energii pochłanianej przez barwniki asymilacyjne. W warunkach stresu oksydacyjnego kiedy mechanizmy fotoochronne nie są wystarczające, wzbudzony chlorofil reaguje z tlenem co prowadzi do powstania tlenu singletowego  $^1\text{O}_2$  oraz innych wolnych rodników, pochodnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Powstałe w ten sposób RFT uszkadzają białka występujące w fotosystemie PSII zaburzając jego normalne funkcjonowanie. Obniża to wydajność fotosyntezy, rozumianej jako proces syntezy złożonych związków z  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  przy udziale pochłanianego przez barwniki asymilacyjne fotosyntetycznego promieniowania. Fotosynteza jest podstawą produkcji biomasy roślin, od której zależnie od dystrybucji wytworzonych asymilatów zależy plon, np. ziarna zbóż. Wydajność procesu fotosyntezy jest nierozrywnie związana również z zawartością wszystkich barwników asymilacyjnych oraz ich wzajemnymi proporcjami [44-46].

Mając na uwadze powyższe, w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe w myśl ustawy, dokonałem analizy zawartości barwników asymilacyjnych w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej, uprawianych na glebie z dodatkiem czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych. Zgodnie z przewidywaniami, obserwowany spadek plonu jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej na skutek oddziaływania CSA i ILS, bezpośrednio był związany z obniżaniem się zawartości chlorofilu w roślinach. Praktycznie wszystkie zastosowane czwartorzędowe sole amoniowe prowadziły do systematycznego spadku chlorofilu *a*, chlorofilu *b*, chlorofilu całkowitego oraz karotenoidów (**prace 1-4, 8**). Zaobserwowany spadek był skorelowany ze wzrostem stężenia tych substancji chemicznych w glebie. W prezentowanych badaniach zaobserwowałem też zależność pomiędzy zawartością barwników asymilacyjnych, a zahamowaniem wzrostu roślin oraz spadkiem świeżej masy siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Związane jest to najprawdopodobniej z zaburzeniami procesu fotosyntezy, co zmniejszyło produktywność roślin, poprzez obniżenie lub zahamowanie tzw. produkcji pierwotnej. Tak destrukcyjny wpływ CSA na zawartość barwników asymilacyjnych nie był praktycznie uzależniony od rodzaju związku. Jedynym wyjątkiem były tutaj sole z długimi podstawnikami, dla których zaobserwowałem najmniejsze zmiany zawartości zarówno chlorofilu, jak i karotenoidów. Przekładało się to na niewielką fitotoksyczność tych soli, zwłaszcza w odniesieniu do rośliny dwuliściennej. Należy również wspomnieć, że w liściach rzodkiewki zwyczajnej stwierdzono mniejsze zmiany zawartości barwników w porównaniu do jęczmienia jarego, co dodatkowo dowodzi o większej tolerancji tej rośliny dwuliściennej na badane substancje.

Do oceny prawidłowości funkcjonowania fotosystemów, wykorzystuje się również wskaźniki wyliczane z zawartości poszczególnych barwników asymilacyjnych, co jednocześnie daje informacje o proporcjach tych organicznych związków chemicznych obecnych w roślinach. Jest to o tyle ważne, ponieważ jak powszechnie wiadomo nie tylko ilość

barwników, ale odpowiednie proporcje Chla, Chb i Car warunkują odpowiednie natężenie procesu fotosyntezy. Bardzo ważnym wskaźnikiem jest stosunek zawartości chlorofilu *a* do poziomu chlorofilu *b*. Obniżenie się wartości tego wskaźnika, bezpośrednio związane ze spadkiem poziomu Chla, świadczy niezawodnie o uszkodzeniach fotosystemów i postępującej za tym fotoinhibicją. Drugim wskaźnikiem jest stosunek zawartości chlorofilu całkowitego do ilości karotenoidów. Spadek wielkości  $Chl(a+b)/Car$  sugeruje nie tylko, że w roślinie doszło do powstania stresu oksydacyjnego, ale jednocześnie wskazuje na podjęcie przez organizm obrony antyoksydacyjnej, poprzez zwiększenie udziału karotenoidów w ogólnej puli barwników asymilacyjnych. Karotenoidy są bowiem odpowiedzialne nie tylko za rozpraszanie energii, ale również za ochronę fotoukładów przed RFT [46].

Na podstawie analizy wyników otrzymanych po obliczeniu stosunku Chla/Chb widać wyraźnie, że wprowadzenie do podłoża czwartorzędowych soli amoniowych zawierających aniony  $BF_4^-$  i  $PF_6^-$  prowadziło do obniżenia się tego wskaźnika, co było widoczne zwłaszcza w jęczmieniu jarym. Wskazuje to na niekorzystne oddziaływanie badanych związków na poziom chlorofilu *a* oraz na zaburzone proporcje pomiędzy zawartością chlorofilu *a* i chlorofilu *b*. W liściach rzodkiewki zwyczajnej zmiany wartości wyliczonych wskaźników były dużo mniejsze i dotyczyły z reguły roślin uprawianych przy najwyższych poziomach stężeń CSA i ILs. Nie stwierdzono natomiast żadnych zmian wartości Chla/Chlb u roślin poddanych oddziaływaniu soli nie wykazujących właściwości fitotoksycznych. Zmiany wartości wskaźnika otrzymanego ze stosunku chlorofilu całkowitego do karotenoidów wskazują na uruchomienie przez rośliny obrony antyoksydacyjnej. Widoczne to było zwłaszcza w przypadku rośliny dwuliściennej, której systemy ochronne są widocznie sprawniejsze i efektywniejsze, niż funkcjonujące w jęczmieniu jarym (**prace nr 3, 4, 8**).

Kontynuując swoje prace badawcze mające na celu stwierdzenie występowania oraz wielkość stresu oksydacyjnego w roślinach podanych oddziaływaniu czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, w materiale roślinnych określiłem również poziom bezpośrednich markerów stresu, jakimi są aldehyd dimalonowy (MDA), nadtlenuk wodoru, a także nie ujęta w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe, wolna prolina. Stopień peroksydacji lipidów w roślinach jest określany za pomocą zmian zawartości nadtlenuków lipidów (LOOH) i MDA. Aldehyd dimalonowy jest bowiem produktem rozkładu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w błonach białkowo-lipidowych, głównie kwasu linolowego. Dlatego zawartość MDA jest rutynowo oznaczana i wykorzystywana jako bardzo dobry wskaźnik pomiaru oksydacyjnego uszkodzenia komórek [31,47,48]. Analizując zmiany poziomu MDA w siewkach jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej należy stwierdzić, że były one powiązane z obserwowaną fitotoksycznością badanych czwartorzędowych soli amoniowych dla tych roślin. Najbardziej toksycznymi solami były te CSA i ILs, które posiadały w cząsteczce anion heksafluorofosforanowy i dla tych związków stwierdziłem również największe zmiany poziomu MDA. Zarówno proste sole alifatyczne (**praca 4**), jak i imidazoliowe cieczy jonowe (**praca 3**) z tymi anionami, prowadziły do dużej akumulacji tego aldehydu w komórkach obu roślin eksperymentalnych, która była dodatkowo skorelowana ze stężeniem tych związków w glebie. Największy wzrost poziomu MDA zaobserwowałem po zastosowaniu najwyższych stężeń czwartorzędowych soli amoniowych, co skłania ku pogładowi, że wysokie stężenia badanych substancji generują już

tak wysoki stopień stresu oksydacyjnego, że systemy obronne, zwłaszcza enzymatyczne stają się nieskuteczne. W przypadku zastosowania soli z anionami  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$  i  $\text{Br}^-$  zmiany poziomu aldehydu dimalonowego nie były już tak jednoznaczne, a stwierdzony wzrost zawartości tego związku dotyczył głównie siewek jęczmienia jarego. Dla rzodkiewki zwyczajnej nie obserwowałem w tych warunkach uprawy podobnych tendencji zmian zawartości MDA, co jest kolejnym dowodem na posiadanie przez tą roślinę wydajniejszego systemu obrony antyoksydacyjnej.

W swoich pracach badawczych określiłem także zawartość nadtlenu wodoru, cząsteczki zaliczanej do RFT, która może być akumulowana w komórkach roślinnych w warunkach stresu oksydacyjnego. Taki wzrost zawartości  $\text{H}_2\text{O}_2$  stwierdza się również wtedy, gdy dochodzi do wzmożonej detoksykacji anionorodnika nadadtlenkowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), prowadzonej przez dysmutazę nadadtlenkową oraz wtedy, gdy zawiodą w roślinach enzymatyczne mechanizmy detoksykacji nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru jest najbardziej stabilną cząsteczką spośród wszystkich RFT i zdolną do przenikania przez błony komórkowe [25,49]. Analizując otrzymane wyniki eksperymentów dotyczących wpływu czwartorzędowych soli amoniowych na zawartość  $\text{H}_2\text{O}_2$ , zaobserwowałem bardzo interesującą odpowiedź roślin na ten czynnik stresogenny. Mianowicie jęczmień jary, roślina bardziej wrażliwa od rzodkiewki na zastosowane substancje chemiczne, doskonale radziła sobie z nadmiarem nadtlenu wodoru. Bez względu na budowę chemiczną zastosowanych CSA i ILs, zawsze obserwowałem spadek zawartości  $\text{H}_2\text{O}_2$  w siewkach jęczmienia, który był skorelowany z zastosowanym stężeniem tych soli. U odporniejszej rośliny dwuliściennej dochodziło zaś do odkładania się tej substancji w komórkach, a wzrost zawartości  $\text{H}_2\text{O}_2$  był widoczny zwłaszcza po zastosowaniu najwyższych stężeń badanych soli (**prace 1-4, 8**). Związki dla których nie obserwowano objawów fitotoksyczności, nie generowały żadnych zmian poziomu  $\text{H}_2\text{O}_2$  w liściach rzodkiewki zwyczajnej. Uzyskanie takich wyników badań można tłumaczyć jedynie zróżnicowaną aktywnością enzymów antyoksydacyjnych rozkładających nadtlenek wodoru w jęczmieniu jarym i rzodkiewce zwyczajnej. W żadnym z obiektów nie stwierdziłem natomiast całkowitego usunięcia tej RFT, co jest związane z faktem, że  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest także cząsteczką sygnałową, odpowiedzialną za regulację niektórych procesów fizjologicznych [34].

Zaobserwowane tendencje zmian zawartości MDA i  $\text{H}_2\text{O}_2$  w roślinach doświadczanych skłoniły mnie do podjęcia badań, których celem było określenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych. W swoich pracach badawczych określiłem aktywność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy (POD). Enzymy te stanowią bardzo istotną linię obrony przed RFT, a w swoich działaniach wykazują wysoką specjalizację, ponieważ produkt działania jednego enzymu staje się natychmiast substratem, na który działa kolejny enzym. Proces ten trwa dopóty, dopóki nie powstaną substancje nietoksyczne [44,50].

Pierwszą linię obrony przed RFT stanowi SOD, enzym detoksykujący anionorodnik nadadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) do  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$ . Dysmutaza nadadtlenkowa to ogólna nazwa całej rodziny tych metaloenzymów, które prowadzą rozkład  $\text{O}_2^{\cdot-}$  w różnych organellach komórkowych, a mianowicie Mn-SOD działa w mitochondriach, Fe-SOD w plastydach, a Cu/Zn-SOD w cytozolu i chloroplastach [45]. Analiza wyników otrzymanych w badaniach własnych nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków co do kierunku zmian aktywności SOD w roślinach uprawianych w warunkach wzrastającej koncentracji czwartorzędowych soli



amoniowych, w tym cieczy jonowych w glebie. W siewkach jęczmienia jarego, bez względu na rodzaj zastosowanego związku, obserwowałem z reguły wzrost aktywności dysmutazy tylko do pewnego poziomu stężenia CSA i ILs, podczas gdy najwyższe stężenia tych soli skutkowały wyraźnym obniżeniem się aktywności tego enzymu (**praca 1-4**). Jest to związane z faktem, że wysoki stopień uszkodzenia komórek roślinnych prowadzi do znacznej inhibicji aktywności enzymów antyoksydacyjnych, co skutecznie redukuje możliwości obrony, a nawet prowadzić może do śmierci komórek. W liściach rzodkiewki zwyczajnej zaobserwowałem natomiast inne tendencje zmian aktywności SOD. Heksafluorofosforany prowadziły do systematycznego obniżania się aktywności tego enzymu (**praca 3**) lub obserwowany spadek widoczny był od pewnego poziomu stężenia CSA i ILs w glebie (**praca 4**). Natomiast sole wykazujące mniejsze właściwości fitotoksyczne takie, jak np. tetrafluoroborany, nie powodowały statystycznie udowodnionych różnic aktywności SOD w odniesieniu do obiektów kontrolnych (**praca 1 i 8**), podczas gdy chlorki i bromki prowadziły do wzrostu aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w liściach rzodkiewki zwyczajnej (**praca 2**). Zmiany aktywności SOD były ponadto skorelowane z zawartością MDA i  $H_2O_2$  w roślinach eksperymentalnych.

Powstały w wyniku dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego  $H_2O_2$  jest z kolei substratem dla aktywności katalazy (CAT) i peroksydazy (POD). Katalaza jest enzymem zlokalizowanym w peroksysomach i powoduje rozkład nadtlenu wodoru do  $H_2O$  i  $O_2$ . Peroksydaza zaś, będąca zbiorem izoenzymów, rozkłada  $H_2O_2$  przy udziale związków fenolowych (pirogalol, benzydyna, gwajakol) lub niektórych niskocząsteczkowych antyutleniaczy (kwas askorbinowy) [25,44].

W literaturze naukowej można spotkać opinie, że usuwanie nadtlenu wodoru z komórek jest rolą katalazy, podczas gdy rola peroksydazy ogranicza się jedynie do regulacji poziomu tego RFT w organizmach roślinnych [44,46]. Przeprowadzone przeze mnie prace badawcze nie potwierdzają jednak powyższej tezy. W siewkach jęczmienia jarego, po wprowadzeniu do gleby czwartorzędowych soli amoniowych z halidkami i anionami  $PF_6^-$  zaobserwowałem wzrost aktywności tego enzymu (**praca 2-4**), podczas gdy tetrafluoroborany powodowały zwiększenie się aktywności katalazy jedynie do pewnego poziomu koncentracji tych związków w podłożu (**praca 1**). W liściach rzodkiewki zwyczajnej również nie stwierdziłem żadnych prawidłowości co do kierunku zmian aktywności katalazy. W zależności od eksperymentu obserwowałem wzrost aktywności CAT tylko do pewnego stężenia soli (**praca 4**), albo wzrost ten był widoczny tylko przy najwyższych stężeniach CSA i ILs (**praca 1-3**), bądź nie stwierdziłem żadnych różnic pomiędzy aktywnością tego enzymu w obiektach kontrolnych, a obiektach, na których rzodkiewka rosła na glebie z dodatkiem CSA (**praca 8**). Takie zróżnicowane kierunki zmian aktywności CAT wynikać mogą z budowy tego enzymu. Inaktywacja katalazy zachodzi bowiem po przyłączeniu się substancji chemicznych do centrum aktywnego enzymu, do którego prowadzi bardzo wąski kanał, przez który duże cząsteczki niektórych CSA i ILs nie są w stanie przeniknąć. Dlatego katalazę uważa się za enzym dość odporny na działanie tego typu soli [51].

W sytuacji kiedy aktywność katalazy nie gwarantuje skutecznej obrony przed RFT, funkcję rozkładu nadtlenu wodoru przejmuje peroksydaza. Spotkać można prace [43], które wbrew opinii o tylko regulacyjnej roli peroksydazy, wnoszą o dużo większym powinowactwie tego enzymu do  $H_2O_2$ , niż obserwowana w przypadku katalazy. Jak bardzo istotna jest rola

POD w detoksykacji nadtlenu wodoru, może świadczyć pogląd, że wzrost aktywności peroksydazy będzie następował zawsze, gdy tylko czynniki stresogenne będą oddziaływały na roślinę i tak długo, jak długo będzie ona w stanie prowadzić w tych warunkach swoją wegetację [52]. Wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań dotyczących oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, na zmiany aktywności peroksydazy w siewkach jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej dowodzą, że wszystkie zastosowane sole wyraźnie stymulowały aktywność tego enzymu w obu roślinach objętych doświadczeniem (**prace 1-4, 8**). W przypadku CSA, które charakteryzowały się niewielką fitotoksycznością, wzrost aktywności POD był odpowiednio mniejszy. Obserwowany wzrost aktywności POD był dodatnio skorelowany ze wzrostem stężenia czwartorzędowych soli w podłożu, co upoważnia do stwierdzenia, że zmiany aktywności peroksydazy są dobrym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych. Warto zaznaczyć, że aktywność peroksydazy w liściach rzodkiewki zwyczajnej była zasadniczo kilkakrotnie niższa, niż stwierdzona w siewkach jęczmienia jarego, co tłumaczy obserwowane tendencje zmian zawartości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach tych roślin.

Trzeba jednak pamiętać, że szybki i duży wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych nie jest do końca korzystny dla roślin. Enzymy te nie tylko usuwają wolne rodniki tlenowe, odpowiedzialne za stres oksydacyjny, ale również mogą upośledzać metabolizm roślinny poprzez rozkład RFT odpowiedzialnych za sygnalizację komórkową. Dodatkowo, wzrost aktywności peroksydazy jest odpowiedzialny także za uszkodzenia cząsteczek chlorofilu [34,52]. W badaniach własnych dowiodłem korelacji pomiędzy wzrostem aktywności peroksydazy, a spadkiem zawartości chlorofilu całkowitego w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej (**prace 1 i 8**).

Podsumowując rezultaty badań własnych mogę stwierdzić, że czwartorzędowe sole amoniowe, w tym cieczy jonowe, z powodzeniem można zaliczyć do abiotycznych czynników stresogennych dla roślin jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Świadczyć o tym może m.in. obserwowana akumulacja MDA i zmiany zawartości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w obu roślinach doświadczalnych. Spadek zaś zawartości barwników asymilacyjnych jest nie tylko kolejnym symptomem stresu oksydacyjnego, ale również odpowiada za stwierdzoną fitotoksyczność tych soli. Degradacja systemu barwników asymilacyjnych znalazła bowiem odzwierciedlenie w obniżeniu się tzw. produkcji pierwotnej, co z kolei wpłynęło na inhibicję wzrostu roślin i obniżenie ich plonu. Stwierdziłem ponadto, że zmiany zarówno poziomu chlorofilu, jak i aktywności peroksydazy mogą być dobrym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego wywołanego przez CSA, podczas gdy zmiany aktywności pozostałych enzymów antyoksydacyjnych, nadają się do tego w zdecydowanie mniejszym stopniu.

Zdobyta wiedza może przyczynić się ponadto do lepszego zrozumienia samego mechanizmu fitotoksyczności czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych. Efekty moich badań mogą również być wykorzystane w praktyce rolniczej, ponieważ ich przesłanką było wybranie tych gatunków roślin uprawnych, które na glebach zanieczyszczonych CSA i ILs nie tylko będą radzić sobie ze stresem oksydacyjnym, ale również zapewnią oczekiwaną wielkość plony o dobrej jakości. W oparciu o uzyskane rezultaty, uprawa roślin dwuliściennych na glebach zawierających tego typu związki chemiczne może

być uważana za bardziej wskazaną, a do stosowania praktycznego polecać należy czwartorzędowe sole amoniowe z długim podstawnikami alkilowymi.

### **Badania nad możliwością zastosowania czwartorzędowych soli amoniowych do ograniczenia wzrostu chwastów – ewentualne możliwości praktycznego wykorzystania wyników badań**

Rośliny niepożądane to jeden z najważniejszych problemów istniejących w uprawie roślin wykorzystywanych gospodarczo i stanowiących podstawę pożywienia ludzkości. Chwasty konkurują z roślinami uprawnymi o wodę, składniki pokarmowe czy światło, a ich szybki wzrost i rozwój powoduje, że rośliny uprawne są góry skazane na niepowodzenie w czasie tego współzawodnictwa. Chwasty pogarszają jakość plonów, utrudniają zbiór mechaniczny oraz generują koszty związane z oczyszczaniem uzyskanych zbiorów ze swoich nasion i pozostałości. Mogą być ponadto żywicielami patogenów powodujących wiele chorób o podłożu bakteryjnym, wirusowym i grzybiczym, co z kolei może prowadzić do infekcji roślin uprawnych i eliminować uzyskane plony pod względem ich wykorzystania. Dlatego od wielu lat do zwalczania roślin niepożądanych stosuje się całą gamę związków chemicznych, nazwanych herbicydami. Jednak wskutek wieloletniego stosowania niektórych preparatów, coraz częściej dochodzi do zjawiska uodparniania się chwastów na wiele dostępnych komercyjnie herbicydów. W związku z powyższym istnieje konieczność ciągłego poszukiwania substancji, które nie tylko wykazywałyby pożądaną właściwość chwastobójczą, ale również byłyby nieszkodliwymi dla ludzi i zwierząt. Przykładem nowej i obiecującej grupy związków są wspomniane już w autoreferacie herbicydowe ciecze jonowe (HILs), w których co najmniej jeden z jonów wykazuje stwierdzone już właściwości chwastobójcze [53,54].

Mając na uwadze powyższe, a także po przeanalizowaniu wyników analiz dotyczących fitotoksyczności i stresu oksydacyjnego w jęczmieniu jarym i rzodkiewce zwyczajnej, podjąłem badania mające na celu wybór i wykorzystanie czwartorzędowych soli amoniowych w ograniczaniu wzrostu i rozwoju chwastów. Do swoich badań wykorzystałem 3 gatunki popularnych chwastów: żóltlica drobnokwiatowa (*Galinsoga parvilora* Cav.), szczaw zwyczajny (*Rumex acetosa* L.) i komosa biała – lebioda (*Chenopodium album* L.). Są to rośliny azotolubne, które cechuje duża zdolność przetrwania i łatwego rozprzestrzeniania się. Chwasty te są jednocześnie trudne do usuwania z upraw ze względu na szybki rozwój, zdolność wydawania olbrzymich ilości nasion mogących przez wiele lat przebywać w glebie nie tracąc przy tym zdolności kiełkowania, czy chociażby, jak w przypadku szczawiu, posiadania kłączy z powodzeniem zimujących w glebie [55-57].

W eksperymencie wykorzystałem czwartorzędowe sole amoniowe, posiadające jako aniony chlorki, bromki i jodki. Związki te zastosowałem w formie oprysku na liście badanych chwastów oraz doglebowo przed wysianiem nasion tych roślin. Powód wyboru tych soli do eksperymentów był oczywisty. Po wstępnych badaniach chwastobójczych, dotyczących oddziaływania chiralnych imidazoliowych cieczy jonowych z anionem tetrafluoroboranowym zastosowanych w formie oprysku liści roślin komosy białej, żóltlicy drobnokwiatowej i szczawiu zwyczajnego (**praca 5**), swoją dalszą działalność badawczą skupiłem na halidkach. Stosowanie bowiem CSA i ILS z anionami  $\text{BF}_4^-$  i  $\text{PF}_6^-$ , nawet jeżeli wykazywały silniejsze właściwości herbicydowe, skutkowało wprowadzeniem do gleby sporych ilości toksycznych jonów fluorkowych. Nie bez znaczenia pozostaje stwierdzona w badaniach własnych

akumulacja fluoru w roślinach, która decyduje o toksyczności takiego materiału roślinnego dla ludzi i zwierząt.

W eksperymencie wazonowym zastosowałem 3 czwartorzędowe sole amoniowe z kationem posiadającym cztery symetryczne podstawniki zawierające 2 atomy węgla oraz takie aniony, jak: Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> i I<sup>-</sup> (**praca 6**). Uzyskane wyniki badań pokazały, że zastosowane substancje wykazują potencjalne właściwości chwastobójcze, a stopień takiego oddziaływania uzależniony był głównie od formy zbiegu, ale także od rodzaju związku i zastosowanego stężenia oraz od gatunku rośliny. W przypadku inkorporacji, najsilniejsze oddziaływanie na wszystkie gatunki chwastów wykazywały jodki. Najbardziej odporną rośliną był zaś szczaw zwyczajny, ale i w jego przypadku stwierdziłem np. około 80% inhibicję wzrostu korzeni. Mniejszy stopień inhibicji wzrostu część nadziemnych i korzeni chwastów, a także spadek zawartości barwników asymilacyjnych w liściach badanych chwastów stwierdziłem po wprowadzeniu do podłoża CSA z chlorkami i bromkami. Słabsze właściwości chwastobójcze w stosunku do żółtlicy drobnokwiatowej, szczawiu zwyczajnego i komosy białej zaobserwowałem bo zastosowaniu badanych czwartorzędowych soli amoniowych w formie oprysku. Rośliną całkowicie odporną na działanie zastosowanych CSA okazała się być żółtlica drobnokwiatowa, natomiast wyraźny wpływ na szczaw zwyczajny i lebidę stwierdziłem dopiero po zastosowaniu wyższych stężeń tych związków. Czwartorzędowe sole amoniowe z chlorkami i bromkami wykorzystane do oprysku w najwyższych stężeniach (2%), powodowały wyraźne przebarwienia na liściach roślin (chloroza i nekroza), a część roślin szczawiu i komosy białej po pewnym okresie ulegała zasychaniu. Za takimi efektami przemawiają także wartości EC<sub>50</sub>, otrzymane z inhibicji długości korzeni i części nadziemnych roślin oraz zaobserwowane zmiany poziomu barwników asymilacyjnych.

Wskutek stwierdzenia totalnych właściwości chwastobójczych jodków zastosowanych doglebowo, podjąłem dalsze badania, które miały na celu wykazać, czy modyfikacja budowy chemicznej tych soli pociągnie za sobą zmianę ich właściwości chwastobójczych (**praca 7**). Do badań wykorzystałem dwa jodki zawierające symetryczne podstawniki z 1 i 4 atomami węgla, a rozwoje tych soli zastosowałem doglebowo i opryskałem nimi liście tych samych chwastów co uprzednio. Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu, najsilniej inhibitująco na kiełkowanie nasion oraz wzrost i rozwój żółtlicy drobnokwiatowej, komosy białej i szczawiu zwyczajnego oddziaływało doglebowe zastosowanie tych soli. Jodek zawierający podstawniki z 4 atomami węgla całkowicie zahamował kiełkowanie nasion wszystkich gatunków chwastów, podczas gdy w przypadku substancji z jednowęglowym podstawnikiem, wykiełkowała tylko część nasion lebidy, a siewki wykazywały karłowatość. Oprysk liści tych gatunków chwastów rozworami badanych jodków również potwierdził wcześniejsze obserwacje. Żółtlica drobnokwiatowa w ogóle nie zareagowała na zastosowane sole. W przypadku szczawiu zwyczajnego oddziaływanie tych CSA uzależnione było głównie od zastosowanego stężenia, chociaż na podstawie uzyskanych rezultatów trzeba wskazać na jodek o czterowęglowych podstawnikach, jako na substancję o silniejszym, niekorzystnym oddziaływaniu na tą roślinę. Wszystkie określone w prezentowanych badaniach biomarkery, tj. inhibicja wzrostu części nadziemnych i korzeni, zmiany poziomu suchej masy i barwników asymilacyjnych oraz wygląd zewnętrzny roślin wskazują, że największą fitotoksycznością charakteryzowały się analizowane jodki w stosunku do komosy białej.

Przeprowadzone badania, dotyczące określenia wpływu czwartorzędowych soli amoniowych zawierających chlorki, bromki i jodki na wzrost i rozwój żóltlicy drobnokwiatowej, szczawiu zwyczajnego i komosy białej pokazały, że zastosowane CSA wykazują potencjalne właściwości chwastobójcze. Wpływ tych soli uzależniony był głównie od formy zabiegu, także od rodzaju związku, zastosowanego stężenia i co najważniejsze, również od gatunku rośliny. Uzyskane wyniki dobrze rokują co do dalszych badań mających na celu projektowanie substancji o podobnej budowie i właściwościach herbicydowych. Pomimo, iż prezentowane badania przeprowadziłem w ściśle kontrolowanych warunkach, a nie na polu, to uzyskane wyniki są interesujące w kontekście ich praktycznego zastosowania w agrochemii. Dlatego zostały poddane prawnej ochronie patentowej. Na dzień dzisiejszy uczestniczyłem w przygotowaniu 5 zgłoszeń dokonanych w Urzędzie Patentowym RP (II.C.1 – II.C.5, załącznik 4) i 4 zgłoszeniach dokonanych w Europejskim Urzędzie Patentowym (II.C.6. – II.C.9, załącznik 4). Czynione są starania, aby niektóre z tych zgłoszeń przekształcić w patenty. Koszty dokonanych zgłoszeń pokryte zostały z funduszy projektu: „Ochrona patentowa metod syntezy i biologicznej aktywności nowych soli oniwych, achiralnych i chiralnych cieczy jonowych, kompleksów układów węglowodanowych z jonami metali grup przejściowych oraz nanorurek węglowych funkcjonalizowanych podstawnikami ze stereogenicznym heteroatomem” realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, którego w latach 2014-2015 byłem kierownikiem.

## PODSUMOWANIE

W cyklu publikacji naukowych powiązanych tematycznie, który stanowi podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, przedstawiłem rezultaty swoich prac naukowych dotyczących określenia fitotoksyczności i stresu oksydacyjnego w siewkach jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej, poddanych oddziaływaniu czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych. Przeprowadzone badania dla szeregu związków tego typu wyraźnie wskazują na fakt, że możliwy jest dobór pod względem budowy chemicznej takich soli, które będą wykazywać jak najniższą toksyczność w stosunku do roślin. Stwarza to szanse na powszechne wykorzystanie takich CSA i ILs w przemyśle i rolnictwie z jednej strony, a z drugiej jest gwarancją uzyskania zadowalających plonów roślin uprawnych o wymaganej jakości, w przypadku przedostania się tych substancji do gleb. Wyniki badań własnych sugerują jednak uprawę na glebach zanieczyszczonych czwartorzędowymi solami amoniowymi, w tym cieczami jonowymi, roślin dwuliściennych, ponieważ zboża okazały się być roślinami o dużej wrażliwości na zastosowane sole. Należy również ograniczyć stosowanie w praktyce CSA i ILs z anionami zawierającymi atomy fluoru, ze względu na możliwość akumulacji jonów fluorkowych w glebie i roślinach.

Otrzymane rezultaty badań dotyczących oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych, w tym cieczy jonowych, na wzrost wczesnych stadiów rozwojowych jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej poparłem następnie pracami naukowymi, których celem było wskazanie powodu zaistniałych objawów fitotoksyczności u tych gatunków roślin. Określenie zmian poziomu MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chlorofili, karotenoidów oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy pozwoliło wskazać na stres oksydacyjny, jako bezpośrednią przyczynę inhibicji wzrostu badanych roślin na glebie z zawartością CSA i ILs.

Za najlepszy wskaźnik stresu oksydacyjnego należy uznać wzrost aktywności peroksydazy oraz spadek zawartości barwików asymilacyjnych w siewkach jęczmienia jarego i liściach rzodkiewki zwyczajnej. Obserwowany spadek poziomu chlorofilu to również bezpośredni powód obniżenia się wydajności tzw. produkcji pierwotnej, co znalazło odzwierciedlenie w inhibicji plonu obu roślin użytych w badaniach.

Wyniki badań dotyczących oceny wpływu czwartorzędowych soli amoniowych na wzrost trzech gatunków chwastów: żółtlicy drobnokwiatowej, komosy białej i szczawiu zwyczajnego w pełni dowodzą zasadności prowadzenia tego typu eksperymentów. Możliwość regulowania stwierdzonych właściwości chwastobójczych tych związków, poprzez modyfikację ich struktury chemicznej, wskazuje na fakt, że badane sole mogą stanowić potencjalną alternatywę dla obecnie stosowanych środków ochrony roślin.

*Przedstawione w tym rozdziale autoreferatu skróty, są tożsame z odpowiednimi skrótami zastosowanymi w pracach naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe wynikające z art. 15 ust. 2 ustawy*

## Literatura

- [1] E. Grabińska-Sota, Evaluation of impact of quaternary ammonium chlorides on water environment, Gliwice, 2004. (in Pol.).
- [2] J. Pernak, M. Śmiglak, S.T. Griffin, W.L. Hough, T.B. Wilson, A. Pernak, J. Zabielska-Matejuk, A. Fojutowski, K. Kitad, R.D. Rogers, *Green Chem.* 8 (2006) 798-806.
- [3] E. Obłąk, A. Gamian, *Post. Hig. Med. Dośw.* 64 (2010) 201-211.
- [4] A. Telesiński, M. Śnioszek, R. Biczak, B. Pawłowska, *Kosmos*, 65(4) (2016) 495-502.
- [5] J.S. Wilkes, *Green Chem.* 4 (2002) 73-80.
- [6] S. Keskin, D. Kayrak-Talay, U. Akman, Ö. Hortaçsu. *J. Supercrit. Fluids.* 4 (2007) 150-180.
- [7] T.P.T. Pham, Ch.-W. Cho, Y.-S. Yun, *Water Res.* 44 (2010) 352-372.
- [8] M. Cvjetko Bubalo, K. Radošević, I. Radojčić Redovniković, J. Halambek, V.G. Srček, *Ecotox. Environ. Saf.* 99 (2014) 1-12.
- [9] J.T. Polit, T. Praczyk, J. Pernak, Ł. Sobiech, E. Jakubiak, G. Skrzypczak, *Acta Physiol. Plant.* 36 (2014) 699-711.
- [10] O.A. Cojocar, J.L. Shamshina, G. Gurau, A. Syguda, T. Praczyk, J. Pernak, R.D. Rogers, *Green Chem.* 15 (2013) 2110-2120.
- [11] J. Pernak, A. Syguda, K. Materna, E. Janus, P. Kardasz, T. Praczyk, *Tetrahedron* 68 (2012) 4267-4273.
- [12] J. Pernak, M. Niemczak, K. Materna, K. Marcinkowska, T. Praczyk, *Tetrahedron* 69 (2013) 4665-4669.
- [13] R. Kordala-Markiewicz, H. Rodak, B. Markiewicz, F. Walkiewicz, A. Sznajdrowska, K. Materna, K. Marcinkowska, T. Praczyk, J. Pernak, *Tetrahedron* 70 (2014) 4784-4789.
- [14] J. Pernak, M. Niemczak, K. Zakrocka, T. Praczyk, *Tetrahedron* 69 (2013) 8132-8136.
- [15] S. Studzińska, T. Kowalkowski, B. Buszewski, *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 1542-1547.
- [16] M. Matzke, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, J. Filser, *Green Chem.* 10 (2008) 584-591.
- [17] P. Stepnowski, W. Mroziak, J. Nichthaus, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 511-516.
- [18] W. Mroziak, Ch. Jungnickel, M. Paszkiewicz, P. Stepnowski, *Water Air Soil Pollut.* 224 (2013) 1759-1765.
- [19] P. Stepnowski, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 189-193.
- [20] P. Bałczewski, B. Bachowska, T. Białas, R. Biczak, W.M. Wiczorek, A. Balińska, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 1881-1892.
- [21] M. Matzke, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, J. Filser, *Ecotoxicology*, 18 (2009) 197-203.
- [22] R. Biczak, B. Pawłowska, P. Bałczewski, B. Bachowska, B. Herman, *Ecol. Chem. Eng. A*, 20 (2013) 621-630.
- [23] R. Biczak, P. Bałczewski, B. Pawłowska, B. Bachowska, P. Rychter, *Ecol. Chem. Eng. S*, 2014, 21: 281-295.
- [24] S. Studzińska, B. Buszewski, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 983-990.
- [25] M. Cvjetko Bubalo, K. Hanousek, K. Radošević, V.G. Srček, T. Jakovljević, I. Radojčić Redovniković, *Ecotox. Environ. Saf.* 101 (2014) 116-123.
- [26] R. Biczak, B. Pawłowska, P. Bałczewski, P. Rychter, *J. Hazard. Mater.* 2014, (2014) 181-190.
- [27] T. Liu, J. Wang, J. Wang, L. Zhu, J. Zhang, X. Sun, X. Bull. *Environ. Contam. Toxicol.* 96 (2016) 544-549.

- [28] T. Liu, L. Zhu, H. Xie, J. Wang, J. Wang, F. Sun, F. Wang, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 3936-3945.
- [29] T. Liu, L. Zhu, J. Wang, J. Wang, H. Xie, *J. Hazard. Mater.* 285 (2015) 27-36.
- [30] H. Liu, S. Zhang, X. Hu, C. Chen, *Environ. Pollut.* 181 (2013) 242-249.
- [31] H. Liu, S. Zhang, X. Zhang, C. Chen, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 440-448.
- [32] OECD/OCDE 208 2006. Guidelines for the testing of chemical. Terrestrial plant: seedling test: seedling emergence and seedling growth test.
- [33] B.A. Schubert, A.H. Jahren, *Agric. Ecosyst. Environ.* 140 (2011) 174-181.
- [34] J. Dragišić Maksimović, J. Zhang, F. Zeng, B.D. Živanović, L. Shabala, M. Zhou, S. Shabala, *Plant Soil* 365 (2013) 141-155.
- [35] C. Arias-Baldrich, N. Bosch, D. Begines, A.B. Feria, J.A. Monreal, S. García-Mauriño, *J. Plant Physiol.* 183 (2015) 121-129.
- [36] T. De Diego, P. Lozzano, M.A. Abad, K. Steffensky, M. Vaultier, J.L. Iborra, *J. Biotechnol.* 140 (2009) 234-241.
- [37] Y. Xu, T. Li, Ch. Peng, H. Liu, *Ind. Eng. Chem. Res.* 54 (2015) 9038-9045.
- [38] J.-Q. Lai, Z.-L. Hu, P.-W. Wang, Z. Yang, *Fuel* 95 (2012) 329-333.
- [39] E.R. Christensen K.O. Kusk, N. Nyholm, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 826-835.
- [40] N. Chapman, A.J. Miller, K. Lindsey, W.R. Whalley, *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 701-710.
- [41] A. Telesiński, M. Śnioszek, *Bromat. Chem. Toksykol.* 4 (2009) 1148-1154.
- [42] M. Baunthiyal, A. Pandey, *Fluoride* 45 (2012) 78-85.
- [43] R. Jbir-Koubaa, S. Charfeddine, W. Ellouz, M.N. Saidi, R. Gargouri-Bouzid, O. Nouri-Ellouz, *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 120 (2015) 933-947.
- [44] C. Arias-Baldrich, N. Bosch, D. Begines, A.B. Feria, J.A. Monreal, S. García-Mauriño, *J. Plant Physiol.* 183 (2015) 121-129.
- [45] D. Di Baccio, A. Castagna, R. Tognetti, A. Ranieri, L. Sebastiani, *J. Plant Physiol.* 171 (2014) 1693-1705.
- [46] Y. Chen, F. Lin, H. Yang, L. Yue, F. Hu, J. Wang, Y. Luo, F. Cao, *Acta Physiol. Plant.* 36 (2014) 3173-3187.
- [47] R. Rosalie, J. Joas, Ch. Deytieux-Belleau, E. Vulcain, B. Payet, L. Dufossé, M. Léchaudel, *J. Plant Physiol.* 184 (2015) 68-78.
- [48] M. Rachoski, A. Gazquez, P. Calzadilla, R. Bezus, A. Rodriguez, O. Ruiz, A. Menendez, S. Maiale, *Acta Physiol. Plant.* 37 (2015) 117.
- [49] V. Demidchik, *Environ. Exp. Bot.* 109 (2015) 212-228.
- [50] Z. Gengmao, H. Yu, S. Xing, L. Shihui, S. Quanmei, W. Changhai, *Ind. Crops Prod.* 64 (2015) 175-181.
- [51] P.C.A.G. Pinto, A.D.F. Costa, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, *Chemosphere*, 82 (2011) 1620-1628.
- [52] L.-S. Wang, L. Wang, L. Wang, G. Wang, Z.-H. Li, J.-J. Wang, *Environ. Toxicol.* 24 (2009) 296-303.
- [53] T. Praczyk, G. Skrzypczak, *Herbicydy*, PWRiL, Warszawa, 2004.
- [54] J. Pernak, M. Niemczak, K. Materna, K. Żelechowski, K. Marcinkowska, T. Praczyk, *RSC Adv.* 6 (2016) 7330-7338.
- [55] W. Matuszkiewicz, *Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski*, PWN, Warszawa, 2006.
- [56] J. Aper, B. De Cauwer, S. De Roso, M. Lourenço, V. Fievez, R. Bulcke, D. Reheul, *Weed Res.* 54 (2014) 169-177.
- [57] B. De Cauwer, R. Devos, S. Claerhout, R. Bulcke, D. Reheul, *Weed Res.* 54 (2014) 38-47.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostałe kierunki mojej pracy badawczej wynikają z własnych zainteresowań naukowych, a także od samego początku wpisują się w tematykę badań naukowych prowadzonych w Zakładzie Biochemii, a obecnie Zakładzie Biochemii i Ekotoksykologii AJD w Częstochowie. Badania te koncentrują się głównie na określeniu reakcji roślin uprawnych na stosowanie związków wykazujących aktywność biologiczną oraz oddziaływaniu zabiegów agrotechnicznych (nawadnianie, nawożenie mineralne) na wielkość i jakość plonu tych roślin. Oprócz tych kierunków badań, mój dorobek naukowy obejmuje również prace dotyczące określenia fitotoksyczności i zmian biochemiczno-fizjologicznych w roślinach poddanych abiotycznym czynnikom stresu oksydacyjnego (zasolenie, ksenobiotyki). Jeszcze inną domeną

moich zainteresowań naukowych są prace z zakresu degradacji w warunkach naturalnych polimerowych materiałów biodegradowalnych. Stosunkowo szeroki zakres tematyczny publikacji i doniesień konferencyjnych wynika ze współpracy z naukowcami z innych jednostek nie tylko uczelni macierzystej, ale także innych ośrodków naukowych. Prezentowane w autoreferacie pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze podzieliłem na pięć głównych tematów badawczych:

1. Oddziaływanie związków chemicznych wykazujących aktywność biologiczną na skład chemiczny i aktywność wybranych enzymów w roślinach uprawnych
2. Wartość biologiczna i odżywcza plonu oraz zmiany biochemiczno-fizjologiczne w roślinach uprawnych pod wpływem nawadniania i nawożenia mineralnego NPKMg
3. Analiza objawów stresu solnego u roślin uprawnych
4. Badania nad degradacją materiałów polimerowych w glebach i kompoście oraz ich fitotoksycznością
5. Fitotoksyczność gleb zanieczyszczonych substancjami chemicznymi.

*(odnośniki do cytowanych w poniższym teście prac są zgodne z ich numeracją zawartą w Wykazie opublikowanych prac naukowych – załącznik 4)*

### **5.1. Oddziaływanie związków chemicznych wykazujących aktywność biologiczną na skład chemiczny i aktywność wybranych enzymów w roślinach uprawnych**

Środki ochrony roślin posiadają olbrzymie znaczenie w powiększaniu efektywności i jakości produkcji rolnej. Rocznie na całym świecie, stosuje się około 2,5 mln ton pestycydów, z czego około 50% stanowią środki chwastobójcze. Chociaż stosowanie w rolnictwie herbicydów przyczynia się do ochrony roślin użytkowych, czy pożądaných, to potencjalna ich obecność w żywności lub środowisku budzi wśród ludzi powszechny niepokój. Stwarza to zatem podstawy do prowadzenia badań naukowych nad nowymi grupami związków chemicznych, wykazujących aktywność biologiczną. Badania te, nie ograniczają się jedynie do stwierdzenia właściwości chwastobójczych nowych substancji chemicznych, ale również dotyczą aspektów naukowych, związanych z pobieraniem tych związków przez rośliny uprawne i ich oddziaływaniem na skład chemiczny roślin oraz aktywność enzymów roślinnych. W związku z powyższym, na początku swojej kariery naukowej aktywnie włączyłem się w badania naukowe prowadzone w ówczesnym Zakładzie Biochemii. Dotyczyły one określenia wpływu związków azaaromatycznych, takich jak: pochodne chinoksaliny, naftyrydiny i fenantroliny na skład chemiczny pora, selera naciowego i korzeniowego, pietruszki naciowej, sałaty masłowej i fasoli szparagowej. Wybór do badań tych substancji chemicznych wynikał z budowy chemicznej tych związków, opartej o pierścienie aromatyczne z atomami azotu, co warunkowało ich właściwości biologiczne. Podobną budowę chemiczną posiadają bowiem takie herbicydy jak: atrazyna, simazyna, dikwat czy parakwat.

Swoją działalność naukowo-badawczą rozpocząłem w 1991 roku, wraz z początkiem realizacji pracy magisterskiej pod kierunkiem dr hab. Eugeniusza Gurguła, kierownika Zakładu Biochemii, ówczesnej Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Częstochowie. Praca badawcza



dotyczyła tematu: „*Skład aminokwasowy w selerze pod wpływem pochodnych fenylohydrazynotetrazolo[2,1-c]chinoksaliny*”. W ramach tej pracy uczestniczyłem w prowadzeniu badań wazonowych w szklarni i laboratoryjnych, mających na celu określenie jakości białka zawartego w liściach selera naciowego, opryskanych tymi substancjami chemicznymi. Jakość białka selera określiłem m.in. na podstawie sumy aminokwasów egzogennych, wielkości zintegrowanego wskaźnika aminokwasów egzogennych ( $\Sigma AA_{\text{index}}$ ) oraz wartości współczynnika strawności –  $(Lys+Arg)/Pro$ . We wnioskach końcowych nie stwierdziłem większego wpływu badanych związków na zawartość aminokwasów i ich wzajemne korelacje w białku liści selera naciowego. Zebrany materiał roślinny posłużył także do określenia zmian zawartości chlorofilu *a* i *b*, chlorofilu całkowitego oraz poziomu cukrów ogółem i kwasu askorbinowego. Analiza otrzymanych wyników pokazała, że wszystkie badane pochodne chinoksaliny w niewielkim stopniu wpływały na skład chemiczny selera naciowego i pietruszki naciowej. W niższych stężeniach związki te zachowywały się jak potencjalne regulatory wzrostu roślin, ponieważ nie tylko nie zmniejszały plonu roślin, ale stymulowały również w tych roślinach wzrost zarówno poziomu barwników asymilacyjnych, jak i cukrów oraz witaminy C. Wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w roślinach również świadczyć może o ich wzmożonym metabolizmie, a tym samym o zwiększeniu zapotrzebowania na fosforany nieorganiczne. Rośliny na oprysk roztworami pochodnych chinoksaliny zareagowały również wzrostem aktywności katalazy i peroksydazy, co wskazuje na skuteczną obronę przed wolnymi rodnikami tlenowymi. Zebrane wyniki badań dobrze rokowały w kontekście wykorzystania przebadanych pochodnych chinoksalin w praktyce rolniczej. Omawiane badania realizowane były we współpracy z prof. Eberhardem Lippmannem z Uniwersytetu w Lipsku (Niemcy).

W tym samym okresie współuczestniczyłem również w badaniach naukowych mających na celu określenie wpływu benzo[h]naftyrydyn i ich pochodnych na zmiany biochemiczno-fizjologiczne w roślinach. Do podjęcia badań mających na celu ustalenie wpływu tych związków na skład chemiczny pora i selera naciowego, a także zmiany aktywności wybranych enzymów w liściach tych roślin, skłoniła nas informacja o stwierdzonej aktywności biologicznej tych związków, przejawiającej się szerokim spektrum działania na bakterie i grzyby. W przypadku tych substancji nie otrzymaliśmy jednak tak jednoznacznych wyników, jakie stwierdziliśmy po zastosowaniu w formie oprysku roślin pochodnych chinoksaliny. Wielkość i kierunek zmian zarówno aktywności badanych enzymów, jak i zawartości barwników asymilacyjnych, cukrów i kwasu askorbinowego, uzależnione były od gatunku rośliny, budowy chemicznej naftyrydyny oraz zastosowanego stężenia tych związków. Należy nadmienić, że pełny zakres omawianych prac badawczych dotyczących pochodnych benzo[h]naftyrydyn posłużył jako temat rozprawy doktorskiej pani dr inż. Barbary Herman, a wykorzystane związki zostały zsyntezowane w Katedrze Chemii Organicznej macierzystej uczelni habilitanta.

Wyjątkowo ciekawym związkiem azaaromatycznym do badań okazała się być 1,10-fenantrolina. Zaliczana jest ona do chelatorów metali typu pirydynowego (2,2'-dipirydyli, 8-hydroksychinolina), powodujących w ciemności akumulację fotodynamicznie aktywnych porfiryn (protoporfiryna IX, magnezoporfiryna IX, protochlorofilid). Substancje te po ekspozycji roślin na światło indukują produkcję reaktywnych form tlenu (RFT), co w konsekwencji może skutkować uszkodzeniem roślin. 1,10-Fenantrolina działa na rośliny jak

typowy herbicyd fotodynamiczny, który powoduje inhibicję oksydazy protoporfirynowej, obniżając tym samym natężenie procesu fotosyntezy, zwłaszcza u roślin dwuliściennych. W swoich badaniach, które kontynuowałem również po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, zastosowaliśmy różne stężenia roztworów fenantroliny, którymi opryskaliśmy liście sałaty rzymskiej, pora, selera korzeniowego i naciowego oraz fasoli szparagowej. Wszystkie badane rośliny zareagowały podobnie na zastosowany związek, m.in. obniżeniem się poziomu chlorofilu, co wyraźnie świadczy o uszkodzeniach fotosystemów. Najbardziej inhibitująco fenantrolina wpływała na poziom chlorofilu *a*, co znalazło swoje odzwierciedlenie w spadku wartości stosunku chlorofilu *a*/chlorofilu *b* w liściach selera naciowego. Zaobserwowana inhibicja poziomu chlorofilu znalazła przełożenie na stwierdzony spadek zawartości cukrów ogółem, które jak wiadomo są produkowane w roślinach w wyniku procesu fotosyntezy. Rośliny poddane działaniu roztworów fenantroliny cechowały się także obniżoną zawartością kwasu askorbinowego. Zaobserwowany w roślinach doświadczalnych wzrost zawartości karotenoidów wskazuje na wzmożoną produkcję RFT, ponieważ barwniki te zaliczane są do niskocząsteczkowych zmiataczy rodników tlenowych. O nadmiarze RTF we wszystkich roślinach opryskanych 1,10-fenantroliną świadczy również wyraźny wzrost aktywności peroksydazy, z reguły dodatnio skorelowany z zastosowanym stężeniem tej substancji. Wykazana ujemna korelacja pomiędzy wzrostem aktywności peroksydazy, a spadkiem zawartości chlorofilu całkowitego, dowodzi natomiast faktu, że za degradację chlorofilu w liściach roślin odpowiada również ten enzym antyoksydacyjny. Aktywność katalazy w tych samych warunkach prowadzenia badań wazonowych, ulegała obniżeniu nie tylko wraz z wiekiem roślin, ale również wskutek zwiększania stężenia fenantroliny w roztworach, które zastosowano do oprysku roślin uprawnych. Wszystkie otrzymane wyniki wyraźnie wskazują na fakt, że 1,10-fenantrolina wykazuje silne, inhibitujące działanie na wzrost i rozwój roślin uprawnych, wpływając tym samym na ich przedwczesne starzenie się. Może to jednocześnie świadczyć o wyraźnie totalnych właściwościach herbicydowych tej substancji. Z drugiej strony, nasze badania sugerują również ostrożność w stosowaniu 1,10-fenantroliny w praktyce, zwłaszcza w wysokich stężeniach, ponieważ powoduje ona niekorzystne zmiany w wartości odżywczej roślin uprawnych.

Oprócz wspomnianej już wcześniej mojej pracy magisterskiej, otrzymane wyniki prac badawczych zostały przedstawione w 10 publikacjach naukowych [II.A.4; II.A.5; II.A.6; II.A.7; II.A.10; II.B.2; II.B.9; II.B.14; II.B.39; II.B.45] oraz w 9 doniesieniach zaprezentowanych podczas konferencji naukowych [III.B.2; III.B.3; III.B.5; III.B.6; III.B.8; III.B.15; III.B.20; III.B.46; III.B.55].

## **5.2. Wartość odżywcza plonu oraz zmiany biochemiczno-fizjologiczne w roślinach uprawnych pod wpływem nawadniania i nawożenia mineralnego NPKMg**

Uzyskiwanie zakładanych plonów roślin uprawnych o wysokiej wartości odżywczej jest uzależnione od wielu czynników zewnętrznych, a do najważniejszych zaliczyć trzeba prawidłową agrotechnikę. Do zabiegów agrotechnicznych należą m.in.: uprawa roli, siew i sadzenie, nawożenie i nawadnianie. Nawożenie mineralne prowadzi się w celu zwiększania lub utrzymania w glebie optymalnego poziomu składników pokarmowych, głównie azotu,

fosforu, potasu, magnezu i wapnia), potrzebnych roślinom do prawidłowego wzrostu i rozwoju. Stosowanie nawozów ma również na celu poprawienie właściwości gleb, np. odczynu, zwiększenie możliwości sorpcyjnych, polepszenie struktury i właściwości biologicznych oraz zwiększenie pojemności wodnej. Nawadnianie ma natomiast na celu dostarczenie roślinom takiej ilości wody, która zapewni im odpowiednie warunki wegetacji. W ramach tej tematyki naukowej prowadziłem samodzielne eksperymenty lub uczestniczyłem w badaniach, których celem było określenie oddziaływania różnych poziomów nawożenia mineralnego NPKMg i nawadniania na wielkość i wartość odżywczą plonu roślin uprawnych oraz zmiany fizjologiczne w tych roślinach. Badaniem objęto kilka gatunków zbóż, roślin ogrodniczych, sadowniczych, motylkowych oraz warzyw.

Już na początku swojej kariery naukowej, oprócz prowadzenia doświadczeń do pracy magisterskiej, uczestniczyłem jednocześnie w badaniach dotyczących zagadnień związanych z oddziaływaniem nawożenia mineralnego NPK na zawartość azotu aminowego i skład aminokwasowy białka zawartego w liściach selera naciowego i pietruszki naciowej. Wzrost zasobności gleby w azot prowadził do wyraźnego zwiększenia się poziomu azotu aminowego w liściach obu roślin, natomiast nie stwierdzono statystycznie udowodnionych różnic w proporcjach ilościowych poszczególnych aminokwasów. Spostrzeżenie to miało istotne znaczenie praktyczne, dowodziło bowiem, że w uprawie selera naciowego i pietruszki naciowej możliwe jest stosowanie wysokich dawek azotu, warunkujących maksymalny plon bez ryzyka obniżenia wartości odżywczej tych warzyw. W świetle uzyskanych wyników stwierdziliśmy także, że wartość biologiczna białka selera i pietruszki była w niewielkim stopniu uzależniona od dawki potasu. Nawożenie mineralne fosforem wywarło natomiast wyraźnie korzystny wpływ na jakość białka tych roślin, co przejawiało się nie tylko wzrostem zawartości aminokwasów egzogennych, ale również podwyższeniem indeksu ( $\Sigma AA_{index}$ ). Materiał roślinny zebrany w trakcie opisywanych badań posłużył również do oznaczenia składu chemicznego liści pietruszki. Wzrost poziomu nawożenia mineralnego NPK prowadził do zwiększenia się poziomu chlorofilu całkowitego i cukrów ogółem, natomiast w przypadku witamy C najbardziej stymulującym okazało się być wprowadzenie do gleby fosforu i potasu. Powyższe badania były prowadzone we współpracy z prof. Eugeniuszem Kołotą z ówczesnej Akademii Rolniczej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu).

Zainteresowanie tematyką dotyczącą oddziaływania nawożenia mineralnego na wzrost i rozwój roślin skłoniły mnie do przeprowadzenia badań, których celem było określenie optymalnych dawek azotu, fosforu i potasu ze względu na plon pora i selera naciowego oraz ze względu na zawartość wybranych składników chemicznych decydujących o wartości biologicznej i odżywczej tych warzyw. Eksperyment wazonowy założony został w tunelu foliowym, a azot, fosfor i potas wprowadzono do gleby w postaci zarówno niezależnych nawożeń (osobno N, P i K), jak i łącznego nawożenia NPK. Fosfor i potas zastosowano jednokrotnie, przedwegetacyjnie, a azot w dwóch podzielonych dawkach ( $\frac{1}{2}$  przedwegetacyjnie i  $\frac{1}{2}$  pogłównie). Realizując założony cel badań oznaczyłem plon ogólny i handlowy, poziom chlorofilu całkowitego, suchej masy, cukrów rozpuszczalnych, kwasu askorbinowego, azotanów (III) i azotanów (V) oraz takich pierwiastków, jak: fosfor, potas, magnez i wapń. Dla porównania optymalnych poziomów nawożenia N, P, K i NPK ze względu na plon ogólny pora i selera naciowego z optymalnymi dawkami dla niektórych składników chemicznych w liściach

tych roślin, zastosowano funkcję wielomianową drugiego stopnia. Chcąc ponadto określić stopień ingerencji zastosowanego nawożenia mineralnego w procesy fizjologiczno-biochemiczne roślin doświadczalnych, w przeprowadzonych badaniach oznaczyłem zmiany aktywności peroksydazy, katalazy i fosfatazy kwaśnej. Otrzymane wyniki jednoznacznie dowiodły, że wyznaczone optymalne dawki nawożenia, ze względu na plon ogólny i handlowy warzyw z reguły nie pokrywały się z optymalnymi dawkami N, P, K i NPK ze względu na zawartość kwasu askorbinowego, cukrów rozpuszczalnych czy składników mineralnych. Optimum nawożenia mineralnego warzyw ze względu na plon nie gwarantowało najwyższej wartości odżywczej selera naciowego i pora. Przy uznanej np. za optymalną dawce azotu uzyskano rośliny selera intensywnie wybarwione, o zadowalającej zawartości witaminy C, a jednocześnie o obniżonym poziomie cukrów. Najwyższe poziomy nawożeń mineralnych prowadziły ponadto do zasolenia gleby, czego objawem był spadek poziomu chlorofilu całkowitego oraz duży wzrost aktywności peroksydazy i mniejszy katalazy. Te zaobserwowane objawy stresu oksydacyjnego u obu gatunków warzyw skutkowały ich przedwczesnym starzeniem się. Omawiane doświadczenia stanowiły podstawę mojej rozprawy doktorskiej pt. „*Wpływ nawożenia mineralnego NPK na plon aktywność enzymatyczną i skład chemiczny wybranych warzyw*”. Dysertację obroniłem w 1998 roku uzyskując stopień doktora nauk rolniczych w zakresie agronomii.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, w ramach opisywanej tematyki prac naukowych uczestniczyłem także w badaniach mających na celu określenie wpływu deficytu magnezu oraz wzrostu zasobności gleb w ten pierwiastek, na wzrost i skład chemiczny niektórych roślin uprawnych. Magnez jest bowiem niezbędnym pierwiastkiem dla prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin, co związane jest m.in. z jego udziałem w budowie chlorofilu, procesie fotosyntezy, biosyntezy białek, tłuszczów i metabolizmie węglowodanów. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziliśmy, że zarówno liście selera korzeniowego, jak i fasoli szparagowej, charakteryzowały się zwiększoną zawartością barwników asymilacyjnych, jeżeli rośliny były uprawiane na glebie ze zwiększoną zawartością magnezu. Nawożenie magnezem prowadziło ponadto do wzrostu poziomu białka w liściach obu roślin. Należy zwrócić uwagę na fakt, że bardzo wysokie dawki nawożenia magnezem nie były już tak efektywne. Stosunkowo poważnym problemem w dostępności i przyswajalności magnezu dla roślin jest wysoki poziom potasu w podłożu. Powszechnie wiadomo, że pomiędzy tymi dwoma pierwiastkami istnieje wyraźny antagonizm jonowy. W związku z powyższym, podjęliśmy się przeprowadzenia badań, w których przy wysokiej zasobności gleby w potas zastosowaliśmy trzy poziomy nawożenia magnezem. Otrzymaliśmy bardzo obiecujące wyniki, gdyż połączenie tych dwóch pierwiastków skutkowało zwiększeniem się poziomu barwników asymilacyjnych w liściach cebuli zwyczajnej i szczypiorku, co następnie przełożyło się na wzrost poziomu cukrów i witaminy C w tych roślinach. Nie stwierdziliśmy ponadto w roślinach żadnych objawów niedoboru któregośkolwiek z pierwiastków. Otrzymane wyniki posiadają aspekt praktyczny, dowiodły bowiem, że możliwym jest dobranie takich dawek K i Mg, które zniwelują antagonizm tych pierwiastków i pozwolą w przypadku uprawy cebuli zwyczajnej i szczypiorku na uzyskanie wysokich plonów o odpowiedniej wartości odżywczej.

Warunkiem uzyskania dużych i o dobrej jakości plonów jest odpowiednia ilość wody w podłożu w czasie wegetacji roślin uprawnych. Zasadniczym źródłem wody są opady

atmosferyczne, ale bardzo często istnieje także konieczność uzupełniania poziomu wody dostępnej dla roślin przy wykorzystaniu jak najbardziej energo- i wodooszczędnych systemów nawadniania.

Pierwszym etapem moich kontaktów z eksperymentami naukowymi dotyczącymi zagadnień związanych z nawadnianiem roślin uprawnych był współudział w badaniach polowych i laboratoryjnych, których celem było określenie nawożenia mineralnego NPK i deszczowania na wielkość plonu pszenicy jarej i pszenżyta jarego oraz aktywność wybranych procesów fizjologicznych. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdziliśmy ponad 100% wzrost plonu obu zbóż w wyniku zastosowanych zabiegów agrotechnicznych. Zaobserwowaliśmy ponadto wzrost zawartości chlorofilu i karotenoidów, zwiększenie się natężenia procesu fotosyntezy i transpiracji oraz przewodności dyfuzyjnej liści, a także wzrost aktywności enzymów oksydacyjno-redukcyjnych w liściu flagowym pszenicy i pszenżyta.

Woda w połączeniu z nawożeniem mineralnym, ma także szczególne znaczenie w uprawie roślin ogrodniczych i sadowniczych, ze względu na ich duże zapotrzebowanie na wodę, zwłaszcza w okresie wzrostu owoców. W ramach tych zagadnień uczestniczyłem w pracach naukowych dotyczących określenia plonowania brzoskwiń i wiśni oraz pomidorów gruntowych. O istotności prowadzonych badań naukowych może świadczyć bardzo duże znaczenie konsumpcyjne roślin ogrodniczych, zwłaszcza pomidorów. Zastosowanie nawożenia mineralnego i nawadniania w postaci tzw. mikronawadniania gwarantowało nie tylko wysokie plony owoców, ale również poprawiało ich jakość, znacznie redukując poziom azotanów (V). Dodatkowo stwierdziliśmy, że nawadniana gleba zawierała mniej azotanów (V), a więcej korzystnej dla roślin formy amonowej azotu. Podobne wyniki otrzymaliśmy wykorzystując nawożenie mineralne i nawadnianie podkoronowe sadów brzoskwiniowych. Uzyskano wysoki plon owoców brzoskwini, które były duże i kształtne, a jednocześnie charakteryzowały się niskim poziomem azotanów (V). Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że zastosowane nawadnianie podkoronowe wpłynęło na skład mineralny owoców podnosząc zawartość m.in. poziomu P, K i Zn. W przypadku uprawy pomidorów gruntowych wykorzystaliśmy dodatkowo nawadnianie kropkowe, co skutkowało wyraźnym zwiększeniem się plonu wczesnego, handlowego i ogólnego owoców. Zgodnie z założeniami, po zastosowaniu nawadniania stwierdziliśmy spadek zawartości azotanów (V) w owocach pomidorów oraz podobnie, jak w przypadku owoców brzoskwini, modyfikację ich składu mineralnego.

Nawadnianie i nawożenie mineralne, w zależności od warunków pluwiotermicznych, poprawia także znacznie plonowanie roślin motylkowych. Do takich wniosków doszliśmy w badaniach dotyczących oddziaływania tych zabiegów agrotechnicznych na wzrost łubinu wąskolistnego i grochu siewnego. Wzrost plonowania tych roślin był szczególnie widoczny po zastosowaniu nawadniania w latach o deficycie wód opadowych i wynikał ze wzrostu produkcji pierwotnej, na co miało przełożenie stwierdzone zwiększenie zawartości barwników asymilacyjnych.

Wzrost zapotrzebowania społeczeństw na wodę może prowadzić do coraz większego deficytu wody słodkiej. Powoduje to zatem konieczność poszukiwania alternatywnych źródeł wody, którą można by wykorzystać do nawadniania roślin uprawnych. W przypadku terenów nadmorskich, taką alternatywą może być woda zasolona. W przeprowadzonym doświadczeniu zastosowaliśmy wodę zasoloną do nawadniania w postaci deszczowania upraw cebuli

zwyczajnej, kapusty białej i buraka ćwikłowego. Uzyskane wyniki pokazały, że istnieje potencjalna możliwość stosowania wody zasolonej w uprawie tych roślin, ponieważ nie stwierdziliśmy obniżenia się wartości odżywczej tych warzyw. Jednak wielkość plonu była znacząco niższa, niż uzyskana z obiektów, na których zastosowano deszczowanie wodą słodką.

Omawiane badania, dotyczące nawadniania roślin uprawnych realizowane były we współpracy z pracownikami Zakładu Produkcji Roślinnej i Nawadniania, ówczesnej Akademii Rolniczej w Szczecinie (obecnie Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny). Należy tutaj wspomnieć Śp. prof. Irenę Zbieć, Śp. prof. Stanisława Karczmarczyka oraz wymienić prof. Zdzisława Koszańskiego i prof. Cezarego Podsiadło.

Wszystkie otrzymane wyniki prac badawczych opisanych w podrozdziale 5.2., oprócz wspomnianej już wcześniej mojej rozprawy doktorskiej, zostały przedstawione w 22 publikacjach naukowych [II.A.1; II.A.2; II.A.3; II.A.8; II.A.9; II.B.1; II.B.3; II.B.4; II.B.5; II.B.6; II.B.7; II.B.8; II.B.10; II.B.13; II.B.16; II.B.17; II.B.18; II.B.22; II.B.23; II.B.29; II.B.30; II.B.39] oraz w 17 doniesieniach zaprezentowanych podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych [III.B.1; III.B.4; III.B.7; III.B.9; III.B.10; III.B.11; III.B.12; III.B.13; III.B.14; III.B.18; III.B.24; III.B.31; III.B.33; III.B.34; III.B.42; III.B.43; III.B.52].

### **5.3. Analiza objawów stresu solnego u roślin uprawnych**

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora moje zainteresowania naukowe zwróciły się również ku zagadnieniom związanym z występowaniem stresu oksydacyjnego u roślin uprawnych, poddanych oddziaływaniu abiotycznych czynników stresowych. Jednym z najważniejszych czynników abiotycznych wywołujących stres oksydacyjny u roślin jest zasolenie podłoża. Zasolenie gleb jest bardzo ważnym czynnikiem ograniczającym wydajność produkcji rolnej, a tym samym wielkość plonu roślin uprawnych. Według szacunkowych danych, wysokie zasolenie obejmuje już około 20% gruntów nawadnianych i około 6% całkowitej, światowej powierzchni gruntów; powierzchnia ta ciągle wzrasta. Zasolenie zmniejsza wzrost roślin poprzez obniżenie potencjału wodnego, hamowanie działania enzymów, brak równowagi jonowej oraz zmianę akumulacji substancji rozpuszczonych, w tym składników odżywczych. Aklimatyzacja roślin do zasolonego podłoża wymaga kompleksowej i szybkiej korekty ich stanu fizjologicznego. Rośliny z reguły odpowiadają na stres solny regulacją potencjału osmotycznego poprzez zwiększanie stężenia  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  w tkankach, jednak obserwowana akumulacja tych jonów może powodować skutki toksyczne i uszkodzenia komórek roślinnych.

Flagowym objawem stresu solnego u roślin jest żółknięcie ich liści (chloroza), związana z zaburzeniem syntezy chlorofilu zaistniałej wskutek utrudnionego pobierania składników pokarmowych takich, jak azot, magnez czy żelazo. Skutkuje to przedwczesnym starzeniem się roślin. W efekcie następuje również zaburzenie i ograniczenie natężenia procesu fotosyntezy, co z kolei prowadzi do zaistnienia zjawiska nadmiaru energii wzbudzenia w chloroplastach. Jeżeli nadmiar energii nie zostanie rozproszony, to dochodzi do nadprodukcji RFT i w konsekwencji do uszkodzenia fotosystemu II (PSII). Dlatego w swoich badaniach naukowych, dotyczących reakcji roślin uprawnych na wzrastające zasolenie gleby dokonaliśmy

określenia zmian zawartości barwników asymilacyjnych, tj. chlorofilu i karotenoidów. Eksperyment wazonowy został przeprowadzony w warunkach szklarniowych, sadzonki selera korzeniowego, fasoli szparagowej i siewki owsa zostały podlane roztworami NaCl o wzrastającym stężeniu. W okresie wegetacji roślin kilkakrotnie pobieraliśmy materiał do badań, w którym określiliśmy zawartość barwników asymilacyjnych i białka ogółem. W liściach fasoli szparagowej stwierdziliśmy systematyczne obniżanie się poziomu chlorofilu i karotenoidów, a obserwowane zmiany były ściśle skorelowane ze wzrostem stężenia soli w glebie. W selerze naciowych spadek zawartości barwników asymilacyjnych zaobserwowano jedynie na obiektach, na których zastosowano najwyższe stężenia soli. W liściach obu roślin stwierdziliśmy ponadto, skorelowany ze stężeniem NaCl w glebie spadek zawartości białka, ale stopień zmian był wyraźnie niższy w przypadku selera naciowego. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że rośliną bardziej wrażliwą na zasolenie gleby jest fasola szparagowa. Takie wnioski znalazły potwierdzenie w badaniach, w których określiliśmy zmiany aktywności peroksydazy i katalazy, podstawowych enzymów antyoksydacyjnych, w liściach fasoli szparagowej i selera naciowego, uprawionych przy wzrastającym stężeniu soli w glebie. W obu roślinach stwierdziliśmy wzrost aktywności peroksydazy, który był skorelowany nie tylko z wiekiem roślin, ale przede wszystkim ze wzrostem koncentracji soli w podłożu. W siewkach owsa również zaobserwowaliśmy wzrost aktywności peroksydazy pod wpływem wzrastającego zasolenia gleby w całym okresie prowadzenia badań. W tych samych warunkach stwierdzono we wszystkich roślinach obniżenie się aktywności katalazy. Należy jednocześnie pamiętać, że obserwowana odporność roślin na zasolenie, uzależniona jest w dużym stopniu od stężenia soli. Powyżej pewnego poziomu zasolenia gleby wszystkie mechanizmy adaptacyjne przestają funkcjonować i dochodzi do obumarcia organizmu roślinnego.

Stosunkowo często opisywane jest w literaturze naukowej zjawisko antagonizmu jonowego w roślinach uprawianych w warunkach zasolenia podłoża. Wzrost stężenia  $\text{Na}^+$  w roztworze glebowym znacznie ogranicza pobieranie przez rośliny jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{K}^+$ , tym samym dochodzi do destabilizacji błon komórkowych. Zaistniała sytuacja negatywnie wpływa wiele procesów fizjologicznych, podział komórek, pierwotny i wtórny metabolizm oraz homeostazę składników pokarmowych. W związku z powyższym dokonaliśmy oceny oddziaływania wzrastającego poziomu zasolenia gleby, wskutek wprowadzania do niej roztworów NaCl lub  $\text{CaCl}_2$ , na skład chemiczny liści selera korzeniowego. W wyniku przeprowadzonych analiz laboratoryjnych nie stwierdziliśmy jednak praktycznie żadnych różnic w reakcji rośliny na zastosowane sole. Obie substancje prowadziły do wyraźnego obniżenia się zawartości barwników asymilacyjnych, a co za tym idzie również poziomu cukrów rozpuszczalnych. Jedynie poziom kwas askorbinowego w liściach selera, utrzymywał się na możliwie stałym poziomie po wprowadzeniu do gleby chlorku wapnia.

Prowadzenie prac naukowych dotyczących reakcji roślin uprawnych na zasolenie gleb, wydaje się być bardzo istotnym z punktu widzenia samej nauki, ale również może mieć znaczenie praktyczne. Wyniki badań pozwalają bowiem wybrać z wielu gatunków roślin uprawnych te, które posiadając wysoką tolerancję na zasolenie będą stosunkowo dobrze radzić sobie w warunkach stresu oksydacyjnego. W konsekwencji doprowadzi to do uzyskania pożądanej wielkości plonów o dobrej jakości odżywczej.

Wszystkie otrzymane wyniki prac badawczych opisanych w tym podrozdziale zostały przedstawione w 5 publikacjach naukowych [II.B.11; II.B.12; II.B.14; II.B.28; II.B.32] oraz w 4 doniesieniach zaprezentowanych podczas konferencji naukowych [III.B.16; III.B.17; III.B.19; III.B.22].

#### **5.4. Badania nad degradacją materiałów polimerowych w glebach i kompoście oraz ich fitotoksycznością**

Współpraca z prof. Markiem Kowalcukiem z Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze, którą rozpocząłem po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, skierowała moje zainteresowania naukowe w stronę przyjaznych dla środowiska materiałów polimerowych. Poszukiwanie takich materiałów związane jest z koniecznością stopniowego zastępowania istniejących niedegradowalnych tworzyw sztucznych materiałami ulegającymi biodegradacji. Na chwilę obecną globalne zużycie tworzyw sztucznych na świecie wynosi ponad 200 mln ton i wzrasta o około 5% rocznie. Tak dynamiczny wzrost produkcji tych tworzyw wynika z ich powszechnego i wielokierunkowego zastosowania, za czym przemawia trwałość i odporność plastików na działanie wielu czynników zewnętrznych. Wymienione cechy plastików decydują jednak z drugiej strony o fakcie, że tworzywa sztuczne stanowią jedne z najbardziej uciążliwych odpadów, stanowiących około 30% całkowitej objętości odpadów komunalnych. Z tego zaś 40% stanowią same materiały opakowaniowe.

Materiały biodegradowalne to z reguły polimery, które w wyniku działania enzymów wytwarzanych przez mikroorganizmy ulegają rozpadowi w warunkach tlenowych do H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> i biomasy. Do takich materiałów zaliczyć można polimery naturalne pochodzenia roślinnego i zwierzęcego (polisacharydy i białka), polimery wytwarzane przez mikroorganizmy – poli-3-hydroksymaślan (PHB), polimery, które powstają z naturalnych monomerów – polilaktyd (PLA) oraz polimery syntetyczne np. kaprolakton. Aby dany materiał biodegradowalny mógł być wprowadzony na rynek materiałów opakowaniowych, musi spełniać odpowiednie wymagania ekologiczne zawarte w Dyrektywie 94/62/EC, określającej możliwość poddania tych tworzyw klasycznym i organicznym (kompostowanie) formom recyklingu.

W ramach badań obejmujących ten aspekt moich zainteresowań naukowych, uczestniczyłem w pracach dotyczących degradacji wybranych syntetycznych poliestrów (PLA), aromatyczno-alifatycznego kopoliestru (BTA) o nazwie handlowej Ecoflex<sup>®</sup> oraz polihydroksymaślanu (a-PHB) w warunkach kompostowania przemysłowego, kompostu z dodatkiem osadów ściekowych, glebie i wodzie morskiej. Bezpośrednim zadaniem pracowników Zakładu Biochemii i Ekotoksykologii było prowadzenie biodegradacji tych polimerów w glebie, a dodatkowo określenie ewentualnej fitotoksyczności tej gleby dla siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Badania prowadzone były w warunkach kontrolowanej wilgotności gleby i temperatury otoczenia, a próbki do analiz pobierano w 1 i 4 miesiącu, po wprowadzeniu materiałów polimerowych do gleby. Po tym okresie inkubacji próbek w glebie, nie zaobserwowaliśmy praktycznie degradacji materiałów polimerowych. Jediną formą degradacji tych polimerów była degradacja hydrolityczna, ponieważ nie stwierdzono w glebie mikroorganizmów odpowiedzialnych za biodegradację enzymatyczną tych materiałów. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń nie stwierdziliśmy ponadto



niekorzystnego oddziaływania produktów degradacji polimerów na kiełkowanie nasion i wzrost roślin użytych w omawianym eksperymencie. Zgodnie z przewidywaniami warunki panujące podczas kompostowania przemysłowego (temp. 45 – 60 °C) stworzyły optymalne środowisko dla biodegradacji polimerów. Już po 2 tygodniach od umieszczenia próbek w kontenerach z kompostem zaobserwowano znaczną dezintegrację badanych materiałów polimerowych. W osobnym badaniu, przeprowadziliśmy również porównanie właściwości fizykochemicznych kompostu (pH, gęstości objętościowej, zawartości suchej masy, substancji organicznej, konduktancji), w którym monitorowano biodegradację polimerów z właściwościami kompostu kontrolnego. Nie stwierdziliśmy statystycznie udowodnionych różnic w wartościach wymienionych właściwości fizykochemicznych pomiędzy próbkami tych kompostów. Dla badanych kompostów przeprowadzono także test fitotoksyczności zgodnie z normą PN-EN 13432. W tym celu przygotowano podłoża z 25% i 50% objętościowym udziałem kompostów, na które wysiano ziarno jęczmienia jarego oraz nasiona rzodkiewki zwyczajnej i rzeżuchy ogrodowej. Rezultaty przeprowadzonego eksperymentu wazonowego nie wykazały toksycznego oddziaływania próbek kompostów na wzrost i rozwój tych gatunków roślin uprawnych. Kontynuując badania biodegradacji tworzyw przyjaznych środowisku, monitorowaliśmy także degradację w glebie blend zawierających BTA i PLA w stosunkach wagowych 90/10, 70/30 i 50/50. Próbkę do badań pobierane były po 1, 4, 10, 16 i 22 miesiącach od założenia doświadczenia. Wyraźny spadek masy cząsteczkowej tych materiałów polimerowych obserwowano począwszy od 10 miesiąca. Drugim ważnym odkryciem okazało się być stwierdzenie, że dodatek aromatyczno-alifatycznego kopoliestru (BTA) znacznie przyspiesza biodegradację polilaktydu (PLA). Ocena fitotoksyczności nie wykazała oddziaływania gleby po degradacji na siłę kiełkowania nasion i wzrost siewek owsa, rzodkiewki zwyczajnej i rzeżuchy ogrodowej. Rezultaty badań dowodzą, że badane materiały polimerowe oraz produkty ich degradacji obecne w glebie nie są toksyczne dla roślin. Opisywane badania były realizowane w ramach projektu "MARGEN" POIG.01.03.01-00-018/08-00, *New generation of packaging materials made from plastics subject to the organic recycling*, European Regional Development Fund in the Framework of the Innovative Economy, 2009-2012, w którym byłem wykonawcą.

We współpracy z Zakładem Mikrobiologii i Biotechnologii AJD w Częstochowie, określiliśmy także rodzaj i liczebność bakterii rozkładających a-PHB, BTA, i PLA, na podłożach zawierających te materiały polimerowe jako jedyne źródło węgla. Liczebność bakterii obecnych na podłożu zawierającym a-PHB była największa (jest to naturalny produkt metabolizmu mikroorganizmów), a wśród bakterii zdolnych do rozkładu polimerów dominowały Gram-dodatnie tlenowe laseczki przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus* i Gram-ujemne pałeczki należące do *Pseudomonadaceae*.

Niektóre wyniki omawianych prac badawczych posłużyły jako temat rozprawy doktorskiej dr Piotra Rychtera, a także zostały przedstawione w 5 publikacjach naukowych [II.B.20; II.B.21; II.B.25; II.B.27; II.B.31] oraz w 13 doniesieniach zaprezentowanych podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych [III.B.21; III.B.23; III.B.25; III.B.26; III.B.27; III.B.28; III.B.30; III.B.32; III.B.35; III.B.37; III.B.39; III.B.40; III.B.45].

## 5.5. Fitotoksyczność gleb zanieczyszczonych substancjami chemicznymi

Ostatnim obszarem moich zainteresowań badawczych jest problematyka związana z toksycznym oddziaływaniem gleb skażonych substancjami chemicznymi na wzrost i rozwój roślin uprawnych. Istotność tych zagadnień powoduje, że stanowią one kolejny, bardzo ważny obszar mojej działalności naukowej, którym zajmuję się od ponad 10 lat. Niejako zwieńczeniem przeprowadzanych badań naukowych było przygotowanie osiągnięcia naukowego zgodnie z *art. 16 ust. 2 ustawy*. W swojej karierze naukowej przebadłem szereg związków chemicznych, których wybór związany był z ich wykorzystaniem m.in. w syntezie chemicznej, przemyśle, agrochemii oraz innych działach gospodarki. Powszechność wykorzystania tych substancji stwarza zamierzoną lub niezamierzoną możliwość skażenia nimi gleb, co z kolei może wpłynąć na wzrost roślin. Na łamach niniejszego rozdziału autoreferatu przedstawiam jedynie najważniejsze z moich osiągnięć naukowych, dotyczących badania fitotoksyczności zanieczyszczonych gleb związkami chemicznymi.

Pierwszą grupą substancji chemicznych, którymi zająłem się w ramach prezentowanych badań były pochodne furanowe kwasu aminofosfoniowego. Związki te należą do grupy substancji fosforoorganicznych, wykazujących określoną aktywność biologiczną, będąc np. inhibitorami niektórych enzymów. Ich budowa chemiczna jest podobna do komercyjnych pestycydów fosforoorganicznych, które jako inhibitory cholinesteraz, enzymów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie układu nerwowego, prowadzą do paraliżu mięśniowego. Analiza wyników naszych badań pokazała, że furanowe pochodne kwasu aminofosfoniowego po dostaniu się do gleby, wykazują wyraźną fitotoksyczność, a wielkość niekorzystnego oddziaływania uzależniona była nie tylko od ilości związku w glebie, ale również związana była z odpornością gatunkową roślin. Większość przebadanych pochodnych kwasu aminofosfoniowego była bardziej toksyczna dla rośliny dwuliściennej, niż dla zboża. Wynikiem, stosunkowo dobrze rokującym w kontekście ewentualnego wykorzystania tych substancji w rolnictwie, była stwierdzona możliwość ograniczenia, bądź zwiększenia toksyczności tych związków poprzez zmianę ich budowy chemicznej. Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z dr hab. Jarosławem Lewkowskim z Uniwersytetu Łódzkiego.

Kolejną grupą analizowanych ksenobiotyków zawierających w cząsteczce atom fosforu, były czwartorzędowe sole fosfoniowe. Posiadanie przez te związki cech charakterystycznych dla cieczy jonowych powoduje, że mogą one być z powodzeniem wykorzystane w przemyśle chemicznym, katalizie, ekstrakcji, elektrochemii oraz do produkcji środków ochrony roślin. Przeprowadzone badania fitotoksyczności czwartorzędowych soli fosfoniowych miały głównie na celu uzyskanie odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu na wielość oddziaływania tych związków na wzrost i rozwój siewek jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej wpływa długość podstawnika przy kationie tych soli. Okazało się, że wielkość fitotoksyczności można z powodzeniem regulować właśnie ilością atomów węgla w podstawniku, przy czym w przypadku oddziaływania na rośliny wzrost toksyczności obserwuje się do 4 – 5 atomów węgla. Dalsze wydłużanie podstawnika nie jest już tak efektywne, w przeciwieństwie do obserwowanego oddziaływania soli fosfoniowych na mikroorganizmy.

Jednym z ciekawszych związków chemicznych, który miałem okazję przebadać był bisfenol A (BTA, dian), używany w dużych ilościach do produkcji tworzyw sztucznych takich,

jak poliwęglany i żywice epoksydowe, znajdujące zastosowanie w produkcji m.in. opakowań do żywności, w tym butelek dla małych dzieci. Badania nad toksycznością bisfenolu A dla ludzi wykazały oddziaływanie kancerogenne BTA, powodowanie zmian hormonalnych wywołujących otyłość czy spadek płodności. Spowodowało to, pomimo protestu producentów bisfenolu A, wydanie w państwach Unii Europejskiej całkowitego zakazu stosowania BTA przy produkcji butelek dla niemowląt, już w 2011 roku. W swoich badaniach dowiedliśmy, że bisfenol A jest substancją toksyczną również dla lądowych roślin wyższych, a jego przedostanie się do gleb na pewno wpłynie na rozwój roślin uprawnych czy pożądaných przez człowieka.

Kolejną substancją chemiczną, której poświęciłem sporo czasu i pracy w laboratorium jest kwas 2,2'-tiodioctowy. Ta siarkowa pochodna kwasu octowego jest wykorzystywana w chemii do wiązania koordynacyjnego wielu metali. Budowa chemiczna tego kwasu pozwala na jednoczesne dołączenie dwóch kationów nieorganicznych lub organicznych, co skutkuje otrzymaniem struktur podobnych w budowie do glifosatu. Przeprowadzone badania wykazały właściwości fitotoksyczne tego kwasu po wprowadzeniu go do gleby, w stosunku do jęczmienia jarego i rzodkiewki zwyczajnej. Ponadto zastosowanie roztworów kwasu 2,2'-tiodioctowego w formie oprysku liści 4 gatunków chwastów: szczaw zwyczajny, chwastnica jednostronna, żóltlica drobnokwiatowa i komosa biała doprowadziło do znacznych uszkodzeń, zaobserwowanych u niektórych gatunków tych roślin. Najsilniejsze oddziaływanie chwastobójcze stwierdzono odnośnie szczawiu zwyczajnego i żóltlicy drobnokwiatowej, podczas, gdy pozostałe gatunki chwastów były zupełnie odporne na badany związek chemiczny. Uzyskane wyniki badań spowodowały, że sole kwasu 2,2'-tiodioctowego stały się jednym z związków, których synteza i badanie ich ekotoksyczności są głównymi zadaniami projektu: „Projektowanie nowych chiralnych i achiralnych czwartorzędowych soli heteroniowych o założonych właściwościach herbicydowych oraz badanie ich eko(fito)toksyczności”, numer umowy: UMO-2013/09/B/ST5/03541, realizowanego w latach 2014-2017 w ramach konkursu NCN OPUS 5. W projekcie tym, jako imienny wykonawca, odpowiedzialny jestem za prowadzenie prac badawczych z zakresu fitotoksyczności oraz określenia ekotoksycznych oddziaływań nowo syntezowanych związków w stosunku do bakterii luminescencyjnych – *Vibrio fischeri* (Microtox<sup>®</sup>) oraz skorupiaków *Heterocypris incongruens* (małżoraczki), przy wykorzystaniu testu Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup>. Zarówno realizacja projektu, jak i opisane badania naukowe są prowadzone we współpracy z prof. Piotrem Bałczewskim z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi.

Wyniki omawianych badań naukowych zostały przedstawione w 7 publikacjach [II.B.24; II.B.35; II.B.36; II.B.37; II.B.38; II.B.41; B.II.42] oraz w 14 doniesieniach zaprezentowanych podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych [III.B.36; III.B.48; III.B.49; III.B.50; III.B.51; III.B.53; III.B.56; III.B.57; III.B.58; III.B.59; III.B.61; III.B.62; III.B.65; III.B.69].

## 6. Podsumowanie ilościowe dotychczasowego dorobku publikacyjnego

Na mój całkowity dorobek naukowy składa się **168** prac, w których jestem autorem lub współautorem. Liczba ta obejmuje:

- **72** oryginalne prace twórcze. Znaczna ich część została opublikowana w języku angielskim, z czego **19** publikacji naukowych znajduje się w czasopismach z bazy Journal Citation Reports (JCR)
- **87** streszczeń opublikowanych w materiałach konferencyjnych
- **9** zgłoszeń patentowych z czego **4** dokonane w Europejskim Urzędzie Patentowym

Z ogólnej liczby 168 prac, przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora opublikowałem **10** oryginalnych prac twórczych i **10** streszczeń w materiałach konferencyjnych

Na chwilę obecną do czasopism znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) wysłałem **4** oryginalne prace twórcze, nie ujęte w tym wykazie.

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WoS): **158; 116** bez autocytowań

Index Hirscha według bazy Web of Science (WoS): **6**

### *Sumaryczne zestawienie punktów uzyskanych za publikacje naukowe po uzyskaniu stopnia doktora*

Liczba punktów		
IF (wg roku opublikowania)	Liczba punktów (wg roku opublikowania)	Liczba punktów (wg listy) MNiSzW z dn. 9.12.2016
<b>42,947</b>	<b>701</b>	<b>977</b>

Mój dorobek naukowy niewliczający się do osiągnięcia naukowego, stanowiącego cykl publikacji powiązanych tematycznie, wynosi **497** pkt (wg roku opublikowania) i **773** pkt (wg listy MNiSzW z dn. 9.12.2016), sumaryczna wartość współczynnika IF **24,949**. Dotyczy to prac wykonanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.

### *Wykaz czasopism naukowych, w których zostały opublikowane prace po uzyskaniu stopnia doktora*

Tytuł czasopisma	Liczba artykułów	IF (wg roku opublikowania)	Liczba punktów (wg roku opublikowania)	Liczba punktów (wg listy MNiSzW z dn. 9.12.2016)
<i>Journal of Hazardous Materials</i>	2	9,167	90	90
<i>Chemosphere</i>	2	7,396	70	70

<i>Journal Agriculture and Food Chemistry</i>	2	5,633	64	80
<i>Biomacromolecules</i>	1	3,664	24	45
<i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>	1	3,130	30	30
<i>Plant Physiology and Biochemistry</i>	1	2,928	35	35
<i>Environmental Science and Pollution Research</i>	1	2,828	30	30
<i>Environmental Toxicology and Chemistry</i>	1	2,763	30	30
<i>Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology</i>	1	1,191	20	20
<i>Polimery</i>	1	0,990	15	15
<i>Ecological Chemistry and Engineering S</i>	2	0,934	30	30
<i>Environment Protection Engineering</i>	1	0,652	15	15
<i>Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements</i>	1	0,610	15	15
<i>Biologia Plantarum</i>	1	0,553	11	25
<i>Polish Journal of Environmental Studies</i>	1	0,508	15	15
<i>Chemia i Inżynieria Ekologiczna</i>	6		24	90
<i>Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, seria Agricultura</i>	6		6	60
<i>Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych</i>	4		32	52
<i>Proceedings of ECOpole</i>	9		50	81
<i>Chemistry. Environmental. Biotechnology</i>	4		15	20
<i>Inżynieria Rolnicza</i>	2		8	20
<i>Folia Horticulturae</i>	2		8	28
<i>Ecological Chemistry and Engineering A</i>	2		14	22
<i>Inżynieria i Ochrona Środowiska</i>	2		13	18
<i>Journal of Ecological Engineering</i>	1		12	12
<i>Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica</i>	1		10	10
<i>Kosmos</i>	1		12	12

<i>Prace Naukowe Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie. Technika, Informatyka, Inżynieria Bezpieczeństwa</i>	1		3	7
<i>Biuletyn Naukowy UMW w Olsztynie</i>	1			
<i>Annals of the Polish Chemical Society</i>	1			
<b>Łącznie</b>	<b>62</b>	<b>42,947</b>	<b>701</b>	<b>977</b>

