

Streszczenie

Alachlor i metolachlor są przed- i powschodowymi herbicydami, powszechnie stosowanymi w ochronie upraw rolniczych i ogrodniczych ze względu na dużą skuteczność oraz umiarkowaną trwałość w środowisku. Z powodu niekontrolowanego oraz nadmiernego stosowania tych herbicydów, substancje te stanowią realne zagrożenie dla środowiska naturalnego oraz organizmów niebędących celem zwalczania. Biodegradacja jest najważniejszą i najefektywniejszą drogą eliminacji chloroacetanilidów ze środowiska, a kluczową rolę w tym procesie przypisuje się mikroorganizmom wyizolowanym ze skażonych środowisk, które często charakteryzują się tolerancją w stosunku do toksycznych związków.

Niniejsza praca doktorska dotyczy zdolności wybranych szczepów *Trichoderma* w biotransformacji alachloru i metolachloru z jednoczesnym uwzględnieniem oddziaływania tychże związków na system antyoksydacyjny oraz profil lipidowy modelu badawczego. Ponadto poddano również ocenie zdolność *Trichoderma* spp. do promowania wzrostu roślin.

W trakcie realizacji pierwszego celu rozprawy doktorskiej wykazano, iż wszystkie badane szczepy *Trichoderma*: *T. atroviride* IM QF10, *T. hamatum* IM I-1, *T. harzianum* IM 0961, *T. koningii* IM 0956, *T. citrinoviride* IM 6325, *T. harzianum* KKP 534, *T. viride* KKP 792 oraz *T. virens* DSM 1963 charakteryzują się zdolnością do eliminacji alachloru i metolachloru, ale różnią się pod względem efektywności degradacji tych związków. Metabolizm chloroacetanilidów przez badane grzyby strzępkowe przebiega głównie na drodze reakcji dechlorynacji, demetylacji oraz hydroksylacji. Analiza toksyczności produktów mikrobiologicznej degradacji ksenobiotyków wskazuje na zmniejszenie toksyczności środowiska. Stwierdzono również, że w przypadku szczepu *T. koningii* IM 0956 eliminacja alachloru jest złożonym procesem obejmującym udział zarówno cytochromu P450 jak i lakazy. Kolejny cel naukowy dotyczył wpływu badanych szczepów *Trichoderma* na wzrost 7-dniowych siewek rzepaku poddanych ekspozycji na alachlor i metolachlor. Spośród badanych szczepów *Trichoderma*: *T. harzianum* KKP 534, *T. viride* KKP 792, *T. koningii* IM 0956 oraz *T. virens* DSM 1963 stymulowały wzrost korzeni i pędów rzepaku zarówno w układzie z jak i bez dodatku herbicydów. Wykazano również, że wszystkie szczepy wykazują cechy świadczące o promowaniu wzrostu m.in. zdolność do wytwarzania sideroforów czy rozpuszczanie fosforanów. Dla najbardziej aktywnych w degradacji

Trichoderma spp. wykazano aktywność deaminazy 1-aminocyklopropano-1-karboksylowej (ACC), a dla szczepu *T. harzianum* IM 0961 aktywność tego enzymu była wyższa po ekspozycji na chloroacetanilidy. Podczas realizacji ostatniego celu niniejszej pracy sprawdzono oddziaływanie alachloru i metolachloru na drobnoustroje zdolne do ich efektywnej biotransformacji. Detekcja *in situ* wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu oraz obecność produktów peroksydacji białek i lipidów w wykładniczej fazie wzrostu badanych *Trichoderma* spp. potwierdziła indukcję stresu oksydacyjnego w wyniku ekspozycji na alachlor i metolachlor. Z drugiej strony znaczący spadek RFT oraz produktów peroksydacji białek, a także zmiany w aktywności katalazy w fazie stacjonarnej (72 h) wskazują na aktywną obronę systemu antyoksydacyjnego badanych grzybów strzępkowych w odpowiedzi na stres wywołany obecnością chloroacetanilidów. Zmiany w profilu fosfolipidowym grzybów *Trichoderma*, zwłaszcza w obrębie dwóch głównych klas PC i PE w odpowiedzi na toksyczne działanie herbicydów, mogą świadczyć o mechanizmie adaptacyjnym. Ponadto nie odnotowano statystycznie znaczącego wzrostu przepuszczalności błon komórkowych *Trichoderma* spp po ekspozycji na chloroacetanilidy.

Badania przeprowadzone w trakcie tworzenia niniejszej rozprawy doktorskiej mają charakter podstawowy, niemniej jednak wykazały możliwość potencjalnego zastosowania kosmopolitycznych grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* w bioremediacji obszarów rolniczych skażonych pozostałościami chloroacetanilidów. Jest to szczególnie istotne w przypadku alachloru, którego stosowanie w UE zostało zabronione m.in. ze względu na ksenoestrogenne właściwości. Spośród badanych szczepów *Trichoderma* najbardziej interesującym modelem badawczym jest *T. koningii* IM 0956 ze względu na jedną z najlepszych aktywności degradacyjnych herbicydów połączoną z jednoczesnym promowaniem wzrostu, również w obecności alachloru i metolachloru.

Justyna Nykiel-Szymurańska

Abstract

Alachlor and metolachlor are pre- and post-emergent herbicides commonly used in the protection of agricultural and horticultural crops due to their high effectiveness and moderate environmental stability. Owing to the uncontrolled and excessive use of these herbicides, they pose a real threat to the natural environment and non-target organisms. Biodegradation is the most important method of controlling the dissipation of chloroacetanilide herbicides in the natural environment, a key role in this process is attributed to microorganisms isolated from contaminated environments, which are often characterized by tolerance to toxic compounds.

This doctoral thesis focuses on the analysis of the ability of selected *Trichoderma* strains to biotransform alachlor and metolachlor with a simultaneous consideration of the impact of these compounds on the antioxidant system and lipid profile of the fungal research model. Moreover, *Trichoderma* spp. ability to promote plant growth has been evaluated.

During the study, it was shown that all tested *Trichoderma* strains: *T. atroviride* IM QF10, *T. hamatum* IM I-1, *T. harzianum* IM 0961, *T. koningii* IM 0956, *T. citrinoviride* IM 6325, *T. harzianum* KKP 534, *T. viride* KKP 792 and *T. virens* DSM 1963 were characterized by the ability to eliminate alachlor and metolachlor but differed in the efficiency of degradation of the xenobiotics. Biotransformation of the herbicides was performed mainly by the reaction of dechlorination, demethylation and hydroxylation. The analysis of the toxicity of microbial degradation products of chloroacetanilides indicated a reduction in environmental toxicity. It was also found that in the case of the strain *T. koningii* IM 0956, the elimination of alachlor was a complex process involving both cytochrome P450 and laccase. The subsequent aim of the thesis concerned the impact of the studied *Trichoderma* strains on the growth of 7-day rape seedlings exposed to alachlor and metolachlor. Among the tested *Trichoderma* strains, *T. harzianum* KKP 534, *T. viride* KKP 792, *T. koningii* IM 0956 and *T. virens* DSM 1963 stimulated the growth of roots and shoots of rapeseed seedlings treated with alachlor or metolachlor. All tested strains exhibited plant growth-promoting traits, such as siderophore production and phosphate solubilization, even in the presence of chloroacetanilide herbicides. *Trichoderma* spp. with the highest capability to effectively eliminated tested chloroacetanilides, were also characterized by the ability to produce

1-aminocyclopropane-1-carboxylic deaminase (ACCD), and for the *T. harzianum* IM 0961 strain the activity of this enzyme was higher after exposure to chloroacetanilides. The last stage of the thesis was an assessment of the effect of alachlor and metolachlor on microorganisms capable of their effective biotransformation. The overproduction of intracellular reactive oxygen species (especially the superoxide anion) and increased lipid and protein oxidative damage confirmed chloroacetanilide-induced stress in *Trichoderma* spp. cultures during the exponential phase of growth. In turn, a considerable decline in the ROS levels and the carbonyl group content (biomarkers of protein peroxidation) in a time-dependent manner and changes in the antioxidant enzyme activities indicated an active response against chloroacetanilide-induced oxidative stress and the mechanism of tolerance in the tested fungi. The changes in the overall content of two main PLs groups (PC and PE) can be considered as defense response of fungal cells against the toxic action of chloroacetanilides. In addition, there was no statistically significant increase observed in the permeability of *Trichoderma* spp. cell membranes after exposure to chloroacetanilides.

The research carried out during the creation of this doctoral dissertation has a basic character, however, it has shown the potential for the use of cosmopolitan filamentous fungi from the genus *Trichoderma* in bioremediation of agricultural areas contaminated with chloroacetanilides. Among the tested *Trichoderma* strains, *T. koningii* IM 0956 has been found to be the most interesting research model because of its the high ability to eliminate the tested chloroacetanilides and multiple PGP activities even in the presence of the herbicides.

Justyna Nykiel-Szymanska