

Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej

**Wpływ nanokoloidów metali
na wybrane parametry jakości
nasion, roślin i oleju z rzepaku jarego**

**Influence of metal nanocolloids on selected quality
parameters of spring rape seeds, plants and oil**

Magdalena Kachel

Rozprawa habilitacyjna

Kraków 2018

Patronat naukowy: Komitet Inżynierii Rolniczej

Rada Naukowa Wydawnictwa

Prof. dr hab. Janusz Haman – czł. rzecz. PAN
Prof. dr hab. Rudolf Michałek – czł. rzecz. PAN
Prof. dr hab. Małgorzata Bzowska-Bakalarz
Prof. dr hab. Jan Bronisław Dawidowski
Prof. dr hab. Józef Szlachta
Prof. dr hab. Jerzy Weres
Prof. dr hab. Zdzisław Wójcicki
Prof. Radomir Adamovsky (Rep. Czeska)
Prof. Stefan Cenkowski (Kanada)
Doc. Ing. Ján Frančák, CSc. (Słowacja)
Prof. Jürgen Hahn (Niemcy)
Prof. Dorota Haman (USA)
Doc. Ing. Zuzana Hlaváčová, CSc. (Słowacja)
Prof. Gerard Wiliam Isaacs (USA)
Prof. Vladimir Kosołapov (Rosja)
Prof. Piotr Savinykh (Rosja)
Prof. Oleg Sidorczuk (Ukraina)

Komitet Redakcyjny

Prof. dr hab. inż. Rudolf Michałek, czł. rzecz. PAN	– redaktor naczelny
Prof. dr hab. inż. Janusz Haman, czł. rzecz. PAN	
Prof. dr hab. inż. Maciej Kuboń	– sekretarz
Dr hab. inż. Sławomir Kocira	
Dr hab. inż. Dariusz Kwaśniewski	

Wydawca:

Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej, Kraków, ul. Balicka 116B

Recenzenci:

Prof. dr hab. Barbara Wiśniowska-Kielian	– Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Dr hab. Monika Szymańska-Chargot	– Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie

ISBN 978-83-64377-22-8

Druk i oprawa:

NOVA SANDEC
ul. Lwowska 143, 33-300 Nowy Sącz
tel. +48 (18) 547 45 45
e-mail: biuro@novasandec.pl; <http://www.novasandec.pl>
Ark. wyd. 10,00 ; ark. druk. 9,25
Nakład: 100 egz.

Spis treści:

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ	7
1. WSTĘP	9
2. PRZEGLĄD LITERATURY	11
2.1. Charakterystyka i zastosowanie nanomateriałów w rolnictwie.....	12
2.2. Wpływ nanocząstek metali na rośliny	14
2.3. Oddziaływanie metali i nanometali na proces fotosyntezy	15
2.4. Czynniki determinujące plon nasion rzepaku i jakość oleju.....	17
2.4.1. Kiełkowanie nasion i wzrost roślin	18
2.4.2. Przechowywanie nasion	19
2.5. Właściwości oleju z nasion rzepaku.....	21
2.6. Stres abiotyczny oraz oksydacyjny i jego wpływ na rośliny	24
2.6.1. Mechanizmy obronne roślin.....	26
2.6.1.1. Enzymatyczny mechanizm antyoksydacyjny.....	26
2.6.1.2. Nieenzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne	28
2.7. Gleba jako środowisko życia mikroorganizmów	29
2.7.1. Aktywność enzymatyczna gleby	29
2.7.2. Oddziaływanie nanocząstek na glebę.....	30
3. CHARAKTERYSTYKA PROBLEMU BADAWCZEGO.....	33
4. CEL I ZAKRES PRACY	35
5. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	37
5.1. Materiał do doświadczeń.....	37
5.2. Metody badań z wykorzystaniem mikroskopii.....	37
5.2.1. Analiza metodą mikroskopii sił atomowych AFM	38
5.2.2. Analiza metodą mikroskopii elektronowej TEM	38
5.3. Uprawa rzepaku w warunkach laboratoryjnych	38
5.3.1. Przygotowanie preparatów nanokoloidów	38
5.3.2. Przygotowanie nasion i warunki ich kiełkowania	39
5.3.3. Warunki wzrostu roślin	39
5.3.4. Przygotowanie materiału do analiz i określenie stresu abiotycznego....	40
5.3.4.1. Zawartość białka rozpuszczalnego wg Bradforda	40
5.3.4.2. Peroksydacja lipidów (LPO)	41
5.3.4.3. Ogólna aktywność antyrodnikowa (anty-ABTS)	41
5.3.4.4. Aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX).....	41
5.3.4.5. Aktywność peroksydazy (GPX).....	41
5.3.4.6. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)	42

5.3.4.7.	Aktywność reduktazy glutationowej (GR).....	42
5.3.4.8.	Aktywność (CAT).....	42
5.3.4.9.	Plon świeżej i suchej masy pędów	42
5.3.4.10.	Ekstrakcja barwników z liści rzepaku i oznaczenie ich zawartości ...	43
5.4.	Uprawa rzepaku w doświadczeniu wazonowym	43
5.4.1.	Oznaczenie pH gleby	44
5.4.2.	Oznaczenie aktywności dehydrogenazy.....	44
5.5.	Uprawa rzepaku w doświadczeniu polowym.....	44
5.5.1.	Przygotowanie i przebieg doświadczenia	44
5.5.2.	Oznaczenie wilgotności nasion	46
5.5.3.	Oznaczenie masy 1000 nasion (MTN).....	46
5.5.4.	Oznaczenie zawartości tłuszczu w nasionach	46
5.5.5.	Analiza zawartości białka	46
5.5.6.	Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych.....	47
5.5.7.	Zawartość pierwiastków w liściach i nasionach.....	47
5.5.8.	Ocena jakości oleju rzepakowego.....	47
5.5.8.1.	Tłoczenie oleju.....	47
5.5.8.2.	Oznaczenie liczby kwasowej (LK)	48
5.5.8.3.	Oznaczenie liczby nadtlencowej (LN).....	48
5.5.8.4.	Oznaczenie stabilności oksydacyjnej	48
5.5.8.5.	Oznaczenie zawartości barwników w oleju	48
5.5.8.6.	Pomiar barwy oleju	48
5.5.8.7.	Pomiary widm ATR-FTIR	49
5.5.6.	Przygotowanie surowca do przechowywania.....	50
5.5.6.1.	Oznaczenie zawartości ergosterolu	51
5.6.	Analiza statystyczna	51
6.	WYNIKI BADAŃ.....	52
6.1.	Ocena potwierdzająca obecność nanocząstek w nanokoloidach (NKAg i NKCu)	52
6.2.	Ocena rzepaku z uprawy w warunkach laboratoryjnych	54
6.2.1.	Ocena energii i zdolności kiełkowania nasion	55
6.2.2.	Ocena długości pędów i korzonków siewek	55
6.2.3.	Ocena stresu abiotycznego.....	57
6.2.4.	Ocena zawartości pierwiastków w liściach.....	65
6.2.5.	Zawartość barwników w liściach	71
6.3.	Ocena czynników środowiskowych.....	73
6.3.1.	Ocena warunków agrometeorologicznych	74
6.3.2.	Ocena składu granulometrycznego gleby	74

6.4.	Ocena parametrów gleby po uprawie wazonowej	75
6.4.1.	Ocena wartości pH gleby	75
6.4.2.	Ocena aktywności dehydrogenaz w glebie	76
6.5.	Ocena nasion i oleju uzyskanych z uprawy polowej	77
6.5.1.	Ocena fizyczna i chemiczna nasion rzepaku	78
6.5.2.	Zawartość ergosterolu w przechowywanych nasionach	87
6.5.3.	Parametry jakościowe oleju tłoczonego na zimno	93
7.	DYSKUSJA	104
8.	WNIOSKI	115
9.	LITERATURA	118
	SPIS TABEL I RYSUNKÓW	140
	STRESZCZENIE	142

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH OZNACZEŃ:

AFM	– mikroskopia sił atomowych (ang. <i>atomic force microscopy</i>)
AgNC	– nanocząstki srebra (ang. <i>silver nanoparticles</i>) (nm)
Anty-ABTS	– ogólna aktywność antyrodnikowa (ang. <i>general anti-radical activity</i>) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka)
APX	– peroksydaza askorbinianowa (ang. <i>ascorbate peroxidase</i>) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka)
ATR-FTIR	– osłabione całkowite odbicie (ATR) - transformacja Fouriera (FTIR) (ang. <i>attenuated total reflectance - Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
car	– karotenoidy (ang. <i>carotenoids</i>) ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
CAT	– katalaza (ang. <i>catalase</i>) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka)
chl <i>a</i>	– chlorofil <i>a</i> (ang. <i>chlorophyll a</i>) ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
chl <i>b</i>	– chlorofil <i>b</i> (ang. <i>chlorophyll b</i>) ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)
CuNC	– nanocząstki miedzi (ang. <i>copper nanoparticles</i>)
CuONC	– nanocząstki tlenku miedzi (ang. <i>copper oxide nanoparticles</i>)
DHA	– aktywność dehydrogenaz (ang. <i>dehydrogenases activity</i>) ($\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.)
EDTA	– kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EDX	– spektroskopia rentgenowska (ang. <i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>)
EPA	– kwas eikozapentaenowy (ang. <i>eicosapentaenoic acid</i>) (%)
ERG	– ergosterol (ang. <i>ergosterol</i>) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
FFT	– szybka transformacja Fouriera (ang. <i>fast Fourier transform</i>)
GPX	– peroksydaza gwajakolowa (ang. <i>guaiacol peroxidase</i>) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka)
GR	– reduktaza glutationowa (ang. <i>glutathione reductase</i>) ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka)
HRTEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa o wysokiej rozdzielczości (ang. <i>high-resolution transmission electron microscopy</i>)
ICDD	– Międzynarodowe Centrum danych dyfrakcji (ang. <i>International Centre for Diffraction Data</i>)
LK	– liczba kwasowa (ang. <i>acid number - AN</i>) ($\text{mg KOH} \cdot \text{g}^{-1}$)
LN	– liczba nadtlenkowa (ang. <i>peroxide number - LOO</i>) ($\text{mmole O} \cdot \text{kg}^{-1}$)
LPO	– peroksydacja lipidów (ang. <i>lipid peroxidation</i>) ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.)
MDA	– dialdehyd malonowy (ang. <i>malondialdehyde</i>) ($\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$)
MTN	– masa tysiąca nasion (ang. <i>mass of one thousand seeds</i>) (g)
MUFA	– monoenowe kwasy tłuszczowe (ang. <i>monounsaturated fatty acids</i>) (%)
(N/N)	– nasiona namoczone (ang. <i>seed soaking</i>)
NC	– nanocząstki (ang. <i>nanoparticles</i>) (nm)
(N/O)NKAg	– nasiona namoczone i rośliny opryskane nanokolidem srebra (ang. <i>soaked seeds and plants sprayed with silver nanocolloid</i>)
(N/O)NKCu	– nasiona namoczone i rośliny opryskane nanokolidem miedzi (ang. <i>soaked seeds and plants sprayed with copper nanocolloid</i>)
(O)NKAg	– rośliny opryskane nanokolidem srebra (ang. <i>plants sprayed with silver nanocolloid</i>)

(O)NKCu	– rośliny opryskane nanokoloide miedzi (ang. <i>plants sprayed with copper nanocolloid</i>)
NKAg	– nanokoloide srebra (ang. <i>silver nanocolloid</i>)
NKCu	– nanokoloide miedzi (ang. <i>copper nanocolloid</i>)
Omega 3	– suma kwasów C18:3n3(alpha), C20:3n3, C20:5 (ang. <i>sum of acids</i>) (%)
Omega 6	– suma kwasów C18:2n6c, C18:3n6(gamma), C20:2, C20:3n6, C20:4, C22:2 (ang. <i>sum of acids</i>) (%)
Omega 9	– suma kwasów C18:1n9c, C20:1n9, C22:1n9, C24:1 (ang. <i>sum of acids</i>) (%)
PUFA	– polienowe kwasy tłuszczowe (ang. <i>polyunsaturated fatty acids</i>) (%)
PVP	– poli(winylopirolidon) (ang. <i>PVP - poly (vinylpyrrolidone)</i>)
RFT	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species - ROS</i>)
SFA	– nasycone kwasy tłuszczowe (ang. <i>saturated fatty acids</i>) (%)
SOD	– dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>) (U·mg ⁻¹ białka)
STEM-HAADF	– skaningowa transmisyjna mikroskopia elektronowa-obrazowanie w szerokokątnym ciemnym polu pierścieniowym (ang. <i>scanning transmission electron microscopy - high-angle annular dark-field imaging</i>)
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>transmission electron microscopy</i>)
WNKT	– wielonienasycone niezbędne kwasy tłuszczowe (ang. <i>polyunsaturated essential fatty acids</i>) (%)

1. WSTĘP

Rzepak – botanicznie kapusta-rzepak (*Brasica napus* var. *oleifera*) to roślina jednoroczna występująca w dwóch odmianach – rzepaku ozimego (*Brasica napus* var. *arvensis*) oraz rzepaku jarego (*Brasica napus* var. *arvensis*). W warunkach agroklimatycznych Polski stanowi podstawową roślinę oleistą. Uprawiana jest głównie jej forma ozima, plonująca w warunkach miejscowych lepiej niż forma jara. Rzepak jary zastępuje i uzupełnia rzepak ozimy, zwłaszcza w latach większych szkód mrozowych lub gdy nie zdołano na czas zasiać jego formy ozimej.

Nasiona rzepaku zawierają około 40-50% tłuszczu, 20-25% białka, 6-7% włókna, 4-6% popiołu oraz 18-22% bezazotowych substancji wyciągowych w suchej masie (Krzymański i in., 1986). Rzepak jary ma około 4-5% mniej tłuszczu i więcej białka niż forma ozima (Muśnicki, 1989). Wśród bezazotowych związków wyciągowych przeważają cukrowce, a w mniejszych ilościach fenole (sinapina), garbniki (taniny) oraz fityny i fityniany. U odmian podwójnie ulepszonych zawartość kwasu erukowego w oleju nie może przekraczać 2%, a zawartość glukozyzolanów $15 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy beztłuszczowej tych nasion. Nawożenie rzepaku jarego jest co najmniej o 30% mniejsze niż ozimego, ponieważ ma mniejsze potrzeby pokarmowe ze względu na mniejsze plony. Spodziewany plon może osiągnąć $2-2,7 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$. Masa tysiąca nasion może wahać się w granicach od 3 do 4,1 g (Muśnicki, 2003).

Rzepak jary i ozimy jest silnie atakowany przez te same szkodniki, ale liczba herbicydów stosowanych w ochronie rzepaku jarego jest nieco mniejsza niż w przypadku ozimego. Zastosowanie insektycydów i fungicydów również w zaprawach nasiennych jest bardzo podobne (Muśnicki, 2003).

Ochrona rzepaku przed agrofagami polega na wykorzystaniu dostępnych metod ujętych w taki system, aby do minimum ograniczyć stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Proekologiczne zasady i metody ochrony przed agrofagami dotyczą: agrotechniki, hodowli nowych odmian, wykorzystania naturalnych elementów ekosystemu i racjonalnego stosowania środków ochrony roślin oraz innych agrochemikaliów. Ciągłe rozwijana koncepcja rolnictwa zrównoważonego w technologii rolniczej jest głównym czynnikiem kształtującym nowoczesne rolnictwo. Wśród najnowszych innowacji technologicznych znaczące miejsce w inżynierii rolniczej, przemyśle rolnym oraz produkcji żywności zajmuje nanotechnologia.

Nanotechnologia zapewnia nowe interdyscyplinarne rozwiązania w dziedzinie rolnictwa i nauk przyrodniczych poprzez wzajemne przenikanie się nauki i inżynierii. Nanotechnologia reprezentuje obiecujące podejście przyczyniające się do poprawy produkcji rolnej poprzez wykrywanie zanieczyszczeń, szkodników i patogenów, chorób roślin, kontrolowaną dostawę pestycydów, składników odżywczych, nawozów, poprawę materiału genetycznego oraz uczestniczenie w formowaniu struktury gleby (Ghormade i in., 2011). Nanocząstki mogą również powodować modyfikację ekspresji genów roślinnych i związanych z nimi szlaków biologicznych, które ostatecznie wywierają wpływ na wzrost i rozwój roślin (Nair i in., 2010). Istnieje wiele publikacji poświęconych trwałemu rozwojowi rolnictwa w ramach stosowanej nanotechnologii oraz jej oddziaływania na środowisko naturalne (Anandaraj i in., 2011; Chen i Yada, 2011; Sekhon 2014; Ditta i in., 2015; Thul i Sarangi, 2015;

Patil i in., 2016). Rozwój i wprowadzenie nanomateriałów może otworzyć również nowe zastosowania w biotechnologii roślin, jak i samej ich uprawie (Scrinis i Lyons, 2007). Obecnie głównym przedmiotem badań nad nanotechnologią jest zastosowanie jej w elektronice (Feiner, 2006), energetyce (Hu i Chen, 2007), medycynie oraz naukach przyrodniczych (Caruthers i in., 2007). Doświadczenia z tych obszarów ułatwiają rozwój zmodyfikowanych genetycznie roślin, środków ochrony roślin oraz technik precyzyjnej hodowli. Zastosowanie nanomateriałów w rolnictwie ma na celu w szczególności ograniczenie stosowania środków ochrony roślin, minimalizację strat składników odżywczych w nawożeniu oraz zwiększenie plonu poprzez optymalne zarządzanie tymi składnikami. Według licznych doniesień, najczęściej są stosowane trzy rodzaje metalicznych nanocząstek, do których zalicza się: srebro, miedź i złoto, wykazujące silną aktywność przeciwko niektórym mikroorganizmom (Yruela, 2005; Żelazowska i Pasternak, 2007; Zhan i in., 2011; Masarovičová i Kráľová, 2013; Syu i in., 2014). Według Danga i in. (2010), nanocząsteczki mają silną aktywność przeciwgrzybiczą wykorzystywaną przeciwko różnym patogenom roślinnym, takim jak: *Phytophthora* czy *Corycium salmonicolor*. Jednakże więcej uwagi poświęcono badaniom dotyczącym właściwości przeciwbakteryjnym nanocząstek miedzi, ponieważ są one znacznie tańsze niż nanocząstki srebra lub złota. Zaletą ta może przyczynić się do szerszego zastosowania nanocząstek miedzi w rolnictwie (Van Du i in., 2014). Obecnie poszukiwanie nowych środków bakterio- i grzybobójczych jest ważne ze względu na stopniowe zwiększanie się liczby nowych szczepów odpornych na wszelkiego rodzaju środki o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym. Zastosowanie nanotechnologii do przetworzenia metali przyczynia się do wzmocnienia działania przeciwbakteryjnego oraz aktywności miedzi i srebra w odpowiednią formę nanocząstek (o wielkości pomiędzy 1 a 100 nm) (Sondi i Salopek-Sondi, 2004; Jain i in., 2009; Mapara i in., 2015). Należy kłaść nacisk na to, aby potencjalne zastosowania nanotechnologii oceniać w świetle zrównoważonego rozwoju, biorąc pod uwagę kwestie gospodarcze (Shapira i Youtie, 2012), społeczne (Roure, 2016), etyczne (Salamanca-Buentello i Daar, 2016) oraz czynniki środowiskowe (Ditta i in., 2015; Bottero, 2016).

2. PRZEGLĄD LITERATURY

Rzepak należy do najważniejszych roślin oleisto-białkowych w Polsce. Nasiona rzepaku są wykorzystywane do produkcji oleju rzepakowego, zużywanego na cele spożywcze i techniczne, a pozostałe po ich przerobie makuchy i śruty poekstrakcyjne, są cenną paszą białkową dla zwierząt gospodarskich (Kapusta, 2015). Światowa produkcja rzepaku od 2014 roku uległa ograniczeniu. W sezonie 2015/2016 wynosiła 64 mln ton tych nasion. Taki poziom produkcji umożliwił zaspokojenie globalnego zapotrzebowania, które było nieznacznie mniejsze (o 0,2%) od produkcji w roku poprzednim. W sezonie 2016/2017 przewidywano dalsze ograniczenie produkcji rzepaku o 6%, czyli do 60,4 mln ton (Rynek, 2016). Szacuje się, że w Unii Europejskiej na skutek niekorzystnych warunków pogodowych zbiory rzepaku w 2016 roku wyniosły 20,1 mln ton. Wśród wiodących producentów rzepaku w UE najbardziej zmalały zbiory w Polsce, Wielkiej Brytanii, we Francji i w Niemczech. W Polsce zbiory rzepaku w 2016 roku wyniosły 2,2 mln ton i były o 17% mniejsze niż w 2015 roku. W pozostałych wymienionych krajach spadek był szacowany odpowiednio na 26%, 12% i 7% (Rynek, 2016).

Roślina ta ma duże wymagania zarówno co do warunków klimatycznych, glebowych, jak i agrotechnicznych. Rzepak należy do roślin, którym nie sprzyjają gleby zakwaszone o zniszczonej strukturze, ubogie w próchnicę i zachwaszczone. Ważnym czynnikiem dla roślin rzepaku ozimego oraz jarego jest odczyn gleby. Rośliny te są wrażliwe na kwaśny odczyn gleby ($\text{pH} < 5,5$) oraz silne zakwaszenie strefy korzeniowej. Optymalny dla rzepaku jest odczyn obojętny ($\text{pH} 6,5\text{--}7,0$). Właściwe pH gleby wpływa korzystnie na pobieranie składników pokarmowych, sprzyja dobremu ukorzenieniu się roślin i zmniejsza presję czynników chorobotwórczych (Rudko, 2011).

Rzepak ma również duże potrzeby pokarmowe. Potrzebne składniki można dostarczyć w formie nawozów mineralnych stosowanych doglebowo przedsiawnie i pogłównie oraz dolistnie (nalistnie). Ważne jest dostarczenie niezbędnych makro- i mikrośladników odpowiadających za prawidłowy rozwój rośliny. Do makrośladników pobieranych przez tę roślinę w największych ilościach należą: azot, potas, wapń, fosfor i siarka. Do mikroelementów należą mangan, cynk, bor, miedź oraz molibden (Muśnicki, 2003).

Roślina ta jest silnie atakowana przez liczne szkodniki i choroby, choć rzepak jary jest w mniejszym stopniu narażony na choroby, z wyjątkiem zgorzeli siewek. Zgubnych skutków tej choroby można uniknąć poprzez odpowiednie zaprawianie nasion (Muśnicki, 2003). Osiągnięcie wysokiego i jakościowo dobrego plonu nasion rzepaku jest obarczone ryzykiem strat wyrządzanych przez choroby, szkodniki i chwasty. Do prawidłowego przeprowadzenia zabiegów ochrony roślin jest niezbędna znajomość zasad zawartych w kodeksie dobrej praktyki rolniczej (DPR) oraz standardzie dobrej praktyki ochrony roślin (DPOR) Europejskiej i Śródziemnomorskiej Organizacji Ochrony Roślin (EPPO). W obu przypadkach dotyczących ochrony roślin wykonuje się znaczną liczbę zabiegów chemicznych, wykorzystując liczne środki chwastobójcze oraz insektycydy (IOR, 2008; Rudko, 2011). Środki te mogą być niebezpieczne dla ludzi i innych organizmów niebędących przedmiotem zwalczania, w zależności od ich toksyczności, stopnia zanieczyszczenia oraz czasu oddziaływania (Kohler i Triebkorn, 2013).

Alternatywą dla ograniczenia stosowania wszelkich środków chemicznych mających zwalczać choroby rzepaku może być zastosowanie nanopreparatów zawierających między innymi nanocząstki srebra i miedzi.

2.1. Charakterystyka i zastosowanie nanomateriałów w rolnictwie

Nanotechnologia może być rozumiana w różny sposób w zależności od rozpatrywanych czynników spośród, których można wyróżnić korzyści oraz ryzyko lub też konsekwencje zarówno ekonomiczne, jak i społeczne (Tyshenko, 2014). Według Royal Society i Royal Academy of Engineering (2004): „*Nanotechnologia to nauka zajmująca się charakterystyką, projektowaniem, produkcją i zastosowaniem struktur, urządzeń i systemów poprzez kontrolę kształtu i wielkości w skali nanometrycznej*”. Nanomateriał to naturalny, powstały przypadkowo lub wytworzony przez człowieka materiał zawierający cząstki w stanie swobodnym lub w formie agregatu bądź aglomeratu, w którym co najmniej 50% lub więcej cząstek w liczbowym rozkładzie wielkości cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie 1 nm – 100 nm (GUS, 2013). Powstający nanomateriał jest substancją polikrystaliczną, złożoną z ziaren o wielkości nieprzekraczającej 100 nm. Wielkością tą może być średnica ziarna lub grubość warstw wytworzonych albo naniesionych na podłożu.

Naturalne nanocząstki występujące w środowisku powstają w wyniku naturalnych zjawisk, takich jak: burze, erozja, erupcja wulkaniczna oraz pożary lasów (Nowack i Bucheli, 2007). Zaprojektowane nanocząstki (NC) są celowo produkowane przez człowieka przy użyciu wielu różnych metod oraz materiałów, wśród których można wyróżnić metale (w tym: Au, Ag, Zn, Ni, Fe i Cu), tlenki metali (TiO_2 , Fe_2O_4 , SiO_2 , CeO_2 i Al_2O_3) (Fernández-García i Rodriguez, 2011), niemetale (krzewy krzemionkowe i kwantowe) (Ehrman i in., 1999), nanostruktury węglowe (grafen i fuleren) (Endo i in., 2013) oraz polimery – chitozan czy polihydroksyalkanolany (Paques i in., 2014). Część z nich posiada m.in. właściwości mechaniczne, elektryczne czy optyczne, które mogą znacznie różnić się od ich odpowiedników – w skali makro.

Dzięki specyficznym właściwościom nanocząstki znalazły swoje miejsce w sektorze rolnym, spożywczym oraz inżynierii rolniczej. Przemysł spożywczy może już zaoferować korzyści płynące z wykorzystania nanotechnologii (w szczególności w odniesieniu do przetwórstwa żywności, dystrybucji, opakowań i żywności funkcjonalnej), ale jego rzeczywisty udział w sektorze rolnictwa jest nadal niepewny (Paris i in., 2015). Perspektywa zastosowania nanomateriałów w inżynierii oraz rolnictwie dotyczy wykorzystania ewentualnych nanosystemów do kontrolowanego uwalniania środków w zwalczaniu szkodników, jak również dostarczania składników odżywczych roślinom (Ghormade i in., 2011; Behnassi i in., 2011). Opracowano systemy nanosensorów do monitorowania warunków środowiskowych oraz interakcji między patogenami i roślinami (Ghormade i in., 2011; Nair i in., 2010).

Nanotechnologia ma wiele zastosowań na wszystkich etapach produkcji, przetwarzania, przechowywania, pakowania i transportu produktów rolnych (Srinivas, 2016). Większość obecnych prac nad zastosowaniem nanotechnologii w rolnictwie pod kątem ochrony roślin sugeruje, że są to badania laboratoryjne i znajdują się na etapie prac lub jeszcze nie zostały skomercjalizowane (Zheng i in., 2005; Hassan, 2015).

Nanocząstkom Ag oraz Cu poświęcono dużo uwagi ze względu na doskonałe i szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, antybakteryjnej oraz antywirusowej. Fox i Modak (1974), Rai i in. (2009), Dang i in. (2010), Carroll i in. (2011), Chatterjee i in. (2014), przeprowadzili badania, które potwierdzają fakt, że nanocząstki metali Ag oraz Cu posiadają wysoką aktywność antybakteryjną przeciw niektórym bakteriom oraz patogenom roślinnym, jak np.: *Phytophthora*, *Corticium salmonicolor* i *Escherichia coli*. Specyficzne właściwości bakteriobójcze oraz grzybobójcze nanocząstek są związane z ich rodzajem, kształtem powierzchni i małym rozmiarem (Morones i in., 2005; Pal i in., 2007), ilością srebra lub miedzi oraz zdolnością uwalniania jonów do otoczenia (Whitesides, 2005). Ich aktywność zależną od rozmiaru, potwierdzają badania przeprowadzone przez Raimondiego i in. (2005), Moronesa i in. (2005) oraz Lu i in. (2013). Według nich nanocząstki mniejsze niż 10 nm mogą swobodnie przenikać przez błony komórkowe bakterii czy grzybów, zaburzając ich procesy życiowe.

Zastosowanie w rolnictwie nanocząstek prawdopodobnie ułatwi kolejny etap rozwoju upraw genetycznie zmodyfikowanych, produkcji zwierzęcej, biocydów i systemu hodowli precyzyjnych (Foss i in., 2009; Robert i in., 2009; Musee, 2011; b; Musee i in., 2011; Lombi i in., 2012). Wykorzystanie nanotechnologii w rolnictwie umożliwi kontrolowanie uwalniania produktów odżywczych lub agrochemicznych przez aplikację nawozów, pestycydów oraz herbicydów w konkretne miejsce docelowe, przyczyniając się do poprawy efektów ochrony, wzrostu i plonowania roślin, a także wydajności konwencjonalnych nawozów (Chhipa, 2017). Uważa się, że zgodnie z kierunkiem zrównoważonego rozwoju rolnictwa zastosowanie innowacyjnej nanotechnologii (w tym do nowych rodzajów nawozów) przyczyni się do zwiększenia produkcji roślinnej w celu zaspokojenia szybko rosnących potrzeb populacji na całym świecie (Lal, 2008). Loomis i Connor (1992) oraz DeRosa i in. (2010) uznali, że rośliny uprawne zazwyczaj wykorzystują mniej niż połowę składników aplikowanych im w nawozach mineralnych, a mała efektywność (zaledwie 30-50%) stosowania konwencjonalnych nawozów oraz niewielka możliwość zwiększenia ich wydajności powinna przyczynić się do kontynuacji badań i poszerzenia asortymentu nawozów z wykorzystaniem nanotechnologii.

Przeprowadzone badania dotyczące wzrostu siewek różnych roślin nie są jednoznaczne i zależą od rodzaju i stężenia nanocząstek oraz gatunku rośliny (Nair i in., 2010; Campos i in., 2014). Badania Lee i in. (2008a), związane z zastosowaniem nanocząstek miedzi - CuNC na podłożu agarowym w hodowli fasoli i pszenicy wykazały większą wrażliwość fasoli na oddziaływanie nanocząstek miedzi niż pszenicy. Po aplikacji CuNC obserwowano zahamowanie wzrostu siewek fasoli. Inne badania przeprowadzili Stampoulis i in. (2009). Dotyczyły one wpływu CuNC na wzrost roślin cukinii i wykazały zmniejszenie długości jej korzenia. Natomiast wykorzystanie nanocząstek srebra -AgNC w hodowli hydroponicznej do oceny zdolności kiełkowania nasion i długości korzeni cukinii nie wykazało negatywnych skutków. Aplikacja omawianych nanocząstek przyczyniła się do wydłużenia pędu, przy jednoczesnym zmniejszeniu jego biomasy (Stampoulis i in., 2009).

Ponadto rozległe wykorzystanie nanocząstek w biologii, naukach medycznych, produktach powszechnego użytku oraz rolnictwie prowadzi do ich uwalniania i akumulacji nanocząstek w środowisku, a zwłaszcza w glebie i wodzie (Hajipour i in., 2012). Przenikanie nanocząstek do środowiska może być jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla korzystnych mikroorganizmów w ekosystemach (Gajjar i in., 2009).

2.2. Wpływ nanocząstek metali na rośliny

Rośliny ewoluowały w obecności naturalnych nanomateriałów. Jednakże prawdopodobieństwo narażenia roślin na ich obecność wzrosło w wyniku rosnącej masowej produkcji i powszechnego stosowania wytworzonych nanomateriałów w procesach inżynierskich oraz umieszczanych w różnych towarach powszechnego użytku (Pan i Xing, 2010). Nanocząstki mogą docierać do roślin przez bezpośrednią aplikację, przypadkowe uwalnianie, zanieczyszczoną glebę czy wodę. W dalszym ciągu niewiele wiadomo na temat wpływu nanocząstek -NC na jakość upraw innych roślin spożywczych i możliwe skutki ich działania w łańcuchu pokarmowym (Darlington i in., 2009; Pidgeon i in., 2009). Nanocząstki posiadają zupełnie nowe lub ulepszone właściwości uzyskane dzięki znacznie mniejszym rozmiarom, dystrybucji oraz morfologii w porównaniu z większymi cząstkami materiałów masowych, z których je wykonano (Song i Kim, 2009). Nanocząstki metali w warunkach niskiej koncentracji odgrywają kluczową rolę w granicach tolerancji dla danej rośliny, wywierając wpływ na jej rozwój (Stoimenov i in., 2002). Od czasu absorpcji nanocząstek przez roślinę niektóre z jonów metali w połączeniu z anionami mogą działać toksycznie w wyniku przekroczenia granicy tolerancji danej rośliny, a efekt toksyczny będzie objawiał się w zahamowaniu wzrostu oraz nieprawidłowościach podziału komórek (Kolmakov i Moskovits, 2004; Franke i in., 2006; Niederberger, 2007). Po ich pobraniu, są następnie przemieszczane i gromadzone w różnych częściach roślin, tworząc kompleksy z nośnikami białek. Jednakże reakcja roślin na metaliczną nanocząstkę różni się w zależności od rodzaju metalu, gatunku rośliny oraz jej stadium rozwojowego. Nanomateriały są zdolne do przenikania przez warstwę liści do cytoplazmy komórek, dlatego też właśnie rośliny stanowią potencjalny szlak transportu nanomateriałów do środowiska poprzez bioakumulację w łańcuchu pokarmowym (Zhang i in., 2008; Sharif i in., 2013). Ewentualny mechanizm translokacji jest inicjowany przez penetrację nanocząstek w ściany i błony komórkowe, komórki macierzyste rośliny oraz otwory szparkowe mieszczące się w zakresie od 3 do 8 nm (Birbaum i in., 2010). Istnieje również podejrzenie, że nagromadzenie nanocząstek na powierzchni fotosyntetycznej liści może spowodować intensywniejsze ich ogrzewanie, prowadząc do zakłóceń w wymianie gazów. Tak powstałe zmiany wynikające z niedrożności aparatu szparkowego mogą powodować zaburzenia w różnych funkcjach fizjologicznych i komórkowych roślin (Aslani i in., 2014).

Przeprowadzono badania dotyczące toksyczności NC dla roślin uprawnych, między innymi takich jak: rzepak (*Brassica napus*), rzodkiewka (*Raphanus sativus*), sałata (*Lactuca sativa*), kukurydza (*Zea mays*) i ogórek (*Cucumis sativus*) (Lin i Xing, 2007; Lee i in., 2008a; Barrera i in., 2009). Wszystkie najnowsze publikacje dotyczą fitotoksyczności, absorpcji, translokacji, akumulacji i biotransformacji NC w roślinach spożywczych (Klaine i in., 2008). Otrzymywane wyniki nie zawsze są jednoznaczne, a w niektórych przypadkach nie stwierdzono pozytywnego lub negatywnego wpływu użycia nanosrebra lub nanomiedzi na rośliny (Miao i in., 2007; Monica i Cremonini, 2009; Musante i White, 2010). Niektóre wyniki badań wykazały, że toksyczność nanocząstek Ag jest niewielka przy ekspozycji na niskie stężenie wynoszące $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, jednocześnie przy większym ich stężeniu obserwowano hamowanie wzrostu roślin (Wood i in., 1996; Ferguson i Christer, 1998; Mcgeer i in., 2000). Doświadczenie przeprowadzone przez Parveen i Rao (2015), z użyciem AgNC wykazało zwiększoną zdolność kiełkowania nasion rospłenicy perłowej (*Pennisetum*

glaucum). Tymczasem inne badania wykazały, że nanocząstki nie miały wpływu na przebieg procesu kiełkowania, ale wpłynęły na wzrost tych roślin. An i in. (2008), odnotowali wzrost zawartości askorbinianu i chlorofilu w liściach szparagów spryskanych nanocząsteczkami srebra. Podobnie soja potraktowana nanożelazem wykazała zwiększoną masę liści (Roghayyeh i in., 2010). Badania laboratoryjne przeprowadzone przez Ma i in. (2010) wykazały, że niskie stężenie AgNC ($<1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) może być toksyczne dla sadzonek rzodkiewki pospolitej (*Arabidopsis thaliana*). AgNC o wielkości w przedziale od 20 nm do 80 nm powodowały wyraźne zahamowanie wzrostu, a zakres ich fitotoksyczności to stężenie wynoszące $340 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ dla cząstek o wielkości 20 nm oraz 40 nm.

Lee i in. (2008a), zbadali pobieranie i translokację CuNC w fasoli złotej (*Phaseolus radiata*) oraz pszenicy (*Triticum aestivum*) rosnących na pożywce agarowej. Badanie wykazało, że CuNC mogły przenikać przez błonę komórkową. Współczynniki bioakumulacji (zawartość Cu w suchej masie roślinnej podzielona przez zawartość Cu w podłożu) dla roślin zbożowych, w tym pszenicy, narażonych na $1000 \text{ mg CuNC} \cdot \text{dm}^{-3}$ wynosiły odpowiednio 8 i 32. Zastosowanie CuNC w małym stężeniu w przypadku rzepaku korzystnie wpłynęło na wzrost roślin, podczas gdy większe stężenia spowodowały reakcję toksyczną (Zhang i Savage, 2006). Interakcje komórek roślinnych z NC prowadzą do modyfikacji ekspresji genów roślinnych i związanych z nimi szlaków biologicznych, które w ostatecznym efekcie wpływają na wzrost i rozwój roślin (Ghormade i in., 2011; Khiew i in., 2011; Hassan i in., 2013). Efekty oddziaływania nanaocząstek na różne gatunki roślin mogą znacznie różnić się w zależności od fazy rozwojowej, sposobu i czasu trwania ekspozycji oraz od kształtu, wielkości, składu chemicznego, stężenia, struktury powierzchniowej, agregacji i rozpuszczalności NC (Khiew i in., 2011). Zhao i in. (2016), zbadali reakcję roślin ogórka w hodowli hydroponicznej we wczesnym stadium rozwoju na dwa stężenia CuNC (10 i $20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Wyniki wykazały, że CuNC zakłóca pobieranie wielu makro- i mikroelementów, takich jak: P, S, Na, Mo, Zn i Fe. Dane metabolometryczne wykazały również, że CuNC w obu tych stężeniach wywołały znaczne zmiany metaboliczne w liściach oraz korzeniach ogórka. Kolejne analizy przeprowadzone przez Trujillo-Reyes i in. (2014) metodą ICP-OES wykazały, że zabiegi, w których użyto Cu/CuO NC, skutkowały znaczącym nagromadzeniem Cu w korzeniach. Wszystkie zabiegi z obecnością Cu w strukturze korzeni wzmogły aktywność katalazy – CAT, ale zmniejszały aktywność peroksydazy askorbinianowej – APX. Ponadto na skutek aplikacji nano-Cu/CuO zmianie uległa jakość odżywcza sałaty. Obserwowano znacznie większą zawartość Cu, Al i S, a mniejszą Mn, P, Ca i Mg w porównaniu z obiektem kontrolnym. Uogólniając, wpływ np.: AgNC i CuNC na rośliny zależy od ich gatunku i wieku, wielkości stężenia aplikowanego nanopreparatu oraz warunków doświadczenia (tj. temperatury, sposobu aplikacji i czasu trwania).

2.3. Oddziaływanie metali i nanometali na proces fotosyntezy

Przyjmuje się, że efektem toksycznego oddziaływania metali na komórkę roślinną jest hamowanie procesu fotosyntezy. Obecność metali powoduje zmniejszenie zawartości chlorofilu i karotenoidów w błonie komórkowej liścia. Wynika to z hamowania syntezy obydwu rodzajów barwników. Podczas syntezy chlorofilu metale, takie jak: Hg, Cd, Cu, Ni, Zn i Pb, mogą być wbudowywane w cząsteczkę chlorofilu zamiast atomu Mg, co powoduje później upośledzenie jego funkcji wychwytywania fotonów. Metale mogą również hamo-

wać syntezę karotenoidów, które uczestniczą w procesie wylapywania fotonów oraz chronią cząsteczki chlorofilu przed fotooksydacją. Ograniczenie zawartości tych barwników oddziałuje również na białka wchodzące w skład fotosystemów. Kompleks chlorofilobiałkowy, zlokalizowany głównie w tylokoidach gran i wychwytyjący fotony światła, ulega degradacji, jeżeli nie jest związany z chlorofilem *b*. Ponadto do jego stabilizacji jest także wymagana obecność chlorofilu *a* i karotenoidów. Metale oddziałują także na przepływ elektronów przez łańcuch fotosyntetyczny, zlokalizowany w błonach tylakoidowych. Zawierają one bowiem w swojej cząsteczce atom Cu, który jest zastępowany przez inny metal powodujący jego inaktywację (Woźny i Przybył, 2004). Niektóre spośród metali ciężkich są niezbędnymi mikroelementami. Wśród nich można wyróżnić: miedź (Cu), mangan (Mn) i cynk (Zn) oraz inne zbędne, a nawet szkodliwe: kadm (Cd) i ołów (Pb). Niezbędne mikroelementy są wymagane w niewielkich ilościach do prawidłowej aktywności rośliny, ale w podwyższonych stężeniach są toksyczne dla roślin (Wuana i Okieimen, 2011).

Miedź (masa atomowa 63,5 g i gęstość $8,96 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), jest jednym z najwcześniej poznanych metali przejściowych i zajmuje 25 miejsce wśród pierwiastków obecnych w skorupie ziemskiej pod względem liczności. Miedź jest uznana za pierwiastek śladowy występujący w niskim stężeniu w tkankach biologicznych, ale niezbędny do życia (Alloway, 1995). Rozpuszczalność miedzi w glebie w dużej mierze zależy między innymi od pH gleby i zawartości rozpuszczonej materii organicznej (Bravin i in., 2012) i staje się łatwo dostępną przy pH poniżej 6 (Adriano, 2001; Brun i in., 2001).

Miedź (Cu) jest niezbędnym mikroelementem dla roślin i odgrywa ważną rolę w wielu procesach metabolicznych obejmujących poza fotosyntezą, oddychanie oraz wzrost i rozwój roślin (Fernandes i Henriques, 1991), chociaż w wyższym stężeniu może działać jak „trucizna pokarmowa” (Macysmiec, 1997). Nadmiar Cu hamuje działanie dużej liczby enzymów i zakłóca wiele procesów biochemicznych roślin, w tym fotosyntezę i syntezę pigmentów fotosyntetycznych. Być może najważniejszym zakłóceniem jest zablokowanie fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów (ETC), prowadzącego do wytwarzania rodników, które rozpoczynają peroksydacyjne reakcje łańcuchowe (Babu i in., 2001).

Wpływ NC na zawartość pigmentów fotosyntetycznych w liściach roślin, wykazany przez nielicznych badaczy, potwierdza fakt, że ich zawartość zmienia się w zależności od rodzaju i odmiany rośliny, zdolności roślin do adaptacji środowiskowych, warunków uprawy, dostępności wody oraz rodzaju i stężenia nanocząstek (Ghafariyan i in., 2013; Falco i in., 2015; Taran i in., 2017). Badania przeprowadzone przez Taran i in. (2017), dotyczące wpływu nanokoloidu Zn i Cu na dwie odmiany pszenicy ozimej uprawianej w kulturze piaskowej, wykazały zmiany w zawartości chlorofilu *a* i *b*. Po namoczeniu nasion w roztworze nanokoloidów zauważono zwiększenie o 13% zawartości chlorofilu w liściach pszenicy w porównaniu z obiektem kontrolnym. Wykazano, że zawartość chlorofilu była zróżnicowana w zależności od ilości wody dostępnej dla roślin. W warunkach ograniczonej dostępności wody obserwowano znaczne obniżenie całkowitej zawartości chlorofilu w liściach, które mieściło się w przedziale od 29% do 45% w zależności od uprawianej odmiany. W nasionach potraktowanych nanokoloidem i umieszczonych w korzystnych warunkach z optymalną ilością wody obserwowano wzrost zawartości chlorofilu *a* w liściach pszenicy odmian ‘Stolichna’ o 12% i ‘Acveduc’ o 10%. Zmniejszenie zawartości chlorofilu *a* w liściach odmiany ‘Stolichna’ w warunkach obniżonej zawartości wody w podłożu wynosiło 24% w porównaniu z roślinami z obiektu kontrolnego. Stwierdzono również, że stosunek chlorofilu *a* do chlorofilu *b* w liściach pszenicy zmienia się w ramach

współdziałania NC oraz warunków uprawy. Zawartość karotenoidów w liściach pszenicy po aplikacji NC zmniejszyła się lub zwiększyła nawet do 31% w zależności od warunków uprawy (Taran i in., 2017).

2.4. Czynniki determinujące plon nasion rzepaku i jakość oleju

Dążenia producentów do uzyskania wysokiej jakości i satysfakcjonującej wielkości plonu nasion rzepaku są poprzedzone działaniami zmierzającymi do osiągnięcia tego celu. Wybór stanowiska, klasy gleby, rejonu uprawy, doboru odmian, zdolności kiełkowania oraz uszlachetnienia materiału siewnego, agrotechniki, nawożenia i ochrony roślin, jak i terminu zbioru oraz sposób przechowywania są niezwykle istotnymi czynnikami warunkującymi uzyskanie zadawalającego efektu końcowego. Jednakże istnieją także czynniki zewnętrzne – uprawowe i środowiskowe (w okresie rozwoju roślin oraz podczas procesu ich dojrzewania), na które producent nie ma żadnego wpływu lub ten wpływ jest niewielki, a które w równie istotny sposób decydują o wielkości i jakości plonu. W związku z zachodzącymi zmianami klimatycznymi, wpływ stresogennych czynników siedliskowych na rozwój nasion i ich dojrzewanie jest zróżnicowany i złożony. Na ogół ich efekt jest szkodliwy i objawia się zmniejszeniem liczby i jakości nasion. W następstwie działania szeregu czynników siedliskowych zaobserwowano zróżnicowanie składu chemicznego, wielkości i masy nasion oraz zdolności ich kiełkowania i wigoru. Wśród najważniejszych czynników modyfikujących plon i jakość nasion wyróżnia się dostępność wody, temperaturę, nawożenie roślin oraz intensywność światła. Występujące wahania i zmiany temperatury w okresie wegetacji nie sprzyjają plonowaniu nasion i są zależne od gatunku roślin. Na przykład niska temperatura podczas formowania nasion powoduje zmniejszenie zawartości białka u jednych roślin, a u innych korzystnie wpływa na ich dorodność. Również słabsze naświetlenie roślin macierzystych skutkuje wytwarzaniem małych nasion (Grzesik i in., 2012). Zgodnie z teorią zrównoważonego rolnictwa i globalnym dążeniem do ograniczenia nadmiernego stosowania związków chemicznych w produkcji roślinnej oraz zwiększającym się arealem roślin uprawianych metodami ekologicznymi lub integrowanymi, zwraca się szczególną uwagę na zwiększoną adaptację nasion i roślin do negatywnych czynników środowiskowych. Dlatego też sektor rolny wykorzystuje przyjazne dla środowiska technologie, w tym również nanotechnologię umożliwiającą zapewnienie alternatywy dla obecnie stosowanych agrochemikaliów (Ruban i in., 2009; Sawinska i in., 2014). Przyjazne warunki do rozwoju roślin można również osiągnąć przez wprowadzenie rotacji upraw, wysiewu w danym regionie nowo wyhodowanych odmian, odpornych na patogeny i szkodniki oraz optymalne terminy siewu lub sadzenia, jak i użycie nanocząstek do otoczkowania nasion w celu ich uszlachetnienia (Tarchevsky, 2001; Ozerkovskaya, 2002; Yina i in., 2010; Voropaeva i in., 2012). Początkowa ochrona nasion rzepaku przez stosowanie nanootoczek elementarnymi formami Zn, Mn, Pa, Pt, Au, Ag i Cu nie tylko zapewni ochronę nasiona, ale wymaga dużo mniejszych nakładów niż metody powlekania, stosowane w chwili obecnej (Manjunatha i in., 2016). Główną przyczyną stosowania nawozów w rolnictwie jest dostarczanie odpowiednich makro- i mikroskładników, ponieważ zwykle gleby nie zawierają ich odpowiedniej ilości. Uważa się, że 35-40% wydajności plonu zależy od ilości zastosowanego nawozu, mającego bezpośrednio wpływ na wzrost roślin. Aby rozwiązać w inteligentny sposób rozpatrywane problemy, warto posłużyć się właśnie nanotechnolo-

gią. Nawozy można dostarczać co najmniej na kilka sposobów – bezpośrednio do gleby lub na liście roślin. Nawozy nano są w stanie trzykrotnie zwiększyć efektywność wykorzystania składników odżywczych, a także zapewnić odporność na stres (Manjunatha i in., 2016). Niezależnie od rodzaju uprawy nanotechnologia może stać się dziedziną przyjazną dla środowiska naturalnego (Manjunatha i in., 2016).

2.4.1. Kielkowanie nasion i wzrost roślin

Warunki kiełkowania nasion rzepaku decydują w dużej mierze o prawidłowej obsadzie i późniejszej kondycji roślin. Kielkowanie to bardzo złożony i dynamiczny etap w rozwoju każdej rośliny. Rzepak zasiany w optymalnym terminie w glebę o odpowiedniej wilgotności wschodzi zwykle w ciągu tygodnia, a w bardzo sprzyjających warunkach wschody można obserwować nawet po 3-4 dniach (Muśnicki, 2003). W trakcie kiełkowania nasion zachodzą zmiany fizjologiczne i biochemiczne, takie jak: wznowienie aktywności oddychowej (Bewley i in., 2013), aktywacja mechanizmów naprawczych, synteza białka według przechowywanego i nowo syntetyzowanego mRNA (Bewley, 1997; Ni i in., 2007). Uaktywniają się enzymy i syntetyzowane są witaminy (Majewska, 1994). Skrobia, białka i tłuszcze są rozkładane na związki stanowiące źródło energii i substratów dla nowo syntetyzowanych substancji. Kielki wykazują bardzo dużą aktywność enzymatyczną, m.in. enzymów amylolitycznych, proteolitycznych, czy lipolitycznych, a ich ilość jest od 10 do 100 razy większa niż w dorosłych roślinach (Piesiewicz i Mielcarz, 2001). Już w pierwszej fazie kiełkowania zaczynają działać enzymy – ksylanaza i glukanaza, rozkładające hemiceleulozy (materiał budulcowy ścian komórkowych) na cukry proste. Działanie tych enzymów powoduje rozluźnienie komórek bielma i warstwy aleuronowej ziarniaków, co otwiera innym enzymom drogę do wnętrza wszystkich komórek. W trakcie kiełkowania ziarniaków wielocukry są rozkładane przez całą gamę enzymów do dwucukrów i cukrów prostych.

Na proces kiełkowania roślin może wpływać wiele czynników abiotycznych, które ograniczają lub hamują jej rozwój. W ostatnio opublikowanych badaniach wykazano również, że zaprawianie nasion wyraźnie poprawia proces kiełkowania w optymalnych i niekorzystnych warunkach środowiskowych w zależności od zastosowanych związków (Li i in., 2010; Pace i in., 2012; Benincasa i in., 2013; Hojjat, 2015). Wielu badaczy oceniało też skutki oddziaływania nanocząstek na kiełkowanie i wzrost roślin w celu promocji tych środków i ich wykorzystania w rolnictwie (Zheng i in., 2005). W ostatnich latach pojawiła się znaczna liczba publikacji dotyczących interakcji nanocząstek z roślinami (Lin i Xing, 2007; Battke i in., 2009; Lin i in., 2009). Większość z prezentowanych w nich badań skupia się na potencjalnej toksyczności NC dla roślin, jak również pozytywnych, negatywnych lub nieistotnych skutkach ich oddziaływania. Badania wskazują, że nanocząstki w zakresie stężeń 10-40 mg·dm⁻³ są w stanie znacznie poprawić zdolność kiełkowanie nasion oraz wzrost roślin pomidorów (Khodakovskaya i in., 2012). Podobne badania dotyczące wpływu nanocząstek metali (Si, Pd, Au, Cu) na kiełkowanie nasion sałaty, które przeprowadzili Shah i Belozeroва (2009), wskazują, że nanocząsteczki (Pd i Au w małym stężeniu; Si i Cu w wyższych stężeniach i kombinacji Au i Cu) miały pozytywny wpływ na kiełkowanie nasion, mierzony stosunkiem masy pędów do korzeni oraz wzrostem siewek. Ponadto srebro jest doskonałym stymulatorem wzrostu roślin (Sharon i in., 2010). Badania przeprowadzone przez Pokhrela i Dubeya (2013), dotyczące zastosowanie nanocząstek Ag i Zn do

oceny zdolności kiełkowania kapusty i kukurydzy, wykazały wydłużenie czasu kiełkowania oraz wydłużenie korzeni, potwierdzając przypuszczenia o bardziej toksycznym działaniu na rośliny niż ich odpowiedników w postaci jonów wolnych metali.

Żywotność nasion rzepaku jest ważnym zjawiskiem we współczesnym rolnictwie, dlatego też zauważalny postęp w dziedzinie nanotechnologii i jej wykorzystania w rolnictwie prowadzi do wzmoczonych badań dotyczących zrozumienia oddziaływania nanocząsteczek srebra i miedzi (AgNC, CuNC) na nasiona w fazie ich kiełkowania (Hojjat, 2015).

2.4.2. Przechowywanie nasion

Proces przechowywania nasion rzepaku wiąże się nieuchronnie ze zmianą ich składu chemicznego oraz starzeniem (Wiklon i Cox, 1992; Sadowska i in., 1995), co skutkuje osłabieniem procesów życiowych i prowadzi do naturalnego zamierania. Nasiona rzepaku są o wiele bardziej narażone na zepsucie niż ziarno zbóż. Tłuszcz, szczególnie w nasionach wilgotnych i uszkodzonych, pod wpływem enzymów i tlenu z powietrza ulega łatwemu rozkładowi. Odmienny skład nasion zbóż i rzepaku jest uwarunkowany przez różnice w możliwości wiązania wody przez zarodek i pozostałą część nasiona. Zalecana wilgotność przechowalnicza nasion rzepaku wynosi 7%, a zbóż 14% (Rudko, 2011).

Proces przechowywania nasion rzepaku wiąże się ze stałymi zmianami ich jakości, lecz zakres tych zmian jest uwarunkowany ich jakością w momencie załadunku do silosów (odmianą nasion, wilgotnością, zanieczyszczeniami czy poziomem ich uszkodzenia), sposobem obróbki pozbiorowej, warunkami przechowywania (temperaturą i obciążeniami) oraz długością okresu przechowywania (Tys i in., 2002a; b; Kachel-Jakubowska i Szpryngiel, 2006; Kachel-Jakubowska, 2008). Składowanie nasion o podwyższonej wilgotności oraz niespełniających wyżej opisanych warunków prowadzi do strat finansowych i wpływa na jakość wytwarzanych produktów żywnościowych, głównie na ich właściwości zdrowotne. Długotrwałe przechowywanie nasion wilgotnych (powyżej 7%) prowadzi zawsze do pogorszenia ich jakości powodowanej przez rozwój grzybów (Rusinek i Tys, 2011). Mając na uwadze stan nasion przed procesem przechowywania, należy dobrać odpowiednią metodę realizacji tego procesu. Stosowane powszechnie techniki przechowywania mają za zadanie zapewnienie optymalnych warunków fizykochemicznych podczas procesu magazynowania, tj. ograniczających procesy życiowe nasion oraz rozwój drobnoustrojów. Istnieją trzy podstawowe sposoby przechowywania nasion: w stanie suchym, ochłodzonym (w temperaturze 5-12°C) lub bez dostępu tlenu, które w zależności od potrzeb można łączyć ze sobą (Nellist, 1998; Tys i in., 2011; Rusinek i in., 2012).

Przyjmuje się, że główną przyczyną zakażenia mikrobiologicznego, pogarszającego jakość przechowywanego surowca jest kurz, którego cząstki obecne w magazynach oraz w elewatorach przenoszą zarówno zarodniki grzybów mikroskopowych, potocznie nazywanych pleśniami, jak i komórki bakteryjne (Chełkowski, 1999). Silne namnożenie się grzybów na nasionach stanowi doskonałe źródło pokarmu dla owadów i gryzoni, przenoszących drobnoustroje w różne partie magazynu, powodując w konsekwencji zwiększenie ich liczebności. Ich rodzaj i ilość zależy od klimatu, położenia geograficznego i terenu uprawy. W nasionach świeżo zebranych z pola znajdują się gatunki właściwe dla konkretnego terenu, natomiast po ich zmagazynowaniu skład mikroorganizmów zmienia się. Zgodnie z literaturą na całym świecie występują te same grzyby magazynowe (Skriegen,

1989). Mikroflorę zasiedlającą nasiona można podzielić na połową i wglębną. Pierwsza z nich to mikroflora powierzchniowa, obejmująca szereg drobnoustrojów, z których tylko nieliczne mogą wnikać w głąb zdrowego nasiona i powodować jego psucie. Do tych grzybów można zaliczyć pleśnie z rodzaju: *Alternaria*, *Fusarium*, *Heminthosporium* oraz *Cladosporium*. Grzyby te wykazują stosunkowo małą aktywność enzymatyczną, a dobrze wysuszone ziarno lub nasiona nie stanowią dla nich dobrej pożywki, co staje się przyczyną ich wymierania (Trojanowska, 2002). Przyjmuje się, że wymieranie grzybów polowych w trakcie przechowywania zależy od wilgotności, temperatury oraz długości przechowywania nasion. Zanikanie grzybów polowych może być spowodowane aktywnością antagonistyczną większości grzybów przechowalniczych (mikroflora wglębna) oraz bakterii (Trojanowska, 2002). „Grzyby przechowalnicze” to grzyby rozwijające się na nieprawidłowo przechowywanych nasionach przy mniejszym lub większym ich zapleśnieniu. Można do nich zaliczyć kilka grup gatunków z rodzaju *Aspergillus* (kropidlaki), *Penicillium* (pędzlaki) czy *Rhizopus* (pleśniakowce), potwierdzonych wynikami badań Trojanowskiej (2002) oraz Kornilowicz-Kowalskiej i in. (2000). Najbardziej podatne na rozwój grzybów są nasiona niedojrzałe oraz zawierające znaczne ilości wody, a także o wysokim stopniu uszkodzenia (Bielecka i in., 1994).

Zanieczyszczenie nasion grzybami oraz ich toksynami może nastąpić na każdym etapie technologicznym – podczas wegetacji na polu oraz w czasie niewłaściwego składowania nasion w okresie późniejszym. Z uwagi na to, że wilgotność nasion po zbiorze bardzo często przekracza zalecaną wilgotność przechowalniczą, nasiona rzepaku muszą być poddane procesowi suszenia i schłodzenia. Wysuszenie i schłodzenie nasion nie gwarantują jednak przechowania bez pogorszenia ich jakości. Podczas długotrwałego przechowywania nasion w silosie, w wyniku zmian temperatury na zewnątrz oraz ogrzewania południowych ścian magazynu, w przechowywanej masie ziarna może wystąpić różnica temperatur. W nawilżonych warstwach ziarna lub nasion następuje uaktywnienie procesów życiowych, które prowadzą do samonagrzewania. Jest to zjawisko negatywne, pogarszające jakość materiału, niestety często występujące w praktyce przechowalniczej. Sytuacji tej można przeciwdziałać, przez przewietrzenie masy nasion. W przypadku zaniechania tego zjawiska w przechowywanej masie nasion – na skutek wzrostu temperatury i wilgotności – następuje rozwój grzybów pleśniowych (Pronyk i in., 2006).

Wśród licznych metabolitów na szczególną uwagę zasługuje ergosterol (ERG), uważany za steroid występujący w grzybach, bakteriach, glonach i roślinach (Axelsson i in., 1995; Anonymous, 2000) umożliwiający oszacowanie biomasy grzybów (Seitz i in., 1979). Występuje on w błonie komórkowej większości grzybów pleśniowych (Newell i Fell, 1992; Gourama i Bullerman, 1995; He i in., 2000; Zhao i in., 2005). Analiza zawartości ERG wskazuje na poziom nie tylko żywej biomasy grzybowej, ale częściowo też całkowitej biomasy grzybowej obecnej w badanej próbce. W licznych badaniach stwierdzono znaczną korelację pomiędzy zawartością ergosterolu a grzybową suchą masą w systemach glebowo-wodnych (Newell, 1994), ryżu (Saxena i in., 2001), ziarnach kukurydzy (Moretzsohn de Castro i in., 2002; Gawrysiak-Witulska i in., 2008; Stuper i in., 2008) czy w oleju z soi (Xue i in., 2006). Na ich podstawie stwierdzono, że jest on głównym steroidem występującym w wielu rodzajach grzybów, między innymi w *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* i *Paecilomyces* (Müller i Schwadorf, 1990; Wiśniewska i Buško, 2005). Porażenie nasion przez te gatunki powoduje pogorszenie nie tylko jakości materiału siewnego, ale również jego wartości technologicznej (Veisz i in.,

1997; Leśnic i in., 2008). Podczas gdy niektóre grzyby stanowią naturalną mikroflorę jądra ziarna lub nasion, inne mogą powodować inwazję pleśni i toksyczne zanieczyszczenie nasion. Jest to związane z produkcją mikotoksyn podczas wzrostu roślin i przechowywania plonów, a w końcowym rezultacie ich szkodliwe efekty można obserwować zarówno u ludzi, jak i u zwierząt (Bottalico, 1999; Šrobárová i Pavlová, 2001; Chełkowski i in., 2001; Perkowski i in., 2008). Obecność ergosterolu w grzybach czyni go dobrym markerem inwazji grzybów w żywności i artykułach rolnych.

2.5. Właściwości oleju z nasion rzepaku

Jakość wytłoczonego oleju rzepakowego zależy przede wszystkim od stanu nasion użytych do jego produkcji. Można to osiągnąć poprzez odpowiednią uprawę z zastosowaniem środków zapewniających im dobrą jakość końcową po zbiorze oraz w czasie procesu przechowywania. Rzepak zbierany w Polsce charakteryzuje się wilgotnością w przedziale od 7% do 17%, jednak znaczna jego część (80-90%) wymaga dodatkowo czyszczenia oraz dosuszania (Rybacki i in., 2001). Po zbiorze nasiona są przechowywane w silosach, które zapewniają pewien stały stan środowiska. Podczas długoterminowego przechowywania rzepaku niezbędna jest kontrola odpowiedniej temperatury oraz wilgotności, dlatego też należy stale monitorować stan przechowywanego surowca (Rusinek i Kobyłka, 2014). Innymi czynnikami wywierającymi wpływ na jakość końcową produktu używanego do tłoczenia oleju są: stopień jego zanieczyszczenia, uszkodzenia, wilgotność oraz dojrzałość nasion, które to w zasadniczy sposób determinują jakość końcowego produktu (Matthäus i Brühl, 2003; 2008). Do wytłaczania oleju rzepakowego na zimno stosuje się prasy o różnej konstrukcji i parametrach wytłaczania (prędkość obrotowa ślimaka, średnica dyszy, temperatura głowic) (Savoire i in., 2013). Otrzymywany w ten sposób olej cechuje się wysoką jakością i dobrymi walorami żywieniowymi, a ponadto sama technologia jest prosta, tania i ekologiczna. Mimo niezaprzeczalnych zalet, olej tłoczony na zimno otrzymuje się przy jednoczesnych dużych stratach tłuszczu pozostającego w wytlókach w porównaniu z ekstrakcją rozpuszczalnikami, po której mała ilość tłuszczu resztkowego pozostaje w śrucie poekstrakcyjnej. Wytlóki z wysoką zawartością tłuszczu mogą być jednak wykorzystywane jako pasza dla zwierząt. Olej z rzepaku może być produkowany metodą tłoczenia na zimno, na ciepło bez ekstrakcji oraz na ciepło z ekstrakcją (olej rafinowany). Olej rafinowany, nazywany powszechnie olejem do gotowania, jest najbardziej popularny na rynku i używany do różnych celów kulinarnych. Jednak w ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie olejem tłoczonym na zimno, charakteryzującym się naturalnym smakiem i zawartością cennych witamin (Wroniak i in., 2006).

W technologii tłoczenia na zimno, jako metody oczyszczania oleju, dopuszcza się tylko filtrowanie lub odwirowanie osadu i ewentualnych resztek wytlóku. Nie można więc usunąć niektórych niepożądanych składników, np. produktów hydrolizy, utlenienia, chlorofili lub zanieczyszczeń chemicznych, takich jak: jony metali, pozostałości pestycydów, czy też wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, których poziom efektywnie obniża rafinacja chemiczna (Singh i Bargale, 2000; Rozporządzenie, 2006; Matthäus, 2012). Oleje tłoczone na zimno zawierają głównie triacyloglicerole (ok. 95%) oraz niewielką ilość diacylogliceroli, monoacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych. Wśród nich można wymienić takie grupy związków, jak: fosfolipidy, tokoferole i tokotrienole, sterole wolne

i zestryfikowane, węglowodory (skwalen), alkohole triterpenowe, karotenoidy, chlorofile oraz inne związki nadające barwę, które są bardzo cennymi składnikami pod względem żywieniowym (Szajdek i Borowska, 2004; Gunstone, 2005; Kamal-Eldin, 2005). Udział tych składników w oleju zależy głównie od jakości, rodzaju surowca i jego odmian oraz warunków klimatycznych uprawy i zabiegów agrotechnicznych, którym były poddawane rośliny (Berganza i in., 2003).

Obecność karotenoidów w diecie człowieka obniża zawartość nadtlenków lipidów w osoczu krwi (Robak i Zachwieja, 1998), chroniąc tym samym przed chorobami wywołanymi przez reaktywne formy tlenu – RFT (ROS z ang. *Reactive Oxygen Species*). Karotenoidy obniżają ryzyko zawału serca, udaru mózgu, choroby niedokrwiennej serca, zaćmy, starczego zwyrodnienia plamki ocznej, choroby Alzheimera, chorób nowotworowych i innych degeneracyjnych chorób wieku starczego (Robak i Zachwieja, 1998).

Obecność wyżej wymienionych przeciwutleniaczy może zapewnić stabilność oleju tłoczonego na zimno przez okres od 6 do 12 miesięcy. Zakres przemian oksydacyjnych w olejach zależy od warunków przechowywania: temperatury, dostępu tlenu i światła oraz rodzaju opakowania (Prescha i in., 2008). Przy kontakcie tłuszczu z tlenem możliwe jest zapoczątkowanie wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych. Światło może zainicjować utlenianie tlenem singletowym o wyjątkowo wysokiej reaktywności, 1450 razy większej niż tlen tripletowy (Bartosz, 2003; Tańska i Rotkiewicz, 2003). Okres ten zależy również od ogólnej zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), zwłaszcza kwasu α -linolenowego (Choe i Min, 2006). Duża zawartość PUFA i innych substancji sprzyjających rozkładowi oleju w wysokiej temperaturze jest przyczyną ograniczenia stosowania olejów nierafinowanych w procesie smażenia, bowiem powodują one zmiany jego smaku oraz barwy (Warner, 2008).

Według międzynarodowego zbioru norm dotyczących żywności – Codex (1999) oleje tłoczone na zimno są to roślinne oleje i tłuszcze jadalne pozyskane w wyniku procesów mechanicznych, takich jak tłoczenie, wykluczając zastosowanie wysokiej temperatury. Mogą one być oczyszczane tylko przez wypłukiwanie wodą, sedymentację, filtrację lub wirowanie. Przy pozyskiwaniu olejów i tłuszczów typu *virgin* dopuszczone jest zastosowanie temperatury w celu zwiększenia wydobycia frakcji tłuszczowej (Codex, 1999). Tłoczenie oleju na zimno jest najstarszą naturalną metodą jego pozyskiwania, zaliczaną do ekologicznych, gdyż do jej przeprowadzenia nie są wykorzystywane żadne rozpuszczalniki.

Szczególne wartości olejów tłoczonych na zimno wynika z faktu, że są one bogatym źródłem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (JKT) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) (Gunstone, 2005). Kwasy tłuszczowe nasycone (SFA) i monoenoowe (MUFA) mogą być syntetyzowane w organizmie człowieka, natomiast kwasy polienowe (PUFA) nie są syntetyzowane ze względu na brak układów enzymatycznych zdolnych do wprowadzania wiązań podwójnych w pozycjach $n-6$ i $n-3$ łańcucha węglowego i muszą być dostarczone w spożywanych pokarmach. Do WNKT są zaliczane tzw. niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT). Są nimi: kwas α -linolenowy (ALA, 18:3, $n-3$), kwas linolowy (LA, 18:2, $n-6$) oraz kwas γ -linolenowy (GLA, C18:3, $n-6$) (Sionek, 1997; Karłowicz-Bodalska i Bodalski, 2007). Mimo że zawartość tłuszczu w nasionach rzepaku jest uwarunkowana genetycznie, to ekspresja tej cechy zależy w znacznym stopniu od sposobu uprawy i zbioru, nawożenia, pogody i innych czynników (Hoffmann i in., 1979). Skład i proporcje kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym są bardzo korzystne dla diety człowieka ze względu na dużą zawartość kwasu oleinowego oraz niezbędnych

nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) – linolowego i linolenowego. Skład chemiczny olejów decyduje o ich potencjale prozdrowotnym oraz zastosowaniu w codziennej praktyce (Junker i in., 2001; Drozdowski, 2007; Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak, 2012). Zwraca się szczególną uwagę na *n*-3 (kwas linolenowy) oraz *n*-6 (kwas linolowy) ze względu na istotną rolę, jaką odgrywają w funkcjonowaniu organizmu ludzkiego. Regulują m.in. gospodarkę lipidami, obniżając poziom cholesterolu i triacylogliceroli we krwi, oraz są szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania układów nerwowego i krążenia (Contreras i Stanley, 2002; Krzymański, 2009). Dla wartości żywieniowej ważna jest nie tylko ich ilość, ale także ich proporcja. Należy zwrócić uwagę na bardzo korzystny stosunek kwasów omega-6 (*n*-6) do omega-3 [*n*-3; kwas dokozaheksaenowy (DHA, 22:6 *n*-3) i kwas eikozapentaenowy (EPA, 20:5 *n*-3)]. Stosunek ten wynosi około 2:1 i jest prawie idealny biorąc pod uwagę potrzeby żywieniowe (Kunachowicz i in., 2005; Wathes i in., 2007; Tańska i in., 2009) oraz zdrowotne (Matthäus i Brühl, 2008).

Obecność wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) sprawia, że oleje spożywcze stają się podatne na utlenianie, pogarszające jednocześnie walory smakowe produktu, a tym samym długość okresu przechowywania produktu. Główną zachodzącą reakcją jest utlenianie lipidów, prowadzące do degradacji nienasyconych kwasów tłuszczowych, która właśnie decyduje o końcowej jakości produktu. Biorąc pod uwagę wartość odżywczą i stabilność oksydacyjną, do najważniejszych czynników determinujących jakość olejów jadalnych należy niewątpliwie skład kwasów tłuszczowych i obecność związków towarzyszących o właściwościach przeciwutleniających (m.in. karotenoidów) oraz substancje niepożądane działające proutleniająco (m.in. chlorofili, metali) (Ziemlański i Budzyńska-Topolowska, 1991; Wroniak i in., 2006; Cichosz i Czczot, 2011). Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych może wynikać z kilku podstawowych reakcji dotyczących otaczającego środowiska: samoczynnie katalizowanej temperatury utleniania, jonów metali i wolnych rodników; utleniania zainicjowanego przez enzym lipoksygenazy; fotoutleniania będące efektem obecności promieniowania UV oraz powietrza (Berset i Cuvelier, 1996; Gutiérrez i in., 2002; Gharby i in., 2011). Wszystkie te zjawiska stają się przyczyną powstania rodziny związków, wodoronadtlenków (LOOH) (Judde, 2004). Podczas utleniania są wytwarzane produkty będące przyczyną rozwoju nieprzyjemnego zapachu, pogorszenia jakości oleju w wyniku obniżenie wartości odżywczej, a także w ostatecznym efekcie toksycznego działania na organizm człowieka (Jacobsen i Nielsen, 2008; Matthäus i in., 2010; Shahidi i Zhong, 2010).

Codex (1999) przedstawia dopuszczalną wartość parametrów świadczących o stopniu oksydacji olejów tłoczonych na zimno. Liczba kwasowa (LK) określa ilość $\text{mg KOH} \cdot \text{g}^{-1}$ potrzebną do zobojętnienia wolnych kwasów tłuszczowych w 1 g tłuszczu. Służy do oceny stopnia zmian hydrolitycznych tłuszczu, a jej maksymalna dopuszczalna wartość wynosi $\leq 4 \text{ mg KOH} \cdot \text{g}^{-1}$. Liczba nadtlencowa (LN) jest miarą zawartości nadtlenców i jest traktowana jako wskaźnik stopnia utlenienia (zjęłczenia) tłuszczów. Maksymalna dopuszczalna wartość LN w olejach powinna wynosić $\leq 15 \text{ mmola O} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Jakość oleju tłoczonego na zimno można określić wieloma metodami, które mogą wykorzystywać liczne środki chemiczne, a przygotowanie próbek analitycznych wymaga poświęcenia znacznej ilości czasu. Obecnie alternatywą stało się wykorzystanie technik spektroskopowych, w tym podczerwieni Attenuated Total Reflection (ATR) z transformacją Fouriera (FTIR) (Mueller i in., 2013), które polegają na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego na badany materiał. Analiza ATR-FTIR stała się potężnym narzędziem

dziem analitycznym w badaniach olejów jadalnych i tłuszczów (Guillén i Cabo, 2000; Tay i in., 2002). Siłą technik ATR-FTIR jako narzędzia analitycznego jest możliwość szybkiego i łatwego przeprowadzania analiz wieloskładnikowych (Van de Voort, 1992), dotyczących oceny zarówno jakościowej jak i ilościowej analizy substancji stałych, płynnych oraz próbek żeli, łącznie z ich charakterystyką chemiczną (Pinto i in., 2010; Mueller i in., 2013). Metody spektroskopowe mają tę zaletę, że umożliwiają analizę bardzo małych próbek rzędu kilkudziesięciu mikrometrów sześciennych oraz minimalizują, a nawet całkowicie pomijają etap przygotowania próbki (Li-Chan i in., 2010).

2.6. Stres abiotyczny oraz oksydacyjny i jego wpływ na rośliny

Uprawa roślin rzepaku jarego, szczególnie w warunkach polowych, zależy ściśle od warunków zewnętrznych, środowiskowych i uprawowych. Niekorzystny wpływ jakiegoś czynnika lub kilku czynników jednocześnie wywołuje stres, czyli zaburzenie homeostazy organizmu roślinnego (Capanoglu, 2010). Wynikiem tego jest nieprawidłowy wzrost i rozwój roślin, co nieuchronnie prowadzi do obniżenia wielkości plonu i jego jakości. Susza, wysokie temperatury, intensywność światła, toksyczność stosowanych substancji chemicznych czy też obecność metali ciężkich, niedobór lub nadmiar makro- i mikroelementów, nieprawidłowy odczyn gleby oraz zasolenie są przyczyną wielu stresów dla roślin. Aby uniknąć takich sytuacji, niezbędne są działania, do których należą m.in. prawidłowa agrotechnika (w tym wapnowanie, nawożenie i ochrona) oraz odpowiedni dobór następstwa roślin uprawianych w kolejnych sezonach wegetacyjnych (płodozmian) (Wang i in., 2003; Pan i in., 2006; Imahori i in., 2008). Stresy prowadzą do szeregu zmian morfologicznych, fizjologicznych, fizycznych, biochemicznych, molekularnych i metabolicznych, które mają niekorzystny wpływ na wzrost i produktywność nasion (Wang i in., 2003; Capanoglu, 2010). W dziedzinie biologii funkcjonuje wiele definicji stresu. Jednak najbardziej uniwersalna z nich określa stres jako stan zaburzenia homeostazy organizmu w wyniku oddziaływania jednego lub kilku czynników stresujących (Herrero i in., 2008; Duque i in., 2013). Podstawą odporności roślin na warunki stresowe jest wydajne działanie naturalnych mechanizmów obronnych (Imahori i in., 2008). Liczne badania nad stresami abiotycznymi wykazują, że efekt ich działania (ograniczenie wzrostu i prawidłowego funkcjonowania rośliny) polega w mniejszym lub większym stopniu, w zależności od czynników stresujących, na generowaniu reaktywnych form tlenu (RFT), które wywołują wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny (Moller i in., 2007; Mourato i in., 2012). Wśród reaktywnych form tlenu (RFT) wyróżnia się te o charakterze rodnikowym, do których są zaliczane rodniki hydroksylowy ($\text{OH}^\bullet$) i anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\bullet-}$, oraz o charakterze nierodnikowym, jak nadtlenek wodoru (H_2O_2) i tlen singletowy ($^1\text{O}_2$). Są one stale generowane we wszystkich aerobowych systemach biologicznych (Sharma i in., 2012; Bartosz, 2013; Das i Roychoudhury, 2014). RFT w warunkach niestresowych są pośrednikami wielu reakcji metabolicznych, jednakże czynniki stresowe, w tym również obecność metali śladowych (Cu, Fe, Zn, Cd, Hg itp.), a szczególnie ich zbyt duże stężenia są przyczyną generowania znacznego nadmiaru RFT i prowadzą do stresu oksydacyjnego w komórce lub sytuacji, w której więcej RFT jest wytwarzane niż metabolizowane. Proces powstawania stresu oksydacyjnego zachodzi w wielu miejscach komórki: fotosyntetycznym i mitochondrialnym łańcuchu przenośników elektronów. Zdolność cząsteczek RFT do uszkodzania wynika z ich

dużej reaktywności oraz zdolności do inicjowania łańcucha reakcji rodnikowych, w których każda cząsteczka RFT reaguje z cząsteczką niebędącą wolnym rodnikiem, powodując powstawanie kolejnego wolnego rodnika. RFT reaguje z wieloma biocząsteczkami komórkowymi białek, kwasów nukleinowych czy lipidów. Reaktywne formy tlenu są w stanie utlenić prawie każdy związek w komórce, co może prowadzić do uszkodzenia wewnętrznego (Berney i in., 2006) na skutek:

- Peroksydacji lipidów przez zaburzenia błon biologicznych, atakując szczególnie nienasycone kwasy tłuszczowe. Powoduje to ich niestabilność i rozpad w kolejnych reakcjach z wytworzeniem aldehydów i alkoholi. Zatrzymanie tego zjawiska następuje najczęściej za sprawą obecności antyoksydantów o małej masie cząsteczkowej, do których można zaliczyć karotenoidy (Herrero i in., 2008).
- Zaburzenia w obrębie kwasów nukleinowych (nukleozydy i reszty cukrowe). Zjawisko to prowadzi do mutacji (Sairam i Srivastava, 2000; Mourato i in., 2012).
- Peroksydacji białek, powodując zmianę ich struktury oraz ich inaktywację (Herrero i in., 2008).
- Inaktywacji fotosyntetycznego łańcucha przenośników elektronów, powodując zahamowanie wytwarzania cukrów z powodu oksydacyjnego uszkodzenia chlorofilu, karotenoidów, białek występujących w obrębie fotosystemów oraz przenośników elektronów i lipidowej struktury błon (Woźny i Przybył, 2004).

Silne uszkodzenie komórki przez RFT może prowadzić do jej śmierci. Śmierć uszkodzonej komórki może być również częścią strategii obronnej rośliny. W czasie stresu oksydacyjnego nadtlenek wodoru funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa. Powoduje napływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy, czego rezultatem jest niekontrolowane, gwałtowne wytworzenie dużej ilości RFT – tzw. wybuch oksydacyjny prowadzący w krótkim czasie do śmierci komórki. Jest to w tym przypadku śmierć pragmatyczna, czyli kontrolowana genetycznie, którą można określić jako reakcję nadwrażliwości HR (ang. *hypersensitive reaction*). Śmierć pragmatyczna stanowi podstawę reakcji obronnej rośliny polegającej na strategii „spalonej ziemi”, czyli wycofaniu wszelkich substancji odżywczych z objętej stresem komórki. Zapobiega to rozprzestrzenianiu się czynnika stresującego do innych komórek lub wystąpieniu śmierci niekontrolowanej (nekrozy) (Woźny i Przybył, 2004). Jednak komórka roślinna nie jest bezbronna wobec powstających RFT. Wykształciła ona wiele neutralizujących je mechanizmów, które mogą być regulowane w zależności od warunków środowiskowych umożliwiających przeżycie. Cząsteczki H_2O_2 są również odpowiedzialne za programowaną śmierć komórki, powodując kaskadę odwracalnych fosforylacji białek, której wynikiem jest indukcja ekspresji genów związanych z reakcjami obronnymi. Najważniejszymi składowymi systemu neutralizacji nadmiaru RFT są:

- enzymy antyoksydacyjne, do których należą dysmutazy nadtlenkowe SOD (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD neutralizujące rodniki ponadtlenkowe ($^1\text{O}_2$) z wytworzeniem H_2O_2 , katalazy CAT oraz duża grupa peroksydaz POX (peroksydaza gwajakolowa, askorbinianowa) redukujących H_2O_2 (Miller i in., 2010),
- obecność drobnocząstkowych antyoksydantów: karotenoidów, flawonoidów, tokoferoli, fenoli itp., wyłapujących reaktywne formy tlenu,
- aktywność cyklu askorbinianowo-glutationowego, w którym biorą udział cztery enzymy: peroksydaza askorbinianowa, reduktaza monodehydroaskorbinianu, reduktaza dehydroaskorbinianu i reduktaza glutationu.

Należy pamiętać, że metale, działając bezpośrednio oraz powodując zwiększenie wytworzenia RFT, prowadzą do inaktywacji enzymów antyoksydacyjnych. Część z nich jest kofaktorami wielu enzymów (Cu, Zn), które wchodzi w skład Cu/Zn-SOD. Dlatego ich niedobór jak i nadmiar oddziałuje niekorzystnie na enzymy antyoksydacyjne i może doprowadzić do indukcji stresu oksydacyjnego w komórce. W efekcie uszkadzają strukturę błon biologicznych, powodują zaburzenia ich funkcji, objawiające się głównie zwiększeniem przepuszczalności oraz inaktywacją białek enzymatycznych wchodzących w ich skład. Staje się to przyczyną zaburzenia wielu procesów metabolicznych komórki odpowiadających za pobieranie substancji ze środowiska, fotosyntezę czy oddychanie mitochondrialne (Woźny i Przybył, 2004).

Skutkiem obecności metali są aktywowane odmienne szlaki systemu antyoksydacyjnego, co zależy od rodzaju i organu rośliny. Z jednej strony metale, powodując zwiększone wytwarzanie RFT, stymulują aktywność systemu antyoksydacyjnego, a z drugiej strony szczególnie w przypadku dużych ich stężeń blokują jego działanie na skutek uszkodzenia enzymów, obniżenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych, przyłączenia się metali do ich grup funkcjonalnych zawierających atomy: S, O oraz N czy zastąpienia właściwych metali pełniących funkcję kofaktorów w cząsteczkach enzymów antyoksydacyjnych przez inne metale śladowe, co uniemożliwia przeprowadzenie katalizowanych przez nie reakcji (Kabata-Pendias i Pendias, 1999).

2.6.1. Mechanizmy obronne roślin

W czasie ewolucji rośliny wykształciły wiele efektywnych mechanizmów obronnych przeciwdziałających niekorzystnym warunkom środowiskowym. Jeśli mechanizmy kompensujące stres działają wydajnie, następuje swoista równowaga pomiędzy powstawaniem RFT, a aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, co zapobiega występowaniu negatywnych zmian (Capanoglu, 2010; Imahori, 2014). Istniejące systemy można podzielić na dwie podstawowe grupy, czyli enzymatyczne oraz nieenzymatyczne. System ten obejmuje przeciwutleniacze rozpuszczalne w tłuszczu (α -tokoferol i karoten) (Parida i Das, 2005), substancje polepszające rozpuszczalność w wodzie (askorbinian i glutation) oraz enzymy, takie jak: katalaza (CAT), peroksydaza askorbinianowa (APX), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza gwajakolowa (GPX) i reduktaza glutationowa (GR) (Demiral i Turkan, 2005; Khan i Panda, 2008; Imahori, 2014).

2.6.1.1. Enzymatyczny mechanizm antyoksydacyjny

Najważniejsze enzymy szlaków antyoksydacyjnych w komórkach roślinnych są ulokowane w różnych kompartmentach i wykazują wysoką specyficzność wobec substratu utleniającego (RFT) (Gill i Tuteja, 2010). Jednym z podstawowych z tej grupy enzymów jest **dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.1)**. SOD jest istotnym przeciwutleniaczem występującym praktycznie we wszystkich organizmach oddychających tlenem (Meng i in., 2013). Stanowi ona pierwszą linię obrony przeciwko stresowi oksydacyjnemu w chloroplastach (Fridovich, 1975; Holmblad i Söderhäll, 1999; Alscher i in., 2002). Jest też najbardziej aktywnym wewnątrzkomórkowym antyoksydantem. Jej aktywność na ogół nasila się

podczas stresu wywołanego metalami ciężkimi (Gill i Tuteja, 2010). Istnieją trzy główne rodziny tej metaloproteiny: mangan SOD (Mn-SOD), żelazo SOD (Fe-SOD) i miedź-cynk SOD (Cu/Zn-SOD) (Gupta i in., 1993). Różnią się one kofaktorem, którym jest jon metalu przejściowego oraz miejscem działania w komórce. W odniesieniu do lokalizacji subkomórkowej stwierdzono, że Mn-SOD występuje w mitochondriach i peroksosomie, Fe-SOD w chloroplacie i Cu/Zn-SOD w cytozolu, chloroplacie i prawdopodobnie w przestrzeni pozakomórkowej (McKersie i in., 1993; Bueno i in., 1995; Mourato i in., 2012).

Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) jest pierwszym enzymem antyoksydacyjnym, który został zidentyfikowany i scharakteryzowany. Występuje głównie w peroksysomach i rozkłada nadtlenek wodoru do tlenu i wody (Mhamdi i in., 2010; Mourato i in., 2012). Katalaza jest tetramerycznym białkiem hemowym oraz jednym z najszybciej działających enzymów w przyrodzie. W ciągu minuty jedna molekula katalazy może przekształcić ok. 6 mln nad-tlenków wodoru (Gill i Tuteja, 2010). Enzym ten może również reagować z wodorotlenkami organicznymi (wodorotlenkiem metanu MeOOH) (Ali i Alqurainy, 2006). Aktywność katalazy waha się w dość dużym zakresie podczas stresu wywołanego przez metale ciężkie. W zależności od stężenia H_2O_2 katalaza działa dwojako. Jeśli stężenie jest niskie $< 1 \mu\text{M}$, wykazuje aktywność jak peroksydaza i może utleniać różne niskocząsteczkowe donory wodoru (etanol lub kwas askorbinowy). Natomiast gdy koncentracja wodoru jest wysoka, katalaza wykazuje typową dla niej szybką, katalityczną redukcję tego związku, w której to H_2O_2 jest donorem i akceptorem protonów i elektronów (Scandalios i in., 1997; Mhamdi i in., 2010).

Peroksydazy (EC, 1.11.1.) są to kolejne enzymy powszechnie występujące w komórkach roślinnych, uczestniczące w wielu innych procesach metabolicznych roślin. Ich aktywność antyoksydacyjna polega na usuwaniu nadtlenu wodoru przy udziale chemicznie zróżnicowanych reduktorów (Mourato i in., 2012). **Peroksydaza gwajakolowa (GPX, EC 1.11.1.7)** jako reduktor wykorzystuje związki fenolowe. Ma niski stopień specyficzności substratowej. Jednym z jej substratów jest IAA (kwas 3-indolilooctowy). Produkty działania GPX mają funkcje fizjologiczne, dlatego też określa się ją jako peroksydazę metaboliczną występującą głównie w wakuoli, ścianie komórkowej i przestrzeniach apoplastu (Asada, 1997). Ponadto uczestniczy w lignifikacji, gojeniu ran i obronie roślin przeciw stresom biotycznym i abiotycznym (Gill i Tuteja, 2010), biosyntezie etylenu i łączeniu glikoprotein bogatych w hydroksyprolinę uczestniczącą w procesach wzrostowych, jak i starzenia się roślin (Asada, 1997; Hiraga i in., 2001). Jej aktywność jest również wykrywana w chloroplastach, peroksysomach oraz mitochondrii. **Peroksydaza askorbinianowa (APX, EC 1.11.1.11)** usuwa H_2O_2 , wykorzystując kwas askorbinowy (AA) jako reduktor, a jej koncentracja w chloroplastach wynosi około $70 \mu\text{M}$ (Asada, 1997). Wykazuje większe powinowactwo do nadtlenu wodoru niż katalaza, co powoduje, że jest zaangażowana głównie w stałe utrzymywanie niskiego stężenia H_2O_2 (Mittler, 2002; Mourato i in., 2012). **Reduktaza glutationowa (GR, EC, 1.6.4.2)** należy do grupy ważnych enzymów utrzymujących pulę zredukowanego glutationu (GSH) i redukujących dehydroaskorbinian (DHA). Występuje głównie w chloroplastach, choć małe ilości innych izoform tego enzymu znajdują się też w cytozolu i mitochondriach oraz w plastydach korzeni (Gill i Tuteja, 2010; Yousuf i in., 2012). Za 80% aktywności GR w liściach odpowiada forma występująca w chloroplastach (Yousuf i in., 2012).

Wymienione enzymy występują praktycznie we wszystkich komórkach roślin oraz stanowią doskonały mechanizm ich obrony przed stresem środowiskowym, również po apli-

kacji nanocząstek. Głównym systemem usuwania nadtlenu wodoru w chloroplastach roślinnych jest cykl, w którym peroksydaza askorbinianowa (APX) jest kluczowym enzymem (Asada, 1992). Znaczny wzrost aktywności SOD w roślinach pomidora i w rączniku pospolitym, które poddano działaniu AgNC, potwierdzili Song i in. (2013) oraz Yasur i Rani (2013). Aktywność ta zwiększała się lub malała w zależności od dawki użytego nanopreparatu. Potwierdzają to liczne publikacje, w których wykazano, że w odpowiedzi na stres środowiskowy i aplikację nanocząstek aktywność APX wzrasta wraz z działaniami innych enzymów, takich jak: reduktaza, CAT, SOD, GPX czy GR (Asada, 1992; Shigeoka i in., 2002; Ishikawa i Shigeoka, 2008; Servin i in., 2013; Majumdar i in., 2014).

2.6.1.2. Nieenzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne

Nieenzymatyczne przeciwutleniacze stanowią drugą grupę mechanizmów przeciwutleniających. Składają się na nie aktywności niskocząsteczkowych związków antyoksydacyjnych zdolnych do reakcji redoks. Nie tylko chronią różne składniki komórki przed uszkodzeniami, ale również odgrywają istotną rolę w rozwoju roślin przez potęgowanie procesów komórkowych, takich jak mitozę, wydłużanie komórek, starzenie się i śmierć komórki (De Pinto i De Gara, 2004). Związki te różnią się stopniem hydrofilowości. W grupie substancji hydrofilowych można wymienić kwas askorbinowy, glutation czy flawonoidy, a w grupie substancji hydrofobowych tokoferole i karotenoidy (Gill i Tuteja, 2010). **Kwas askorbinowy (AA)** występuje we wszystkich tkankach roślinnych, choć jego stężenie jest na ogół wyższe w tkankach fotosyntetyzujących, w merystemach oraz w niektórych owocach. Kwas AA jest uważany za najpotężniejszy wymiatacz RFT, ponieważ może ulegać wielu enzymatycznym oraz nieenzymatycznym reakcjom redoks (Barnes i in., 2002). **Glutation (GSH)** jest uważany za jeden z najistotniejszych związków broniących komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Znajduje się go we wszystkich kompartmentach komórkowych, a także w apoplazmie (Gill i Tuteja, 2010). Glutation efektywnie usuwa $^1\text{O}_2$, H_2O_2 oraz $\text{HO}^\bullet$, chroni też grupy tiolowe w białkach przed utlenianiem. Jest on również prekursorem fitochelatyn, polipeptydów pełniących ważną rolę w detoksykacji metali ciężkich w komórkach roślin (Gill i Tuteja, 2010). **Tokoferole** (witamina E) należą do związków rozpuszczalnych w tłuszczach, posiadających zdolność neutralizacji RFT. Są powszechnie uważane za główny antyoksydant błon komórkowych, ponieważ mają zdolność przerywania procesu reakcji łańcuchowej autooksydacji lipidów. Najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne ma jeden z nich, α -tokoferol (El-Bassiouny i in., 2005; Ali i in., 2015a; b). **Prolina** należy również do aminokwasów o silnych zdolnościach redukcji RFT. Jest również osmoprotektantem, stabilizuje białka, chelatuje metale oraz jest inhibitorem peroksydacji lipidów (Gill i Tuteja, 2010). Jej stężenie w komórkach roślinnych zwiększa się w odpowiedzi na oddziaływanie stresów abiotycznych (Verbruggen i Hermans, 2008; Płazek i in., 2014). **Karotenoidy** należą do związków izoprenowych, rozpuszczalnych w tłuszczach, jak również do rodziny lipofilowych przeciwutleniaczy, które występują w plastydach zarówno fotosyntetycznych, jak i nefotosyntetycznych tkanek roślinnych. Wykazują aktywność przeciwutleniającą, chroniącą mechanizm fotosyntezy na różne sposoby, poprzez reakcję z produktami LPO w celu zakończenia reakcji łańcuchowych, wychwytywanie $^1\text{O}_2$ i rozpraszanie nadmiarowej energii fotosyntetycznej w postaci ciepła, a także mają zdolność neutralizowania RFT, zapobiegania powstawaniu $^1\text{O}_2$ przez wzbudzenie chlorofilu ($\text{Chl}^\bullet$) (Das i Roychoudhury, 2014).

2.7. Gleba jako środowisko życia mikroorganizmów

Współdziałanie mikroorganizmów i roślin wyższych doprowadza do powstania pewnego stanu równowagi w układach biocenotycznych w środowiskach glebowych, którą zakłóca każdy nowy dopływ substancji chemicznej lub gwałtowna zmiana właściwości fizyczno-chemicznych gleby. Gleba, w odróżnieniu od innych tworów geologicznych, cechuje się tzw. aktywnością biologiczną, o której decydują m.in. mikroorganizmy glebowe i wydzielane przez nie enzymy (Kieliszewska-Rokicka, 2001). Gleba posiada kilka podstawowych właściwości, wśród których można wyróżnić budowę fazową, w tym fazę stałą, umożliwiającą tworzenie się agregatów oraz dostępność mikro- i makroelementów, które stanowią o tym, że tworzy ona optymalne środowisko do wzrostu i rozwoju występujących obok siebie zróżnicowanych organizmów glebowych (Nannipieri i in., 2003; Chaney i in., 1998). Gleba stanowi środowisko biologicznie niejednorodne (heterogenne), w którym występują znaczne różnice w składzie i właściwościach, zależnie od miejsca, z którego pochodzi (Agnelli i in., 2004; Libudisz i in., 2007; Stępniewski i Stępniewska, 2009).

2.7.1. Aktywność enzymatyczna gleby

Poziom aktywności enzymatycznej gleb stanowi czuły wskaźnik ich żyzności i urodzajności oraz informuje o zmianach ekologicznych zachodzących w środowisku glebowym (Bielińska i in., 2000). Istnieją czynniki hamujące działanie enzymów określane jako inhibitory reakcji enzymatycznych. Reakcje te mogą być nieodwracalne, jak i odwracalne i zachodzą z udziałem małych cząsteczek oraz jonów metali ciężkich. Terminem „metale ciężkie” są określane te pierwiastki, których gęstość jest większa od umownie przyjętej granicy $5 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, a liczba atomowa przekracza 20. Wśród 90 pierwiastków występujących naturalnie w przyrodzie, do metali ciężkich zalicza się 53, ale tylko nieliczne z nich mają znaczenie biologiczne (Schützendübel i Polle, 2002). Metale te mogą być pobierane przez żywe komórki, a przez to wpływać na metabolizm organizmów oraz funkcjonowanie ekosystemów. W grupie tej znajdują się metale zaliczane do mikroelementów, takie jak: Fe, Mn, Zn, Ni, Cu, Mo, Co i Cr. Zarówno ich nadmiar, jak i niedobór może zakłócić wzrost i rozwój organizmu. Inne metale: Hg, Ag, Cd i Pb oraz metaloid As nie należą do składników niezbędnych dla roślin, natomiast w mniejszym lub większym stopniu wykazują działanie toksyczne dla roślin i mikroorganizmów (Schützendübel i Polle, 2002).

Metale, takie jak: Cu, Pb czy Ag, łatwo wiążą się w sposób nieodwracalny ze wszystkimi białkami, powodując rozległe zmiany ich konformacji, prowadzące do denaturacji, której towarzyszy wypadanie białka w postaci osadu. Powszechne zanieczyszczenia gleb metalami lub pestycydami wiążą się ze zmianą aktywnością dehydrogenaz, co dowodzi słuszności uznania tych enzymów za doskonale indykatory skażenia środowiska glebowego (Chaperon i Sauve, 2007).

Aktywność dehydrogenaz (DHA) w glebie jest związana z czynnością wielu enzymów (dehydrogenaz) lub systemów enzymatycznych, powszechnie występujących w drobnoustrojach glebowych (Thalmann, 1968; Ross, 1971). Liczni autorzy wskazują, że pomiar aktywności dehydrogenaz stanowi wskaźnik funkcji oddechowej, związanej z aktywnością metaboliczną całej populacji bakteryjnej (Brzezińska, 2002; Moreno i in., 2007; Koper i in., 2008; Vogeller i in., 2008). Gianfreda i in. (2005) wykazali, że udział dehydrogenaz

w przemianach materii organicznej gleby prowadzi do wytworzenia energii i produktów, którymi przede wszystkim są CO_2 i H_2O . Szereg badań wskazuje również na fakt, że dehydrogenazy glebowe uwolnione z żywych komórek mikroorganizmów są nietrwałe w środowisku glebowym i szybko ulegają dezaktywacji. Stąd też pomiary aktywności tej grupy enzymów są utożsamiane z obecnością i żywotnością całej populacji drobnoustrojów (Włodarczyk, 2000; Singh i Kumar, 2008). Można zatem stwierdzić, że aktywność dehydrogenaz – DHA określa intensywność i kierunek przemian biochemicznych w procesach przekształcania materii organicznej gleby. Obecnie aktywność enzymów glebowych jest wykorzystywana jako wskaźnik ogólnej aktywności biologicznej gleby oraz jej żyzności, bardziej niż inne wskaźniki biologiczne, takie jak intensywność oddychania czy też określanie liczebności mikroorganizmów (Koper i in., 2004; Roldan i in., 2005; Yang i in., 2005; Jezierska-Tys i Frąc, 2008; Stręk i Telesiński, 2015). Istnieje wiele czynników środowiskowych wpływających aktywująco na DHA. Aktywność enzymatyczna może być zatrzymana lub obniżona przez inne cząsteczki – inhibitory. Z kolei aktywatory enzymatyczne to cząsteczki zwiększające aktywność enzymów. Można tu wyróżnić substancje niskocząsteczkowe przyspieszające przebieg reakcji, czyli jony metali (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} lub rzadziej Cu^{2+} albo Co^{2+}). Niektóre z aktywatorów enzymatycznych chronią enzymy przed działaniem czynników chemicznych, inne odczepiają od nieczynnych proenzymów, blokując tym samym te grupy chemiczne (Wolińska, 2010). Rolę aktywatorów DHA bardzo często przejmują również liczne czynniki środowiskowe, wśród których można wyróżnić warunki wodno-powietrzne, temperaturę, zawartość węgla organicznego lub odczyn gleby (Bielińska i Mocek, 2003; Lee i in., 2008b; Xiang i in., 2008). Jednak ważny jest również związek między aktywnością dehydrogenaz glebowych i poziomem profilu glebowego oraz porą roku. Zakres pH, w którym dehydrogenazy wykazują stosunkowo wysoką aktywność, mieści się między 5,5 a 7,8. Włodarczyk i in. (2002) stwierdzili maksimum aktywności DHA przy pH 7,1.

2.7.2. Oddziaływanie nanocząstek na glebę

W „systemie glebowo-roślinnym” gleba i rośliny są ściśle powiązane. Obecność nanocząstek w glebie może w bezpośredni sposób wpływać pozytywnie lub negatywnie, szkodzić roślinom, zwierzętom oraz ludziom (Anjum i in., 2013). Specyficzne właściwości nanocząstek określają ich zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu oraz rolnictwie, stwarzając jednocześnie zagrożenie dla różnych elementów środowiska i organizmów żywych (Klaine i in., 2008). Większość obecnie prowadzonych badań koncentruje się na toksyczności nanocząstek dla pojedynczych gatunków bakterii w warunkach laboratoryjnych (Pal i in., 2007; McQuillan i in., 2011; Levard i in., 2012). Przeprowadzono również wiele doświadczeń, które dostarczyły dowodów na to, że nanometale są szkodliwe w naturalnych warunkach glebowych i wpływają w znacznym stopniu na skład ich populacji mikroorganizmów (Kumar i in., 2011; 2012; Dinesh i in., 2012; Echavarri-Bravo i in., 2015; Sillen i in., 2015) czy też na biomasę bakteryjną (Hänsch i Emmerling, 2010) oraz procesy rozwoju bakterii (Ge i in., 2011). Skala produkcji nanocząstek prowadzi do ich nieuniknionego uwalniania do różnych elementów środowiska, w tym również gleb.

Dzięki niewielkim rozmiarom „nano” mogą łatwo przeniknąć do organizmów, wywołując wszelkie zmiany na poziomie DNA (Auffan i in., 2012). Nanocząstki mogą przenikać

do gleby w wyniku nawożenia mineralnego, zastosowania pestycydów (np. TiO_2 , Cu, CuO, Ag) oraz nawozów organicznych (Gogos i in., 2012; Ma i in., 2014). Zanieczyszczenie gleby wytworzonymi przez człowieka nanocząstkami może mieć miejsce także w wyniku użycia produktów zawierających w swoim składzie NC, jak: fotoogniwa, opony samochodowe lub paliwa. Pośrednie zanieczyszczenie gleby NC może wynikać również z ich osadzania się z powietrza lub z wody gruntowej (Pan i Xing, 2012). W ostatnim czasie liczba prowadzonych badań na obecność NC w glebie jest coraz większa, a ich większość dotyczy zarówno losu NC w glebach, jak i ich wpływu na ilość gatunków oraz liczebność organizmów glebowych (Choi i in., 2008; Du i in., 2011; Ge i in., 2011; Joško i Oleszczuk, 2013; Antisari i in., 2013). NC obecne w środowisku wpływają nie tylko na różnorodność gatunków drobnoustrojów glebowych, ale także na ich funkcje ekologiczne (He i in., 2011). Szczególnie ważne są badania wpływu NC na drobnoustroje glebowe, a dotychczas przeprowadzone w większości dotyczyły wpływu NC na aktywność enzymatyczną gleb i wykazały jej zróżnicowanie (Du in., 2011; Jin i in., 2013; Peyrot i in., 2014). Chociaż badania te dostarczyły mnóstwa cennych informacji, nadal pozostaje wiele niewyjaśnionych kwestii związanych z problematyką wpływu NC na aktywność enzymatyczną gleb. Właściwości gleby także wpływają na zachowanie NC srebra i miedzi (zawartość składników mineralnych, naturalna materia organiczna, czy pH), powodując różne efekty ekotoksykologiczne (Dinesh i in., 2012; Pan i Xing, 2012; Joško i Oleszczuk, 2013; Schlich i Hund-Rinke, 2015).

Zastosowanie nanomiedzi oraz nanosrebra jest głównym tematem badań dotyczących toksyczności biologicznej prowadzonych przez wielu naukowców (Murata i in., 2005; Throback i in., 2007; Navarro i in., 2008; Aruoja i in., 2009; Chang i in., 2012; Xu i in., 2012; Dimkpa i in., 2012a; 2012b; 2012c; 2013; Bondarenko i in., 2013; Hu i in., 2014). Doniesienia na temat potencjalnych skutków zwiększonej zawartości AgNC, CuNC lub CuONC w glebie i ich oddziaływania na mikroorganizmy glebowe są sprzeczne (Senjen, 2007; Anjum i in., 2015). Toksyczne oddziaływanie nanosrebra i nanomiedzi na drobnoustroje glebowe zostało szeroko opisane w wielu pracach (Murata i in., 2005; Throback i in., 2007; Mahapatra i in., 2008; Wang i in., 2010; Baek i An, 2011). W większości z nich powstające jony Cu^+ i Ag^+ były przyczyną śmierci patogenów oraz bakterii przyjaznych otoczeniu (Morones i in., 2005; Min i in., 2009; Dimkpa i in., 2012a). Poziom toksyczności zależy jednak od kilku czynników, do których można zaliczyć: czas oddziaływania, rodzaj gleby, stan utleniania metalu oraz ilości uwolnionych jonów Cu i Ag (Ben-Moshe i in., 2010). Brakuje jednak informacji dotyczących wpływu nieszkodliwego poziomu nanomiedzi na wtórny metabolizm, kondycję oraz przeżywalność bakterii w środowisku glebowym (Dimkpa i in., 2012a; 2012b). Zakłada się, że zakłócenie metabolizmu oraz przeżywalność bakterii zależy od dawki nanomiedzi. Według Mahapatry i in. (2008), zastosowane nanocząsteczki Cu, wielkości 80-160 nm, wykazały działanie antybakteryjne, powodując ograniczenie liczebności kolonii *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudokirchneriella aeruginosa* oraz szczepów *Salmonella paratyphi* i *Shigella*. A zdaniem Gajjara i in. (2009), hamowanie wzrostu może również występować w kolonii *Pseudomonas putida*. Badania przeprowadzone przez Senjen (2007) wykazały toksyczny wpływ nanosrebra na obecne w glebie bakterie heterotroficzne i bakterie chemolitotroficzne. Te organizmy dostarczają wielu istotnych składników odżywczych, istotnych w tworzeniu struktur gleby. To one mogą odgrywać kluczową rolę w dostępności azotu i rozkładzie materii organicznej. Bakterie te

również tworzą związki symbiotyczne z roślinami stanowiąc główne źródło azotu dla tych roślin oraz roślin następczych (Senjen, 2007).

Badania Oliveiry i Pampulhy (2006) dowodzą, że dehydrogenazy należą do najbardziej wrażliwych spośród badanych enzymów na zanieczyszczenie metalami. Badania przeprowadzone przez Samarajcewą i in. (2017), wykazały znaczne interakcje pomiędzy zastosowanymi AgNC a czasem ich działania na aktywność enzymów dehydrogenaz, wykazując największą ich wrażliwość w 14 dniu doświadczenia po zastosowaniu dawki wynoszącej $19,9 \text{ mg Ag} \cdot \text{kg}^{-1}$.

3.CHARAKTERYSTYKA PROBLEMU BADAWCZEGO

W Polsce nasiona rzepaku są wykorzystywane głównie do produkcji olejów przeznaczonych na cele spożywcze. W ostatnich latach, zarówno w Polsce, jak i na świecie, obok przerobu na oleje, półsurowce spożywcze i chemiczne, zwiększa się wykorzystanie nasion rzepaku w produkcji paliwa roślinnego do napędu silników wysokoprężnych.

Rzepak ozimy jest rośliną bardzo wrażliwą na wymarzenie, co czyni go zawodnym w uprawie. Rzepak jary stanowi pewne zabezpieczenie surowcowe dla przemysłu zarówno olejarskiego, jak i paliwowego.

Czynniki mające wpływ na jakość roślin, nasion i oleju pozyskiwanego z rzepaku to przede wszystkim: właściwa klasa gleby i rejon uprawy, odmiana, prawidłowa agrotechnika, poprawne nawożenie i ochrona roślin, zbiór, przechowywanie i przetwarzanie nasion (odpowiednia metoda tłoczenia).

Rzepak należy do roślin bardzo wrażliwych na wszelkie choroby grzybowe. Grzyby atakujące tkanki roślinne prowadzą do obniżenia plonów, a w skrajnych przypadkach doprowadzają do zamierania poszczególnych organów lub całych roślin. Ochrona roślin i nasion wymaga od plantatorów użycia dużej ilości środków ochrony, które mają zahamować rozwój patogenów chorobotwórczych. Na skutek działania środków ochrony roślin, jak i patogenów, rośliny są narażone na stres. Powoduje to zmianę funkcji tkanek roślinnych w odpowiedzi na czynnik stresowy (stresor). Intensywność stresu zależy od czasu trwania i natężenia bodźca. Zbyt długie narażenie na oddziaływanie stresora może stać się przyczyną uszkodzenia błon, białek oraz DNA rośliny.

Zabiegi, którym są poddawane rośliny w czasie wegetacji, mają zasadniczy wpływ na wielkość plonu (masę tysiąca nasion – MTN) oraz jakość zebranego surowca (wilgotność, zawartość tłuszczu, profil kwasów tłuszczowych, zawartość białka, zawartość makro- i mikroelementów), jak i jakość produktu końcowego otrzymanych z przetworzenia nasion, czyli oleju (zawartość barwników, barwę oleju, liczbę kwasową – LK, liczbę nadtlenną – LN, stabilność oksydacyjną).

Jak wynika z licznych publikacji zastosowanie preparatów zawierających różne formy metali w czasie uprawy, wpływa w różnicowany sposób na rozwój rośliny (np.: utrudnienia we wzroście, przyswajalności makro- i mikroelementów) (Bernal i in., 2012; Cambrollé i in., 2013; Mateos-Naranjo i in., 2013; Wang i in., 2015), a w późniejszym czasie na jakość otrzymywanego plonu w postaci nasion (MTN, zawartość tłuszczu i białka) (Kotecki i in., 1999; Murawa i in., 2000; Wenda-Piesik i in., 2017) oraz wytłoczonego oleju spożywczego (kolor, zawartość barwników, stabilność oksydacyjną) (Ziemiański i in., 1991; Murawa i in., 2000).

Alternatywą dla obecnie stosowanych środków ochronnych roślin jest wykorzystanie nanocząstek (Chowdappa i Gowda, 2013; JRC, 2014). Znane są też przykłady użycia nanonawozów, które w porównaniu z nawozami tradycyjnymi minimalizują straty składników odżywczych (Nair i in., 2010). Zastosowanie nanocząstek w nawozach ułatwia absorpcję składników mineralnych przez rośliny, przyspiesza wzrost roślin oraz zwiększa plon (Zheng i in., 2005; Gao i in., 2006).

Jednak nie zbadano kompleksowo wpływu nanocząstek na enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne oraz nie dokonano oceny ich wpływu na jakość zebranego surowca i produktów uzyskanych po jego przetworzeniu.

Niedostatek informacji w tej dziedzinie stanowił podstawę do sformułowania problemu naukowego oraz określenia celu i zakresu pracy. Postawiono następujące hipotezy:

1. Zastosowanie nanokoloidów srebra oraz miedzi w formie zaprawy nasion rzepaku jarego, aplikowanej przez namoczenie, przyczynia się do poprawy parametrów energii i zdolności kiełkowania.
2. Aplikacja nanokoloidów srebra oraz miedzi na nasiona w formie zaprawy oraz na rośliny rzepaku jarego, jako nanonawozu podawanego nalistnie, wpływa pozytywnie na wybrane parametry jakościowe zebranych nasion (MTN, zawartość tłuszczu i białka).
3. Nasiona rzepaku jarego zebrane z uprawy polowej, w której wykorzystano nanokoloidy srebra oraz miedzi i przechowywane w silosie, charakteryzują się większą odpornością i mniejszą ilością biomasy grzybowej (mierzoną ilością ergosterolu).
4. Aplikacja nanokoloidów srebra oraz miedzi na rośliny rzepaku jarego w fazie początku kwitnienia (61-66 BBCH) przyczynia się do poprawy stabilności oksydacyjnej oleju tłoczonego metodą na zimno.
5. Nanokoloidy srebra i miedzi niezależnie od stosowanej dawki nie mają wpływu na wzrost roślin rzepaku oraz nie powodują zakłóceń w równowadze między utleniaczami a przeciwutleniaczami i nie wywołują stresu oksydacyjnego.
6. Wysiew nasion zaprawionych nanokoloidami srebra oraz miedzi do gleby, a następnie oprysk roślin nanokoloidami zwiększa liczbę nanocząstek w glebie, powodując obniżenie aktywności dehydrogenaz.

4. CEL I ZAKRES PRACY

Zagadnieniem nabierającym coraz większego znaczenia jest wykorzystanie w rolnictwie nanokolidów metali jako samodzielnego nanonawozu lub dodatku do nawozów mineralnych, środków stymulujących wzrost roślin, lub zaprawy materiału siewnego. Koniecznością staje się określenie wpływu nanokolidów metali na materiał pochodzenia roślinnego oraz powstających z niego produktów, które mogą wywierać wpływ zarówno na zdrowie ludzi, jak i środowisko naturalne.

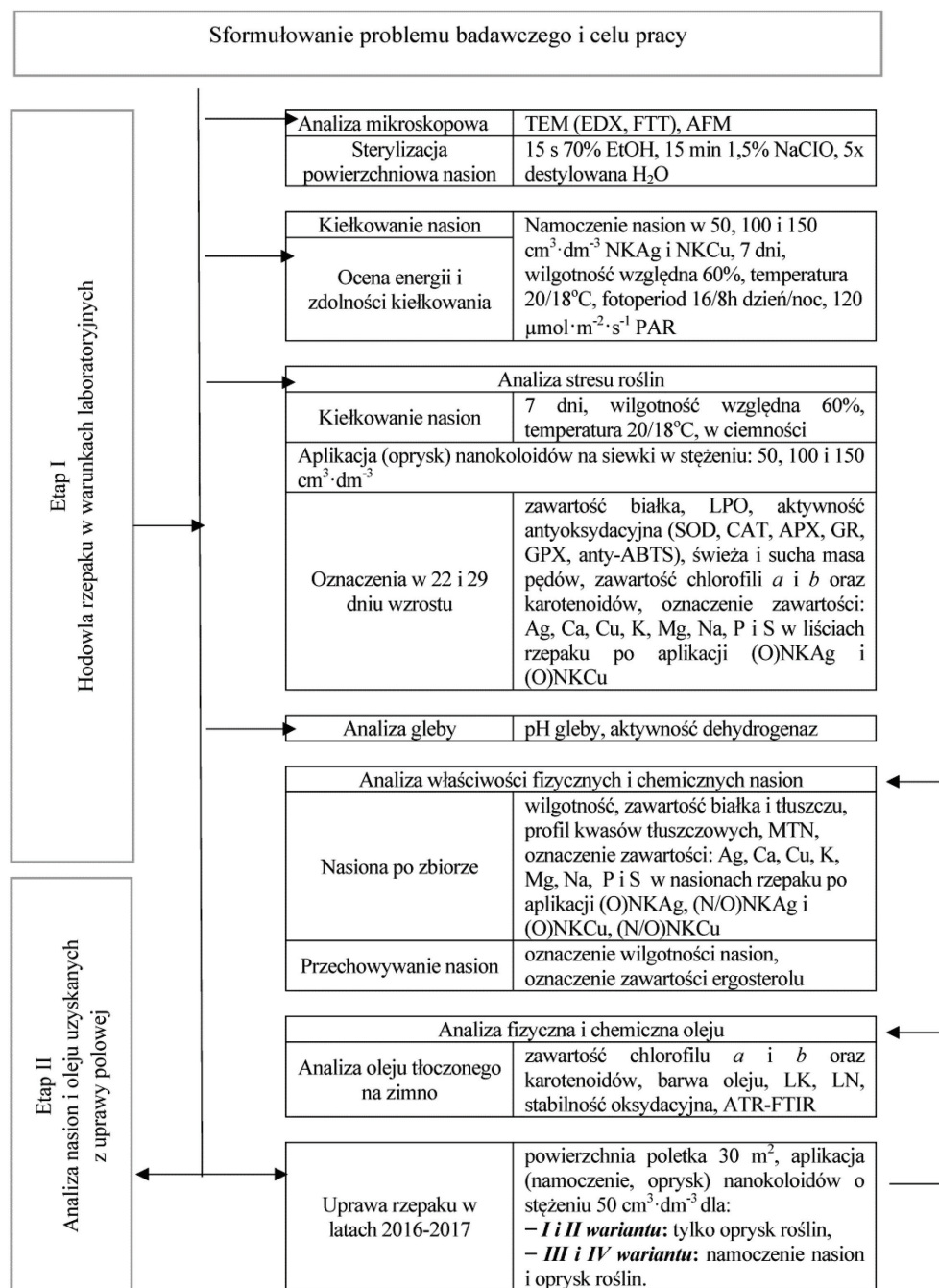
Główne cele pracy były skoncentrowane na:

1. potwierdzeniu autentyczności nanokolidów oraz zbadaniu liczby i rozmiaru nanocząstek w zakupionych preparatach nanokolidu miedzi oraz nanokolidu srebra;
2. określeniu wpływu nanometali nieorganicznych w postaci nanokolidu srebra (NKAg) i nanokolidu miedzi (NKCu) na wybrane właściwości rzepaku jarego (uprawa laboratoryjna);
3. określeniu parametrów jakości nasion pochodzących z uprawy rzepaku po aplikacji nanokolidów srebra i miedzi oraz oleju tłoczonego na zimno z nasion rzepaku jarego (uprawa polowa);
4. zbadaniu wpływu nanokolidów srebra i miedzi na mechanizmy obronne rośliny (stres oksydacyjny) oraz parametry wzrostu rzepaku jarego (uprawa laboratoryjna).

Cele szczegółowe dotyczyły:

- a. zbadania wpływu różnych dawek nanokolidów srebra i miedzi (NKAg, NKCu – 50, 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) na energię i zdolność kiełkowania nasion rzepaku;
- b. zbadania wpływu różnych dawek nanokolidów srebra i miedzi (NKAg, NKCu – 50, 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) na wzrost siewek oraz zawartość świeżej i suchej masy, na podstawowe parametry takie jak: zawartość białka, aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, APX, GR oraz GPX), stopień stresu oksydacyjnego (LPO) mierzony metodą oznaczania zawartości dialdehydu malonowego (MDA), ogólną aktywność antyrodnikową (anty-ABTS), zawartość Ag i Cu oraz makro pierwiastków (Ca, K, Mg, Na, P, S), zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w tkankach roślinnych;
- c. zbadania wpływu różnych dawek nanokolidów srebra oraz miedzi (NKAg i NKCu – 50, 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) na pH oraz aktywność dehydrogenaz w naturalnej glebie;
- d. zbadania wpływu nanokolidów srebra oraz miedzi zastosowanych w dawce 50 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ na jakość nasion rzepaku na podstawie masy tysiąca nasion (MTN), zawartości tłuszczu, kwasów tłuszczowych i białka, zawartości Ag i Cu oraz makro pierwiastków (Ca, K, Mg, Na, P, S).
- e. zbadania wpływu nanokolidów srebra i miedzi, zastosowanych w dawce 50 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ w uprawie poletkowej, na parametry fizyczne i chemiczne oleju wytłoczonego metodą na zimno, takie jak: barwa, zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów, wartości LK i LN, stabilność oksydacyjną oraz wyniki analizy ATR-FTIR;
- f. zbadania wpływu nanokolidów srebra oraz miedzi zastosowanych w dawce 50 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ na zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku poddanych procesowi przechowywania w silosie laboratoryjnym.

Zakres badań został przedstawiony na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat zakresu badań

5. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Obiektem badań były nasiona i rośliny uprawiane w warunkach laboratoryjnych (uprawa hydroponiczna i na szalkach Petriego). Doświadczenia laboratoryjne dają możliwość lepszej kontroli warunków wzrostu roślin (np. dzięki zastosowaniu jednorodnej pożywki) niż uprawa w warunkach polowych czy w doświadczeniach wazonowych. Oceniano następnie nasiona uzyskane z uprawy polowej oraz olej wytłoczony z tych nasion. Poddano również ocenie próbki gleby, oznaczając jej pH oraz aktywność dehydrogenaz gleby (uprawa *in vitro*). W celu potwierdzenia obecności nanocząstek w zakupionych preparatach nanokoloidów (ITP-2KAg PO i ITP-1KCu PO) przeprowadzono analizę mikroskopową (AFM i TEM).

5.1. Materiał do doświadczeń

W doświadczeniach użyto nieotoczkiowane nasiona rzepaku jarego (*Brassica napus* L. var. *arvensis f. annua*) odmiany 'Markus' pochodzące z Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR. Jest to odmiana populacyjna zarejestrowana w 2010 roku, która została oceniona przez PDO COBORU (Porejestrowe Doświadczalnictwo Odmianowe – Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych) jako najwyższej plonująca odmiana w Polsce w 2011 r. Plonuje ona lepiej niż odmiany mieszańcowe. Badania PDO COBORU (COBORU, 2011) wykazały, że charakteryzują się ona wysoką zawartością tłuszczu i niską zawartością glukozyzolanów, jak i wczesnym terminem kwitnienia oraz dojrzewania.

Nanomateriały do badań laboratoryjnych i polowych stanowiły dwa środki dostępne w handlu, w butelkach o pojemności 1 dm³, reprezentowane przez koloidy nanosrebra oraz nanomiedzi o stężeniu odpowiednio: $\geq 0,2\%$ srebra (ITP-2KAg PO) i $\geq 0,1\%$ miedzi (ITP-1KCu PO), wyprodukowane przez ITP-SYSTEM Sp. z o.o. w Dąbrowie Górniczej. Mianem koloidu, rozumiany w tym przypadku jako zawiesinę koloidalną, którą określa się niejednorodną mieszaninę, zwykle dwufazową, tworzącą układ dwóch substancji, w którym jedna z nich jest rozproszona w drugiej. Zakupione koloidy nanocząstek nie mają otoczek, są stabilizowane między innymi solami kwasów organicznych. Stężenia koloidów zostały dobrane tak, aby finalny użytkownik nie miał problemu z wykonaniem aplikacji w przypadku rolniczego zastosowania.

Próbki gleby z doświadczenia polowego pochodziły z gruntu ornego gospodarstwa rolnego w Czesławicach, wschodnia Polska, województwo lubelskie. Próbki gleby pobrano z warstwy powierzchniowej (0-20 cm) 15 poletek, a następnie wymieszano w celu uzyskania próbek reprezentatywnych.

5.2. Metody badań z wykorzystaniem mikroskopii

Zgodnie z podanym wcześniej schematem (rys. 1), wykonano badania liczby i wielkości nanocząstek w stosowanych nanokoloidach, wykorzystując mikroskop sił atomowych oraz transmisyjny mikroskop elektronowy (AFM i TEM).

5.2.1. Analiza metodą mikroskopii sił atomowych AFM

Analiza polegała na potwierdzeniu zawartości nanocząstek w preparatach. Wykonano ją w Centralnym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej UMCS w Lublinie. Wykorzystano mikroskop sił atomowych AFM firmy Veeco (USA) NanoScope V umożliwiający odwzorowanie powierzchni ciał stałych w powiększeniu i w trzech wymiarach w zakresie powiększenia od 2000 do 500 000 razy. Wiarygodność pomiarów jest zgodna z normą PN-EN ISO/IEC 17025. Preparaty do mikroskopii AFM uzyskano przez naniesienie kropli roztworu na płytkę miki przyklejoną do metalowego krążka i odparowanie roztworu. Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej. Zdjęcia uzyskane przy użyciu AFM zostały przetworzone w programie Nanoscope Analysis (Bruker).

5.2.2. Analiza metodą mikroskopii elektronowej TEM

Podstawową analizę polegającą na potwierdzeniu zawartości nanocząstek w preparatach przeprowadzono w Centralnym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej UMCS w Lublinie. Do analizy nanocząsteczek srebra i miedzi użyto wysokorozdzielczego elektronowego mikroskopu transmisyjnego Titan G2 60-300 firmy FEI.

Preparaty do mikroskopii transmisyjnej uzyskano przez naniesienie kropli roztworu na miedzianą siatkę mikroskopową pokrytą błoną węglową. Mikrografie zostały wykonane w trybie ciemnego pola mikroskopu elektronowego TEM. Średni rozmiar nanocząstek NKAg i NKCu oraz rozkład statystyczny ich wielkości w funkcji średnicy krótkiej (A) i długiej (B) osi elipsy został obliczony przy użyciu licencjonowanego oprogramowania (NIS-Elements 3.10) przez 5-punktowe dopasowanie kształtu elipsy.

5.3. Uprawa rzepaku w warunkach laboratoryjnych

Uprawa rzepaku w warunkach laboratoryjnych polegała na przygotowaniu preparatów nanokoloidów srebra oraz miedzi w stężeniach: 50, 100 i 150 cm³·dm⁻³, a następnie namoczenia nasion (N/N) w roztworach o tych stężeniach oraz przeprowadzeniu badań ich energii i zdolności kiełkowania zgodnie z polską normą PNR-65950:1994. Ocenę toksyczności nanokoloidów na rośliny przeprowadzono w uprawie hydroponicznej, a ocenę ich wpływu na aktywność dehydrogenaz w glebie – w uprawie *in vitro*.

5.3.1. Przygotowanie preparatów nanokoloidów

Nanopreparat (nanokoloidu srebra NKAg i nanokoloidu miedzi NKCu) do namoczenia oraz oprysku przygotowano w trzech stężeniach: 50, 100 oraz 150 cm³·dm⁻³, rozcieńczając odpowiednie ilości preparatu do objętości 1 dm³ wodą destylowaną.

5.3.2. Przygotowanie nasion i warunki ich kiełkowania

Kiełkowanie nasion przeprowadzono w dwóch niezależnych wariantach.

Pierwszy wariant – doświadczenie mające na celu analizę energii oraz zdolności kiełkowania: nasiona rzepaku umieszczono w 70% roztworze etanolu na 15 s w celu sterylizacji powierzchniowej, następnie przeniesiono je do 1,5% roztworu chloranu(I) sodu (NaClO) na czas 15 min, po upływie tego czasu nasiona wypłukano pięciokrotnie w wodzie destylowanej. Tak przygotowane nasiona zanurzano na 1 godzinę w przygotowanych nanokoloidach srebra i miedzi o stężeniu 50, 100 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ w szalkach Petriego, stosując po $1,5 \text{ cm}^3$ roztworu na 100 nasion. Obiekt kontrolny stanowiły nasiona nienamoczone w rozpatrywanych nanokoloidach, ale przez 1 h moczone w wodzie destylowanej. Kiełkowanie prowadzono na szalkach Petriego wyłożonych trzema warstwami bibuły filtracyjnej, uwilgoconych wodą destylowaną po $1,5 \text{ cm}^3$ na każdą szalkę. Następnie szalki umieszczono w fitotronie (model FD 711 DD INOX) z ustawionym podziałem temperatury $20^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ dzień/noc. Poziom wilgoci bibuły regulowano co drugi dzień. Każdy obiekt doświadczenia liczył po 100 nasion i obejmował pięć powtórzeń. Po 5 dniach od wysiewu nasion rozpoczęto liczenie normalnie rozwiniętych siewek. Obserwacje prowadzono do siódmego dnia kiełkowania. Na podstawie tych obliczeń określono energię i zdolność kiełkowania nasion.

Drugi wariant - doświadczenie mające na celu określenie stresu abiotycznego dla rośliny: nasiona rzepaku umieszczono w 70% roztworze etanolu na 15 s w celu sterylizacji powierzchniowej, następnie przeniesiono je do 1,5% roztworu chloranu (I) sodu (NaClO) na czas 15 min, po upływie tego czasu nasiona wypłukano pięciokrotnie w wodzie destylowanej, po czym wyłożono na okrągłe, plastikowe tacki o średnicy 30 cm, wyścielone papierowym ręcznikiem. Na każdej tacce umieszczono około 500 nasion. Uwilgocano je, dolewając po około 100 cm^3 wody destylowanej na każdą tackę, po czym przykryto folią aluminiową i wstawiono do fitotronu model FD 711 DD INOX w celu skiełkowania w następujących warunkach: w ciemności, przy wilgotności względnej 60%, w temperaturze $20/18^\circ\text{C}$ dzień/noc. Nasiona codziennie wietrzono. Proces kiełkowania trwał 7 dni.

5.3.3. Warunki wzrostu roślin

Siewek o podobnej wielkości i dobrze rozwiniętych korzeniach zarodkowych i o około 1,5 cm długości przeniesiono do zmodyfikowanej, napowietrzanej pożywki Hoaglanda o optymalnym $\text{pH} = 6,5$ (tab. 1).

Tabela 1.

Receptura roztworu Hoaglanda zastosowanego w doświadczeniu (Sharma, 2013)

Związek	Stężenie	Związek	Stężenie
KNO_3	1 mM	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9 μM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,8 mM	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 μM
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,05 mM	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,06 μM
H_3BO_4	9 μM	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,02 μM

Rośliny wzrastały w fitotronie przez następne 21 dni w następujących warunkach: wilgotność względna 60%, temperatura 20/18°C dzień/noc, fotoperiod 18/6h dzień/noc, natężenie promieniowania aktywnego fotosyntetycznie $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Każdy obiekt obejmował trzy powtórzenia. Pojemniki o pojemności $1,5 \text{ dm}^3$ z pożywką i roślinami w fitotronie początkowo ustawiono w sposób losowy, zmieniany co 2 dni. Pożywkę wymieniano i kontrolowano jej pH co 2 dni (regulowano pH przez dodatek roztworu 35% HCl lub 2 M NaOH do pH = 6,5). Po upływie 21 dni siewki spryskano przygotowanymi roztworami nanokoloidów w ilości około 4 cm^3 każdy (NKAg oraz NKCu o stężeniach: $50 \text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$, $100 \text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz $150 \text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$). Po spryskaniu roślin ustawiono je w grupach poszczególnych wariantów w celu uniknięcia ewentualnego kontaktu z roślinami spryskanymi roztworem o innym stężeniu.

5.3.4. Przygotowanie materiału do analiz i określenie stresu abiotycznego

Materiał analityczny pobierano w 22 dniu (pierwszym po aplikacji nanokoloidu na siewki – wczesny stres) i 29 dniu wzrostu rośliny (późniejszy stres). W 22 i 29 dniu z każdego wariantu pobrano po 30 roślin w celu oznaczenia świeżej i suchej masy. Pędy pozbawione korzeni poddano analizom zawartości Ag i Cu oraz makro pierwiastków (Ca, K, Mg, Na, P, S). Do analizy biochemicznej odseparowano pierwsze liście z każdej z 30 roślin, następnie wydzielono ich środkowe części, odważając 0,5 g próbki, po czym zamrożono w temperaturze -60°C .

Materiał ten wykorzystano do przygotowania homogenatów roślinnych. Gotowe 0,5 g naważki wyjęto z zamrażalnika i umieszczono w lodzie. Następnie próbki roztarto w młynku na łaźni wodnej z dodatkiem $4,5 \text{ cm}^3$ schłodzonego (4°C) 50 mM buforu sodowo-potasowo fosforanowego (pH 7,5) zawierającego 0,1 mM EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) oraz 2% PVP [poli(winylopirolidon)]. Homogenat przesączono przez tkaninę nylonową, uzyskując w ten sposób „surowy homogenat” użyty bezpośrednio do oznaczenia stopnia peroksydacji lipidów (LPO). Pozostałą część odwirowano przy 11 000 RPM przez 20 min w 4°C . Uzyskany supernatant homogenatu użyto do pozostałych analiz biochemicznych (Balakhnina i in., 2015).

5.3.4.1. Zawartość białka rozpuszczalnego wg Bradforda

Odczynnik przygotowano, rozpuszczając 100 mg błękitu kumasyny G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-150) w 50 cm^3 95% etanolu. Następnie dodano 100 cm^3 85% (w/v) H_3PO_4 , a gdy barwnik rozpuścił się całkowicie, rozcieńczono do obojętności 1 dm^3 wodą destylowaną i przefiltrowano przez sączek laboratoryjny (o gęstości $65 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Bezpośrednio przed użyciem odczynnik rozcieńczono pięciokrotnie wodą destylowaną. Do $0,25 \text{ cm}^3$ homogenatu dodawano 5 cm^3 odczynnika i inkubowano przez 10 min w ciemności. Absorbancję mierzono przy długości fali 595 nm. Krzywą wzorcową sporządzono, wykorzystując albuminę bydlęcą z serum (BSA, Bovine Serum Albumin) (Bradford, 1976).

5.3.4.2. Peroksydacja lipidów (LPO)

Poziom stresu oksydacyjnego (LPO) określono po oznaczeniu zawartości dialdehydu malonowego (MDA) metodą związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Mieszanina reakcyjna składała się z 3 ml 1% H_3PO_4 , 1 ml 0,6% kwasu tiobarbiturowego, 0,1 ml 0,28% $FeSO_4$ oraz 0,3 ml „surowego” homogenatu. Przygotowane próbki wstawiono do łaźni wodnej w temperaturze $100^{\circ}C$ na 45 min. Po tym czasie natychmiast schłodzono na lodzie i ekstrahowano 4 cm^3 n-butanolu, zebrano przy użyciu pipety górną frakcję i po odwirowaniu (3000 rpm przez 5 min) wykonano pomiary spektrofotometryczne przy długościach fali 532 oraz 600 nm. Ilość dialdehydu malonowego wyrażono w $nMg\text{ MDA}\cdot g\text{ świeżej masy}^{-1}$. Do obliczeń posłużył molowy współczynnik ekstynkcji równy $1,56\cdot 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Uchiyama i Mihara, 1978).

5.3.4.3. Ogólna aktywność antyrodnikowa (anty-ABTS)

Oznaczenie przeprowadzono metodą redukcji (inhibicji) kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$ (kwasu 2'-azynobis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) przez próbkę homogenatu. 192 mg ABTS rozpuszczono w 25 cm^3 wody destylowanej. 33 mg nadsiarczanu potasu ($K_2S_2O_8$) rozpuszczono w 25 cm^3 wody destylowanej i oba roztwory połączono w celu wygenerowania rodników $ABTS^{\cdot+}$, pozostawiając w ciemności na 24 h (Re i in., 1999). Bezpośrednio przed użyciem roztwór kationorodnika rozcieńczono wodą destylowaną do absorbancji 0,7. Do $80\text{ }\mu\text{m}^3$ homogenatu dodano 5 cm^3 roztworu $ABTS^{\cdot+}$ i mierzono wartość absorbancji przy długości fali 734 nm przez 5 min. Procent inhibicji wyliczono ze wzoru:

$$I (\%) = 100 \times (A_0 - A_w) / A_0 \quad (1)$$

gdzie:

A_0 – absorbancja wyjściowa roztworu $ABTS^{\cdot+}$ (0,7 Abs);

A_w – absorbancja właściwa roztworu $ABTS^{\cdot+}$ po 5 min inkubacji z homogenatem.

5.3.4.4. Aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX)

Do $2,7\text{ cm}^3$ buforu fosforanowego dodano $0,1\text{ cm}^3$ homogenatu oraz $0,1\text{ cm}^3$ 0,5 mM kwasu askorbinowego i wykonano pierwszy pomiar absorbancji (300 nm). Drugi pomiar wykonano po 30 s od momentu dodania do mieszaniny reakcyjnej $0,1\text{ cm}^3$ 3 mM H_2O_2 . Spadek stężenia kwasu askorbionowego wyrażono w $\mu\text{mol}\cdot\text{mg białka}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Do obliczeń wykorzystano molowy współczynnik ekstynkcji równy $2,8\text{ mM}^{-1}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Nakano i Asada, 1981).

5.3.4.5. Aktywność peroksydazy (GPX)

Do $2,7\text{ cm}^3$ buforu fosforanowego dodano $0,1\text{ cm}^3$ homogenatu, a bezpośrednio przed pomiarem również $0,1\text{ ml}$ 0,15% roztworu H_2O_2 . Natychmiast zmierzono absorbancję tak przygotowanego roztworu (470 nm), po czym dodano $0,1\text{ cm}^3$ 60 μM gwasjakułu i po 20 s ponownie zmierzono absorbancję. Wynik wyrażono w $\mu\text{mol tetrahydrogwasjakułu}\cdot\text{mg białka}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

$\text{ka}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Użyto molowego współczynnika ekstynkcji równego $26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Polle i in., 1990).

5.3.4.6. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Przygotowana mieszanina reakcyjna składała się z $2,1 \text{ cm}^3$ buforu fosforanowego, $0,1 \text{ cm}^3$ 13 mM metioniny, $0,1 \text{ ml}$ 75 μM chlorku błękitu tetrazoliowego (NBT), $0,1 \text{ cm}^3$ homogenatu, $0,2 \text{ cm}^3$ żelatyny ($5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$) oraz $0,2 \text{ cm}^3$ 2 μM ryboflawiny. Pierwszy pomiar wykonano w ciemności, po czym mieszanina reakcyjna została naświetlona przez 10 min za pomocą świetlówki fluoroscencyjnej (30W i odległości 30 cm) jako jedyne źródła światła. Jedna jednostka aktywności dysmutazy ponadtlenkowej została zdefiniowana jako ilość enzymu powodującego 50% inhibicji fotoredukcji NBT (Giannopolitis i Ries, 1977). Wyniki wyrażono w $\text{U} \cdot \text{mg białka}^{-1}$. W czasie analizy unikano zbędnego naświetlania próbek.

5.3.4.7. Aktywność reduktazy glutationowej (GR)

Przygotowana mieszanina reakcyjna składała się z $2,6 \text{ cm}^3$ buforu fosforanowego, $0,1 \text{ cm}^3$ 0,15 mM NADPH, $0,1 \text{ cm}^3$ 3 mM MgCl_2 , $0,1 \text{ cm}^3$ 0,5 mM GSSG. Próbkę mieszało się w seriach po 5. Dodanie $0,1 \text{ ml}$ homogenatu do mieszaniny reakcyjnej zapoczątkowało reakcję – wykonano pierwszy pomiar absorbancji (340 nm). Po kolejnej minucie homogenat był dodawany do kolejnej próbki. Po 5 min wykonywano drugi pomiar absorbancji, rozpoczynając od pierwszej próbki. Wzięto pod uwagę także odpowiednią poprawkę na oksydację NSDPH. Wyniki wyrażano w $\mu\text{mol substratu} \cdot \text{mg białka}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Do obliczeń użyto molowego współczynnika ekstynkcji równego $6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Foyer i Halliwell, 1976).

5.3.4.8. Aktywność (CAT)

Mieszanina reakcyjna o końcowej objętości 3 cm^3 zawierała $2,95 \text{ cm}^3$ 0,036% roztworu H_2O_2 w 50 mM buforze fosforanowym oraz $50 \mu\text{m}^3$ homogenatu. Pomiar wykonano przy 240 nm co 30 s przez 3 min. Wyniki wyrażano w $\mu\text{mol substratu} \cdot \text{mg białka}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Do obliczeń wykorzystano molowy współczynnik ekstynkcji równy $39,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Aebi, 1984).

5.3.4.9. Plon świeżej i suchej masy pędów

Parametry te badano w 22 i 29 dniu doświadczenia. Świeżą masę pędów określano, ważąc ją po dokładnym osuszeniu ręcznikami papierowymi. W celu określenia zawartości suchej masy pędów próbki umieszczono w cieplarni w temperaturze 60°C na 48 h, po czym ważono.

5.3.4.10. Ekstrakcja barwników z liści rzepaku i oznaczenie ich zawartości

Liście siewek rzepaku (2 g) rozdrobniono, a następnie zalewano 15 cm³ roztworu chloroformu i alkoholu metylowego (w stosunku 2:1; temperatura otoczenia 20°C; bez dostępu światła). Następnie próbkę wytrząsano przez 2 h w termo-wytrząsarce Mix Smart-100 w celu ekstrakcji barwników chlorofilowych i karotenoidowych, po czym poddano odwirowaniu przez (9000 obr.·min⁻¹) w celu pozbycia się resztek rozdrobnionych liści.

Oznaczenie stężenia chlorofili *a* i *b* oraz karotenoidów w siewkach (zielonych liściach) rzepaku przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu dwuwiązkowego spektrofotometru firmy Jaco V-630 z wiązką promieniowania UV-VIS. Metoda badania zawartości barwników polegała na analizie ich widm absorpcji w zakresie długości fali 350-700 nm. Próbkę ekstraktów z liści siewek rozcieńczono 6 krotnie w acetonie. Wyniki oszacowano jako średnia z trzech powtórzeń zgodnie z procedurą Lichtenthaler i Buschmann (2001) i wyrażono w µg·cm⁻³.

5.4. Uprawa rzepaku w doświadczeniu wazonowym

Materiał roślinny w doświadczeniu stanowiły nieotoczkiowane nasiona rzepaku jarego odmiany 'Markus'. Część z tych nasion namoczono w nanokoloidach NKAg i NKCu o stężeniu 50, 100 i 150 cm³·dm⁻³ (patrz: rozdział 5.3.2.). Tak przygotowane nasiona podzielono na dwie grupy doświadczeń po trzy warianty każdy. W pierwszym doświadczeniu wydzielono następujące warianty:

- pierwszy wariant stanowiły nasiona niezaprawiane nanokoloidami – obiekt kontrolny,
- drugi wariant stanowiły nasiona zaprawione nanokoloidem Ag,
- trzeci wariant to nasiona zaprawiane nanokoloidem Cu.

Wyrośnięte siewki w pierwszym doświadczeniu po upływie 21 dnia nie zostały poddane dodatkowemu opryskowi roztworami nanokoloidów.

Drugie doświadczenie stanowiły te same warianty jak wyżej. W tym doświadczeniu nasiona zaprawione nanokoloidami, z których wyrosły rośliny poddano w 21 dniu wzrostu dodatkowo opryskowi przygotowanymi roztworami nanokoloidów, na każdą doniczkę NKAg oraz NKCu o 3 stężeniach: 50, 100 oraz 150 cm³·dm⁻³ w ilości ok. 1 cm³, z pominięciem obiektu kontrolnego.

Nasiona namoczone w roztworach nanokoloidów wysiano w doniczkach rozsadowych o wymiarach 8x8 cm i objętości 512 cm³ (6 sztuk w 3 powtórzeniach dla każdego stężenia) po 8 nasion w każdej. Doniczki wraz z wysianymi nasionami umieszczono w fitotronie z ustawionym podziałem w temperaturze 20°C/18°C dzień/noc. Przez okres 31 dni utrzymywano stałą wilgotność gleby na poziomie 60% wilgotności względnej (RH). Rośliny podlewano co 3 dni wodą destylowaną, symulując warunki naturalnych opadów deszczu.

Próbki gleby zostały pobrane z każdej powyższej wersji doświadczenia. Każdą próbkę poddano przesianiu w warunkach sterylnych na sitach o wielkości oczek 1 mm, a następnie przechowywano z zachowaniem całkowitej sterylności w temperaturze 4°C. W próbach glebowych oznaczono wartość pH oraz wykonano testy biochemiczne pozwalające na oznaczenie aktywności enzymu dehydrogenazy.

5.4.1. Oznaczenie pH gleby

Wartość pH gleby oznaczono metodą potencjometryczną w temperaturze pokojowej z użyciem pehametru Beckman $\phi 32$ pH-Meter w zawiesinach gleby po intensywnym mieszaniu (50 rpm przez godzinę) z H_2O oraz 1 M roztworem KCl, sporządzonych w proporcji 1:2,5 (m/v). Za wartość pH przyjmowano średnią z 3 pomiarów wykonywanych przez 15 min.

5.4.2. Oznaczenie aktywności dehydrogenazy

Aktywność dehydrogenazy oznaczano metodą Alefa (1995) na podstawie redukcji chlorku 2-,3-,5-trójfenylotetrazolu (TTC) do czerwono zabarwionego formazanu (TPF). Naważono po 3 g próbki gleby do gilz wirówkowych o pojemności 10 cm^3 , następnie dodawano $0,5\text{ cm}^3$ 3% TTC, 1 cm^3 3% $CaCO_3$ (zawiesina $CaCO_3$ w H_2O) i 1 cm^3 wody destylowanej. Całość dokładnie wymieszano szklaną bagietką, tak by nad powierzchnią gleby pozostawała warstwa płynu (stworzenie warunków mikroaerofilnych). Próbki inkubowano w temperaturze 28°C przez okres 24 godzin. Po tym czasie formazan ekstrahowano 5 cm^3 porcjami metanolu, dokładnie wytrząsając przez 1-2 minuty do uzyskania 25 cm^3 ekstraktu. Mieszaninę odwirowywano przy $10\,000\text{ rpm}\cdot\text{min}^{-1}$ i oddzielano supernatant od osadu. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 485\text{ nm}$. Wyniki przeliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej wykonanej dla roztworów wzorcowych formazanu (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ metanolu). Aktywność dehydrogenazy wyrażono w μg powstałego formazanu w przeliczeniu na 1 g suchej masy gleby $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{ s.m.}$ Przeliczeń dokonano w programie Microsoft Excel 2007 dla 3 supernatantów ekstraktów metanolowych każdego wariantu doświadczenia w 3 powtórzeniach.

5.5. Uprawa rzepaku w doświadczeniu polowym

5.5.1. Przygotowanie i przebieg doświadczenia

Doświadczenie polowe założono w cyklu dwuletnim 2016-2017 na glebie średniej o uziarnieniu pyłu piaszczystego. Do doświadczenia użyto nieotoczkiowanych nasion rzepaku jarego odmiany 'Markus'. W doświadczeniu polowym przed wysiewem nasiona podzielono na trzy grupy: nienamoczone w przygotowanych roztworach nanokoloidów, namoczone w roztworze nanokoloidu srebra oraz namoczone w roztworze nanokoloidu miedzi. Dwie grupy nasion rzepaku poddano procesowi namaczania (zaprawieniu) przez 1 h w przygotowanym roztworze nanokoloidów srebra oraz miedzi (ITP-2KAg PO i ITP-1KCu PO), a następnie podsuszone (w warunkach naturalnych mieszając co 3 godziny) w cienkiej warstwie 1 cm w plastikowych pudełkach o pojemności 20 dm^3 w celu przygotowania do wysiewu. Obiekt kontrolny stanowiły nasiona niezaprawiane. Tak przygotowane nasiona podzielono na pięć wariantów doświadczenia, w których to przyjęto za:

I wariant - nasiona nieotoczkiowane, które wysiano do gleby, a następnie w okresie kwitnienia (61-66 BBCH) opryskano nanokoloidem srebra (O)NKAg o stężeniu $50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$;

II wariant - nasiona nieotoczowane, które wysiano do gleby, a następnie w okresie kwitnienia (61-66 BBCH) opryskano nanokolloidem miedzi (O)NKCu o stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$;

III wariant - w którym wysiano nasiona nieotoczowane, namoczone w nanokolloidzie srebra o stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ (NKAg), a następnie w okresie kwitnienia (61-66 BBCH) opryskano nanokolloidem (N/O)NKAg o stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$;

IV wariant - w którym wysiano nasiona nieotoczowane namoczone w nanokolloidzie miedzi o stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ (NKCu), a następnie w okresie kwitnienia (61-66 BBCH) opryskano nanokolloidem (N/O)NKCu o stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$;

V wariant - obiekt kontrolny, który stanowiły wysiane nasiona nieotoczowane, nie-namoczone w roztworze nanokolloidów, a rośliny nie zostały poddane aplikacji w postaci oprysku nanokolloidami srebra oraz miedzi.

W eksperymencie polowym przyjęto najniższe stężenie nanokolloidów ($50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) z wcześniej badanych w doświadczeniu np.: upraw hydroponicznych i na szalkach Petriego. Wyboru takiego stężenia nanokolloidów ($50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) dokonano w celu minimalizacji ewentualnych, niekorzystnych efektów środowiskowych. Przygotowane nasiona wysiano na poletkach o powierzchni 30 m^2 w trzech powtórzeniach. Wysiew nasion na polu przeprowadzono wykorzystując siewnik rzędowy firmy KUHN KN253APL E, w rozstawie wąskiej wynoszącej 12 cm. Po wschodach utrzymano obsadę dla każdego wariantu doświadczenia dla 60 roślin na m^2 . Pozostałe zabiegi agrotechniczne przeprowadzano zgodnie z zaleceniami dla rzepaku jarego. Do nawożenia mineralnego przedsięwzięcie zastosowano nawóz wieloskładnikowy NPK, dawka nawozu wynosiła $18 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ N, $60 \text{ kg} \text{ P}_2\text{O}_5$, $90 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ K_2O oraz nawożenie azotem w dawce $92 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. Ochrona herbicydowa była wykonana z użyciem środka Command 480EC w ilości $0,2 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$. W trakcie wegetacji w fazie 31 zastosowano również nawożenie nawozem dolistnym BORMAX w ilości $1 \text{ l} \cdot \text{ha}^{-1}$.

W ostatnim tygodniu sierpnia rzepak zebrano metodą jednoetapową przy wykorzystaniu kombajnu poletkowego Wintersteiger typu KM-ELITE. Zebrane nasiona oczyszczono, wykorzystując wialnię laboratoryjną modelu SLN. Po oczyszczeniu nasiona przechowywano w workach jutowych przez dwa tygodnie w warunkach laboratoryjnych w temperaturze 20°C , mieszając każdego dnia w celu wyrównania poziomu wilgoci w całej masie nasion, a następnie poddano analizom. W obu latach zbioru średni plon dla obiektu kontrolnego wynosił $1,5 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$, a dla obiektów, które poddano namoczeniu i opryskowi roztworem nanokolloidów średnio $1,4 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$.

W oparciu o dane pogodowe z okresu od marca do sierpnia w latach 2016-2017, pochodzące z Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej Państwowego Instytutu Badawczego IMGW-PIB ze stacji Lublin-Radawiec określono warunki meteorologiczne.

Badania jakości nasion po zbiorze rzepaku jarego oparto na wyznaczeniu: wilgotności nasion, masy tysiąca nasion (MTN), zawartości tłuszczu, profilu kwasów tłuszczowych, zawartości białka, Ag i Cu oraz makro pierwiastków (Ca, K, Mg, Na, P, S). Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku badano po zakończeniu każdego tygodnia z pięciu tygodni przechowywania nasion w silosie laboratoryjnym.

Badania jakości oleju tłoczonego na zimno z nasion i roślin uprawianych w warunkach polowych (*wariant I i II*: aplikacja na rośliny z nasion niezaprawianych nanokolloidami miedzi oraz srebra; *wariant III i IV*: aplikacja na rośliny z nasion namoczonych nanokolloidami miedzi oraz srebra; *wariant V*: obiekt kontrolny-bez namoczenia nasion i oprysku roślin roztworem nanokolloidów), polegały na wyznaczeniu następujących parametrów

jakościowych: zawartości barwników (chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów), barwy oleju, zawartości liczby kwasowej (LK), liczby nadtlenkowej (LN), stabilności oksydacyjnej oraz analizy widm metodą spektroskopową ATR-FTIR.

Próbki gleby poddano analizie, którą wykonano w Okręgowej Stacji Chemiczno-Rolniczej w Lublinie. Skład granulometryczny przeprowadzono zgodnie z KQ/PB-75 wersja 03 dn. 07.10.11. Wartość pH w KCl (PN-ISO 10390-1997) oraz zawartość makroelementów przyswajalnych: P_2O_5 (KO/PB-07-wew. 06 z dn. 01.03.2013), K_2O (KQ/PB-07-wew. 06 z dn. 01.03.2013) i Mg zgodnie z PN-R-04020-1994+Az1:2004.

5.5.2. Oznaczenie wilgotności nasion

Wilgotność nasion określono przy użyciu przenośnego wilgotnościomierza Dramińskiego z młynkiem/rozdrabniaczem Grain Mastera (GMS). Uzyskane wyniki przedstawiono z dokładnością błędu wskazań wynoszącym $\pm 1,0\%$ w zakresie do 10% wilgotności, powyżej 10% $\pm 1,2\%$.

5.5.3. Oznaczenie masy 1000 nasion (MTN)

Metoda polega na wyznaczeniu masy 1000 nasion w stanie naturalnym. Wydzielono losowo nasiona z próbki i zważono z dokładnością do 0,01 g na wadze elektronicznej Radwag AS 110. R2. Oznaczenia wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego wariantu doświadczenia, z których wyliczono wartość średnią arytmetyczną. Masę 1000 nasion o wilgotności naturalnej przeliczono na suchą substancję według wzoru:

$$X = a \cdot \left(1 - \frac{b}{100}\right) (g) \quad (2)$$

gdzie:

- X – masa 1000 nasion suchych (g);
- a – masa 1000 nasion w stanie naturalnym (g);
- b – wilgotność nasion (%).

5.5.4. Oznaczenie zawartości tłuszczu w nasionach

Zawartość tłuszczu oznaczono przy użyciu aparatu Soxtec 8000 (aplikacje ASN 310). Metoda Soxhleta polega na wielokrotnej ciągłej ekstrakcji substancji tłuszczowej z rozdrobnionego i uprzednio wysuszonego produktu stosując rozpuszczalnik organiczny, usunięciu rozpuszczalnika i oznaczeniu substancji tłuszczowej metodą wagową. Wyniki wyrażono w % i oszacowano dla średniej z trzech powtórzeń. Analiza została wykonana zgodnie z PN-EN ISO 659:2010.

5.5.5. Analiza zawartości białka

Zawartość białka oznaczono metodą Kjeldahla, zgodnie z normą PN-A-04018/A z 3:2002. Metoda ta polega na przeprowadzeniu organicznych związków azotu w siarczany

amonowy w wyniku mineralizacji stężonym kwasem siarkowym w obecności katalizatora, zalkalizowaniu roztworu, destylacji NH_3 i miareczkowaniu kwasem solnym amoniaku związanego z kwasem borowym. Wyniki wyrażono w % i oszacowano dla średniej z trzech powtórzeń.

5.5.6. Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych

Oznaczenie składu kwasów tłuszczowych przeprowadzono z zastosowaniem chromatografii gazowej, zgodnie z obowiązującą normą PN-EN ISO 5508:1996. Rozdział i oznaczanie kwasów tłuszczowych prowadzono w chromatografie gazowej Varian 450-GC. Do sterowania chromatografem, zbierania, integrowania i przeliczania wyników użyto oprogramowania Galaxie™ Chromatography Data System, z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID), kolumny kapilarnej o długości 30 m (średnica wewnętrzna 0,32 mm, faza ciekła supelcowax 10, grubość filmu 0,25 μm) i dozownika (1177 Split/Splitless) przy temperaturze dozownika 250°C i temperaturze detektora 300°C, kolumny kapilarnej Select™ Biodiesel for FAME (Agilent Technologies) o wymiarach L·ID·OD odpowiednio 30 m·0,32 mm·0,45 mm. Gazem nośnym był hel (przepływ 1,0 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$).

5.5.7. Zawartość pierwiastków w liściach i nasionach

Do mineralizacji użyto 0,2 g próbek nasion (uprawa polowa) oraz suchej masy liści i korzeni (uprawa laboratoryjna). Próbki poddano mineralizacji w mineralizatorze Berghoff Speedwave Four w naczyniach teflonowych DAP 100% przy użyciu 65% kwasu HNO_3 . Po mineralizacji uzyskane roztwory wykorzystano do oznaczenia zawartości srebra (Ag), wapnia (Ca), miedzi (Cu), potasu (K), magnezu (Mg), sodu (Na), fosforu (P), siarki (S). Analizy przeprowadzono techniką atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej (ICP-OES; Thermo Scientific Icap Series 6500). Krzywa wzorcowa została przygotowana z wzorców dedykowanych do ICP-OES zakupionych w Inorganic Ventures (US, Virginia). Mineralizację i pomiary ICP-OES przeprowadzono według standardowej metodyki dostarczonej przez producentów urządzeń.

5.5.8. Ocena jakości oleju rzepakowego

Ocenę jakości oleju wytłoczonego z nasion rzepaku jarego zebranych z uprawy polowej oparto na oznaczeniu: liczby kwasowej LK, liczby nadtlenkowej LN, oznaczeniu stabilności oksydacyjnej, zawartości barwników w oleju (chlorofilu *a* i chlorofilu *b*) pomiarze barwy oraz widm ATR-FTIR oleju.

5.5.8.1. Tłoczenie oleju

Olej został wytłoczony przy użyciu prasy ślimakowej ze zmienną dyszą o średnicy 8 mm wraz z zestawem sit firmy Farnet DUO o działaniu ciągłym. Przed uruchomieniem prasy nagrzano ją do temperatury 50°C. Prasę tłoczącą uruchomiono i po ustabilizowaniu

temperatury tłoczenia rozpoczęto właściwy proces. Stabilizację osiągnięto po wytłoczeniu oleju z masy około 1 kg nasion, wówczas temperatura wynosiła około 60°C. Temperaturę tłoczenia zmierzono termometrem cyfrowym AD 20TH Firmy Amarell-ama-digit. Olej po wytłoczeniu przechowywano w szklanych butelkach z ciemnego szkła o pojemności 200 cm³ w temperaturze 5°C w celu naturalnego rozdzielania w ciągu 6 dni, a następnie zdekantowano i poddano dalszym analizom.

5.5.8.2. Oznaczenie liczby kwasowej (LK)

Oznaczenie liczby kwasowej (LK) wykonano zgodnie z normą PN-EN ISO 660:2005. Metoda ta polegała na zobojętnieniu roztworem KOH wolnych kwasów tłuszczowych w badanej próbce. Wyniki wyrażono w mg KOH·g⁻¹ i oszacowano dla średniej z trzech powtórzeń.

5.5.8.3. Oznaczenie liczby nadtlenkowej (LN)

Oznaczenie liczby nadtlenkowej (LN) wykonano zgodnie z obowiązującą normą PN-EN ISO 3960:2012. Polegało ono na ilościowym oznaczeniu jodu wydzielonego z jodku potasu w wyniku działania nadtlenków znajdujących się w badanym tłuszczu. Wyniki wyrażono w mmol O·kg⁻¹ i oszacowano dla średniej z trzech powtórzeń.

5.5.8.4. Oznaczenie stabilności oksydacyjnej

Stabilność oksydacyjną zmierzono przy użyciu aparatu Rancimat 670 (Metrohm AG, Herisau, Szwajcaria). Próbkę oleju (2,5 g) odważono do naczyń reakcyjnych i ogrzewano w temperaturze 120°C w strumieniu suchego powietrza wynoszącym 20 dm³·h⁻¹, zgodnie z obowiązującą normą PN-EN ISO 6886:2009. Czas potrzebny na dotarcie do punktu przegięcia przewodnictwa rejestrowano jako okres indukcji (IT), wyrażony w godzinach. Czas normalny oceniono na podstawie czasu indukcji wykorzystując współczynnik walidacji wyznaczony w zależności czasu indukcji od temperatury próbki. Zwykły czas obliczano w oprogramowaniu StabNet, który steruje urządzeniem Rancimat. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

5.5.8.5. Oznaczenie zawartości barwników w oleju

Oznaczenie stężenia chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w wytłoczonych próbkach oleju przeprowadzono metodą spektrofotometryczną przy użyciu dwuwiązkowego spektrofotometru firmy Jaco V-630 z wiązką promieniowania UV-VIS. Metoda badania ilości barwników polegała na 20 krotnym rozcieńczeniu próbek olei w acetonie, a następnie poddaniu ich analizie widm absorpcji w zakresie 350-700 nm. Wyniki wyrażono w µg·cm⁻³ i oszacowano dla średniej z trzech powtórzeń zgodnie z procedurą Lichtenthalera i Buschmanna (2001).

5.5.8.6. Pomiar barwy oleju

Pomiary kolorymetryczne wykonano przy użyciu analizatora barwy Minolta CR-221 (Minolta, Osaka, Japonia) z oświetleniem obwodowym o kącie 45° i pomiarem geometrii kąta widzenia 0°. Jako źródło światła użyto impulsową lampę ksenonową. Rozmiar otworu

wynosił 3 mm. Zastosowano skalę barw CIE Lab (CIE L^* a^* b^*) określoną przez Commission Internationale de l'Éclairage, CIE. Trzy współrzędne systemu oceny barwy CIE Lab reprezentują odpowiednio: jasność L^* (0 dla czerni i 100 dla bieli), chromatyczność a^* czerwień – zieleń (wartości ujemne – barwa zielona, wartości dodatnie – barwa magenta), chromatyczność b^* niebieski – żółty (barwa niebieska – wartości ujemne, barwa żółta – wartości dodatnie na osi). Przyrząd był kalibrowany do białej płytki ceramicznej (CIE $L^* = 99,25$, $a^* = 0,60$, $b^* = 1,87$) zgodnie z zaleceniami producenta. Przed analizą wszystkie próbki pozostawiono na 2 godziny w celu uzyskania równowagi w temperaturze pokojowej. Kuwety polipropylenowe o drodze optycznej 10 mm napełniono 4 cm³ próbek. Kuwety były pokryte kartonem z trzech stron (białość *****), z wyjątkiem tej, która była skierowana ku głowicy pomiarowej do pomiaru barwy, aby zapewnić białe tło. Pomiary przeprowadzano w zaciemnionym pomieszczeniu, aby wykluczyć zakłócenia z zewnętrznych źródeł światła. Analizator barwy automatycznie generuje 3 pomiary, na podstawie których zostają obliczone średnie parametry barwy. Aby zapewnić powtarzalność pomiaru przyrządu, współrzędne kolorów rejestrowano trzy razy dla każdej próbki i liczono średnie wartości: L^* a^* b^* . Kolorymetryczne pomiary tła zostały wykonane w identycznych warunkach, przy użyciu kuwety napełnionej wodą destylowaną. Z otrzymanych współrzędnych CIE Lab obliczono następujące parametry barwy:

1. Kąt barwy:

$$h = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (3)$$

2. Chromatyczność C^* , która informuje o nasyceniu koloru, czyli proporcjach, w jakich dominujący kolor jest pomieszany z barwą białą, czarną lub szarą (Brainard, 2003).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (4)$$

3. Różnica między dwoma kolorami w przestrzeni L^* a^* b^* jest odległością euklidesową między dwoma punktami w przestrzeni trójwymiarowej, w tym przypadku była mierzona względem tła:

$$\Delta E_{12} = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2} \quad (5)$$

5.5.8.7. Pomiary widm ATR-FTIR

Pomiary widm w podczerwieni dla badanych olei wykonano z użyciem spektrometru Vertex 70 FTIR (firmy Bruker). Zastosowana w nim przystawka ATR (ang. *Attenuated Total Reflection*) w postaci monokryształu ZnSe o odpowiedniej geometrii (kąt ścięcia 45°), która zapewnia dwudziestokrotne odbicie wewnętrzne wiązki absorbowanej. W trakcie pomiaru rejestrowano 16 skanów pomiarowych i następnie program dokonywał uśrednienia wszystkich widm. Kryształ ZnSe przed pomiarem czyszczono ultra czystymi rozpuszczalnikami firmy Sigma-Aldrich. Komorę pomiarową przed (1 h) i w trakcie całej analizy utrzymywano w atmosferze gazu obojętnego N₂. Pomiar widm wykonywano w obszarze 500-4000 cm⁻¹ z rozdzielczością 2 cm⁻¹. Analizy i opracowania widm wykonano z wykorzystaniem oprogramowania Grams/AI firmy ThermoGalactic Industries (USA). Wszystkie widma zmierzono w temperaturze 23°C.

5.5.6. Przygotowanie surowca do przechowywania

Nasiona przeznaczone do przechowywania pochodziły z uprawy poletkowej, z każdego wariantu uprawy rzepaku jarego.

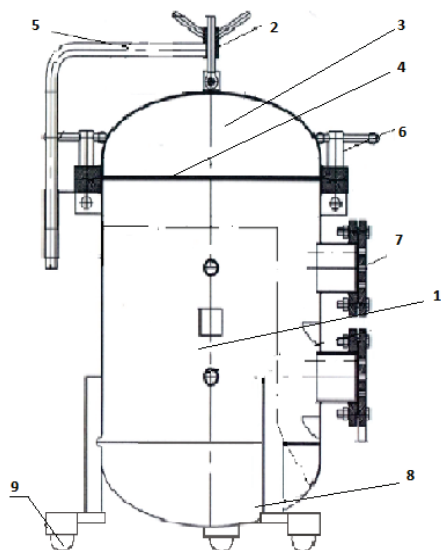
Nasiona rzepaku podzielono na trzy grupy. Przed rozpoczęciem analiz zbadano wilgotność nasion, oraz doprowadzono do poziomu wilgotności 6% – grupa pierwsza. Następnie nasiona rzepaku nawilżono do wilgotności 9% - grupa druga i 12% – grupa trzecia. Próbkę o wymaganej wilgotności uzyskano, zraszając nasiona o znanej wilgotności W_0 wodą destylowaną, której ilość Δm_{mw} określono zgodnie z zależnością:

$$\Delta m_{mw} = m_0 \cdot \frac{W_1 - W_0}{1 - W_1} \quad (6)$$

gdzie:

- Δm_{mw} – masa dodanej wody,
- m_0 – masa materiału o wilgotności początkowej W_0 ,
- W_1 – wilgotność oczekiwana.

Po nawilżeniu nasiona pakowano w woreczki polietylowe i pozostawiono w pomieszczeniu o temperaturze 5°C na okres 24 h. Wilgotność materiału przed i po nawilżaniu określono metodą wagowo-suszarkową, przy użyciu wagosuszarki firmy Radwag typu: MAX 50/1/WH. Tak przygotowane nasiona umieszczono w komorze termo-higrostatycznej pełniącej rolę silosu przemysłowego, umożliwiającej przechowywanie nasion rzepaku na niezmiennym początkowym poziomie wilgotności. Próbkę nasion przechowywano w silosie w temperaturze 30°C przez pięć tygodni. W każdym tygodniu pobierano próbkę nasion w stałych interwałach czasu (7, 14, 21, 28 i 35 dni po umieszczeniu w silosie nasion). Każdą pobraną próbkę przeznaczono do dalszej analizy zawartości ergosterolu, którą wykonywano w trzech powtórzeniach.



Elementy budowy silosu:

- 1 – korpus-zbiornik silosu na nasiona,
- 2 – mechanizm opuszczania pokrywki,
- 3 – pokrywka,
- 4 – uszczelka pokrywki,
- 5 – kanał z przewodem,
- 6 – mechanizm docisku pokrywki,
- 7 – okna wglądowe,
- 8 – dno silosu bez nasion,
- 9 – koła silosu.

Parametry techniczne:

- najwyższe dopuszczalne ciśnienie – $p_0 \leq 4$ bary;
- temperatura maksymalna/minimalna – $t_0 \leq 60^\circ\text{C}/7^\circ\text{C}$;
- pojemność rzeczywista – $V = 0,25 \text{ m}^3$;
- masa zbiornika – $m = 215 \text{ kg}$.

Rys. 2. Schemat silosu laboratoryjnego

5.5.6.1. Oznaczenie zawartości ergosterolu

W celu oznaczenia ergosterolu odważono po 100 mg nasion rzepaku i umieszczono w probówce o pojemności 40 cm³, w której przeprowadzono ekstrakcję ergosterolu z jednoczesnym zmydleniem, dodając 5 cm³ metanolu oraz 0,7 cm³ wodnego roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 2 M (Wiśniewska i Buśko, 2005; Perkowski i in., 2008). Szczelnie zamkniętą probówkę umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 95°C na 2 min, następnie schłodzono i powtórnie umieszczono w łaźni na 2 min. Schłodzone do temperatury pokojowej próbki neutralizowano, dodając 2 cm³ wodnego roztworu kwasu solnego o stężeniu 0,5 M oraz 3 cm³ metanolu. Następnie przeprowadzono ekstrakcję pentanem (3 razy po 4 cm³). Połączone ekstrakty pentanowe odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed przystąpieniem do analizy próbę rozpuszczano w 3 cm³ metanolu, przefiltrowano (Restek Filter 0,45 µm, PTFE, 13 mm), wysuszono w strumieniu azotu i ponownie rozpuszczono w 1 cm³ metanolu o czystości HPLC. Analizę przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Acella, Thermo Scientific, USA) z detektorem DAD. Rozdział chromatograficzny odbywał się na kolumnie Hypersil Gold (50 x 2,1 mm, 1,9 µm, Thermo Scientific), a fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i acetonitrylu (90:10, v/v). Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 450 cm³·min⁻¹. Pomiar stężenia ERG wykonano stosując wzorzec zewnętrzny przy długości fali $\lambda = 282$ nm. Identyfikacja związków odbywała się na podstawie porównania czasów retencji wzorca z czasem retencji próbki, a stężenie wyliczono przez porównanie z krzywą wzorcową. Wyniki wyrażono w µg·cm⁻³ jako średnią z trzech powtórzeń.

5.6. Analiza statystyczna

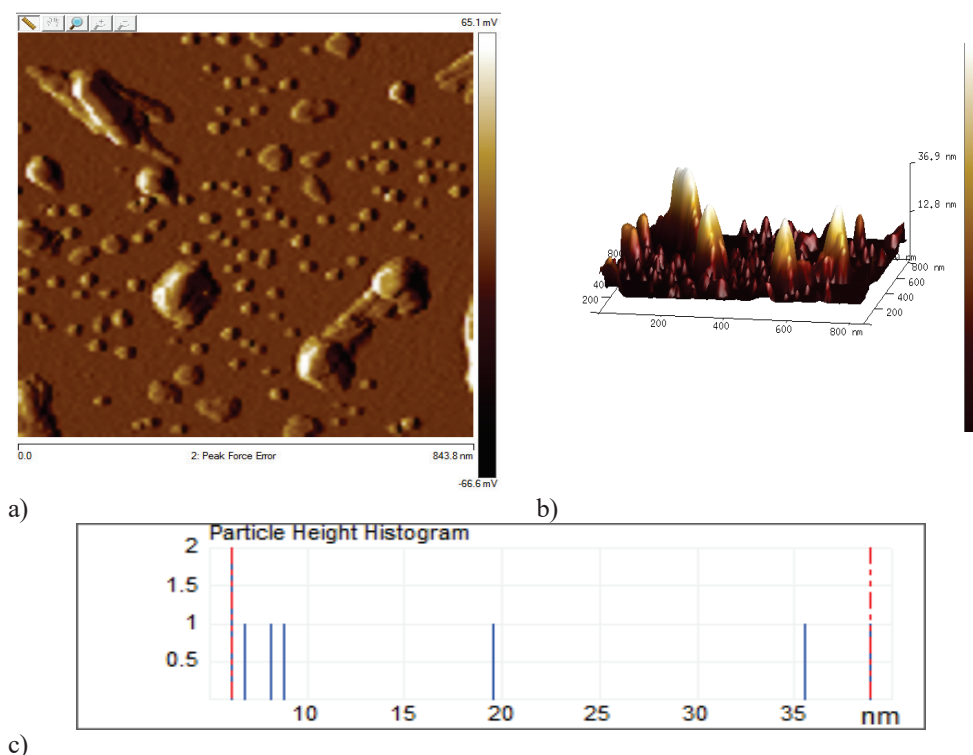
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Dla wszystkich zmiennych wyznaczono wartości średnie, odchylenia standardowe oraz zastosowano test post hoc Tukeya (HSD) i macierze korelacji. Analizę przeprowadzono na poziomie istotności $p < 0,05$.

Analizy czynników dotyczących stresu abiotycznego nie wykazywały cech rozkładu normalnego (test Shapiro-Wilka, $p < 0,05$). Do opracowania statystycznego wykorzystano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa ($p < 0,05$). Wyniki przedstawiono jako średnie $n=9$, $\pm$ SD. Obliczenia wykonano z wykorzystaniem programu Statistica 10 firmy Statsoft.

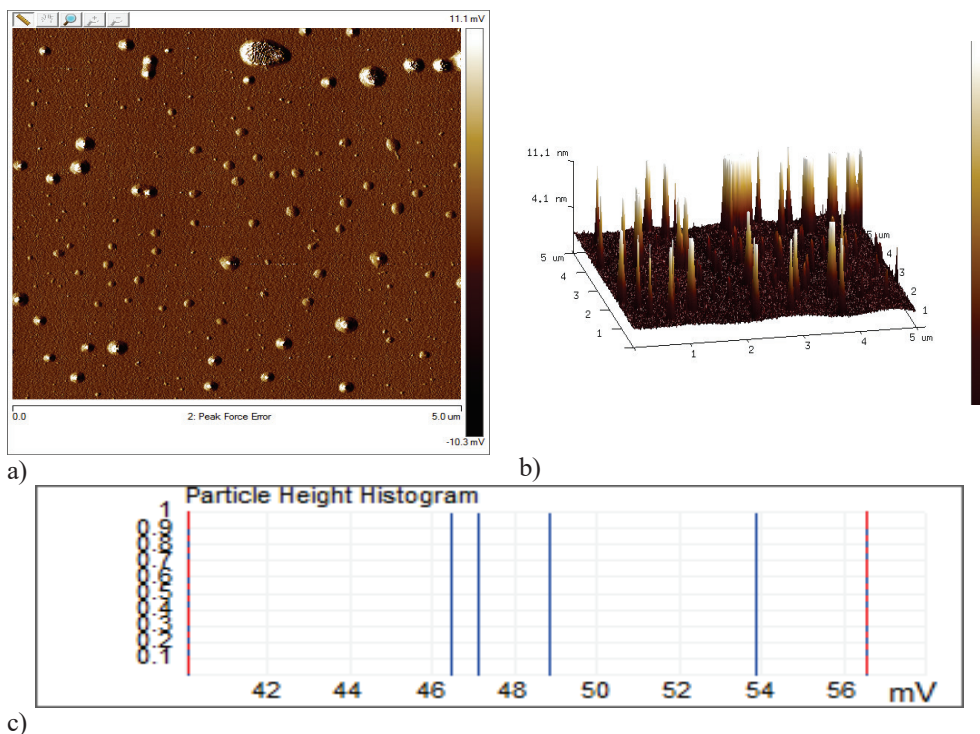
6. WYNIKI BADAŃ

6.1. Ocena potwierdzająca obecność nanocząstek w nanokoloidach (NKAg i NKCu)

W celu potwierdzenia obecności nanocząstek i przeprowadzenia oceny właściwości powierzchni oraz jej zobrazowania z rozdzielczością rzędu nanometrów, analizowane próbki nanokoloidów NKCu i NKAg poddano analizie morfologii z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM). Wykonano zdjęcia w formacie dwu- i trójwymiarowej topografii obydwóch nanokoloidów, które przedstawiono na rysunkach 3 i 4. Otrzymany średni analizowany obszar dla NKCu wyniósł $33,955 \text{ nm}^2$. Uzyskane parametry w czasie analizy umożliwiły wyodrębnienie minimalnej oraz maksymalnej wysokości nanocząstek NKCu, które wynosiły odpowiednio $6,088 \text{ nm}$ i $38,933 \text{ nm}$. Dla NKAg średni analizowany obszar wyniósł $4355,113 \text{ nm}^2$. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że gęstość rozmieszczenia nanocząstek NKAg w analizowanym obszarze wynosi $0,240 \text{ }\mu\text{m}^2$, a ich minimalna oraz maksymalna wysokość wynosi odpowiednio $48,825 \text{ nm}$ i $56,575 \text{ nm}$.



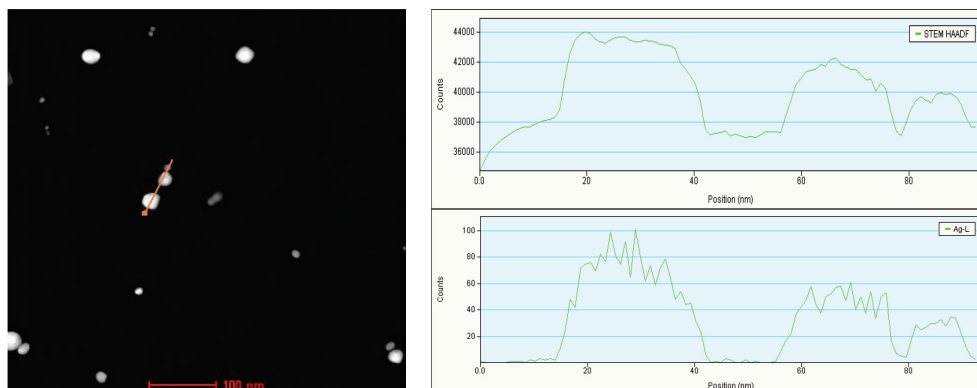
Rys. 3. Wyniki analizy metodą mikroskopii sił atomowych AFM dla NKCu: a) zdjęcie w formacie 2D według wysokości cząstek oraz dystrybucji nanocząstek na 100 obiektach; b) zdjęcie w formacie 3D; c) histogram wysokości nanocząstek



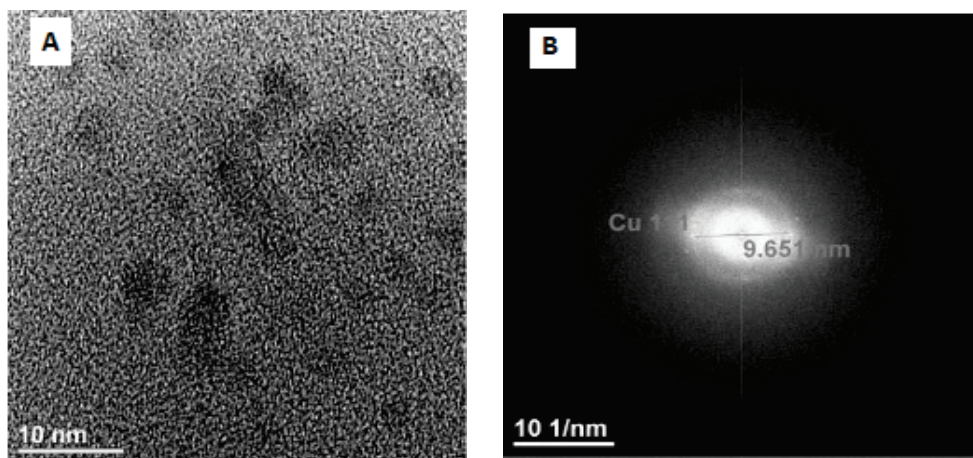
Rys. 4. Wyniki analizy metodą mikroskopii sił atomowych AFM dla NKA: a) zdjęcie w formacie 2D według wysokości cząstek oraz dystrybucji nanocząstek na 100 obiektach; b) zdjęcie w formacie 3D; c) histogram wysokości nanocząstek

Identyfikację jakościową nanocząstek NKA_g wykonano metodą mikroanalizy fluorescencji rentgenowskiej EDX (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy). W trybie skanującym STEM-HAADF wykonano profil liniowy linii AgL potwierdzający zawartość srebra w nanocząstkach. Na rysunku 5 po lewej stronie można zauważyć, że analiza dotyczyła przekroju przez 3 nanocząstki (obraz w ciemnym polu). Po prawej stronie znajdują się 2 profile: górny ilustruje rozmiary tych nanocząstek, a dolny ich widmo. W przypadku dolnego panelu widmo linii L-NKA_g dokładnie pokrywa się z tymi samymi cząstkami, co dowodzi, że jest to srebro (PDF4).

Rysunek 6 przedstawia obecność miedzi w analizowanych nanokolidach, które określono na podstawie stałych sieciowych zmierzonych na obrazach transformaty Fouriera, FFT wysokorozdzielczych mikrografii TEM oraz z wykorzystaniem bazy danych krystalograficznych ICDD. Na podstawie analizy pomiaru stałych sieciowych w obrazie dyfrakcyjnym od 2 różnych płaszczyzn i porównaniu tych parametrów sieci z bazą danych dyfrakcyjnych ICDD potwierdziło, że w badanej próbce znajdują się nanocząstki NKC_u (PDF4).



Rys. 5. Wyniki analizy nanocząstek - panel lewy – zdjęcie mikroskopowe nanocząstek NKAg w ciemnym polu tryb STEM-HAADF, panel prawy – profil liniowy ilustrujący rozmiary nano-Ag i widmo linii L-NKAg



Rys. 6. Wyniki analizy cząstek NKCu: A – obraz TEM nanocząstek NKCu, B – transformata Fouriera FFT

6.2. Ocena rzepaku z uprawy w warunkach laboratoryjnych

Nasiona rzepaku przeznaczone do uprawy laboratoryjnej poddano analizom w celu określenia ich energii i zdolności kiełkowania na szalkach Petriego oraz w celu określenia stresu abiotycznego siewek rzepaku w 22 oraz 29 dniu wzrostu roślin w uprawie hydroponicznej. Jako wyznacznik stresu przyjęto mechanizmy enzymatyczne i nieenzymatyczne wśród których wyróżniamy: SOD, CAT, APX, GR, GPX, anty-ABTS oraz zawartość chlorofi-

li *a* i *b* oraz karotenoidów w analizowanych próbkach. Ponadto oznaczono zawartość Ag i Cu oraz makro pierwiastków Ca, K, Mg, Na, P i S w siewkach roślin.

6.2.1. Ocena energii i zdolności kiełkowania nasion

W tabeli 2 przedstawiono wyniki oceny energii oraz zdolności kiełkowania przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych. Energia kiełkowania w obiekcie kontrolnym wynosiła 96,7%. Po zastosowaniu nanokoloidu srebra we wszystkich stężeniach (50, 100 oraz 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) energia kiełkowania była większa niż w obiekcie kontrolnym, lecz statystycznie istotnie tylko w przypadku stężeń 50 oraz 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ i wynosiła ona odpowiednio 99,3% i 98,8%, co w końcowym rezultacie oznacza, że zastosowanie nanokoloidu srebra przyczyniło się do pobudzenia energii kiełkowania kolejno o 2,75; 0,68 i 2,16%. W przypadku namoczenia nasion w nanokoloidzie miedzi energia kiełkowania była większa, i na pograniczu statystycznie istotna w odniesieniu do obiektu kontrolnego i stanowiła wartość większą o 1,03% dla stężeń 50 i 100 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Jedynie stężenie 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ okazało się stężeniem nieznacznie obniżającym o 1,03% energię kiełkowania, która wynosiła 95,7%.

Zdolność kiełkowania nasion w obiekcie kontrolnym wynosiła 99,3%. Wyniki po zastosowaniu nanokoloidu srebra w badanym obiekcie, we wszystkich stężeniach okazały się porównywalne do uzyskanego w obiekcie kontrolnym, a zwiększenie zdolności kiełkowania o 0,6% odnotowano tylko po zastosowaniu stężenia 50 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. W przypadku zastosowania nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/N)NKCu w stężeniach 50 i 100 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ zdolność kiełkowania również była porównywalna z obiektem kontrolnym i wynosiła odpowiednio 99,33% i 99,67%. W przypadku aplikacji stężenia 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ obserwowano niewielki spadek w zdolności kiełkowania nasion wynoszący 0,66% (98,7%).

Tabela 2.

Wpływ stężenia nanokoloidów na energię oraz zdolność kiełkowania nasion rzepaku

Cecha (%)	Stężenie nanokoloidu						
	(N/N)NKAg				(N/N)NKCu		
	Obiekt kontrolny	50	100	150	50	100	150
	$\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$						
Energia kiełkowania	96,7±1,15	99,3±1,15ab	97,3±1,53	98,8±1,53ab	97,7±0,58a	97,7±0,58a	95,7±1,15ac
Zdolność kiełkowania	99,3±1,5	100,0	99,3±0,58	99,3±1,15	99,3±1,15	99,7±1,15	98,7±0,58b

Wartości średnie ± SD (n=9); a – statystycznie istotną różnicę w stosunku do obiektu kontrolnego; b, c – średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszach nie różnią się istotnie w stosunku do obiektu kontrolnego przy $p < 0,05$

6.2.2. Ocena długości pędów i korzonków siewek

W tabeli 3 przedstawiono średnie długości pędu i korzonków siewek w siódmym dniu doświadczenia, dotyczącego określenia zdolności kiełkowania nasion. Średnia wartość długości pędu siewek z obiektu kontrolnego wynosiła 36 mm. W obiektach, w których zastosowano namoczenie nasion w roztworach NKAg o stężeniach 50, 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$

obserwowano wzrost długości pędu w odniesieniu do siewek z obiektu kontrolnego, wynoszący odpowiednio: 28%, 42% i 23%. Po zastosowaniu nanokoloidu miedzi (N/N)NKCu obserwowano również wzrost długości pędu o 24% dla stężenia 50 i 100 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz o 28% dla stężenia 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Aplikowane stężenie nanocząstek miedzi były dodatnio ($R^2=0,72$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$ z długością pędów analizowanych siewek.

Średnie długości korzonków roślin z obiektu kontrolnego, wynosiły 48 mm. W przypadku nasion namoczonych w roztworach NKA_g [(N/N)NKA_g], we wszystkich stężeniach obserwowano wzrost jego długości w porównaniu z siewkami kontrolnymi wraz z dawką nanosrebra. Wynosiły one kolejno: 38%; 48% i 82%. Po zastosowaniu roztworu NKC_u [(N/N)NKC_u] również obserwowano statystycznie istotny wzrost długości korzenia po aplikacji preparatu o stężeniu 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Najkrótsze korzonki wytworzyły siewki po zastosowaniu najniższego stężenia nanokoloidu miedzi (3%). Wzrost długości korzonków pozostałych dawkach preparatu wynosił odpowiednio 14% oraz 35% (rys. 7).

Tabela 3.

Wpływ różnego stężenia nanokoloidów na długość pędu oraz korzonków rzepaku

Cecha (mm)	Stężenie nanokoloidu						
	(N/N)NKA _g				(N/N)NKC _u		
	Obiekt kontrolny	50	100	150	50	100	150
		$\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$					
Długość pędu	36±0,32	47±0,28ab	52±1,04ab	45±0,05ab	45±0,50ab	45±0,50ab	47±0,28ab
Długość korzonka	48±0,76	67±1,52ab	72±1,26ab	88±0,50ac	50±0,57c	58±0,50ab	65±1,50ab

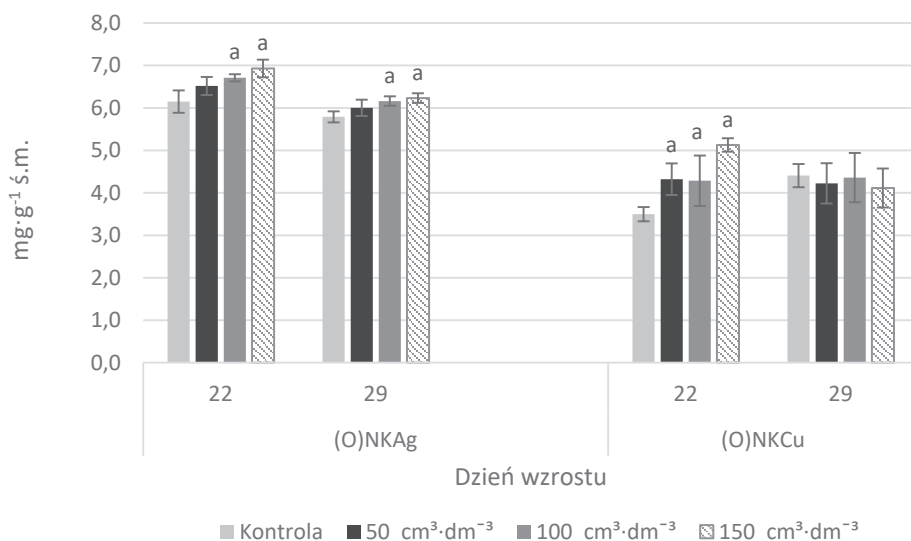
Wartości średnie ± SD (n=9); a – statystycznie istotną różnicę w stosunku do obiektu kontrolnego. b, c – średnie oznaczone tymi samymi literami w wierszach oznacza, że wyniki nie różnią się istotnie w stosunku do obiektu kontrolnego przy $p<0,05$



Rys. 7. Wzrost siewek rzepaku po zastosowaniu namaczania nasion w NKA_g (A) i NKC_u (B)

6.2.3. Ocena stresu abiotycznego

Zawartość białka rozpuszczalnego (rys. 8) w siewkach z obiektu kontrolnego w seriach (O)NKAg i (O)NKC u w 22 dniu wzrostu roślin wynosiła 7,14 oraz 3,50 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. W przypadku roślin (O)NKAg we wszystkich trzech wariantach stężeń (50, 100 oraz 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) zaobserwowano zwiększenie syntezy białka w zakresie od 5,91 do 12,61%, lecz statystycznie istotnie tylko dla dwóch wyższych dawek. Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (O)NKC u na rośliny nastąpiło statystycznie istotne zwiększenie syntezy białka w stosunku do siewek z obiektu kontrolnego we wszystkich wariantach doświadczenia. Zawartości białka w siewkach roztwór o stężeniu 50, 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ zwiększyła się odpowiednio o 23,55%; 22,52% i 46,54%. W 29 dniu wzrostu roślin zawartość białka w obiekcie kontrolnym wynosiła 3,50 oraz 4,41 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m. W serii z nanokolloidem srebra obserwowano podobną tendencję jak w 22 dniu wzrostu roślin. W przypadku dwóch wyższych zastosowanych stężeń odnotowano statystycznie istotne zwiększenie syntezy białka wynoszące odpowiednio 3,7 i 7,7%. W przypadku nanokolloidu miedzi odnotowano zmianę. Tu we wszystkich przypadkach zastosowanych stężeń 50, 100 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ obserwowano zmniejszenie syntezy białka kolejno o: 4,2%; 1,1% oraz 6,6%.

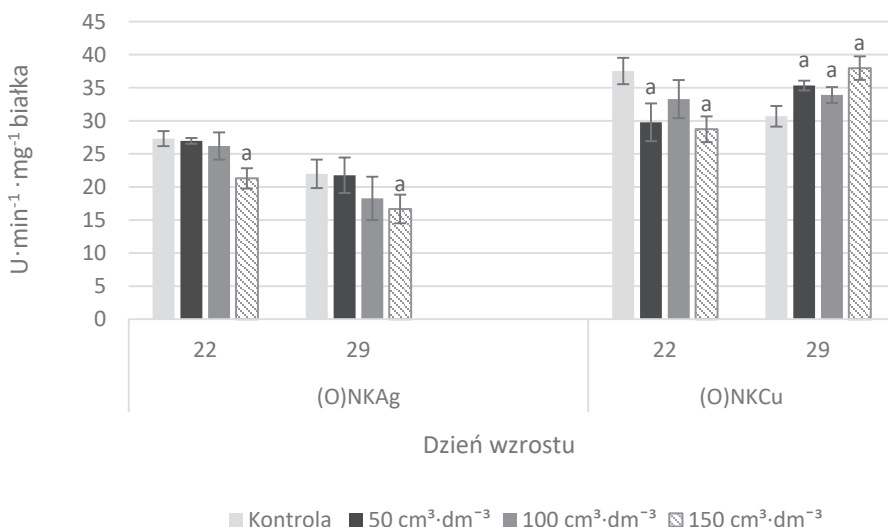


Rys. 8. Zawartość białka rozpuszczalnego w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p < 0,05$)

Aktywność dysmutazy ponadtlenukowej (SOD) w liściach rzepaku przedstawiono na rysunku 9. Na jej podstawie można stwierdzić, że aktywność SOD w próbach kontrolnych w 22 dniu wzrostu po aplikacji nanokolloidów w obiektach (O)NKAg i (O)NKC u wynosiła kolejno 27,30 oraz 37,52 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka. Po zastosowaniu nanokolloidu srebra (O)NKAg we wszystkich badanych stężeniach obserwowano obniżenie aktywności tego enzymu w stosunku do obiektu kontrolnego. Największe różnice wystąpiły w wariantcie ze stężeniem

$100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, w którym odnotowano spadek aktywności o 4,0% oraz statystycznie istotny dla stężenia $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ o 22%. W przypadku użycia nanokoloidu miedzi NKCu odnotowano statystycznie istotne obniżenie aktywności SOD dla stężeń 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Aktywność SOD była niższą od otrzymanej w próbkach z obiektu kontrolnego kolejno o 20,6% i 23,4%.

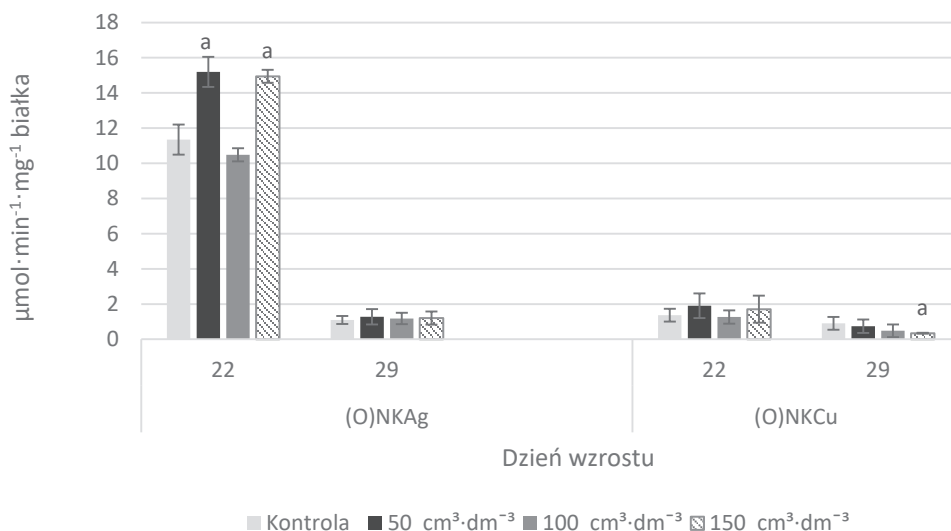
W 29 dniu wzrostu roślin aktywność SOD w próbach roślin kontrolnych w serii (O)NKAg wynosiła 21,99 a w serii (O)NKCu 30,68 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka. W przypadku zastosowania nanokoloidu srebra odnotowano zmniejszenie aktywności dysmutazy pod wpływem wszystkich rozpatrywanych stężeń. Statystycznie istotną różnicę obserwowano tylko w przypadku zastosowania nanokoloidu w stężeniu $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, a aktywność SOD była niższa o 24,2% niż w próbie roślin kontrolnych. Odminną reakcję zaobserwowano w przypadku aplikacji nanokoloidu miedzi na rośliny. Nastąpiło tu statystycznie istotne zwiększenie aktywności tego enzymu w roślinie w stosunku do stwierdzonego w obiekcie kontrolnym we wszystkich zastosowanych dawkach odpowiednio o 15,2; 10,5% oraz 23,7%.



Rys. 9. Aktywność SOD w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p < 0,05$)

Aktywność katalazy CAT w liściach rzepaku jarego (rys. 10) w próbach kontrolnych po zastosowaniu oprysku roślin w seriach (O)NKAg i (O)NKCu w 22 dniu wzrostu roślin wynosiła odpowiednio 11,35 oraz 1,37 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka. W pierwszym dniu (22 dniu wzrostu) po oprysku roślin nanokoloidem srebra zaobserwowano statystycznie istotne i dość znaczne zwiększenie aktywności tego enzymu w obiektach z najniższym oraz najwyższym stężeniem. Aktywność CAT była wyższa kolejno o 38,2% i 31,7% od aktywności odnotowanej w roślinach kontrolnych. Po zastosowaniu nanokoloidu w stężeniu $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ obserwowano spadek aktywności enzymu o 7,6%. Aktywność katalazy po

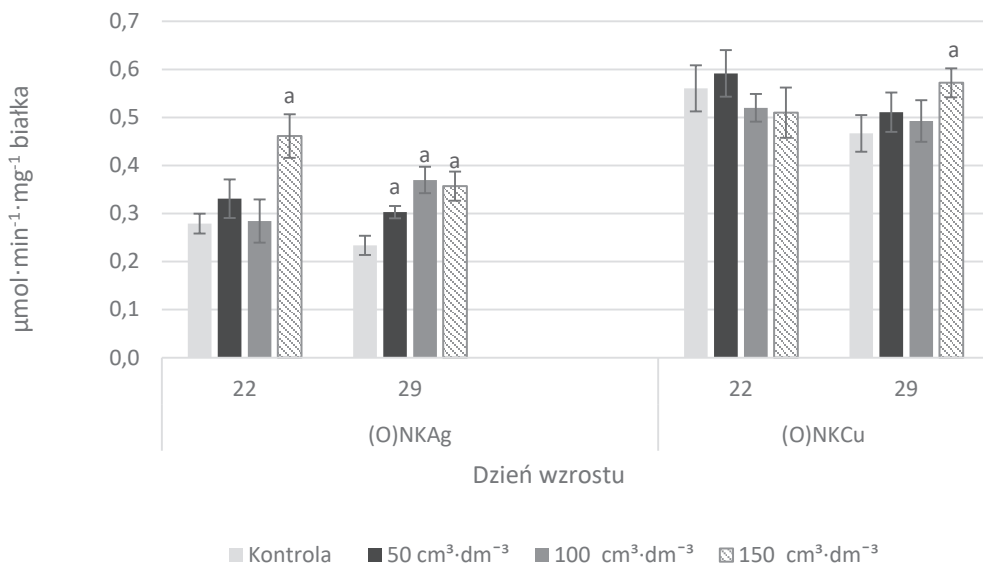
aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (O)NKC_u na rośliny była dużo mniejsza, choć zmiany wykazywały podobną tendencję jak po zastosowaniu nanokoloidu srebra w serii (O)NKAg. Można zaobserwować wzrost aktywności po zastosowaniu dawek 50 i 150 cm³·dm⁻³ o 39,2% oraz 25,0% w stosunku do obiektu kontrolnego. Dla stężenia 100 cm³·dm⁻³ odnotowano zmniejszenie aktywności rozpatrywanego enzymu o 7,3%. Pobrane próbki z obiektu kontrolnego dla 29 dnia wzrostu roślin po aplikacji obydwóch nanokoloidów charakteryzowały się aktywnością CAT wynoszącą 1,10 oraz 0,90 μmol·min⁻¹·mg⁻¹ białka. W przypadku zastosowanego nanokoloidu w serii (O)NKAg obserwowano niewielki wzrost aktywności CAT wynoszący dla kolejnych stężeń odpowiednio 16,2%; 7,5% oraz 9,7%. Natomiast po aplikacji nanokoloidu miedzi we wszystkich rozpatrywanych stężeniach odnotowano tendencję spadkową w stosunku do obiektu kontrolnego. Otrzymane wyniki były niższe odpowiednio o 17,7%; 46% oraz statystycznie istotnie o 61,9%.



Rys. 10. Aktywność CAT w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

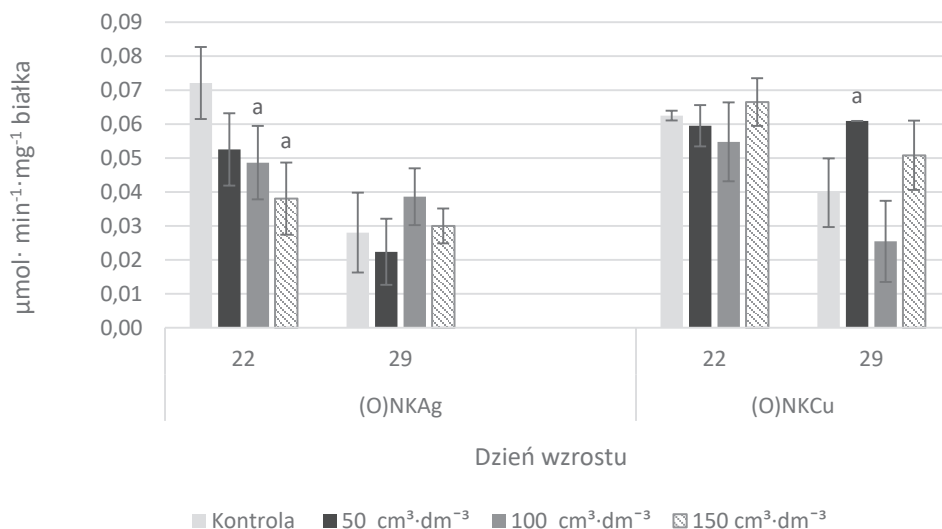
Aktywność enzymu peroksydazy askorbinianowej (APX) w 22 dniu wzrostu roślin w obiektach kontrolnych w zależności od zastosowanych preparatów NKAg oraz NKC_u wynosiła odpowiednio 0,28 i 0,56 μmol·min⁻¹·mg⁻¹ białka (rys. 11). Po aplikacji nanokoloidu srebra w serii (O)NKAg aktywność enzymu peroksydazy askorbinianowej zwiększyła się w porównaniu z roślinami z obiektu kontrolnego. Po aplikacji nanokoloidu srebra aktywność enzymu wzrosła statystycznie istotnie o 65,2% w przypadku stężenia 150 cm³·dm⁻³ i wynosiła 0,46 μmol·min⁻¹·mg⁻¹ białka. W pozostałych przypadkach aktywność była również wyższa od zaobserwowanej w roślinach z obiektu kontrolnego o 18,56% dla stężenia 50 cm³·dm⁻³ oraz 1,82% dla stężenia 100 cm³·dm⁻³. W przypadku aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (O)NKC_u w stężeniu 50 cm³·dm⁻³ aktywność APX wzrosła o 5,6%, a w pozostałych zaobserwowano obniżenie aktywności peroksydazy askorbinianowej

wynoszące kolejno: 7,2% i 9,01%. Aktywność APX w roślinach kontrolnych w 29 dniu wzrostu roślin dla nanokolloidów srebra i miedzi wynosiła kolejno 0,23 i 0,47 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Po aplikacji nanokolloidu srebra we wszystkich wariantach stężeń aktywność enzymu była statystycznie istotnie wyższa niż w roślinach kontrolnych, odpowiednio o 29,6%; 58,2% oraz 52,7%. W przypadku aplikacji nanokolloidu miedzi w serii (O)NKC_u również obserwowano wzrost aktywności enzymu APX we wszystkich rozpatrywanych przypadkach, odpowiednio o 9,4%; 5,5% i statystycznie istotnie 22,5%.



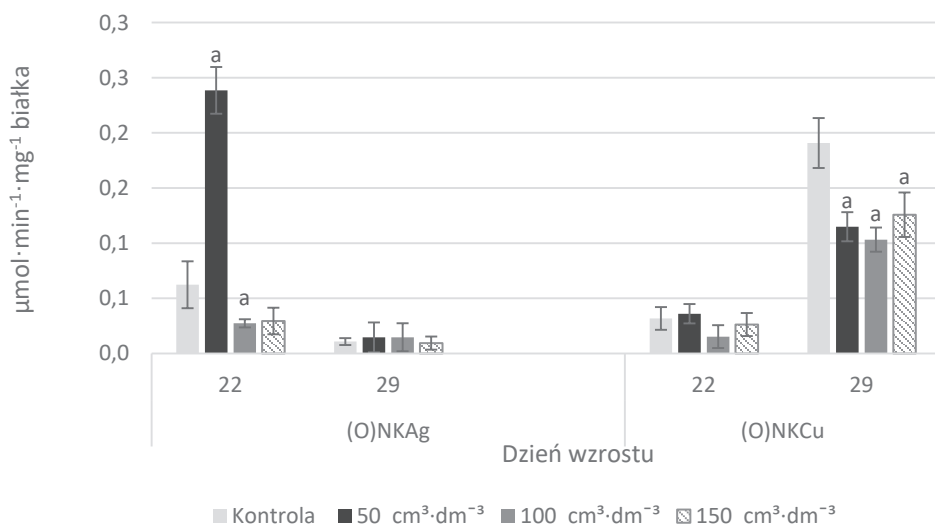
Rys. 11. Aktywność APX w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

Aktywności reduktazy glutationowej (GR) w wariantach kontrolnych w 22 dniu wzrostu roślin (rys. 12) wynosiły: 0,07 i 0,06 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Po aplikacji preparatu nanokolloidu srebra obserwowano inhibicję aktywności GR wynoszącą kolejno: 27,1%; 32,5% i 47,2% i statystycznie istotną dla stężeń 100 i 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. W przypadku aplikacji nanokolloidu miedzi w stężeniu 50 i 100 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ obserwowano zmniejszenie aktywności reduktazy glutationowej, wynoszące odpowiednio 4,8% oraz 12,4%. Wyjątkiem okazało się stężenie 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ po zastosowaniu, którego nastąpiło zwiększenie aktywności enzymu GR o 6,4%. W 29 dniu wzrostu roślin aktywność GR w obiektach kontrolnych dla nanokolloidów srebra i miedzi wynosiła 0,028 i 0,04 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Po zastosowaniu nanokolloidu srebra obserwowano inhibicję aktywności rozpatrywanego enzymu przy stężeniu 50 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ wynoszącą 20,2%. Nanosrebro zastosowane w stężeniach 100 i 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ spowodowało wzrost aktywności GR wynoszący kolejno 38% i 3%. W wyniku aplikacji nanokolloidu miedzi na rośliny w serii (O)NKC_u obserwowano inhibicję aktywności tego enzymu przy stężeniu 100 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ wynoszącą 36%, zaś przy stężeniu 50 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ nastąpiło statystycznie istotne pobudzenie aktywności o 53,2%, a najwyższa dawka NKC_u zwiększyła aktywność GR o 27,7% w porównaniu z roślinami obiektu kontrolnego.



Rys. 12. Aktywność GR w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

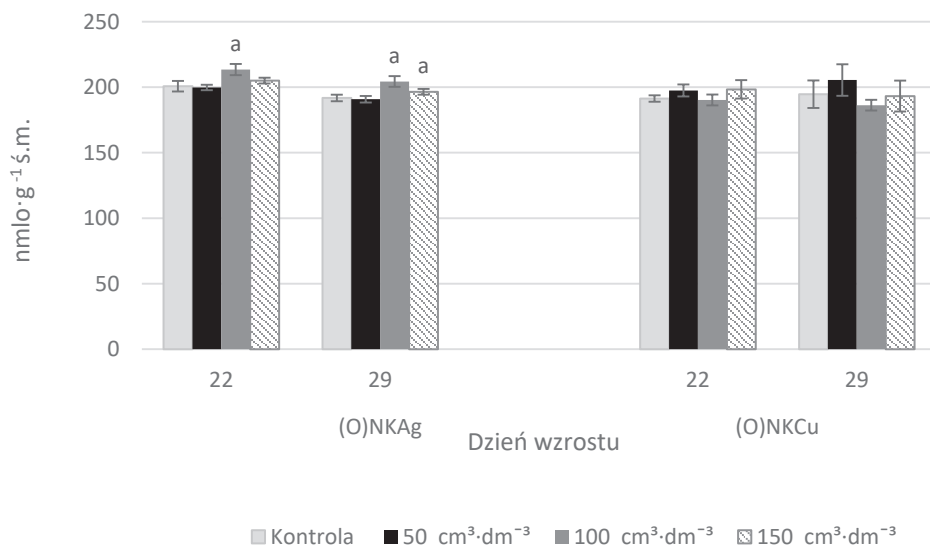
Aktywność peroksydazy gwasjokolowej (GPX) przedstawiono na rysunku 13. Aktywność GPX w roślinach kontrolach w 22 dniu wzrostu roślin wynosiła dla nanokolloidów srebra i miedzi odpowiednio 0,06 oraz 0,03 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Najwyższą, statystycznie istotnie aktywność obserwowano po aplikacji nanokolloidu srebra w stężeniu 50 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$, wynoszącą aż 232% w porównaniu z obiektem kontrolnym. W przypadku obydwu wyższych stężeń nastąpiło osłabienie aktywności enzymu GPX odpowiednio o 43,5% (statystycznie istotnie) oraz o 19,8%. Podobną reakcję obserwowano po zastosowaniu nanokolloidu miedzi w serii (O)NKCu. Niewielki wzrost aktywności obserwowano po aplikacji roztworu o stężeniu 50 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ wynoszący 13,2% oraz inhibicję aktywności przy stężeniu 100 i 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ odpowiednio o 52% oraz 17,5%. W 29 dniu wzrostu roślin aktywność peroksydazy gwasjokolowej w roślinach z obiektów kontrolnych po aplikacji nanokolloidów srebra i miedzi wynosiła kolejno 0,01 oraz 0,19 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. W wariancie z użyciem NKAg w stężeniu 50 i 100 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ obserwowano niewielki wzrost aktywności analizowanego enzymu wynoszący odpowiednio 36% oraz 35,8%, a zastosowany w najwyższym stężeniu obniżał aktywność GPX o 12,7%. W przypadku nanokolloidu miedzi zastosowanego we wszystkich stężeniach odnotowano statystycznie istotną inhibicję aktywności wynoszącą kolejno: 39,8%; 52% oraz 17,5%.



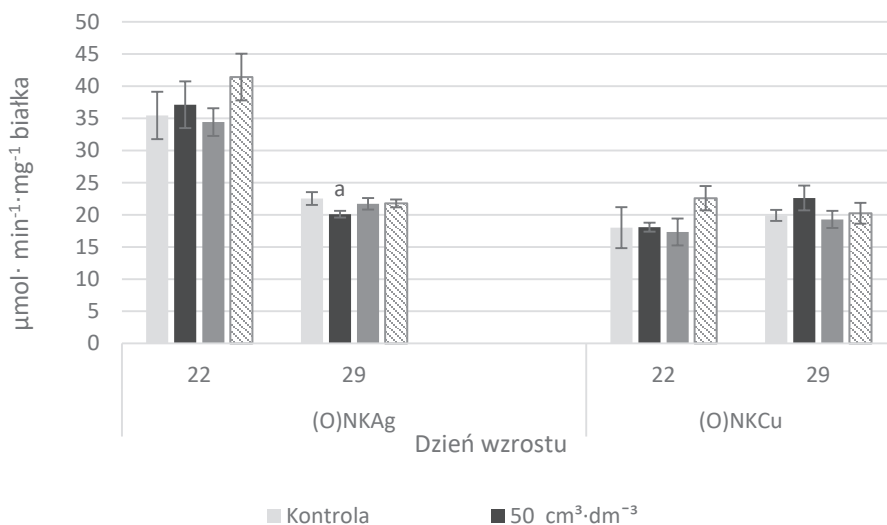
Rys. 13. Aktywność GPX w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – oznacza istotną różnicę w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

W próbach z obiektów kontrolnych (rys. 14) peroksydacja lipidów (LPO) w 22 dniu wzrostu roślin wynosiła odpowiednio 201 oraz 191 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}$ Po zastosowaniu nanokoloidu srebra w serii (O)NKAg o stężeniu $50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ zaobserwowano niewielki spadek peroksydacji lipidów wynoszący 0,5% oraz po zastosowaniu nanokoloidu miedzi w serii (O)NKC u o stężeniu $100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. Statystycznie istotny wzrost o 6,3% w stosunku do roślin kontrolnych obserwowano przy stężeniu NKAg $100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. Po aplikacji NKC u zwiększenie peroksydacji wynosiło odpowiednio 3,2% i 3,7% dla stężenia 50 i $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. W 29 dniu wzrostu LPO w obiektach kontrolnych wynosiły 192 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}$ w [(O)NKAg] oraz 194,6 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s.m.}$ w serii [(O)NKC u]. Po aplikacji NKAg obserwowano podobną zależność jak w 22 dniu wzrostu roślin. Obserwowano nieznaczny spadek LPO po zastosowaniu NKAg w stężeniu $50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ wynoszącą 0,52% oraz niewielki, ale statystycznie istotny wzrost jej aktywności po aplikacji nanokoloidu w stężeniu $100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ (6,5%) i $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ (2,5%). W przypadku roślin opryskanych nanokoloidem miedzi (O)NKC u wzrost LPO obserwowano tylko przy stężeniu $50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ wynoszący 5,5%, a w przypadku pozostałych dawek – inhibicję wynoszącą kolejno 4,3% oraz 0,7%. Różnice te nie były statystycznie istotne.

Ogólną aktywność antyrodnikową (anty-ABTS) przedstawiono na rysunku 15. W 22 dniu wzrostu roślin jego aktywność w próbach kontrolnych serii (O)NKAg i (O)NKC u wynosiła 35,45 oraz 18 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. Jego aktywność w roślinach po aplikacji NKAg wzrosła o 4,7% i 20,4% dla stężenia 50 i $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. Natomiast po zastosowaniu stężenia $100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ odnotowano obniżenie tej aktywności wynoszące 7,3% w odniesieniu do roślin z obiektu kontrolnego. Po aplikacji NKC u reakcja była podobna.



Rys. 14. Peroksydacja lipidów LPO w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)



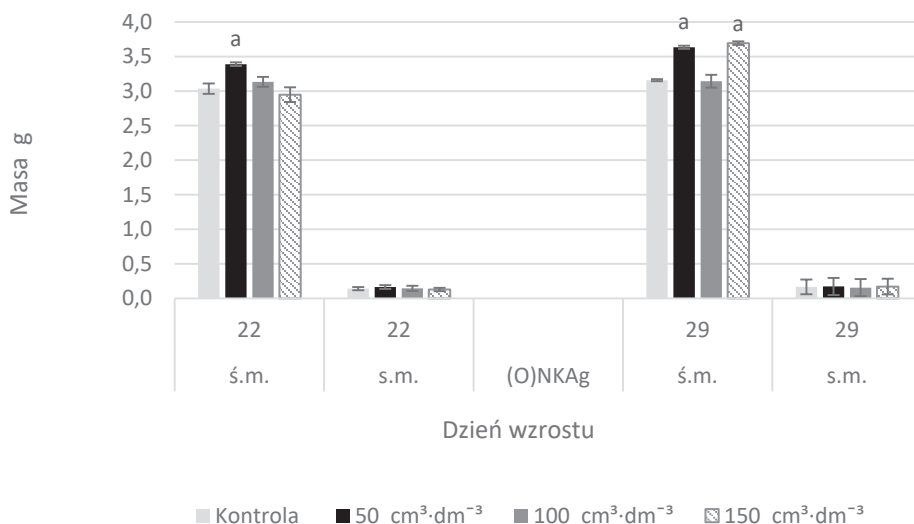
Rys. 15. Aktywność anti-ABTS w liściach rzepaku jarego; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

Odnotowano wzrost anti-ABTS wynoszący 0,41% i 30,3% kolejno dla stężeń 50 i 150 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ aplikowanego preparatu, a niewielki spadek w przypadku stężenia 100 $\text{cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$

wynoszący 4,1%. W 29 dnia wzrostu roślin wartość rozpatrywanej aktywności enzymu w próbkach obiektów kontrolnych wynosiła kolejno 22,54 i 19,90 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka. W przypadku zastosowania nanokoloidu srebra w stężeniu $50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ obserwowano statystycznie istotny spadek aktywności anty-ABTS o 10,9%. Nanosrebro zastosowane w pozostałych stężeniach spowodowało wzrost tego enzymu o 8,1% i 0,32% dla stężeń 100 i $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$, a po aplikacji NKCu w stężeniach 50 i $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ odpowiednio o 13,6% oraz 5,0% w porównaniu z roślinami kontrolnymi. W stężeniu pośrednim ($100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$) odnotowano zmniejszenie o 14,7% aktywności anty-ABTS.

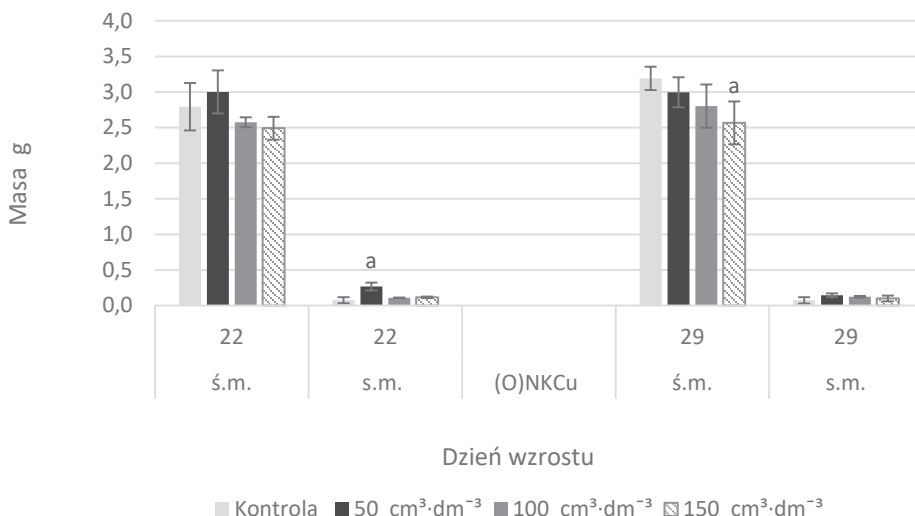
Na rysunkach 16 i 17 przedstawiono plon świeżej i suchej masy roślin poddanych opryskowi nanokoloidów srebra i miedzi. Plon świeżej masy roślin w obiektach kontrolnych w serii (O)NKAg w 22 i 29 dniu wzrostu roślin wynosił kolejno 3,04 g oraz 3,16 g (rys. 16). Oprysk roślin (O)NKAg w stężeniu $50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ w 22 dniu wzrostu wpłynął statystycznie istotnie na przyrost ich masy, zwiększając ją o 11,6% w porównaniu z obiektem kontrolnym. Nieznaczny wzrost wynoszący 3,2% obserwowano po zastosowaniu NKAg w stężeniu $100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. Kontakt rośliny z nanokoloidem srebra o stężeniu $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ skutkował ograniczeniem plonu świeżej masy o 2,9%. W 29 dniu wzrostu roślin obserwowano znaczny statystycznie istotny wzrost masy roślin przy aplikacji roztworu o stężeniu 50 i $150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$, wynoszący odpowiednio 15,1% oraz 17,0%. Okazało się, że aplikacja stężenia $100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ wpłynęła nieznacznie wstrzymując wzrost roślin o 0,5% w stosunku do obiektu kontrolnego.

Plony suchej masy roślin w kolejnych dniach wzrostu wynosiły 0,14 g oraz 0,17 g. W obu analizowanych terminach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic.



Rys. 16. Plon świeżej i suchej masy korzeni i pędów rzepaku jarego po aplikacji NKAg; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

Na rysunku 17 przedstawiono plony świeżej i suchej masy roślin opryskanych nanokolloidem miedzi w serii (O)NKC_u. Plon świeżej masy roślin w obiektach kontrolnych w 22 i 29 dniu wzrostu wynosił 2,79 g oraz 3,19 g. W 22 dniu wzrostu roślin obserwowano niewielkie zwiększenie przyrostu masy przy stężeniu 50 cm³·dm⁻³, wynoszące 7,4%. Natomiast w przypadku zastosowania roztworów o stężeniu 100 i 150 cm³·dm⁻³ odnotowano ograniczenie wzrostu roślin, wynoszące kolejno 7,8% oraz 10,8%. W 29 dniu wzrostu roślin zastosowanie nanokolloidu w stężeniach 150 cm³·dm⁻³ spowodowało statystycznie istotne zahamowanie ich wzrostu w odniesieniu do obiektu kontrolnego, wynoszące 39,4%. Dla niższych stężeń ograniczenie wzrostu wynosiło kolejno 24,3% i 24,0%. Plony suchej masy w porównaniu z otrzymanymi w obiektach kontrolnych w obydwu terminach wynosiły 0,08 g oraz 0,07 g.



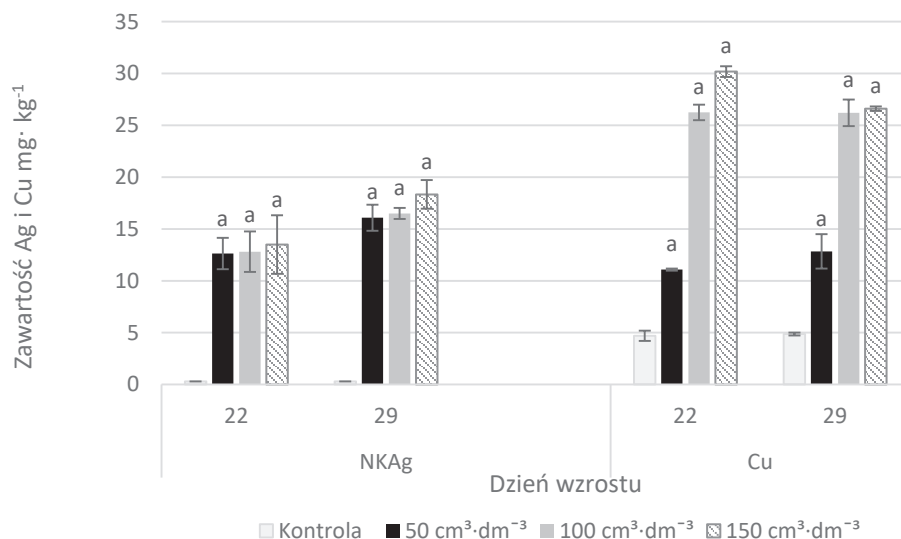
Rys. 17. Plon świeżej i suchej masy korzeni i pędów rzepaku jarego po aplikacji NKC_u; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

6.2.4. Ocena zawartości pierwiastków w liściach

Zawartość srebra oraz miedzi w liściach nasion rzepaku po zastosowaniu oprysku nanokolloidem srebra w obiekcie (O)NKAg przedstawiono na rysunku 18.

W próbie roślin z obiektu kontrolnego nie stwierdzono zawartości tego pierwiastka. Natomiast w 22 dniu wzrostu po aplikacji nanokolloidu srebra jego zawartość zwiększyła się statystycznie istotnie w miarę wzrostu stężenia tego preparatu. Dla stężeń 50, 100 i 150 cm³·dm⁻³ zawartość srebra wzrosła i wynosiła odpowiednio 12,64; 12,81 i 13,50 mg·kg⁻¹. W 29 dniu wzrostu roślin obserwowano statystycznie istotne zwiększenie jego zawartości w porównaniu z dniem 22, kolejno dla zastosowanych stężeń o 43%; 30% oraz 20%. Interesujące rezultaty obserwowano w przypadku zawartości Cu w liściach rzepaku. W roślinach z obiektu kontrolnego zawartość miedzi w liściach wynosiła w 22 i 29 dniu wzrostu

4,70 mg·kg⁻¹ oraz 4,87 mg·kg⁻¹. Po zastosowaniu nanokoloidu srebra obserwowano statystycznie istotne zwiększenie przyswajania tego składnika przez rośliny. W 22 dniu wzrostu roślin zawartość miedzi wzrosła kolejno o 136%; 458% oraz 542% w odniesieniu do roślin z obiektu kontrolnego. W 29 dnia życia roślin obserwowano podobną tendencję, a zawartości miedzi były wyższe kolejno o 164%; 438% oraz 436% w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

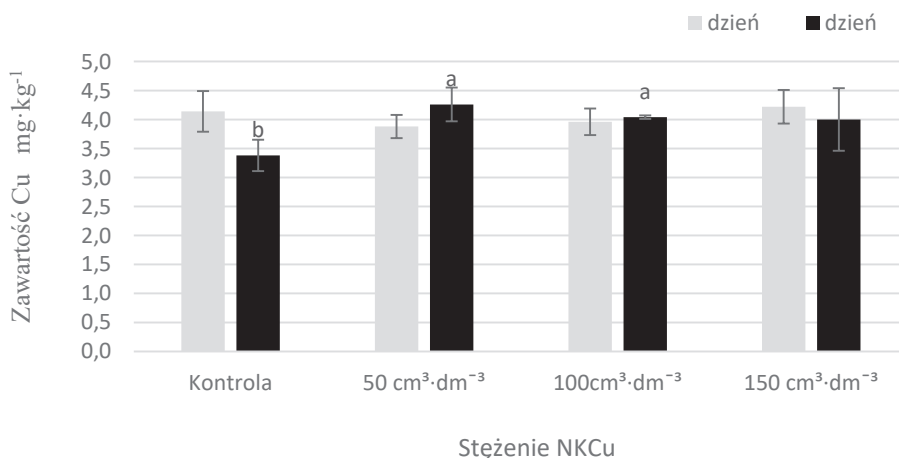


Rys. 18. Zawartość srebra w liściach rzepaku jarego oraz miedzi po aplikacji NKA; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

Zawartość miedzi w liściach rzepaku po zastosowaniu oprysku nanokoloidem miedzi przedstawiono na rysunku 19. W dniu 22 oraz 29 wzrostu roślin zawartość miedzi w roślinach z obiektu kontrolnego wynosiła kolejno 4,14 oraz 3,38 mg·kg⁻¹. Zawartość w roślinach kontrolnych pomiędzy 22 a 29 dniem wzrostu roślin różni się statystycznie istotnie. Ilość przyswojonej miedzi przez roślinę w 29 dniu zmniejszyła się o 18,4%. W 22 dniu wzrostu siewek rzepaku po zastosowaniu NKC u stężeniach 50 i 100 cm³·dm⁻³ obserwowano niewielkie obniżenie zawartości miedzi w liściach wynoszące odpowiednio 6,3% oraz 4,3%. W przypadku stężenia 150 cm³·dm⁻³ zawartość miedzi nieznacznie wzrosła o 2% i wynosiła 4,22 mg·kg⁻¹. W 29 dniu wzrostu roślin stwierdzono statystycznie istotne różnice zawartości tego pierwiastka w roślinach po zastosowaniu roztworów w stężeniach 50 i 100 cm³·dm⁻³ w porównaniu z roślinami kontrolnymi i wynosiły kolejno 4,26 oraz 4,04 mg·kg⁻¹, co stanowi wzrost o 26% i 19,5% w stosunku do zawartości w roślinach kontrolnych. Dla stężenia 150 cm³·dm⁻³ zawartość Cu wzrosła o 18,3%.

W tabeli 4 podano zawartość pozostałych pierwiastków w liściach rzepaku poddanych aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (O)NKA. Omówiono składniki uważane za naj-

ważniejsze oraz o największej zawartości ilościowej w analizowanym materiale, do których należą: Ca, K, Mg, P, S oraz Na.



Rys. 19. Zawartość Cu w liściach nasion rzepaku po oprysku NKCu; wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$). b – istotne różnice w stosunku do kontroli we wcześniejszym dniu wzrostu roślin ($p<0,05$)

Zawartość wapnia (Ca) w roślinach kontrolnych w 22 i 29 dniu wzrostu wynosiła kolejno 54 817 oraz 18 240 mg·kg⁻¹. W większości rozpatrywanych wariantów zastosowania nanokolloidu srebra w 22 dniu wzrostu zaobserwowano znaczne obniżenie jego zawartości w porównaniu z obiektem kontrolnym. Dla poszczególnych stężeń wynosiło ono kolejno: 76,6%; 76,4% oraz 76,3%. W późniejszym okresie, czyli w 29 dniu wzrostu roślin obserwowano podobną tendencję z wyjątkiem stężenia 50 cm³·dm⁻³, dla którego odnotowano tylko nieznaczący wzrost wynoszący 0,2%. Po zastosowaniu pozostałych stężeń obserwowano obniżenie zawartości miedzi wynoszące odpowiednio 2,5% oraz 8%.

Zawartość potasu (K) w roślinach z obiektu kontrolnego w 22 i 29 dniu wzrostu roślin wynosiła kolejno 29 780 oraz 39 043 mg·kg⁻¹. Po zastosowaniu nanokolloidu srebra obserwowano w stężeniach 50 i 100 cm³·dm⁻³ w 22 dniu obniżenie zawartości potasu w liściach. W przypadku stężenia 50 cm³·dm⁻³ było to statystycznie istotne obniżenie zawartości potasu w odniesieniu do roślin kontrolnych o 11,5%. Po aplikacji roztworów w stężeniu 100 cm³·dm⁻³ obniżenie zawartości wynosiło 3%. Statystycznie istotny wzrost zawartości K obserwowano po zaaplikowaniu roztworu o stężeniu 150 cm³·dm⁻³ (10%). Otrzymane wyniki w 29 dniu wzrostu roślin po zastosowaniu nanokolloidu srebra we wszystkich stężeniach zawartość była statystycznie istotnie niższa w odniesieniu do obiektu kontrolnego kolejno o 3,0%; 11,% oraz 5,7%.

Tabela 4.
Zawartość makro pierwiastków w liściach rzepaku jarego opryskanego (O)NKAg

		(O) NKAg										
Pierwiastki		22 dzień wzrostu				29 dzień wzrostu						
(mg·kg ⁻¹)	Obiekt kontrolny	50	100	150	Obiekt kontrolny	50	100	150	cm ³ ·dm ⁻³	50	100	150
		cm ³ ·dm ⁻³										
Ca	54817±95,51	12810±52,65ab	12940±55,75ab	12993±60,86a	18240±68,08	18280±60,7b	17793±66,4b					16763±21,7b
K	29780±63,36	26350±54,30ab	28830±62,89c	32820±65,58ad	39043±47,49	37920±47,78ab	34543±48,38ac					36823±74,32ad
Mg	7111±74,15	6941±24,50	7071±66,33	6778±41,00a	7717±75,51	7588±37,07a	7756±66,09a					7415±37,76a
Na	905,00±60,86	1148±59,30a	1478±57,26ac	1352±65,64ab	1898±51,45	1817±30,86ab	1545±30,55ab					1341±29,07ab
P	12853±64,14	12533±53,44b	12600±58,08b	11920±61,92ac	11740±42,97	10937±48,48ab	11497±60,29b					11340±51,74ab
S	14913±82,02	13637±81,45ab	14843±69,80b	15693±66,44b	18957±29,34	18933±60,49b	19097±50,51b					18010±60,35ab

Wartości średnie ± SD dla (n=9); a – statystycznie istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego (p<0,05);
b, c, d –statystycznie istotne różnice pomiędzy rozpatrywanymi stężeniami dla wybranych nanokolidów w wierszu (p<0,05)

Zawartość fosfor (P) w roślinach z obiektu kontrolnego wynosiła 12 853 oraz 11 740 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W trakcie wzrostu roślin nastąpił spadek zawartości fosforu po zastosowaniu nanosrebra we wszystkich stężeniach. W 22 dniu obserwowano zawartość, która była statystycznie istotnie niższa tylko dla stężenia $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ o 7,26%. Natomiast dla pozostałych dawek preparatu obserwowano obniżenie o 2,5% oraz 2,0%. Po 29 dniu życia roślin obserwowano obniżenie zawartości fosforu we wszystkich aplikowanych stężeniach odpowiednio o 7%; 2% oraz 3,5%.

Zawartość siarki (S) w liściach rzepaku w kolejnych dniach z obiektu kontrolnego wynosiła 14 913 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ oraz 18 957 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W 22 dniu wzrostu roślin obserwowano statystycznie istotny spadek jej zawartości po aplikacji nanokolloidu srebra w stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, które wynosiło 8,5%. W przypadku stężenia $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ obserwowane nieznaczne obniżenie zawartości siarki o 0,5%, a stężenie $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ spowodowało jej niewielki wzrost wynoszący 5%. W 29 dniu wzrostu roślin obserwowano nieznaczny spadek zawartości S po zastosowaniu nanokolloidu Ag w stężeniach 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, o 0,1% oraz 5% w porównaniu z zawartością tego pierwiastka w obiekcie kontrolnym. Natomiast po aplikacji roztworu o stężeniu $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ zaobserwowano niewielki wzrost wynoszący 1%.

Zawartość magnezu (Mg) w liściach z obiektu kontrolnego wynosiła w kolejnych dniach 7 111 oraz 7 717 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Jego zawartość w 22 dniu wzrostu roślin była niższa niż w roślinach kontrolnych dla każdego zastosowanego stężenia. Po aplikowaniu roztworu o stężeniach 50, 100 oraz $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ zawartość magnezu była niższą o 2%; 0,5% i 5%. W 29 dniu wzrostu roślin nastąpił statystycznie istotny spadek jego zawartości kolejno o 2%; 0,5% oraz 4% po aplikacji nanokolloidu.

Zawartość sodu (Na) w rzepaku z obiektu kontrolnego w kolejnych dniach wzrostu wynosiła 905 oraz 1 898 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W 22 dniu wzrostu roślin po aplikacji nanokolloidu srebra w serii (O)NKAg obserwowano statystycznie istotny wzrost jego zawartości o 27%; 63% oraz 49%. Odwrotną sytuację zaobserwowano w 29 dniu wzrostu roślin. Wartości te stanowiły statystycznie istotne różnice obniżenia ilości omawianego pierwiastka. Otrzymane wartości dla rozpatrywanych stężeń wynosiły kolejno: 5%; 19% oraz 29%.

W tabeli 5 przedstawiono zawartość pierwiastków w liściach rzepaku po aplikacji NKCu w trzech stężeniach w obiekcie (O)KNCu. Zawartość wapnia (Ca) w rzepaku w kolejnych dniach wzrostu wynosiła 8 222 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ oraz 9 557 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W pierwszym terminie wzrostu roślin po zastosowaniu nanokolloidu miedzi we wszystkich stężeniach obserwowano statystycznie istotny spadek zawartości wapnia, kolejno o 15,5%; 32,5% oraz 10% w porównaniu z roślinami w obiekcie kontrolnym. Podobną tendencją zaobserwowano w 29 dniu. W odniesieniu do zawartości Ca w próbach z obiektu kontrolnego nastąpiło statystycznie istotne obniżenie zawartości Ca po zastosowaniu NKCu w stężeniach 50 i $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, które wynosiły kolejno 4% oraz 11,3%. Po użyciu nanokolloidu o stężeniu $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ obserwowano statystycznie istotny wzrost zawartości tego pierwiastka wynoszący 33%.

Zawartość potasu (K) w próbach liści dla kolejnych dni z obiektu kontrolnego wynosiła odpowiednio 1 571 oraz 20 143 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W 22 dniu wzrostu roślin obserwowano statystycznie istotny spadek jego zawartości po zastosowaniu NKCu w stężeniach 50, 100 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, w porównaniu z obiektem kontrolnym o 20%; 45% oraz 23,6%. W 29 dniu nastąpił statystycznie istotny spadek o 10% zawartości potasu w liściach rzepaku, na które zastosowano nanokolloid miedzi w stężeniach 50 i $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, w odniesieniu do roślin z obiektu kontrolnego. Statystycznie istotny wzrost zawartości potasu obserwowano po zastosowaniu NKCu w najwyższym stężeniu ($150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$), wynoszący aż 53% (30 906 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Tabela 5.
Zawartość makro pierwiastków w liściach rzepaku jarego po aplikacji (O)NKCu

Pierwiastki (mg·kg ⁻¹)	(O)NKCu									
	22 dzień wzrostu					29 dzień wzrostu				
	Obiekt kontrolny	50	100	150	Obiekt kontrolny	50	100	150	cm ³ ·dm ⁻³	
Ca	8222±40,46	6947±81,66ab	5543±62,99ac	7372±76,75ab	9557±67,74	9172±39,32ab	8473±86,59ac	12700±65,74ab		
K	15710±41,30	15577±59,88b	10692±79,85ac	14857±85,36b	20143±29,0,6	18147±85,0,9ab	18180±42,42ab	30906±52,05ac		
Mg	6846±67,20	5744,7±53,20ab	5341±99,05ac	6144±90,65ab	6918±31,37	6328±44,91ab	6591,33±21,92ab	6166±69,77ab		
Na	11195±33,97	1247±68,15c	11155±57,64c	1901±98,66ab	909,23±29,51	1921±45,61ab	1381±25,90ac	1975±25,77ab		
P	13760±52,86	13040±28,83c	12290±58,75ab	12963±49,87c	12943±57,48	11959±35,01c	12610±88,31c	9837±56,13ab		
S	10380±81,96	10036±51,47c	8337±74,75ab	10108±54,77c	14530±37,95	113257±96,79ab	12240±52,97b	14937±96,71c		

Wartości średnie ± SD dla (n=9); a – statystycznie istotną różnicę w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego (p<0,05);

b, c, d – oznacza statystycznie istotne różnice pomiędzy rozpatrywanymi stężeniami dla wybranych nanokoloidów w wierszu (p<0,05)

Zawartość fosforu (P) w analizowanych próbkach liści w kolejnych dniach wynosiła 13 760 oraz 12 943 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Jego zawartość po zastosowaniu NKC u w stężeniach 50, 100 i 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ w 22 dniu wzrostu wykazała statystycznie istotną obniżkę, kolejno o 5%; 10% i 5%. W 29 dniu obserwowano również statystycznie istotne obniżenia zawartości fosforu w roślinach, kolejno o 8% (11 959 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); 3% (12 610 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) oraz 24% (9 832,67 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Zawartość siarki (S) w próbkach liści z obiektu kontrolnego w kolejnych dniach wynosiła 10 380 oraz 14 530 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Zarówno w 22, jak i 29 dniu życia roślin obserwowano spadek zawartości siarki po zastosowaniu roztworów o stężeniach 50 i 100 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$, ale był on statystycznie istotny tylko dla stężenia 100 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ w 22 dniu oraz 50 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ w 29 dniu. Zawartość siarki w roślinach rzepaku z wariantów była niższą o 17%; 31% w 22 dniu, oraz o 22% i 16% w 29 dniu. Zastosowanie NKC u w najwyższym stężeniu obniżyło zawartość siarki w liściach w 22 dniu o 16,3%, a w 29 dniu zwiększyło jej zawartość o 3%.

Zawartość magnezu (Mg) w analizowanych próbkach liści rzepaku z obiektu kontrolnego wynosiła 6 846 oraz 6 918 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. W 22 dnia wzrostu roślin zastosowanie wszystkich rozpatrywanych stężeń spowodowało statystycznie istotne obniżenie zawartości magnezu kolejno o 9%; 15% oraz 2,5%. W 29 dniu wzrostu roślin obserwowano analogiczną tendencję spadkową, która była statystycznie istotna dla każdego zastosowanego stężeniu NKC u. Zawartość magnezu była o 8,5%; 5% oraz 11% niższa niż w próbkach liści z obiektu kontrolnego.

Zawartość sodu (Na) w kolejnych dniach w liściach z obiektu kontrolnego wynosiła 1 195 oraz 909,23 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. W 22 dniu wzrostu roślin obserwowano zwiększoną jego zawartość po aplikacji roztworu NKC u o stężeniu 50 oraz 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. Po aplikacji roztworu o stężeniu 50 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ zawartość sodu była wyższa o 4% niż w próbkach kontrolnych, a dla stężenia 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ zawartość (Na) była statystycznie istotna i wynosiła 59%. Aplikacja roztworu o stężeniu 100 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$ spowodowała niewielkie obniżenie zawartości sodu o 3% w porównaniu do jego zawartości w próbkach liści kontrolnych. W 29 dniu wzrostu roślin zawartość sodu była statystycznie istotnie wyższa po zastosowaniu NKC u we wszystkich stężeniach w odniesieniu do obiektu kontrolnego i kolejno wyższą o 111% (1 921 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$); 52% (1 381 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) oraz 117% (1 975 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

6.2.5. Zawartość barwników w liściach

Zawartość barwników roślinnych w liściach rzepaku z obiektu kontrolnego w 22 dniu wzrostu po aplikacji nanokolloidu srebra w serii (O)NKAg wynosiła: dla chlorofilu *a* 32,40 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, chlorofilu *b* 14,91 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ oraz karotenoidów 5,06 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. W 29 dniu wzrostu wynosiły odpowiednio: 21,39; 9,08 oraz 2,11 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (tab. 6). W 22 dniu wzrostu obserwowano statystycznie istotny spadek zawartości chlorofilu *a* i *b* w stosunku do liści z obiektu kontrolnego, który był proporcjonalny do wielkości stężenia NKAg zadanego na rośliny. Zawartość chlorofilu *a* po aplikacji nanokolloidu srebra we wszystkich rozpatrywanych stężeniach wynosiła kolejno: 30,43; 29,24 oraz 24,98 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, czyli mniej o 6,1%; 9,7% oraz o 22,9%. Zawartość chlorofilu *b* była niższa o 6,1% (14,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), 14,7% (12,7 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) oraz 32,7% (10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Zawartość karotenoidów po aplikacji NKAg w porównaniu z próbkami z obiektu kontrolnego wykazała również tendencję spadkową, ale statystycznie istotną tylko dla stężeń 100 i 150 $\text{cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$. Wynosiła ona kolejno: 4,08 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i 3,90 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, co stanowiło obniżenie zawartości karotenoidów w porównaniu z obiektem kontrolnym o 19,4% i 22,9%.

Tabela 6.
Zawartość chlorofilu i karotenoidów w liściach rzepaku jarego

Barwnik ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	Dzień wzrostu	Obiekt kontrolny	(O)NKag			Obiekt kontrolny	(O)NKCū		
			$50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$	$100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-31}$	$150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$		$50\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$	$100\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$	$150\text{ cm}^3\cdot\text{dm}^{-3}$
Chlorofil a	22	32,40 $\pm$ 2,83	30,43 $\pm$ 6,26ab	29,24 $\pm$ 6,12ac	24,98 $\pm$ 1,50ad	31,7 $\pm$ 11,1	13,27 $\pm$ 2,08ab	18,55 $\pm$ 4,27ac	21,96 $\pm$ 4,55ad
Chlorofil b		14,91 $\pm$ 1,65	14,00 $\pm$ 2,37ab	12,71 $\pm$ 2,02ac	10,03 $\pm$ 1,14ad	14,42 $\pm$ 4,2	6,55 $\pm$ 0,78ab	7,57 $\pm$ 1,95ac	9,77 $\pm$ 2,02ad
Karotenoidy		5,06 $\pm$ 0,58	4,48 $\pm$ 1,00b	4,08 $\pm$ 0,86ab	3,90 $\pm$ 0,51ab	5,5 $\pm$ 1,8	1,42 $\pm$ 0,21ab	2,23 $\pm$ 0,52ab	2,54 $\pm$ 0,51ab
Chlorofil a	29	21,39 $\pm$ 4,06	25,47 $\pm$ 2,66ab	30,64 $\pm$ 5,19ac	36,02 $\pm$ 2,69ad	21,5 $\pm$ 10,1	21,63 $\pm$ 5,35b	30,92 $\pm$ 8,90ac	31,10 $\pm$ 6,85ac
Chlorofil b		9,08 $\pm$ 1,50	11,99 $\pm$ 1,27ab	13,35 $\pm$ 2,54ac	14,74 $\pm$ 6,88ad	11,08 $\pm$ 4,1	9,78 $\pm$ 2,08ab	13,72 $\pm$ 4,09ac	15,05 $\pm$ 2,51ad
Karotenoidy		2,11 $\pm$ 0,43	3,52 $\pm$ 0,33ab	3,84 $\pm$ 0,87ab	4,85 $\pm$ 0,80ac	3,1 $\pm$ 1,5	1,45 $\pm$ 2,08ab	3,42 $\pm$ 1,48c	5,20 $\pm$ 1,32ad

Wartości średnie $\pm$ SD dla n=9; a – statystycznie istotną różnicę w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$); b, c, d – statystycznie istotne różnice pomiędzy rozpatrywanymi stężeniami dla wybranych nanokolooidów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$)

W 29 dniu wzrostu roślin obserwowano statystycznie istotne zwiększenie zawartości analizowanych barwników w odniesieniu do próbek z obiektu kontrolnego. Aplikacja NKAg w stężeniach 50, 100 i 150 cm³·dm⁻³ przyczyniła się do wzrostu zawartości chlorofilu *a*, który wynosił kolejno: 9,1%, 43,2% oraz 68,4%. Zawartość chlorofilu *b* była wyższą o 32,1%; 47% oraz 62,3%, i karotenoidów wyższą odpowiednio o 66,8%; 81,9% oraz 129,8%.

Zawartość barwników roślinnych w liściach rzepaku w próbach liści kontrolnych po aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (O)NKC_u w 22 dniu wzrostu wynosiła w chlorofilu *a* 33,70 μg·cm⁻³, chlorofilu *b* 14,42 μg·cm⁻³ oraz karotenoidów 5,50 μg·cm⁻³. W 29 dniu wzrostu w tej samej kolejności wynosiła odpowiednio: 21,49 μg·cm⁻³; 11,08 μg·cm⁻³ oraz 3,11 μg·cm⁻³. Po aplikacji NKCu na rośliny obserwowano niższą zawartość barwników w porównaniu z próbkami liści z obiektu kontrolnego, które były statystycznie istotne i proporcjonalne do zadanego stężenia nanokoloidu miedzi. W 22 dniu wzrostu roślin zawartość chlorofilu *a* była niższa odpowiednio o 60,6% (13,27 μg·cm⁻³); 45% (18,55 μg·cm⁻³) oraz 34,8% (21,96 μg·cm⁻³), a chlorofilu *b* o 54,6% (6,55 μg·cm⁻³); 45,5% (7,57 μg·cm⁻³) oraz 32,3% (9,77 μg·cm⁻³). Zawartość karotenoidów w liściach rzepaku również była statystycznie istotnie niższą w odniesieniu do próbek z obiektu kontrolnego, proporcjonalnie do zadanej dawki nanokoloidu. Zawartość karotenoidów była niższa odpowiednio o 74,2% (1,42 μg·cm⁻³); 59,5% (2,23 μg·cm⁻³) oraz 53,8% (2,54 μg·cm⁻³) po aplikacji NKCu w stężeniu 50, 100 i 150 cm³·dm⁻³.

W 29 dniu wzrostu roślin po aplikacji NKCu obserwowano podobny rozkład zawartości barwników, jak w 22 dniu i w większości przypadków różnice były statystycznie istotne w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Zawartości chlorofilu *a* po aplikacji NKCu w poszczególnych stężeniach były wyższe o 0,7% (50 cm³·dm⁻³); 44% (100 cm³·dm⁻³) oraz 44,7% (150 cm³·dm⁻³). Zawartość chlorofilu *b* była odpowiednio mniejsza o 11,7%; oraz 23,8% i 35,8% większa, a dla karotenoidów o 53,4% mniejsze oraz o 10% i 67,2% większe niż w liściach z obiektu kontrolnego.

6.3. Ocena czynników środowiskowych

Ocena czynników środowiskowych polegała na przeanalizowaniu warunków meteorologicznych panujących w okresie uprawy rzepaku jarego, a następnie poddaniu analizom laboratoryjnym próbek gleby w celu określenia jej składu granulometrycznego, pH gleby oraz jej zasobności w składniki pokarmowe.

Pobrane próbki gleby z pola przeznaczono na doświadczenie laboratoryjne. W glebie umieszczonej w doniczkach rozsadowych wysiano nasiona namoczone w przygotowanych roztworach nanokoloidów o trzech stężeniach (50, 100 i 150 cm³·dm⁻³), a następnie po wykiełkowaniu siewek dodatkowo spryskano roztworami tych nanokoloidów. Po zakończeniu doświadczenia w 31 dniu wzrostu roślin doświadczenia w warunkach laboratoryjnych (*in vitro*) pobrane próbki gleby zostały poddane analizie pH gleby oraz określeniu aktywności enzymatycznej dehydrogenaz.

6.3.1. Ocena warunków agrometeorologicznych

W tabeli 7 przedstawiono warunki pogodowe: parametry ciśnienia atmosferycznego, temperatury powietrza oraz ilości opadów w okresie wegetacji rzepaku 2016-2017. Dane uwzględniały okres zgodny z terminem siewu oraz zbioru nasion od marca do sierpnia. Średnia temperatury miesięczne w okresie wzrostu rzepaku w 2016 roku wahała się od 3,46°C w marcu do 18,91°C w lipcu, a średnie miesięczne opady wynosiły od 1,09 mm H₂O w maju do 4,49 mm H₂O w lipcu. Na uwagę zasługuje fakt, że średnia temperatur w 2016 roku tego nie wykazuje, ale okres od czerwca do sierpnia był okresem wysokich temperatur powodujących „upałów”. W analogicznym okresie w 2017 roku zakres temperatur wahał się od 5,39°C do 19,14°C, a ilość opadów mieściła się w przedziale od 1,06 do 2,83 mm H₂O. Rok ten był łagodniejszy pod względem temperatur, a bardziej obfity pod względem ilości wody dostępnej dla roślin. Tak więc zakres temperatur w 2016 roku w czasie wzrostu rzepaku okazał się szerszy, a średnia opadów w poszczególnych miesiącach w znacznej części przewyższała te w 2017 roku z wyjątkiem miesięcy kwiecień i maj. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić statystycznie istotne różnice w średniej temperaturze powietrza między rozpatrywanymi latami w miesiącach marzec, kwiecień oraz sierpień. Istotne różnice obserwowano również w ilości opadów w miesiącu lipcu.

Tabela 7.

Warunki pogodowe w latach 2016-2017

Miesiąc	Rok 2016			Rok 2017		
	Ciśnienie (hPa)	Temperatura (°C)	Opady (mm H ₂ O)	Ciśnienie (hPa)	Temperatura (°C)	Opady (mm H ₂ O)
Marzec	985,26±6,56a	3,46±2,44a	2,04±2,0a	987,61±7,49a	5,39±2,67b	1,19±2,08a
Kwiecień	983,69±5,34a	8,91±3,35a	1,20±3,46a	986,96±5,48a	7,24±3,69b	1,94±3,76a
Maj	985,82±5,25a	14,44±4,12a	1,09±3,14a	988,02±5,39a	13,55±4,24a	1,35±3,21a
Czerwiec	986,30±5,14a	18,34±3,44a	1,78±2,15a	984,57±5,25a	17,96±3,65a	1,06±2,30a
Lipiec	987,12±4,56a	18,91±2,34a	4,49±4,98a	985,41±4,95a	18,09±2,59a	2,83±5,05b
Sierpień	990,73±4,34a	18,07±2,35a	1,52±3,02a	989,5±2,97a	19,14±4,14b	1,78±4,96a

Wartości średnie ± SD dla (n=60); a, b – oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do wyniku z poprzedniego roku, ta sama litera w rozpatrywanym czynniku oznacza brak istotnych różnic (p<0,05)

6.3.2. Ocena składu granulometrycznego gleby

W tabelach 8 i 9 przedstawiono skład granulometryczny gleby oraz zawartości składników przyswajalnych. Kategorię agronomiczną gleby określono jako mineralna średnia z grupy pyłu (pył piaszczysty). Udział frakcji granulometrycznej gleby <0,02 mm wynosił 32,77% (tab. 8). We frakcji piaskowej największy udział miała frakcja piasku bardzo drobnego w przedziale 0,10-0,05 mm, który wynosił 20,89%, we frakcji pyłowej dominował pył gruby w przedziale 0,05-0,02 mm stanowiący 39,45%.

Na podstawie uzyskanych wyników (tab. 9.) stwierdzono, że wartości pH analizowanej gleby mieszczą się w przedziale 7,31-7,40 czyli w zakresie odczynu zasadowego, optymalnego dla rozwoju nasion i roślin rzepaku. Ponadto gleba ta charakteryzuje się bardzo dobrymi parametrami dotyczącymi zawartości składników przyswajalnych dla roślin.

Tabela 8.

Skład granulometryczny analizowanej gleby

Skład granulometryczny zawartości frakcji w (%)									
Frakcja	Piasek					Pył			łł
Średnia (mm)	2,0-1,0	1,0-0,5	0,5-0,25	0,25-0,10	0,10-0,05	0,05-0,02	0,02-0,005	0,005-0,002	< 0,002
Udział frakcji (%)	2,34 ±1,54	1,63 ±1,09	0,96 ±0,34	2,79 ±0,83	20,89 ±0,98	39,45 ±0,88	21,83 ±1,88	7,74 ±0,95	4,46 ±0,26
Zawartość frakcji < 0,02 mm (%)	32,77±0,89								

Wartości średnie ± SD dla (n=9) - Mean values ± SD for (n=9)

Tabela 9.

Zawartość składników przyswajalnych w analizowanej glebie

Rok	Kategoria agronomiczna gleby	Kwasowość		Potrzeby wapnowania	Zawartość składników przyswajalnych (mg·100g ⁻¹ gleby)					
		pH w KCl	odczyn		P ₂ O ₅	Zasobność	K ₂ O	Zasobność	Mg	Zasobność
2016	mineralna średnia	7,31	zasadowy	zbędne	69,07 ±6,77	b. wysoka	71,33 ±0,65	b. wysoka	11,47 ±0,55	b. wysoka
2017	mineralna średnia	7,40	zasadowy	zbędne	70,20 ±5,45	b. wysoka	72,00 ±0,56	b. wysoka	12,00 ±0,23	b. wysoka

Wartości średnie ± SD dla (n=9) - Mean values ± SD for (n=9)

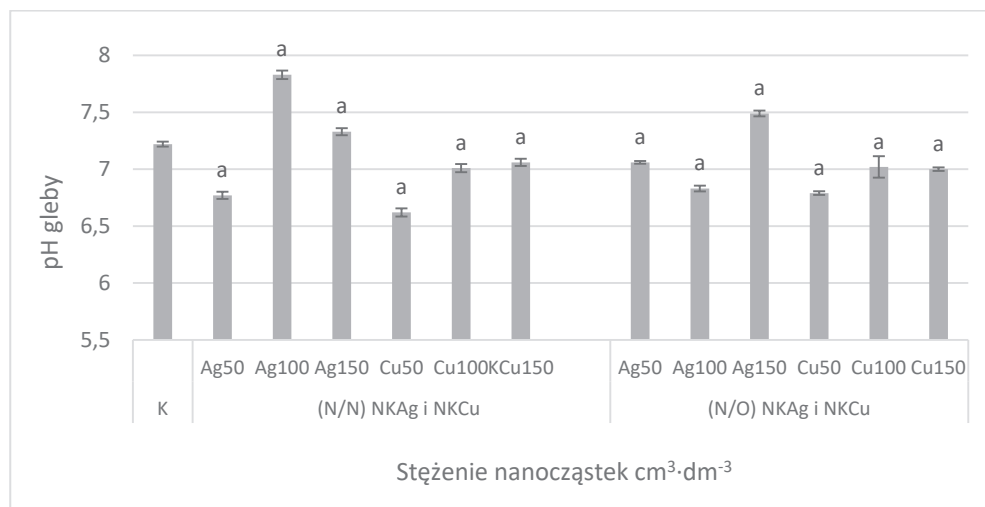
6.4. Ocena parametrów gleby po uprawie wazonowej

Ocenę parametrów gleby z niniejszego doświadczenia przeprowadzono na podstawie określenia dwóch parametrów skupiając się na: wartości pH gleby oraz aktywności dehydrogenaz w glebie.

6.4.1. Ocena wartości pH gleby

Na rysunku 20 przedstawiono wartości pH gleby, w której wysiano nasiona namoczone w roztworach nanokoloidów oraz gleby, w której wysiano nasiona namoczone, a w późniejszym terminie siewki (rośliny) dodatkowo opryskano nanokoloidami srebra i miedzi. Wartość pH gleby w obiekcie kontrolnym wynosiło 7,22. Aplikacja nanokoloidu srebra tylko do namoczenia nasion (N/N) spowodowała statystycznie istotne obniżenie wartości pH gleby po zastosowaniu NKAg w stężeniu 50 cm³·dm⁻³ o 6,2% w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Dla wyższych stężeń nanokoloidów pH gleby statystycznie istotnie wzrosło

odpowiednio o 8,4% i 1,5%. Po namoczeniu nasion w nanokoloidzie miedzi w serii (N/N)NKCu i wysianiu ich w glebie obserwowano statystycznie istotny spadek wartości pH o 8,3%; 2,9% oraz 2,2% w stosunku do gleby obiektu kontrolnego. Po podwójnej aplikacji nanokoloidów (namoczenia i oprysk) z użyciem NKAg nastąpiło statystycznie istotne obniżenie wartości pH o 2,2% ($50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) i 5,4% ($100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) w stosunku do obiektu kontrolnego oraz statystycznie istotny wzrost wartości pH o 3,7% dla stężenia $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Po podwójnej aplikacji NKCu we wszystkich trzech stężeniach obserwowano obniżenie wartości pH o 5,9%; 2,8% i 3%.



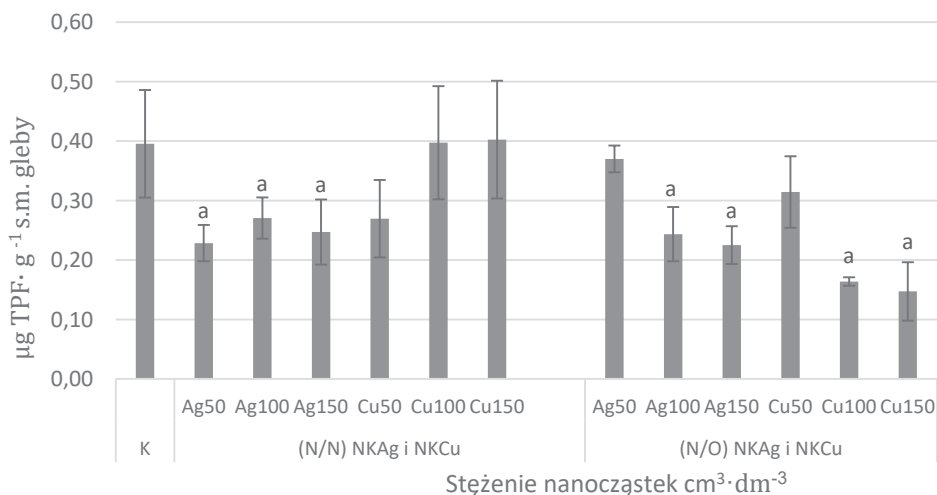
Rys. 20. Wartość pH gleby po wysianiu nasion namoczonych (N/N) oraz namoczonych nasion i opryskanych roślin (N/O) NKAg i (N/O)NKCu; wartości średnie $\pm$ SD dla ($n=9$); a – statystycznie istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

6.4.2. Ocena aktywności dehydrogenaz w glebie

Aktywność dehydrogenaz w glebie z obiektu kontrolnego wynosiła $0,39 \mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. (rys. 21). Kontakt gleby z nanokoloidami srebra i miedzi na nasionach oraz w wyniku dodatkowego oprysku roślin spowodował zmiany aktywności tych enzymów w większości zastosowanych stężeń. Po wprowadzeniu do gleby nasion namoczonych w nanokoloidzie srebra we wszystkich rozpatrywanych stężeniach w serii (N/N)NKAg obserwowano statystycznie istotne obniżenie aktywności DHA w porównaniu z glebą z obiektu kontrolnego o 42,2%; 31,5% oraz 37,5%.

Po wysiewie nasion namoczonych w nanokoloidzie miedzi z serii (N/N)NKCu w glebie istotne obniżenie aktywności dehydrogenaz obserwowano w przypadku stężenia $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$, wynoszące 31,8%. W przypadku pozostałych dawek nanokoloidu (100 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) aktywność DHA utrzymywała się na poziomie podobnym jak w glebie kontrolnej, a jej wartości były wyższe tylko o 0,5% oraz 1,7%. W przypadku wariantu namoczenia nasion i opryskania roślin w nanokoloidzie srebra w serii (N/O)NKAg aktywność dehydro-

genaz statystycznie istotnie obniżyła się odpowiednio o 6,4%; 38,4% oraz 43% w stosunku do aktywności w glebie obiektu kontrolnego. Po zastosowaniu nanokoloidu miedzi w serii (N/O)NKC_u statystycznie istotne obniżenie aktywności obserwowano po jego aplikacji w stężeniach 100 i 150 cm³·dm⁻³ o 58,5% oraz 62,7% w odniesieniu do gleby z obiektu kontrolnego. Aktywność enzymatyczna gleby była silnie ujemnie ($R^2=0,74$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ ze stężeniem nanokoloidów zastosowanych na nasiona oraz rośliny w serii (N/O)NKAg i (N/O)NKC_u.



Rys. 21. Zmiany aktywności dehydrogenaz w glebie po wysianiu namoczonych nasion i opryskaniu roślin nanokoloidami; wartości średnie $\pm$ SD dla ($n=9$); a – statystycznie istotną różnicę w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$)

6.5. Ocena nasion i oleju uzyskanych z uprawy polowej

Nasiona zebrane w uprawie polowej poddano analizom w celu określenia ich jakości oraz jakości oleju wytłoczonego metodą na zimno z nasion pochodzących z tej uprawy. Za wyznacznik jakości nasion rzepaku przyjęto określenie: masy tysiąca nasion (MTN), zawartości wilgotności i tłuszczu, profil kwasów tłuszczowych, zawartości białka, pierwiastków śladowych oraz określeniu zawartości biomasy grzybowej przez określenie zawartości ergosterolu w nasionach poddanych procesowi przechowywania w silosie laboratoryjnym.

Jako wyznacznik jakości oleju przyjęto zawartość barwników (chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów), barwę oleju, wartość liczby kwasowej (LK) i liczby nadtlenkowej (LN), stabilność oksydacyjną oraz analizę widm przez wykorzystanie spektroskopii ATR-FTIR.

6.5.1. Ocena fizyczna i chemiczna nasion rzepaku

W tabeli 10 przedstawiono zawartości wilgotności, tłuszczu, białka i MTN w nasionach rzepaku z uprawy poletkowej. Wilgotność nasion zebranych w 2016 roku z obiektu kontrolnego wynosiła 7,53%. Wilgotność nasion z pozostałych wariantów doświadczenia wahała się w przedziale od 6,78 do 9,48%. Najniższą wartość wilgotności obserwowano w nasionach zebranych z roślin wyrosłych z nasion namoczonych i z roślin, na które aplikowano nanokoloid srebra w serii (N/O)NKAg, która była niższa niż nasiona z obiektu kontrolnego o 10%. Najwyższą wilgotnością charakteryzowały się nasiona w serii (N/O)NKCu, czyli które po podwójnej aplikacji NKCu. Otrzymana wartość była statystycznie istotnie wyższa o 26% w porównaniu z nasionami z obiektu kontrolnego.

Średnia zawartość tłuszczu w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 39,88%. W pozostałych wariantach wahała się w przedziale od 39,45% do 40,70%. Najniższą zawartość obserwowano w nasionach uzyskanych z roślin poddanych tylko opryskowi nanokoloidem srebra w serii (O)NKAg, która była niższa od zawartości tłuszczu w nasionach z obiektu kontrolnego o 1,1%. Nasiona zebrane z roślin potraktowanych podwójnie NKAg w serii (N/O)NKAg charakteryzowały się zawartością tłuszczu tylko o 0,4% wyższą niż obiekt kontrolny. Najwyższą średnią zawartość tłuszczu obserwowano w surowcu pochodzącym z uprawy w serii (N/O)NKCu, w której zastosowano NKCu do namoczenia nasion oraz do oprysku roślin o 2,1% wyższą. W przypadku zastosowania nanokoloidu miedzi tylko do oprysku roślin zawartość tłuszczu w nasionach była nieznacznie niższa niż w obiekcie kontrolnym i wynosiła 0,5%.

Zawartość tłuszczu w nasionach rzepaku i stężenie aplikowanych nanocząstek była słabo dodatnio ($R^2=0,55$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$.

Średnia zawartość białka w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 22,95%. W rozpatrywanych wariantach zastosowanych nanokoloidów jego zawartość wahała się w zakresie od 23,65% do 24,45%. Zawartość białka w nasionach z pozostałych wariantów doświadczenia była większa. Najniższą statystycznie istotną jego zawartość w nasionach obserwowano w wariancie z zastosowaniem oprysku roślin w serii (O)NKAg i była ona wyższa o 3% od oznaczonej w nasionach z obiektu kontrolnego. Nasiona z wariantu (N/O)NKAg, w którym nanokoloidu użyto do namoczenia nasion i oprysku roślin, była wyższa o 5% niż ta w obiekcie kontrolnym. Najwyższą zawartość białka obserwowano w analizowanym surowcu po zastosowaniu nanokoloidu miedzi do namoczenia nasion oraz oprysku roślin i była ona większa o 6,5% i statystycznie istotna. W przypadku zastosowania oprysku tym nanokoloidem zawartość białka była wyższa o 4,4% niż w obiekcie kontrolnym.

Zawartość białka w nasionach rzepaku i stężenie aplikowanych nanokoloidów na rośliny była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,92$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Określenie MTN pozwala ocenić dorodność zebranego surowca w danym okresie. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że masa tysiąca nasion z obiektu kontrolnego wynosiła 3,08 g. W poszczególnych wariantach MTN wahała się w granicach od 2,65 do 2,97 g. Należy zwrócić uwagę na fakt, że nasiona z obiektu kontrolnego charakteryzowała się najwyższą MTN spośród wszystkich wariantów doświadczenia. Najniższą masę miały nasiona, które uzyskano z roślin poddanych opryskowi nanokoloidem miedzi w serii (O)NKCu i mniejszą niż w obiekcie kontrolnym o 14%. Nasiona z roślin poddanych podwójnej aplikacji z NKCu w serii (N/O)NKCu, charakteryzowały się MTN niższą

o 3,7% od tej uzyskanej w obiekcie kontrolnym. Masa nasion zebranych z roślin poddanych tylko opryskowi nanokoloidem srebra w serii (O)NKAg była niższa o 8%, a nasion z surowca namoczonego i roślin opryskanych w serii (N/O)NKAg o 12% niższa.

Nasiona zebrane w 2017 roku z obiektu kontrolnego miały wilgotność wynoszącą 6,80% (tab. 10.). W pozostałych wariantach doświadczenia wilgotność wahała się w przedziale od 6,83% do 7,33%. Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w wilgotności nasion tylko w surowcu zebranym po aplikacji nanokoloidów srebra w seriach (O)NKAg, (O)NKC u oraz (N/O)NKAg kolejno o 24,7%; 26,4% oraz 17,8%.

Średnia zawartość tłuszczu w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 45,17%. W pozostałych wariantach wahała się w zakresie od 42,53% do 45,80%. Statystycznie istotną różnicę w jego zawartości obserwowano w nasionach otrzymanych po podwójnej aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (N/O)NKC u, które zawierały o 5,8% mniej tłuszczu niż nasiona z obiektu kontrolnego.

Średnia zawartość białka w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 22,37%. W nasionach ze wszystkich wariantów doświadczenia wahała się ona w granicach od 22,37% do 24,5%. Statystycznie istotne różnice w zawartości białka obserwowano po dwukrotnej aplikacji obu nanokoloidów. Zawartość białka była wyższa o 8% w serii (N/O)NKAg oraz o 9,5% w serii (N/O)NKC u w porównaniu do nasion z obiektu kontrolnego.

Zawartość białka w nasionach rzepaku i stężenie aplikowanych nanokoloidów było silnie dodatnio ($R^2=0,84$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Na podstawie uzyskanych wartości MTN można stwierdzić, że masa nasion z obiektu kontrolnego w 2017 roku wynosiła 4,13 g. W pozostałych wariantach doświadczenia wahała się w przedziale od 3,31 g do 3,94 g. MTN z pozostałych wariantów doświadczenia była niższa w odniesieniu do nasion z obiektu kontrolnego. Statystycznie istotne różnice obserwowano w przypadku podwójnej aplikacji obydwóch nanokoloidów, a ich wartości były niższe odpowiednio o 19,7% w serii (N/O)NKAg oraz o 13,1% w serii (N/O)NKC u.

Masa tysiąca nasion w analizowanych nasionach rzepaku i stężenie aplikowanych nanokoloidów było dodatnio ($R^2=0,62$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Tabela 10.

Wilgotność nasion, zawartość białka, tłuszczu oraz MTN rzepaku

Rok	Parametry	Jednostka	Obiekt				
			Kontrolny	(O)NKAg	(O)NKC u	(N/O)NKAg	(N/O)NKC u
2016	Wilgotność	(%)	7,53±0,3 ^A	7,80±0,1b ^A	6,88±0,1b ^A	6,78±0,1b ^A	9,48±0,2a ^A
	Tłuszcz	(%)	39,88±0,2 ^A	39,45±0,7b ^A	39,65±0,6b ^A	40,05±0,9b ^A	40,70±0,8b ^A
	Białko	(%)	22,95±0,1 ^A	23,65±0,2ab ^A	23,97±0,2ab ^A	24,05±0,2ab ^A	24,45±0,3ab ^A
	MTN	(g)	3,08±0,2 ^A	2,83±0,1b ^A	2,65±0,3b ^A	2,71±0,1b ^A	2,97±0,1b ^A
2017	Wilgotność	(%)	6,80±0,3 ^A	7,23±0,1ac ^A	7,33±0,15ac ^A	6,83±0,2ac ^A	6,80±0,28b ^B
	Tłuszcz	(%)	45,17±0,9 ^B	43,93±1,1b ^B	45,80±0,20c ^B	44,43±1,1b ^B	42,53±1,1ad ^B
	Białko	(%)	22,37±0,3 ^A	22,37±0,2c ^B	22,60±0,36c ^B	24,17±0,2ab ^A	24,50±0,3ab ^A
	MTN	(g)	4,13±0,1 ^B	3,80±0,2b ^B	3,94±0,17b ^B	3,31±0,1ba ^A	3,59±0,1ab ^A

Wartości średnie ± SD (n=9); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$); b, c – istotne różnice pomiędzy wariantami stężeń dla wybranych nanokoloidów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$). A, B – statystycznie istotne różnice pomiędzy parametrami w wierszu a rokiem zbioru nasion, ta sama litera oznacza brak istotności ($p<0,05$)

Zaobserwowano statystycznie istotne różnice w zawartości tłuszczu oraz masie tysiąca nasion zebranych w obydwóch latach doświadczenia w obiekcie kontrolnym. Zauważono także istotne różnice w zawartości tłuszczu, białka oraz MTN po aplikacji nanokoloidów w seriach (O)NKAg oraz (O)NKCu. W przypadku podwójnej aplikacji obu nanokoloidów zaobserwowano istotne różnice tylko w zawartości tłuszczu.

W tabeli 11 przedstawiono wyniki analiz profilu kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku jarego w 2016 roku.

Tabela 11.

Profil kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku jarego w 2016 roku

Profil kwasów tłuszczowych					
Obiekt	Kontrolny	(O)NKAg	(O)NKC <u>u</u>	(N/O)NKAg	(N/O)NKC <u>u</u>
Kwasy tłuszczowe	(%)				
C14:0	0,09±0,02	0,09±0,02b	0,09±0,02b	0,10±0,02b	0,09±0,02b
C16:0	4,74±0,67	4,85±0,69b	5,02±0,71b	5,23±0,74b	5,06±0,72b
C16:1	0,37±0,03	0,37±0,03b	0,39±0,03b	0,42±0,04b	0,39±0,03b
C17:0	0,05±0,01	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b
C17:1	0,12±0,02	0,15±0,02b	0,15±0,02b	0,14±0,02b	0,15±0,02b
C18:0	1,96±0,13	2,21±0,14b	2,21±0,14b	2,10±0,14b	3,30±0,15c
C18:1n9c + C18:1n9t	59,23±3,40	59,32±3,41b	59,03±3,39b	57,82±3,32c	59,18±3,40b
C18:2n6c + C18:2n6t	22,06±2,98	20,94±2,83ab	21,54±2,91b	22,58±3,05c	21,22±2,87ab
C18:3n6 (gamma)	0,05±0,01	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b
C18:3n3 (alpha)	8,44±0,61	8,52±0,62b	8,28±0,60b	8,23±0,60b	8,24±0,60b
C20:0	0,69±0,13	0,77±0,14b	0,77±0,14b	0,77±0,14b	0,80±0,15ab
C20:1n9	1,24±0,30	1,51±0,37b	1,35±0,33b	1,35±0,33b	1,38±0,33b
C20:2	0,08±0,01	0,08±0,01b	0,08±0,01b	0,09±0,02b	0,08±0,01b
C22:0	0,39±0,06	0,41±0,06b	0,41±0,06b	0,44±0,07b	0,42±0,07b
C22:1n9	0,05±0,01	0,22±0,05ab	0,11±0,02ac	0,10±0,02c	0,12±0,03ac
C24:0	0,22±0,04	0,23±0,05b	0,23±0,05b	0,26±0,05b	0,24±0,05b
C24:1	0,18±0,04	0,18±0,04b	0,18±0,04b	0,22±0,05b	0,18±0,04b
SFA	8,12^A	8,59b^A	8,78b^A	8,94b^A	8,94b^A
MUFA	61,13^A	61,73b^A	61,20b^A	60,03ac^B	61,39b^A
PUFA	30,58^A	29,54ab^A	29,90b^A	30,90b^A	29,53ab^A
OMEGA 3	8,44^A	8,52b^A	8,28b^A	8,23b^A	8,24b^A
OMEGA 6	22,14^A	21,02ab^A	21,62ab^A	22,67ac^B	21,30ab^A
OMEGA 9	60,65^A	61,22ac^A	60,67c^A	59,48ab^B	60,85c^A

Wartości średnie ± SD (n=6); a – istotną różnicę w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego (p<0,05); b, c – istotne różnice pomiędzy wariantami stężeń dla wybranych nanokoloidów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05). A, B – istotne różnice w latach zbioru nasion a rodzajem aplikacji nanokoloidów w kolumnie na wybrane parametry w wierszu, ta sama litera oznacza brak istotności (p<0,05)

Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA – *saturated fatty acids*) w nasionach z obiektu kontrolnego z 2016 roku wynosiła 8,12% sumy kwasów i była najniższą wartością, stwierdzoną w badaniach i najniższa od najwyższej o 8%. We wszystkich rozpatrywanych wariantach zastosowania nanokoloidów srebra i miedzi udział SFA mieścił się w przedziale od 8,59 do 8,94% sumy kwasów i nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy sumą tych kwasów.

Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych w poszczególnych wariantach uprawy rzepaku i stężeniem aplikowanych nanocząstek było silnie dodatnio ($R^2=0,85$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$.

Zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA – *monounsaturated fatty acids*) w nasionach obiektu kontrolnego wynosiła 61,13% sumy kwasów. Udział tych kwasów w rozpatrywanych wariantach stosowania nanokoloidów mieścił się w przedziale od 60,03 do 61,73% sumy kwasów. Najniższą wartość tego kwasu obserwowano w przypadku serii (N/O)NKAg, czyli po namoczeniu nasion oraz oprysku roślin nanokoloidem srebra. Była ona nieznacznie niższą o 1,8% od otrzymanej wartości w obiekcie kontrolnym, ale statystycznie istotną. Największa ilość MUFA obserwowano po zastosowaniu tylko oprysku roślin w serii (O)NKAg, wyższą o 1% niż w obiekcie kontrolnym.

Zawartość polienowych kwasów tłuszczowych (PUFA – *polyunsaturated fatty acids*) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 30,58% sumy kwasów. Ich ilość w wariantach uprawy z zastosowaniem nanokoloidów wahała się w przedziale od 29,53% do 30,90% sumy kwasów. Statystycznie istotne różnice obserwowano w przypadku nasion z roślin po aplikacji nanokoloidów w serii (O)NKAg oraz (N/O)NKC_u, w których ilość PUFA zmalała kolejno o 3,4% oraz 4,4% w stosunku do obiektu kontrolnego.

W analizowanych nasionach stwierdzono obecność kwasów tłuszczowych z grupy Omega 3, 6 oraz 9. Zawartość kwasów Omega 3 w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 8,44% sumy kwasów, a w pozostałych zaś wariantach wahała się w przedziale od 8,23% do 8,52% sumy kwasów. Najniższą ich zawartość miały nasiona z roślin z serii (N/O)NKAg, czyli po zastosowaniu namoczenia i oprysku roślin NKAg i była ona niższa o 2,5% od wartości w obiekcie kontrolnym, lecz nie stanowiła statystycznie istotnej różnicy. Najwyższą obserwowaną zawartość kwasów Omega 3 odnotowano w przypadku zastosowania oprysku roślin w serii (O)NKAg i była ona o 1% wyższa niż w nasionach z obiektu kontrolnego. Zawartość kwasów Omega 3 w poszczególnych wariantach uprawy rzepaku i stężenie aplikowanych nanokoloidów było dodatnio ($R^2=0,69$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Analiza zawartości kwasów tłuszczowych z grupy Omega 6 wykazała, że w obiekcie kontrolnym ich ilość wynosiła 22,14% sumy kwasów. W pozostałych wariantach ich ilość wahała się w przedziale od 21,02 do 22,67% sumy kwasów. Zawartość najniższą odnotowano w przypadku aplikacji nanosrebra na rośliny w serii (O)NKAg, i statystycznie istotnie mniejszą o 5% w odniesieniu do obiektu kontrolnego.

Zawartość kwasów Omega 9 w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 60,65% sumy kwasów. Ich ilość w nasionach z rozpatrywanych wariantów wahała się w przedziale od 59,48% do 61,22% sumy kwasów. Najmniejszą ich zawartość obserwowano w przypadku aplikacji nanokoloidu srebra na nasiona oraz rośliny w serii (N/O)NKAg i była statystycznie istotnie niższą niż w nasionach z obiektu kontrolnego o 2%. Najwyższą zawartość tych kwasów obserwowano w serii (O)NKAg w przypadku aplikacji NKAg na rośliny, która wynosiła 61,22% sumy kwasów i była wyższa o 1% od jej zawartości w obiekcie kontrolnym.

W tabeli 12 przedstawiono profil kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku z uprawy w 2017 roku. Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 8,52% sumy kwasów i była najniższą jaką stwierdzono w analizowanych próbkach nasion. We wszystkich wariantach zastosowania nanokoloidów zawartość

SFA wahała się w przedziale od 8,70% w serii (O)NKCu do 8,85% w serii (N/O)NKCu sumy kwasów.

Zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych w poszczególnych wariantach uprawy rzepaku i stężenie aplikowanych nanokoloidów była silnie dodatnio ($R^2=0,83$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Tabela 12.

Profil kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku jarego w 2017 roku

Profil kwasów tłuszczowych					
Obiekt	Kontrolny	(O)NKAg	(O)NKCu	(N/O)NKAg	(N/O)NKCu
Kwasy tłuszczowe	(%)				
C14:0	0,09±0,02	0,09±0,02b	0,08±0,01b	0,09±0,02b	0,09±0,02b
C16:0	4,93±0,70	5,16±0,73b	4,97±0,71b	5,03±0,72b	5,06±0,72b
C16:1	0,37±0,03	0,39±0,03ac	0,35±0,03b	0,35±0,03b	0,36±0,03b
C17:0	0,05±0,01	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b
C17:1	0,12±0,02	0,14±0,02b	0,13±0,02b	0,12±0,02b	0,14±0,02b
C18:0	2,21±0,14	2,14±0,14b	2,25±0,15b	2,29±0,15b	2,27±0,15b
C18:1n9c + C18:1n9t	59,52±0,42	58,27±0,35b	59,63±0,43b	59,41±0,41b	58,90±0,38b
C18:2n6c + C18:2n6t	21,55±0,92	22,57±0,55b	20,66±0,79b	20,72±0,80b	20,95±0,83b
C18:3n6 (gamma)	0,05±0,01	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b	0,05±0,01b
C18:3n3 (alpha)	8,16±0,59	8,32±0,60b	8,21±0,59b	8,05±0,58b	8,50±0,61b
C20:0	0,73±0,14	0,72±0,13b	0,76±0,14b	0,78±0,15b	0,77±0,14b
C20:1n9	1,23±0,30	1,18±0,29b	1,60±0,39b	1,70±0,41b	1,61±0,39b
C20:2	0,07±0,01	0,07±0,01b	0,08±0,01b	0,08±0,01b	0,08±0,01b
C22:0	0,37±0,06	0,37±0,06b	0,38±0,06b	0,40±0,06b	0,38±0,06b
C22:1n9	0,13±0,03	0,07±0,02ab	0,38±0,08ac	0,43±0,09ab	0,35±0,08ab
C24:0	0,20±0,04	0,20±0,04b	0,21±0,04b	0,22±0,04b	0,22±0,04b
C24:1	0,16±0,03	0,18±0,04b	0,17±0,04b	0,18±0,04b	0,18±0,04b
SFA	8,52^A	8,71ab^A	8,70ab^A	8,85ab^A	8,83ab^A
MUFA	61,52^A	60,22ac^B	62,24ab^B	62,17ab^B	61,52d^A
PUFA	29,78^A	30,95ab^B	28,94ac^B	28,85ac^B	29,53d^A
OMEGA 3	8,16^A	8,32b^A	8,21b^A	8,05c^A	8,50ad^A
OMEGA 6	21,62^A	22,64ab^B	20,74ac^B	20,80ac^B	21,03ab^A
OMEGA 9	61,04^A	59,69ac^A	61,76b^B	61,70b^B	61,03b^A

Wartości średnie ± SD (n=6); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$); b, c – istotne różnice pomiędzy wariantami stężeń dla wybranych nanokoloidów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$). A, B – istotne różnice w latach zbioru nasion w obiektach aplikacji nanokoloidów w kolumnie i zawartość kwasów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$)

Zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 61,52% sumy kwasów, a w pozostałych wariantach mieściła się w przedziale od 60,22% do 62,24% sumy kwasów. Statystycznie istotnie mniejszą zawartość MUFA obserwowano w nasionach z roślin w serii (O)NKAg i (N/O)NKCu opryskanych nanokoloidem srebra o 2,1% oraz po dwukrotnej aplikacji nanokoloidów w seriach (N/O)NKAg, z których nasiona zawierały odpowiednio 1,1% oraz 1,2% większą od zawartości MUFA w obiekcie kontrolnym.

Zawartość kwasów PUFA w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 29,78% sumy kwasów, a w pozostałych wariantach doświadczenia wahała się w przedziale od 28,85% do 30,95% sumy kwasów. Statystycznie istotne różnice obserwowano po aplikacji nanokolloidu srebra na rośliny w serii (O)NKAg, z której nasiona zawierały o 3,9% więcej PUFA w porównaniu z ilością kwasów w obiekcie kontrolnym oraz w serii (O)NKCu i (N/O)NKAg, z której nasiona zawierały mniej o 6,5% i 3,1% tych kwasów.

Suma kwasów Omega 3 w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 8,16% sumy kwasów, a w nasionach z pozostałych wariantów wahała się od 8,05% do 8,50% sumy kwasów. Statystycznie istotne więcej tych kwasów obserwowano w nasionach, które poddano podwójnej aplikacji nanokolloidu miedzi w serii (N/O)KNCu, o 4,2% w porównaniu z obiektem kontrolnym.

Suma kwasów Omega 6 w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 21,62% sumy kwasów, a w nasionach pozostałych wariantów uprawy wahała się w przedziale od 20,74% do 22,65% sumy kwasów. Statystycznie istotne różnice w ich zawartości obserwowano w nasionach poddanych aplikacji nanokolloidem srebra w serii (O)NKAg, które zawierały o 4,7% więcej kwasów niż nasiona w obiekcie kontrolnym. W pozostałych obiektach: (O)NKCu, (N/O)NKAg oraz (N/O)NKCu zawartość kwasów Omega 6 była mniejsza odpowiednio o 4,1%; 3,8% i 2,7%.

Zawartość sumy kwasów Omega 9 w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 61,04%, a w pozostałych wariantach ich ilość wahała się w przedziale od 59,69% do 61,76% sumy kwasów. Statystycznie istotnie mniej tych kwasów o 2,2% obserwowano po aplikacji nanokolloidu srebra w serii (O)NKAg w porównaniu z zawartością w obiekcie kontrolnym. Niewielką różnicę, statystycznie nieistotną, obserwowano również po aplikacji nanokolloidów w seriach (O)NKCu oraz (N/O)NKAg, z których nasiona zawierały odpowiednio o 3,5% i 1,1% więcej tych kwasów niż nasiona w obiekcie kontrolnym.

Statystycznie istotne różnice w zawartości poszczególnych sum kwasów w obydwu latach doświadczenia dotyczyły zawartości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (MUFA) po aplikacji nanokolloidu srebra oraz miedzi do namoczenia nasion i oprysku roślin (N/O)NKAg. Taką tendencję zaobserwowano również w zawartości kwasów polienowych PUFA i Omega 6.

W tabeli 13 przedstawiono zawartość pierwiastków w nasionach rzepaku jarego otrzymanych z uprawy w 2016 roku. Szczególną uwagę skupiono na zawartości metali srebra oraz miedzi a następnie na zawartość pozostałych ważnych dla roślin pierwiastków o największej zawartości w nasionach rzepaku.

Nie wykazano zawartości srebra w nasionach rzepaku z obiektu kontrolnego. Statystycznie istotnie więcej srebra zawierały nasiona po aplikacji nanokolloidu na nasiona i rośliny w serii (N/O)NKAg oraz tylko na rośliny w serii (O)NKAg, odpowiednio $8,61 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i $8,34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

W przypadku namoczenia nasion oraz zastosowania oprysku na rośliny jego zawartość w nasionach była wyższa o 3% niż w przypadku zastosowania wyłącznie oprysku na rośliny, lecz różnica była nieistotna statystycznie.

W nasionach z obiektu kontrolnego zawartość Cu wynosiła $2,18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W pozostałych wariantach z aplikacją nanokolloidów zawierających Cu wahała się w przedziale od 2,29 do $3,36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

W przypadku aplikacji nanokolloidu srebra w serii (O)NKAg w postaci oprysku na rośliny zawartość miedzi była o 5% wyższa od tej w nasionach z obiektu kontrolnego.

Najwyższą i statystycznie istotnie większą zawartość Cu w nasionach obserwowano po aplikacji nanokoloidu miedzi na nasiona i rośliny w serii (N/O)NKC_u. Zawartość ta była wyższa o 54% od zaobserwowanej w obiekcie kontrolnym. Wyższą zawartość Cu odnotowano również po zastosowaniu oprysku w serii (O)NKC_u, stanowiącą wartość o 21,5% wyższą niż w nasionach z obiektu kontrolnego.

Do pierwiastków o znacznej zawartości w nasionach rzepaku, należały między innymi: Ca, K, Mg, Na, P i S. Zawartość wapnia (Ca) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 4 027 mg·kg⁻¹. Po aplikacji nanokoloidów Ag lub Cu w postaci namoczenia nasion oraz późniejszego oprysku roślin w serii (N/O)NKAg zawartość Ca była nieznacznie niższa o 0,6%, a po serii (N/O)NKC_u zauważono statystycznie istotny wzrost zawartości wapnia w nasionach o 3,6% w porównaniu z tym uzyskanym w obiekcie kontrolnym. W przypadku zastosowania tylko oprysku na rośliny nanokoloidu w serii (O)NKAg, wykazano statystycznie istotną o 8% większą zawartość wapnia w nasionach. Po aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (O)NKC_u wzrost zawartości Ca był niewielki, na pograniczu statystycznej istotności i wynosił 1,5%.

Zawartość potas (K), w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 8 746 mg·kg⁻¹. Nasiona uzyskane zarówno po oprysku roślin (O)NKAg oraz po namoczeniu i opryskaniu roślin (N/O)NKAg zawierały statystycznie istotnie więcej wapnia, w odniesieniu do nasion z obiektu kontrolnego o 7,5% oraz 7,1%. Po zastosowaniu tylko namoczenia nasion w NKCu obserwowano spadek zawartości potasu, który wynosił 2%. Po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (N/O)NKC_u zawartość K wzrosła o 17,3%.

Zawartość fosforu (P) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 7 998 mg·kg⁻¹. Aplikacja NKAg w obu wariantach (O)NKAg i (N/O)NKAg skutkowałą podwyższeniem zawartości fosforu w nasionach, odpowiednio statystycznie istotnym o 3,8% w stosunku do obiektu kontrolnego oraz niewielkim wynoszącym 0,5%. W przypadku aplikacji NKCu tylko w formie oprysku obserwowano niewielkie, ale statystycznie istotne obniżenie zawartości fosforu, wynoszące 3,7%, a w wariancie z podwójną aplikacją tego nanokoloidu zawartość P statystycznie istotnie wzrosła o 12%.

Średnia zawartość siarki (S) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 4 058 mg·kg⁻¹. W większości wariantów aplikacji nanokoloidów zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie zawartości siarki w nasionach rzepaku w porównaniu do obiektu kontrolnego, odpowiednio o 7% w serii (O)NKAg, o 11% w serii (N/O)NKAg oraz o 16% w serii (N/O)NKC_u. Wyjątkiem była seria (O)NKC_u z użyciem preparatu NKCu do oprysku roślin, w której zaobserwowano statystycznie istotne obniżenie zawartości siarki w porównaniu z obiektem kontrolnym wynoszące 5,5%.

Zawartość magnezu (Mg) w nasionach z obiektu kontrolnego wykazała jego zawartość na poziomie 2 741 mg·kg⁻¹. Podobnie jak w przypadku siarki po aplikacji nanokoloidu srebra w serii (O)NKAg wzrost zawartości Mg wynosił 3%, i w serii (N/O)NKAg o 4,5%, a po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu miedzi w serii (N/O)NKC_u o 10,5%. Statystycznie istotne obniżenie zawartości magnezu zaobserwowano w nasionach z serii (O)NKC_u w stosunku do obiektu kontrolnego, które wynosiło 4,5%.

Średnia zawartość sodu (Na) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła 65,2 mg·kg⁻¹. Wzrost jego zawartości w nasionach obserwowano w przypadku aplikacji obu nanokoloidów tylko do oprysku roślin, których w wariancie (O)NKAg wynosił 1,2%, a w wariancie (O)NKC_u 4,1%. Po dwukrotnej aplikacji nanopreparatów zawartość sodu w nasionach

nieznacznie obniżyła się kolejno o 1,7% w wariancie (N/O)NKAg oraz o 1,5% w wariancie (N/O)NKCu.

Tabela 13.

Zawartość makro pierwiastków w nasionach rzepaku jarego w 2016 roku

Zawartość pierwiastków					
Obiekt	Kontrolny	(O)NKAg	(O)NKCu	(N/O)NKAg	(N/O)NKCu
Pierwiastki	(mg·kg ⁻¹)				
Ag	0,00	8,34±0,66a ^A	0,00	8,61±1,05a ^A	0,00
Ca	4027±6,55 ^B	4338±0,15ab ^A	4073±0,15c ^A	4001±0,22d ^A	4172±0,28ac ^A
Cu	2,18±0,21 ^A	2,29±0,11b ^A	2,65±0,11b ^A	2,60±0,11b ^A	3,36±0,09ab ^A
K	8746±50,84 ^B	9405±49,03ab ^A	8584±0,39c ^A	9364±0,34ab ^A	10260±0,46ad ^A
Mg	2741±13,90 ^B	2819±10,49ab ^A	2618±0,10ac ^A	2864±0,12ad ^A	3030±0,13ac ^A
Na	65,24±4,03 ^B	66,03±4,14b ^A	67,92±2,19b ^A	64,13±3,84b ^A	64,23±0,35b ^A
P	7998±6,00 ^B	8299±11,43ab ^A	7698±6,86ac ^A	8037±0,19d ^A	8961±0,30ac ^A
S	4058±11,07 ^B	4345±7,35ab ^A	3834±7,10ac ^A	4508±9,17ad ^A	4699±0,18ad ^A

Wartości średnie ± SD (n=9); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego (p<0,05); b, c, d, e – istotne różnice pomiędzy wariantami obiektów dla wybranych nanokolidów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05). A, B – istotne różnice pomiędzy latami zbioru nasion w zastosowanych stężeniach nanokolidów w kolumnie i pierwiastkami w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05)

W tabeli 14 przedstawiono zawartość makro pierwiastków w nasionach rzepaku zebra-nych w 2017 roku. W nasionach z obiektu kontrolnego nie odnotowano zawartości srebra. Statystycznie istotne różnice jego zawartości zaobserwowano po aplikacji nanokolidu Ag na rośliny, jego zawartość w serii (O)NKAg wynosiła 7,67 mg·kg⁻¹, a w wariancie (N/O)NKAg – 8,44 mg·kg⁻¹.

Tabela 14.

Zawartość makro pierwiastków w nasionach rzepaku jarego w 2017 roku

Zawartość pierwiastków					
Obiekt	Kontrolny	(O)NKAg	(O)NKCu	(N/O)NKAg	(N/O)NKCu
Pierwiastki	(mg·kg ⁻¹)				
Ag	0,00	7,67±0,2ab ^A	0,00	8,44±0,9ac ^A	0,00
Ca	4260±5,7 ^A	4308±24,3b ^A	4386±1,4b ^B	3306±14,4ac ^B	5107±14,2ad ^B
Cu	2,72±0,3 ^A	3,12±0,1ac ^A	2,52±0,2ab ^A	2,53±0,1ab ^A	2,59±0,1b ^A
K	8465±7,5 ^A	7490±38,2ab ^B	8999±14,8c ^A	7368±18,5ab ^B	7535±33,6ab ^B
Mg	2585±6,3 ^A	2749±12,7ab ^A	2767±3,8ab ^A	2420±6,8ac ^B	2606±7,8d ^A
Na	81,68±0,7 ^A	65,88±3,3ab ^A	68,08±3,1ab ^A	66,5±1,8ab ^B	118,8±1,7ac ^B
P	7780±5,6 ^A	8032±30,9b ^B	8391±1,52b ^B	6881±21,1ac ^B	7885±13,3b ^B
S	3926±21,2 ^A	4678±21,4ab ^B	4347±1,3ac ^B	3511±11,2ac ^B	4652±11,9ad ^A

Wartości średnie ± SD (n=9); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego (p<0,05); b, c, d, e – istotne różnice pomiędzy rozpatrywanymi stężeniami dla wybranych nanokolidów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05). A, B – istotne różnice pomiędzy latami zbioru nasion w zastosowanych stężeniach nanokolidów w kolumnie i pierwiastkami w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05)

Zawartość miedzi w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $2,72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Po aplikacji nanokoloidu srebra w serii (O)NKAg nastąpiło niewielkie, ale statystycznie istotne podwyższenie zawartości Cu wynoszące 14,9% w stosunku do zawartości w nasionach z obiektu kontrolnego. Po zastosowaniu dwukrotnej aplikacji tego preparatu obserwowano statystycznie istotne obniżenie w nasionach wynoszące 6,8%. Po aplikacji nanokoloidu tylko w postaci oprysku zawartość miedzi w nasionach rzepaku była statystycznie istotnie niższa od zawartości w nasionach z obiektu kontrolnego o 7,2%. W wariancie (N/O)NKCu średnia zawartość miedzi w nasionach była nieco wyższa niż po wykonaniu oprysku na rośliny, ale w dalszym ciągu była niższa o 5% niż w obiekcie kontrolnym.

Średnia zawartość wapnia (Ca) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $4\,260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Po aplikacji obydwóch nanokoloidów w formie oprysku obserwowano niewielki wzrost jego zawartości, wynoszący 1,1% w obiekcie (O)NKAg oraz 3% w wariancie (O)NKCu. Statystycznie istotne podwyższenie zawartości wapnia obserwowano po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKCu wynoszące 20% oraz obniżenie zawartości Ca o 22,3% po aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (N/O)NKAg.

Średnia zawartość potasu (K) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $8\,465 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Statystycznie istotne obniżenie zawartości tego pierwiastka obserwowano po aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (O)NKAg o 11,5% i (N/O)NKAg o 12,9% oraz po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKCu o 11%. Niewielki wzrost o 6,3%, obserwowano po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (O)NKCu. Zawartość potasu i zadane stężenie nanocząstek srebra było bardzo silnie ujemnie ($R^2=0,83$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Średnia zawartość fosforu (P) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $7\,780 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, a w pozostałych wariantach doświadczenia wahała się w przedziale od $6\,881 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do $8\,391 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Statystycznie istotne obniżenie zawartości potasu obserwowano po zastosowaniu nanokoloidu srebra do namoczenia nasion oraz oprysku roślin. Zawartość ta była niższa o 11,5% od tej w obiekcie kontrolnym. Zawartość fosforu w nasionach i zadane stężenie nanocząstek srebra było ujemnie ($R^2=0,55$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Średnia zawartość siarki (S) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $3\,926 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, a w pozostałych wariantach doświadczenia wahała się od $3\,511 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do $4\,678 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Aplikacja nanokoloidu srebra do oprysku roślin spowodowała statystycznie istotne zwiększenie zawartości siarki w nasionach o 19,2%, a po namoczeniu nasion i oprysku roślin obniżenie o 10,6% w odniesieniu do obiektu kontrolnego. W obu wariantach aplikacji nanokoloidu miedzi nastąpiło małe, ale statystycznie istotne podwyższenie zawartości siarki w nasionach, odpowiednio o 11% w obiekcie (O)NKCu oraz o 18,5% w obiekcie (N/O)NKCu.

Zawartość magnezu (Mg) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $2\,585 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Statystycznie istotny wzrost zawartości magnezu w nasionach rzepaku obserwowano po oprysku roślin obydwoma nanokoloidami, odpowiednio o 6,3% w obiekcie (O)NKAg oraz o 7,1% w obiekcie (O)NKCu. Najniższą statystycznie istotną zawartość Mg obserwowano po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu srebra (N/O)NKAg o 6,4% w odniesieniu do obiektu kontrolnego.

Średnia zawartość sodu (Na) w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła $81,68 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. W pozostałych wariantach doświadczenia wahała się w przedziale od $65,88 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ do $118,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Statystycznie istotne obniżenie zawartości sodu obserwowano w obu

wariantach zastosowania nanokoloidów, odpowiednio o 19,3% w wariancie (O)NKAg, o 16,6% w wariancie (O)NKCu oraz w serii (N/O)NKAg o 18,5%. Statystycznie istotny wzrost zawartości Na obserwowano po aplikacji nanokoloidu miedzi w wariancie (N/O)NKCu, o 45,5%. Zawartość sodu w nasionach i zadane stężenie nanocząstek srebra było znacznie ujemnie ($R^2=0,72$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$. Natomiast zawartość sodu w nasionach i zadane stężenie nanocząstek miedzi było dodatnio ($R^2=0,50$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$.

Przeprowadzona analiza statystyczna zależności średnich zawartości makro pierwiastków wykazała w większości przypadków istotne różnice. Istotności wystąpiły zarówno pomiędzy latami zbioru nasion, jak i w zastosowanych wariantach uprawy nasion w porównaniu do obiektów kontrolnych. Analiza korelacji zadanego stężenia nanokoloidów na nasiona ($50 \text{ cm} \cdot \text{dm}^{-3}$) i rośliny ($50 \text{ cm} \cdot \text{dm}^{-3}$) w latach zbioru wykazała, że w większości przypadków są one silnie dodatnio lub ujemnie skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$ (tab. 15) z otrzymaną wilgotnością zebranych nasion.

Tabela 15.

Wartość współczynnika korelacji (r) między zadanym stężeniem nanokoloidów w poszczególnych wariantach doświadczenia i zawartości wilgoci w nasionach rzepaku w roku zbioru

Współczynniki korelacji	Wilgotność nasion w 2016	Wilgotność nasion w 2017
(O)NKAg	-0,915*	0,663*
(O)NKC <u>u</u>	-0,595	0,872*
(N/O)NKAg	-0,999*	0,707*
(N/O)NKC <u>u</u>	0,108	0,998*

*— oznacza istotną różnicę $p<0,05$

6.5.2. Zawartość ergosterolu w przechowywanych nasionach

W tabeli 16 przedstawiono zawartość ergosterolu ERG w nasionach rzepaku zebranego z uprawy polowej w latach 2016-2017, a następnie przechowywano w silosie przez pięć tygodni. Zawartość ergosterolu w nasionach z 2016 roku w pierwszym tygodniu analiz w zależności od wilgotności początkowej w obiekcie kontrolnym wynosiła: $0,45 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (6%), $0,32 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (9%) oraz $0,33 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (12%). Analiza statystyczna wykazała, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była ujemnie ($R^2=0,64$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach obiektu kontrolnego.

W rozpatrywanych wariantach zastosowania nanokoloidów zawartość ergosterolu w nasionach w większości przypadków statystycznie istotnie zmniejszyła się w porównaniu z jego zawartością w obiekcie kontrolnym. W obiekcie (O)NKAg przy wilgotności nasion 6% oraz 9% jego zawartość obniżyła się kolejno o 34% oraz 13%, a przy wilgotności nasion 12% ilość ergosterolu wzrosła o 7% w porównaniu z zawartością w obiekcie kontrolnym. Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była słabo dodatnio ($R^2=0,59$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach po aplikacji nanokoloidu srebra do oprysku.

Po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (O)NKCu przy kolejnych poziomach wilgotności nasion obserwowano statystycznie istotne obniżenie zawartości ERG odpowiednio o 42%; 42,5% oraz o 43,2%. Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była dodatnio

($R^2=0,65$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach po aplikacji nanokoloidu miedzi do oprysku.

Po aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (N/O)NKAg zawartość ergosterolu w nasionach o wilgotności 6%, 9% oraz 12% statystycznie istotnie obniżyła się, kolejno o 36%, 27% oraz o 27%. Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo słabo ujemnie ($R^2=0,54$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC u we wszystkich poziomach wilgotności obserwowano istotne obniżenie zawartości ergosterolu, odpowiednio o 35% oraz na granicy statystycznej istotności o 20% dla wilgotności 9% i 12%.

Po dwóch tygodniach zawartość ERG w nasionach rzepaku z obiektu kontrolnego wynosiła kolejno: $0,32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $0,22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; oraz $0,35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ przy wilgotności 6, 9 i 12%. Po aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (O)NKAg zawartość ergosterolu statystycznie istotnie zmalała przy wszystkich poziomach wilgotności w odniesieniu do obiektu kontrolnego kolejno o 60,6%; 39,7% oraz o 28,1%. Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,83$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po zastosowaniu nanokoloidu miedzi w obiekcie (O)NKC u zawartość ERG statystycznie istotnie zmalała o 53% przy wilgotności nasion 6%. Przy pozostałych wilgotnościach obserwowano obniżenie ERG w nasionach o 4% (9%) oraz o 11% (12%). Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,99$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach poddanych procesowi oprysku nanokoloidem miedzi.

W przypadku zastosowania nanokoloidu srebra (N/O)NKAg również obserwowano zmniejszenie zawartości ERG we wszystkich rozpatrywanych wilgotnościach, ale statystycznie istotnie tylko dla wilgotności 6% (47%) oraz 12% (o 50%). W obiekcie (N/O)NKC u także odnotowano statystycznie istotne obniżenie zawartości ergosterolu w nasionach dla wszystkich wariantów wilgotności, odpowiednio o 35%; 55% oraz o 43%.

Po trzech tygodniach zawartość ERG w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła kolejno: $0,22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (6%), $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (9%) oraz $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (12%). Po aplikacji NKAg na rośliny w postaci oprysku [(O)NKAg] przy najniższej wilgotności przechowywanych nasion (6%) obserwowano statystycznie istotny wzrost zawartości ergosterolu o 17%. Przy wilgotności 9% oraz 12% odnotowano statystycznie istotnie mniej ERG w nasionach, wynoszący odpowiednio o 40,2% oraz 48,2%. Po aplikacji NKC u w formie oprysku roślin statystycznie istotnie więcej ERG obserwowano przy wilgotności 9% (o 146%), a statystycznie istotnie mniej przy wilgotności 6% przechowywanych nasion (o 71%) oraz 12% (o 55%). Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,99$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach poddanych procesowi oprysku nanokoloidem miedzi.

Statystycznie istotny wzrost zawartości ERG obserwowano również w nasionach postraktowanych dwukrotnie nanokoloidem srebra w obiekcie (N/O)NKAg przy wilgotności nasion 9%, wynoszący 99%. Więcej ERG obserwowano również przy wilgotności nasion 6% o 28%, a w nasionach o wilgotności 12% zawartość ERG zmniejszyła się o 20% i była niższa od tej w obiekcie kontrolnym. Ilość analizowanego metabolitu po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC u przy wilgotności najniższej oraz najwyższej obniżyła się odpowiednio o 13% oraz o 9,7%, a przy wilgotności 9% przechowywanych nasion obserwowano wzrost o 33%.

Po czterech tygodniach zawartość ERG w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła odpowiednio: $0,22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (6%), $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (9%) oraz $0,27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (12%). W nasionach o wilgotności 9% z roślin, które poddano opryskowi NKA_g, obserwowano statystycznie istotny wzrost jego poziomu o 66%. Przy wilgotności nasion równej 6% oraz 12% ilość tego metabolitu zmalała i była niższa kolejno o 23% oraz 11%. Po aplikacji nanokolloidu srebra w formie oprysku roślin analiza statystyczna wykazała, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,79$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (O)NKCu przy wilgotności 9% obserwowano podwyższenie zawartości ERG o 19%, a przy wilgotności 6% oraz 12% zmniejszenie kolejno o 42% oraz 23,7%. Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,79$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Nasiona zebrane z roślin poddanych dwukrotnej aplikacji w obiekcie (N/O)NKA_g przy dwóch wyższych wilgotnościach (9% i 12%) zawierały więcej ergosterolu, odpowiednio o 14% oraz statystycznie istotnie o 62%. Zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,81$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKCu wzrost ERG obserwowano tylko przy najniższej wilgotności (6%) nasion wynoszącym 10%. Natomiast obniżenie w przypadku wilgotności 9% i 12%, wynoszącym kolejno 4% oraz 27%.

Po pięciu tygodniach zawartość ERG w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła odpowiednio: $0,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (6%), $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (9%) oraz $0,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (12%).

W obiekcie (O)NKA_g przy 9% wilgotności nasion obserwowano statystycznie istotny wzrost zawartości ergosterolu w przechowywanych nasionach o 56,4% w porównaniu z jego zawartością w obiekcie kontrolnym. Przy wilgotności 6% oraz 12% jego zawartość zmalała odpowiednio o 28% oraz 15%. Podobną tendencję obserwowano w przypadku aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (O)NKCu. Przy wilgotności nasion 6% i 12% odnotowano statystycznie istotnie mniejszą zawartość ergosterolu o 51% i 44%, a większą o 9% zawartości ERG przy wilgotności nasion 9%. Po dwukrotnej aplikacji nanokolloidów w obiektach (N/O)NKA_g i (N/O)NKCu obserwowano statystycznie istotny wzrost zawartości ERG w nasionach przy wilgotności nasion 9% oraz 12%, po aplikacji nanokolloidów odpowiednio o 40% i statystycznie istotnie o 56% większą. Przy 6% wilgotności nasion w obiekcie (N/O)NKA_g zawartość ERG obniżyła się o 26%, a w obiekcie (N/O)NKCu zaobserwowano istotny wzrost zawartości metabolitu o 52%. Statystycznie istotną obniżoną zawartość ERG obserwowano dla wilgotności nasion 6% wynoszące 52% w porównaniu do obiektu kontrolnego.

Przeprowadzona analiza statystyczna dla aplikacji nanokolloidu srebra w postaci namoczenia nasion i oprysku roślin wykazała, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była słabo dodatnio ($R^2=0,56$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach. Po aplikacji miedzi analiza wykazała, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,85$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Średnia zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku przechowywanych w silosie laboratoryjnym w 2017 roku po pierwszym tygodniu przechowywania w obiekcie kontrolnym wynosiła odpowiednio $0,31 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ oraz $0,28 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dla wilgotności nasion 6, 9 i 12%. Po aplikacji NKA_g na rośliny zawartość ERG przy wszystkich poziomach wilgotno-

ści była niższa niż w nasionach z obiektu kontrolnego. Statystycznie istotne zmiany obserwowano przy wilgotności nasion 6 i 12%, przy których nasiona zawierały mniej tego metabolitu kolejno o 45%, 15% oraz 82%. Po aplikacji nanokoloidu srebra analiza statystyczna wykazała, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie ujemnie ($R^2=0,98$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po aplikacji NKCu w formie oprysku roślin obserwowano spadek zawartości ERG przy najniższej oraz najwyższej wilgotności nasion, odpowiednio o 48% i 36%. Po aplikacji nanokoloidu miedzi analiza statystyczna wykazała, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie ujemnie ($R^2=0,84$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Zawartość ergosterolu w próbkach nasion otrzymanych z uprawy, w której zastosowano podwójną aplikację nanokoloidu srebra w obiekcie (N/O)NKAg, była statystycznie istotnie niższa przy najniższym i najwyższym (6% i 12%) poziomie wilgotności nasion niż zawartość ERG w obiekcie kontrolnym o 13% i 43%. Przy 9% wilgotności nasion obserwowano wzrost zawartości ERG o 100%. Po podwójnej aplikacji dawki nanokoloidu srebra na nasiona i rośliny, wykazano, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie ujemnie ($R^2=0,81$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

W obiekcie (N/O)NKC u poziom ERG w nasionach był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu z zawartością w obiekcie kontrolnym i wynosił kolejno 25%; 77% oraz 71% przy wilgotności 6, 9 i 12%.

Po dwóch tygodniach zawartość ERG w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła kolejno: $0,33 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; $0,14 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ oraz $0,29 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ przy wilgotnościach 6, 9 i 12%. Statystycznie istotne różnice w zawartości tego metabolitu obserwowano po zastosowaniu nanokoloidu srebra w obiekcie (O)NKAg przy wilgotności nasion 6%, które zawierały o 69% mniej ERG w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Analiza statystyczna wykazała po aplikacji pojedynczej dawki srebra na rośliny, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,84$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach. Aplikacja nanokoloidu miedzi w obiekcie (O)NKC u spowodowała statystycznie istotne obniżenie zawartości ERG w nasionach o wilgotności 6% oraz 12%, odpowiednio 36% i 59%. Analiza statystyczna wykazała, że po aplikacji pojedynczej dawki miedzi na rośliny zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie ujemnie ($R^2=0,91$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

W obiekcie (N/O)NKAg nastąpiło obniżenie zawartości ERG w nasionach rzepaku przy wilgotności 6% i 12%, odpowiednio o 45% oraz 10%, ale statystycznie istotne obniżenie zawartości tego metabolitu nastąpiło tylko przy najniższej wilgotności (6%). Statystycznie istotny wzrost ergosterolu o 50%, obserwowano przy 9% wilgotności nasion. Analiza statystyczna wykazała, że po aplikacji podwójnej dawki srebra na rośliny zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,97$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach. Po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC u obserwowano zmniejszenie zawartości ergosterolu przy wilgotności nasion 6% oraz 12%, wynoszące odpowiednio 24 i 31%, natomiast przy wilgotności 9% nasiona zawierały o 21% więcej ERG.

Po trzech tygodniach zawartość ERG w nasionach z obiektu kontrolnego przy wilgotnościach 6, 9 i 12% wynosiła odpowiednio: $0,62 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; $0,22 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ oraz $0,68 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Po aplikacji nanokoloidów w rozpatrywanych wariantach obserwowano spadek jego zawartości, z wyjątkiem obiektu (N/O)NKC u, przy wilgotności nasion 9%, w którym nasiona zawierały

więcej ERG w porównaniu z obiektem kontrolnym o 36%. Po aplikacji NKA_g w formie oprysku obserwowano statystycznie istotnie mniej ERG kolejno o 51%; 41% i 84%, a po aplikacji nanokolloidu miedzi w formie oprysku (O)NKC_u odnotowano statystycznie istotnie mniej ERG w nasionach, odpowiednio o 90%; 82% oraz 91%. W obiekcie (N/O)NKA_g wykazano statystycznie istotne obniżenie zawartości ERG w nasionach 87%; 55% oraz 84%. Stwierdzono, że po aplikacji nanokolloidu srebra w obiekcie (N/O)NKA_g zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,96$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach, natomiast w obiekcie (O)NKA_g obserwowano zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie ujemnie ($R^2=0,82$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po czterech tygodniach zawartości ERG w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła odpowiednio: $0,72 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; $0,22 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz $0,32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ przy wilgotności 6, 9 i 12%. Stwierdzono, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była ujemnie ($R^2=0,57$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w surowcu w obiekcie kontrolnym. Po aplikacji nanokolloidu srebra w obiekcie (O)NKA_g obserwowano statystycznie istotne obniżenie zawartości ERG przy wilgotności nasion 6% i 12%, odpowiednio o 79% oraz o 41%.

Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (O)NKC_u obserwowano przy wszystkich trzech poziomach wilgotności nasion obniżkę zawartości ERG, kolejno o 82%; 36% oraz 31%, statystycznie istotne tylko dla 6% oraz 12% wilgotności nasion rzepaku. W obiekcie (O)NKC_u stwierdzono, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była silnie dodatnio ($R^2=0,83$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach. Po zastosowaniu nanokolloidu srebra (N/O)NKA_g obserwowano statystycznie istotny spadek zawartości ergosterolu przy wilgotności nasion 6% i 12%, kolejno o 81% i 31%. W analizowanych próbach, w których zastosowano aplikację nanokolloidu na nasiona oraz rośliny, stwierdzono, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,97$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC_u zawartość ERG statystycznie istotnie obniżyła się o 78% (6%) oraz 34% (12%). Dla tego wariantu doświadczenia również stwierdzono, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była dodatnio ($R^2=0,60$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po pięciu tygodniach zawartość ERG w nasionach z obiektu kontrolnego wynosiła odpowiednio: $0,39 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ oraz $0,24 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ przy wilgotności 6, 9 i 12%. Dla wariantu (O)NKA_g z aplikacją nanokolloidu srebra obserwowano statystycznie istotne obniżenie metabolitu przy wszystkich poziomach wilgotności nasion, odpowiednio o 69%; 50% oraz 42% w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (O)NKC_u statystycznie istotne obniżenie zawartości ERG obserwowano przy wszystkich trzech poziomach wilgotności nasion, odpowiednio o 72%; 44% i 83%. W tym przypadku stwierdzono, że zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku była bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,94$) skorelowana na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością wilgoci w nasionach.

Po dwukrotnej aplikacji nanokolloidu srebra w obiekcie (N/O)NKA_g obserwowano niższą zawartość ERG przy wszystkich poziomach wilgotności nasion, odpowiednio o 69%; 69% i 4%. Statystycznie istotne obniżenie zawartości ERG obserwowano również po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC_u przy najniższej wilgotności nasion stanowiącej wartość o 52% niższą. W pozostałych wariantach nasiona zawierały mniej ERG odpowiednio o 31% oraz o 21%.

Tabela 16.
Średnie stężenie ergosterolu (ERG) w nasionach rzepaku podczas przechowywania

Rok	Okres przechowywania	Obiekt														
		Kontrolny			(ONKAg)			Zawartość ergosterolu (µg g ⁻¹)			(ONKCu)			(N'ONKCu)		
2016	Wilgotność nasion (%)	6	9	12	6	9	12	6	9	12	6	9	12	6	9	12
	(1)-7 dzień	0,45±0,04 ^A	0,32±0,05 ^A	0,33±0,02 ^A	0,28±0,01ab ^A	0,27±0,02ab ^A	0,35±0,01b ^A	0,25±0,02ab ^A	0,18±0,02ab ^A	0,19±0,01ab ^A	0,23±0,01ab ^A	0,28±0,01b ^A	0,24±0,02ab ^A	0,28±0,01b ^A	0,25±0,02ab ^A	0,27±0,03b ^A
	(2)-14 dzień	0,32±0,02 ^A	0,22±0,02 ^A	0,35±0,02 ^A	0,12±0,03ac ^A	0,14±0,01ac ^A	0,25±0,02ac ^A	0,14±0,03ab ^A	0,22±0,02c ^A	0,31±0,01c ^A	0,16±0,02ac ^A	0,15±0,01ac ^A	0,18±0,01ab ^A	0,11±0,02ac ^A	0,11±0,02ac ^A	0,22±0,02ab ^A
	(3)-21 dzień	0,22±0,03 ^A	0,13±0,01 ^A	0,33±0,03 ^A	0,26±0,02b ^A	0,08±0,02ab ^A	0,17±0,02ad ^A	0,63±0,01ab ^A	0,31±0,02ac ^A	0,15±0,03ab ^A	0,28±0,03b ^A	0,11±0,02c ^A	0,26±0,02ab ^A	0,25±0,01ab ^A	0,17±0,01c ^A	0,29±0,03b ^A
	(4)-28 dzień	0,22±0,01 ^A	0,15±0,01 ^A	0,27±0,02 ^A	0,17±0,02c ^A	0,24±0,02ab ^A	0,25±0,01c ^A	0,12±0,01ab ^A	0,17±0,02b ^A	0,21±0,02b ^A	0,14±0,03c ^A	0,16±0,03c ^A	0,35±0,03ac ^A	0,17±0,02b ^A	0,14±0,03c ^A	0,22±0,03b ^A
	(5)-35 dzień	0,19±0,01 ^A	0,08±0,02 ^A	0,19±0,01 ^A	0,14±0,03c ^A	0,12±0,02ac ^A	0,16±0,02d ^A	0,096±0,01ac ^A	0,09±0,01d ^A	0,14±0,01b ^A	0,15±0,01c ^A	0,09±0,01ac ^A	0,26±0,02b ^A	0,12±0,02b ^A	0,12±0,02c ^A	0,29±0,03ab ^A
2017	Wilgotność nasion (%)	6	9	12	6	9	12	6	9	12	6	9	12	6	9	12
	(1)-7 dzień	0,31±0,05 ^B	0,13±0,03 ^B	0,28±0,02 ^B	0,17±0,02ab ^B	0,11±0,02b ^B	0,05±0,03ac ^B	0,16±0,02ab ^A	0,13±0,01b ^A	0,12±0,02ab ^A	0,27±0,03b ^A	0,39±0,01b ^B	0,26±0,03ab ^A	0,16±0,03b ^A	0,23±0,02ac ^A	0,29±0,03ac ^A
	(2)-14 dzień	0,33±0,03 ^A	0,14±0,02 ^B	0,29±0,03 ^B	0,10±0,02ab ^A	0,12±0,03b ^A	0,25±0,02c ^A	0,21±0,02ab ^B	0,14±0,03b ^A	0,12±0,02ab ^B	0,18±0,01ab ^A	0,25±0,03b ^B	0,26±0,02b ^A	0,25±0,03b ^B	0,17±0,01b ^B	0,20±0,02b ^A
	(3)-21 dzień	0,62±0,04 ^B	0,22±0,04 ^B	0,68±0,01 ^B	0,30±0,01ab ^A	0,13±0,01ac ^A	0,11±0,03ac ^A	0,06 $\pm$ 0,03ab ^B	0,04±0,05ab ^B	0,06±0,01ab ^A	0,08±0,02ab ^B	0,34±0,04ab ^B	0,11±0,02ab ^B	0,34±0,04ab ^B	0,30±0,02ab ^B	0,39±0,02ab ^B
	(4)-28 dzień	0,72±0,02 ^B	0,22±0,03 ^A	0,32±0,03 ^B	0,15±0,03ab ^A	0,21±0,03c ^A	0,19±0,03ab ^A	0,13±0,03ab ^B	0,14±0,03b ^A	0,22±0,03ac ^A	0,14±0,00ab ^A	0,16±0,03ab ^A	0,23±0,04ab ^B	0,16±0,03ab ^A	0,15±0,02b ^A	0,21±0,03ab ^A
	(5)-35 dzień	0,39±0,03 ^B	0,16±0,03 ^A	0,24±0,02 ^A	0,12±0,02ab ^A	0,08±0,03b ^A	0,14±0,02b ^A	0,11±0,01ab ^B	0,09±0,02ab ^A	0,09±0,04ab ^B	0,12±0,03ab ^A	0,05±0,02b ^A	0,23±0,02ac ^A	0,14±0,01ab ^A	0,11±0,03b ^A	0,19±0,03b ^B

Wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obciążenia kontrolnego ($p<0,05$); b, c, d – istotne różnice pomiędzy obiektami badań dla wybranych nanokoloidów w kolumnie, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$); A, B – istotne różnice zawartości ERG w latach przechowywania nasion a rodzajem aplikacji nanokoloidów w kolumnie na wybrane parametry, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$)

Wyniki analizy statystycznej zależności między zawartością ergosterolu w nasionach od roku ich zbioru oraz czasu przechowywania przedstawiono w tabeli 16. Wykazano statystycznie istotne różnice w zawartości ERG, występujące w większości przypadków między nasionami z obiektu kontrolnego i z obiektów po aplikacji nanokolloidów zarówno na nasiona, jak i na rośliny, w poszczególnych tygodniach, a także przy przyjętych poziomach wilgotności nasion.

6.5.3. Parametry jakościowe oleju tłoczonego na zimno

W tabeli 17 przedstawiono zawartość karotenoidów oraz chlorofilu *a* i *b* w oleju wytłoczonym z nasion rzepaku uprawianego po namoczeniu nasion przed wysiewem oraz oprysku roślin z użyciem NKAg oraz NKCu. Zawartość barwników w analizowanych próbkach w obydwóch latach uprawy 2016-2017 charakteryzowała się wysokim ich poziomem.

W 2016 roku zawartość chlorofilu *a* w oleju z obiektu kontrolnego wynosiła $7,28 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, chlorofilu *b* $2,78 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ oraz karotenoidów $70,74 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Po namoczeniu nasion i oprysku nanokolloidem srebra (N/O)NKAg suma chlorofilu *a* i *b* w oleju wynosiła $15,86 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, statystycznie istotnie więcej w odniesieniu do obiektu kontrolnego odpowiednio dla chl *a* o 43,8% oraz dla chl *b* o 93,8%. Zawartość karotenoidów w analizowanym oleju była niższa o 0,35% w porównaniu z obiektem kontrolnym. Podobną zależność odnotowano w przypadku aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC u. Suma chlorofilu w oleju z tego obiektu wynosiła $17,25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Po aplikacji nanokolloidów obserwowano większą zawartość obu chlorofilu niż w obiekcie kontrolnym. Statystycznie istotnie większe o 63,4% (chl *a*) i 92% (chl *b*). Zadane stężenie nanocząstek było dodatnio ($R^2=0,62$) i ($R^2=0,53$) skorelowany na poziomie istotności ($p<0,05$) z zawartością chlorofilu *a* oraz z zawartością chlorofilu *b* w analizowanych próbkach oleju. Obserwowano również istotny statystycznie wzrost zawartości karotenoidów w oleju o 27,4% w obiekcie (N/O)NKC u, w porównaniu z jego zawartością w oleju z obiektu kontrolnego.

Olej uzyskany z roślin, na które zastosowano tylko oprysk nanokolloidami w obiektach (O)NKAg i (O)NKC u, wykazywał statystycznie istotny wzrost zawartości sumy chlorofilu, która wynosiła odpowiednio $16,19 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ i $16,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, co oznacza wzrost zawartości o 51% (chl *a*) i o 87% (chl *b*) w obiekcie (O)NKAg. Obserwowano też statystycznie istotny wzrost zawartości karotenoidów w analizowanym oleju w porównaniu z obiektem kontrolnym o 27,4% w obiekcie (O)NKAg, a w obiekcie (O)NKC u o 48% (chl *a*) i o 95% (chl *b*), a niewielki spadek karotenoidów o 0,9% w obiekcie (O)NKC u.

W 2017 roku zawartość barwników była wysoka i wynosiła w obiekcie kontrolnym kolejno $7,72 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chl *a*); $3,36 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chl *b*) oraz $80,45 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (car). Po zastosowaniu namoczenia nasion i oprysku roślin w obiekcie (N/O)NKAg suma chlorofilu wynosiła $15,36 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Obserwowany wzrost zawartości chlorofilu był statystycznie istotny w odniesieniu do obiektu kontrolnego odpowiednio o 37% (chl *a*) oraz o 42% (chl *b*), a wzrost zawartości karotenoidów był niewielki wynoszący 1,4%. W oleju z obiektu (N/O)NKC u suma zawartości chlorofilu wynosiła $17,1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Zawartość chlorofilu *a* i *b* zwiększyła się statystycznie istotnie w odniesieniu do obiektu kontrolnego odpowiednio o 47% (chl *a*) oraz 71% (chl *b*). Obserwowano również wzrost zawartości karotenoidów o 13%.

Aplikacja nanokolloidów srebra tylko w postaci oprysku na rośliny w obiekcie (O)NKAg wykazała również statystycznie istotny wzrost zawartości chlorofilu w porówna-

niu z ich zawartością w oleju z obiektu kontrolnego o 39% (chl *a*) oraz 44% (chl *b*), a suma ich zawartości wynosiła $15,56 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Zawartość karotenoidów nieznacznie, ale statystycznie istotnie zmniejszyła się o 6,1%. Suma zawartości chlorofili po aplikacji nanokoloиду miedzi w obiekcie (O)NKCu wynosiła $17,9 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, była statystycznie istotnie wyższą w przypadkach obydwóch chlorofili niż w obiekcie kontrolnym kolejno o 47% (chl *a*) oraz 97% (chl *b*). W tym obiekcie również obserwowano zmniejszenie zawartości karotenoidów o 10% w odniesieniu do ich zawartości w oleju z obiektu kontrolnego.

Wyniki analizy statystycznej zależności zawartości barwników w obydwu latach tłoczenia oleju wykazały statystycznie istotne różnice tylko dla zawartością karotenoidów w obiektach (O)NKAg, (O)NKCu oraz (N/O)NKAg.

Tabela 17.

Zawartość chlorofili i karotenoidów w oleju tłoczonym na zimno z nasion rzepaku

Rok	Barwniki	Obiekt				
		Kontrolny	(O)NKAg	(O)NKC <u>u</u>	(N/O)NKAg	(N/O)NKC <u>u</u>
2016	Chlorofil <i>a</i>	7,28±0,66 ^A	10,98±0,59ab ^A	10,77±0,56ab ^A	10,47±0,11ab ^A	11,90±0,15ac ^A
	Chlorofil <i>b</i>	2,78±0,41 ^A	5,21±0,54ab ^A	5,43±0,66ab ^A	5,39±0,20ab ^A	5,35±0,40ab ^A
	Karotenoidy	70,74±1,23 ^A	90,11±1,63ab ^A	70,08±2,61c ^A	70,49±3,80c ^A	90,10±1,29ab ^A
2017	Chlorofil <i>a</i>	7,72±1,9 ^A	10,73±0,7ab ^A	11,36±0,78ac ^A	10,58±0,8ab ^A	11,35±0,4ab ^A
	Chlorofil <i>b</i>	3,36±0,15 ^A	4,83±0,9ab ^A	6,63±0,44ac ^B	4,78±0,4ab ^A	5,75±0,4ab ^A
	Karotenoidy	80,45±7,54 ^A	75,58±7,5ac ^B	72,74±5,8ac ^B	89,6±5,8b ^B	90,76±5,2b ^A

Wartości średnie $\pm$ SD ($n=9$); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$); b, c – istotne różnice pomiędzy zadanymi stężeniami wybranych nanokoloïdów w wierszu, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$). A, B – istotne różnice w latach barwników w tłoczonym oleju a zadanym stężeniem aplikacji nanokoloïdów w kolumnie na wybrane parametry, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$)

Tabela 18 przedstawia parametry barwy mierzonej w skali CIE dla uproszczenia zapisu oznaczone jako L^* a^* oraz b^* dla oleju wytłoczonego z nasion rzepaku uprawianego w latach 2016-2017. Parametr L^* oznacza względną jasność próbki. Analiza barwy oleju z roku 2016 wykazała, że wszystkie badane oleje są relatywnie ciemne L^* w przedziale od 5,27 w oleju z nasion z obiektu (N/O)NKAg do 7,95 w oleju z obiektu kontrolnego. We wszystkich wariantach aplikacji nanokoloïdów barwa oleju statystycznie istotnie różni się od barwy oleju z obiektu kontrolnego. Różnice w otrzymanych wartościach L^* wynoszą odpowiednio: 6%; 9,3% i dla obiektów (O)NKAg i (O)NKCu 33,7% i 8,2% dla oleju z nasion z obiektów (N/O)NKAg i (N/O)NKCu. Należy pamiętać, że parametr ten jest względny i w praktyce oznacza zmieszanie barwy podstawowej z barwą czarną (niskie L) lub białą (wysokie L). Parametry a^* i b^* określają kolor próbki. Ujemne wartości a^* oznaczają udział barwy zielonej w ogólnym kolorze, a dodatnie udział barwy czerwonej. W przypadku parametru b^* ujemne wartości oznaczają udział barwy niebieskiej, a dodatnie barwy żółtej.

Tabela 18.

Analiza barwy oleju tłoczonego z nasion rzepaku na zimno

Rok	Obiekt	Parametry barwy oleju					
		L*	a*	b*	h	Chrome	ΔH
2016	Kontrolny	7,95±0,16 ^A	4,66±0,12 ^A	11,06±0,30 ^A	1,17±0,01 ^A	12,01±0,28 ^A	14,87±1,24 ^A
	(O)NKAg	7,48±0,22ab ^A	4,51±0,20b ^A	9,21±0,29ab ^A	1,1±0,01ab ^A	10,25±0,34ab ^A	13,81±0,37b ^A
	(O)NKC <u>u</u>	7,21±0,19ab ^A	4,67±0,20b ^A	9,55±0,37ab ^A	1,12±0,02ab ^A	10,64±0,37ab ^A	13,58±1,17b ^A
	(N/O)NKAg	5,27±0,20ac ^A	3,96±0,15ac ^A	6,44±0,31ac ^A	1,02±0,01ac ^A	7,56±0,32ac ^A	11,57±1,37ac ^A
	(N/O)NKC <u>u</u>	7,30±0,09ab ^A	4,10±0,22ac ^A	9,62±0,30ab ^A	1,17±0,01d ^A	10,46±0,34ab ^A	11,54±1,40ac ^A
2017	Kontrolny	8,83±0,56 ^A	4,72±0,26 ^A	12,44±1 ^B	1,21±0,03 ^A	13,31±0,97 ^B	16,02±1,62 ^B
	(O)NKAg	7,92±0,30b ^A	4,83±0,17b ^A	10,39±0,52ab ^A	1,14±0,01b ^A	11,45±0,54ab ^B	14,86±0,55ab ^B
	(O)NKC <u>u</u>	8,08±0,33b ^B	3,92±0,14b ^A	8,32±0,36ac ^B	0,13±0,02b ^B	9,20±0,33ac ^B	11,83±1,03ac ^B
	(N/O)NKAg	6,28±0,15a ^B	4,01±0,19b ^A	8,04±0,25ac ^B	1,11±0,01b ^A	8,98±0,28ac ^B	8,04±1,86ad ^B
	(N/O)NKC <u>u</u>	7,87±0,14ab ^A	4,55±0,13b ^A	10,66±0,28ab ^B	1,17±0,01b ^A	11,59±0,30ab ^B	12,10±0,35ac ^A

Wartości średnie ± SD (n=9); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego (p<0,05); b, c, d – istotne różnice pomiędzy rozpatrywanymi stężeniami dla wybranych nanokoloidów w kolumnie, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05). A, B – istotne różnice w latach tłoczenia oleju a rodzajem zadanego stężenia nanokoloidów w wierszu na wybrane parametry, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności (p<0,05)

Dodatnia wartość parametru a* pomiędzy 3,96 w oleju z nasion poddanych aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (N/O)NKAg a 4,67 w oleju z nasion roślin poddanych opryskowi z obiektu (O)NKCu wskazuje na domieszkę barwy czerwonej w ogólnej barwie olejów, którą jest barwa żółta (dodatnie wartości parametru b*, pomiędzy 6,44 a 11,06). Statystycznie istotne obniżenie wartości parametru a* obserwowano w olejach po dwukrotnej aplikacji obu nanokoloidów, o 15% oraz o 12%. W przypadku parametru b* obserwowano statystycznie istotne obniżenie wartości we wszystkich przypadkach aplikacji nanokoloidów w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Najbardziej obniżyła się jego wartość w olejach z nasion po zastosowaniu nanokoloidu srebra w obiekcie (O)NKAg, o 17% oraz w obiekcie (N/O)NKAg o 41,7%. Parametr h oznacza odcień barwy, który zostaje wyznaczony po konwersji barw w systemie L* a* b* na system kartezjański. Wartość tego parametru oznacza odcień żółtości. Parametr Chroma w teorii koloru oznacza saturację lub nasycenie barwy. Jest to subiektywna intensywność barwy. Im barwa jest bardziej nasyciona, tym jest odbierana jako bardziej żywa. Za to barwy mniej nasycone zdają się być przytłumione i bliższe szarości. Relatywnie wysoka wartość tego parametru oznacza dość nasyconą barwę próbki oleju, a statystycznie istotne różnice obserwowano po wszystkich aplikacjach nanokoloidów w odniesieniu do oleju z obiektu kontrolnego. Największe obniżenie tego parametru zaobserwowano w obiektach (N/O)NKAg, o 37,0% oraz (O)NKAg, o 14,6%. Odległość energetyczna próbki ΔH od tła (którym był biały karton) wskazuje na kolor próbki mierzony względem tła. Jak wynika z danych, olej z obiektu kontrolnego ma najbardziej intensywną barwę, która statystycznie istotnie różni się od barwy olei otrzymanych z nasion z obiektu z dwukrotną aplikacją nanokoloidami. Wartość ta dla oleju otrzyma-

nego z nasion z obiektu (N/O)NKAg była mniejsza od wartości otrzymanej w obiekcie kontrolnym o 22,2% (11,57), a w przypadku obiektu (N/O)NKC u była mniejsza o 22,4% (11,54).

W 2017 roku wartość parametru L^* wskazuje, że wszystkie oleje charakteryzują się ciemną barwą, w przedziale od 6,28 dla oleju z nasion po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC u do 8,83 w oleju z obiektu kontrolnego. Statystycznie istotne różnice barwy obserwowano dla oleju otrzymanego z nasion po dwukrotnej aplikacji nanokoloidów srebra i miedzi (na nasiona oraz rośliny) w odniesieniu do wartości barwy oleju z obiektu kontrolnego. Wartości L^* były mniejsze o 28,8% dla oleju z nasion z obiektu (N/O)NKAg oraz o 10,9% z obiektu (N/O)NKC u. Otrzymane dodatnie wartości parametru a^* , między 3,92 dla oleju z nasion z obiektu (O)NKC u a 4,83 dla obiektu (O)NKAg, wskazuje również na domieszkę barwy czerwonej w ogólnej żółtej barwie oleju, (dodatnie wartości b^* między 8,04 a 12,44). Obserwowano statystycznie istotne obniżenia wartości parametru b^* we wszystkich wariantach zastosowania nanokoloidów. Po aplikacji (O)NKAg jego wartość zmalała o 16,5%, a po zastosowaniu nanokoloidu miedzi w obiekcie (O)NKC u o 33,1%. Po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu srebra w obiekcie (N/O)NKAg parametr b^* był mniejszy o 35,4%, a w obiekcie (N/O)NKC u o 14,3%. Wyniki parametru Chrome wykazały statystycznie istotne obniżenie jego wartości we wszystkich wariantach aplikacji nanokoloidów: dla (O)NKAg o 14%, dla (O)NKC u o 30,9%; dla (N/O)NKAg o 32,5% oraz dla (N/O)NKC u o 13%. Odległość energetyczna próbk ΔH od tła, podobnie jak w 2016 roku wskazuje, że olej w obiekcie kontrolnym ma najbardziej intensywny kolor oraz statystycznie istotnie różni się barwą od olei otrzymanych z nasion z każdego wariantu aplikacji. Wartości te miały wartość mniejszą o 7,2%; 26%; 49,8% oraz 24,5% odpowiednio dla obiektów (O)NKAg, (N/O)NKAg, (O)NKC u i (N/O)NKC u.

Wyniki analizy statystycznej zależności barwy oleju tłoczonego na zimno w obydwu latach wykazała, że występuje statystycznie istotna różnica pomiędzy wartością parametru L^* oleju z obiektu (O)NKC u oraz (N/O)NKAg, a w 2017 roku wartość tego parametru były wyższe niż w roku poprzednim. Stwierdzono też statystycznie istotne różnice wartości w obydwu latach tłoczenia oleju, dla wskaźnika b^* , Chrome oraz ΔH , i podobnej jak wartość L^* w 2017 roku w większości przypadków aplikacji nanokoloidów ich wartości były wyższe od tych w 2016 roku.

Podsumowując, oleje ze wszystkich obiektów mają nasyconą barwę żółtą jako podstawową, z domieszką barwy czerwonej. Może to oznaczać, że wszystkie oleje były tłoczone w fazie pełnej dojrzałości. Dodatkowo obecność barwy czerwonej może świadczyć o lekkim stopniu utlenienia olejów zawierających dużą ilość chlorofili (przejście chlorofili w formę feofityny, która ma barwę czerwoną).

W tabeli 19 przedstawiono podstawowe czynniki opisujące stabilność olei wyrażane między innymi wartością liczby kwasowej (LK), liczby nadtlencowej (LN) oraz stabilności oksydacyjnej. Otrzymane w 2016 roku wartości stabilności oksydacyjnej w obiekcie kontrolnym dla czasu indukcji wynosiły 4,6 h, a dla czasu normalnego 25,68 h. Analiza wytłoczonego oleju z surowca uzyskanego po stosowaniu namoczenia nasion oraz opryskaniu roślin z obiektu (N/O)NKAg wykazała statystycznie istotnie większą stabilność oleju niż stabilność oleju w obiekcie kontrolnym, a która wynosiła dla czasu indukcji 5,68 h oraz 30,46 h dla czasu normalnego, czyli były wyższe kolejno o 22,9% i 23,49% w porównaniu z obiektem kontrolnym. Po zastosowaniu nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/O)NKC u czas indukcji wynosił 5,7 h, a czas normalny 30,43 h, co stanowiło wzrost kolejno o 23,4% oraz 23,37%. W przypadku oleju otrzymanego z nasion, rzepaku z obiektu, w którym zastosowano tylko oprysk roślin nanokoloidami, w obiekcie (O)NKAg czas indukcji wzrósł do 4,8 h, przyczyniając się do wzrostu jego stabilności o 4,3%, zaś wartość czasu normalnego

wzrosła do 25,76 h, czyli o 4,43%. Po użyciu nanokoloidu w obiekcie (O)NKC_u wzrósł czas indukcji oleju o 9,3% w porównaniu z otrzymanym wynikiem w obiekcie kontrolnym. Statystycznie istotnie zwiększyła się wartość czasu normalnego stabilności oleju o 23,37%. Zadane stężenia nanocząstek było słabo dodatnio ($R^2=0,58$) oraz bardzo silnie ($R^2=0,92$) skorelowany na poziomie istotności $p<0,05$ z czasem indukcji oraz z czasem normalnym w analizowanych próbach oleju.

Wartość LK oleju z obiektu kontrolnego wynosiła 1,95 mg KOH·h⁻¹, a po aplikacji nanokoloidów wartości te mieściły się w przedziale od 1,92 do 2,79 mg KOH·h⁻¹ (tab. 19). Występują niewielkie różnice wartości LK z obiektów, w których stosowano NKAg i NKC_u w porównaniu z obiektem kontrolnym. Najniższą wartość obserwowano w oleju otrzymanym w obiekcie, w którym nasiona i rośliny potraktowano nanokoloidem z obiektu (N/O)NKC_u (mniejsza o 1,6%), a najwyższą w oleju z nasion z obiektu, w którym rośliny opryskano (O)NKAg (więcej o 43,0%). Zadane stężenie nanocząstek było dodatnio ($R^2=0,64$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$ z zawartością LK w nasionach rzepaku.

Otrzymane wartości LN w olejach z nasion rzepaku z obiektów z aplikacją nanokoloidów były zbliżone, choć wyższe niż jej wartość w obiekcie kontrolnym, która wynosiła 3,17 mmol O·kg⁻¹. W pozostałych olejach wartość LN była wyższa i wynosiła w oleju z roślin z obiektu, w którym zastosowano tylko oprysk nanokoloidem srebra (O)NKAg 4,72 mmol O·kg⁻¹, czyli statystycznie więcej w odniesieniu do obiektu kontrolnego o 48,9%. Po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (O)NKC_u po oprysku roślin wartość LN wynosiła 4,36 mmol O·kg⁻¹, co stanowiło wartość statystycznie istotnie większą o 37,5%. Niższe wartości LN obserwowano po dwukrotnej aplikacji obu nanokoloidów do namoczenia nasion oraz oprysku roślin (N/O). Wykazano również, że stanowiły one wartości statystycznie istotnie wyższe dla oleju z obiektu (N/O)NKAg o 35,3% oraz wzrost statystycznie nieistotny w obiekcie (N/O)NKC_u o 3,5%.

W 2017 roku czas indukcji dla obiektu kontrolnego wynosił 5,06 h, a czas normalny 26,90 h. Analiza oleju wyłoczonego z nasion po aplikacji nanokoloidów nie wykazała statystycznie istotnych różnic czasu indukcji olejów, choć obserwowano wzrost ich wartości w porównaniu z obiektem kontrolnym. Wartości czasu indukcji były wyższe o 3% dla obiektu (O)NKAg, 0,8% dla obiektu (O)NKC_u, o 0,7% dla obiektu (N/O)NKAg oraz o 7% dla obiektu (N/O)NKC_u. Wartości czasu normalnego we wszystkich wariantach różniły się w niewielkim, i w statystycznie istotnym stopniu od wartości otrzymanych dla oleju z obiektu kontrolnego. Nastąpiło wydłużenie czasu ich stabilności odpowiednio o 3,3%; 1%; 1,2% oraz o 1%. Zadane stężenie aplikowanych nanocząstek były bardzo silnie dodatnio ($R^2=0,93$) oraz słabo dodatnio ($R^2=0,57$) skorelowane na poziomie istotności $p<0,05$ z czasem indukcji jak i z czasem normalnym w analizowanych próbach oleju.

Wartość LK dla oleju z obiektu kontrolnego wynosiła 1,98 mg KOH·g⁻¹, a w olejach otrzymanych z nasion roślin poddanych zabiegom z użyciem obu nanokoloidów wartości LK były większe i mieściły się w przedziale od 2,16 do 2,64 mg KOH·g⁻¹.

Wartość LN w oleju z obiektu kontrolnego wynosiła 4,01 mmol O·kg⁻¹, a w pozostałych wariantach doświadczenia mieściła się w przedziale od 3,10 mmol O·kg⁻¹ do 5,10 mmol O·kg⁻¹. Najwyższe statycznie istotne zwiększenie wartości LN obserwowano po aplikacji nanokoloidu srebra w postaci oprysku i była to wartość wyższa niż w obiekcie kontrolnym o 48%. W oleju z obiektu (O)NKC_u LN była wyższa o 37,3%, a z obiektu (N/O)NKAg wyższa o 35,2% niż w obiekcie kontrolnym.

Analiza statystyczna czynników porównująca stabilność oleju z obydwóch lat ich wytłoczenia w większości przypadków nie wykazała statystycznie istotnych różnic.

Stabilność oksydacyjna olejów wytłoczonych w latach 2016-2017 była dodatnio ($R^2=0,58$ oraz $R^2=0,59$) skorelowana na poziomie istotności ($p<0,05$) z zawartością sumy kwasów tłuszczowych (SFA, MUFA, PUFA, Omega 3, Omega 6 i Omega 9) w nasionach rzepaku.

Tabela 19.

Liczba kwasowa, liczba nadtlenkowa oraz czas indukcji olejów

Rok	Obiekt	Parametry stabilności oleju			
		Stabilność oksydacyjna		LK	LN
		(h)		(mg KOH·g ⁻¹)	(mmol O·kg ⁻¹)
2016	Kontrolny	Czas indukcji	4,62±0,01 ^A	1,95±0,01 ^A	3,17±0,01 ^A
		Czas normalny	25,68±0,39 ^A		
	(O)NKAg	Czas indukcji	4,82±0,05b ^A	2,56±0,01b ^A	4,72±0,01ab ^A
		Czas normalny	25,76±0,20b ^A		
	(O)NKCu	Czas indukcji	5,05±0,08b ^A	2,46±0,01b ^A	4,36±0,02ab ^A
		Czas normalny	27,32±0,69c ^A		
	(N/O)NKAg	Czas indukcji	5,68±0,22ab ^A	2,79±0,01b ^A	4,29±0,01ab ^A
		Czas normalny	30,46±1,18d ^A		
	(N/O)NKCu	Czas indukcji	5,70±0,24ab ^A	1,92±0,01a ^A	3,28±0,02c ^A
		Czas normalny	30,43±1,36d ^A		
2017	Kontrola	Czas indukcji	5,06±0,02 ^A	1,98±0,01 ^A	4,04±0,01 ^A
		Czas normalny	26,90±0,21 ^B		
	(O)NKAg	Czas indukcji	5,21±0,01b ^A	2,22±0,01b ^A	4,21±0,01b ^A
		Czas normalny	27,80±0,23ab ^B		
	(O)NKCu	Czas indukcji	5,10±0,15b ^A	2,16±0,02b ^A	5,10±0,03b ^B
		Czas normalny	27,20±0,33ab ^A		
	(N/O)NKAg	Czas indukcji	5,60±0,21b ^A	2,64±0,02b ^A	4,63±0,02b ^A
		Czas normalny	29,90±0,21ac ^A		
	(N/O)NKCu	Czas indukcji	5,41±0,03b ^A	2,41±0,01b ^A	3,10±0,01ac ^A
		Czas normalny	29,80±0,9ac ^A		

Wartości średnie ± SD (n=9); a – istotne różnice w stosunku do odpowiedniego obiektu kontrolnego ($p<0,05$); b, c – istotne różnice pomiędzy zadanymi stężeniami aplikacji nanokoloidów w kolumnie, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$). A, B – istotne różnice w latach tłoczenia oleju a rodzajem zadanego stężenia nanokoloidów w wierszu na wybrane parametry, ta sama litera w wierszu oznacza brak istotności ($p<0,05$)

Na rysunku 22 zaprezentowano widma ATR-FTIR obiektów - olei wytłoczonych z nasion rzepaku jarego zebranych z uprawy w 2016 roku (linia czarna ciągła) oraz z uprawy w 2017 roku (linia szara przerywana).

W panelu A przedstawiono widma dla obiektu kontrolnego (bez aplikacji nanokoloidów), w panelu B – widma dla oleju wytłoczonego z nasion roślin, które poddano opryskowi nanokoloidem srebra (O)NKAg, w panelu C widma dla oleju uzyskanego z nasion roślin, które poddano aplikacji opryskowi nanokoloidem miedzi (O)NKC u, w panelu D z widma dla oleju uzyskane z nasion rzepaku, które przed wysiewem namoczono w nanokoloidzie srebra, a rośliny opryskano nim (N/O)NKAg. W ostatnim panelu E umieszczono widma dla oleju wytłoczonego z nasion rzepaku, które poddano dwukrotnej aplikacji nano-

koloиду miedzi z obiektu (N/O)NKCu. W tabelach 20 i 21 przedstawiono wszystkie charakterystyczne pasma występujące w obiektach oleju wytłoczonego w 2016 roku (tab. 20) oraz oleju wytłoczonego w 2017 roku (tab. 21) oraz przypisano odpowiednim pasmom drgania konkretnych grup funkcyjnych.

W tabelach 20 i 21 przedstawiono również w indeksach dolnych natężenie obserwowanych pasm w typowych widmach w rejonie podczerwieni IR. Przyporządkowanie w tym przypadku widm odpowiadających drganiom rozciągającym w widmach w podczerwieni tego rodzaju próbek jest zazwyczaj łatwiejsze niż przyporządkowanie pasm odpowiadających drganiom deformacyjnym. Jest to często spowodowane pokrywaniem się pasm odpowiedzialnych za drgania tego typu. W przedstawionych widmach absorpcji wybranych do badań próbek oleju obserwuje się drgania grupy metylenowej, położone w zakresie spektralnym od 1350 do 1150 cm^{-1} . Są to w tym przypadku drgania rozciągające, pochodzące z drgań grupy -C-H związanej z grupą -CH₃ (zazwyczaj około 1350-1360 cm^{-1} , w analizowanych próbkach około 1350-1353 cm^{-1}) oraz drgań deformacyjnych w tej grupie (~1160 cm^{-1} , w analizowanych próbkach 1159-1161 cm^{-1}). Rozciągające drgania wiązania estrowego $\nu(\text{C-O})$ składają się z dwóch połączonych drgań asymetrycznych, są to drgania grupy C-C(=O)-O oraz O-C-C. Pasma te występują w regionie pomiędzy 1300 C-C(=O)-O, w analizowanych próbkach około 1280 cm^{-1} , jako podbudowanie pasma z maksimum przy 1236-1238 cm^{-1} oraz około 1000 cm^{-1} (w niniejszych badaniach 1029 do 1031 cm^{-1} dla tej kombinacji grup). Pasma związane z estrami nasyconymi C-C(=O)-O występują między 1240 a 1160 cm^{-1} (w tym przypadku oleju z nasion rzepaku jarego około 1236-1238 cm^{-1}). Następne kolejne dwa pasma zaprezentowane w tabelach 20 i 21 oraz na rysunku 22 mogą sprawiać niewielkie trudności w ich odpowiednim rozpoznaniu: jedno – to pasmo z maksimum przy około 1416-1418 cm^{-1} , a drugie z maksimum przy około 1320 cm^{-1} (raczej poszerzenie pasma – rys. 22, zarówno dla oleju wytłoczonego w 2016, jak i 2017 roku). Pierwsza grupa drgań z maksimum około 1416-1418 cm^{-1} (w zależności od próbki oleju, rys. 22) może zostać przypisana do drgań grup metylowych w alifatycznych łańcuchach wybranych do badań oleju. Druga grupa pasm (tzn. poszerzenie pasma) z maksimum około 1320 cm^{-1} (w przypadku wszystkich próbek) jest obserwowana jednocześnie z pasmami z maksimum około 966-968 i 912-914 cm^{-1} . Zauważono, że pasmo około 912-914 cm^{-1} (w zależności od analizowanych próbek), które pojawia się we wszystkich próbkach oleju, jest związane z drganiami rozciągającymi *cis*-podstawionych grup olefinowych oraz może być powiązane z drganiami grupy winylowej.

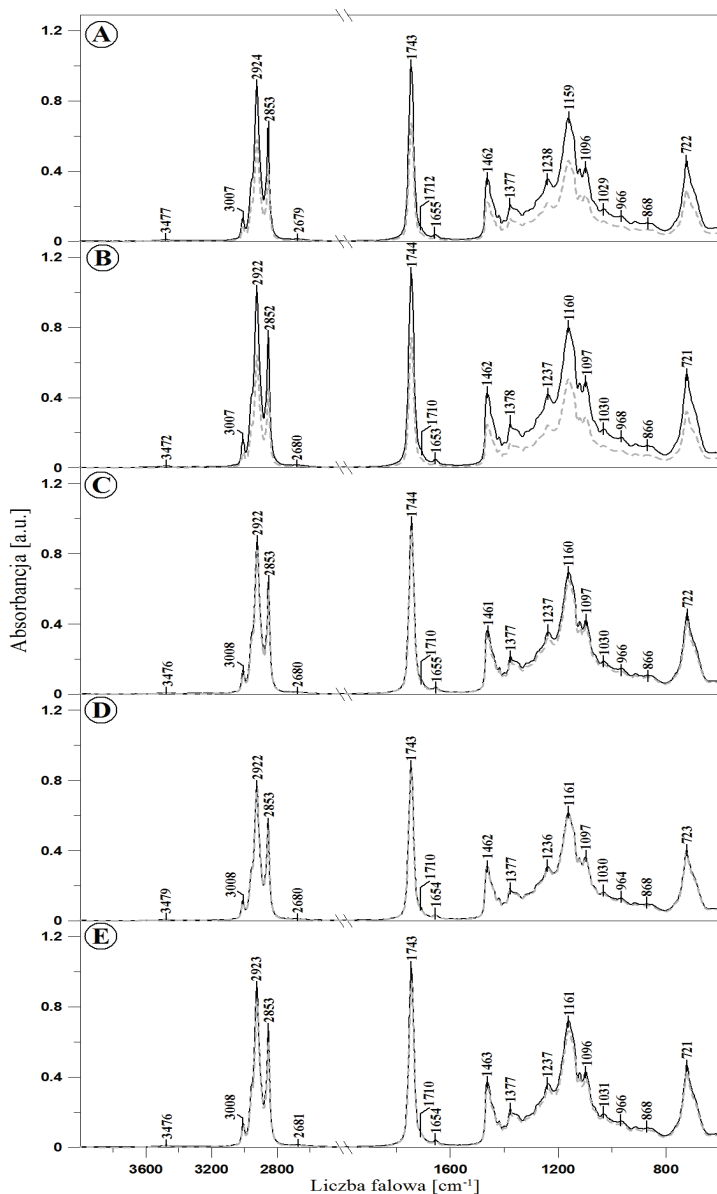
Wybrane do badań próbki oleju mają dość podobne widma w obszarze podczerwieni, jednakże na uwagę zasługuje fakt, że w zależności od sposobu wybranej zadanej stężenia nanokolloidów wykazują jednak znaczne różnice w natężeniu odpowiednich pasm oraz w ich dokładnej częstotliwości (choć nie są to duże przesunięcia), w której obserwuje się maksymalną absorbancję w każdym z poszczególnych przypadków. Ma to wyraźny związek z odmiennym sposobem aplikacji NKAg lub NKCu. Zdecydowanie różną intensywność pasm obserwuje się w przypadku olejów z nasion rzepaku ze zbioru w 2016 roku, nieco większą intensywność pasm praktycznie dla każdego sposobu aplikacji. Ponadto,

w celu łatwiejszej interpretacji widm oraz lepszej ich prezentacji, wszystkie widma zostały przedstawione w osobnych panelach oraz nie zostały też unormowane w celu uwydatnienia różnic w ich intensywnościach.

Obok pasma charakterystycznego dla drgań grupy karbonylowej (z maksimum przy około 1744-1743 cm^{-1}) w estrach występuje po stronie mniejszych liczb falowych podbudowanie z maksimum około 1710-1712 cm^{-1} , odpowiadające również drganiom grupy karbonylowej, lecz występującej w grupach kwasowych badanych próbkach oleju. Bardzo charakterystyczny obszar obejmuje również drgania z maksimum przy 1461-1463 cm^{-1} pochodzące od drgań deformacyjnych grup -C-H w grupach -CH₂ i -CH₃ (drgania zginające). Warto również wspomnieć o drganiach z obszaru od 900 do 650 cm^{-1} , które reprezentują charakterystyczne drgania deformacyjne należące do grup -HC=CH- (konformacja *cis*-, poza płaszczyznę) oraz drgania kołyszące tych grup (δ (-(CH₂)_n- i -HC=CH- (*cis* -)).

Przechodząc do drgań z zakresu większych liczb falowych, należy wymienić bardzo znaczące drgania rozciągające =C-H (transformacji *trans*-) z maksimum przy około 3063-3064 cm^{-1} (tab. 20) (na rys. 22 o bardzo małej intensywności). Z kolei dla drgań rozciągających =C-H konfiguracji *cis*-bardzo charakterystyczne, a zarazem intensywne drgania z maksimum przy około 3007/8 cm^{-1} (rys. 22 oraz tab. 20 i 21). Drgania z maksimum przy około 2952/5, 2922/4 oraz 2852/3 cm^{-1} pochodzą kolejno od drgań rozciągających -C-H w grupach -CH₃, -CH₂ należących do alifatycznych grup w trigricerydach.

W widmach badanych próbek olei wytłoczonych z nasion rzepaku w latach uprawy 2016-2017 z obiektów z aplikacją nanokoloidów (rys. 22) zaznaczają się wyraźne różnice w kształcie pasm z obszaru 1780 – 1670 cm^{-1} . W większości badanych próbek wyraźnie można zaobserwować lekkie podbudowanie pasma przy 1743/4 cm^{-1} (odpowiedzialnego za drgania grupy C=O, co opisano powyżej) po stronie niższych liczb falowych, z wyraźnym maksimum przy około 1710-1712 cm^{-1} (Bendini i in., 2007), które można przypisać również tworzeniu się wiązania wodorowego między grupami C=OH-O-H (w badanych próbkach). Jednocześnie z pojawieniem się pasma przy 1710-1712 cm^{-1} widać wyraźny wzrost intensywności pasm przy około 1350-1353, 721-723 cm^{-1} (Yang i Irudayaraj, 2001; Guilléni, in., 2003), które można również przypisać drganiom rozciągającym w grupach C-O oraz C-C (opisywanych powyżej). Ponadto obszar pomiędzy 1100-1300 cm^{-1} odpowiada również drganiom rozciągającym grupy C-O, lecz wykazuje on niewielkie zmiany w badanych próbkach olei niezależnie od sposobu aplikacji. Zmiany w widmach bardzo dobrze korelują ze zmianami w profilu kwasów tłuszczowych zaprezentowanymi w tabelach 11 i 12. Warto ponadto zwrócić uwagę na bardzo ważny fakt – pomimo iż nie można dostrzec znaczących różnic w przesunięciach pasm w widmach ATR-FTIR analizowanych obiektów - oleji, to obserwuje się zmiany w ich intensywnościach, w przypadku obydwu latach tłoczenia dotyczące sposobu aplikacji, jak również pomiędzy uzyskanymi w obiektach latach.



Rys. 22. Widma ATR-FTIR dla wybranych próbek olei wytłoczonych z nasion rzepaku jarego z uprawy w 2016 roku (linia czarna ciągła) oraz 2017 (linia szara przerywana). Panel A – kontrola, panel B – z zastosowaniem oprysku (O)NKAg, panel C – z zastosowaniem oprysku (O)NKCu, panel D – z zastosowaniem dwukrotnej aplikacji (N/O)NKAg, panel E – z zastosowaniem dwukrotnej aplikacji (N/O)NKCu. Widma w zakresie spektralnym od 590 do 4000 cm^{-1} .

Tabela 20.

Położenie maksimów pasm absorpcyjnych w zakresie spektralnym od 4000 do 590 cm⁻¹ wraz z przyporządkowaniem odpowiednich drgań dla oleju wytłoczonego z nasion rzepaku z uprawy w 2016 roku poddanych aplikacji nanokolloidów srebra oraz miedzi

ATR-FTIR					Rodzaje i pochodzenie drgań
Położenie maksimum (cm ⁻¹)					
Kontrola	(O)NKAg	(O)NKC <u>u</u>	(N/O)NKAg	(N/O)NKC <u>u</u>	
3477	3472	3476	3479	3476	-C=O _w (overtone)
3063	3063	3065	3063	3064	and ν(=C-H _{vw} , <i>trans</i> -)
3007	3007	3008	3008	3008	ν(=C-H _m , <i>cis</i> -)
2952	2954	2952	2954	2955	ν _{as} (-C-H _{vst} , -CH _a)
2924	2922	2922	2922	2923	i
2853	2852	2853	2853	2853	ν _s (-C-H _{vst} , -CH _a) (alifatyczne grupy w triglicerydach)
2731	2730	2729	2731	2734	-C=O _{vw} (rezonans Fermiego)
2679	2680	2680	2680	2681	
1743	1744	1744	1743	1743	ν(-C=O _{vst}) w esterach
1712	1710	1710	1710	1710	ν(-C=O _{vw}) w kwasach
1655	1653	1655	1654	1654	ν _{vw} (-C=C-, <i>cis</i> -)
1462	1462	1461	1462	1463	δ _{vw} (-C-H) w -CH ₂ i w grupach -CH ₃ , deformacyjne (nożycowe)
1417	1416	1418	1417	1418	ν _{vw} (-C-H, <i>cis</i> -) deformacyjne (wahadłowe)
1400	1401	1400	1400	1400	ν _{w, m, vw} (-C-H, -CH ₃) oraz deformacyjne
1377	1378	1377	1377	1377	
1350	1352	1353	1352	1351	
1320	1320	1320	1320	1320	δ _m (-C-H, -CH ₃)
1238	1237	1237	1236	1237	ν _m (-C-O) lub δ _m (-CH ₂ -)
1159	1160	1160	1161	1161	ν _{st} (-C-O) or δ _{st} (-CH ₂ -)
1119	1120	1120	1121	1120	ν _m (-C-O)
1096	1097	1097	1097	1096	ν _{m, vw} (-C-O)
1029	1030	1030	1030	1031	
966	968	966	964	966	δ _w (-HC=CH-, <i>trans</i> -)
914	913	914	912	912	deformacyjne poza płaszczyznę
868	868	868	868	866	δ _{vw} (-HC=CH-, <i>cis</i> -)
852	856	852	850	850	deformacyjne poza płaszczyznę
722	721	722	723	721	δ(-(CH ₂) _n - i -HC=CH- (<i>cis</i> -) deformacyjne (wahadłowe)

v – rozciągające, δ – deformacyjne, s – symetryczne, as – asymetryczne, st – silne, vst – bardzo silne, w – słabe

Tabela 21.

Położenie maksimów pasm absorpcyjnych w zakresie spektralnym od 4000 do 590 cm^{-1} wraz z przyporządkowaniem odpowiednich drgań dla oleju wytłoczonego z nasion rzepaku w roku uprawy 2017 poddanych aplikacji nanokolloidów srebra oraz miedzi

ATR-FTIR					Rodzaje i pochodzenie drgań
Położenie maksimum (cm ⁻¹)					
Kontrola	(O)NKAg	(O)NKC <u>u</u>	(N/O)NKAg	(N/O)NKC <u>u</u>	
3477	3472	3476	3479	3476	-C=O _w (overtone)
3063	3063	3065	3063	3064	and ν(=C-H _{vw} , <i>trans</i> -)
3007	3007	3008	3008	3008	ν(=C-H _m , <i>cis</i> -)
2952	2954	2952	2954	2955	ν _{as} (-C-H _{vst} , -CH _a)
2924	2922	2922	2922	2923	i
2853	2852	2853	2853	2853	ν _s (-C-H _{vst} , -CH _a) (alifatyczne grupy w triglicerydach)
2731	2730	2729	2731	2734	
2679	2680	2680	2680	2681	-C=O _{vw} (rezonans Fermiego)
1743	1743	1744	1743	1743	ν(-C=O _{vst}) w esterach
1712	1710	1710	1710	1710	ν(-C=O _{vw}) w kwasach
1655	1655	1654	1655	1654	ν _{vw} (-C=C-, <i>cis</i> -)
1462	1461	1460	1462	1463	δ _{vw} (-C-H) w -CH ₂ i w grupach -CH ₃ , deformacyjne (nożycowe)
1417	1416	1418	1417	1418	ν _{vw} (-C-H, <i>cis</i> -) deformacyjne (wahadłowe)
1400	1401	1400	1400	1400	ν _{w, m, vw} (-C-H, -CH ₃) oraz deformacyjne
1377	1375	1377	1377	1377	
1350	1352	1353	1352	1351	
1320	1320	1320	1320	1320	δ _m (-C-H, -CH ₃)
1238	1237	1237	1236	1237	ν _m (-C-O) lub δ _m (-CH ₂ -)
1159	1160	1160	1161	1161	ν _{st} (-C-O) or δ _{st} (-CH ₂ -)
1119	1120	1120	1121	1120	ν _m (-C-O)
1096	1097	1097	1097	1096	ν _{m, vw} (-C-O)
1029	1030	1030	1030	1031	
966	968	966	964	966	δ _w (-HC=CH-, <i>trans</i> -) deformacyjne poza płaszczyznę
914	913	914	912	912	
868	868	868	868	866	δ _{vw} (-HC=CH-, <i>cis</i> -) deformacyjne poza płaszczyznę
852	856	852	850	850	δ(-CH ₂) _n - i -HC=CH- (<i>cis</i> -)
722	721	722	723	721	deformacyjne (wahadłowe)

v – rozciągające, δ – deformacyjne, s – symetryczne, as – asymetryczne, st – silne, vst – bardzo silne, w – słabe

7. DYSKUSJA

W przedstawionej pracy podjęto próbę oceny między innymi przydatności nanokoloidów metali srebra oraz miedzi do uszlachetniania (zaprawiania) nasion rzepaku jarego. Proces kiełkowania nasion i analizy długości korzeni jest szybkim i powszechnie stosowanym testem fitotoksyczności dzięki czułości, prostocie, niskim kosztom i przydatności oceny zastosowanych substancji chemicznych (Abdel-Azeem i Elsayed, 2013).

Poddanie nasion rzepaku jarego aplikacji nanokoloidu srebra (N/N)NKAg skutkowało poprawą energii i zdolności kiełkowania nasion. Po aplikacji nanokoloidu miedzi (N/N)NKC u tylko dwa niższe stężenia (50 i $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) spowodowały poprawę energii oraz zdolności kiełkowania nasion rzepaku jarego. Przy stężeniu $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ odnotowano niewielkie osłabienie o $0,66\%$ zdolności kiełkowania nasion oraz o $1,03\%$ energii kiełkowania. Przyczyną ograniczenia energii i zdolności kiełkowania nasion mogło być zakłócenie równowagi enzymatycznej roślin na skutek wywołania stresu oksydacyjnego przy wysokim stężeniu nanokoloidu miedzi.

Doświadczenia wielu autorów dowodzą, że efekty przedsewnej stymulacji (zaprawiania) nasion nanocząstkami zależą od rodzaju rośliny, zastosowanych nanocząstek, ilości (stężenia), warunków eksperymentu (np.: temperatury) oraz czasu trwania doświadczenia (Coutris i in., 2012; Joshi in., 2012; Singha i Kumara, 2015; Taran i in., 2016). Otrzymane wyniki po aplikacji nanocząstek srebra i miedzi na nasiona w wielu publikacjach są sprzeczne. Badania wpływu nanocząstek metali (Au, Cu) na kiełkowanie nasion sałaty (Shah i Belozeroва, 2009) wskazują, że nanocząstki (Cu w wyższych stężeniach i kombinacji Au i Cu) miały pozytywny wpływ na kiełkowanie tych nasion, mierzony jako stosunek długości pędów do korzeni oraz ogólnego wzrostu siewki. Wyniki uzyskane w badaniach własnych są porównywalne z otrzymanymi przez Tomacheską i in. (2017), którzy po aplikacji nanocząstek srebra na nasiona owsa i rzodkiewki obserwowali również zwiększenie zdolności kiełkowania nasion. Natomiast wyniki badania zdolności kiełkowania nasion przeprowadzone przez Krishnaraja i in. (2012) wyraźnie ujawniły, że nanosrebro AgNC w różnych stężeniach ($0,01$; $0,1$; 10 ; $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) nie spowodowały polepszenia zdolności kiełkowania nasion kasztanowca (*Bacopa monnieri*). Natomiast Hruby i in. (2002) uznali, że aplikacja AgNC w stężeniu od 500 do $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ okazała się toksyczna dla nasion pomidorów. Badania przeprowadzone przez Singha i Kumara (2015) wykazały, że użyte nanocząstki srebra charakteryzowały się mniejszą toksycznością dla roślin niż ich jony Ag^+ .

W niniejszej pracy zastosowanie nanokoloidów srebra lub miedzi jako zaprawy do nasion, przyczyniło się do wzrostu długości pędów, jak i długości korzonków u siewek rzepaku jarego. W obu wariantach użytych nanokoloidów wzrost ten nastąpił przy każdym rozpatrywanym stężeniu. Po aplikacji nanokoloidu srebra w serii (N/N)NKAg największy i statystycznie istotny wzrost długości pędu i korzeni odnotowano po zastosowaniu stężeniu $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Podobną zależność obserwowano po aplikacji nanokoloidu miedzi w obiekcie (N/N)NKC, jednak przyrost ten nie był tak znaczący jak w przypadku aplikacji NKAg.

Zastosowanie nanocząstek srebra, jak i miedzi ma zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na wydłużenie korzeni w zależności od gatunków roślin (Gruyer i in., 2013).

Judy i in. (2015) oraz Mustafe i in. (2015), w przeprowadzonych analizach wykazali poprawę wzrostu masy w różnych rozpatrywanych gatunkach roślin. Aplikacja AgNC

wpłynęła korzystnie na wzrost soi uprawianej na terenach powodziowych (Mustafa i in., 2015). Uzyskane wyniki wykazały zwiększenie masy rośliny po aplikacji nanocząstek o rozmiarze 15 nm i stężeniu 2 ppm. W swoich badaniach Syu i in. (2014) wykazali, że aplikacja AgNC może spowodować tworzenia RFT, lecz to nie przeszkadza w dalszym wzroście hodowanych roślin. Aplikacja tych nanocząstek stymuluje wzrost masy korzeni oraz prowadzi do zwiększenia akumulacji białek związanych z cyklem komórkowym, biogenezą chloroplastu i metabolizmem węglowodanów. Według Almutairi i Alharbi (2015) aplikacja AgNC na nasiona arbuza i cukinii wpłynęła pozytywnie na długość ich korzeni. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzili, że znaczne wydłużenie korzeni u arbuza miało miejsce przy większym stężeniu AgNC wynoszącym $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (11,4 cm), a u cukinii po aplikacji dawki $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (14,48 cm). Natomiast doświadczenie Farghaly i Nafady (2015), polegające na moczeniu ziaren pszenicy w roztworze AgNC o stężeniu $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i pozostawieniu ich do wzrostu przez 35 dni (stadium wegetatywne) spowodowało zmniejszenie długości pędów i korzeni w porównaniu z obiektem kontrolnym. Salama (2012) poinformował, że aplikacja AgNC w stężeniu: 20, 40 i 60 ppm przyczyniła się do statystycznie istotnego wydłużenia pędów i korzeni badanych roślin (fasoli zwyczajnej i kukurydzy), ale stężenie 80 i 100 ppm spowodowało statystycznie istotne hamowanie ich długości. Doświadczenie przeprowadzone przez Pradhanę i in. (2015) udowodniło, że zastosowanie nanocząstek miedzi CuNC w różnych stężeniach (0,05; 0,1; 0,5; 1 oraz $2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) na nasiona fasoli spowodowało wzrost długości korzenia i pędów roślin.

Analiza aktywności enzymów antyoksydacyjnych wykazała u roślin rzepaku jarego poddanych działaniu nanocząstek metali (srebra i miedzi) powstanie zakłóceń równowagi pomiędzy utleniaczami a przeciwutleniaczami, powodując reakcje utlenienia, czyli stres oksydacyjny mający związek ze zwiększeniem zawartości białka rozpuszczalnego w 22 i 29 dniu wzrostu roślin po aplikacji NKAg oraz NKCu. Farghaly i Nafady (2015) stwierdzili, że aplikacja AgNC powodowała znaczną akumulację rozpuszczalnych białek w liściach pomidora oraz spowodowała nieistotne zahamowanie wzrostu liści pszenicy. Salama (2012) zaobserwował, że aplikacja AgNC w stężeniu: 20, 40 i 60 ppm powodowała zwiększenie zawartości białka w badanych roślinach uprawnych. Stwierdzili, że zwiększenie zawartości białka po aplikacji AgNC w pewnym stężeniu sugeruje optymalną dawkę wspomagającą wzrost roślin kukurydzy. Zmniejszenie zawartości białka poza tym stężeniem sugeruje toksyczny wpływ AgNC na rośliny. Według Rena i in. (2011), wzrost zawartości białka rozpuszczalnego w liściach jest silnie skorelowany z zawartością chlorofilu w liściach roślin. Wraz ze zwiększeniem zawartości chlorofilu następuje wzrost intensywności fotosyntezy roślin, co powoduje gromadzenie się rozpuszczalnego białka. Badania Ghanatiego i Bakhtiariana (2013) wykazały, że aplikacja nanocząstek srebra na rośliny powoduje uszkodzenie membran roślin oraz znaczny wzrost poziomu nadtlenkowania lipidów membranowych wraz ze wzrostem stężenia aplikowanych roztworów AgNC.

Aktywność SOD po aplikacji obu nanokolloidów uległa zmniejszeniu w 22 i 29 dniu wzrostu w wariancie (O)NKAg oraz tylko w 22 dniu wzrostu roślin w wariancie (O)NKC u. W 29 dniu wzrostu roślin nastąpiło wzmocnienie aktywności dysmutazy nadtlenkowej. Obniżenie aktywności SOD w tkankach fotosyntetyzujących roślin po aplikacji nanokolloidu srebra i miedzi we wczesnym etapie wzrostu rzepaku hamuje aktywność SOD. Jest to zjawisko bardzo niekorzystne, gdyż świadczy o mniejszej zdolności roślin do neutralizacji anionorodników ponadtlenkowych, które powodują wystąpienie stresu oksydacyjnego.

Bardziej podatne na stres stają się także chloroplasty, co przekłada się na zmianę syntezy węglowodanów, a więc i na wzrost roślin. Pradhan i in. (2015) w swoich badaniach nie stwierdzili znacznych różnic w aktywności enzymatycznej SOD w odniesieniu do obiektów kontrolnych po aplikacji CuNC.

Aktywność APX wzrosła w 22 i 29 dniu wzrostu roślin we wszystkich rozpatrywanych stężeniach w wariantcie (O)NKAg, natomiast w wariantcie (O)NKC u nastąpiło zwiększenie jej aktywności tylko w 22 dniu wzrostu roślin przy stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz w 29 dniu wzrostu we wszystkich trzech zastosowanych stężeniach. Można zatem przypuszczać, że aktywność APX w roślinach z obiektu kontrolnego w miarę wzrostu roślin nieznacznie maleje, co może być związane z rozwojem ich liści, natomiast u roślin poddanych stresowi powodowanemu przez metale srebra przyczynia się do silnej stymulacji enzymu. Aplikacja nanokoloidu miedzi w wyższych stężeniach we wczesnym stadium wzrostu roślin powoduje inhibicję APX, po czym w dalszej fazie rozwoju powoduje jej stymulację. Jest bardzo prawdopodobne, że enzym ten odgrywa ważną rolę we wczesnym stadium wzrostu zależne od czynnika stresującego roślinę. Natomiast gdy działanie stresora nie ustaje, ich udział w reakcji obronnej wzrasta.

Aktywność CAT zwiększyła się tylko w 22 dniu wzrostu roślin po aplikacji nanokoloidów w wariantach (O)NKAg i (O)NKC u w stężeniu 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Po czym w przypadku aplikacji NKAg w 29 dniu wzrostu roślin aktywność CAT zmalała do poziomu w obiekcie kontrolnym. Może to świadczyć o znacznym udziale CAT w obronie roślin przed nadmiarem H_2O_2 we wczesnym etapie odpowiedzi rzepaku na znaczne ilości srebra lub miedzi. Przyjmuje się, że jeśli działanie czynnika stresującego nie ustaje, mechanizm obronny determinowany przez CAT stopniowo załamuje się.

Aktywność GR w liściach rzepaku wzrosła w 29 dniu życia roślin po dolistnej aplikacji NKAg w stężeniu 100 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz w 22 dniu po aplikacji NKC u w stężeniu $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz w 29 dniu wzrostu roślin po aplikacji NKC u w stężeniu 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Reduktaza glutationowa jest enzymem uczestniczącym w reakcji redoks komórki i utrzymującym pulę zredukowanego glutationu w stosunku do jego utlenionej formy (GSH/GSSG) na bezpiecznym poziomie. Zakłócenia i stres wywołany aplikacją nanocząstek metali przez obniżenie aktywności GR może wpływać na stan redoks, przesuwając równowagę w stronę warunków bardziej utleniających. Zjawisko to z kolei wiąże się z zakłóceniem równowagi i wystąpieniem stresu oksydacyjnego. Aktywność GR wzrosła po zastosowaniu niektórych stężeń w 29 dniu życia roślin, co może wskazywać na rolę tego enzymu w utrzymaniu równowagi na późniejszym etapie i w zależności od aplikowanego metalu czy też stężenia nanokoloidu.

Aktywność GPX wzrosła w 22 dniu życia roślin po dolistnej aplikacji NKAg w stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz nieznacznie w 29 dniu wzrostu roślin rzepaku przy stężeniu 50 i $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Po aplikacji NKC u w stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ w 22 dniu obserwowano nieznaczne pobudzenie tej aktywności. GPX jest enzymem działającym w ścianie komórkowej i przestrzeniach apoplastu roślin (Asada, 1997). Silna jego aktywacja lub inhibicja w liściach może świadczyć o zwiększeniu ilości nadtlenu wodoru w apoplaście na skutek działania dużej dawki metali. Ze zwiększeniem aktywności GPX, nasileniu ulegają procesy lignifikacji w pędach (Gill i Tuteja, 2010), co mogłoby tłumaczyć zwiększenie się plonu świeżej i suchej masy roślin po aplikacji NKAg w stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$.

Rośliny rzepaku poddane opryskowi NKAg i NKC u wykazały niewielką aktywność peroksydacji lipidów (LPO), choć obserwowano statystycznie istotny wzrost w 22 dniu życia

roślin po zastosowaniu NKAg w stężeniu $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ i w 29 dniu wzrostu przy stężeniu 100 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Po aplikacji nalistnej NKCu w stężeniu 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ nieznaczny wzrost aktywności LPO obserwowano w 22 dniu wzrostu roślin oraz w 29 dniu, gdy stężenie wynosiło $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$.

Aktywność anty-ABTS wzrosła po nalistnej aplikacji NKAg w 22 dniu, gdy stężenie wynosiło 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. W wyniku zastosowania oprysku NKCu zwiększenie aktywności obserwowano w 22 dniu wzrostu roślin przy stężeniu $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz w 29 dniu życia roślin przy stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Obniżenie lub podwyższenie aktywności anty-ABTS w czasie trwania zakłóceń równowagi czy stresu może być bezpośrednio związane ze wzrastającą lub malejącą w tym samym czasie aktywnością GPX. To GPX usuwając nadmiar H_2O_2 przyczynia się do zmiany równowagi różnych elementów aparatu antyoksydacyjnego, gdyż może wykorzystywać jako substraty różne niskocząsteczkowe związki fenolowe, których obecność w komórce składa się na ogólną odpowiedź antyoksydacyjną i antyrodnikową (Gill i Tuteja, 2010).

Oprysk roślin NKAg przyczynił się do wzrostu masy roślin w 22 dniu ich wzrostu po jego aplikacji w stężeniu 50 oraz $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Plon suchej masy utrzymał się na równym poziomie z uzyskanym w obiekcie kontrolnym. W 29 dniu życia roślin aplikacja nanokolloidu w stężeniu 50 i $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ przyczyniła się do wzrostu ich masy. Oprysk NKCu przyczynił się do wzrostu plonu świeżej masy roślin w stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. Zawartość suchej masy zmieniła się analogicznie jak plon świeżej masy, czyli najwyższą jej wartość odnotowano po aplikacji na rośliny nanokolloidu miedzi w stężeniu $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$. W 29 dniu wegetacji nastąpiło zahamowanie wzrostu roślin po aplikacji nanokolloidów we wszystkich stężeniach.

W wielu badaniach wykazano fitotoksyczność nanocząstek (NC) spowodowaną wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT), które powodują zakłócenia, a w rezultacie stres oksydacyjny, reakcje nadtlenkowe lipidów, białka i uszkodzenia DNA w roślinach (Arruda i in., 2015; Ma i in., 2015). Ponieważ rośliny pobierają nanocząstki o różnych rozmiarach, przemieszczają je i gromadzą w różnych częściach rośliny, ich obecność w ekosystemie zwiększyła się (Monica i Cremonini, 2009).

Dostępne są liczne badania, które wykazują bezpośredni wpływ NC na enzymatyczne oddziaływanie związków antyoksydacyjnych (Mohammadi i in., 2014; Rico i in., 2015; Tripathi i in., 2016). W rzeczywistości badania te wskazują na nierównomierne i niekorzystne oddziaływanie nanocząstek na aktywność enzymatycznych mechanizmów obronnych. Badania przeprowadzone przez Taran i in. (2016), z wykorzystaniem między innymi nanokolloidów Ag i Cu o stężeniu 120 i $240 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wykazały, że namoczenie nasion przed wysiewem w nanokolloidach o stężeniu $120 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ przyczyniło się do zwiększenia o 12% zawartości TBARS/LPO w tkankach fotosyntetycznych roślin, zaś stężenie $240 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ spowodowało zmniejszenie TBARS/LPO o 19%. Aktywność CAT zmalała pod wpływem obu stężeń. Aktywność SOD wzrosła po aplikacji nanocząstek w stężeniu $120 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, a zmniejszyła się przy stężeniu $240 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Lei i in. (2008) wykazali, że nanocząstki tlenku tytanu ($\text{TiO}_2\text{-A-NC}$) poprawiły aktywność SOD, CAT, APX i GPX w szpinaku. Podobnie Song i in. (2012) donoszą o zwiększonej aktywności GPX, SOD i CAT w rzęsie drobnej (*Lemna minor*). W przeciwieństwie do tego, Foltete i in. (2011) wykazali, ograniczoną aktywność GR i APX w bobie (*Vicia faba* L). Dlatego trudno jest wykazać pozytywny lub negatywny wpływ NC na aktywność różnych enzymów.

Mechanizmy obronne roślin (APX i SOD), pomagają złagodzić stres oksydacyjny wywoływany przez aplikację niono tlenków miedzi CuONC. SOD i APX są kluczowymi enzymami zaangażowanymi w metabolizowanie reaktywnych form tlenu (RFT) (Caverzan i in., 2012). Obserwowany wzrost aktywności SOD i APX w przeprowadzonym doświadczeniu (Da Costa i Sharma, 2016) może w pewnym stopniu złagodzić efekt oksydacyjny. Doświadczenie przeprowadzone przez Shaw i Hossaina (2013) wykazało wzmożone działanie APX i glutationu (GR) w sadzonkach ryżu w wyniku aplikacji CuONC na nasiona. Inni autorzy wykazali, że zadane stężenie CuNC przyczynia się do zwiększenia ekspresji APX, SOD i innych enzymatycznych przeciwutleniaczy w roślinach (Inzé i van Montagu, 1995; Yoshimura i in., 2000). Doświadczenie przeprowadzone przez Da Costę i Sharmę (2016) wykazało również, że po aplikacji CuONC na nasionach ryżu następuje ekspresja genów enzymatycznych przeciwutleniaczy, takich jak peroksydazy askorbinianowej (APX) i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), która rośnie wraz ze wzrostem stężenia CuONC. Aktywność APX uwidoczniała trzykrotny wzrost ekspresji przy stężeniu $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Przy stężeniu CuONC $1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ poziom ekspresji genów APX był podobny do notowanego w obiekcie kontrolnym. Poziom ekspresji SOD wzrósł 1,5-krotnie przy stężeniu CuONC $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ i podwoił się przy stężeniu $100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ w porównaniu z obiektem kontrolnym. Aplikacja CuONC w stężeniu $1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ wykazała znacząco niższy poziom ekspresji SOD w porównaniu z obiektem kontrolnym.

Analiza eksperymentu przeprowadzonego przez Farghaly i Nafady (2015), uwzględniająca aplikację nanosrebra (AgNC) na rośliny pomidora, wykazała nieznaczne zwiększenie aktywności katalazy (CAT) w jego liściach, która odgrywa główną rolę w zapewnieniu ochrony przed uszkodzeniami utleniającymi w roślinach narażonych na działanie nanocząstek srebra. Trujillo-Reyes i in. (2014) stwierdzili, że w korzeniu sałaty wystawionej na działanie Cu/CuONC wzrasta aktywność katalazy (CAT), podczas gdy aktywność peroksydazy askorbinianowej (APX) zmniejszyła się, natomiast w liściach pszenicy odnotowano odwrotną tendencję, zmniejszenie aktywności CAT a zwiększenie APX. Krishnaraj i in. (2012) uważają, że CAT to jeden z enzymów należący do grupy zapewniających ochronę roślinom przed uszkodzeniem oksydacyjnym. W swoich badaniach Krishnaraj i in. (2012) stwierdzili, że duża aktywność CAT (około $160 \mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka) w liściach *Bacopa monnieri* L. poddanych opryskowi nanosrebrem wystąpiła do 10 dnia doświadczenia. Po upływie 10 dni, ekspansja AgNC w liściach rośliny na aktywność katalazy osłabła i w ostatnim 30 dniu doświadczenia jej wartość zmalała do około $60 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka.

Zawartości barwników w roślinach niniejszej pracy wykazała, że w liściach rzepaku pochodzących z uprawy hydroponicznej po aplikacji roztworów nanokoloidów (srebra i miedzi) w 22 dniu zawartość analizowanych barwników zmniejszyła się we wszystkich wariantach doświadczenia. Obserwowane obniżenie zawartości barwników poniżej stwierdzonej w obiekcie kontrolnym po nalistnej aplikacji NKA_g we wszystkich rozpatrywanych stężeniach. Ich zawartość malała wraz ze wzrostem stężenia zadawanego roztworu (np.: w przypadku chl *a* – $30,43 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ dla stężenia $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ do $24,98 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ dla stężenia $150 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$). W przypadku nalistnej aplikacji NKCu reakcja roślin była odwrotna – im wyższe stężenie aplikowanego roztworu, tym większa zawartość barwników (np.: w przypadku chl *a* – $13,27 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ dla stężenia $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$ do $21,96 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ dla stężenia

150 cm³·dm⁻³). Świadczy to o tym, że aplikacja nanocząstek na rośliny we wczesnym etapie wzrostu rzepaku hamowała produkcję chlorofilu i karotenoidów, lecz w trakcie dalszego wzrostu mechanizmy obronne rzepaku radzą sobie z zakłóceniami (stresem) wywołanymi ich aplikacją. Potwierdza to wysoka zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w liściach rzepaku jarego w 29 dniu wzrostu roślin (np.: w przypadku chl *a* – 25,47 µg·cm⁻³ dla stężenia 50 cm³·dm⁻³ do 36,02 µg·cm⁻³ dla stężenia 150 cm³·dm⁻³) po nalistnej aplikacji NKAg. Uzyskane wyniki miały podobny charakter, jak te, które uzyskali Pradhan i in. (2015). Przeprowadzone przez nich doświadczenie potwierdziło, że zawartość karotenoidów chroni układ fotosyntezy przed stresem abiotycznym. W roślinach poddanych oddziaływaniu CuNC stwierdzono, że zawartość karotenoidów zwiększyła się w odniesieniu do roślin z obiektu kontrolnego.

Karotenoidy, jak i chlorofile występują w tylakoidach stanowiących lipidowo-białkowe struktury wewnętrznej błony chloroplastów (Kączkowski, 1987). Barwniki te uczestniczą w transporcie energii świetlnej do centrów reakcyjnych procesów fotosyntezy. Karotenoidy chronią jednocześnie komórki i tkanki roślinne przed uszkodzeniami świetlnymi, zamieniając nadmiar energii świetlnej w ciepło (Shaw i Hossain, 2013). Karotenoidy są znane jako silne wygaszacze RFT, zwłaszcza tlenu singletowego (¹O₂) (Young, 1991). Badania przeprowadzone przez Shaw i Hossaina (2013) wykazały, że w znacznej ilości sadzonek ryżu (*Oryza sativa* L.), które poddano oddziaływaniu CuONC była uboższe o 1,2 razy w zawartość karotenoidów w liściach w odniesieniu do obiektu kontrolnego (Shaw i Hossain, 2013). Według Foyery i in. (1994), również chlorofil jest jednym z najważniejszych pigmentów, który umożliwia wychwytywanie kwantów światła i przekazywanie energii wzbudzenia do centrum reakcji foto-układu skąd wybijane są elektrony, spożytkowane następnie w dalszych etapach fotosyntezy. W istocie obniżenie zawartości chlorofilu wpływa na fotosyntezę i powoduje, że nadmiar elektronów łączy się z cząsteczkami tlen, tworząc szkodliwe RFT, które mogą nieodwracalnie uszkodzić strukturę chloroplastów w roślinie (Foyer i in., 1994). Według Salamy (2012), aplikacja nanocząstek srebra na nasiona fasoli i kukurydzy w stężeniu 60 ppm powodowała znaczny wzrost zawartości chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w porównaniu z obiektem kontrolnym. Zawartość analizowanych barwników zmniejszyła się w obu gatunkach roślin przy wyższym stężeniu nanopreparatu. Według Taran i in. (2016), aplikacja nanokoloidów srebra i miedzi na rośliny w stężeniu 120 mg·dm⁻³ spowodowała wzrost zawartości chl *a*, chl *b* oraz karotenoidów. Farghaly i Nafady (2015) uważają, że zabiegi polegające na aplikacji AgNC, powodowały znaczną stymulację zawartości barwników (chl *b* oraz karotenoidów) w pomidorach, z wyjątkiem chl *a*, w przypadku którego obserwowano nieistotny wzrost. Zawartość barwników w pszenicy nie uległa znacznej zmianie po aplikacji AgNC w stosunku do obiektu kontrolnego. To jest zgodne z doświadczeniem Pandeya i in. (2014), którzy zauważyli, że zawartość chlorofilu zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia AgNC. Zauważyli również, że AgNC mogą znacząco promować fotosyntezę, a ich obecność jest ściśle związana ze zmianą metabolizmu azotu.

Według Pradhany i in. (2015), rośliny poddane aplikacji CuNC nawet w dawce 1 mg·dm⁻³ reagują pozytywnie, wytwarzając większą ilość chlorofilu. Jest to wynik pozytywny, bo świadczy o tym, że CuNC mają istotny wpływ na fotosyntezę, ponieważ chl *a* jest kluczowym elementem zależnym od świetlnego szlaku fotosyntetycznego (Pradhan i in., 2015). Po aplikacji CuNC zauważono zmiany w strukturze chloroplastu i kompozycji

membranowej thylakoidu w liściach szpinaku, ryżu, pszenicy i fasoli w warunkach wzrostu roślin (Fernandes i Henriques, 1991).

Analiza zawartości pierwiastków w suchej masie roślin wykazała, że w roślinach poddanych nalistnej aplikacji NKA_g nastąpiło podwyższenie zawartości srebra, zarówno w 22, jak i 29 dniu życia roślin. Na skutek jego oddziaływania obserwowano zwiększenie przyswajalności miedzi (Cu) przez rośliny rzepaku jarego, zwiększające się proporcjonalnie do dawki nanokoloidu srebra. Po aplikacji nalistnej nanokoloidu miedzi [(O)NKC_u] rośliny reagowały obniżonym przyswajaniem miedzi zależne od zadanego stężenia NC w 22 dniu wzrostu roślin, w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Wzrost zawartości miedzi w 29 dniu życia rzepaku jarego, proporcjonalnie do aplikowanego stężenia. Zarówno po aplikacji NKA_g, jak i NKC_u w formie oprysku w większości przypadków zawartość pierwiastków w liściach rzepaku (np. Ca, K, Mg, S) obniżyła się.

Ostatnio wiele badań wykazało działanie świadczące o toksycznym wpływie CuNC na przyswajanie składników odżywczych. Na przykład aplikacja CuNC (100-500 mg·kg⁻¹ przez 7 dni) spowodowała zmniejszenie się zawartość Fe, Ca i Mg w liściach roślin fasoli (Dimkpa i in., 2015). Podobnie aplikacja CuNC (20 mg·dm⁻³ przez 15 dni) obniżyła stężenie P, Ca i Mg w sałacie (Trujillo-Reyes i in., 2014), a u sałaty oraz lucerny CuNC zmniejszały zawartość P i Fe w pędach i korzeniach tych roślin (Hong i in., 2015). Wpływ Cu na pobieranie składników mineralnych przez rośliny i ich kumulacja zależy od gatunku rośliny, stężenia Cu w strefie korzeniowej, czasu trwania ekspozycji, dawki i warunków wzrostu roślin (Adrees i in., 2015).

Analiza aktywność enzymatycznej gleby w niniejszej pracy skupiono się na aktywności enzymatycznej dehydrogenaz po zastosowaniu nanokoloidu srebra i wykazała bardzo silną reakcję. Aplikacja NKA_g na nasiona oraz ich wysianie w glebie, a w późniejszym terminie dodatkowo przeprowadzenie oprysku roślin, powodowało statystycznie istotne obniżenia aktywności dehydrogenaz. Statystycznie istotne osłabienie aktywności dehydrogenaz obserwowano również po wysiewie nasion namoczonych w NKC_u o stężeniu 50 cm³·dm⁻³. Przeprowadzony dodatkowo oprysk na rośliny (N/O)NKC_u zwiększył zawartość nanocząstek w glebie jednocześnie obniżając ich aktywność enzymatyczną statystycznie istotnie przy stężeniu 100 i 150 cm³·dm⁻³. AgNC i CuNC hamują aktywności dehydrogenazy w glebie, powodując obniżenie ich aktywności w przypadku cząstek Cu nawet pięćdziesięciokrotnie, a cząstek Ag aż stukrotnie (Murata i in., 2005).

Aktywność enzymatyczna jest wysoce czułym wskaźnikiem enzymatycznym gleby, a może mieć na nią wpływ wiele czynników (Aon i Colaneri, 2001; Dinesh i in., 2012; Burns i in., 2013; Huang i in., 2005). Dehydrogenazy jako jedne z licznych enzymów są bardzo wrażliwe na obecność zanieczyszczeń, dlatego też są ważnym wskaźnikiem zanieczyszczeń gleby metalami ciężkimi oraz pestycydami (Rogers i Li, 1985; Brookes, 1995; Dick, 1997; Pascual i in., 2000; Aon i Colaneri, 2001). Do tej pory jednak odnotowano stosunkowo niewiele badań dotyczących skutków zastosowania NC na aktywności dehydrogenaz, a te dostępne są sprzeczne. Najwięcej przeprowadzonych dotychczas badań dotyczy aktywności enzymatycznej obejmującej zastosowania ZnONC, CuONC oraz NiNC (Du i in., 2011; Kim i in., 2000; 2011; 2013; Joško i in., 2014; Heinlaan i in., 2008). Badania przeprowadzone przez Kima i in. (2013), obejmujące porównanie wrażliwości różnych enzymów na NC, wykazały, że dehydrogenazy były bardziej wrażliwe na CuONC niż na

ZnONC. Analizy wykonane przez Joškę i in. (2014), w których wykorzystano ZnONC, $\text{Cr}_2\text{O}_3\text{NC}$, CuONC oraz NiNC (w dawkach 10, 100 i 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ gleby), wykazały pozytywny wpływ na aktywność dehydrogenaz w glebie. Różnice między otrzymanymi wynikami mogą wynikać z użycia innej gleby do badań [gleby bielcowej -SL1(Haplic Podzol) oraz gleby płowej -SL2 (Haplic Luvisol)] oraz zawartości składników przyswajalnych: K odpowiednio (1,5 oraz 2,6 $\text{mg K}_2\text{O}\cdot\text{kg}^{-1}$), Mg (0,3 oraz 1,1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) oraz P (0,7 oraz 5,5 $\text{mg P}_2\text{O}_5\cdot\text{kg}^{-1}$), jak i stężenia samych nanocząstek.

Analiza fizyczna i chemiczna nasion rzepaku w niniejszych badaniach obejmowała m. in. masę 1000 nasion (MTN) rzepaku jarego, która była zróżnicowana i wahała się w 2016 roku od 2,65 g [obiekt (O)NKC_u] do 3,08 g (obiekt kontrolny), a w 2017 roku od 3,31 g [obiekt (N/O)NKAg] do 4,13 g (obiekt kontrolny). Otrzymana masa była niższa od masy prezentowanej przez innych badaczy oraz Grupę IHAR-Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Duży wpływ na masę 1000 nasion zwłaszcza w obiekcie kontrolnym w tym doświadczeniu należy wiązać nie tylko z aplikacją nanokoloidów metali lub jej brakiem, ale również z panującymi warunkami pogodowymi. Różne warunki agrometeorologiczne panujące w latach 2016 i 2017 spowodowały zróżnicowanie MTN a otrzymane wyniki mogą śmiało zostać im przypisane.

Według Grupy IHAR i opisu dostarczonych nasion (na opakowaniu), masa 1000 nasion dla odmiany 'Markus' zarówno w roku 2016, jak i w 2017 wynosiła 5,0 g. Wyniki otrzymane przez Murawę i Warmińskiego (2004), dotyczyły innych odmian rzepaku jarego ('Star' i 'Margo'), a autorzy w swoich badaniach zastosowali zróżnicowane środki ochronne. Według nich masa tysiąca nasion (MTN) badanych odmian rzepaku jarego nie ulegała zmianom w poszczególnych latach badań, a wahała się w przedziale od 4,05 g (po zastosowaniu desykacji i zwalczania szkodników) do 4,53 g (po zastosowaniu Butisanu+Ronilanu) w zależności od zastosowanej kombinacji środków (Murawa i Warmiński, 2004). Na przydatność nasion rzepaku do przetwórstwa spożywczego wpływają cechy fizyczne, a spośród nich ważne miejsce zajmuje wielkość nasion (Rotkiewicz i in., 2002), która jak podają Fornal i in. (1991), w znacznym stopniu zależy od czynników genetycznych. Wielkość nasion jest ważną cechą w przetwórstwie, ponieważ małe wymiary nasion są przyczyną zwiększonej ogólnej zawartości fosforu w oleju oraz jego form niehydratowalnych, szczególnie trudnych do usunięcia.

Zasadniczymi kryteriami w ocenie jakości nasion rzepaku jarego przeznaczonych do produkcji olejów spożywczych są między innymi: zawartość tłuszczu, skład kwasów tłuszczowych oraz zawartość białka, które zależą w różnym stopniu od czynników agrotechnicznych, klimatycznych oraz od odmiany (Przeździecki i Murawa, 1988). Plony tłuszczu i białka, będące funkcją zawartości tych składników w nasionach i plonie nasion, w dużym stopniu zależą od przebiegu pogody, a zwłaszcza ilości opadów (Muśnicki, 2003; Bobrzeczka i Salamonik, 1997). Zawartość tłuszczu w nasionach rzepaku jarego ma znaczenie technologiczne i ekonomiczne, zaś skład chemiczny otrzymanego oleju jest czynnikiem wpływającym na jego stabilność oraz wartość odżywczą i zdrowotną (Ziemiański i Budryńska-Topolowska, 1991). Zawartość tłuszczu w nasionach rzepaku jarego odmiany 'Markus' w badaniach własnych wahała się w 2016 roku od 39,45% [obiekt (O)NKAg] do 40,40% s.m. [obiekt (N/O)NKC_u], zaś w 2017 roku od 42,53% [obiekt (N/O)NKC_u] do 45,80% s.m. [obiekt (O)NKAg]. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Murawę i in. (2000), polegającym na zastosowaniu różnych herbicydów w ochronie rzepaku jarego, przeciętna

zawartość tłuszczu w nasionach kształtowała się w zależności od odmiany na poziomie 47,9% s.m. ('Star') do 50,0% s.m. ('Lisonne'). Zawartość białka w nasionach w 2017 roku była porównywalna z zawartością podaną przez COBORU, (2016) dla odmiany 'Markus' (44,7% s.m.).

Suma kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku w niniejszej pracy charakteryzowała się ich wysoką zawartością zarówno w 2016, jak i 2017 roku sumą kwasów. Ich udział wahał się w zależności od wariantu doświadczenia [(O)NKAg, (N/O)NKAg czy (O)NKCu, (N/O)NKCu] i wynosił odpowiednio w roku 2016 i 2017: SFA od 8,12% do 8,94% oraz od 8,51% do 8,85% sumy kwasów, PUFA od 29,53% do 30,90% oraz od 28,85% do 30,95% sumy kwasów, MUFA od 60,03% do 61,73% oraz 60,22% do 62,24% sumy kwasów, Omega 3 - od 8,23% do 8,52% oraz od 8,05% do 8,50% sumy kwasów, Omega 6 - 21,02% do 22,67% oraz od 20,74% do 22,64% sumy kwasów oraz Omega 9 - od 59,48% do 61,22% oraz od 59,69% do 61,70% sumy kwasów. Suma ta różni się zawartością pomiędzy poszczególnymi grupami kwasów występujących w rzepaku jarym oraz w rzepaku ozimym (Kachel-Jakubowska i Sujak, 2016; Tys i in., 2006), jednak ich ilość jest porównywalna z tą przedstawianą w Codex (1999) i zależy od wybranej odmiany.

Przechowywanie nasion. Wśród metabolitów pierwszorzędnych w nasionach rzepaku na szczególną uwagę zasługuje ergosterol (ERG). Analiza zawartości ergosterolu wskazuje na stopień zanieczyszczenia nasion masą zarówno żywej, jak i martwej mikroflory. Otrzymane wyniki porównano z aktualnymi danymi, biorąc pod uwagę fakt, że nie ma do tej pory uregulowań prawnych dotyczących tej kwestii (Stuper i in., 2010). Pierwotnie jako bezpieczną liczbę mikoflory w zdrowym ziarnie czy nasionach przyjęto stężenie ERG wynoszące $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Maupetit i in., 1993). Według Schnürera i Johnsona (1992) stężenie tego metabolitu dla nasion zbóż powinno wahać się w zakresie od 1 do $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ stanowiąc jednocześnie wartość bezpieczną i graniczną dla ziarna konsumpcyjnego.

Oznaczone stężenia ERG w nasionach ze wszystkich badanych wariantów stosowania obydwóch nanokoloidów (srebra i miedzi) nie przekroczyła wskazanej w literaturze wartości granicznej. Występowały istotne różnice w zawartości ergosterolu w nasionach poszczególnych wariantów doświadczenia. Najwyższy poziom ergosterolu w nasionach rzepaku jarego zebranych w 2016 roku stwierdzono w 35 dniu doświadczenia, który wynosił $0,96 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ w nasionach zebranych z roślin opryskanych nanokoloidem miedzi (O)NKCu, gdy wilgotność przechowywanych nasion wynosiła 6%. Najwyższym poziomem ERG w 2017 roku charakteryzowały się nasiona rzepaku z obiektu kontrolnego przy wilgotności 6%. Średnia zawartość ERG dla tego obiektu wynosiła $0,39 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Obserwowana średnia zawartość tego metabolitu była znacznie niższa niż w badaniach laboratoryjnych przeprowadzonych przez Gancarza i in. (2017). Przeprowadzone przez nich doświadczenie dotyczące przechowywania nasion rzepaku wykazało najwyższe średnie stężenie ERG w 30 i 31 dniu w granicy około $30 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ i $34 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Tak więc aplikacja nanokoloidów, zarówno jako środka zaprawiającego, jak i nanonawozu podawanego roślinom nalistnie zapewnia ograniczenie rozwoju grzybów mikroskopowych, będących przyczyną strat gospodarczych na całym świecie (Tekauz, 2002).

Analiza parametrów jakościowych oleju tłoczonego na zimno. Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe występują we wszystkich olejach roślinnych, w ilościach zależnych od gatunku i dojrzałości surowców oraz od technologii wydobywania i rafinacji oleju (Rot-

kiewicz i in., 2002). Według Ciecierskiej i Obiedzińskiego (2006), oleje tłoczone na zimno, bez udziału chemicznych procesów rafinacji, mogą być wartościowymi olejami jadalnymi pod warunkiem, że nie zawierają niebezpiecznych dla człowieka zanieczyszczeń chemicznych i mikrobiologicznych w tym mikotoksyn oraz przyspieszających procesy utleniania oleju metali (żelaza, miedzi) i barwników chlorofilowych, które są zwykle usuwane w procesie chemicznej rafinacji olejów. Według licznych autorów, zbyt duża zawartość chlorofilu wpływa ujemnie na jakość (zapach) oraz stabilność oksydacyjną oleju (Krygier i in., 1996; 2000), działa bowiem prooksydacyjnie i powoduje przyciemnienie jego barwy (Kozłowska i in., 1988). Na barwę oleju wpływa również ujemnie ilość nasion uszkodzonych (Krygier i in., 2000). Oprócz barwników chlorofilowych w nasionach rzepaku występują i to w znacznej ilości, barwniki z grupy karotenoidów. Obecność karotenoidów w oleju jest ważna z powodu ich działania przeciwutleniającego i prowitaminowego (Sionek, 1997; Sujak i in., 2000).

Analiza otrzymanych wyników zawartości barwników (chl *a*, chl *b* oraz karotenoidów) w oleju tłoczonym na zimno z nasion zebranych w uprawie polowej zarówno w 2016 roku, jak i w 2017, wykazała w większości przypadków statystycznie istotnie wyższą ich zawartości w porównaniu z olejem z obiektu kontrolnego. Zawartość tych barwników w odniesieniu do olei wytłoczonych z nasion zebranych z tradycyjnej uprawy (z zastosowaniem tradycyjnych środków ochrony) była znacznie wyższa. W olejach wytłoczonych metodą na zimno, np.: z nasion rzepaku ozimego otrzymanych z tradycyjnej uprawy, zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów była znacznie niższa i wynosiła $1,23 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chl *a*), $2,02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chl *b*) oraz $8,41 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (karotenoidów) (Kachel-Jakubowska i Sujak, 2016).

W 2016 roku wyjątek w zawartości karotenoidów stanowiły oleje wytłoczone z nasion, które otrzymano z roślin rzepaku jarego poddanych opryskowi nanokoloidem miedzi (O)NKCu ($70,08 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) oraz po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu srebra (N/O)NKAg ($70,49 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Zmiany te były jednak niewielkie w odniesieniu do obiektu kontrolnego ($70,74 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) i nieistotne statystycznie.

W 2017 roku wyjątek stanowiły oleje wytłoczone z nasion rośliny, które poddano aplikacji nanokoloidów (O)NKAg ($75,58 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) oraz (O)NKCu ($72,74 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$). Zawartość karotenoidów była w nich statystycznie istotnie niższa niż w oleju wytłoczonym z obiektu kontrolnego ($80,54 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

Stabilność oksydacyjna jest bardzo ważnym wskaźnikiem jakości olejów, szczególnie olejów tłoczonych na zimno, które zawierają naturalne przeciwutleniacze (m.in. karotenoidy), a jednocześnie substancje niepożądane działające proutleniająco (m.in.: chlorofile i metale) usuwane w procesie rafinacji (Koski i in., 2002; Sionek, 1997). Oleje tłoczone na zimno charakteryzują się ciemniejszą barwą w porównaniu z olejami rafinowanymi (Wroniak i in., 2006). Analizy przeprowadzone przez Wroniak i in. (2006) wykazały, że szybkość utleniania tłuszczów była uwarunkowana w dużej mierze składem kwasów tłuszczowych. Test Rancimat wykazał, że olej rzepakowy tłoczony na zimno charakteryzował się czasem indukcji w zakresie od 4,05 do 4,5 h (Wroniak i in., 2006; Kachel-Jakubowska i Sujak, 2016).

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że oleje wytłoczone z nasion rzepaku jarego z obiektów, w których zastosowano nanokoloidy charakteryzowały się większą stabilnością oksydacyjną niż olej z obiektu kontrolnego (4,62 h). Aplikacja nanokoloidów na nasiona, a następnie na rośliny w czasie ich wzrostu przyczyniła się do zwiększenia stabilności oksydacyjnej oleju tłoczonego na zimno w obu latach badań. Największą stabilnością

charakteryzował się olej z nasion z uprawy po dwukrotnej aplikacji nanokoloidu miedzi w 2016 roku (N/O)NKC_u wynoszącą 5,70 h, a w 2017 roku – 5,60 h.

Czynnikami wpływającymi negatywnie na trwałość oleju mogą być, poza wysoką zawartością chlorofilu, obecność wolnych kwasów tłuszczowych określona liczbą kwasową (LK) oraz obecność nadtlenków, która traktowana jest jako wskaźnik stopnia utlenienia (zjełczenia) tłuszczu, określana liczbą nadtlenkową (LN). Są to wartości wskazujące na rozpoczęte procesy hydrolizy triglicerydów oraz utleniania zarówno w nasionach, jak i w oleju. W wytłoczonych w doświadczeniu olejach wartość tych liczb była wyższa niż w obiekcie kontrolnym, ale nie przekraczała wymaganych dopuszczalnych wartości (Codex, 1999). Najwyższą wartością LK charakteryzował się olej pozyskany z nasion roślin dwukrotnie poddanych działaniu nanokoloidu srebra [(N/O)NKAg] 2,79 mg KOH·g⁻¹ w 2016 roku oraz 2,64 mg KOH·g⁻¹ w 2017 roku. Najwyższą wartości LN obserwowano w olejach z nasion roślin, które poddano aplikacji nanokoloidem srebra [(O)NKAg] 4,72 mmol O·kg⁻¹ oraz nanokoloidem miedzi [(O)NKC_u] 5,10 mmol O·kg⁻¹ w 2017 roku. Otrzymane wartości były wyższe niż te, który otrzymano w innych badaniach dla oleju tłoczonego na zimno (Cichosz i Czeczot, 2011; Wroniak i in., 2013; Maniak i in., 2012; Kachel-Jakubowska i Sujak, 2016).

Na uwagę zasługuje to, że wszystkie widma w podczerwieni (ATR-FTIR) dla obiektów olei, zarówno wytłoczonych z nasion zebranych w 2016 roku, jaki w 2017 roku, mają bardzo intensywne i wyraźne pasma, które można przypisać konkretnym drganiom odpowiednich grup funkcyjnych, zarówno składników typowych dla żywności, jak również potencjalnych materiałów charakterystycznych dla produkcji biodiesla. Większość zarówno jadalnych tłuszczów roślinnych, jak i potencjalnych materiałów oleistych to substancje, które składają się zasadniczo z różnych frakcji grup triglicerydów, których główną różnicę stanowi stopień i forma nienasycenia w nich grup acylowych zawartych, jak również długości ich łańcuchów (Guillén i Cabo, 1997a; b). W wielu pracach autorzy dokonali odpowiednich dopasowań konkretnym pasmom w widmach tłuszczu zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego konkretnych drgań w cząsteczkach lub ich ugrupowaniach, wiele pasm jest trudnych do odpowiedniego przypisania konkretnej grupie funkcyjnej (Ismail i in., 1993; Lai i in., 1994; Dupuy i in., 1996; Guillén i Cabo, 1997b; 2003; Mehrotra, 2000; Tay i in., 2002; Yang i in., 2005; Vlachos i in., 2006; Lerma-García i in., 2010; Rohman i in., 2009; Rohman i Che Man, 2010).

8. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń oraz otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski:

1. Analiza morfologii potwierdziła zawartość nanocząstek srebra oraz miedzi w zakupionych nanokolloidach. Otrzymane wyniki umożliwiły wykorzystanie ich w zaplanowanym doświadczeniu.
2. Namoczenie nasion w nanokolloidach srebra lub miedzi w większości przypadków przyczyniło się do poprawy ich energii oraz zdolności kiełkowania.
3. Badania, przeprowadzone w hodowli hydroponicznej rzepaku jarego w 22 i 29 dniu życia roślin, czyli w 1 i 7 dniu po aplikacji nanokolloidów miedzi i srebra wykazały, że rodzaj, dawka i czas oddziaływania nanokolloidów na rośliny miały wpływ na wielkość plonu świeżej masy oraz powstawanie zakłóceń w relacjach między związkami utleniającymi a przeciwutleniającymi, w kierunku reakcji utlenienia i tworzenia reaktywnych form tlenu (RFT – stres oksydacyjny). Najwyższą aktywność świadczącą o uruchomieniu mechanizmów obronnych obserwowano w przypadku stymulacji enzymu CAT oraz APX czy LPO po zadaniu wyższych stężeń nanokolloidów w obiekcie (O)NKAg na rośliny w 22 dniu oraz APX i LPO w 29 dniu ich wzrostu. Po aplikacji nanokolloidu miedzi w obiekcie (O)NKC*u*, obserwowano znaczące zakłócenia jedynie w aktywności SOD w 29 dniu wzrostu roślin. Podwyższenie aktywności oraz obecność tego enzymu w chloroplastach, mogła spowodować znaczące obniżenie zawartości barwników w liściach rzepaku. Po aplikacji nanokolloidów w obiektach (O)NKAg i (O)NKC*u* na rośliny w 22 dniu wzrostu, nastąpiło obniżenie zawartości chlorofili *a* i *b* oraz karotenoidów w liściach rzepaku jarego. Ich zawartość była ściśle związana ze stężeniem aplikowanego nanokolloidu i malała wraz z jego zwiększeniem. W 29 dniu wzrostu roślin zawartość barwników wzrosła powyżej poziomu obiektu kontrolnego we wszystkich wariantach proporcjonalnie do stężenia aplikowanego nanokolloidu. Na tej podstawie można stwierdzić, że w pierwszym dniu po aplikacji nanokolloidów na rośliny mechanizm nieenzymatyczny odporności rzepaku malał proporcjonalnie do zwiększającej się dawki. W 7 dniu po aplikacji nanokolloidów (w 29 dniu wzrostu) roślina zdołała pobudzić mechanizmy obronne (zwalczając RFT), co odpowiada większej zawartości chlorofilu oraz karotenoidów w badanych liściach rzepaku.
4. Wykonany oprysk nanokolloidem srebra lub miedzi spowodował w większości przypadków obniżenie zawartości pierwiastków między innymi: Ca, K, Mg i S w 22 oraz w 29 dniu wzrostu roślin. W liściach rzepaku zawartość Na po oprysku (O)NKAg w 22 dniu życia roślin była wyższa i rosła wraz ze zwiększającą się dawką aplikowanych nanocząstek. Podobną sytuację odnotowano również dla zawartości Na po aplikacji (O)NKC*u* w 29 dniu wzrostu roślin.
5. Aktywność enzymatyczna dehydrogenaz w glebie statystycznie istotnie zmalała po wysianiu w niej nasion namoczonych w NKAg. Stężenie 100 i 150 cm³·dm⁻³ NKCu przyczyniło się do zachowania aktywności DHA na poziomie równym obiektowi kontrolnemu. Aplikacja nanokolloidów srebra oraz miedzi na nasiona i w późniejszym terminie na rośliny spowodowała obniżenie aktywności DHA.

6. Badania poszczególnych parametrów jakościowych nasion zebranych z uprawy polowej wykazały, że aplikacja nanokoloidów w nielicznych przypadkach statystycznie istotnie różnicowała ich wartości.
 - a. Po aplikacji nanokoloidów w 2016 roku nie wystąpiło statystycznie istotne różnicowanie zawartości tłuszczu w nasionach. Nasiona zebrane w 2017 roku charakteryzowały się statystycznie istotnie wyższą zawartością tłuszczu niż zebrane w roku poprzednim, co czyniło je cenniejszym surowcem dla przemysłu tłuszczowego. Różnice te okazały się widoczne w zawartości tłuszczu w nasionach otrzymanych z roślin po aplikacji nanokoloidu srebra w oprysku (O)NKAg. Namoczenie nasion i przeprowadzenie oprysku roślin nanokoloidami (N/O)NKAg oraz (N/O)NKC_u spowodowało istotne obniżenie zawartości tłuszczu w porównaniu z nasionami z obiektu kontrolnego.
 - b. Nasiona zebrane w roku 2016 charakteryzowały się wysoką zawartością białka, a we wszystkich wariantach zastosowania nanokoloidów, jego zawartość była istotnie wyższa niż w obiekcie kontrolnym. Nasiona pochodzące z uprawy po zastosowaniu oprysku nanokoloidami w obiektach (O)NKAg i (O)NKC_u w 2017 roku charakteryzowały się porównywalną zawartością białka z obiektem kontrolnym. Statystycznie istotnie wyższą zawartość białka obserwowano w nasionach pochodzących z uprawy o podwójnej aplikacji preparatu w obiektach (N/O)NKAg i (N/O)NKC_u.
 - c. Warunki pogodowe panujące w czasie kiełkowania nasion i wzrostu roślin rzepaku w obydwóch latach różniły się. Faktem jest, że w początkowym okresie wzrostu roślin, warunki te nie były korzystne dla prawidłowego ich rozwoju. Jednak w obydwóch latach zbioru obserwowano obniżenie MTN po aplikacji nanokoloidów we wszystkich wariantach doświadczenia w odniesieniu do obiektu kontrolnego.
 - d. Badanie zawartości kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku wykazało, że niezależnie od roku zbioru, suma kwasów nasyconych SFA, monoenurowych kwasów tłuszczowych MUFA, polienowych kwasów tłuszczowych PUFA, Omega 3, Omega 6 oraz Omega 9 była wysoka. Jednak nie stwierdzono wyraźnego wpływu aplikacji nanokoloidów na ich zawartość.
 - e. Aplikacja nanokoloidów zarówno na nasiona, jak i na rośliny spowodowała w większości przypadków podwyższenie przyswajalności pierwiastków przez rośliny, przyczyniając się do zwiększenia ich zawartości w zebranych nasionach.
 - f. Występowały istotne różnice w średniej zawartości ergosterolu w nasionach z poszczególnych wariantów doświadczenia. W większości przypadków zawartość tego metabolitu była niższa niż w obiekcie kontrolnym w obydwóch latach doświadczenia. Średnie stężenie ERG dla wszystkich badanych obiektów poddanych oddziaływaniu obydwóch nanokoloidów srebra i miedzi nie przekroczyło wskazanej w literaturze wartości granicznej.
7. Analiza parametrów jakościowych oleju tłoczonego na zimno z nasion zebranych z uprawy polowej wykazała, że:
 - a. Zawartość barwników w oleju z obu lat zbioru była bardzo wysoka. Ilość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w oleju w większości przypadków, niezależnie od roku zbioru oraz sposobu i stężenia aplikowanych nanokoloidów, okazała się statystycznie istotnie wyższa w porównaniu z ich zawartością w obiektach kontrolnych.
 - b. Najwyższą stabilnością oksydacyjną charakteryzowały się oleje tłoczone z nasion zebranych w obu latach zbioru surowca z obiektu z zastosowaniem namoczenia nasion oraz

- z opryskiem roślin (N/O)NK. Najgorszymi parametrami stabilności oksydacyjnej charakteryzowały się oleje z obiektu kontrolnego zarówno pod kątem czasu indukcji, jak i czasu normalnego.
8. Postawione w pracy hipotezy zostały zweryfikowane, a otrzymane wyniki badań potwierdzają je w większości przypadków w całości lub częściowo w zależności od analizowanego parametru lub też zaprzeczając ich słuszości.
 9. Stosowanie nanokoloidów metali srebra i miedzi w uprawie roślin na przykładzie rzepaku jarego wpływa zarówno na przebieg procesów zachodzących w środowisku naturalnym (glebie), jak i na zachowanie nasion i roślin w czasie ich wzrostu oraz końcową jakość otrzymanych nasion podczas przechowywania i stabilność oksydacyjną tłoczonego oleju. Stężenia zastosowane w niniejszych doświadczeniach wpłynęły niekorzystnie na aktywność dehydrogenaz w glebie ale zastosowanie mniejszego stężenia może przyczynić się do podwyższenia aktywności DHA. Widoczne korzyści jakie można uzyskać pod kątem jakości końcowej otrzymanych surowców (nasion) i produktów (oleju) są zachęcające do ich propagowania w uprawie polowej.

9. LITERATURA

- Abdel-Azeem, E. A., Elsayed, B. A. (2013). Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba* seedlings. *New York Science Journal*, 6(12), 148–156.
- Adrees, M., Rizwan S. A. M., Ibrahim, M., Abbas F., Farid, Zia-ur-Rehman, M., Irshad, M. K., Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science Pollution Research*, 22, 8148–8162.
- Adriano, D. C. (2001). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals, 2nd edn. *Springer*, New York
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymology*, 105, 121–126.
- Agnelli, A., Ascher, J., Corti, G., Ceccherini, M. T., Nannipieri, P., Pietramellara, G. (2004). Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration and DGGE of total and extracellular DNA. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 859–868.
- Alef, K. (1995). Dehydrogenase activity. In: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, (K. Alef, P. Nannipieri red.). *Academic Press*, London, 228–231.
- Ali, A. A., Alqurainy, F. (2006). Activities of antioxidants in plants under environmental stress. W: The lutein-prevention and treatment for age-related diseases. M. Motohashi (red.), *Transworld Research Network*, India, 187–256.
- Ali, Z., Ashraf M., Al-Qurainy F., Khan M. S., Akram N. A. (2015a). Appraising drought tolerance in local accessions of sesbania [*Sesbania sesban* (L.) Merrill.] using biomass production, relative membrane permeability and photosynthetic capacity as selection criteria. *Pakistan Journal of Botany*, 47, 845–850.
- Ali, Z., Ashraf, M., Al-Qurainy, F., Khan, M. S., Akram, N. A. (2015b). Field screening of guar [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.] accessions for enhanced forage production on hot drylands. *Pakistan Journal of Botany*, 47, 1429–1437.
- Alloway, B. J. (Ed.) (1995). Heavy metals in soils *Blackie Academic and Professional*, London, 122–151.
- Almutairi, Z. M., Alharbi, A. (2015). Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *Journal of Advances in Agriculture*, 4, 280–285.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1331–41.
- An, J., Zhang, M., Wang, S., Tang, J. (2008). Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1100–1107.
- Anandaraj, M., Dinesh, R., Srinivasan, V., Harnza, S. (2011). Nanotechnology in agriculture: the use of novel materials and environmental issues. *Botanica*, 59–61, 22–34.
- Anjum N. A., Gill S. S., Duarte A. C., Pereira E., Ahmad I. (2013). Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15, 1896, 1–26.
- Anjum, N.A., Adam, V., Kizek, R., Duarte, A.C., Pereira, E., Iqbal, M., Lukatkin, A. S., Ahmad, I. (2015). Nanoscale copper in the soil-plant system – toxicity and underlying potential mechanisms. Review. *Environmental Research*, 138, 306–325.
- Anonymous Book (2000). A Dictionary of Biology. *Oxford University Press*, Market House Book, Ltd.
- Antisari, V. L., Carbone, S., Gatti, A., Vianello, G., Nannipieri, P. (2013). Toxicity of metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 60, 87–94.
- Aon, M. A., Colaneri, A. C. (2001). Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied II. Soil Ecology*, 18, 255–270.
- Arruda, S. C. C., Silva, A. L. D., Galazzi, R.M., Azevedo, R. A., Arruda, M. A. Z. (2015). Nanoparticles applied to plant science: a review. *Talanta*, 131, 693–705.

- Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., Kahru, A. (2009).** Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, 1461–1468.
- Asada, K. (1992).** Ascorbate peroxidase. A hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plantarum*, 85, 235–241.
- Asada, K. (1997).** The Role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses 34, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 715–735.
- Aslani, F., Bagheri, S., Julkapli, N. M., Juraimi, A. S., Golestan Hashemi, F. S., Baghdadi, A., (2014).** Effects of Engineered Nanomaterials on Plants Growth: An Overview. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal*, Article ID 641759, 1–28.
- Auffan, D. M., Santaella, D.C., Thiéry, P. A., Paillès, C., Rose, J., Achouak, D.W., Thill, D. A., Masion, A., Wiesner, M., Bottero, J.-Y. (2012).** Ecotoxicity of inorganic nanoparticles: from unicellular organisms to invertebrates. W: Bhushan, P.B. (ed.), *Encyclopedia of nanotechnology*. Springer, Netherlands, 623–636.
- Axelsson, B. O., Saraf, A., Larsson, L. (1995).** Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatogr B: Biomedical Applications*, 7, 666(1), 77–84.
- Babu, T.S., Marder, J. B., Tripuranthakam, S., Dixon, D. G., Greenberg, B. M. (2001).** Synergistic effects of a photooxidized polycyclic aromatic hydrocarbon and copper on photosynthesis and plant growth: evidence that in vivo formation of reactive oxygen species is a mechanism of copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1351–1358.
- Back, Y. W., An, Y. J. (2011).** Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Science of the Total Environment*, 409, 1603–1608.
- Balakhnina, T. I., Bulak, P., Matichenkov, V. V., Kosobryukhov, A. A., Włodarczyk, T. M. (2015).** The influence of Si-rich mineral zeolite on the growth processes and adaptive potential of barley plants under cadmium stress. *Plant Growth Regulation*, 75, 557–565.
- Barnes, J. Zheng, Y., Lyons, T. (2002).** Plant resistance to ozone: the role of ascorbate ,in *Air Pollution and Plant Biotechnology – Prospects for Phytomonitoring and Phytoremediation*, eds. K. Omasa, H. Saji, S. Youssefian, and N. Kondo (Tokyo: Springer-Verlag), 235–252.
- Barrena, R., Casals E., Colon J., Font X., Sanchez A., Puentes V. (2009).** Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere*, 75, 850–857.
- Bartos, G. (2013).** *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Warszawa 2003. PWN.
- Battke, F., Leopold, K., Maier, M., Schmidhalter, U., Schuster, M. (2009).** Palladium exposure of barley: uptake and effects. *Plant Biology*, 10, 272–276.
- Behnassi, M., Shahid, A. S., D'Silva, J. (2011).** Sustainable agricultural development, Springer Science Business Media, London, 171–184.
- Bendini, A., Cerretani, L., Di Virgilio, F., Belloni, P., Bonoli-Carbognin M., Lercker, G. (2007).** Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *Journal of Food Quality*, 30, 424–437.
- Benincasa, P., Pace, R., Quinet, M., Lutts, S. (2013).** Effect of salinity and priming on seedling growth in rapeseed (*Brassica napus* var oleifera Del.), *Acta Scientiarum Agronomy*, 35, 479–486.
- Ben-Moshe, T., Dror, I., Berkowitz, B. (2010).** Transport of metal oxide nanoparticles in saturated porous media. *Chemosphere*, 81, 387–393.
- Berganza, B. E., Moran, A. W., Rodriguez, G., Coto, N. M., Santamaria, M., Bressani, R. (2003)** Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Food for Human Nutrition*, 58, 1–6.
- Bernal, M., Casero, D., Singh, V., Wilson, G. T., Grande, A., Yang, H., Dodani, S. C., Pellegrini, M., Huijser, P., Connolly, E. L., Merchant, S.S., Krämer, U. (2012).** Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24 (2), 738–761.

- Berney, M., Weilenmann, H.-U., Egli, T. (2006). Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology*, 152, 1719–1729.
- Berset, C., Cuvelier, M. E. (1996). Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. In *Sciences des aliments*. Ed Lavoisier. Paris. France. 219–245.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9, 1055–1066.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., Nonogaki, H. (2013). Seeds physiology of development. In: Germination and dormancy. 3rd ed. New York, NY: Springer.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Śmieszek, M. (1994). Warunki zbioru i przechowywania a jakość nasion rzepaku. Cz. II. Jakość mikrobiologiczna. *Rośliny Oleiste*, XV(2), 135–143.
- Bielińska, E. J., Baran, S., Domżał, H. (2000). Zastosowanie wskaźników enzymatycznych do oceny wpływu rocznych zabiegów agrotechnicznych na poprawę właściwości gleby lekkiej. *Fol. Univ. Stetin. 211 Agricultural*, 84, 35–40.
- Bielińska, E. J., Moeck, A. (2003). Aktywność enzymatyczna gleby użytkowanej sadowniczo jako wskaźnik stanu środowiska wywołany stosowaniem ściółek z tworzyw sztucznych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, Z. 492, 25–37.
- Birbaum, K., Brogioli, R., Schellenberg, M. (2010). No evidence for cerium dioxide nanoparticle translocation in maize plants. *Environmental Science and Technology*, 44(22), 8718–8723.
- Bobrzecka, D., Salamonik, S. (1997). Zależność między technologią nawożenia miedzią a plonem i zawartością tłuszczu w nasionach podwójnie ulepszonych odmian rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste*, XVII (1), 219–225.
- Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., Kahru, A. (2013). Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: acritical review. *Archives of Toxicology*, 87, 1181–1200.
- Bottalico, A. J. (1999). Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles in Europe. *Plant Pathology*, 80, 85–103.
- Bottero, J.-Y. (2016). Environmental risks of nanotechnology: a new challenge? In: Nanosciences and nanotechnology, Lourtioz J-M et al. (eds) Springer International Publishing, Cham, 287–311.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brainard, D. H. (2003). Color appearance and color difference specification. In: Science of Color (Ed. S. Shevell). *Optical Society of America*, Washington, DC, USA.
- Bravin, M. N., Garnier, C., Lenoble, V., Gérard, F., Dudal, Y., Hinsinger, P. (2012). Root-induced changes in pH and dissolved organic matter binding capacity affect copper dynamic speciation in the rhizosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 84, 256–268.
- Brookes, P. C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soil*, 19, 269–275.
- Brun, L. A., Maillet, J., Hinsinger, P., Pépin, M. (2001). Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution*, 111, 293–302.
- Brzezińska, M. (2002). Significance of soil enzymes in nutrient transformations. *Acta Agrophysica*, 63, 5–23.
- Bueno, P., Varela, J., Gimeenez-Gallego, G., del Rio, L. A. (1995). Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase: Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiology*, 108, 1151–1160.
- Burns, R. G., DeForest, J. L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R. L., Stromberger, M. E., Wallenstein, M. D., Weintraub, M. N., Zoppini, A. (2013). Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 216–234.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J. M., Muñoz-Vallés, S., Figueroa-Luque, E., Luque, T., Figueroa, M. E. (2013). Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monoptalum*. *Environmental Science and Pollution Research. International*, 20, 8839–8847.

- Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Fraceto, L. F. (2014).** Applications of controlled release systems for fungicides, herbicides, acaricides, nutrients, and plant growth hormones: a review. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6, 373–387.
- Capanoglu, E. (2010).** The potential of priming in food production. *Trends Food Science Technology*, 21, 399–407.
- Carroll, K. J., Reveles, J. U., Shultz, M. D., Khanna, S. N., Carpenter, E. E. (2011).** RepARATION of Elemental Cu and Ni Nanoparticles by the Polyol Method: An Experimental and Theoretical Approach. *The Journal of Physical Chemistry*, C115(6), 2656–2664.
- Caruthers S. D., Wickline S. A., Lanza G. M. (2007).** Nanotechnological applications in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 26–30.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B. (2012).** Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. – *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1011–1019.
- Chaney, R., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., Baker, A. J. M. (1998).** Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3), 279–284.
- Chang, Y.-N., Zhang, M., Xia, L., Zhang, J., Xing, G. (2012).** The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles. *Materials*, 5, 2850–2871.
- Chaperon, S., Sauve, S. (2007).** Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 2329–2338.
- Chatterjee, A.K., Chakraborty, R., Basu, T. (2014).** Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 25, 135101.
- Chelkowski, J. (1999).** Dobrze przechowywane zboża. Praca zbiorowa. Mr INFO, Poznań.
- Chelkowski, J., Perkowski, J., Grabarkiewicz-Szczęśna, J., Kostecki, M., Goliński, P. (2001).** Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe, 111–130. In: Logrieco A. (ed.), European Commission COST 835, *Academic Press*.
- Chen, H., Yada, R. (2011).** Nanotechnologies in agriculture: new tools for sustainable development. *Trends Food Science Technology*, 22, 585–594.
- Chhipa, H. (2017).** Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environmental Chemistry Letters*, 15, 15–22.
- Choe, E., Min, D. B. (2006).** Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Science and Food Safety*, 5, 169–186.
- Choi, O., Deng, K. K., Kim, N.-J., Ross Jr., L., Surampalli, R. Y., Hu, Z. (2008).** The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42, 3066–3074.
- Chowdappa, P., Gowda, S. (2013).** Nanotechnology in crop protection: Status and scope. *Pest. Management in Horticultural Ecosystems*, 19(2), 131–151.
- Cichosz, G., Czacot, H. (2011).** Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV(1), 50–60.
- Ciecierska, M., Obiedziński, M. W. (2006).** Zanieczyszczenie olejów roślinnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2(47), 48–55.
- COBORU (2016).** Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych. Zawartość tłuszczu i glukozyolanów. *Rzepak jary*, 2016.
- Codex Alimentarius Commission (1999).** Fats, Oils & Related Products By Codex Alimentarius Commission – Codex Standard for Edible Fats and Oils not Covered by Individual Standards (CODEX STAN 19–1981, Rev. 2–1999).
- Contreras, M. A., Stanley, R. I. (2002).** Recent studies on interactions between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in brain and other tissues. *Current Opinion in Lipidology*, 13(3), 267–272.
- Coutris, C., Joner, E. J. Oughton, D. H. (2012).** Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. *Science of the Total Environment*, 420, 327–333.
- Da Costa, M. V. J., Sharma, P. K. (2016).** Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54, 110–119.

- Dang, V. P., Vo, T. K. L., Nguyen, T. K. L. (2010).** Synthesis and antimicrobial effects of colloidal silver nanoparticles in chitosan by c-irradiation. *Journal Experimental Nanoscience*, 5, 169–179.
- Darlington, T. K., Neigh, A. M., Spencer, M. T., Nguyen, O. T., Oldenburg, S. J. (2009).** Nanoparticle characteristics affecting environmental fate and transport through soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(6), 1191–1199.
- Das, K., Roychoudhury, A. (2014).** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environmental Science*, 2(53), 1–13.
- De Pinto, M. C., De Gara, L. (2004).** Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2559–2569; 1–26.
- Demiral, T., Turkan, I. (2005).** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 247–257.
- DeRosa, M. C., Monreal, C., Schnitzer, M., Walsh, R., Sultan, Y. (2010).** Nanotechnology in fertilizers. *Nature Nanotechnology*, 5(2), 90–91.
- Dick, R. P. (1997).** Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health, Pankhurst, C., Doube B. and Gupta V. (eds) Biological Indicators of Soil Health. *CAB International*, Wallingford, UK, 121–156.
- Dimkpa, C. O., Mclean, J. E., Britt, D. W., Anderson, A. J. (2012a).** CuO and ZnO nanoparticles differently affect the secretion of fluorescent siderophores in the beneficial root colonizer, *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Nanotoxicology*, 6, 635–642.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., Anderson, A. J. (2015).** Nano-CuO and interaction with nano-ZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotoxicology*, 24, 119–129.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., Johnson, W. P., Arey, B., Lea, A. S. (2012b).** Nanospecific inhibition of pyoverdine siderophore production in *Pseudomonas chlororaphis* O6 by CuO nanoparticles. *Chemical Research Toxicology*, 25, 1066–1074.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P. (2012c).** CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 1125.
- Dimkpa, C. O., Latta, D. E., McLean, J. E., Britt, D. W., Boyanov, M. I., Anderson, A. J. (2013).** Fate of CuO and ZnO nano- and microparticles in the plant environment. *Environmental Science of Technology*, 47, 4734–4742.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., Hamza, S. (2012).** Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, 19–27, 173–174.
- Ditta, A., Arshad, M., Ibrahim, M. (2015).** Nanoparticles in sustainable agricultural crop production: applications and perspectives. In: Siddiqui M. H., Al-Whaibi M.H., Mohammad F. (eds.) Nanotechnology and plant sciences: nanoparticles and their impact on plants. Springer International Publishing, Cham, 55–75.
- Drozdowski, B. (2007).** Lipidy. W: Chemia żywności: sacharydy, lipidy, białka. Red. Sikorski Z. T. II. WNT, Warszawa, 73–164.
- Du, W., Sun, Y., Ji, R., Zhu, J., Wu, J., Guo, H. (2011).** TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 822–828.
- Dupuy, N., Duponchel, L., Huvenne, J. P., Sombret, B., Legrand, P. (1996).** Classification of edible fats and oils by principal component analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 57, 245–251.
- Duque, A. S., De Almeida, A. M., Da Silva, A. B., Da Silva, J. M., Farinha, A. P., Santos, D., Fevereiro, P., De Sousa Araujo, S. (2013).** Abiotic stress responses in plants: unraveling the complexity of genes and networks to survive. W: Vahdati K., Leslie C. (red.), Abiotic stress – plant responses and applications in agriculture. *InTech Rijeka*, Croatia, 153–172.

- Echavarri-Bravo, V., Paterson, L., Aspray, T. J., Porter, J. S., Winson, M. K., Thornton B., Hartl, M. G. (2015). Shifts in the metabolic function of a benthic estuarine microbial community following a single pulse exposure to silver nanoparticles. *Environmental Pollutions*, 201, 91–99.
- Ehrman, S. H., Friedlander, S. K., Zachariah, M. R. (1999). Phase segregation in binary SiO₂/TiO₂ and SiO₂/Fe₂O₃ nanoparticle aerosols formed in a premixed flame. *Journal of Materials Research*, 14, 4551–4561.
- El-Bassiouny, H. M. S., Gobarah, M. E., Ramadan, A. A. (2005). Effect of antioxidants on growth, yield and favism causative agents in seeds of *Vicia faba* L. plants grown under reclaimed sandy soil. *Journal of Agricultural*, 4, 281–287.
- Endo, M., Iijima, S., Dresselhaus, M. S. (eds) (2013). Carbon Nanotubes. *Elsevier*, Shinshu University, Japan.
- Falco, W. F., Queiroz, A. M., Fernandes, J., Botero, E. R., Falcão, E. A., Guimarães, F. E. G. (2015). Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: a close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. *Journal of Photochemistry Photobiology A: Chemistry*, 299, 203–209.
- Farghaly, F. A., Nafady, N. A. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Rosmarinus officinalis* and Its Effect on Tomato and Wheat Plants. *Journal of Agricultural Science*, 7(11), 277–287.
- Feiner, L.-F. (2006). Nanoelectronics: crossing boundaries and borders, *Nature Nanotechnology*, 1, 91–92.
- Ferguson, E. A., Christer, H. (1998). Acute silver toxicity to seawater-acclimated rainbow trout: influence of salinity on toxicity and silver speciation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 589–593.
- Fernandes, J. C., Henriques, F. S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 57, 246–273.
- Fernández-García, M., Rodríguez, J. A. (2011). Metal oxide nanoparticles. *Encycl. Inorg. Bioinorg Chem.* Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid, Spain and Brookhaven National Laboratory, Upton, NY, USA.
- Foltete, A. S., Masfaraud, J. F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Labille, J., Rose, J., Ferard, J. F., Cotellet, S. (2011). Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nano-composites on *Vicia faba*. *Environmental Pollution*, 159(10), 2515–252.
- Fornal J., Jaroch R., Sadowska J., Kaczyńska B. (1991). Mechaniczne właściwości nasion wybranych odmian i rodów rzepaku. *Zeszyty Problemowe IHar.*, Cz. I., 165–179.
- Foss, H. S., Baun, A., Michelson, E. S., Kamper, A., Borling, P., Stuer-Lauridsen, F. (2009). Nanomaterials in consumer products. *Nanomaterials: Risks and Benefits*, 359–367.
- Fox, C. L., Modak, S. M. (1974). Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 5(6), 582–588.
- Foyer, C. H., Descourvières, P., Kunert, K. J. (1994). Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 17(5), 507–523.
- Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133, 21–25.
- Franke, M. E., Koplin, T. J., Simon, U. (2006). Metal and metal oxide nanoparticles in chemiresistors: Does the nanoscale matter? *Small*, 2(1), 36–50.
- Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 44, 147–59.
- Gajjar, P., Pettee, B., Britt, D. W., Huang, W., Johnson, W. P., Anderson, A. J. (2009). Antimicrobial activities of commercial nanoparticles against an environmental soil microbe, *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Biological Engineering*, 3(9), 1–13.
- Gancarz, M., Wawrzyniak, J., Gawrysiak-Witulska, M., Wiącek, D., Nawrocka, A., Tadla, M., Rusinek, R. (2017). Application of electronic nose with MOS sensors to prediction of rapeseed quality. *Measurement*, 103, 227–234.
- Gao, F., Hong F., Liu, C., Zhang L., Su, M., Wu, X., Yang, F., Wu, C., Yang, P. (2006). Mechanism of nano-anatase TiO₂ on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach. *Biological Trace Element Research*, 111, 239–253.

- Gawrysiak-Witulska, M., Wawrzyniak, J., Ryniecki A., Perkowski, J. (2008).** Relationship of ergosterol content and fungal contamination and assessment of technological quality of malting barley preserved in a metal silo using the near-ambient method. *Journal of Food Products Research*, 44, 360–365.
- Ge, Y., Schimel, J. P., Holden, P. A. (2011).** Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1659–64.
- Ghafariyan, M. H., Malakouti, M. J., Dadpour, M. R., Stroeve, P., Mahmoudi M. (2013).** Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10645–10652.
- Ghanati, F., Bakhtiarian, S. (2013).** Changes of natural compounds of *Artemisia annua* L. by methyl jasmonate and silver nanoparticles. *Advances in Environmental Biology*, 7, 2251–2258.
- Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Haddad, A., Matthäus, B., Charrouf, Z. (2011).** Oxidative Stability of Edible Argan Oil: a Two-Year Period Study. *LWT Food Science and Technology*, 44, 1–8.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V., Paknikar, K. M. (2011).** Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*, 29(6), 792–803.
- Gianfreda, L., Antonietta, Rao M., Piotrowska, A., Palumbo, G., Colombo, C. (2005).** Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341(1-3), 265–279.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977).** Superoxide dismutases occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59, 309–314.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010).** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Gogos, A., Knauer, K., Bucheli, T. D. (2012).** Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9781–9792.
- Gourama, H., Bullerman, L. B. (1995).** Detection of molds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. *Journal of Food Protection*, 58, 1389–1394.
- Gruyer, N., Dorais, M., Bastien, C., Dassylva, N., Triffault-Bouchet, G. (2013).** Interaction between silver nanoparticles and plant growth. International symposium on new technologies for environment control, energy-saving and crop production in greenhouse and plant factory – greensys, Jeju, Korea, 6–11.
- Grzesik, M., Janas, R., Górnik, K., Romanowka-Duda Z. (2012).** Biologiczne i fizyczne metody stosowane w produkcji i uszlachetnianiu nasion. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 57(3), 147–152.
- Guillén, M. D., Cabo N. (1997a).** Characterization of edible oils and lard by fourier transform infrared spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1281–1286.
- Guillén, M. D., Cabo N. (1997b).** Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 1–11.
- Guillén, M. D., Cabo, N. (2000).** Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 2028–2036.
- Guillén, M. D., Ruiz, A., Cabo, N., Chirinos R., Pascual, G. (2003).** Characterization of sachu inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil by FTIR spectroscopy and ¹H NMR. Comparison with linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 755–762.
- Gunstone, F. D. (2005).** Vegetable Oils. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, vol. 1. Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects, ed. Shahidi F., eds. *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, 213–267.
- Gupta, A. S., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burke, J. J., Allen, R. D. (1993).** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 90, 1629–1633.

- GUS (2013).** Główny Urząd Statystyczny. Nanotechnologia w Polsce w 2012 r. Warszawa, grudzień 2013.
- Gutiérrez, F., Villafranca, M. J., Castellano, J. M. (2002).** Changes in the Main Components and Quality Indices of Virgin Olive Oil during Oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(7), 669–676.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., Mahmoudi, M. (2012).** Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499–511.
- Hänsch, M., Emmerling, C. (2010).** Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173, 554–558.
- Hassan, F., Shahram, A., Farzin, A., Saeed, J. P. (2013).** Comparative effects of nanosized and bulk titanium dioxide concentrations on medicinal plant salvia officinalis L., *Annual Review & Research in Biology*, 3(4), 814–824.
- Hassan, S. (2015).** A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, 4, 1–3.
- He, S. Y., Feng, Y. Z., Ren, H. X., Zhang, Y., Gu, N., Lin, X. G. (2011).** The impact of iron oxide magnetic nanoparticles on the soil bacterial community. *Journal of Soils and Sediments*, 11, 1408–1417.
- He, X., Huai, W., Tie, C., Liu, Y., Zhang, B. (2000).** Breeding of high ergosterol-producing yeast strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(1), 39–44.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.-C., Kahru, A. (2008).** Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71, 1308–1316.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E. (2008).** Redox control and oxidative stress in yeast cells, *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, 1780, 1217–1235.
- Hiraga, S., Sasaki K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001).** A large family of Class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42, 462–468.
- Hoffmann, W., Mudra, A., Plarre, W. (1979).** Szczegółowa hodowla roślin. PWRiL. Warszawa 1979.
- Hojjat, S. S. (2015).** Effect of Nano Silver on Seed Germination and Seedling Growth in Fenugreek Seed. *International Journal of Food Engineering*, 1(2), 106–110.
- Holmblad, T., Söderhäll, K. (1999).** Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172, 111–123.
- Hong, J., Rico, C., Zhao, L., Adeleye, A. S., Keller, A. A., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. (2015).** Toxic Effects of Copper-based Nanoparticles or Compounds to Lettuce (*Lactuca sativa*) and Alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science: Processes and Impacts*, 17(1), 177–185.
- Hruby, M., Cigler, P., Kuzel, S. (2002).** Contribution to understanding the mechanism of titanium action in plant. *Journal of Plant Nutrition*, 25, 577–598.
- Hu, L., Chen, G. (2007).** Analysis of optical absorption in silicon nanowire arrays for photovoltaic applications. *Nano Letters*, 7, 3249–3252.
- Hu, W., Culloty, S., Darmody, G., Lynch, S., Davenport, J., Ramirez-Garcia, S. (2014).** Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: a redox proteomic investigation. *Chemosphere*, S0045-6535(14), 00120–00129 (pii).
- Huang, P.-M., Wang, M.-K., Chiu, C.-Y. (2005).** Soil mineral – organic matter – microbe interactions: impacts on biogeochemical processes and biodiversity in soils. *Pedobiologia*, 49, 609–635.
- Imahori, Y. (2014).** Role of ascorbate peroxidase in postharvest treatments of horticultural crops. In: Ahmad, P. (Ed.), *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*. Elsevier Inc., San Diego, USA, 425–451.
- Imahori, Y., Takemura, M., Bai, J. (2008).** Chilling-induced oxidative stress and antioxidant responses in mume (*Prunus mume*) fruit during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 54–60.
- Inzé, D., Van Montagu, M. (1995).** Oxidative stress in plants. – *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 153–158.

- IOR (2008).** Instytut Ochrony Roślin. Integrowana produkcja rzepaku ozimego i jarego. Opracowanie zbiorowe (red.) M. Mrówczyński i S. Pruszyński. Program wieloletni 2006-2010. 3.1. Integrowany program ochrony roślin jako podstawa nowoczesnych technologii produkcji roślin rolniczych. Poznań 2008.
- Ishikawa, T., Shigeoka, S. (2008).** Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72, 1143–1154.
- Ismail, A. A., van de Voort, F. R., Emo, G., Sedman, J. (1993).** Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 335–341.
- Jacobsen, C., Nielsen, N. S. (2008).** Optimization of oxidative stability of omega – 3 enriched foods. In H. Brevik (Ed.). Longchain omega – 3 specialty oils (pp. 197–217). Bridgewater: *The Oily Press Ltd*.
- Jain, J., Arora, S., Rajwade, J., Omray, P., Khandelwal, S., Paknika, R. K. (2009).** Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for Topical use. *Molecular Pharmaceutics*, 6, 1388–1401.
- Jezierska-Tys, S., Frąc, M. (2008).** Microbiological indices of soil quality fertilized with dairy sewage sludge. *International Agrophysics*, 22, 215–219.
- Jin, L., Son, Y., Yoon, T. K., Kang, Y.J., Kim, W., Chung, H. (2013).** High concentrations of single-walled carbon nanotubes lower soil enzyme activity and microbial biomass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 9–15.
- Joshi, N., Ngwenya, B. T., French, C. E. (2012).** Enhanced resistance to nanoparticle toxicity is conferred by overproduction of extracellular polymeric substances. *Journal of Hazardous Materials*, 241–242, 363–370.
- Joško, I., Oleszczuk, P. (2013).** Influence of soil type and environmental conditions on ZnO, TiO₂ and Ni nanoparticles phytotoxicity. *Chemosphere*, 92, 91–99.
- Joško, I., Oleszczuk, P., Futa, B. (2014).** The effect of inorganic nanoparticles (ZnO, Cr₂O₃, CuO and Ni) and their bulk counterparts on enzyme activities in different soils. *Geoderma*, 232, 528–537.
- JRC. Scientific and Policy Reports (2014).** Proceedings of a workshop on “Nanotechnology for the agricultural sector: from research to the field”. ISSN 1831–9424.
- Judde, A. (2004).** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique: mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications? *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 11(6), 414–418.
- Judy, J. D., Kirby, J. K., Creamer, C., McLaughlin, M. J., Fiebiger, C., Wright, C., Cavagnaro, T. R., Bertsch, P. M. (2015).** Effects of silver sulfide nanomaterials on mycorrhizal colonization of tomato plants and soil microbial communities in biosolid-amended soil. *Environmental Pollution*, 206, 256–263.
- Junker, R., Kratz, M., Neufeld, M., Erren, M., Nofer, J. R., Schulte, H., Nowak-Gottl, U., Assmann, G., Wahrburg, U. (2001).** Effects of diets containing olive oil, sunflower oil, or rapeseed oil on the hemostatic system. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 85, 280–286.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1999).** Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa 1999.
- Kachel-Jakubowska, M. (2008).** Wpływ suszenia na jakość nasion rzepaku ozimego. *Inżynieria Rolnicza*, 1(99), 127–135.
- Kachel-Jakubowska, M., Sujak, A. (2016).** Evaluation of physical properties of selected vegetable oils obtained by cold pressing. *Acta Agrophysica.*, 23(4), 583–592.
- Kachel-Jakubowska, M., Szpryngiel, M. (2006).** Jakość surowca ocenianego na podstawie stopnia uszkodzenia nasion rzepaku. *Inżynieria Rolnicza*, 13, 155–165.
- Kamal-Eldin, A. (2005).** Minor Components of Fats and Oils. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products, vol. 3. Edible Oil and Fat Products: Specialty Oils and Oil, Ed. Shahidi F., Eds. *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, 319–359.
- Kapusta, R. (2015).** Ewolucja miejsca i roli rzepaku w rolnictwie oraz gospodarce Polski. *Problemy Rolnictwa Światowego*, t. 15(XXX), 2, 85–95.

- Karłowicz-Bodalska, K., Bodalski, T. (2007). Nienasycone kwasy tłuszczowe, ich właściwości biologiczne i znaczenie w leczeniu. *Postępy Fitoterapii*, 1, 46–56.
- Kączkowski, H. (1987). Fotosynteza. Rozdział 14 w „Podstawy biochemii”. WNT Warszawa.
- Khan, M. H., Panda, S. K. (2008). Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 81–89.
- Khiew, P., Chiu, W., Tan, T., Radiman, S., Abd-Shukor, R., Chia, CH. (2011). *Palm Oil: Nutrition, Uses and Impacts*. Nova Science Capping effect of palm-oil based organometallic ligand towards the production of highly monodispersed nanostructured material, 189–219.
- Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., Biris, A. S. (2012). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS (American Chemical Society) Nano*, 3(10), 322–327.
- Kieliszewska-Rokicka, B. (2001). Enzymy glebowe i ich znaczenie w badaniach aktywności biologicznej gleby. W: Drobnoustroje środowiska glebowego. Pr. zbior. Red. H. Dahn, A. Pokojska-Burdziej. Toruń: Wydaw. A. Marszałek, 37–47.
- Kim, J.-H., Cho, H., Ryu, S.-E., Choi, M.-U. (2000). Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase vhr: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{+2} ion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382, 72–80.
- Kim, S., Kim, J., Lee, I. (2011). Effects of Zn and ZnO nanoparticles and Zn^{2+} on soil enzyme activity and bioaccumulation of Zn in *Cucumis sativus*. *Chemical of Ecology*, 27, 49–55.
- Kim, S., Sin, H., Lee, S., Lee, I. (2013). Influence of metal oxide particles on soil enzyme activity and bioaccumulation of two plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1279–1286.
- Klaine, S. J., Alvarez, P. J.J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1825–1851.
- Kohler, H. R., Triebskorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341, 759–765.
- Kolmakov, A., Moskovits, M. (2004). Chemical sensing and catalysis by one-dimensional metal-oxide nanostructures. *Annual Review of Materials Research*, 34, 151–180.
- Koper, J., Piotrowska, A., Siwik-Ziomek, A. (2004). Wartość enzymatycznego wskaźnika żyzności w zależności od zróżnicowanego zmianowania i nawożenia gleby. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 501, 219–225.
- Koper, J., Piotrowska, A., Siwik-Ziomek, A. (2008). Aktywność dehydrogenaz i inwertazy w glebie rdzawej leśnej w okolicy Zakładów Azotowych „Anwill” we Włocławku. W: *Proceedings of ECOpole*, 2 (1), 197–202. Wydawnictwo Anwill Włocławek, Polska.
- Korniłowicz-Kowalska, T., Szwed, A., Szwed, G. (2000). Charakterystyka mykologiczna nasion rzepaku w zależności od warunków ich przechowywania. *Acta Agrophysics*, 37, 83–94.
- Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Hopia, A., Kefalas, P., Wähälä, K., Heinonen, M. (2002). Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil. *European Food Research and Technology*, 214, 294–298.
- Kotecki, A., Kozak, M., Malarz, W. (1999). Wpływ zabiegów ochrony roślin, nawożenia azotem i gęstości siewu na rozwój i plonowanie rzepaku jarego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XX (2), 643–652.
- Kozłowska, H., Nowak, H., Zadernowski, R. (1988). Rapeseed hulls fat characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 6, 216–219.
- Krishnaraj, C., Jagan, E.G., Ramachandran, R., Abirami, S.M., Mohan, N., Kalaichelvan, P.T. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47(4), 651–658.
- KQ/PB-07 - wew. 06 z dn. 01.03.2013. Zawartość makroelementów przyswajalnych.
- KQ/PB-75 wersja 03 dn. 07.10.11. Skład granulometryczny gleby.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Ramachandran, R., Abirami, S. M., Mohan, N., Kalaichelvan, P. T. (2012). Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. Plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47(4), 651–658.

- Krygier, K., Obiedziński, M., Ratusz, K. (1996). Wpływ procesów bielenia na jakość oleju rzepakowego tłoczonego na zimno. *Rośliny Oleiste*, t. XVII, 455–459.
- Krygier, K., Wroniak, M., Grześkiewicz, S., Obiedziński, M. (2000). Badanie wpływu zawartości nasion uszkodzonych na jakość oleju rzepakowego tłoczonego na zimno. *Rośliny Oleiste*, t. XXI, 586–596.
- Krzyżański, J. (2009) (red.). Olej rzepakowy – nowy surowiec, nowa prawda. Polskie Stowarzyszenie Produkcji Oleju, Tom 2, Warszawa 2009.
- Krzyżański, J., Lipińska, H., Frankiewicz, A. (1986). Wartość odżywcza oleju i śruty rzepaku podwójnie ulepszanego, IHAR, Radzików.
- Kumar, N., Shah, V., Walker, V. K. (2011). Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles. *Journal of Hazard Materials*, 190(1-3), 816–822.
- Kumar, N., Shah, V., Walker, V. K. (2012). Influence of a nanoparticle mixture on an arctic soil community. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 131–135.
- Kunachowicz, H., Nadolna, I., Przygoda, B. (2005). Tabele składu i wartości odżywczej żywności. PZWL 2005.
- Lai, Y. W., Kemsley E. K., Wilson, R. H. (1994). Potential of Fourier transform infrared spectroscopy for the authentication of vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1154–1159.
- Lal, R. (2008). Promise and limitations of soils to minimize climate change. *Journal of Soil and Water Conservation*, 63, 113A–118A.
- Lee, S. H., Oh, B. I., Kim, J. (2008a). Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Bioresource Technology*, 99, 2578–2587.
- Lee, W.-M., An, Y.-J., Yoon, H., Kweon, H.-S. (2008b). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to terrestrial plants *Phaseolus radiatus* (Mung bean) and *Triticum aestivum* (Wheat); plant agar test for water-insoluble nanoparticles, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1915–1921.
- Lei, Z., Mingyu, S., Xiao, W., Chao, L., Chunxiang, Q., Liang, C., Hao, H., Xiaoqing, L., Fashui, H. (2008). Antioxidant stress is promoted by nano-anatase in spinach chloroplasts under UV-B radiation. *Biological Trace Element Research*, 121(1), 69.
- Lerma-García, M. J., Ramis-Ramos G., Herrero-Martínez J. M., Simó-Alfonso E. F. (2010). Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 118, 78–83.
- Lešnic, M., Cencič, A., Vajs, S., Simončič, A. (2008). Milling and bread baking techniques significantly affect the mycotoxin (deoxynivalenol and nivalenol) level in bread. *Acta Alimentaria*, 37, 471–483.
- Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., Brown G. E. Jr. (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 6900–6914.
- Li, Z., Lu, G.Y., Zhang, X.K., Zou, C.S., Cheng, Y., Zheng, P.Y. (2010). Improving droughttolerance of germinating seeds by exogenous application of gibberellic acid (GA3) in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Seed Science and Technology*, 38, 432–440.
- Libudysz, Z., Kowal, K., Sakowska, Z. (2007). Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. T. 1. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Polska.
- Li-Chan, E., Chalmers, J. M., Griffiths, P. R. (2010). Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science, Instrumentation and Fundamental Applications. ISBN: 978-0-470-74299-0.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-Vis Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wiley & Sons, Inc., USA., Supplement 1, F4.31-F4.3.8.
- Lin, D., Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150, 243–250.
- Lin, S., Reppert, J., Hu, Q., Hunson, J. S., Reid, M. L., Ratnikova, T. (2009). Uptake, translocation and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 1128–1132.

- Lombi, E., Nowack, B., Baun, A., McGrath, S. P. (2012).** Evidence for effects of manufactured nano-materials on crops is inconclusive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), IDE-3336.
- Loomis, R. S., Connor, D. J. (1992).** Crop ecology: productivity and management in agricultural systems. *Cambridge University Press, Cambridge*, 538.
- Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., Chen, R. (2013).** Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24, 1465–1471.
- Ma, C., White, J. C., Dhankher, O. P., Xing, B. (2015).** Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environmental Science & Technology*, 49(12), 7109–7122.
- Ma, R., Levard, C., Judy, J. D., Unrine, J. M., Durenkamp, M., Martin, B., Jefferson, B., Lowry, G. V. (2014).** Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant and in processed biosolids. *Environmental Science & Technology*, 48, 104–112.
- Ma, X. M., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A. (2010).** Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408, 3053–3061.
- Macsymiec, W. (1997).** Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica*, 34, 321–342.
- Mahapatra, O., Bhagat, M., Gopalakrishnan, C., Arunachalam, K. D., (2008).** Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3, 185–193.
- Majewska, B. (1994).** Kielki – najdoskonalszy pokarm na ziemi?, *Zdrowa Żywność*, 1(23), 16–17.
- Majumdar, S., Peralta-Videa, J. R., Bandyopadhyay, S., Castillo-Michel, H., Hernandez-Viezcas, J. A., Sahi S., Gardea-Torresdey, J. L. (2014).** Exposure of cerium oxide nanoparticles to kidney bean shows disturbance in the plant defense mechanisms. *Journal of Hazard Materials*, 278, 279–287.
- Maniak, B., Zdybel, B., Bogdanowicz, M., Wójcik, J. (2012).** Ocena wybranych właściwości fizykochemicznych tradycyjnych olejów roślinnych produkowanych na ziemi lubelskiej. *Inżynieria Rolnicza*, 3(138), 101–107.
- Manjunatha, S. B., Biradar, D. P., Aladakatti, Y. R. (2016).** Nanotechnology and its applications in agriculture: A review. *Journal of Farm Science*, 29(1), 1–13.
- Mapara, N., Sharma, M., Shriram, V., Bharadwaj, R., Mohite, K. C., Kumar, V. (2015).** Antimicrobial potentials of *Helicteres isora* silver nanoparticles against extensively drug-resistant (XDR) clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10655–10667.
- Masarovičová, E., Kráľová, K. (2013).** Metal nanoparticles and plants. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 20(1), 9–22.
- Mateos-Naranjo, E., Andrades-Moreno, L., Cambrolle, J., Perez-Martin, A. (2013).** Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: ecotoxicological implications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90, 136–142.
- Matthäus, B. (2012).** Oil technology in: Technological innovations in major world oil crops, vol. 2: Perspectives. Ed. S.K. Gupta. *Springer Science Business Media*, 23–92.
- Matthäus, B., Brühl, L. (2003).** Quality of cold-pressed edible rapeseed oil in Germany. *Nahrung/Food*, 47(6), 413–419.
- Matthäus, B., Brühl, L. (2008).** Why is it so difficult to produce high-quality virgin rapeseed oil for human consumption? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 611–617.
- Matthäus, B., Guillaume, D., Gharby, S., Haddad, A., Harhar, H., Charrouf, Z. (2010).** Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry*, 120, 426–432.
- Maupetit, P., Gatel, F., Cahagnier, B., Botorel, G., Charlier, M., Dauvillier, P., Laffiteau J., Roux, G. (1993).** Quantitative estimation of fungal intestation of feedstuffs by determining ergosterol content, 44th Annual meeting of EAAP Aarhus, Denmark, 16-19 August, Commission of animal nutrition, 16, 20.

- Mcgeer, J. C., Playle, R. C., Wood, C. M., Galvez, F. (2000). A physiologically based biotic ligand model for predicting the acute toxicity of waterborne silver to rainbow trout in freshwaters. *Environmental Science and Technology*, 34(19), 4199–4207.
- McKersie, B. D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S. R., Bowler, C., Inze, D. (1993). Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, 103, 1155–1163.
- McQuillan, J. S., Infante, H. G., Stokes, E., Shaw, A. M. (2011). Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in *Escherichia coli* K12. *Nanotoxicology*, 6, 857–866.
- Mehrotra, R. (2000). Infrared Spectroscopy, Gas Chromatography/Infrared in Food Analysis, Wiley Online Library.
- Meng, Q., Chen, J., Xu, Ch., Huang, Y., Wang, Y., Wang, T., Zhai, X., Gu, W., Wang, W. (2013). The characterization, expression and activity analysis of superoxide dismutases (SODs) from *Procambarus clarkia*. *Aquaculture*, 406–407; 131–140.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4197–4220.
- Miao, A. J., Quigg, A., Schwehr, K., Xu, C., Santschi, P. (2007). Engineered silver nanoparticles (ESNs) in coastal marine environments, bioavailability and toxic effects to the phytoplankton *Thalassiosira weissflogii*. In 2nd International Conference on the Environmental Effects of Nanoparticles and Nanomaterials: Sept 24–25. London: 2007.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environmental*, 33, 453–467.
- 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. *The Plant Pathology Journal*, 25(4), 376–380.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 7(9), 405–410.
- Mohammadi, R., Maali-Amiri, R., Mantri, N. L. (2014). Effect of TiO₂ nanoparticles on oxidative damage and antioxidant defense systems in chickpea seedlings during cold stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 61(6), 768–775.
- Moller, I. M., Jensen, P.E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review Plant Biology*, 58, 459–481.
- Monica, R. C., Cremonini, R. (2009). Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62(2), 161–165.
- Moreno, J. L., Aliaga, A., Navarro, S., Hernandez, T., Gracia, C. (2007). Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. *Applied Soil Ecology*, 35, 120–127.
- Moretzsohn de Castro, M., Bragagnolo, N., Toledo Valentini, S. (2002). The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 22–26.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, 2346–2353.
- Mourato, M., Reis, R., Martins, L. L. (2012). Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: a focus on heavy metal toxicity. W: Montanaro G. (red.), *Advances in selected plant physiology aspects*, *InTech*, 23–44.
- Mueller, D., Ferrao, M. F., Marder, L., Da Costa, A. B., Schneider R. C. (2013). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and multivariate analysis for identification of different vegetable oils used in biodiesel production, *Sensors*, 13, 4258–4271.
- Müller, H. M., Schwadorf, K. (1990). Ergosterol – a parameter for the quantitative determination of fungal infestation in feedstuffs. *Animal Research and Development*, 31, 71–84.
- Murata, T., Kanao-Koshikawa, M., Takamatsu, T. (2005). Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water Air Soil Pollut*, 164, 103–118.

- Murawa, D., Warmiński, K. (2004).** Plonowanie rzepaku jarego w warunkach zróżnicowanej ochrony. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura*, 3(2), 221–233.
- Murawa, D., Warmiński, K., Pykalo, I. (2000).** Skład kwasów tłuszczowych oleju z nasion rzepaku jarego w zależności od stosowanych herbicydów. *Rośliny Oleiste*, t. XXI, 819–825.
- Musante, C., White, J. C. (2010).** Toxicity of silver and copper to Cucurbita pepo, differential effects of nano and bulk-size particles. *Environmental Toxicology*, 27, 510–517.
- Musee, N. (2011).** Nanowastes and the environment: potential new waste management paradigm. *Environment International*, 37(1), 112–128.
- Musee, N., Thwala, M., Nota, N. (2011).** The antibacterial effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 13, 1164–1183.
- Muśnicki, Cz. (1989).** Charakterystyka botaniczno-rolnicza rzepaku ozimego i jego plonowanie w zmienionych warunkach siedliskowo-agrotechnicznych, AR, Poznań, *Rozprawy Naukowe*, z. 191.
- Muśnicki, Cz. (2003).** Rośliny oleiste. Praca zbiorowa (red.) Jasińska Z., Kotecki A., Szczegółowa uprawa roślin. T. II. WAR we Wrocławiu. ISBN 83-89189-15-1.
- Mustafa, G., Sakata, K., Hossain, Z., Komatsu, S. (2015).** Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean. *Journal of Proteomics*, 122, 100–118.
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D. S. (2010).** Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*, 179, 154–163.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867–880.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003).** Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655–670.
- 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.
- Nellist, M. E. (1998).** Bulk storage drying in theory and practice. *Journal of the Royal Agricultural Society of England*, 159, 120–135.
- Newell, S. (1994).** Total and free ergosterol in mycelia of saltmarsh ascomycetes with access to whole leaves or aqueous extracts of leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3479–3482.
- Newell, S. Y., Fell, J. W. (1992).** Ergosterol content of living and submerged, decaying leaves and twigs of red mangrove. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(9), 979–982.
- Ni, D., Song, L., Gao, Q., Wu, L., Yu, Y., Zhao, J., Qiu, L., Zhang, H., Shi, F. (2007).** The cDNA cloning and mRNA expression of cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase (SOD) gene in scallop *Chlamys farreri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23, 1032–1042.
- Niederberger, M. (2007).** Nonaqueous sol-gel routes to metal oxide nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 40(9), 793–800.
- Nowack, B., Bucheli, T. D. (2007).** Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150, 5–22.
- Obiedzińska, A., Waszkiewicz-Robak, B. (2012).** Oleje tłoczone na zimno jako żywność funkcjonalna. *Żywność. Nauka Technologia. Jakość*, 1(80), 27–44.
- Oliveira, A., Pampulha, M. E. (2006).** Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 102(3), 157–161.
- Ozerkovskaya, O. L. (2002).** The Problems of Specific Immunity. *Plant Physiology*, 49, 148–154.
- Pace, R., Benincasa, P., Ghanem, M. E., Quinet, M., Lutts, S. (2012).** Germination of untreated and primed seeds in rapeseed (*Brassica napus* var. *Oleifera* Del.) undersalinity and low matric potential, *Experimental Agriculture*, 48, 238–251.
- Pal, S., Tak, Y. K., Song, J. M. (2007).** Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 27(6), 1712–1720.
- Pan, B., Xing, B. (2010).** Manufactured nanoparticles and their sorption of organic chemicals. *Journal of Advanced Agricultural*, 108, 137–181.

- Pan, B., Xing, B. (2012).** Applications and implications of manufactured nanoparticles in soils: a review. *European Journal of Soil Science*, 63, 437–456.
- Pan, Y., Wu, L. J., Yu, Z. L. (2006).** Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation*, 49, 157–165.
- Pandey, S., Ror, S., Chakraborty, D. (2014).** Analysis of Biochemical Responses in Vigna Mungo Varieties Subjected to Drought Stress and Possible Amelioration. *International Journal of Scientific Research in Agricultural Sciences*, 1(1), 6–15.
- Paques, J. P., van der Linden, E., van Rijn, C. J, Sagis, L. M. (2014).** Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 163–171.
- Parida, A. K. Das, A. B. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324–349.
- Paris, C., Vigani, M., Rodriguez-Cerezo, E. (2015).** Agricultural Nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today*, 10, 124–127.
- Parveen, A., Rao, S. (2015).** Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*. *Journal of Cluster Science*, 26(3), 693–701.
- Pascual, J. A., Garcia, C., Hernández, T., Moreno, J. L., Ros, M. (2000).** Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation processes. *Soil Biology Biochemistry*, 32, 1877–1883.
- Patil, S. S., Shedbalkar, U. U., Truskewycz, A., Chopade, B. A., Ball, A. S. (2016).** Nanoparticles for environmental clean-up: a review of potential risks and emerging solutions. *Environmental Technology & Innovation*, 5, 10–21.
- PDF4.** Baza danych krystalograficznych. Urządzenie najnowszej generacji w zakresie identyfikacji składu chemicznego i fazowego materiałów.
- Perkowski, J., Buśko, M., Stuper, K., Kostecki, M., Matysiak, A., Sz wajkowska-Michalek, L. (2008).** Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 63/4, 542–547.
- Peyrot, C., Wilkinson, K. J., Desrosiers, M., Sauvé, S. (2014).** Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter. *Environ tal Toxicology and Chemistry*, 33, 115–125.
- Pidgeon, N., Harthorn, B. H., Bryant, K., Rogers-Hayden, T. (2009).** Deliberating the risks of nanotechnologies for energy and health applications in the United States and United Kingdom. *Nature Nanotechnology*, 4, 95–98.
- Piesiewicz, H., Mielcarz, M. (2001).** Kiełki w żywieniu człowieka. *Przegląd Piekarski i Cukierniczy*, (3), 10–14.
- Pinto, R. C., Eveleigh, L., Rutledge, D. N. (2010).** Preliminary studies on the mid-infrared analysis of edible oils by direct heating on an ATR diamond crystal, *Food Chemistry*, 120, 1170–1177.
- Plažek, A., Dubert, F., Kościelniak, J., Tatrz ańska, M., Maciejewski, M., Gondek, K., Żurek, G. (2014).** Tolerance of *Miscanthus × giganteus* to salinity depends on initial weight of rhizomes as well as high accumulation of potassium and proline in leaves. *Industrial Crop and Products*, 52, 278–285.
- PN-A-04018/A z 3:2002.** Produkty rolniczo-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kjeldahla i przeliczanie na białko.
- PN-EN ISO 3960:2012.** Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadttlenkowej. Jodometrycznie (wizualnie) oznaczenie punktu końcowego.
- PN-EN ISO 5508:1996.** Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- PN-EN ISO 659:2010.** Nasiona oleiste. Oznaczenie zawartości oleju (metoda odwoławcza).
- PN-EN ISO 660:2005.** Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
- PN-EN ISO 6886:2009.** Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie stabilności oksydacyjnej (test przyspieszonego utleniania).
- PN-EN ISO/IEC 17025.** Ogólne wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorcujących.

- PN-ISO 10390:1997. Jakość gleby, oznaczanie pH.
- PN-R-65 950: 1994. Materiał siewny. Metody badania nasion.
- Pokhrel, L. R., Dubey, B. (2013). Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 321–332, 452–453.
- Polle, A., Chakrabarti, K., Schiirmann, W., Rennenberg, H. (1990). Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Piceaabies* L., Karst.). *Plant Physiology*, 94, 312–319.
- Pradhan, S., Patra, P., Mitra, S., Dey, K. K., Basu, S., Chandra, S., Palit, P., Goswami, A. (2015). Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: a biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2606–2617.
- Prescha, A., Siger, A., Lorenc-Kukuła, K., Biernat, J., Nogala-Kalucka, M., Szopa, J. (2008). Badania nad składem i podatnością na utlenianie oleju z nasion lnu modyfikowanego genetycznie. *Bromatologia i. Chemia Toksykologiczna*, 3, 286–292.
- Pronyk, C., Abramson, D., Muir, W. E., White, N. D. G. (2006). Correlation of total ergosterol levels in stored canola with fungal deterioration. *Journal of Stored Products Research*, 42, 162–172.
- Przeździecki, Z., Murawa, D. (1988). Badania skuteczności kilku herbicydów stosowanych w rzepaku jarym oraz ich wpływ na plon i skład chemiczny nasion. *Acta Academiae Agriculturae Technicae Olstenensis*, 45, 203–213.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27, 76–83.
- Raimondi, F., Scherer, G. G., Kötzt, R., Wokaun, A. (2005). Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 44(15), 2190–2209.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237.
- Ren, H.-X., Liu, L., Liu, Ch., He, S.-Y., Huang, J., Li, J.-L., Zhang, Y., Huang, X.-J., Gu, N. (2011). Physiological Investigation of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Towards *Chinese Mung Bean*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(5), 677–684.
- Rico, C. M., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Chemistry, biochemistry of nanoparticles, and their role in antioxidant defense system in plants. In: *Nanotechnology and Plant Sciences*, 1–17.
- Robak, J., Zachwieja, Z. (1998). Znaczenie karotenoidów w diecie człowieka oraz w leczeniu niektórych schorzeń. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, T. XXXI (4), 295–301.
- Robert, J. G., Kelly, H., Nancy, D. D., Davis, S. B. (2009). Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 107(2), 404–415.
- Rogers, J. E., Li, S. W. (1985). Effect of metals and other inorganic ions on soil microbial activity: soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 858–865.
- Roghayyeh, S. M. S., Mehdi, T. S., Rauf, S. S. (2010). Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean. *Notulae Scientia Biologicae*, 2, 112–113.
- Rohman, A., Che Man, Y. B. (2009). Analysis of Cod-Liver Oil Adulteration Using Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86, 1149–1459.
- Rohman, A., Che Man, Y. B. (2010). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Research International*, 43, 886–892.
- Roldan, A., Salinas-Gracia, J. R., Alguacil, M. M., Diaz, E., Caravaca, F. (2005). Soil enzymes activities suggest advantages of conservation tillage practices in sorghum cultivation under subtropical conditions. *Geoderma*, 129, 178–185.
- Ross, D. J. (1971). Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biology Biochemistry*, 3, 97–110.

- Rotkiewicz, D., Konopka, I., Tańska, M. (2002).** Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe olejów roślinnych oraz ich funkcje. *Rośliny Oleiste*, T. XXIII, 561–579.
- Roure, F. (2016).** Societal approach to nanoscience and nanotechnology: when technology reflects and shapes society. In: Lourtioz J-M et al. (eds) *Nanosciences and nanotechnology*. Springer International Publishing, Cham, 357–404.
- Royal Society and the Royal Academy of Engineering (2004).** *Nanoscience and nanotechnology: Opportunities and uncertainties*, London. ISBN 0 85403 604 0.
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006z dnia 19 grudnia 2006 r.** ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych, Dz. U. L 364 z 20.12.2006, s. 30, wraz z późniejszymi poprawkami, EUR-Lex (2014) www.eur-lex.europa.eu (29.05.2017).
- Ruban, I. N., Voropaeva, N., Sharipov, M., Magarshak, Yu. B. (2009).** Modern risks of the antropogenic influence on living spieces: nano-level fluctuations. In the book *Silicon Versus Carbon. Fundamental nanoprocesses, nanobiotechnology and risks assessment*. *Shpringer*, 353–377.
- Rudko, T. (2011).** Uprawa rzepaku ozimego. Rzepak – zasady uprawy – zdrowa żywność. Poradnik dla producentów. Wydawnictwo Instytutu Agrofizyki. ISBN 978-83-89969-91-0.
- Rusinek, R., Kobyłka, R. (2014).** Experimental study and discrete element method modeling of temperature distributions in rapeseed stored in a model bin. *Journal of Stored Products Research*, 254–259.
- Rusinek, R., Tys, J. (2011).** Suszenie i przechowywanie rzepaku. Monografia. Rozdz. 2. Czynniki kształtujące jakość przechowalniczą nasion rzepaku. Teraz rzepak. Teraz olej. T. 5. PSPO Warszawa.
- Rusinek, R., Tys, J., Horabik, J. (2012).** Koncepcja stalowego zbiornika do suszenia i bezpiecznego przechowywania nasion rzepaku. Zbiorniki na materiały sypkie i ciecze. *Przegląd Budowlany*, 89–91.
- Rybacki, R., Skawiński, P., Lampkowski, M. (2001).** The status of rapeseed dehydration in the raw material base area of ZT Kruszwica S.A. (in Polish). *Rośliny Oleiste*, T. XXII, 539–549.
- Rynek Rzepaku, (2016).** IERiGŻ-PIB, Biuro Analiz i Prognozowania ARR, MRiRW, 2016 nr 10.
- Sadowska J., Fornal J., Ostaszyk A., Winnicki T. (1995).** Evaluation of technological quality of rapeseeds dried in industrial driers. *Zeszyty Problemowe PNR*, 427, 127–135.
- Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2000).** Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43, 381–386.
- Salama, H. M. H. (2012).** Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology*, 3, 190–197.
- Salamanca-Buentello, F., Daar, A. S. (2016).** Dust of wonder, dust of doom: a landscape of nanotechnology, nanoethics, and sustainable development. In: Bagheri A et al (eds) *Global bioethics: the impact of the UNESCO international bioethics committee*, vol. 5, Advancing global bioethics. Springer International Publishing, Cham, 101–123.
- Samarajeewa, A. D., Velicogna, J. R., Princz, J. I., Subasinghe, R. M., Scroggins, R. P., Beaudette, L. A. (2017).** Effect of silver nano-particles on soil microbial growth, activity and community diversity in a sandy loam soil. *Environmental Pollution*, 220, 504–513.
- Savoire, R., Lanoisellé, J.-L., Vorobiev, E. (2013).** Mechanical Continuous Oil Expression from Oilseeds: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 1–16.
- Sawinska, Z., Khachatryan, K., Sobiech, Ł., Idziak, R., Kosiada, T., Skrzypczak, G., (2014).** Wykorzystanie nanocząstek srebra jako fungicydu, *Przemysł Chemiczny*, 93, 1472–1474.
- Saxena, J., Munimbazi, C., Bullerman, L. (2001).** Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 29–34.
- Scandalios, J. G., Guan, L., Polidoros, A. N. (1997).** Catalases in plants: gene, structure, properties, regulation, and expression. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* 34, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 343–406.
- Schlich, K., Hund-Rinke, K. (2015).** Influence of soil properties on the effect of silver nanomaterials on microbial activity in five soils. *Environmental Pollution*, 196, 321–330.
- Schnürere, J., Jonsson, A. (1992).** Ergosterol levels and mould colony forming units in Swedish grain of food and feed grade. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 42, 240–245.

- Schützendübel, A., Polle, A. (2002).** Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351–1365.
- Scrinis, G., Lyons, K. (2007).** The emerging nano-corporate paradigm: nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems, *International Journal of Sociology of Agricultural and Food*, 15, 22–44.
- Seitz, L., Sauer, D., Burroughs, R., Mohr, H., Hubbard, J. (1979).** Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology*, 69, 1202–1203.
- Sekhon, B. S. (2014).** Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications*, 7, 31–53.
- Senjen, R. (2007).** Nano silver – a threat to soil, water and human health? Friends of the Earth Australia March 2007. Available at: <http://nano.foe.org.au/node/189>.
- Servin, A. D., Morales, M. I., Castillo-Michel, H., Hernandez-Viezas, J. A., Munoz, B., Zhao, L., Nunez, J. E., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. (2013).** Synchrotron verification of TiO₂ accumulation in cucumber fruit: a possible pathway of TiO₂ nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environmental Science of Technology*, 47(20), 11592–11598.
- Shah, V., Belozero, I. (2009).** Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Pollution*, 197, 143–148.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2010).** Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39, 4067–4079.
- Shapira P., Youtie, J. (2012).** The economic contributions of nanotechnology to green and sustainable growth. **Background paper 3.** OECD and the US National Nanotechnology Initiative, (2012).
- Sharif, F., Westerhoff, P., Herckes, P. (2013).** Sorption of trace organics and engineered nanomaterials onto wetland plant material, *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, vol. 15(1), 267–274.
- Sharma I. (2013).** Arsenic-induced oxidative stress and antioxidant defense system of *Pisum sativum* and *Pennisetum typhoides*: a comparative study. *Research Journal of Biotechnology*, 8, 48–56.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012).** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *American Journal of Botany*, 217037, 1–26.
- Sharon, M., Choudhary, A. K., Kumar, R. (2010).** Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. *Journal of Phytochemistry*, 2(4), 83–92.
- Shaw, A. K., Hossain, Z. (2013).** Impact of nano-CuO stress on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 93, 906–915.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. (2002).** Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305–1319.
- Sillen, W. M. A., Thijs, S., Abbamondi, G. R., Janssen, J., Weyens, N., White, J. C. (2015).** Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. *Soil Biology Biochemistry*, 91, 14–22.
- Singh, D., Kumar, A. (2015).** Effects of nano silver oxide and silver ions on growth of vigna radiata. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 95, 379–384.
- Singh, D., Kumar, S. (2008).** Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soils (ridges with forest) and in cotton soil after acetamprid treatments. *Chemosphere*, 71, 412–418.
- Singh, J., Bargale, P. C. (2000).** Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering*, 43(2), 75–82.
- Sionek, B. (1997).** Oleje tłoczone na zimno, *Roczniki PZH*, 48(3), 283–294.
- Skriegen, E. (1989).** Kaltlageung von Kornerraps. *RAPS*, 2, 78–87.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004).** Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid Interface Science*, 275, 177–182.
- Song, G. L., Gao, Y., Wu, H., Hou, W., Zhang, C., Ma, H., (2012).** Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), 2147–2152.

- Song, J. Y., Kim, B. S. (2009).** Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 79–84.
- Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., Lee, E. J. (2013).** Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 60–67.
- Srinivas, K. (2016).** Sustainable agriculture based on nanotechnology. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(5), 1681–1689.
- Šrobárová, A., Pavlová, A. (2001).** Toxicity of secondary metabolites of the fungus *F. culmorum* in relation to resistance of winter wheat cultivars. *Cereal Research Communications*, 29, 101–108.
- Stampoulis, D., Sinha, S. K., White, J. C. (2009).** Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science Technology*, 43, 9473–9479.
- Stępniewski, W., Stępniewska, Z. (2009).** Selected oxygen-dependent process. Response to soil management and tillage. *Soil & Tillage Research*, 102, 193–200.
- Stoimenov, P. K., Klinger, R. L., Marchin, G. L., Klabunde, K. J. (2002).** Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17), 6679–6686.
- Stręk, M., Telesiński, A. (2015).** Przebieg zmian aktywności dehydrogenaz w glebie zanieczyszczonej benzyną poddanej biostymulacji selenem i siarczanem (vi) amonu w różnych proporcjach. *Water-Environment-Rural Areas*. T. 15. Z., 1(49), 113–122.
- Stuper, K., Buśko, M., Matysiak, A., Perkowski, J., (2010).** Zanieczyszczenia zbóż grzybami mikroskopowymi oraz ich metabolitami zebranych na terenie Wielkopolski. *Aparatura badawcza i dydaktyczna, ABiD*, 4, 89–96.
- Stuper, K., Buśko, M., Perkowski, J. (2008).** Rozwój chemicznych metod oznaczania zawartości mikroflory grzybowej w produktach zbożowych. *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna*, 4, 68–74.
- Sujak, A., Okulski, W., Gruszecki, W. I. (2000).** Organization of oxfanthophyll pigments lutein and zeaxanthin in lipid membranes formed with dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochemica et. Biophysica Acta*, 1509, 255–263.
- Syu, Y.-Y., Hung, J.-H., Chen, J.-Ch., Chuang, H.-W. (2014).** Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57–64.
- Szajdek, A., Borowska, J. (2004).** Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (41) Supl., 5–28.
- Tańska, M., Rotkiewicz, D. (2003).** Stopień przemiany lipidów wybranych olejów roślinnych i konsumpcyjnych nasion oleistych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 38, 3–4, 147–155.
- Tańska, M., Rotkiewicz, D., Ambrosewicz, M. (2009).** Technological value of selected Polish varieties of rapeseed. *Polish Journal of Natural Sciences*, 22, 122–32.
- Taran, N., Batsmanova, L., Kovalenko, M., Okanenko, A. (2016).** The impact of metal nanoform colloidal solutions on the adaptive potential of plants. *Nanoscale Research Letters*, 11, 89–95.
- Taran, N., Storozhenko, V., Svetlova, N., Batsmanova, L., Shvartau, V., Kovalenko, M. (2017).** Effect of Zinc and Copper Nanoparticles on Drought Resistance of Wheat Seedlings. *Nanoscale Research Letters*, 12, 60.
- Tarchevsky, V. P. (2001).** Signal Systems of Plant's Cells. Moscow. *Science*, 348.
- Tay, A., Singh, R. K., Krishnan, S. S., Gore, J. P. (2002).** Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using Fourier transform infrared spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology*, 35, 99–103.
- Tekauz A. (2002).** Fusarium head blight of oat in western Canada – preliminary studies on the Fusarium species involved and levels of mycotoxin(s) in grain. *Journal of Applied Genetics*. 43A, 197–206.
- Thalmann, A. (1968).** Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtschaft, Forschung*, t. XXI, 3–4.
- Throback, I. N., Johansson, M., Rosenquist, M., Pell, M., Hansson, M., Hallin, S. (2007).** Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 270, 189–194.

- Thul, S. T., Sarangi, B. K. (2015). Implications of nanotechnology on plant productivity and its rhizospheric environment. In: Siddiqui MH, Al-Whaibi MH, Mohammad F (eds) Nanotechnology and plant sciences: nanoparticles and their impact on plants. Springer International Publishing, Cham, 37–54.
- Tomacheski, D., Pittol, M., Simoes, D. N., Ribeiro, V. F. (2017). Effect of natural ageing on surface of silver loaded TPE and its influence in antimicrobial efficacy. *Applied Surface Science*, 405, 137–145.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, V. P., Prasad, S. M., Dubey, N. K., Chauhan, D. K. (2016). Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 4, 1–14.
- Trojanowska, K. (2002). Zagrożenia ze strony mikroflory występującej w ziarnie zbożowym i w jego przetworach. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 9–12.
- Trujillo-Reyes, J., Majumdar, S., Botez, C. E., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: are they a potential physiological and nutritional hazard? *Journal Hazard Materials*, 267, 255–63.
- Tys, J., Jackowska, I., Rybacki, R. (2006). Wartość technologiczna nasion różnych odmian rzepaku ozimego przeznaczonych na biopaliwa. *Acta Agrophysica*, 8(4), 1017–1030.
- Tys, J., Krasucki, W., Szwed, G. (2002a). Wpływ warunków składowania na zmiany składu chemicznego nasion rzepaku jarego. 7 International Scientific Conference Theoretical and applicatory problems of agricultural engineering in the process of adaptation to EU research programmers. Instytut Inżynierii Rolniczej AR Wrocław, 343–346.
- Tys, J., Rusinek, R., Olejarski, P., Korbas, M., Jajor, E., Gładkowski, K. (2011). Suszenie i przechowywanie rzepaku. Polskie Stowarzyszenie Producentów Oleju, Warszawa.
- Tys, J., Sobczuk, H., Rybacki, R. (2002b). Wpływ temperatury suszenia na właściwości mechaniczne nasion rzepaku. *Rośliny Oleiste*, T. XXIII, 417–426.
- Tyshenko, M. G. (2014). Nanotechnology framing in the Canadian national news Media. *Technology in Society*, 37, 38–48.
- Uchiyama, M., Mihara, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86, 271–278.
- Van de Voort, F. R. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International*, 25, 397–403.
- Van Du, C., Nguyen, P. P., Khuong, V. Q. (2014). Ultrafine copper nanoparticles exhibiting a powerful antifungal/killing activity against *Corticium salmonicolor*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(9), 2645–2648.
- Veisz, O., Szunics, L., Szunics, L. (1997). Fusarium infection of oat varieties. *Cereal Research Communications*, 25, 829–831.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35, 753–759.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A., Tegou, E. (2006). Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 573, 459–465.
- Vogeller, I., Vachey, A., Deurer, M., Bolan, N. (2008). Impact of plants on the microbial activity in soils with high and low levels of copper. *European Journal of Soil Biology*, 44, 92–100.
- Voropaeva, N., Figovsky, O., Ibraliu, A., Shehu, I., Kadiasi, N., Varlamo, V., Karpachev, V. (2012). Innovative nanotechnology for agriculture. *Scientific Israel- Technological Advantages*, 14(1), 98–102.
- Wang, R., Wang, J., Zhao, L., Yang, S., Song, Y. (2015). Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of *Arabidopsis* seedlings. *Biometals*, 28, 123–132.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218, 1–14.
- Wang, Z. L. Y., Wu, B., Horst, A., Kang, Y., Tang, Y. J., Chen, D. R. (2010). Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 80, 525–529.

- Warner, K. (2008).** Chemistry of Frying Oils. In: Akoh CC, Min DB (eds) Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton (FL), 189–202.
- Wathes D. C., Abayasekara D. R., Aitken R. J. (2007).** Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190–201.
- Wenda-Piesik, A., Kazek, M., Ropińska, P. (2017).** Wpływ aminokwasowego biostymulatora i nawozu mikroelementowego stosowanych nałistnie na produktywność rzepaku ozimego. *Fragmenta Agronomica*, 34(3), 119–129.
- Whitesides, G. M. (2005).** Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*, 1, 172–179.
- Wiklon, D. R., Cox, P. D. (1992).** Drying and storage of oilseed rape in the UK. Part II. Pest control of stored oilseed rape. *HGCA Oilseed Research Review* OS6, 48.
- Wiśniewska, H., Buško, M. (2005).** Evaluation of spring wheat resistance to Fusarium seedling blight and head blight. *Biologia, Bratislava*, 60, 287–293.
- Włodarczyk, T. (2000).** Some aspects of dehydrogenase activity in soils. *International Agrophysics*, 14, 365–376.
- Włodarczyk, T., Stępniewski, W., Brzezińska, M. (2002).** Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous oxide from Cambisols under flooding conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 36, 200–206.
- Wolińska A. (2010).** Aktywność dehydrogenazowa mikroorganizmów glebowych i dostępności tlenu w procesie reoksydacji wybranych mineralnych gleb Polski. Rozprawy i Monografie. *Acta Agrophysica*, 180(3). ISSN 1234-4125.
- Wood, C. M., Hogstrand, C., Galvez, F., Munger, R. S. (1996).** The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag⁺. *Aquatic Toxicology*, 35(2), 93–109.
- Woźny, A., Przybył, K. (2004).** Komórki roślinne w warunkach stresu. T.I. Komórki in vivo. Cz. II. Wydawnictwo Naukowe UAM. ISBN 83-232-1443-3.
- Wroniak, M., Łukasik, D., Maszewska, M. (2006).** Porównanie stabilności oksydacyjnej olejów tłoczonych na zimno z olejami rafinowanymi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1(46), 214–221.
- Wroniak, M., Ptaszek, A., Ratusz, K. (2013).** Ocena wpływu warunków tłoczenia w prasie ślimakowej na jakość i skład chemiczny olejów rzepakowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1(86), 92–104.
- Wuana, R. A., Okieimen, F. E. (2011).** Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network ISRN Ecology*, ID 402647, 1–20.
- Xiang, S. R., Doyle, A., Holden, P. A., Schimel, J. P. (2008).** Drying and rewetting effects on C and N mineralization and microbial activity in surface and subsurface California grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 2281–2289.
- Xu, M., Li, J., Iwai, H., Mei, Q., Fujita, D., Su, H., Chen, H., Hanagata, N. (2012).** Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interactions. *Scientific Reports*, 2, 406.
- Xue, H. Q., Upchurch, R. G., Kwanyuen, P. (2006).** Ergosterol as a Quantifiable Biomass Marker for *Diaporthe phaseolorum* and *Cercospora kikuchii*. *Plant Disease*, 90(11), 1395–1398.
- Yang, H., Irudayaraj, J. (2001).** Comparison of near-infrared, fourier transform-infrared, and fourier transform-raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 889–895.
- Yang, H., Irudayaraj, J., Paradkar, M. M. (2005).** Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 93, 25–32.
- Yang, L. J., Li, T. L., Fu, S. F. (2005).** Effect of manure and chemical fertilizer on the dynamics of soil enzymatic activities in vegetable soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 36 (2), 223–226.
- Yasur, J., Rani, P. U. (2013).** Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 8636–8648.

- Yina, I. H., Zhao, X., Du, Y. (2010).** Oligochitosan: A plant diseases vaccine-A review. *Carbohydrate Polymers*, 82, Issue 1, 2 August, 1–8.
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T. (2000).** Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology*, 123, 223–233.
- Young, A. J. (1991).** The protective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia. Plantarum*, 83, 702–708.
- Yousuf, P. Y., Hakeem, K. U. R., Chandna, R., Ahmad, P. (2012).** Role of glutathione reductase in plant abiotic stress. W: Ahmad P, Prasad MNV (red.), Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability, *Springer Science + Business Media, LLC*, 149–158.
- Yruela, I. (2005).** Copper in plant. *Braz. Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145–156.
- Zhan, G., Huang, J., Lin, L., Lin, W., Kamana, E. J. (2011).** Synthesis of gold nanoparticles by *Cacumen platycladi* leaf extract and its simulated solution: toward the plant-mediated biosynthetic mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 4957–4968.
- Zhang, L., Feng, C., Chen, Z. (2008).** Super aligned carbon nanotube grid for high resolution transmission electron microscopy of nanomaterials. *Nano Letters*, 8(8), 2564–2569.
- Zhang, W., Savage, N. (2006).** Nanoscale Bimetallic Particles for In Situ Remediation. EPA, United States Environmental Protection Agency, Grant Number: R829625.
- Zhao, L. J., Huang, Y. X., Hu, J., Zhou, H. J., Adeleye, A. S., Keller, A. A. (2016).** H-1 NMR and GC-MS based metabolomics reveal defense and detoxification mechanism of cucumber plant under nano-Cu stress. *Environmental Sciences & Technology*, 50, 2000–2010.
- Zhao, X. R., Lin, Q., Brookes, P. C. (2005).** Does soil ergosterol concentration provide a reliable estimate of soil fungal biomass? *Original Research Article Soil Biology and Biochemistry*, 37(2), 311–317.
- Zheng, L., Hong, F., Lu, S., Liu, C. (2005).** Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104, 83–92.
- Ziemiański, S., Budzyńska-Topolowska, J. (1991).** Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe, PWN, Warszawa, 171–173.
- Żelazowska, R., Pasternak, K. (2007).** Metale szlachetne: srebro (Ag), złoto (Au), Platyna (Pt) w biologii i medycynie. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2, T. XL, 205–209.

SPIS TABEL I RYSUNKÓW

Tabele

- Tabela 1. Receptura roztworu Hoaglanda zastosowanego w doświadczeniu
- Tabela 2. Wpływ stężenia nanokoloidów na energię oraz zdolność kiełkowania nasion rzepaku
- Tabela 3. Wpływ różnego stężenia nanokoloidów na długość pędu oraz korzonków rzepaku
- Tabela 4. Zawartość makro pierwiastków w liściach rzepaku jarego opryskanego (O)NKAg
- Tabela 5. Zawartość makro pierwiastków w liściach rzepaku jarego po aplikacji (O)NKCu
- Tabela 6. Zawartość chlorofili i karotenoidów w liściach rzepaku jarego
- Tabela 7. Warunki pogodowe w latach 2016-2017
- Tabela 8. Skład granulometryczny analizowanej gleby
- Tabela 9. Zawartość składników przyswajalnych w analizowanej glebie
- Tabela 10. Wilgotność nasion, zawartość białka, tłuszczu oraz MTN rzepaku
- Tabela 11. Profil kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku jarego w 2016 roku
- Tabela 12. Profil kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku jarego w 2017 roku
- Tabela 13. Zawartość makro pierwiastków w nasionach rzepaku jarego w 2016 roku
- Tabela 14. Zawartość makro pierwiastków w nasionach rzepaku jarego w 2017 roku
- Tabela 15. Wartość współczynnika korelacji (r) między zadaniem stężeniem nanokoloidów w poszczególnych wariantach doświadczenia i zawartości wilgoci w nasionach rzepaku w roku zbioru.
- Tabela 16. Średnie stężenie ergosterolu (ERG) w nasionach rzepaku podczas przechowywania
- Tabela 17. Zawartość chlorofili i karotenoidów w oleju tłoczonym na zimno z nasion rzepaku
- Tabela 18. Analiza barwy oleju tłoczonego z nasion rzepaku na zimno
- Tabela 19. Liczba kwasowa, liczba nadtlenkowa oraz czas indukcji olejów
- Tabela 20. Położenie maksimów pasm absorpcyjnych w zakresie spektralnym od 4000 do 590 cm^{-1} wraz z przyporządkowaniem odpowiednich drgań dla oleju wytłoczonego z nasion rzepaku z uprawy w 2016 roku poddanych aplikacji nanokoloidów srebra oraz miedzi.
- Tabela 21. Położenie maksimów pasm absorpcyjnych w zakresie spektralnym od 4000 do 590 cm^{-1} wraz z przyporządkowaniem odpowiednich drgań dla oleju wytłoczonego z nasion rzepaku w roku uprawy 2017 poddanych aplikacji nanokoloidów srebra oraz miedzi

Rysunki

- Rys. 1. Schemat zakresu badań
- Rys. 2. Schemat silosu laboratoryjnego
- Rys. 3. Wyniki analizy metodą mikroskopii sił atomowych AFM dla NKCu: a) zdjęcie w formacie 2D według wysokości cząstek oraz dystrybucji nanocząstek na 100 obiektach; b) zdjęcie w formacie 3D; c) histogram wysokości nanocząstek
- Rys. 4. Wyniki analizy metodą mikroskopii sił atomowych AFM dla NKAg: a) zdjęcie w formacie 2D według wysokości cząstek oraz dystrybucji nanocząstek na 100 obiektach; b) zdjęcie w formacie 3D; c) histogram wysokości nanocząstek
- Rys. 5. Wyniki analizy nanocząstek - panel lewy – zdjęcie mikroskopowe nanocząstek NKAg w ciemnym polu tryb STEM-HAADF, panel prawy – profil liniowy ilustrujący rozmiary nano-Ag i widmo linii L-NKAg
- Rys. 6. Wyniki analizy cząstek NKCu: A – obraz TEM nanocząstek NKCu, B – transformata Fouriera FFT
- Rys. 7. Wzrost siewek rzepaku po zastosowaniu namaczania nasion w NKAg (A) i NKCu (B)
- Rys. 8. Zawartość białka rozpuszczalnego w liściach rzepaku jarego
- Rys. 9. Aktywność SOD w liściach rzepaku jarego
- Rys. 10. Aktywność CAT w liściach rzepaku jarego
- Rys. 11. Aktywność APX w liściach rzepaku jarego
- Rys. 12. Aktywność GR w liściach rzepaku jarego
- Rys. 13. Aktywność GPX w liściach rzepaku jarego
- Rys. 14. Peroksydacja lipidów LPO w liściach rzepaku jarego
- Rys. 15. Aktywność anty-ABTS w liściach rzepaku jarego
- Rys. 16. Plon świeżej i suchej masy korzeni i pędów rzepaku jarego po aplikacji NKAg
- Rys. 17. Plon świeżej i suchej masy korzeni i pędów rzepaku jarego po aplikacji NKCu
- Rys. 18. Zawartość srebra w liściach rzepaku jarego oraz miedzi po aplikacji NKAg
- Rys. 19. Zawartość Cu w liściach nasion rzepaku po oprysku NKCu
- Rys. 20. Wartość pH gleby po wysianiu nasion namoczonych (N/N) oraz namoczonych nasion i opryskanych roślin (N/O) NKAg i (N/O)NKCu
- Rys. 21. Zmiany aktywności dehydrogenaz w glebie po wysianiu namoczonych nasion i opryskaniu roślin nanokoloidami
- Rys. 22. Widma ATR-FTIR dla wybranych próbek olei wytłoczonych z nasion rzepaku jarego z uprawy w 2016 roku (linia czarna ciągła) oraz 2017 (linia szara przerywana). Panel A – kontrola, panel B – z zastosowaniem oprysku (O)NKAg, panel C – z zastosowaniem oprysku (O)NKCu, panel D – z zastosowaniem dwukrotnej aplikacji (N/O)NKAg, panel E – z zastosowaniem dwukrotnej aplikacji (N/O)NKCu. Widma w zakresie spektralnym od 590 do 4000 cm^{-1}

STRESZCZENIE

Zabiegi, którym jest poddawany rzepak jary w czasie wegetacji, mają znaczący wpływ na plon oraz jakość zebranego surowca, a także na jakość produktów końcowych z przetworzenia nasion. Alternatywą dla tradycyjnych pestycydów jest wykorzystanie w rolnictwie nanokolloidów metali jako samodzielnego nanonawozu lub dodatku do nawozów mineralnych, środków stymulujących wzrost roślin bądź zaprawy materiału siewnego. Koniecznością staje się określenie wpływu nanokolloidów metali na rośliny oraz produkty z nich wytworzone. Nanokolloidy mogą wywierać wpływ zarówno na zdrowie ludzi, jak i środowisko naturalne. Dlatego też zostały wytyczone główne cele pracy:

1. Określenie wpływu nanometali nieorganicznych w postaci nanokolloidu srebra (NKAg) oraz nanokolloidu miedzi (NKCu) na energię i zdolność kiełkowania nasion rzepaku.
2. Określenie parametrów jakości nasion pochodzących z uprawy rzepaku po aplikacji nanokolloidów srebra oraz miedzi i oleju tłoczonego na zimno z nasion rzepaku jarego. Wyznacznikiem jakości nasion były: masa tysiąca nasion (MTN), zawartość tłuszczu, profil kwasów tłuszczowych, zawartość białka i pierwiastków. Ponadto poddano ocenie zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku po procesie przechowywania w silosie laboratoryjnym. Wyznacznikiem jakości oleju tłoczonego na zimno z nasion rzepaku jarego pochodzącego z uprawy z zastosowaniem nanokolloidów były: barwa, zawartość chlorofilu *a* i *b*, karotenoidów, liczba kwasowa – LK, liczba nadtlennikowa – LN, stabilność oksydacyjna oraz analiza chemiczna wykorzystująca spektroskopię ATR-FTIR.
3. Określenie wpływu nanokolloidów na mechanizmy obronne rośliny (stres oksydacyjny) i parametry wzrostu rzepaku jarego. Ocena wpływu różnych dawek nanokolloidu na wzrost świeżej i suchej masy siewek oraz podstawowych parametrów, takich jak: zawartość białka, aktywność enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej – SOD, katalazy –CAT, peroksydazy askorbinianowej – APX, reduktazy glutationowej – GR oraz peroksydazy gwajakolowej – GPX), stopień stresu oksydacyjnego (LPO) mierzony metodą oznaczania zawartości dialdehydu malonowego (MDA), ogólna aktywność antyrodnikowa (anty-ABTS), zawartość Ag i Cu oraz makroelementów, chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w tkankach roślinnych.
4. Zbadanie wpływu różnych dawek nanokolloidów na pH gleby oraz aktywność dehydrogenaz w glebie. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że namoczenie nasion przed wysiewem w nanokolloidach w większości przypadków przyczyniło się do poprawy ich energii oraz zdolności kiełkowania w porównaniu z obiektem kontrolnym. Aplikacja nanokolloidu srebra oraz miedzi na nasiona spowodowała wydłużenie pędów i korzeni w rozwijających się siewkach. Siewki z nasion namoczonych w nanokolloidzie srebra charakteryzowały się znacznie dłuższymi korzeniami niż siewki z nasion namoczonych w nanokolloidzie miedzi. Badania zawartości tłuszczu i białka w nasionach zebranych w uprawie polowej wykazały, że aplikacja nanokolloidów w nielicznych przypadkach statystycznie istotnie różnicowała ich zawartości. Wyższą zawartość tłuszczu obserwowano w 2017 roku po aplikacji nanokolloidu miedzi – obiekt (N/O)NKCu. W 2016 roku zawartość białka była wyższa w każdym wariancie stosowania nanokolloidów oraz w roku 2017 po podwójnej aplikacji obu nanokolloidów w odniesieniu do obiektu kontrolnego. W obu latach zbioru obserwowano obniżenie masy tysiąca nasion – MTN po aplikacji nanokolloidów we wszystkich wariantach doświadczenia w odniesieniu do obiektu kontrolnego. Wyższą masą tysiąca nasion, choć statystycznie na granicy istotności odnotowano w 2017 roku dla nasion z obiektu kontrolnego oraz w nasionach z roślin poddanych aplikacji (O)NKAg lub (O)NKCu. W większości przypadków zawartość ergosterolu w nasionach rzepaku przechowywanych w silosie laboratoryjnym była istotnie niższa niż w obiekcie kontrolnym. Wartości stężenia ERG dla wszystkich wariantów doświadczenia poddanych oddziaływaniu dwóch nanokolloidów nie przekroczyły wartości uważanych za szkodliwe. Zawar-

tość barwników w oleju z obydwu lat zbioru była bardzo wysoka. Ilość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w oleju w większości przypadków, niezależnie od roku zbioru oraz ilości aplikowanych nanokolloidów, okazały się statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z ich zawartością w próbkach kontrolnych. Statystycznie istotny wzrost zawartości karotenoidów obserwowano po aplikacji nanokolloidów w obiektach (O)NKAg, (O)NKCu oraz (N/O)NKAg. Wszelkie wartości LK oraz LN mieściły się w granicach dopuszczalnych w przyjętych normach. Zaś najwyższą stabilnością oksydacyjną charakteryzowały się oleje tłoczone z nasion zebranych w obydwu latach w doświadczeniu z zastosowaniem namoczenia nasion oraz oprysku roślin nanokolloidami w obiektach (N/O)NKAg oraz (N/O)NKCu. Rośliny rzepaku jarego poddano oddziaływaniu nanocząstek metali (srebra i miedzi) w postaci oprysku w 22 (wczesny stres) i 29 (późniejszy stres) dniu ich wzrostu. Przeprowadzona analiza wykazała, że rodzaj, dawka i czas oddziaływania nanokolloidów na rośliny miały wpływ na wielkość plonu świeżej masy oraz powstawanie zakłóceń w relacjach między związkami utleniającymi a przeciwutleniającymi, powodując zachwianie tej równowagi w kierunku reakcji utlenienia i tworząc reaktywne formy tlenu (RFT – stres oksydacyjny).

Wysiew nasion namoczonych w nanokolloidzie srebra (w każdym wariancie doświadczenia) i miedzi do gleby oraz przeprowadzenie dodatkowo oprysku roślin spowodowało statystycznie istotne obniżenie aktywności enzymatycznej dehydrogenaz. Uzyskane wyniki badań pozwoliły zweryfikować hipotezy badawcze, potwierdzając je w większości przypadków w całości lub częściowo w zależności od analizowanego parametru lub też zaprzeczając ich słuszności. Do hipotez potwierdzonych lub potwierdzonych częściowo niniejszymi wynikami należą:

- Zastosowanie nanokolloidów srebra oraz miedzi w formie zaprawy nasion rzepaku jarego, aplikowanej przez namoczenie, przyczynia się do poprawy parametrów energii i zdolności kiełkowania.
- Nasiona rzepaku jarego zebrane z uprawy polowej, w której wykorzystano nanokolloidy srebra oraz miedzi i przechowywane w silosie, charakteryzują się wyższą odpornością i mniejszą biomasą grzybową (ilością ergosterolu).
- Aplikacja nanokolloidów srebra oraz miedzi na rośliny rzepaku jarego w czasie początku kwitnienia (61-66 BBCH) przyczynia się do poprawy stabilności oksydacyjnej oleju tłoczonego metodą na zimno.
- Wysiew nasion zaprawionych nanokolloidami srebra oraz miedzi do gleby, a następnie oprysk roślin zwiększa liczbę nanocząstek w glebie, powodując obniżenie aktywności dehydrogenaz.

Zaprzeczono słuszności hipotezy:

- Nanokolloidy srebra i miedzi niezależnie od stosowanej dawki nie mają wpływu na wzrost roślin rzepaku oraz nie powodują zakłóceń w równowadze między utleniaczami a przeciwutleniaczami i niw wywołują stresu oksydacyjnego.
- Aplikacja nanokolloidów srebra oraz miedzi na nasiona w formie zaprawy oraz na rośliny rzepaku jarego, jako nanonawozu podawanego nalistnie, wpływa pozytywnie na wybrane parametry jakościowe zebranych nasion (MTN, zawartość tłuszczu i białka).

Słowa kluczowe: nanokolloidy, jakość nasion rzepaku, jakość oleju, przechowywanie

Influence of metal nanocolloids on selected quality parameters of spring rape seeds, plants and oil

Abstract

Treatments to which spring rapeseed is subjected during vegetation have a considerable impact on the yield and quality of the harvested raw material, as well as on the quality of final products from seed processing. The use of metal nanocolloids in agriculture as an independent nanofertilizer or an additive to mineral fertilizers, substances that stimulate the plant growth or seed dressing is an alternative for traditional pesticides. Determination of the impact of metal nanocolloids on plants and products made thereof has become a necessity. Nanocolloids may affect the people's health and natural environment. Therefore, main objectives of the paper has been set out:

1. Determination of the impact of non-organic nanometals in the form of silver nanocolloid (NKAg) and copper nanocolloid (NKCu) on the rape seeds germination energy and ability.
2. Determination of the quality parameters of seeds from rapeseed cultivation after application of silver and copper nanocolloids and cold -pressed oil of spring rapeseed. The following indicated the seed quality: thousand seeds mass, fat content, fat acids profile, protein and minerals content. Moreover, the content of ergosterol in rape seeds after the storage in the laboratory silo was assessed. The quality indicators of the cold-pressed oil from rape seeds from the cultivation which used nanocolloids were: colour, a and b chlorophyll content, acid value, peroxide value, oxidation stability and chemical analysis which uses ATR-FTIR spectroscopy.
3. Determination of the impact of nanocolloids on the protective mechanisms of plants (oxidative stress) and growth parameters of spring rapeseed. Assessment of the impact of various doses of nanocolloids on the growth of fresh and dry mass of seedlings and basic parameters such as: protein content, activity of antioxidation enzymes (superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT, ascorbinian peroxidase - APX, glutathione reductase - GR and guaiacol peroxidase - GPX), oxidative stress level measured with the method of determination of the malone dialdehyde (MDA), general antiradical activity (anty-ABTS), Ag and CU content as well as macroelements, a and b chlorofile and carotenoids in plant tissues.
4. Checking the impact of various nanocolloids doses on the soil pH and activity of dehydrogenases in soil.

Based on the obtained results it can be stated that soaking seeds in nanocolloids before sowing in majority of cases caused the improvement of the germination energy and ability in comparison to the test object. Application of silver and copper nanocolloids resulted in elongation of sprouts and roots in maturing seedlings. Seedlings of seeds soaked in silver nanocolloids characterized with a considerably longer roots than seedlings from seeds soaked in copper nanocolloids.

Tests on the fat and protein content in seeds collected in the field crop showed that application of nanocolloids in a low number of cases, statistically significantly differentiated their content. A higher content of fat was observed in 2017 after application of copper nanocolloids - object (N/O)NKCu. In 2016, the protein content in each variant of using nanocolloids and in

2017 after double application of both nanocolloids, the protein content was higher in comparison to the test object.

In both years of harvesting, a thousand seeds mass was reduced after application of nanocolloids in all variants of the experiment in comparison to the test object. A higher thousand seeds mass, although statistically at the limit of significance, was reported in 2017 for seeds from the test object and in seeds from plants subjected to application of (O)NKAg or (O)NKCu.

In majority of cases, the content of ergosterol in rape seeds stored in the laboratory silo was significantly higher than in the test object. The ERG concentration value for all variants of the experiment subjected to the impact of two nanocolloids did not exceed the values considered as harmful.

The content of dye in oil from both years of harvesting was very high. The amount of chlorophyll a and b and carotenoids in oil in majority of cases, regardless the harvesting year and the amount of applied nanocolloids, proved to be statistically significantly higher in comparison to their content in test samples. A statistically significant growth of carotenoids was reported after application of nanocolloids in objects (O)NKAg, (O)NKCu and (N/O)NKAg.

Any values of LK and LN were within the limits admissible in accepted standards. While, the highest oxidation stability was in case of oils pressed from seeds harvested in both years in the experiment with soaking of seeds and plant spraying with nanocolloids in objects (N/O)NKAg and (N/O)NKCu.

Rapeseed plants were subjected to the influence of metal (silver and copper nanoparticles in the form of spraying on the 22 (early stress) and on the 29th (later stress) day of growth. The analysis that was carried out proved that the type, dose and time of the nanocolloids impact on plants affected the size of the fresh mass yield and formation of disturbances in relations between oxidizing and antioxidant compounds resulting in upsetting the balance towards oxidizing reaction and forming reactive oxygen forms (FRT - oxidative stress). Sowing of seeds soaked in silver nanocolloid (in each variant of the experiment) and copper to soil and additional spraying of plants caused statistically significant reduction of the enzymatic activity of dehydrogenases.

The obtained results of the study enabled verification of scientific hypotheses confirming them in majority of cases in full or partially depending on the analysed parameter or denying their rightness. Hypotheses confirmed or partially confirmed with this results include:

- application of silver and copper nanocolloids in the form of spring rapeseed dressing, by soaking, causes improvement of germination energy and ability.
 - Rape seeds harvested from the field crop that used silver and copper nanocolloids and stored in the silo have a higher resistance and lower fungi biomass (amount of ergosterol).
 - Application of nanocolloids of silver and copper on spring rapeseed at the beginning of flowering (61-66 BBCH) causes improvement of the oxidization stability of cold-pressed oil.
- Sowing of seeds dressed with silver and copper to soil and then spraying of plants increases the number of nanoparticles in soil and causes reduction of dehydrogenases activity.

The rightness of the hypothesis was denied.

- Silver and copper nanocolloids, regardless the applied dose, do not affect the growth of rapeseed plants and do not cause disturbances between oxidizers and anti-oxidisers and do not cause the oxidative stress.
- Application of silver and copper nanocolloids on seeds in the form of dressing and on the spring rapeseed plants as nanofertilizer sprayed on leaves positively affects the selected quality parameters of harvested seeds (thousand seeds mass, fat and protein content).

Key words: nanocolloids, quality of rapeseeds, quality of oils, storage

