

Synteza i charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek srebra oraz ocena ich toksyczności w stosunku do grzybów z gatunku *Fusarium culmorum* izolowanych z pszenicy ozimej

¹Katarzyna Wolny-Koładka, ²Dagmara Malina, ²Agnieszka Sobczak-Kupiec, ²Zbigniew Wzorek

¹Katedra Mikrobiologii – Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków, Polska

²Katedra Technologii Nieorganicznej i Biotechnologii Środowiska, Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej – Politechnika Krakowska
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków, Polska

Abstrakt. Poszukując alternatywy dla toksycznych środków ochrony roślin, podjęto badania mające na celu ocenę przydatności nanocząstek srebra syntetyzowanych na drodze redukcji chemicznej do zwalczania grzybów z gatunku *Fusarium culmorum*. Do badań prowadzonych na terenie województwa małopolskiego pobrano 218 kłosów pszenicy ozimej z objawami fuzariozy. Kłosa po odkażeniu wykładano na podłoże PDA (agar glukozowo-ziemniaczany) i inkubowano w 24°C przez 7 dni. Fragmenty wyrosniętej grzybni przeszczepiano na kolejne szalki Petriego z podłożem PDA w celu izolacji czystych szczepów. Zgromadzono 79 szczepów należących do gatunku *Fusarium culmorum*. Synteza nanocząstek srebra (Ag_{nano}) przebiegała na drodze redukcji chemicznej z zastosowaniem wybranego stabilizatora. Przeprowadzono badania spektroskopowe w zakresie UV-Vis oraz oceniono morfologię nanocząstek przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Wpływ nanocząstek srebra na wzrost szczepów *Fusarium culmorum* badano dodając w odpowiednich proporcjach Ag_{nano} do pożywki, a następnie zaszczipiając na niej 5 mm fragmenty grzybni, kontrolę stanowiło podłoże bez dodatku nanostruktur. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono grzybobójcze działanie testowanych nanocząstek srebra. Za minimalne stężenie hamujące wzrost szczepów *Fusarium culmorum* uznano 60 ppm.

słowa kluczowe: nanocząstki srebra, *Fusarium culmorum*, pszenica ozima, toksyczność

WSTĘP

Grzyby z rodzaju *Fusarium* powszechnie występują w przyrodzie, a ich głównym rezerwuarem jest gleba. Zasadlają zarówno podziemne, jak i nadziemne części roślin, powodując różne ich choroby, tj. zgorzel siewek

oraz łodyg, więdnienie oraz zgniliznę organów roślinnych i plamistość liści. Występujące na terenie Polski grzyby z rodzaju *Fusarium* porażają wiele ważnych gospodarczo roślin zbożowych i okopowych. Dodatkowo, są producentami mykotoksyn, m.in. trichotecenów, zearalenonu oraz fuzaryny C (Chełkowski, 1985; Ławecki, Korbas, 2002; Suchorzyńska, Misiewicz, 2009).

Od lat w rolnictwie stosuje się różnego rodzaju środki ochrony roślin mające na celu zmniejszenie porażenia upraw zbóż przez fuzariozę kłosa. Niestety, wiele fungicydów jest mało efektywnych w eliminowaniu grzybów z rodzaju *Fusarium* (Jones, 2000; Milus, Parsons, 1994). Dodatkowo, należy pamiętać, iż użycie fungicydów nie zawsze zapobiega skażeniu ziarna przez mykotoksyny (Simpson i in., 2001). W związku z tym nieustannie poszukuje się innych metod walki z tymi patogenami, chociażby poprzez wprowadzanie odmian opornych na fuzariozę kłosa (Bai, Shaner, 1994; Miedaner, 1997; Mesterhazy, 2002). Inną i niezwykle ciekawą możliwością jest stosowanie alternatywnych środków ochrony roślin opartych o nanostruktury (Sobczak-Kupiec i in., 2012). W literaturze dostępnych jest wiele doniesień na temat możliwości wykorzystania nanocząstek srebra w ochronie roślin przed chorobami powodowanymi przez grzyby (Sharon i in., 2010). Wysoka aktywność fungistatyczna została wykazana w stosunku do takich patogenów, jak *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* (Min i in., 2009) lub *Fusarium culmorum* (Kasprowicz i in., 2010). Podobne działanie nanosrebra wykryto również w stosunku do *Golovinomyces cichoracearum* i *Sphaerotheca fusca*, sprawców mączniaka prawdziwego dyniowatych (Lamsal i in., 2011) oraz *F. oxysporum*, *F. culmorum* i *Rhizoctonia solani* (Sobczak-Kupiec i in., 2012). Jednocześnie, ciągle zwraca się uwagę na fakt, iż dane obejmujące wpływ nanocząstek na grzyby są niewystarczające (Navarro i in., 2008).

Dlatego w obliczu ciągle narastającego zjawiska nabywania oporności przez mikroorganizmy na stosowane w rolnictwie środki ochrony roślin podjęto badania mają-

Autor do kontaktu:

Katarzyna Wolny-Koładka
e-mail: k.wolny@ur.krakow.pl
tel. +48 12 662 40 96

Praca wpłynęła do redakcji 18 maja 2013 r.

ce na celu zweryfikowanie tezy o grzybobójczym działaniu nanocząstek srebra. Celem pracy była synteza i analiza fizykochemiczna nanocząstek srebra otrzymanych na drodze redukcji chemicznej oraz ocena ich toksyczności w stosunku do kultur grzybów z gatunku *F. culmorum* izolowanych z pszenicy.

MATERIAŁ I METODY

Kłosa pszenicy ozimej pobrano losowo z 218 pól (1 pole – 1 kłos) znajdujących się na obszarze województwa małopolskiego w powiatach: gorlickim (30), nowotarskim (38), wielickim (42), oświęcimskim (41), olkuskim (33), dąbrowskim (34). Do badań pobierano kłosa z objawami chorobowymi bezpośrednio do jałowych woreczków i transportowano do laboratorium celem przeprowadzenia izolacji *Fusarium* spp.

Kłosa pszenicy ozimej w całości odkażano powierzchniowo z użyciem 1% roztworu podchlorynu sodu, a następnie płukano w wodzie destylowanej. Tak przygotowane próbki wykładano na podłoże PDA (agar glukozowo-ziemniaczany) i inkubowano w 24°C przez 7 dni. Fragmenty wyrosniętej grzybni przeszczepiano na kolejne szalki Petriego z podłożem PDA w celu izolacji czystych szczepów (Kowalska, 2011).

Szczepy grzybów wyizolowane z porażonych kłosów zidentyfikowano w oparciu o klucze diagnostyczne (Biłaj, 1977; Domsch i in., 1980; Gilman, 1971; Kwaśna i in., 1991; Macura, 2008; Marcinowska, 2003). Izolaty zidentyfikowane jako *F. culmorum* przeszczepiono i poddano dalszym analizom.

Analizy mikrobiologiczne wykonywano w sezonie wegetacyjnym przypadającym w roku 2012 (maj – lipiec). Równolegle prowadzono syntezę i analizę podstawowych właściwości fizykochemicznych nanocząstek srebra, którymi działano na izolaty *F. culmorum*.

W celu otrzymania zawiesiny nanocząstek zastosowano metodę chemiczną, polegającą na redukcji soli będącej źródłem jonów metalu przez czynnik redukujący, w obecności odpowiedniego stabilizatora zapobiegającego łączeniu się cząstek w większe agregaty. Zastosowano metodę proponowaną przez Sabatini i in. (2007), jednakże z licznymi modyfikacjami – zmieniono środowisko reakcji z alkoholowego na wodne, stosunki molowe reagentów oraz warunki prowadzenia reakcji. W celu uzyskania 200 cm³ zawiesiny nanocząstek srebra o stężeniu 500 ppm do 190 cm³ 3% roztworu wodnego poliwinylpirolidonu (Acros Organics, m.cz. = 8000) dodano 0,1575 g AgNO₃ (POCH S.A., CZDA) w warunkach ciągłego mieszania na mieszadle magnetycznym z prędkością 500 obrotów na minutę (roztwór A, bezbarwny). Następnie 0,0035 g NaBH₄ (POCH S.A., CZDA) rozpuszczono w 10 cm³ 3% roztworu wodnego poliwinylpirolidonu (roztwór B, bezbarwny). Stosunek molowy soli srebra do reduktora wyniósł 10. Po całkowitym rozpuszczeniu soli srebra, roztwór B dodawano kroplami (1 kropla/s) do roztworu A – po dodaniu

kilku kropel roztworu reduktora bezbarwny roztwór nagle stał się herbaciany z pomarańczową poświatą, co świadczy o redukcji jonów metalu i utworzeniu nanocząstek. Po dodaniu całego roztworu B, otrzymany roztwór koloidalny mieszano jeszcze przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Uzyskane nanocząstki przechowywano w temperaturze 4°C. Obecność nanocząstek w uzyskanych zawiesinach potwierdzano wykorzystując instrumentalną metodę spektroskopii absorpcyjnej UV-Vis w zakresie długości fali 330–700 nm w temperaturze pokojowej z zastosowaniem spektrofotometru Marcel Media. Ocenę stopnia dyspersji, średniego rozmiaru cząstek w zawiesinie, a także analizę rozkładu wielkości przeprowadzono przy użyciu analizatora Zetasizer Nano-ZS firmy Malvern Instruments. Kuwetę o długości drogi optycznej 10 mm zawierającą koloidalny roztwór nanocząstek srebra umieszczono w celi aparatu, a następnie po osiągnięciu temperatury 25°C wykonano 3 pomiary. Morfologię uzyskanych nanostruktur oraz skład pierwiastkowy nanokoloidu badano z zastosowaniem skaningowego mikroskopu elektronowego z emitерem polowym (FEG) JSM-7500F marki JEOL z mikroanalizatorem elektronów odbitych firmy Oxford Instruments. Kroplę badanego koloidu nanoszono na holter miedziowo-cynkowy, następnie próbkę suszono na wolnym powietrzu i napyłono chromem w celu eliminacji gromadzenia się na powierzchni próbki ładunków powierzchniowych, które utrudniają obserwację. Tak uzyskany materiał poddano obserwacji mikroskopowej przy stosowaniu różnych powiększeń (od 20 000 do 100 000) oraz badaniu składu pierwiastkowego.

Stężenia Ag_{nano} w pożywce dobrano w oparciu o publikację Kasprzowicza i in. (2010): 0, 5, 7, 10, 30, 50, 60, 80, 100, 120 ppm.

Do podłoża (agar brzezczkowy) dodawano w odpowiednich proporcjach roztwór nanocząstek srebra w celu uzyskania zakładanego stężenia, a następnie na zestalone podłoże wykładano fragmenty grzybni o średnicy 5 mm, podłoże kontrolne stanowił agar brzezczkowy bez dodatku nanocząstek. Tak przygotowane hodowle inkubowano przez okres 7 dni w temperaturze 24°C. Po tym czasie dokonano pomiaru wzrostu badanych szczepów. Doświadczenie przeprowadzono w trzech powtórzeniach, testom poddano wszystkie zgromadzone szczepy z gatunku *F. culmorum*.

Przeprowadzono analizę statystyczną, mającą na celu ocenę korelacji pomiędzy stężeniem nanocząstek srebra w podłożu hodowlanym a wzrostem grzybni *F. culmorum*. Wykonano także analizę wariancji (ANOVA) oraz obliczono wartość średnią przyrostu grzybni. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu Statistica v. 10 (StatSoft).

WYNIKI I DYSKUSJA

Z 218 kłosów pszenicy wyizolowano 157 szczepów należących do rodzaju *Fusarium*. Częstość izolacji *Fusarium* spp. z porażonych kłosów wyznaczono na poziomie 72%.

Tabela 1. Zróżnicowanie wzrostu *F. culmorum* pod wpływem testowanych stężeń nanocząstek srebra
 Table 1. Growth differentiation *F. culmorum* under the influence of silver nanoparticle concentrations tested.

Gatunek Species	Liczba szczepów Number of strains	Średni przyrost grzybni [cm] pod wpływem różnych stężeń Ag _{nano} [ppm] Average growth of mycelium [cm] under different concentrations of Ag _{nano} [ppm]					Współczynnik korelacji (p<0,05) The correlation coefficient (p<0.05)
		0 (K)	60	80	100	120	
		<i>F. culmorum</i>	79	6,496667	5,166667	3,596667	

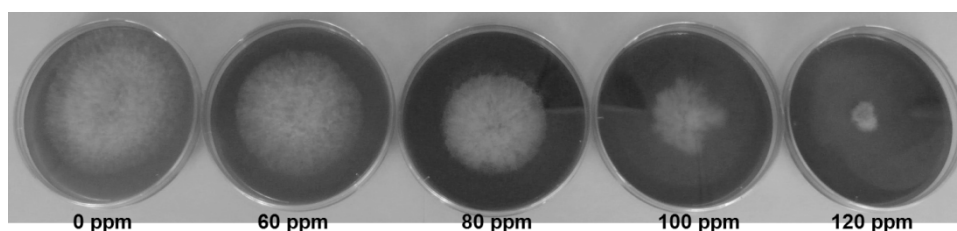
Po przeprowadzeniu identyfikacji gatunkowej stwierdzono, iż w puli 157 izolatów 79 należy do gatunku *F. culmorum* (50%). Zgromadzone szczepy *F. culmorum* poddano działaniu nanosrebra, uzyskane wyniki zaprezentowano w tabeli 1.

Analiza statystyczna zależności średniego przyrostu grzybni od stężenia nanocząstek w podłożu hodowlanym potwierdziła prawie pełną ujemną korelację pomiędzy tymi dwiema wartościami (tab. 1). Analiza ANOVA wykazała, iż wpływ wszystkich testowanych stężeń nanosrebra na grzyby był istotny statystycznie (p<0,05).

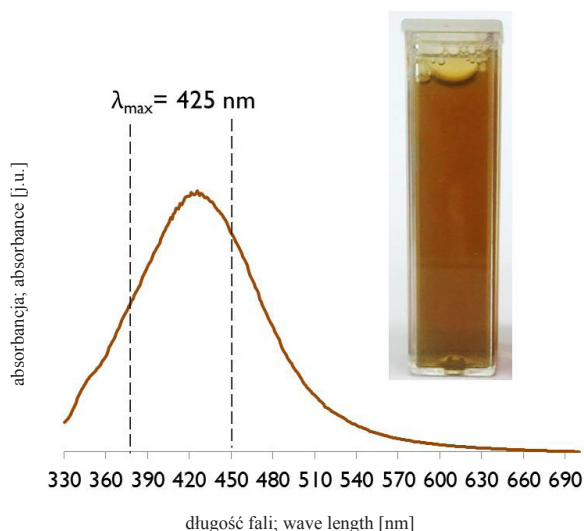
W wyniku prowadzonych doświadczeń zaobserwowano zahamowanie wzrostu grzybów powodowane obecnością nanosrebra. Stwierdzono, iż dodatek 60 ppm roztworu koloidalnego Ag_{nano} wpływał na spowolnienie wzrostu grzybni (ryc. 1).

W światowej literaturze dostępnych jest wiele informacji o bakteriobójczym i grzybobójczym działaniu nanostruktur metali (Egger i in., 2009; Falkiewicz-Dulik, Macura, 2008; Kasprowicz i in., 2010; Kim i in., 2008; Sobczak-Kupiec i in., 2012; Wzorek, Konopka, 2007). Dlatego właśnie postanowiono zweryfikować powyższe doniesienia w odniesieniu do szczepów z gatunku *F. culmorum* izolowanych z kłosów pszenicy rosnącej na terenie Małopolski. W efekcie przeprowadzonych doświadczeń laboratoryjnych stwierdzono, iż dopiero stężenie nanosrebra wynoszące 60 ppm hamuje wzrost grzybni. Dodatek 120 ppm do podłoża powodował całkowite zahamowanie wzrostu *F. culmorum*. Uzyskane wyniki wyraźnie różnią się od rezultatów badań innych autorów, którzy stwierdzili, iż szczepy z gatunku *F. culmorum* były o wiele bardziej wrażliwe na działanie nanosrebra (Kasprowicz i in., 2010). W badaniach Kasprowicz i in. (2010) nanocząstki wpływały ha-

mująco na wzrost *Fusarium* spp. już od 2,5 ppm. Przyczyn takich różnic można szukać w zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym grzybów z rodzaju *Fusarium* i ich różnej oporności na działanie nanocząstek. Ponadto, należy zwrócić uwagę na proces syntezy, w wyniku którego otrzymano Ag_{nano}. Nanostruktury użyte w doświadczeniu syntetyzowane były na drodze redukcji chemicznej (Malina i in., 2010), a Kasprowicz i in. (2010) wykorzystali wysokonapięciowe wyładowania elektryczne pomiędzy srebrnymi elektrodami. O wysokiej aktywności grzybobójczej nanosrebra piszą także Kim i in. (2012). W ich badaniach zaobserwowano spowolniony wzrost grzybni *Fusarium* spp. na skutek działania roztworu nanosrebra o stężeniu 10 ppm. Jak piszą Malina i in. (2010) oraz Kasprowicz i in. (2010), proces wytwarzania nanostruktur może mieć istotny wpływ na ich właściwości fizykochemiczne oraz na aktywność antymikrobiologiczną. Zastosowane w badaniach własnych nanostruktury były syntetyzowane na drodze redukcji chemicznej jonów srebra do srebra nanometalicznego. W celu potwierdzenia obecności nanocząstek w uzyskanych zawiesinach przeprowadzono analizę w zakresie promieniowania UV-Vis. Miniaturyzacja rozmiarów metali do skali nanoskopowej skutkuje pojawieniem się intensywnej barwy w roztworach ich koloidów, związanych ze zjawiskiem oscylacji plazmonów powierzchniowych. W efekcie nanocząstki metali szlachetnych charakteryzują się bardzo silną absorpcją optyczną promieniowania w zakresie promieniowania widzialnego i ultrafioletowego spowodowaną wzbudzeniem plazmonów powierzchniowych obecnych na ich powierzchni (Slistan-Grijalva i in., 2005; Sobczak-Kupiec i in., 2012). Lokalizacja maksimum absorpcji (λ_{max}) zależy od rodzaju nanocząstek, ich wielkości oraz kształtu i dla nanocząstek srebra λ_{max} mieści się



Ryc. 1. Wpływ nanocząstek srebra na wzrost *F. culmorum*.
 Fig. 1. Effect of silver nanoparticles on growth of *F. culmorum*.

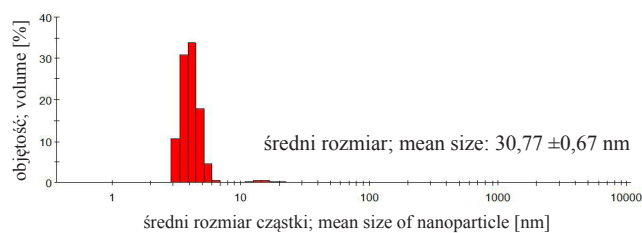


Ryc. 2. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra
Fig. 2. UV-Vis spectrum of silver nanoparticles.

w zakresie od 380 do 450 nm (Sönnichsen i in., 2002). Analiza otrzymanej suspensji nanosrebra potwierdziła powyższe założenia teoretyczne – λ_{\max} nanosuspensji srebra wynosi około 425 nm. Rycina 2 przedstawia widmo UV-Vis nanocząstek srebra oraz fotografię uzyskanego nanokoloidu.

Mikrografie SEM nanocząstek przedstawione na ryc. 3. potwierdzają, że otrzymane nanostruktury cechują się kształtem zbliżonym do kulistego oraz uwidaczniają tendencję nanocząstek do tworzenia niewielkich aglomeratów o wielkości od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów, aczkolwiek pojedyncze formy kuliste są również zauważalne.

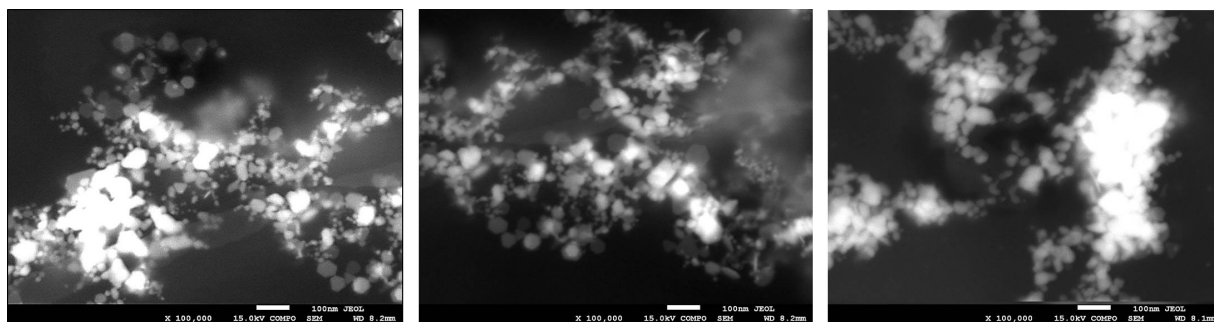
Analiza rozmiaru cząstek wykazała, iż średni rozmiar cząstek w zawiesinie wynosi $30,77 \pm 0,67$ nm. Oznacza to, że rozmiar wszystkich cząstek analizowanych przez aparat pomiarowy (zarówno kilkunanometrowych, jak i mikrometrowych) po uśrednieniu daje taki wynik. Jednakże wąski rozkład wielkości przedstawiony na ryc. 4. skłania autorów



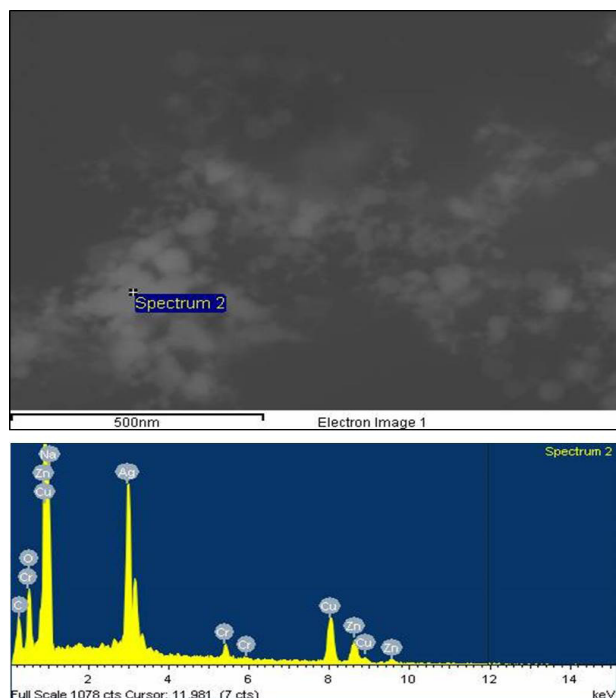
Ryc. 4. Średnica i rozkład wielkości nanocząstek srebra.
Fig. 4. The diameter and size distribution of silver nanoparticles.

ku przekonaniu, że w zawiesinie znajdują się cząstki monodispersyjne, czyli zaledwie kilka procent wszystkich nanocząstek tworzy duże aglomeraty. W związku z powyższym, z dużym prawdopodobieństwem można uznać, iż uzyskany roztwór koloidalny posiada nanocząstki w większości o średnicy mieszczącej się w umownej granicy do 100 nm.

Punktowa analiza składu chemicznego preparatów mikroskopowych przy wykorzystaniu mikroanalizatora rentgenowskiego dyspersji energii sprzężonego z mikroskopem skaningowym (SEM-EDS) potwierdziła, że widoczne na mikroobrazach nanostruktury – pojedyncze czy zaglomerowane – są cząstkami srebra. Analiza SEM-EDS została przedstawiona na ryc. 5. Należy jednak podkreślić, iż analiza składu pierwiastkowego wskazuje na obecność również innych pierwiastków pochodzących z holtera, na który naniesiono próbkę, oraz reagentów stosowanych podczas syntezy. Utworzone wolne atomy srebra są wynikiem reakcji redoks, w których elektrony pochodzące od reduktora są przekazywane jonom srebra. Oprócz otrzymania wolnych atomów metalu w mieszaninie reakcyjnej obecne są również inne związki – wodorek boru i azotan sodu. Pierwszy związek w reakcji z wodą powoduje wydzielanie się wodoru, pozostające więc w roztworze koloidalnym jony borowe, mogą zostać wykorzystane przez roślinę do uzupełnienia niedoborów tego deficytowego mikroelementu. Z kolei azotan sodu jest powszechnie stosowanym składnikiem nawozów, w związku z czym nie wpływa negatywnie na procesy fizjologiczne roślin.



Ryc. 3. Mikrofotografia SEM nanocząstek srebra (powiększenie 100 000)
Fig. 3. SEM micrograph of silver nanoparticles (magnification 100 000).



Ryc. 5. Analiza punktowa SEM-EDS nanocząstek srebra
Fig. 5. SEM-EDS point analysis of silver nanoparticles.

W zaprezentowanych badaniach potwierdzono grzybobójcze właściwości nanocząstek srebra. Zaobserwowano wyraźne zahamowanie wzrostu grzybnii wszystkich testowanych izolatów. Inhibicja ta była skorelowana z rosnącym stężeniem Ag_{nano} w podłożu hodowlanym. Zgromadzone wyniki skłaniają do podjęcia dalszych badań nad wpływem nanostruktur na grzyby z rodzaju *Fusarium*. Ponadto potwierdzają możliwość stosowania nanocząstek srebra jako czynnika grzybobójczego, co jest szczególnie ważne w sytuacji coraz częstszych przypadków nabywania odporności przez mikroorganizmy na dostępne fungicydy.

Zagadnienia przedstawione jako przedmiot badań zostały wybrane przede wszystkim ze względu na ich znaczenie poznawcze oraz możliwości praktycznego wykorzystania wyników badań w rolnictwie. Uzyskane wyniki są niezwykle obiecujące i pozwalają sądzić, iż produkcja preparatów ochrony roślin opartych o nanostruktury jest zasadna. Należy jednak zaznaczyć, iż przy obecnym stanie wiedzy nie można jednoznacznie stwierdzić, czy nanometryczne srebro, cechujące się wysoką aktywnością biochemiczną, oraz inne nanomateriały, są szkodliwe jedynie dla niektórych organizmów żywych. Potencjalne ryzyko stosowania nanocząstek metalicznych i innych nanomateriałów jest obecnie przedmiotem szeregu badań prowadzonych przez różne instytucje zajmujące się gromadzeniem danych na temat realizowanych projektów badawczych i wyników badań. Opracowanie bezpiecznego środka ochrony roślin na bazie koloidalnej zawiesiny grzybo-

bójczych nanocząstek srebra może być ważnym krokiem w zwalczaniu grzybowych patogenów roślin.

WNIOSKI

1. W wyniku syntezy na drodze redukcji chemicznej jonów srebra, w odpowiednio dobranych warunkach prowadzenia reakcji oraz przy antyaglomeracyjnym wpływie substancji stabilizującej, uzyskano koloidalny roztwór nanocząstek o kształcie zbliżonym do kulistego i wąskim rozkładzie wielkości.

2. Zebrany materiał roślinny był w wysokim procencie porażony przez grzyby z rodzaju *Fusarium*.

3. Testowana zawiesina nanocząstek srebra charakteryzuje się wysoką aktywnością fungistatyczną, minimalne stężenie hamujące wzrost badanych grzybów wynosiło 60 ppm.

PIŚMIENNICTWO

- Bai G.H., Shaner G.E., 1994. Scab of wheat: prospects for control. *Plant Dis.*, 78: 760-766.
- Bilaj W.J., 1977. *Fuzarii*. Kijew, Naukowa Dumka, 441 ss.
- Chelkowski J., 1985. *Mycotoxins producing fungi and fungal diseases*. Wyd. SGGW – AR, Warszawa.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Londyn.
- Egger S., Lehmann R.P., Height M.J., Loessner M.J., Schuppler M., 2009. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(9): 2973-2976.
- Falkiewicz-Dulik M., Macura A.B., 2008. Nanosrebro jako substancja biostabilizująca materiały obuwnicze w profilaktyce grzybiczy stóp. *Mikolog. Lek.*, 15(3): 145-150.
- Gilman, J.C., 1971. *A Manual of Soil Fungi*, 2nd Ed. Iowa State College Press, Ames, Iowa, 450 ss.
- Jones R.K., 2000. Assessment of *Fusarium* head blight of wheat and barley in response to fungicide treatment. *Plant Dis.*, 84: 1021-1030.
- Kasproicz M., Gorczyca A., Koziol M., 2010. The effect of Silver Nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Can. J. Microbiol.*, 56: 1-7.
- Kim K.J., Sang-Sung W., Moon S.K., Choi J.S., Kim J.G., Lee D.G., 2008. Antifungal Effect of Silver Nanoparticles on Dermatophytes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18(8): 1482-1484.
- Kim W.S., Jung J.H., Lamsal K., Kim Y.S., Min S.J., Lee Y.S., 2012. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology*, 40(1): 53-58.
- Kowalska J., 2011. Metody zastąpienia miedzi w ochronie warzyw i ziół uprawianych w rolnictwie ekologicznym. Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu
- Kwaśna H., Chelkowski J., Zajkowski P., 1991. *Fusarium*. Grzyby, t. 22, PAN, Warszawa – Kraków.
- Lamsal K., Kim S.W., Jung J.H., Kim Y.S., Kim K.S., Lee Y.S., 2011. Application of Silver Nanoparticles for the Control of *Colletotrichum* Species *In Vitro* and Pepper Anthracnose Disease in Field. *Mycobiology*, 39(1): 194-199.

- Lawecki T., Korbias M., 2002.** Reactions of barley cultivars to infection with blight fungus of the genus *Fusarium*. Post. Ochr. Rośl./Progr. Plant Protect., 42: 869-871.
- Macura A.B., 2008.** Diagnostyka grzybów. Cz. II. Diagnostyka grzybów pleśniowych. Diagnosta Labor., 3(18): 4-5.
- Malina D., Sobczak-Kupiec A., Kowalski Z., 2010.** Nanocząsteczki srebra – przegląd chemicznych metod syntezy. Czasopis. Chem., Wyd. Politechniki Krakowskiej, 1: 183-192.
- Marcinowska J., 2003.** Oznaczanie rodzajów grzybów ważnych w patologii roślin. Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa.
- Mesterhazy A., 2002.** Theory and practice of the breeding for *Fusarium* head blight resistance in wheat. J. Appl. Genet., 43A: 289-302.
- Miedaner T., 1997.** Breeding wheat and rye for resistance to *Fusarium* diseases. Plant Breed., 116: 201-220.
- Milus E.A., Parsons C.E., 1994.** Evaluation of foliar fungicides for controlling *Fusarium* head blight of wheat. Plant Dis., 78: 697-699.
- Min J.S., Kim K.S., Kim S.W., Jung J.H., Lamsal K., Kim S.B., 2009.** Effects of Colloidal Silver Nanoparticles on Sclerotium-Forming Phytopathogenic Fungi. Plant Pathol. J., 25(4): 376-380.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.-J., 2008.** Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology, 17(5): 372-386.
- Sabatini C.A., Pereira R.V., Gehlen M.H., 2007.** Fluorescence modulation of acridine and coumarin dyes by silver nanoparticles, J. Fluoresc., 17: 377-382.
- Sharon M., Choudhary A.K., Kumar R., 2010.** Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. J. Phytol., 2(4): 83-92.
- Simpson D.R., Weston G.E., Turner J.A., Jennings P., Nicholson P., 2001.** Differential control of head blight of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. Eur. J. Plant. Pathol., 107: 421-431.
- Slistan-Grijalva A., Herrera-Urbina R., Rivas-Silva J.F., Avalos-Borja M., Castillon-Barraza F.F., Posada-Amarillas A., 2005.** Classical theoretical characterization of the surface plasmon absorption band for silver spherical nanoparticles suspended in water and ethylene glycol, Physica, E 27: 104-112.
- Sobczak-Kupiec A., Burgiel Z.J., Wójcik A., Malina D., Wzorek Z., 2012.** Wpływ suspensji nanocząstek srebra i złota na wzrost wybranych fitopatogenicznych grzybów. Przem. Chem., 9/91: 1816-1819.
- Sönnichsen C., Franzl T., Wilk T., Plessen G., Feldmann J., 2002.** Plasmon resonances in large noble-metal clusters. NJPh, 4: 93.1-93.8.
- Suchorzyńska M., Misiewicz A., 2009.** Mycotoxigenic phytopathogenic fungi of *Fusarium* genus and their identification by PCR techniques. Post. Mikrobiol., 48(3): 221-230.
- Wzorek Z., Konopka M., 2007.** Nanosrebro – nowy środek bakteriobójczy. Czasopis. Chem., Wyd. Politechniki Krakowskiej, 1: 175-181.

K. Wolny-Koladka, D. Malina, A. Sobczak-Kupiec, Z. Wzorek

SYNTHESIS AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE SILVER NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR TOXICITY TO FUNGI OF THE SPECIES *FUSARIUM CULMORUM* ISOLATED FROM WINTER WHEAT

Summary

Searching for alternatives to toxic pesticides, studies were conducted to evaluate the usefulness of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction to combat the fungi of the species *Fusarium culmorum*. The research was conducted in the Małopolskie voivodship, where 218 ears of winter wheat with symptoms of fusariosis were collected. Ears after disinfection were placed on PDA medium and incubated at 24°C for 7 days. Seventy-nine strains belonging to the species of *F. culmorum* were collected. The synthesis of silver nanoparticles proceeded by chemical reduction using a suitable stabilizer. Spectroscopic studies were carried out in the UV-Vis and the morphology of nanoparticles by using a scanning electron microscope. Effect of silver nanoparticles on the growth of *F. culmorum* strains was tested by adding of suitable proportions of appropriate concentrations of the Ag_{nano} to medium. Then the prepared medium was inoculated with 5 mm mycelial fragments, control was the medium without the addition of nanostructures. Based on the research, it can be concluded that silver nanoparticles possess fungicidal properties. The minimum inhibitory concentration for growth of strains of *F. culmorum* was 60 ppm.

key words: silver nanoparticles, *Fusarium culmorum*, winter wheat, toxicity