

Stacjonarne Studia Doktoranckie Mikrobiologii,
Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej

mgr Krzysztof Piotrowski

**Opracowanie strategii upraw roślin
energetycznych metodami
ekologicznymi w warunkach globalnych
zmian klimatycznych i środowiskowych**

Development of a strategy for the cultivation of energy
crops with ecological methods in the conditions of global
climate and environmental changes

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Ekofizjologii Roślin Instytutu
Biologii Eksperymentalnej

pod kierunkiem

dr hab. Zdzisławy Romanowskiej-Duda, prof. UŁ

Praca doktorska wykonana w ramach Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Mikrobiologii,
Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej w Katedrze Ekofizjologii Roślin
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach:
Grantu N305 322035 NCN „Opracowanie strategii upraw roślin energetycznych metodami
ekologicznymi w warunkach globalnych zmian klimatycznych i środowiskowych”

(Współpraca naukowa z Instytutem Ogrodnictwa w Skierniewicach);

BIOSTRATEG II, 2016-2020, Projekt /296369/5/NCBR/2016 NCBR.

Projekt realizowany w KONSORCJUM "BIOKONWERSJA":
„Przetwarzanie biomasy odpadowej w skojarzonych procesach biologiczno-chemicznych”;
“Processing of waste biomass in the associated biological and chemical processes”,

Podziękowania

Ta praca doktorska, będąca zwieńczeniem blisko siedmiu lat pracy, nie powstałaby bez wsparcia i życzliwości wielu osób. Ich obecność, zrozumienie i pomoc pozwoliły mi dotrzeć do końca pomimo chwil zwątpienia.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania *Pani Dr hab. Zdzisławie Romanowskiej-Duda Prof. UŁ* za nieocenioną pomoc i wsparcie merytoryczne udzielone w trakcie przygotowywania niniejszej pracy doktorskiej, cierpliwość i wyrozumiałość oraz motywację do krytycznego spojrzenia na problematykę badawczą.

Dziękuję Panu *Prof. dr hab. Mieczysławowi Grzesikowi* za umożliwienie wykonywania badań w ramach współpracy z Instytutem Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz za wsparcie merytoryczne.

Chciałbym również podziękować Rodzinie oraz Przyjaciołom, za nieustanne wsparcie oraz motywację. Pragnę podziękować wszystkim moim Przyjaciołom, którym nie znudziło się pytać „Jak tam doktorat?”, ani słuchać w odpowiedzi „już niedługo”.

Bardzo serdecznie dziękuję.

Krzysztof Piotrowski

SPIS TREŚCI

1. WYKAZ ORYGINALNYCH PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	6
2. WYKAZ ORYGINALNYCH PRAC NIEBĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.....	8
3. UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH	10
4. WYKAZ PROJEKTÓW	14
5. NAGRODY I WYRÓŻNIENIA.....	15
6. WYKAZ ZGŁOSZEŃ PATENTOWYCH.....	16
7. PRACE ORGANIZACYJNE NA RZECZ WYDZIAŁU BIOŚ UNIWERSYTETU ŁÓDZKIEGO.....	17
8. STRESZCZENIE	18
9. ABSTRACT	19
10. WYKAZ SKRÓTÓW	21
11. WSTĘP.....	22
11.1. Globalne zmiany klimatyczne	22
11.2. Udział biomasy roślin energetycznych w bilansie OZE.....	24
11.3. Charakterystyka wybranych gatunków roślin energetycznych	25
11.3.1. Wierzba wiciowa (<i>Salix viminalis</i> L.).....	25
11.3.2. Słonecznik bulwiasty (<i>Helianthus tuberosus</i> L.).....	26
11.3.3. Ślaziolec pensylwański (<i>Sida hermaphrodita</i> L. Rusby).....	26
11.4. Produkcja energii z biomasy (toryfikacja).....	27
12. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	28
12.1. Cel pracy.....	28
12.2. Hipotezy badawcze.....	28
13. MATERIAŁ I METODY	30
13.1. Testowane gatunki roślin.....	30
13.2. Środki biologiczne.....	30
13.2.1. Biojodis	30
13.2.2. Asahi SL.....	30

13.2.3. Mieszaniny monokultur okrzemek i nietoksycznych <i>Cyanobacteria</i>	30
13.3. Warunki uprawy i metody traktowania roślin	31
13.4. Analiza statystyczna wyników	32
13. WYNIKI BADAŃ	33
14.1. Publikacja nr 1	33
14.2. Publikacja nr 2	34
14.3. Publikacja nr 3	35
14.4. Publikacja nr 4	36
14.5. Publikacja nr 5	37
14.6. Publikacja nr 6	38
14. DYSKUSJA	40
15.1. Wytoczne UE w zakresie OZE	40
15.2. Zmiany klimatyczne	41
15.3. Zapotrzebowanie na biomasę roślin energetycznych do wytworzenia energii z OZE	42
15.4. Wpływ preparatów biologicznych na wzrost i rozwój roślin energetycznych	42
15. WNIOSKI	46
16. PODSUMOWANIE.....	48
17. LITERTURA	50
18. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	53

1. WYKAZ ORYGINALNYCH PRAC BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- Publikacja nr 1** **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2014. Climate change and the cultivation of energy crops. *Acta Innovations*, ISSN 2300-5599, nr. 11, str. 19-29.
MEN- 8 p.
- Publikacja nr 2** M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, R. Janas, 2015. Okrzemki (*Bacillariophyceae*) jako efektywne bazy nawozów ekologicznych nowej generacji. *Przemysł Chemiczny*, 94/3; s: 391-396.
IF₂₀₁₉- 0,485; IF₅-0,405; MEN-40p.
- Publikacja nr 3** **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2016. „*Cyanobacteria*, Asahi SL i Biojodis jako biostymulatory poprawiające wzrost i rozwój ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) w niekorzystnych warunkach zmieniającego się klimatu”. *Przemysł Chemiczny*, Vol.95, No.8, 1569-1573.
IF₂₀₁₉- 0,485; IF₅-0,405; MEN-40p.
- Publikacja nr 4** **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, 2018. „Positive impact of bio-stimulators on growth and physiological activity of willow in climate change conditions”. *International Agrophysics*. Vol. 32, doi:10.1515/intag-2017-0006.
IF₂₀₁₉-1,655; IF₅- 1,776; MEN-70 p.
- Publikacja nr 5** **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, B. Messyasz, 2020. „Cultivation of energy crops by ecological methods under the conditions of global climate and environmental changes with the use of diatom extract as a natural source of chemical compounds”. *Acta Physiologiae Plantarum*., 42:146, doi.org/10.1007/s11738-020-03135-8.
IF₂₀₁₉- 1,76; IF₅- 2,078; MEN-70p.

Publikacja nr 6 S. Szufa, P. Piersa , Ł. Adrian, J. Sielski, M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, W. Lewandowska, 2020. „Acquisition of Torrefied Biomass from Jerusalem Artichoke Grown in a Closed Circular System Using Biogas Plant Waste”. Molecules 25, 3862; doi:10.3390/molecules25173862.
IF₂₀₁₉- 3,267; IF₅- 3,589; MEN-100p.

Sumaryczny IF= 7,652; IF_{5letni} = 8,253;

Sumaryczna punktacja wg MEN z 2021 r = 328 p.

2. WYKAZ ORYGINALNYCH PRAC NIEBĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- Publikacja nr 1** M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, 2009. "New technologies of the energy plant production in the predicted climate changed conditions". "Bjuleten Djerżawnowo Nikitskowo Botaniczieskowo Sada". Ukrainska Akademia Agrarnych Nauk, ISSN 0513-1634, nr 99, s. 65-68.
MEN- 6p.
- Publikacja nr 2** M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, K. Piotrowski, 2009. „The effect of potential change in climatic conditions on the development of the energy willow (*Salix viminalis*) plants”. "Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMEPE) and SECOTOX Conference", Mykonos, Ed: A. Kungolos, K. Aravossis, A. Karagiannidis, P. Samaras, GRAFIMA" Publ., D. Gounari 62-68, Thessaloniki, ISBN 978-960- 6865-09-1, vol. IV, pp. 1877-1882
MEN- 8 p.
- Publikacja nr 3** Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, W. Pszczółkowski, **K. Piotrowski**, A. Pszczółkowska, 2014. „Dydaktyczne i środowiskowe funkcje kolekcji roślin energetycznych w Centrum Transferu Technologii OZE w Konstantynowie Łódzkim”, Acta Innovations, nr 13, s.41-52. ISSN 2300-5599.
MEN- 8 p.
- Publikacja nr 4** Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, W. Pszczółkowski, **K. Piotrowski**, A. Pszczółkowska, 2014. „Założenia programowe badań naukowych w Centrum Transferu Technologii w obszarze odnawialnych źródeł energii w zakresie przetwarzania biomasy roślin energetycznych”, Acta Innovations, nr 13, s.13-24, ISSN 2300-5599.
MEN- 8 p.
- Publikacja nr 5** **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2016. „How Biojodis and *Cyanobacteria* alleviate the negative influence of

predicted environmental constraints on growth and physiological activity of corn plants”, Polish Journal of Environmental Studies, Vol. 25, No. 2, s.1-10, ISSN 1230-1485.

IF₂₀₁₉- 1,383; IF₅- 1,421; MEN-40p.

Publikacja nr 6 Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, P. Dziugan, 2018. „Utilization of Waste from Methane Fermentation in *Lemnaceae* Plant Breeding Intended for Energy Purposes”. Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation, Springer Proceedings in Energy, pp.267-274. doi:10.1007/978-3-319-72371-6_26.
MEN- 80 p.

Publikacja nr 7 Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, N. Jagiełło, M. Dębowski, M. Zieliński, 2019. “Development of new *Lemnaceae* breeding technology using Apol-humus and biogas plant waste”. International Agrophysics, 33(3), s. 297–302, doi: <https://doi.org/10.31545/intagr/108975>.
IF₂₀₁₉-1,655; IF₅- 1,776; MEN-70 p.

Publikacja nr 8 Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, B. Wolska, M. Dębowski, M. Zieliński, P. Dziugan, S. Szufa, 2020. „Stimulating effect of ash from *Sorghum* on the growth of *Lemnaceae* - a new source of energy biomass”. Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation, Springer Proceedings in Energy, s. 341-349, doi:10.1007/978-3-030-13888-2_34
MEN--80 p.

Sumaryczny IF= 3,038; IF_{5letni} = 3,197;

Sumaryczna punktacja MEN = 300 p.

Punktacja wg wykazu Ministerstwa Nauki i Edukacji z dnia 9 lutego 2021 roku.

3. UDZIAŁ W KONFERENCJACH NAUKOWYCH

1. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, 2009. "New Technologies of the energy plant production in the predicted climate changed conditions". International Conferences Actual Problems of Applied Genetics, Breeding and Biotechnology of Plants, 2-7. 11, Yalta. Abstrakt str. 77 (plakat).
2. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, 2009. "Development of the energy willow (*Salix viminalis*) plants in the expected climate changed conditions", 2nd International CEMEPE and SECOTOX Conferences Mykonos, June 21-26, 2009, ISBN 578-960-6865-08-4. Abstrakt str. 438 (plakat).
3. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, 2011. "Influence of Biojodis on the physiological activity of corn plants in the predicted environmental constraints", 15th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA 2015, July 3-8, HONG KONG). Abstrakt str. 10 (plakat).
4. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2015. „Wpływ Asahi SL na wzrost i aktywność fizjologiczną kukurydzy (*Zea mays*) w warunkach zmieniającego się klimatu”, Lublin; 28-29.11.2015, Ogólnopolskie Sympozjum Energii Odnawialnej–„OZE– Energia przyszłości”. Abstrakt str. (plakat).
5. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, W. Pszczółkowski, 2015. „Cyanobacteria jako ekologiczny bionawóz w uprawach słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) w warunkach zmieniającego się klimatu”, Częstochowa; 17-20.11.2015, „Technologia uprawy mikroglonów w bioreaktorach zamkniętych z recyklingiem CO₂ i innych odpadów z biogazowni" (plakat).
6. Pszczółkowska, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, **K. Piotrowski**, 2015. „Zastosowanie biomasy mikroglonów w agrotechnologii uprawy roślin energetycznych”, Częstochowa; 17-20.11.2015, „Technologia uprawy mikroglonów w bioreaktorach zamkniętych z recyklingiem CO₂ i innych odpadów z biogazowni" (plakat).
7. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2016. „Influence of natural biostimulators on growth and physiological activity of willow plants (*Salix viminalis* L.)

- in the conditions of global climate change". 11th International Conference on Agrophysics, 26-28 września 2016, Lublin, Polska, abstrakt str. 1.
8. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, A. Pszczółkowska, W. Pszczółkowski, 2016. „Growth characteristics of plants *Lemna minor* L. cultivated in vitro in laboratory conditions, supplemented by leachate coming from the process of methane fermentation”. Międzynarodowa konferencja: X Conference „*In Vitro* Cultures in Plant Physiology” 7-9 grudnia 2016 Kraków, Polska (plakat).
 9. Pszczółkowska, Z. Romanowska-Duda, W. Pszczółkowski, **K. Piotrowski**, M. Dębowski, M. Zieliński, P. Dziugan 2016. „Strain of *Chlorella* sp. proposed for cultivation in biorefinery as a part of waste treatment”. Międzynarodowa konferencja: X Conference „*In Vitro* Cultures In Plant Physiology” 7-9 grudnia 2016 Kraków, Polska (plakat).
 10. W. Pszczółkowski, Z. Romanowska-Duda, A. Pszczółkowska, **K. Piotrowski**, M. Dębowski, M. Zieliński, P. Dziugan 2016. „Microalgae species *Scenedesmus obliquus* as a potential candidate for utilization of wastes from biogas production”. Międzynarodowa konferencja: X Conference „*In Vitro* Cultures in Plant Physiology” 7-9 grudnia 2016 Kraków, Polska (plakat).
 11. Z. Romanowska-Duda, K. Śmigielski, **K. Piotrowski**, B. Wolska, P. Dziugan, 2017. „Economical production of biomass of aquatic plants *Lemnaceae* as an ecological source of Energy”. The XLVI ESNA ANNUAL MEETING 29 sierpnia – 1 września 2017, Wieliczka, Polska (plakat).
 12. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, 2017. “Development of an innovative technology to culture energetic plants with the use of ecological stimulators of natural origin, taking *Helianthus tuberosus* as an example”. 2nd International Conference on the Sustainable Energy and Environment Development – SEED’17, 14 – 17 października 2017, Kraków, Polska (plakat).
 13. Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, P. Dziugan, 2017. “Utilization of waste from methane fermentation in *Lemnaceae* plant breeding intended for energy purposes”. IV Międzynarodowa Konferencja Odnawialne Źródła Energii: technika, technologie, innowacje, 20-23 czerwca 2017, Krynica-Zdrój, Polska (plakat).

14. Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, M. Grzesik, R. Janas, 2017. "Increasing the potential of biomass production of *Spirodela polyrrhiza* using the Apol-humus stimulator". IV Międzynarodowa Konferencja Odnawialne Źródła Energii: technika, technologie, innowacje 20-23 czerwca 2017, Krynica-Zdrój, Polska (plakat).
15. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, 2018. "Development of innovative cultivation technologies of *Helianthus tuberosus* L. with the use of natural biostimulators". 7th International Conference for Young Researchers, Multidirectional Research in Agriculture, Forestry and Technology. 16-17 kwiecień 2018, Kraków, Polska (referat).
16. Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, B. Wolska, 2018. „Stimulating effect of ash from *Sorghum* on the growth of *Lemnaceae* - a new source of energy biomass". V Międzynarodowa Konferencja Odnawialne źródła energii. Techniki, technologie, innowacje (Renewable energy sources. Engineering, technology, innovation). 20-22 czerwca 2018 r.– Krynica-Zdrój, Polska (plakat).
17. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, 2018. „Development of innovative *Lemnaceae* plants technologies with the use of Apol-Humus, a natural stimulator". 12th International Conference on Agrophysics: Soil, Plants & Climate, 17-19 września 2018, Lublin, Polska. Abstrakt str. 163, (plakat).
18. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, 2018. „Cultivation of energy plants with the use of diatoms (*Bacillariophyceae*) in the unusual conditions of a changing climate". 12th International Conference on Agrophysics: Soil, Plants & Climate, 17-19 września 2018, Lublin, Polska. Abstrakt str. 164, (plakat).
19. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, N. Jagiełło, B. Wolska, P. Dziugan, 2018. „Economic production of *Lemnaceae* on the effluents from the technological process of biogas plants and biostimulators". Fifth International Symposium on Green Chemistry, Sustainable Development and Circular Economy, 30 września – 3 października, Skiathos, Grecja. Abstrakt str. 139, (referat).
20. A. Pszczółkowska, Z. Romanowska-Duda, W. Pszczółkowski, **K. Piotrowski**, M. Dębowski, M. Zieliński, 2018. „Biogas plant waste as a sustainable feedstock for the production of *Chlorella vulgaris* biomass. Treatment of post-fermentation leachates with microalgae". Fifth International Symposium on Green Chemistry, Sustainable

- Development and Circular Economy, 30 września – 3 października, Skiathos, Grecja. Abstrakt str. 172, (plakat).
21. Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, D. Stępiński, 2019. “Ashes from Sorgo as a supplement in the organic production of biomass of aquatic plants”. 19th International Symposium on Toxicity Assessment, 25-30 Sierpnia 2019, Thessaloniki, Grecja. Abstrakt str. 17, (plakat).
 22. Z. Romanowska-Duda, **K. Piotrowski**, S. Kowalczyk, A. Nowak, 2019. „The effect of post-fermentation effluents on the aquatic plants biomass”. VI Międzynarodowa Konferencja Odnawialne źródła energii: technika, technologie, innowacje. 12-14 czerwca 2019 r.– Krynica-Zdrój, Polska. Abstrakt str. 45, (plakat).
 23. Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, **K. Piotrowski**, R. Janas, S. Szufa, 2019. „Post-fermentation waste from biogas plants - a natural fertilizer in plant cultivation. Circular economy”. Australian Society of Plant Scientists Conference ASPS 2019, 26-29 listopada, Melbourne, Australia. Abstrakt str. 87, (plakat).
 24. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, S. Szufa, 2019. “Fluorescence of chlorophyll as a tool for assessing the vigor of *Lemnaceae* plants grown on digestate from biogas plant in Piaszczyzna (Poland)”. Australian Society of Plant Scientists Conference ASPS 2019, 26-29 listopada, Melbourne, Australia. Abstrakt str. 81, (plakat).
 25. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Skłodowska, M. Naliwajski, 2019. „The effect of salt stress on the growth and development of *Lemnaceae* aquatic plants”. XI Conference “In Vitro Cultures In Biotechnology and Plant Physiology”, 4-6 grudnia 2019, Kraków, Polska. Abstrakt str. 61.
 26. Z. Romanowska-Duda, A. Pszczółkowska, **K. Piotrowski**, W. Pszczółkowski, A. Stępiński, 2019. “The model of sustainable aquatic plant biomass production for biofuels”. XI Conference “In Vitro Cultures In Biotechnology and Plant Physiology”, 4-6 grudnia 2019, Kraków, Polska. Abstrakt str. 63, (plakat).
 27. **K. Piotrowski**, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, R. Janas, 2020. “Post-fermentation effluents from a biogas plant as a source of biologically active compounds used to enhance the photosynthesis process in plants”. International Research Conference ICCSA 14. International Conference on Crop Science and Agronomy, 5-7 lutego 2020, Lizbona, Portugalia. Abstrakt str. 395, (referat).

4. WYKAZ PROJEKTÓW

SWITCH - "Sustainable Water Integrated Management Towards Tomorrow's Cities Health" („Zintegrowane Zarządzanie Wodą to Zdrowie w Mieście Jutra”), wykonany w ramach 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej, Departament Ekologii Stosowanej Urzędu Miasta Łodzi i ERCE pod auspicjami UNESCO, Łódź, Polska 2007.

Grant N305 322035 NCN „Opracowanie strategii upraw roślin energetycznych metodami ekologicznymi w warunkach globalnych zmian klimatycznych i środowiskowych” (Współpraca naukowa z Instytutem Ogrodnictwa w Skierniewicach);

BIOSTRATEG II, 2016-2020, Projekt /296369/5/NCBR/2016 NCBR. Projekt realizowany w KONSORCJUM "BIOKONWERSJA": „*Przetwarzanie biomasy odpadowej w skojarzonych procesach biologiczno-chemicznych*”; “Processing of waste biomass in the associated biological and chemical processes” DZP/BIOSTRATEG-II/393/2015 Dyrektora NCBiR z dnia 22.12.2015 r. Realizowany w latach 2016 – 2020. Koordynator Projektu w UŁ – Dr hab. Zdzisława Romanowska-Duda Prof. UŁ., wartość całkowita zadania UŁ – 963.750,00 zł.

5. NAGRODY I WYRÓŻNIENIA

Złoty Medal na 18th International Innovation Exhibition ARCA 2020, "Method of Preparing Media for the Cultivation of Aquatic Macrophytes from the *Lemnaceae* Family". 15-17 listopada 2020 r., Zagrzeb, Chorwacja.

Pierwsza nagroda dla A. Pszczółkowska, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, W. Pszczółkowski, **K. Piotrowski** za pracę pt. „Zastosowanie biomasy mikroglonów w agrotechnologii uprawy roślin energetycznych” prezentowaną na Międzynarodowej Konferencji Naukowej „Technologia uprawy mikroglonów w bioreaktorach zamkniętych z recyklingiem CO₂ i innych odpadów z biogazowni”. Częstochowa, 17-20.11.2015.

6. WYKAZ ZGŁOSZEŃ PATENTOWYCH

- P.433932** z 13.05.2020 r. Sposób otrzymywania medium do hodowli kultur *in vitro* roślin wodnych na bazie odcieków z biogazowni w procesie gospodarki cyrkulacyjnej.
- P. 427546** z 26.10.2018 r. Sposób przygotowania mediów do hodowli makrofitów wodnych z rodziny *Lemnaceae*.

7. PRACE ORGANIZACYJNE NA RZECZ WYDZIAŁU BiOŚ UNIwersytetu Łódzkiego

Udział w debacie telewizyjnej w TVP3 dotyczącej Odnawialnych Źródeł Energii – Debata Ekspercka. Emisja programu – 13 czerwca 2014 godz. 19.05 TVP3. Współpraca z Centrum Badań i Innowacji Pro-Akademia, Centrum Transferu Technologii.

Udział w realizacji filmu promującego Wydział BiOŚ UŁ, mającym na celu zachęcić licealistów do studiowania na naszym Wydziale. 21 maj 2014r.

Wystąpienie na XIV Forum Klastra Bioenergia dla Regionu, pt. Polsko-mołdawska współpraca w zakresie OZE, w tym biomasy i biogazu, 27.11.2014, Łódź. Współpraca z Centrum Badań i Innowacji Pro-Akademia, Centrum Transferu Technologii.

Udział w Warsztatach Konfokalnej Mikroskopii Ramanowskiej, AFM, TERS, Łódź 2014.

Nawiązanie współpracy z Instytutem Naukowym w Karaman Belediyesi w Turcji. Łódź 2014. Prezentacja multimedialna na Wydziale BiOŚ: Opracowanie innowacyjnych technologii do uprawy roślin energetycznych.

I Międzynarodowy Kongres „Łódzkie Energetyczne 2014”, 25–27.06.2014, Łódź, reprezentant UŁ Wydział BiOŚ. Współorganizator stanowiska reklamowego.

II Międzynarodowy Kongres „Łódzkie Energetyczne 2015”, 8–10.06.2015, Łódź, reprezentant UŁ Wydział BiOŚ. Współorganizator stanowiska reklamowego.

Udział w debacie w ramach XV Forum Klastra Bioenergia dla Regionu, poświęconym ustawie o OZE w Centrum Transferu Technologii, 16.04.2015 r., Łódź. Współpraca z Centrum Badań i Innowacji Pro-Akademia, Centrum Transferu Technologii.

Udział w IV Międzynarodowym Kongresie Biogospodarki w Łodzi, 6-7 października 2016 r. Reprezentant Wydziału BiOŚ UŁ.

Udział w Warsztatach organizowanych przez Instytutu Kreatywnej Biologii na Wydziale BiOŚ UŁ, prowadzenie zajęć pt. „Wpływ metali ciężkich na środowisko wodne na przykładzie makrofitów” - projektu skierowanego do uczniów szkół ponadpodstawowych (gimnazja i licea), semestr ziomy 2019 i semestr letni 2020.

8. STRESZCZENIE

Zachodzące i często nieprzewidywalne zmiany klimatyczne i środowiskowe wymagają opracowania innowacyjnych technologii oraz procesów adaptacyjnych w produkcji rolniczej. Dlatego celem prezentowanych doświadczeń było zbadanie wpływu biopreparatów: Biojodis i Asahi SL oraz mieszanin monokultur *Navicula* sp. (*Bacillariophyceae*) i nietoksycznych *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis* na wzrost i rozwój roślin energetycznych wybranych gatunków uprawianych w niesprzyjających warunkach klimatycznych i określenie możliwości niwelowania ich negatywnego oddziaływania na plon i jakość otrzymanej biomasy. Założono, że ograniczenie stosowania syntetycznych nawozów i zastąpienie ich biopreparatami oraz produktami powstałymi na bazie materii organicznej zwiększy odporność roślin na negatywny wpływ stresu środowiskowego, wpłynie korzystnie na rozwój i plonowanie roślin, obniży koszty uprawy i przyczyni się do zmniejszenia skażenia środowiska. Materiałem roślinnym wykorzystanym w doświadczeniach były: wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.), słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* L. Rusby). Ekstrakty naturalne aplikowano do roślin w trzech wariantach: podlewanie, opryskiwanie (aplikacja dolistna) oraz jednoczesne podlewanie i opryskiwanie. W ramach badań co 2 tygodnie oznaczono: wysokość roślin, indeks zawartości chlorofilu, aktywność wymiany gazowej u roślin (fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową oraz stężenie międzykomórkowe CO₂), a pod koniec sezonu wegetacyjnego wykonano analizę: świeżej i suchej biomasy. Oceniono również aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej (pH=6,0) i zasadowej (pH=7,5), RNazy, dehydrogenaz, a także określono integralność błon cytoplazmatycznych. Uzyskane wyniki potwierdziły pozytywny wpływ biopreparatów na wzrost i rozwój uprawianych roślin. Analizowane parametry fizykochemiczne, charakteryzowały się wyższymi wartościami o 15-20% w porównaniu z kontrolą. Zastosowane ekstrakty *Navicula* sp. i *Cyanobacteria* stymulowały wzrost i rozwój roślin, co zostało potwierdzone w zwiększonej ich wysokości i plonie biomasy oraz aktywności metabolicznej. Wykorzystanie naturalnych preparatów może być alternatywą dla nawozów chemicznych i jest uważane za jedną z obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie roślin.

Plan doświadczenia

wierzba wiciowa
(*Salix viminalis* L.)

ślazowiec pensylwański
(*Sida hermaphrodita* L.
Rusby)

slonecznik bulwiasty
(*Helianthus tuberosus* L.)



Wariant I – pokój vegetacyjny
(warunki kontrolowane).
Wilgotność gleby – 30% (stała wartość) i zmienna od 20 do 60%,
temperatura – 10°C, 20°C, 40°C,
temperatury zmienne od -5 do 40°C,
fotoperiod (16h-światło, 8h –
ciemność) SON-T AGRO 400 W.



Wariant II – szklarnia (temp.
zależna od pogody), Wilgotność
gleby - stosowana co trzy tygodnie na
przemiań: susza glebowa (20%
wilgotność gleby) i nadmierne
uwilgotnienie gleby (60% wilgotność
gleby), nasłonecznienie – zależne od
pogody, pory dnia, pory roku.



Wariant III – pole (warunki
zależne od pogody), Wilgotność
gleby – zależna od pogody,
temperatura – zależna od pogody,
nasłonecznienie – zależne od
pogody, pory dnia, pory roku.

Aplikacja biopreparatami oraz monokulturami *Navicula* sp. i *Cyanobacteria* w formie:
podlewania i aplikacji dolistnej (oprysk), nawożenia doglebowego i dolistnego.



Biojodis:
0%; 1%; 2%; 3%



Asahi SL
0%; 0,2%; 0,4%; 0,8%



**Monokultury
Navicula sp.**
0%; 0,5%; 1%



***Cyanobacteria*
(*Anabaena* sp.
Trebou, *Microcystis*
aeruginosa MKR
0105, *Anabaena*
variabilis)**



Produkcja energii z biomasy słonecznika bulwiastego
(*Helianthus tuberosus* L.)- toryfikacja



BIOMASA

REAKTOR
toryfikacja

BIOWĘGIEL

TORGAZ

ABSTRACT

The occurring and often unpredictable climate and environmental changes force us to develop innovative technologies and adaptation processes in agricultural production. Therefore, the aim of the presented experiments was to investigate the effect of biopreparations: Biojodis and Asahi SL and mixtures of *Navicula* sp. (*Bacillariophyceae*) monocultures and non-toxic *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis* on the growth and development of energy plants of selected species in unfavorable climatic conditions and to determine the possibility of eliminating their negative impact on the yield and quality of obtained biomass. It was assumed that limiting the use of synthetic fertilizers and replacing them with biopreparations and products based on organic matter will increase plant resistance to the negative impact of environmental stress, will positively affect plant development and yield, lower cultivation costs and contribute to reducing environmental contamination. The plant material used in the experiments were: willow (*Salix viminalis* L.), jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and virginia mallow (*Sida hermaphrodita* L. Rusby). Natural extracts were applied to plants in three variants: watering, spraying (foliar application) and simultaneous watering and spraying. Every 2 weeks, the following were determined: plant height, chlorophyll index, gas exchange activity in plants (net photosynthesis, transpiration, stomatal conductivity and intercellular CO₂ concentration), and at the end of the growing season, the analysis of fresh and dry biomass was performed. The enzymatic activity of acid (pH=6.0) and alkaline phosphatase (pH=7.5), RNase, dehydrogenases was also assessed, and the integrity of cytoplasmic membranes was determined. The obtained results confirmed the positive effect of biopreparations on the growth and development of cultivated plants. The analyzed physical and chemical parameters were characterized by higher values by 15-20% compared to the control. The applied extracts of *Navicula* sp. and *Cyanobacteria* stimulated the growth and development of plants, which was confirmed by their increased height and yield of biomass and metabolic activity. The use of natural preparations can be an alternative to chemical fertilizers and is considered one of the promising strategies in organic and integrated plant cultivation.

10. WYKAZ SKRÓTÓW

EUROSTAT – European Statistical Office, Europejskie Biuro Statystyczne

IEA – International Energy Agency, Międzynarodowa Agencja Energii

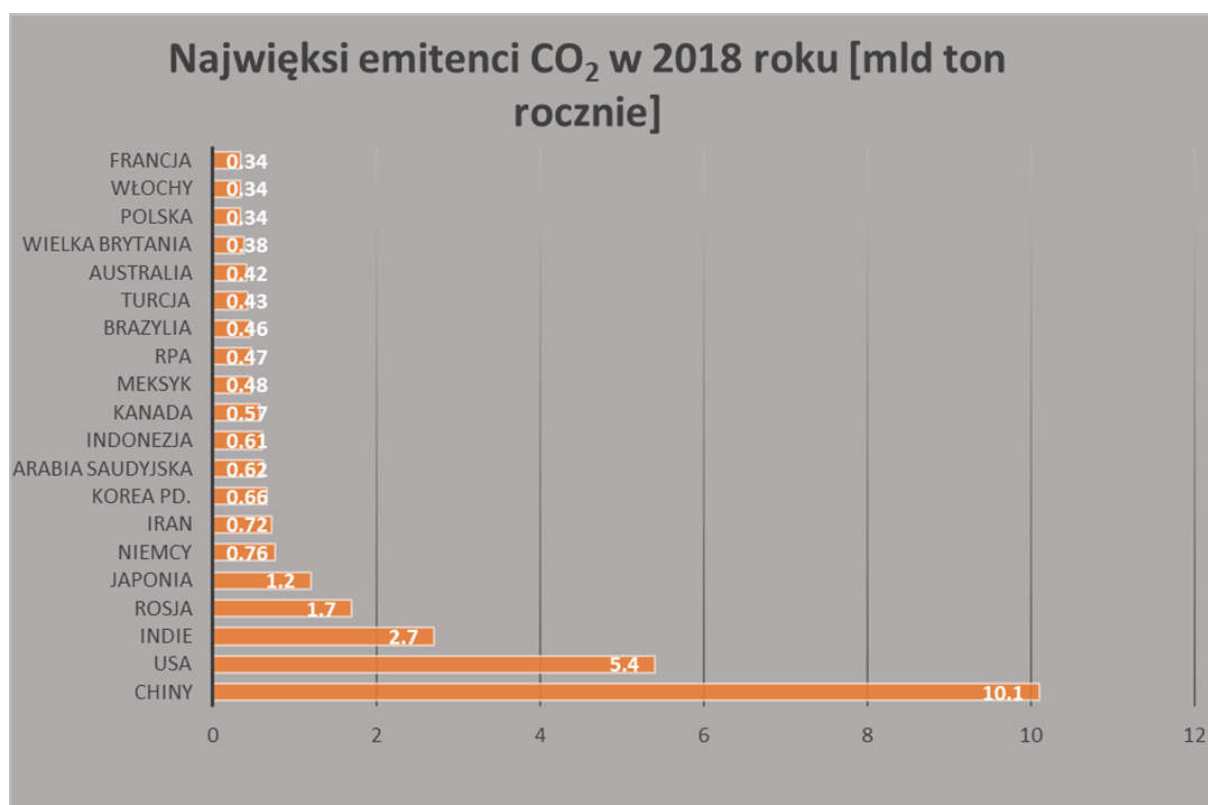
OW – Obszary Wiejskie

OZE – Odnawialne Źródła Energii

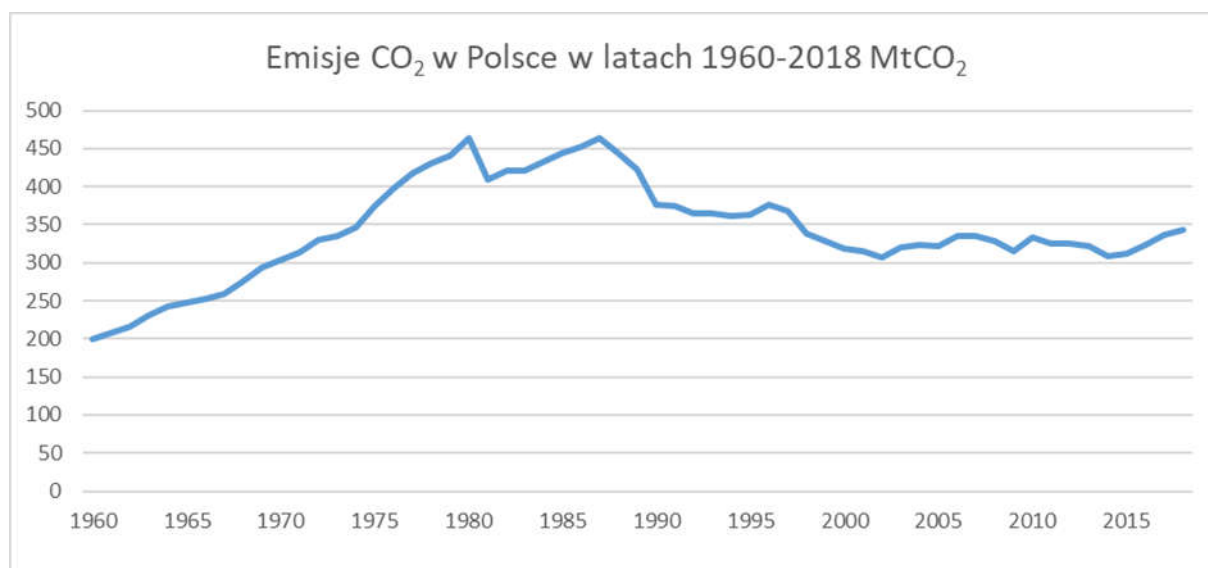
11. WSTĘP

11.1. Globalne zmiany klimatyczne

Klimat jest podstawowym elementem przyrody determinującym zrównoważony rozwój społeczeństwa poprzez wpływanie bezpośrednio i pośrednio na gospodarkę, w tym na rolnictwo całego świata. Naukowcy zgadzają się, co do tego, że zachodzące w ostatnim okresie niekorzystne zmiany klimatyczne stanowią coraz większe zagrożenie dla współczesnego rolnictwa, a ich występowanie coraz częściej jest nieprzewidywalne, nagłe i ekstremalne, co niesie ze sobą katastrofalne skutki. Globalne zmiany pogodowe i środowiskowe, powodują znaczący spadek plonów roślin uprawnych, w tym energetycznych. Wielorakie, niekorzystne działania antropogeniczne zanieczyszczają atmosferę poprzez nadmierną emisję dwutlenku węgla, co w konsekwencji skutkuje powstaniem globalnego ocieplenia prowadzącego do znacznych zmian klimatu, w tym temperatury. W latach 90tych XX wieku dowiedziono, że ostatnio zmiany te są znacznie większe i zachodzą dużo szybciej w wyniku wzmożonej aktywności gospodarczej człowieka, co w wielu przypadkach wpływa niekorzystnie na środowisko. Najistotniejszym dokumentem w zakresie ograniczeń związanych z emisją dwutlenku węgla jest Protokół z Kyoto z 1998 roku [1]. Dokument ten stanowi uzupełnienie Ramowej Konwencji Narodów Zjednoczonych. Jednak międzynarodowe działania podjęte na dużą skalę w tamtym czasie, nie przyniosły żadnych efektów, co widać po wzroście emitowanego do atmosfery dwutlenku węgla po roku 2000. Co więcej, wiele krajów nie podjęło żadnych zobowiązań co do redukcji emisji CO₂. Konsekwencją lekceważenia problemów środowiskowych był i nadal jest coraz szybszy przyrost CO₂ w atmosferze, co bezpośrednio wpływa na wzrastającą intensywność globalnych zmian klimatycznych. W efekcie pojawiają się nowe problemy w produkcji żywności, relokacja szkodników i chorób roślin uprawnych, a także wzrost kosztów ich wytwarzania. W ostatnich kilkunastu latach pojawili się nowi liderzy w produkcji CO₂ (Chiny i Indie) - kraje o najszybszym wzroście gospodarczym, ale i tym samym produkujący najwięcej dwutlenku węgla emitowanego do atmosfery. Według Międzynarodowej Agencji ds. Energii (IEA) i międzynarodowej platformy Global Carbon Atlas, mimo coraz większego udziału OZE w produkcji energii, wzrost produkcji CO₂ nie zmniejszył się, a w wielu krajach uległ zwiększeniu.



Najwięksi emitenci CO₂ na świecie w 2018 r. – Źródło: Global Carbon Project raport 2019



Emisje CO₂ w Polsce w latach 1960-2018 / Źródło: Biuro Analiz, Dokumentacji i Korespondencji, Kancelaria Senatu 2020

Największym i najszybciej odczuwalnym efektem globalnego ocieplenia jest wzrost średnich temperatur na świecie. Ekstremalne upały, topnienie lodowców, wzrost poziomu wód morskich i oceanów, spadek poziomu wód gruntowych, poszerzanie się stref pustynnych

stawia przed społeczeństwami całego świata nowe wyzwania. Minimalizowanie skutków powyższych zagrożeń jest priorytetem dla nowoczesnego rolnictwa i przemysłu energetycznego, w tym OZE. Zasięg oraz rozmiar negatywnych skutków zmian środowiskowych uzależniony jest w znacznym stopniu od warunków społeczno-ekonomicznych, geograficznych czy klimatycznych danego regionu [2]. Nagłe zmiany temperatury powietrza i obiegu wody w środowisku naturalnym powodują nieprzewidywalne konsekwencje w odniesieniu do funkcjonowania większości ekosystemów, szczególnie w tych związanych z działalnością człowieka i produkcją biomasy roślin energetycznych. Jedyną szansą na ograniczenie negatywnych skutków anomalii klimatycznych oraz strat w produkcji rolniczej jest opracowanie odpowiedniej agrotechnologii w rolnictwie oraz innowacyjnych technologii we wszystkich sektorach gospodarki, zapobiegających postępującym niekorzystnym zmianom klimatycznym.

11.2. Udział biomasy roślin energetycznych w bilansie OZE

Zgodnie z dyrektywą UE, w bilansie energetycznym udział energii ze źródeł odnawialnych powinien stanowić w najbliższym czasie co najmniej 20%. Dane opublikowane przez agencję EUROSTAT wskazują, że w Polsce w 2019 roku udział OZE w produkcji energii brutto wynosił 12,16%, podczas gdy pozyskana z węgla kamiennego stanowiła 40% z węgla brunatnego - 5%, ropy naftowej - 25,6% i gazu ziemnego - 15% całego bilansu energetycznego. Przewiduje się, że obok produkowanej przez systemy fotowoltaiczne i farmy wiatrowe, przeważająca jej ilość będzie pochodziła z biomasy roślinnej, pozyskiwanej z bieżącej produkcji rolniczej i leśnej oraz w istotnym stopniu z plantacji roślin energetycznych. Polska ze względu na znaczne zasoby gleb średniej klasy, nieużytków rolnych oraz terenów na których zaprzestano uprawy roślin konsumpcyjnych ma największy w całej UE potencjał w zakresie rolnictwa energetycznego. Dotychczasowe wyniki badań wskazały, że produkcja biomasy energetycznej na glebach słabych i zdegradowanych w niekorzystnych warunkach klimatycznych jest możliwa pod warunkiem zastosowania innowacyjnych technik rolniczych z wykorzystaniem naturalnych środków biologicznych, które mają korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin i nie zanieczyszczają środowiska.

W Polsce istnieją odpowiednie warunki środowiskowe i agrometeorologiczne do wyprodukowania biomasy roślinnej w znacznych ilościach, która po przetworzeniu na energię zapewni bezpieczeństwo energetyczne kraju. Odnawialne źródła energii stanowią istotną szansę dla rozwoju polskiej gospodarki, w tym obszarów wiejskich (OW) w długofalowej perspektywie. Jednym z ważniejszych zadań w produkcji roślin energetycznych jest dobór

odpowiednich gatunków roślin i metod ich upraw w warunkach zmieniającego się klimatu. Biomasa roślinna może być wykorzystana na cele energetyczne, między innymi do produkcji biogazu, bezpośredniego spalania w celach grzewczych w postaci trocin, zrębków drzewnych, peletu i brykietu drzewnego oraz do produkcji toryfikatu (biowęgla), który charakteryzuje się korzystniejszymi parametrami cieplnymi i jednocześnie może być wykorzystany w rolnictwie jako bionawóz. Opracowanie wysoko wydajnych technologii jej produkcji w różnych warunkach środowiskowych zmieniającego się klimatu na glebach słabych, daje możliwości uzyskania wysokich plonów oraz dużą zawartość różnych związków przydatnych w gospodarce i stwarza perspektywy wykorzystania roślin energetycznych w szerokim zakresie w przemyśle energetycznym, spożywczym, paszowym, medycznym i rolnictwie.

11.3. Charakterystyka wybranych gatunków roślin energetycznych

Najistotniejszym elementem w produkcji biomasy, a tym samym propagowaniu produkcji energii odnawialnej z OZE jest dobór odpowiednich gatunków roślin energetycznych. Rośliny te muszą spełniać odpowiednie kryteria, z których najważniejsze jest wartość opałowa i plon wytworzonej biomasy. Uprawa roślin powinna być rentowna i ekonomiczna oraz charakteryzować się wysokim stopniem plonowania, odpornością na niekorzystne, zmienne warunki atmosferyczne i czynniki chorobotwórcze. Ze względu na duże perspektywy uprawy w Polsce na cele energetyczne materiałem roślinnym wykorzystanym w doświadczeniach były: wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.), słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.), ślaziolec pensylwański (*Sida hermaphrodita* L. Rusby).

11.3.1. Wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.)

Śród roślin energetycznych w Polsce i Europie najczęściej wykorzystywana jest biomasa pozyskana z wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.). Roślina ta rośnie przede wszystkim w klimacie umiarkowanym i chłodnym na półkuli północnej, a kilka gatunków również na półkuli południowej. W Polsce roślina ta reprezentowana jest przez 28 gatunków [3]. Wierzba wiciowa, często określana jest jako wierzba energetyczna, charakteryzuje się szybkim wzrostem oraz stosunkowo łatwym rozmnażaniem przez sadzonki. Najlepiej plonuje na terenach lekko kwaśnych o wartości pH 5–6,5 i może być uprawiana na słabych glebach nie wykorzystywanych w celach żywnościowych. Wierzba należy do roślin wodolubnych i najefektywniej rozwija się na obszarach podmokłych oraz na terenach bogatych w cieki wodne. Dzięki wysokiemu potencjałowi do kumulacji substancji szkodliwych w tym metali ciężkich, stanowi ona idealne rozwiązanie do nasadzenia w formie pasów ochronnych przy zakładach przemysłowych czy wzdłuż szlaków komunikacyjnych [4]. Rośliny tego gatunku

dorastają do 8 m wysokości i w optymalnych warunkach ich tempo wzrostu jest 10-krotnie wyższe w porównaniu z sosną i świerkiem [5]. Polepszenie warunków dla wzrostu wierzby, poprzez włączenie do uprawy naturalnych substancji stymulujących, może wpłynąć korzystnie na parametry jakościowe i fizjologiczne oraz wigor roślin, co w konsekwencji spowoduje osiągnięcie znacznych plonów biomasy.

11.3.2. Słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.)

Słonecznik bulwiasty, (syn. topinambur) to długowieczna bylina należąca do rodziny astrowatych, pochodząca z Ameryki Północnej. Walory smakowe i ozdobne spowodowały rozpowszechnienie tej rośliny na wielu kontynentach. Słonecznik bulwiasty zwrócił uwagę naukowców i rolników jako roślina o znacznym potencjale energetycznym. Bulwy topinamburu cechują się wysoką wartością odżywczą i w wielu krajach Europy stały się alternatywą dla ziemniaków. Ze względu na małe wymagania glebowe, wysokie tempo wzrostu i odporność na niekorzystne warunki atmosferyczne jest polecany do uprawy w celach spożywczych i energetycznych na wielu obszarach, biorąc pod uwagę jego inwazyjne właściwości. Ze względu na swoje specyficzne właściwości fitoremediacyjne, wykorzystywany jest również w rekultywacji gleb zasolonych, zanieczyszczonych metalami ciężkimi i na terenach górniczych [6]. W krajach Unii Europejskiej bulwy słonecznika stanowią surowiec do produkcji bioetanolu wykorzystywanego jako biopaliwo oraz innych gałęziach przemysłowych w tym gospodarce energetycznej.

11.3.3. Ślazowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* L. Rusby)

Ślazowiec pensylwański jest wieloletnią rośliną pochodzącą z Ameryki Północnej o bardzo wysokim potencjale produkcyjnym z przeznaczeniem na cele energetyczne. W Polsce wykorzystywany jest przede wszystkim w przemyśle celulozowo-papierniczym i pszczelarskim oraz jako suplement do pasz hodowlanych. Ze względu na właściwości fitoremediacyjne, ślazowiec pensylwański znajduje zastosowanie w rekultywacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Ślazowiec jest uprawiany w celu pozyskania biomasy suchych łodyg z przeznaczeniem do spalania, pozyskania zrębków lub przetworzenia na pelet. Z kolei zielona biomasa może być wykorzystywana w procesie fermentacji metanowej jako substrat w biogazowniach rolniczych [7]. W porównaniu z wierzbą i słonecznikiem roślina ta jest bardziej wrażliwa na niesprzyjające warunki klimatyczne, które można ograniczyć poprzez zastosowanie naturalnych substancji stymulujących wzrost roślin.

11.4. Produkcja energii z biomasy (toryfikacja)

Wyprodukowana biomasa energetyczna może być przerabiana bezpośrednio na biogaz w biogazowniach, albo po przerobieniu na pelety lub po wysuszeniu spalana w kotłach grzewczych. Ostatnio coraz więcej uwagi zwraca się na możliwość jej toryfikacji w celach poprawy wartości grzewczej. Toryfikacja czyli prażenie - to wstępny proces obróbki termicznej biomasy mający na celu uzyskanie właściwości biomasy roślinnej zbliżonych do właściwości węgla. Biomasa po procesie toryfikacji nosi nazwę toryfikatu i można ją przetwarzać na specjalne pelety w celach łatwiejszego użycia w kotłach grzewczych. W porównaniu z klasycznymi peletami charakteryzują się one niemal zerową higroskopijnością i bardzo wysokim stopniem przemialowości. Wysoka wrażliwość na wilgoć standardowych peletów z biomasy zwiększa koszty ich produkcji i wykorzystania w energetyce ze względu na konieczność zastosowania specjalistycznych środków transportujących oraz składowania w szczelnych opakowaniach lub pomieszczeniach.

Proces toryfikacji biomasy polega na termicznej obróbce w zakresie temperatur 200-300°C, pod ciśnieniem atmosferycznym bez dostępu tlenu. Tego typu powolna piroliza zachodzi w specjalistycznych reaktorach w kontrolowanych warunkach temperatury, a jednostkowy przyrost temperatury w tym procesie nie powinien przekraczać 50°C/min. Podczas wysokotemperaturowego suszenia biomasy następuje zmniejszenie jej masy nawet o 30% w porównaniu do wartości początkowej substratu. Jest to spowodowane przede wszystkim przez redukcję stopnia wilgotności oraz substancji lotnych (torgaz). W procesie toryfikacji otrzymujemy paliwo z biomasy roślinnej o lepszej gęstości nasypowej, niższej masie i wyższej wartości opałowej (kaloryczność). W zależności od czasu trwania procesu w reaktorze, temperatury tego procesu, rodzaju substratu pochodzenia roślinnego i jego wilgoci, produkt końcowy może się różnić pod względem masy i kaloryczności. Obecnie proces toryfikacji jest jedną z najbardziej obiecujących i najszybciej rozwijających się technologii waloryzacji biomasy. Bardzo istotną korzyścią toryfikatu jest możliwość spalania go w kotłach pyłowych bez konieczności zmian układów nawęglania i układu paleniskowego kotła.

12. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

12.1. Cel pracy

Nieprzewidywalne i nagłe zmiany klimatyczne o zasięgu globalnym w ostatnich latach powodują olbrzymie straty szczególnie w sektorze rolniczym. Wyjątkowo wysokie i ekstremalnie niskie temperatury, a także susza i liczne gwałtowne powodzie w znacznym stopniu zaburzają wzrost i rozwój roślin energetycznych oraz sprzyjają relokacji i występowaniu chorób oraz szkodników, co w konsekwencji zwiększa koszty produkcji i negatywnie wpływa na bilans energetyczny kraju oparty na OZE.

Ograniczenie niekorzystnych efektów zmian klimatycznych jest priorytetem zrównoważonej gospodarki cyrkulacyjnej i stanowi podstawę dla innowacyjnego i ekologicznego rolnictwa oraz przemysłu energetycznego. Nieliczne doniesienia naukowe w zakresie zastosowania środków biologicznych (Biojodis, Asahi SL i związków krzemu pochodzenia naturalnego) w produkcji biomasy energetycznej, były inspiracją do przeprowadzenia badań dotyczących wpływu tych biopreparatów na wzrost i rozwój wybranych gatunków roślin energetycznych w różnych warunkach zmieniającego się środowiska.

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie wzrostu i aktywności metabolicznej wybranych gatunków roślin: wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.), słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* (L.) Rusby), uprawianych w przewidywanym szerokim spektrum zmian klimatycznych oraz sprawdzenie możliwości poprawy ich rozwoju i zwiększenia plonu biomasy przy pomocy nowych ekologicznych metod upraw, z zastosowaniem biopreparatów Asahi SL, Biojodis i związków krzemu pochodzenia naturalnego.

12.2. Hipotezy badawcze

Hipoteza I. Ocena wartości siewnej nasion i materiału rozmnożeniowego przygotowywanego do doświadczeń (wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.), słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* (L.) Rusby).

Hipoteza II. Wpływ stałych i okresowo zmiennych warunków, sub- i supraoptymalnych temperatur oraz suszy i nadmiernego uwilgotnienia gleby w warunkach prowadzonych doświadczeń: (a) pokoi wegetacyjnych, (b) szklarni, (c) gruncie i ich wpływ na wzrost rozwój oraz plon biomasy wybranych gatunków roślin energetycznych.

Hipoteza III. Możliwości poprawy wzrostu, rozwoju i plonu biomasy roślin energetycznych uprawianych w warunkach stałych i okresowo zmiennych optymalnych, sub- i supraoptymalnych temperatur oraz suszy i nadmiernego uwilgotnienia gleby w pokojach wegetacyjnych, szklarni i gruncie pod wpływem biopreparatów: Asahi SL, Biojodis oraz mieszanin monokultur *Navicula* sp. (*Bacillariophyceae*) i nietoksycznych *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*, aplikowanych różnymi metodami (podlewanie, aplikacja dolistna oraz aplikacja dolistna i podlewanie) w trzech stężeniach.

Coroczna ocena wysokości i jakości roślin (w skali bonitacyjnej) oraz aktywności enzymatycznej wybranych enzymów, aktywności wymiany gazowej (fotosynteza netto, transpiracja, stężenie międzykomórkowego CO₂, przewodność szparkowa), integracji membran cytoplazmatycznych, zawartości chlorofilu (indeks zawartości chlorofilu), a także plonu świeżej i suchej biomasy roślin uprawianych w różnych warunkach temperatury, wilgotności gleby i traktowanych biopreparatami: Biojodis, Asahi SL i związkami krzemu pochodzenia naturalnego.

13. MATERIAŁ I METODY

13.1. Testowane gatunki roślin

Badania przeprowadzono na roślinach trzech gatunków: wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.), słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L.), które charakteryzują się dużym potencjałem plonotwórczym i są rekomendowane do upraw energetycznych. Dobór roślin podyktowany był ich specyficznymi właściwościami: szybkim wzrostem, stosunkowo niskimi kosztami uprawy, występowaniem w różnych strefach klimatycznych, wysoką kalorycznością. Przebieg eksperymentu w warunkach szklarniowych i polowych był ściśle uzależniony od sezonu wegetacyjnego.

13.2. Środki biologiczne

13.2.1. Biojodis

Do badań wykorzystano płynny preparat organiczny Biojodis (Jodavita, Jeznach Sp. J.) wyprodukowany na bazie ekstraktu biohumusu, ulepszanego biologicznie aktywnym jodem i mikroorganizmami glebowymi. Jod występował w postaci jonów IO_3^- i I^- i miał silne właściwości stymulujące wzrost bakterii glebowych, odpowiedzialnych za kompleksy organiczno-mineralne. Preparat Biojodis zawierał 5–8% substancji organicznych, 107–1010 CFU/g mikroorganizmów glebowych, 0,15–0,7% makro- i mikroelementów, w tym jod oraz humus rozpuszczalny w wodzie (pH 7,1–7,8).

13.2.2. Asahi SL

Drugim zastosowanym preparatem był stymulator wzrostu - Asahi SL (Arysta Life Science) wyprodukowany na bazie trzech substancji aktywnych z grupy nitrofenoli, naturalnie występujących w roślinach: *o*-nitrofenolanu sodu (ONP) (0,2%), *p*-nitrofenolanu sodu (PNP) (0,3%), 5-nitrogwajakolanu sodu (5NG) (0,1%). Środek Asahi SL ma korzystny wpływ na plonowanie oraz jakość roślin warzywnych. Zastosowanie środka jest wskazane w warunkach stresowych, nie sprzyjających wzrostowi roślin np. ekstremalnie niskich lub wysokich temperaturach albo w przypadku uszkodzenia roślin np. środkami ochrony roślin lub nawozami.

13.2.3. Mieszaniny monokultur okrzemek i nietoksycznych *Cyanobacteria*

Podczas eksperymentu w okresie sezonu wegetacyjnego wszystkie rośliny były traktowane ekstraktami monokultur *Navicula* sp. i nietoksycznych *Cyanobacteria* (*Anabaena*

sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*), pochodzących z kolekcji Katedry Ekofizjologii Roślin, Wydział BiOŚ, UŁ. Monokultury hodowano w pomieszczeniu fitotronowym na pożywkach Z i BG11 (ATCC Medium 616) w temperaturze 27°C przy oświetleniu lampami Farel (18 W), zgodnie z procedurą opracowaną przez Romanowska-Duda et al. (2010). Liczbę komórek okrzemek i *Cyanobacteria* określono z wykorzystaniem hemocytometru Fuchsa i Rosenthala. Komórki okrzemek i *Cyanobacteria* poddano 2 minutowemu wirowaniu (4000 rpm, temperatura 20°C) i zawieszono w wodzie. W użytych do doświadczeń monokulturach liczba komórek w 1 mL wody wynosiła 600 000. Następnie przed przystąpieniem do aplikacji monokultury poddano 15 minutowemu procesowi sonifikacji (częstotliwość ultradźwięków 20 kHz, przy amplitudzie 80% i impulsach 0,7-sekundowych w odstępach co 0,3s.) za pomocą ultradźwiękowego homogenizatora (Omni-Ruptor 4000, Omni International).

13.3. Warunki uprawy i metody traktowania roślin

Doświadczenie przeprowadzono w trzech wariantach: Wariant I – w pokojach wegetacyjnych, z kontrolowaną wilgotnością gleby, temperaturą i oświetleniem; Wariant II – w szklarni, z kontrolowaną częściowo temperaturą i w pełni kontrolowaną wilgotnością gleby; Wariant III – w polu, w którym wilgotność gleby, temperatura i nasłonecznienie były uzależnione od pogody, pory dnia i pory roku. Szczegółowe parametry podano w Tabeli 1.

Tabela 1. Warunki uprawy roślin w pokoju wegetacyjnym, w szklarni i w polu.

Wierzba wiciowa (<i>Salix viminalis</i> L.)	Słonecznik bulwiasty (<i>Helianthus tuberosus</i> L.)	Słazowiec pensylwański (<i>Sida hermaphrodita</i> L. Rusby)
Wariant I – pokój wegetacyjny (warunki kontrolowane) -Wilgotność gleby stała 30% (kontrola) -Wilgotność gleby zmienna, co trzy tygodnie na przemian susza glebowa (20% wilgotność gleby) i nadmierne uwilgotnienie gleby (60%); -Temperatura zmienna: 20/0/20°C; 20/40/20°C, 20/0/40/20°C; 10/-5/20/40/20°C -Naświetlenie: 8 godz. ciemność/16 godz. Naświetlenie, Lampy SON-T AGRO 400 W, 100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.		
Doglebowa aplikacja monokultur okrzemek, <i>Cyanobacteria</i> , Asahi SL (0.2, 0.4 i 0.8%) i Biojodis (1.0, 2.0 i 3.0%).	Dolistna aplikacja monokultur okrzemek, <i>Cyanobacteria</i> , Asahi SL (0.2, 0.4 i 0.8%) i Biojodis (1.0, 2.0 i 3.0%).	Dolistna i doglebowa aplikacja monokultur okrzemek, <i>Cyanobacteria</i> , Asahi SL (0.2, 0.4 i 0.8%) i Biojodis (1.0, 2.0 i 3.0%).
Wariant II – szklarnia -kontrolowana wilgotność gleby (30%), -częściowo kontrolowana temperatura 20-30°C, -stosowana co trzy tygodnie na przemian susza (20% wilgotność gleby) i nadmierne uwilgotnienie (60%)		
Doglebowa aplikacja monokultur okrzemek, <i>Cyanobacteria</i> , Asahi SL (0.2%) i Biojodis (3.0%).	Dolistna aplikacja monokultur okrzemek, <i>Cyanobacteria</i> , Asahi SL (0.2%) i Biojodis (3.0%).	Dolistna i doglebowa aplikacja monokultur okrzemek, <i>Cyanobacteria</i> , Asahi SL (0.2%) i Biojodis (3.0%).
Wariant III – pole (warunki zależne od pogody), -wilgotność gleby, temperatura, nasłonecznienie uzależnione od pogody, pory dnia i pory roku.		
Doglebowa aplikacja monokultur okrzemek, Asahi SL (0.2%) i Biojodis (3.0%).	Dolistna aplikacja monokultur okrzemek, Asahi SL (0.2%) i Biojodis (3.0%).	Dolistna i doglebowa aplikacja monokultur okrzemek, Asahi SL (0.2%) i Biojodis (3.0%).

Rośliny we wszystkich wariantach (I-III) uprawiane były w 3 litrowych doniczkach wypełnionych mieszanką piasku i torfu (1:1=v:v). W wybranych wariantach eksperymentalnych glebę podlano nawozem okrzemkowym lub preparatami Biojodis albo Asahi SL po wysianiu nasion ślazuwca pensylwańskiego bądź posadzeniu sadzonek wierzby wiciowej i bulw słonecznika bulwiastego.

Pierwsze aplikacje nawozem okrzemkowym lub preparatami Biojodis albo Asahi SL wykonano przy wysokości roślin 15 cm. Co 4 tygodnie były określane parametry dla uprawianych roślin: wysokość i zdrowotność, liczba pędów i suma ich długości, indeks zawartości chlorofilu (aparatem Minolta SPAD-502, Konica Minolta7), intensywność wymiany gazowej (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa oraz stężenie międzykomórkowe CO₂) za pomocą analizatora wymiany gazowej TPS-2, PP Systems, USA. Ponadto w ramach przeprowadzonych badań oznaczono aktywność enzymatyczną: fosfatazy kwaśnej (pH=6,0) i zasadowej (pH=7,5), RNazy oraz dehydrogenaz, stosując spektrofotometr UVmini-1240 Shimadzu). Wykonano również badania w zakresie integralności membran cytoplazmatycznych za pomocą konduktometru CC-551 Elmetron. Stosowane testy oceny aktywności fizjologicznej roślin są powszechnie uznane za użyteczne markery reakcji roślin na warunki klimatyczne środowiska, co stwierdzono w dotychczas przeprowadzonych badaniach. Pod koniec okresu wegetacyjnego została dokonana analiza świeżej i suchej biomasy.

Demonstracyjnym gatunkiem poddanym procesowi toryfikacji był słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.) uprawiany na glebie słabej suplementowanej odpadami z biogazowni i traktowanym w okresie wegetacyjnym środkami biologicznymi: Apol-humus i Stymjod. Celem badań było określenie wartości energetycznej uzyskanej biomasy z roślin w procesie toryfikacji, co potwierdziło założenia postawionej hipotezy.

13.4. Analiza statystyczna wyników

Doświadczenie przeprowadzono w 5 powtórzeniach dla każdego traktowania (eksperymentalnego wariantu). Na każde powtórzenie składało się po 30 roślin z każdego gatunku, rozmieszczonych metodą losowych bloków. Uzyskane średnie z każdego parametru zostały pogrupowane z wykorzystaniem testu Duncana na poziomie istotności $\alpha=0,05$. W przedstawionych pracach wnioskowanie indukcyjne oparto o testy ANOVA I. Porównania średnich z prób dokonano na podstawie sekwencyjnych testów post-hoc Duncana lub Newmana-Keulsa. Do porównania próby kontrolnej z pozostałymi próbami wykorzystano test Dunnetta.

13. WYNIKI BADAŃ

Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane w sześciu publikacjach naukowych (I – VI), które wchodzi w skład rozprawy doktorskiej pod tytułem „Opracowanie strategii upraw roślin energetycznych metodami ekologicznymi w warunkach globalnych zmian klimatycznych i środowiskowych”.

14.1. Publikacja nr 1

Piotrowski K., Romanowska-Duda Z. 2014. „Climate change and the cultivation of energy crops”. Acta Innovations, vol. 11, ISSN 2300-5599.

W publikacji zebrano najistotniejsze dane dotyczące zmian klimatycznych, zachodzących na świecie w ostatnich dziesięcioleciach. Cyrkulacje atmosferyczne, temperatura, cykle hydrologiczne, oddziaływanie promieniowania słonecznego, warunkują życie na ziemi wszystkich organizmów. Gwałtowne zmiany klimatyczne, wymuszają na społeczeństwie tworzenie nowych efektywnych rozwiązań w zakresie rolnictwa – oraz innych aspektach gospodarki światowej. Opracowanie innowacyjnych technologii upraw roślin energetycznych metodami ekologicznymi, w znacznym stopniu przyczyni się do ograniczenia negatywnych skutków globalnych zmian środowiskowych. Technologie te umożliwią pozyskiwanie energii z tych roślin zamiast z kopalin, których spalanie emituje gazy cieplarniane oraz wskażą na wysoko produktywne metody ich uprawy w nowych warunkach zmieniającego się klimatu. Na podstawie dostępnych danych literaturowych stwierdzono, że dotychczasowe próby ograniczenia negatywnych skutków działalności człowieka nie przynosi i nie przyniesie oczekiwanych efektów. Istnieje wiele wątpliwości i słów krytyki od naukowców w zakresie niedoprecyzowanych modeli cyrkulacji. Oczywistym jest iż zaburzenia pogodowe w bezpośredni sposób wpłyną na światową gospodarkę, szczególnie na produkcję rolną. Jest bardzo prawdopodobne, że wiele regionów świata charakteryzujących się dzisiaj wysoką produktywnością, będzie musiała zreformować model dotychczasowej uprawy roślin, a niekiedy zupełnie jej zaniechać. Zmiany temperatury powietrza i obieg wody w środowisku naturalnym pociągną za sobą ważne konsekwencje zarówno w odniesieniu do funkcjonowania większości ekosystemów, jak i działalności gospodarczej człowieka. W związku z powyższym częstotliwość, zakres terytorialny oraz siła występowania wszelkiego rodzaju anomalii pogodowych (upałów, susz, powodzi, huraganowych wiatrów, trąb powietrznych, gradobić, gwałtownych ulew, zalewania gruntów wodą itp.) znacznie się

zwiększy, a w niektórych rejonach może stać się nawet codziennością. Jedną z szans na zminimalizowanie negatywnych skutków zmian klimatycznych oraz strat w produkcji rolnej i energetycznej jest odpowiednie przekształcenie i przystosowanie upraw roślin do zmieniających się warunków klimatycznych, poprzez opracowanie odpowiednich agrotechnologii.

14.2. Publikacja nr 2

Grzesik M., Romanowska-Duda Z., Piotrowski K., Janas R.. 2015. „Okrzemki (*Bacillariophyceae*) jako efektywne bazy nawozów ekologicznych nowej generacji”. *Przemysł Chemiczny*, 94/3; s: 391- 396.

W publikacji określono możliwości wykorzystania naturalnych form krzemu w postaci okrzemek jako bionawozu nowej generacji w uprawie wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.) w warunkach zredukowanego nawożenia syntetycznego i sprawdzono potencjał dolistnej aplikacji *Navicula* sp. Poziom skuteczności naturalnego biostymulatora był zależny od poziomu wzbogacenia gleby w nutrieny zawarte w syntetycznym nawozie. Ocena aktywności zawiesiny opartej na bazie okrzemek została określona na podstawie analizy wzrostu roślin (wysokość, liczba pędów, suma ich długości, plon świeżej i suchej biomasy), który był skorelowany ze wzrostem aktywności fizjologicznej (transpiracji, fotosyntezy netto, przewodnictwa szparkowego, stabilności cytomembran, zawartości chlorofilu w liściach), a także aktywności enzymatycznej (fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, RNazy oraz dehydrogenaz). Wyniki badań wskazały, że jednym z ekologicznych nawozów organicznych może być mieszanina monokultur *Navicula* sp., która korzystnie wpłynęła na wzrost i rozwój badanych roślin. Wykazano również, że bionawożenie sonifikowanymi komórkami okrzemek co 3 tygodnie w formie dolistnej aplikacji, zwiększyło dynamikę wzrostu pędów wierzby wiciowej, co przełożyło się na wyższy plon świeżej i suchej biomasy oraz korzystnie wpłynęło na ich wigor i aktywność fizjologiczną. W artykule tym zwrócono szczególną uwagę na zasadność stosowania ekologicznych nawozów w postaci ekstraktów okrzemkowych i wskazano na ich ekonomiczny i przyjazny dla środowiska charakter. Zastosowanie bionawozów jako stymulatorów wzrostu roślin i ich naturalnej odporności na niekorzystne warunki środowiskowe oraz alternatywy dla nawozów chemicznych jest uważane za jedną z najbardziej obiecujących strategii w ekologicznej i zrównoważonej uprawie roślin energetycznych.

14.3. Publikacja nr 3

Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., Grzesik M.. 2016. „*Cyanobacteria*, Asahi SL i Biojodis jako biostymulatory poprawiające wzrost i rozwój ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) w niekorzystnych warunkach zmieniającego się klimatu”. *Przemysł Chemiczny*, Vol.95, No.8, 1569-1573.

W publikacji opisano wpływ naturalnych stymulatorów na wzrost i aktywność fizykochemiczną roślin ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) w szerokim zakresie temp. (od -5°C do $+40^{\circ}\text{C}$) i wilgotności gleby od 20% do 60%. W przeprowadzonym doświadczeniu wykorzystano mieszaninę trzech monokultur *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*) oraz dwa płynne biopreparaty Asahi SL i Biojodis, dozowane w postaci trzech form aplikacji: doglebowej, dolistnej oraz jednocześnie doglebowej i dolistnej. Efektywność testowanych stymulatorów określono na podstawie pomiarów biometrycznych i aktywności fizjologicznej roślin ślazuwca pensylwańskiego. Co 4 tygodnie określano wysokość i jakość roślin, indeks zawartości chlorofilu (a+b), a w połowie okresu wegetacyjnego oznaczono parametry wymiany gazowej: fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową i stężenie międzykomórkowe CO_2 , a także aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej (pH 6,0) i alkalicznej (pH 7,5) oraz RNazy, oraz integralność membran cytoplazmatycznych. Przeprowadzone testy są powszechnie uznane za użyteczne markery aktywności metabolicznej oraz reakcji roślin na bodźce zewnętrzne, co znalazło potwierdzenie we wcześniejszych badaniach i w literaturze światowej. Przeprowadzone badania wykazały korzystny wpływ testowanych środków biologicznych na wzrost i rozwój ślazuwca pensylwańskiego - rośliny energetycznej uprawianej w optymalnych warunkach środowiskowych oraz na możliwości łagodzenia przez nie niekorzystnego wpływu ekstremalnych temperatur i wilgotności gleby, które zgodnie z najnowszymi danymi literaturowymi będą występować coraz częściej na świecie. Wyniki badań wskazały na zróżnicowaną wrażliwość ślazuwca pensylwańskiego w odpowiedzi na traktowanie różnymi biopreparatami i zawiesinami nietoksycznych szczepów *Cyanobacteria*. Szczególnie pozytywny skutek zaobserwowano w przypadku aplikacji dolistnej i doglebowej preparatu Biojodis w stężeniu 1–3% i w nieco mniejszym stopniu stosując preparat Asahi SL we wszystkich stosowanych stężeniach tj. 0,1%-0,8%. Również mieszanina monokultur *Cyanobacteria* korzystnie wpłynęła na wzrost i rozwój badanych roślin w porównaniu z próbą kontrolną. W powyższej publikacji wskazano na zasadność stosowania preparatów biologicznych i nietoksycznych sinic podczas uprawy roślin energetycznych na przykładzie

ślazowca pensylwańskiego w celu łagodzenia niekorzystnego na niego wpływu zachodzących zmian klimatycznych, w tym ekstremalnych temperatur oraz wilgotności gleby. Otrzymane wyniki mają istotne znaczenie dla upraw roślin energetycznych, gdyż wnoszą nowe informacje odnośnie innowacyjnych, nowoczesnych modeli ich upraw z wykorzystaniem biopreparatów w warunkach zachodzących zmian klimatycznych.

14.4. Publikacja nr 4

Piotrowski K., Romanowska-Duda Z.. 2018. „Positive impact of bio-stimulators on growth and physiological activity of willow in climate change conditions”. International Agrophysics. Vol. 32, doi: 10.1515/intag-2017-0006.

Czwarta publikacja dotyczy oceny możliwości niwelowania niekorzystnego wpływu przewidywanych zmian klimatycznych na wzrost i aktywność fizjologiczną wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.) - rośliny energetycznej uprawianej w warunkach zmiennej temperatury i wilgotności gleby, przy pomocy dolistnej i doglebowej aplikacji biopreparatów: Biojodis (1%), Asahi SL (0,03%) oraz mieszaniny monokultur *Cyanobacteria*. Badane rośliny wierzby wiciowej uprawiano w przewidywanym, szerokim spektrum zmian klimatycznych tj. w warunkach stałych i okresowo zmiennych, optymalnych, sub- i supraoptymalnych temperatur (od -5°C do 40°C) oraz suszy (zmieniająca się wilgotność gleby od 20% do 60%) w pokojach vegetacyjnych i szklarni. Uzyskane wyniki weryfikowano w warunkach polowych uzależnionych od pogody. W okresie sezonu vegetacyjnego rośliny wierzby wiciowej były traktowane (dolistnie, doglebowo i jednocześnie dolistnie i doglebowo) co trzy tygodnie biopreparatami w różnych stężeniach. Co 4 tygodnie przeprowadzano biometryczną i fizjologiczną ocenę uprawianych roślin: wysokość, liczba pędów i suma ich długości, indeks zawartości chlorofilu oraz intensywność wymiany gazowej (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa oraz stężenie międzykomórkowe CO₂). Pod koniec okresu vegetacyjnego została dokonana analiza świeżej i suchej biomasy. Ponadto w ramach przeprowadzonych badań oznaczono aktywność enzymatyczną: fosfatazy kwaśnej (pH=6,0) i zasadowej (pH=7,5), RNazy oraz dehydrogenaz i analizowano integralność membran cytoplazmatycznych. Zastosowane testy oceny aktywności fizjologicznej roślin są powszechnie uznane za użyteczne markery reakcji roślin na zmieniające się warunki klimatyczne środowiska.

Otrzymane wyniki wskazały na zasadność stosowania biopreparatów jakimi są Biojodis, Asahi SL oraz mieszaniny nietoksycznych monokultur *Cyanobacteria* w uprawie roślin wierzby wiciowej zarówno w optymalnych jak i w niekorzystnych warunkach

środowiskowych (charakteryzującymi się ekstremalnymi zmiennymi temperaturowymi oraz naprzemiennie zmieniającą się wilgotnością gleby od 20% do 60%). W zależności od formy aplikacji biopreparatów i *Cyanobacteria*, wykazano różny stopień wrażliwości wierzby wiciowej na zastosowane środki biologiczne, co przejawiało się w łagodzeniu niekorzystnego wpływu stresu środowiskowego na wzrost testowanych roślin oraz zwiększenie ich aktywności metabolicznej i wyższy plon biomasy. Najkorzystniej na wzrost i aktywność fizjologiczną wierzby wiciowej wpłynęła trzykrotna dolistna i doglebowa aplikacja preparatu Biojodis w stężeniu 1%. W wariancie ze zmienną temperaturą i stałą wilgotnością gleby (30%) najskuteczniejszym preparatem okazał się Biojodis 1%, Asahi SL 0,03 % i mieszanina monokultur *Cyanobacteria*, których aplikacja istotnie poprawiła wzrost i rozwój roślin w porównaniu z serią kontrolną.

14.5. Publikacja nr 5

Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., Messyas B.. 2020. „Cultivation of energy crops by ecological methods under the conditions of global climate and environmental changes with the use of diatom extract as a natural source of chemical compounds”. *Acta Physiologiae Plantarum.*, 42:146, doi.org/10.1007/s11738-020-03135-8.

Piąta publikacja dotyczyła możliwości ograniczenia stosowania nawozów chemicznych w rolnictwie oraz ich negatywnego wpływu na środowisko i zastąpienie ich naturalnymi preparatami – mieszaniną okrzemek jako naturalnego źródła krzemu. Materiałem roślinnym były: wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.), słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazowiec pensylwański (*Sida hermaphrodita* L. Rusby). Ekstrakt naturalny uzyskano z monokultur *Navicula* sp. (*Bacillariophyceae*), którym traktowano rośliny w trzech formach aplikacji: podlewanie, opryskiwanie (aplikacja dolistna) i podlewanie i opryskiwanie. Co 2 tygodnie oznaczono: wysokość roślin, indeks zawartości chlorofilu, w połowie lata aktywność wymiany gazowej (fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową oraz stężenie międzykomórkowe CO₂), a pod koniec sezonu wegetacyjnego wykonano analizę świeżej i suchej biomasy. Oceniono również aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej (pH=6,0) i zasadowej (pH=7,5), RNazy, dehydrogenaz, oraz integralność błon cytoplazmatycznych. Otrzymane wyniki badań wskazały na pozytywny wpływ mieszaniny monokultur *Navicula* sp. na wzrost i rozwój roślin energetycznych wszystkich trzech gatunków. Zastosowane monokultury przyspieszyły wzrost, co wyraziło się wyższą wysokością traktowanych roślin o 15-25% w porównaniu do kontroli, ich jakością i plonem biomasy oraz aktywnością metaboliczną. Wykazano, że skala pozytywnego wpływu ekstraktu

z okrzemek była uzależniona od sposobu aplikacji i najbardziej korzystną jej formą było jednoczesne podlewanie i opryskiwanie roślin. Zastosowane monokultury okrzemek w znacznym stopniu łagodziły niekorzystny wpływ stresu środowiskowego na testowane rośliny energetyczne oraz zwiększyły ich aktywność metaboliczną, co w konsekwencji przełożyło się na wyższy plon biomasy. Należy przypuszczać, że szybszy wzrost i rozwój badanych roślin był spowodowany wysoką zawartością krzemu oraz innych niezbędnych makro i mikroelementów występujących w komórkach okrzemek [8] oraz dużą różnorodnością substancji biologicznie czynnych i wysoką zawartością związków antyoksydacyjnych występujących w ich komórkach [9]. Aplikacja dolistna oraz podlewanie roślin mieszaniną monokultur w tym samym czasie spowodowały najbardziej dynamiczny wzrost roślin, zintensyfikowały procesy wymiany gazowej roślin, korzystnie wpłynęły na gospodarkę wodną i aktywność enzymatyczną oraz usprawniły pobieranie substancji odżywczych z gleby. Efektem tych procesów był wyższy plon biomasy roślinnej. Wykorzystanie naturalnych ekstraktów z okrzemek *Navicula* sp. jako stymulatorów wzrostu roślin może być alternatywą dla nawozów chemicznych i jest uważane za jedną z obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie roślin.

14.6. Publikacja nr 6

Szufa S., Piersa P., Adrian Ł., Sielski J., Grzesik M., Romanowska-Duda Z., Piotrowski K., Lewandowska W.. 2020. „Acquisition of torrefied biomass from jerusalem artichoke grown in a closed circular system using biogas plant waste”. *Molecules* 25, 3862; doi:10.3390/molecules25173862.

Ostatnią publikacją wchodzącą w skład rozprawy doktorskiej jest praca dotycząca możliwości toryfikacji roślin energetycznych nawożonych bionawozami, która jest nową technologią przetwarzania biomasy na potrzeby energetyczne. W odróżnieniu do poprzednich prac, w których koncentrowano się na biostymulacji w niekorzystnych warunkach klimatycznych dla rozwoju roślin, przeznaczonych do bezpośredniego spalania lub fermentacji, w publikacji tej sprawdzono możliwość toryfikacji biomasy pozyskanej na glebie słabej po zastosowaniu nawozów naturalnych i biopreparatów. Demonstracyjnym gatunkiem poddanym procesowi toryfikacji był słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.). Toryfikacja jest procesem wstępnego, cieplnego przetwarzania biomasy mającym za zadanie zbliżyć ją do właściwości węgla. Biomase po procesie toryfikacji można dalej przetwarzać na specjalne pelety, które odznaczają się jeszcze większym podobieństwem do niskokalorycznych węgli, mają niemal zerową wilgotność i są bardziej przydatne

w energetyce niż biomasa nieprzetworzona. Celem badań była ocena wpływu odpadów z biogazowni i środków biologicznych testowanych we wcześniejszych pracach na aktywność fizjologiczną i metaboliczną roślin słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) oraz określenie wartości energetycznej uzyskanej biomasy w procesie toryfikacji. Zastosowanie odpadów z procesu biofermentacji w biogazowni jako nawozu biologicznego, stosowanego samodzielnie lub z dodatkiem preparatów Apol-humus i Stymjod (nowa generacja Biojodis), spowodowało wzrost aktywności fizjologicznej i metabolicznej słonecznika bulwiastego, co w konsekwencji może przyczynić się do ograniczenia stosowania chemicznych nawozów, których produkcja i wykorzystanie w rolnictwie jest szkodliwe dla środowiska. Przeprowadzone badania wykazały pozytywny wpływ odpadów pofermentacyjnych na wzrost roślin. Wszystkie zastosowane dawki tych odpadów przyspieszyły wzrost i aktywność fizjologiczną badanych roślin, przy czym wariant ilościowy 30-40 m³ ha⁻¹ był najkorzystniejszy. Pozytywny wpływ tego naturalnego nawozu na wzrost i rozwój został wzmocniony poprzez dodatkowe zastosowanie doglebowe preparatu biologicznego Apol-humus (10 l ha⁻¹) oraz w większym stopniu przez dodatkowe podwójne opryskiwanie roślin preparatem Stymjod (5 l ha⁻¹). Odpady z biogazowni, stosowane samodzielnie lub z dodatkiem Apol-humus i Stymjod, zwiększyły aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej, RNazy i dehydrogenaz. Aktywność tych enzymów była ściśle powiązana z rosnącymi dawkami nawozów. Wskazania pozostałych parametrów biochemicznych, w tym indeksu zawartości chlorofilu, aktywności procesu wymiany gazowej (fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej oraz stężenia międzykomórkowe CO₂), a także parametrów energetycznych, które znacząco wpłynęły na kinetykę wzrostu topinamburu, wskazały na zasadność stosowania odpadów pofermentacyjnych z jednoczesnym wykorzystaniem środków biologicznych: Apol-humus i Stymjod. Badane odpady mogą być wykorzystane jako ekonomiczny i przyjazny dla środowiska bionawóz, o ile są stosowane w określonych dawkach i zgodnie z krajowymi regulacjami prawnymi dotyczącymi bezpiecznego stosowania tych produktów. Uzyskane wyniki wykazały, że zwiększony plon biomasy roślin energetycznych wyprodukowanej w niekorzystnych warunkach środowiskowych przy pomocy nawozów naturalnych i środków biologicznych nadaje się nie tylko do bezpośredniego spalania i fermentacji, jak wykazały poprzednio omówione prace, ale również może być przetwarzany w procesie toryfikacji w celach poprawy jego właściwości energetycznych (cieplnych).

14. DYSKUSJA

15.1. Wytyczne UE w zakresie OZE

W 2018 roku Parlament Europejski zatwierdził nowe cele w zakresie odnawialnych źródeł energii (32%) oraz w zakresie efektywności energetycznej (32,5%) jakie mają zostać osiągnięte do roku 2030. Zaakceptowane założenia mają odgrywać kluczową rolę w realizacji unijnych celów klimatycznych i są to najważniejsze punkty legislacyjne wchodzące w skład pakietu „Czysta energia dla wszystkich obywateli Unii Europejskiej”. Zgodnie z polityką proekologiczną UE poszczególne kraje członkowskie muszą rozwijać i wdrożyć innowacyjne technologie ukierunkowane na ograniczenie wytwarzania energii na bazie paliw kopalnych. Energia z OZE powinna stanowić przynajmniej 32% zużycia energii brutto. Powyższe założenia będą zweryfikowane do roku 2023 przy czym każde z państw członkowskich może podwyższyć, ale nie obniżyć ich wartości. Na skutek zwiększenia efektywności energetycznej dotychczasowe koszty produkcji energii elektrycznej mają ulec obniżeniu, a Europa zmniejszy swoją zależność od zewnętrznych dostawców ropy i gazu. Dodatkowo wszystkie państwa członkowskie są zobowiązane do przeznaczenia konkretnych środków finansowych na rzecz efektywności energetycznej, uwzględniając obszary dotknięte ubóstwem energetycznym. Nowe dyrektywy unijne spowodują, że każde państwo członkowskie będzie musiało opracować minimum dziesięcioletni zintegrowany plan energetyczno-klimatyczny, w którym muszą być zawarte nowe cele i zaplanowane środki. Dokument został opracowany i ogłoszony 31 grudnia 2019 roku, a jego aktualizacja musi być przeprowadzana co 10 lat. Aby osiągnąć nowe restrykcyjne cele, Polska jako jedno z większych państw Unii Europejskiej musi w znacznym stopniu zwiększyć udział odnawialnych źródeł energii, w tym energii pochodzącej z biomasy. Biopaliwa pierwszej generacji po roku 2030 nie będą wliczane do celów UE w zakresie energii odnawialnej, a ich udział w OZE od roku 2019 jest stopniowo zmniejszany. Unia Europejska zdecydowanie wiąże większe plany z rozwojem i udziałem w OZE biopaliw drugiej generacji, które mają odgrywać kluczową rolę w zmniejszeniu wkładu węglowego. Zgodnie z założeniami Parlamentu Europejskiego do 2030 r., co najmniej 14% paliw zużywanych w transporcie będzie pochodzić z odnawialnych źródeł. Mimo wzmożonej aktywności inwestycyjnej w obszarze fotowoltaiki, farm wiatrowych i technologii opartych na pompach ciepła zgodnie z danymi Eurostatu (z dnia 23.01.2020 r.) Polska ma deficyt 3,7% do wymaganego 15% udziału OZE.

15.2. Zmiany klimatyczne

Pod koniec XIX wieku światowa populacja wynosiła niecałe 1,5 mld ludzi, a obecnie liczy 7 837 395 378 [10]. Wzrost ludności na świecie spowodował większe zużycie zasobów naturalnych, zanieczyszczenia środowiska, a tym samym znaczny wzrost konsumpcji energii elektrycznej. Od czasów rewolucji przemysłowej (koniec XVIII wieku), emisja dwutlenku węgla ze spalania paliw kopalnych, tj. węgla kamiennego i brunatnego, ropy naftowej i gazu ziemnego, zwiększyła się kilkadziesiąt razy. Według Międzynarodowej Agencji Energetycznej w latach 1850-1900 emisja CO₂ utrzymywała się na poziomie poniżej 1 mld ton rocznie, a obecnie wynosi ona ponad 36 mld ton CO₂ rocznie [11]. Prawie 30% całkowitej emisji dwutlenku węgla w Unii Europejskiej ma swoje źródło w przemyśle transportowym, z czego 72% pochodzi z sektora transportu lądowego [12]. Dotychczasowe raporty prezentowane na szczycie klimatycznym COP24 (Konferencja Narodów Zjednoczonych w sprawie Zmian Klimatu), która odbyła się w Polsce w 2018 roku, wskazywały, że w najbliższych dziesięcioleciach czeka nas wzrost globalnej temperatury o minimum dwa stopnie Celsjusza. Wielkość wzrostu temperatury na świecie w najbliższych dziesięcioleciach jest kwestią sporną (naukowcy podają od 1,8-3,1°C) jednak wszyscy są zgodni w kwestii konsekwencji jakie powstaną na skutek globalnych zmian klimatu. Naukowcy nie mają wątpliwości, że na skutek nieprzewidywalnych i gwałtownych zmian klimatycznych i środowiskowych sektorem, który najbardziej ucierpi będzie światowe rolnictwo. Ekstremalnie wysokie temperatury, pogłębiające się susze, nagłe podtopienia, coraz silniejsze huragany, niekontrolowane rozprzestrzenianie się chorób i patogenów, spowodują znaczny wzrost kosztów uprawy roślin. Wyjątkowo duża liczba dni słonecznych, wysokie temperatury powietrza i niskie opady atmosferyczne wywołały w 2018 i 2019 roku długotrwałą suszę rolniczą na terenie całej Polski. W 2018 r. niekorzystne zmiany klimatyczne dotknęły obszarów rolnych o powierzchni 3,5 mln ha, a straty wynosiły ponad 3,5 mld zł. [13]. Bezśnieżne, suche i ciepłe zimy powodują znaczny spadek poziomu wód gruntowych oraz uniemożliwiają odbudowę wilgoci w glebie. Ekstremalnie wysokie temperatury zaburzają okres wegetacyjny roślin, a w ostatnim dziesięcioleciu znacznie się nasiliły. W lipcu i sierpniu 2015 roku w Polsce wystąpiła fala upałów, z rekordową liczbą dni z temperaturą powyżej 30°C. Liczba dni upalnych w ostatniej dekadzie w stosunku do lat 1951-1990 wzrosła blisko trzykrotnie [14]. Na podstawie pomiarów prowadzonych od 1880 roku najgorętszym rokiem w historii badań globalnie był rok 2016. Rok 2019 był drugim najgorętszym rokiem, a lipiec 2019 był najgorętszym miesiącem w historii globalnych pomiarów dla tego miesiąca (od 1979, poprzedni rekord padł w lipcu 2016). Analizy pokazują również, że ostatnich pięć lat

(2015-2019) było najgorętszymi latami w historii pomiarów [15] i potwierdziły konieczność adaptacji upraw rolniczych w tym roślin energetycznych do zmian klimatycznych.

Odpowiednie dostosowanie do nowych niekorzystnych warunków pogodowych jest kluczowe dla przyszłości rolnictwa w Europie i na świecie. Warunki pogodowe i klimatyczne wpływają na dostępność wody niezbędnej do nawadniania upraw, hodowli inwentarza żywego, przetwarzania artykułów rolnych oraz warunków transportu i magazynowania. Opracowanie innowacyjnych technologii z wykorzystaniem naturalnych metod uprawy roślin jest jedyną szansą na zminimalizowanie negatywnego wpływu globalnych zmian klimatycznych na sektor rolny przy jednoczesnym zachowaniu polityki proekologicznej.

15.3. Zapotrzebowanie na biomasę roślin energetycznych do wytworzenia energii z OZE

Zmiana polityki energetycznej w Europie, rosnąca emisja gazów cieplarnianych, obawy o bezpieczeństwo i samowystarczalność energetyczną powodują intensyfikację działań mających na celu wzrost udziału OZE w wytwarzaniu energii. W związku z powyższym w ostatnim dziesięcioleciu poszukuje się nowych kierunków produkcji roślinnej mających na celu pokrycie rosnącego zapotrzebowania na energię. Jednym z nich, z którym wiąże się duże nadzieje jest wykorzystanie biomasy roślinnej do celów energetycznych. W Polsce biomasę roślinną pozyskuje się z odpadów rolniczych, leśnych i organicznych odpadów komunalnych. W przyszłości uzupełnieniem bilansu podaży biomasy powinno być jej pozyskiwanie ze specjalnych plantacji wieloletnich gatunków roślin. Według raportu Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) z 2017 roku roczny techniczny potencjał biomasy stałej wynosi 440 EJ, a biopaliw płynnych 154 EJ. Szacuje się, że światowy potencjał biomasy na lądzie wynosi około 150 gigaton (mld ton) rocznie, co odpowiada około 120 mld ton węgla kamiennego i blisko dziesięciokrotnie przekracza współczesne zapotrzebowanie świata na energię. W Polsce roczny potencjał energetyczny biomasy, którą można zagospodarować to: ponad 20 mln ton słomy odpadowej, ok. 4 mln ton odpadów drzewnych i 6 mln ton osadów komunalnych. W sumie daje to ok. 30 mln ton biomasy rocznie, co jest energetycznie równoważne 15 - 20 mln ton węgla. W Polsce udział biomasy w OZE wynosi 98% [16].

15.4. Wpływ preparatów biologicznych na wzrost i rozwój roślin energetycznych

Dotychczasowe rolnictwo konwencjonalne, nazywane również zindustrializowanym, definiuje się jako sposób gospodarowania ukierunkowany na maksymalizację zysku, osiąganego dzięki dużej wydajności produkcji roślinnej [17]. Efektywność tą uzyskuje się w wysoce wyspecjalizowanych gospodarstwach rolnych charakteryzujących się dużym

zużyciem szkodliwych dla środowiska środków chemicznych, przy stosunkowo niskim nakładzie robocizny [18]. Efektem jest szybki wzrost plonów i biomasy roślinnej przy ograniczeniu kosztów produkcyjnych. Jednocześnie z tym typem rolnictwa wiążą się liczne zagrożenia ekologiczne takie jak zanieczyszczenia gleby, wody, powietrza czy żywności pozostałościami pestycydów i metalami ciężkimi, pochodzącymi z nawozów mineralnych. Ponadto intensywne eksploatowanie gleb często prowadzi do ich erozji, obniżenia bioróżnorodności środowiska glebowego, a także zubożenia krajobrazu poprzez wprowadzenie monokultur. Nowoczesne rolnictwo oparte na zrównoważonej gospodarce cyrkulacyjnej ma na celu ograniczenie, a nawet wyeliminowanie chemicznych nawozów i zastąpienie ich organicznymi preparatami. Wykorzystanie naturalnych nawozów stanowi alternatywę dla nawozów syntetycznych oraz wpływa pozytywnie na środowisko i organizmy żywe. Szacuje się, że wykorzystanie preparatów powstałych na bazie materii organicznej w znacznym stopniu zmniejszy wykorzystanie niebezpiecznych dla środowiska i zdrowia pestycydów przy jednoczesnym utrzymaniu niskich kosztów produkcyjnych [19]. Odpowiednio dobrane zabiegi agrotechniczne mogą przyczynić się do obniżenia dostępności oraz mobilności niektórych związków toksycznych. Otrzymane wyniki wskazały na zasadność stosowania badanych preparatów (Biojodis, Asahi SL oraz mieszanin monokultur okrzemek i nietoksycznych *Cyanobacteria*) w uprawie roślin energetycznych, zarówno w optymalnych jak i niekorzystnych warunkach środowiskowych (tj. charakteryzujących się ekstremalnymi temperaturami i zmienną wilgotnością gleby). Badane preparaty biologiczne Biojodis i Asahi SL, a także mieszaniny monokultur okrzemek i *Cyanobacteria* aplikowane w formie doglebowej, oprysku oraz jednocześnie doglebowej i w formie oprysku w okresie wegetacyjnym, znacznie minimalizowały negatywne skutki stresu środowiskowego, zwiększyły odporność roślin na choroby oraz zwiększyły ich metabolizm, co skutkowało wyższym plonem biomasy. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano w wariancie z wykorzystaniem 1% preparatu Biojodis z jednoczesnym podlewaniem i opryskiwaniem roślin. Pozytywny efekt zaobserwowano również w seriach z wykorzystaniem Asahi SL oraz mieszaniny monokultur *Navicula* sp. i *Cyanobacteria*. Wszystkie trzy gatunki roślin: wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.), słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.) i ślaziolec pensylwański (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) charakteryzowały się wyższymi parametrami biochemicznymi i fizjologicznymi o 15-20% w porównaniu z serią kontrolną. Pozytywny wpływ Biojodis, Asahi SL oraz mieszanin monokultur okrzemek (*Bacillariophyceae*) i *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*) został potwierdzony poprzez analizę podstawowych parametrów fizyko-

chemicznych tj.: indeksu zawartości chlorofilu, intensywności wymiany gazowej (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa oraz stężenie międzykomórkowe CO₂), aktywności enzymatycznej: fosfatazy kwaśnej (pH=6,0) i zasadowej (pH=7,5), RNazy oraz dehydrogenaz, a także integralności membran cytoplazmatycznych. Dotychczasowe badania wskazały na dużą różnorodność substancji biologicznie czynnych i wysoką zawartość związków antyoksydacyjnych występujących w organicznych preparatach [20]. Poprzez wpływ naturalnych stymulatorów na szereg procesów metabolicznych roślin, odpowiadają one znacznie niższemu stresowi oksydacyjnemu, co wykazali w swoich badaniach Grzesik i in. 2015 i Przybysz i in. 2016 [21 i 22]. Kolejnym aspektem, który wskazuje na zasadność wykorzystania środków biologicznych w nowoczesnym rolnictwie jest korzystny bilans ekonomiczny ich stosowania. McAnally-Salas i in. 1992 [23] wykazali, że produkcja nawozów okrzemkowych w porównaniu do standardowych konwencjonalnych nawozów może być tańsza o niemal 98%. Natomiast naturalny preparat rolniczy testowany przez Valenzuela-Espinoza, 1997 [24], charakteryzował się ośmiokrotnie niższymi kosztami produkcyjnymi. Obecnie w rolnictwie polecanych jest wiele środków biologicznych, których zastosowanie skutkuje korzystniejszym bilansem ekonomicznym niż wykorzystanie nawozów i środków syntetycznych, a dodatkowo są one bardziej przyjazne dla środowiska. Tego typu działania proekologiczne stwarzają szansę na znaczne ograniczenie niebezpiecznych dla człowieka i środowiska chemicznych nawozów przy jednoczesnym obniżeniu kosztów produkcyjnych upraw roślin energetycznych. Korzystny efekt bionawozów i środków biologicznych zaobserwowano również w uprawie roślin słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) suplementowanej odpadami pofermentacyjnymi z biogazowni i aplikowanymi dodatkowo biopreparatami Apol-Humus i Stymjod (nowsza generacja Biojodis). Przeprowadzone badania wskazały również na możliwości energetycznego wykorzystania wyprodukowanej, według opracowanych metod, biomasy nie tylko w procesie spalania i biodegradacji do metanu, ale również perspektywy uszlachetnienia jej w procesie toryfikacji, w celu zwiększenia przydatności w przemyśle ciepłowniczym. Aplikacja odpadów i biopreparatów korzystnie oddziaływała na aktywność enzymów, które mają kluczowy wpływ na wzrost roślin, plon biomasy, procesy fizjologiczne i właściwości energetyczne. Podobnie jak w przypadku procesów wymiany gazowej, użyty poferment oraz preparaty biologiczne wzmacniały aktywność fosforylaz kwaśnych i zasadowych, RNazy i dehydrogenazy w sposób zależny od zastosowanej dawki. Fosforylasy alkaliczne i kwaśne są odpowiedzialne za dystrybucję fosforu w roślinach i katalizują hydrolizę fosforu organicznego oraz regulują stopień jego mineralizacji, co wpływa na wartość energetyczną

biomasy roślin [25]. Ścisły związek między zróżnicowaną formą nawożenia, a stopniem aktywności enzymatycznej i rozwojem roślin stwierdzono również w innych roślinach energetycznych, takich jak kukurydza i wierzba wiciowa, które były traktowane ekstraktem z glonów [26,27,28] oraz nawożone osadami ściekowymi i popiołem [29,30]. Stymulujący wpływ preparatów Asahi SL oraz Stymjod, aplikowanych razem z odpadami pofermentacyjnymi, na wzrost i rozwój słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) mógł być również efektem oddziaływania zawartych w nich makro- i mikroelementów, kwasów humusowych oraz jodu [31,32]. Z przedstawionych badań wynika, że wykorzystanie odpadów z biogazowni w uprawach słonecznika bulwiastego w różnych warunkach klimatycznych pozwala nie tylko na zmniejszenie dawek nawozów syntetycznych zanieczyszczających środowisko naturalne, ale także może rozwiązać poważny problem utylizacji i składowania odpadów pofermentacyjnych, który jest kosztowny i niebezpieczny dla środowiska [33,34].

Przeprowadzone badania wykazały, że wykorzystanie testowanych środków biologicznych, naturalnych ekstraktów z monokultur okrzemek (*Bacillariophyceae*) i nietoksycznych szczepów *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*) oraz odpadów z biogazowni jako stymulatorów wzrostu roślin może być uważane za jedną z obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie roślin energetycznych w warunkach zmieniającego się klimatu.

15. WNIOSKI

1. Wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.), słonecznik bulwiasty (*Helianthus tuberosus* L.) i ślaziołek pensylwański (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) wykazują zróżnicowaną wrażliwość na zastosowane ekstremalne warunki temperatury i wilgotności gleby podczas ich uprawy, a także na różne formy aplikacji bioinoculantów i środków biologicznych.
2. Szerokie spektrum temperatury (od -5 do 40°C) oraz stosowana co 3 tygodnie na przemian susza glebowa i nadmierne uwodnienie niekorzystnie wpływają na rozwój testowanych roślin.
3. Dolistna i/lub doglebowa aplikacja mieszaniny monokultur *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*), monokultur okrzemek (*Bacillariophyceae*) oraz biopreparatów Asahi SL i Biojodis w znacznym stopniu zmniejszają negatywny wpływ stresu hydrotermicznego i pozytywnie wpływają na dynamikę wzrostu oraz aktywność fizjologiczną roślin energetycznych.
4. Najbardziej skuteczną w niwelacji niekorzystnego wpływu stresu hydrotermicznego oraz stymulacji wzrostu i aktywności fizjologicznej jest dolistna i doglebowa aplikacja preparatu Biojodis o stężeniu 1%, w nieco mniejszym stopniu Asahi SL 0,2% oraz mieszaniny monokultur *Navicula* sp. i *Cyanobacteria*.
5. Wykorzystanie środków biologicznych jest ekonomiczną alternatywą oraz może sprzyjać ograniczeniu stosowania nawozów chemicznych i pestycydów, które niekorzystnie wpływają na środowisko.
6. Zwiększenie odporności roślin oraz stymulacja wzrostu i aktywności fizjologicznej przy pomocy testowanych monokultur *Navicula* sp. i *Cyanobacteria*, pofermentów z biogazowni oraz preparatów Biojodis, Asahi SL i Stymjod, skutkują uzyskaniem większego plonu biomasy roślinnej w warunkach zachodzących zmian klimatycznych, transferowanej na cele energetyczne.
7. Zastosowanie monokultur *Navicula* sp. i *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*), odpadów z biogazowni i zwiększenie ich wartości nawozowych poprzez dodatkową aplikację biopreparatów Biojodis, Apol-Humus i Stymjod jako alternatywy do nawozów sztucznych wskazuje na nowe możliwości ograniczenia nawożenia syntetycznego roślin energetycznych i zwiększenia ich plonu biomasy.

8. Pozyskana biomasa roślin energetycznych, traktowanych testowanymi bionawozami, środkami biologicznymi oraz monokulturami okrzemek i *Cyanobacteria*, charakteryzuje się wysokimi parametrami energetycznymi i może być bezpośrednio spalana w kotłach grzewczych, poddana biodegradacji do metanu oraz uszlachetniana w procesie toryfikacji w celu zbliżenia jej wartości energetycznych do węgla kamiennego.
9. Zastosowanie odpadów z biogazowni, preparatów Biojodis, Asahi SL, Stymjod i Apol-humus oraz mieszaniny monokultur okrzemek i *Cyanobacteria* jako biostymulatorów wzrostu roślin, jest jedną z najbardziej obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie testowanych roślin energetycznych.
10. Ze względu na ograniczoną ilość danych literaturowych i wzrastające zapotrzebowanie na opracowanie technologii stosowania preparatów (typu Asahi SL i Biojodis) oraz mieszaniny monokultur okrzemek i *Cyanobacteria* jako biostymulatorów w uprawie roślin, konieczne są dalsze badania w celu pełniejszego zrozumienia tych procesów, jak również identyfikacji związków aktywnych uwalnianych przez te organizmy i ich wpływu na poszczególne gatunki roślin.

16. PODSUMOWANIE

Celem przeprowadzonych prac było zbadanie wpływu wybranych biopreparatów oraz pofermentów z biogazowni, ekstraktów z okrzemek *Navicula* sp. i nietoksycznych monokultur *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*), na wzrost i rozwój wybranych roślin energetycznych: wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.), słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) w przewidywanych warunkach zmieniającego się klimatu. Wszystkie zastosowane bionawozy i biopreparaty korzystnie wpłynęły na wzrost i aktywność fizjologiczną testowanych roślin energetycznych, w stopniu zależnym od ich dawki i sposobu aplikacji. Wykazany korzystny wpływ mieszaniny okrzemek (*Bacillariophyceae*) i monokultur *Cyanobacteria* na wzrost i aktywność fizykochemiczną roślin był wynikiem oddziaływania syntetyzowanych przez te organizmy związków: mikro i makroelementów, aminokwasów i węglowodanów, witamin, roślinnych hormonów wzrostu (IAA-auksyn, GA-giberelin, CK-cytokinin) oraz wielu innych metabolitów wtórnych niezbędnych do prawidłowego rozwoju roślin. Dowiedziony pozytywny wpływ Biojodis, Stymjod i Asahi SL na testowane rośliny energetyczne, udokumentowany wyższymi parametrami aktywności metabolicznej (indeks zawartości chlorofilu, wymiana gazowa, integralność membran cytoplazmatycznych, aktywność enzymatyczna fosfatazy kwasnej i zasadowej oraz RNazy) był konsekwencją oddziaływania zawartych w tych biopreparatach substancji humusowych, chitozanu, aktywnych form jodu oraz makro- i mikroelementów. Badania wykazały, że testowane ekstrakty, pofermenty i preparaty mogą być zastosowane w rolnictwie i stanowić podstawę dla zrównoważonej ekologicznej gospodarki cyrkulacyjnej i przemysłu energetycznego, jako alternatywa dla syntetycznych, niebezpiecznych dla środowiska nawozów sztucznych i pestycydów. Opracowane wyniki potwierdziły wcześniejsze założenia i hipotezy mające na celu ograniczenie negatywnego wpływu na rośliny zmiennych warunków, sub- i supraoptymalnych temperatur oraz suszy i nadmiernego uwilgotnienia gleby.

Przeprowadzone badania wnoszą nowe informacje wskazujące na możliwość wykorzystania testowanych środków biologicznych, pofermentów z biogazowni oraz ekstraktów z monokultur okrzemek *Navicula* sp. i nietoksycznych szczepów *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*) w uprawie testowanych roślin energetycznych jako alternatywy dla nawożenia syntetycznego.

Wykorzystanie ich w rolnictwie jest uważane za jedną z obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie roślin energetycznych w warunkach zmieniającego się klimatu.

17. LITERTURA

1. P. Matczak, 2008. Adaptacja do zmian klimatu. Kosmos, tom 57, nr 3-4, str. 281-292.
2. Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów, 2012.
3. J. Tomanek, Botanika Leśna, PWRiL, Warszawa 1994, s. 449.
4. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, K. Piotrowski, W. Pszczółkowski, A. Pszczółkowska, 2014. Dydaktyczne i środowiskowe funkcje kolekcji roślin energetycznych w Centrum Transferu Technologii OZE w Konstantynowie Łódzkim. Acta Innovations, nr. 13, s.41-52. ISSN 2300-5599.
5. M.J. Stolarski, 2004: Produktowność i pozyskiwanie biomasy wierzby energetycznej, Seminarium „Bioenergia w rolnictwie” opublikowany w: Czysta Energia, październik 2004.
6. Xiao Yong Ma, Li Hua Zhang, Hong Bo Shao, Gang Xu, Feng Zhang, Fu Tai Ni, M. Brestic, 2011. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), a medicinal salt-resistant plant has high adaptability and multiple-use values. „Journal of Medicinal Plants Research”. 5 (8), s. 1272-1279.
7. K. Kwiatkowski, Ł. Graban, W. Lajszner, J. Tworowski, 2012. Produkcja biomasy ślazu pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* Rusby) jako kosubtratu do biogazowni rolniczej. Bałtyckie Forum Biogazu, Gdańsk, 17-18 września 2012 r.
8. K. Piotrowski, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2016. How Biojodis and *Cyanobacteria* alleviate the negative influence of predicted environmental constraints on growth and physiological activity of corn plants. Pol J Environ Stud 25(2):741–751. <https://doi.org/10.15244/pjoes/60894>.
9. D. Fimbres-Olivarria, E. Carvajal-Millan, J.A. Lopez-Elias, K.G. Martinez-Robinson, A. Miranda-Baeza, L.R. Martinez-Cordova, F. Enriquez-Ocaña, J.E. Valdez-Holguina, 2018. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp.. Food Hydrocolloids 75:229–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.002>.
10. Worldometers <https://www.worldometers.info/>
11. Global Carbon Project z 2017 r. <https://www.globalcarbonproject.org/>
12. Europejska Agencja Środowiskowa <https://www.eea.europa.eu/pl>

13. Agencja Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa https://www.arimr.gov.pl/?fbclid=IwAR22tUTmwrmo-cXkCNVQYTpySqURIs2DJ_xEwRgquXgYQclbz83g3LNK9g
14. The Copernicus Climate Change Service (C3S) <https://climate.copernicus.eu/>
15. Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej, Państwowy Instytut Badawczy <https://www.imgw.pl/instytut/imgw-pib>
16. K. Napieraj i M. Stańczak Odnawialne Źródła Energii – Biomasa.
17. J. Kuś, M. Fotyma, 1992. Stan i perspektywy rolnictwa ekologicznego. Fragmenta Agronomica 2, 75–86.
18. M. Głodowska, A. Gałązka, 2018. Intensyfikacja rolnictwa a środowisko naturalne. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, nr 592, 3–13.
19. G.V. Bloemberg, A.H.M. Wijnfijes, G.E.M. Lamers, N. Stuurman, B.J.J. Lugtenberg, 2000. Molecular Plant Microbe Interaction, 13, 1170.
20. D. Fimbres-Olivarria, E. Carvajal-Millan, J.A. Lopez-Elias, K.G. Martinez-Robinson, A. Miranda-Baeza, L.R. Martinez-Cordova, F. Enriquez-Ocaña, J.E. Valdez-Holguina, 2018. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp.. Food Hydrocolloids Vol. 75, Pages 229-236.
21. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, K. Piotrowski, R. Janas, 2015. Diatoms (*Bacillariophyceae*) as an effective base of a new generation of organic fertilizers. Przemysł Chemiczny, 94(3):391–396.
22. H. Gawrońska, A. Przybysz, A. Słowiński, 2008. Biological basis of action biostimulant Asahi SL. Conf. Biostimulators in Modern Crop Production, February 7-8, Warsaw, Poland.
23. L.S. McAnally-Salas, F. Ocampo-Aranda, L.E. Garcí 'a-Pa'manes, 1992. Efecto de la microalga Pavlova lutheri (Droop) cultivada con fertilizantes agrí 'colas en el crecimiento y supervivencia de larvas y postlarvas del mejillo'n *Mytilus edulis* (L). Ciencias Marinas 18, 57/74.
24. E. Valenzuela-Espinoza, 1997. Uso de un medio alterno al 'f/2' para el cultivo de *Isochrysis aff. Galbana* (clone t-ISO). M. Sc. Thesis, Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Auto'noma de Baja California. Ensenada, Baja California, Mexico, p. 51.
25. W.A. Dick, M.A. Tabatabai, 1992. Significance and potential uses of soil enzymes. Environ. Manag., 95–125.
26. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, 2015. Ability of *Cyanobacteria* and microalgae in improvement of metabolic activity and development of willow plants. Pol. J. Environ. Stud. 2015, 24, 1003–1012, doi:10.15244/pjoes/34667.

27. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, K. Piotrowski, 2009. The effect of potential climatic changes, *Cyanobacteria*, Biojodis and Asahi SL on development of the Virginia fanpetals (*Sida hermaphrodita*) plants. *Pamiętnik Puławski* 2009, 151, 483–491.
28. M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, 2014. Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with *cyanobacteria* and microalgae. *Pol. J. Environ. Stud.* 2014, 23, 1147–1153.
29. Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, H.M. Kalaji, 2010. Phytotoxkit test in growth assessment of corn as an energy plant fertilized with sewage sludge. *Environ. Prot. Eng.*, 36, 73–81.
30. Z. Romanowska-Duda, R. Janas, M. Grzesik, 2019. Application of Phytotoxkit in the quick assessment of ashes suitability as fertilizers in sorghum crops. *International Agrophysics*, 33, s.145–152, doi: 10.31545/intagr/104597.
31. K. Piotrowski, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, 2016. How biojodis and *cyanobacteria* alleviate the negative influence of predicted environmental constraints on growth and physiological activity of corn plants. *Pol. Journal Environmental Study*, 25, 741–751, doi: 10.15244/pjoes/60894.
32. A. Jeznach, 2015. General description of organic and mineral fertilizer “Stymjod” intended for foliar fertilization of plants. Available online: http://www.phujeznach.com.pl/doc/Stymjod/Opis_preparatu_STYMJOD_2.pdf (accessed 28 July 2018).
33. A. Pszczółkowska, Z. Romanowska-Duda, W. Pszczółkowski, M. Grzesik, Z. Wysokińska, 2012. Biomass production of selected energy plants: Economic analysis and logistic strategies. *Comp. Econ. Res.* 2012, 15, 77–103.
34. Z. Romanowska-Duda, K. Piotrowski, B. Wolska, M. Dębowski, M. Zieliński, P. Dziugan, S. Szufa, 2020. Stimulating Effect of Ash from *Sorghum* on the Growth of *Lemnaceae*—A New Source of Energy Biomass; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2020; pp. 341–349.

18. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW

Krzysztof Piotrowski
Katedra Ekofizjologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 12.02.2021 r.

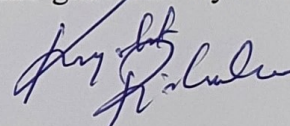
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., M. Grzesik 2014. „Climate change and the cultivation of energy crops”. Acta Innovations, ISSN 2300-5599, vol. 11. Str. 19-29.

udział autorów:

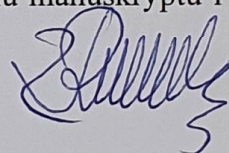
Piotrowski K.: mój udział wynosił **65%** i polegał na:

Koncepcja manuskryptu, zebranie danych literaturowych, opracowanie graficzne wykresów, współudział w przygotowaniu manuskryptu i korekty po recenzjach.



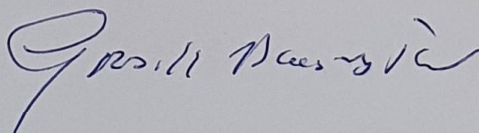
Romanowska-Duda Z.: mój udział wynosił **30%** i polegał na:

Wytyczenie zakresu tematycznego, współudział w przygotowaniu manuskryptu i korekty po recenzjach, autor korespondujący.



Grzesik M.: mój udział wynosił **5%** i polegał na:

Współudział w przygotowaniu manuskryptu w zakresie charakterystyki roślin energetycznych.



Krzysztof Piotrowski
Katedra Ekofizjologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 12.02.2021 r.

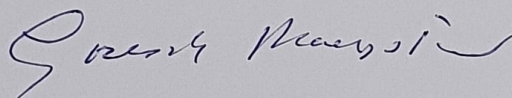
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzesik M., Romanowska-Duda Z., Piotrowski K., Janas R.. 2015. „Okrzemki (*Bacillariophyceae*) jako efektywne bazy nawozów ekologicznych nowej generacji”. Przemysł Chemiczny, 94/3; s: 391- 396.

udział autorów:

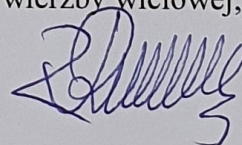
Grzesik M.: mój udział wynosił **20%** i polegał na:

Współudział w koncepcji badań w zakresie stosowania nawozu YaraMila i badań dotyczących wymiany gazowej w liściach wierzby wiciowej oraz w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



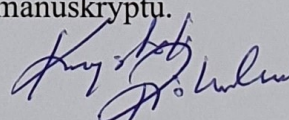
Romanowska-Duda Z.: mój udział wynosił **20%** i polegał na:

Współudział w koncepcji badań w zakresie stosowania ekstraktów *Navicula* sp. jako nawozu, badań dotyczących wymiany gazowej: fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i stężenia międzykomórkowego CO₂ w liściach wierzby wiciowej, przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu. Autor korespondencyjny.



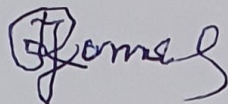
Piotrowski K.: mój udział wynosił **40%** i polegał na:

Współudział w koncepcji badań i wykonaniu doświadczeń. Wykonanie badań i przygotowanie materiału roślinnego. Przygotowanie sterylnych pożywek do hodowli okrzemek, *Navicula* sp., otrzymanie zawiesin komórkowych i sonifikowanych homogenatów okrzemkowych do nawożenia roślin *Salix viminalis* L., współudział w przeprowadzanych doświadczeniach i analizach aktywności enzymatycznej fosfataz pH 6,0 i pH 7,5, RNazy i dehydrogenazy, przygotowanie prób do oznaczeń parametrów energetycznych i zawartości N, P i K dla wierzby, współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



Janas R.: mój udział wynosił **20%** i polegał na:

Ocena zdrowotności roślin wierzby wiciowej, ich naturalnej odporności na patogeny we wszystkich seriach doświadczalnych. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Janas R.', with a stylized, cursive script.

OŚWIADCZENIE

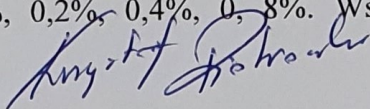
Oświadczam, że w pracy: Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., Grzesik M.. 2016. „*Cyanobacteria*, Asahi SL i Biojodis jako biostymulatory poprawiające wzrost i rozwój ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) w niekorzystnych warunkach zmieniającego się klimatu”. Przemysł Chemiczny, Vol.95, No.8, 1569-1573.

udział autorów:

Piotrowski K.: mój udział wynosił 60% i polegał na:

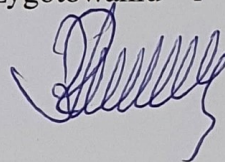
Współudział w koncepcji badań i wykonaniu doświadczeń. Przygotowanie mediów sterylnych do hodowli *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR0105, *Anabaena variabilis*. Prowadzenie hodowli monokultur *Cyanobacteria*, oznaczanie i analiza kinetyki gęstości komórek. Opracowanie metodyki otrzymywania homogenatów 3 gatunków *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR0105, *Anabaena variabilis* z wykorzystaniem metody sonifikacji oraz uzyskanie sterylnych zawiesin komórkowych. Przygotowanie roztworów Biojodis 1%, 2% i 3%, Asahi SL 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0, 8%. Współudział w prowadzonych doświadczeniach na roślinach ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) zgodnie z opracowanymi wariantami: (a) zmienna temperatura, stała wilgotność (20/0/20°C; 20/40/20°C; 20/0/40/20°C; 10/-5/20/40/20°C, (b) temperatura 20°C, zmienna wilgotność gleby 20-60% co 3 tygodnie (kontrola; 20-60%; 20-60% + mieszanina *Cyanobacteria*; 20-60% + Asahi SL; 20-60% + Biojodis. (c) temperatura 10°C lub 40°C, stała wilgotność gleby 30% (kontrola; mieszanina *Cyanobacteria*; Asahi SL; Biojodis) przy różnych formach aplikacji: dolistnej, doglebowej i mieszanej; udział w analizach aktywności enzymatycznej fosfohydrolaz pH 6,0 i pH 7,5, RNazy i dehydrogenaz dla wszystkich wymienionych wariantów, przygotowanie wszystkich roztworów reakcyjnych, homogenatów roślinnych i *Cyanobacteria* oraz roztworów Biojodis

1%, 2% i 3%, Asahi SL 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,8%. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



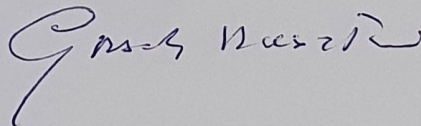
Romanowska-Duda Z.: mój udział wynosił **35%** i polegał na:

Współudział w koncepcji i wykonaniu badań dotyczących wymiany gazowej: fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i stężenia międzykomórkowego CO₂ w liściach ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby dla wariantów: zgodnie z opracowanymi wariantami: (a) zmienna temperatura, stała wilgotność (20/0/20°C; 20/40/20°C; 20/0/40/20°C; 10/-5/20/40/20°C (b) temperatura 20°C, zmienna wilgotność gleby 20-60% co 3 tygodnie (kontrola; 20-60%; 20-60% + mieszanina *Cyanobacteria*; 20-60% + Asahi SL; 20-60% + Biojodis. (c) temperatura 10°C lub 40°C, stała wilgotność gleby 30% (kontrola; mieszanina *Cyanobacteria*; Asahi SL; Biojodis) przy różnych formach aplikacji: dolistnej, doglebowej i mieszanej. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu. Autor korespondencyjny.



Grzesik M.: mój udział wynosił **5%** i polegał na:

Kierownik grantu, współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



Krzysztof Piotrowski
Katedra Ekofizjologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 12.02.2021 r.

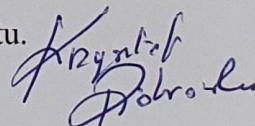
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Piotrowski K., Romanowska-Duda Z.. 2018. „Positive impact of bio-stimulators on growth and physiological activity of willow in climate change conditions”. International Agrophysics. Vol. 32, doi: 10.1515/intag-2017-0006.

udział autorów:

Piotrowski K.: mój udział wynosił 60% i polegał na:

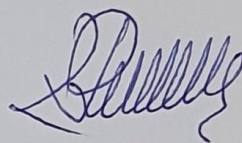
Współudział w koncepcji badań i wykonaniu doświadczeń. Przygotowanie mediów sterylnych: BG11, ATCC Medium 616 do hodowli *Cyanobacteria: Anabaena* sp. PCC 7120, *Microcystis aeruginosa* MKR0105. Prowadzenie hodowli monokultur *Cyanobacteria*, oznaczanie i analiza kinetyki gęstości komórek. Opracowanie metodyki otrzymywania homogenatów 2 gatunków *Cyanobacteria: Anabaena* sp. PCC 7120, *Microcystis aeruginosa* MKR0105 z wykorzystaniem metody sonifikacji oraz uzyskanie sterylnych zawiesin komórkowych. Współudział w prowadzonych doświadczeniach na roślinach wierzby *Salix viminalis* L.) zgodnie z opracowanymi wariantami: (a) zmienna temperatura, stała wilgotność 30% i temperatura 10°C, 20°C, 40°C; (b) stała wilgotność 30%, temperatura 20/0/20°C; 20/40/20°C; 20/0/40/20°C; 10/-5/20/40/20°C; (c) zmienna wilgotność gleby 20-60% temperatura 20°C (kontrola; 20-60%; 20-60% + mieszanina *Microcystis aeruginosa* i *Anabaena* sp. PCC 7120, 1% Biojodis, lub 0,03% Asahi SL; udział w oznaczaniu wzrostu roślin, przewodnictwa elektrolitycznego, indeksu chlorofilu, aktywności enzymatycznej fosfohydrolaz pH 6,0 i pH 7,5, RNazy i dehydrogenaz dla wszystkich wymienionych wariantów, przygotowanie wszystkich roztworów reakcyjnych, homogenatów roślinnych i *Cyanobacteria*. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



Romanowska-Duda Z.: mój udział wynosił 40% i polegał na:

Oznaczaniu wymiany gazowej: fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i stężenia międzykomórkowego CO₂ w roślinach wierzby *Salix viminalis* L.) zgodnie z

opracowanymi wariantami: (a) zmienna temperatura, stała wilgotność 30% i temperatura 10°C, 20°C, 40°C; (b) stała wilgotność 30%, temperatura 20/0/20°C; 20/40/20°C; 20/0/40/20°C; 10/-5/20/40/20°C; (c) zmienna wilgotność gleby 20-60% temperatura 20°C (kontrola; 20-60%; 20-60% + mieszanina *Microcystis aeruginosa* i *Anabaena* sp. PCC 7120, 1% Biojodis, lub 0,03% Asahi SL. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu. Autor korespondencyjny.



Krzysztof Piotrowski
Katedra Ekofizjologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 12.02.2021 r.

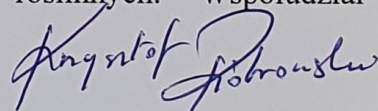
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., Messyasz B.. 2020. „Cultivation of energy crops by ecological methods under the conditions of global climate and environmental changes with the use of diatom extract as a natural source of chemical compounds”. Acta Physiologiae Plantarum., 42:146.

udział autorów:

Piotrowski K.: mój udział wynosił **60%** i polegał na:

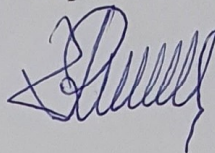
Współudział w koncepcji badań i wykonania doświadczeń. Przygotowanie mediów sterylnych do hodowli okrzemek *Navicula* sp.; prowadzenie upraw: wierzy (*Salix viminalis* L.), słonecznika bulwiastego (*Helianthus tuberosus* L.) i ślazu pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby). Prowadzenie hodowli monokultur okrzemek, oznaczanie i analiza kinetyki gęstości komórek *Navicula* sp.. Opracowanie metodyki otrzymywania ekstraktu z *Navicula* sp. metodą sonifikacji. Współudział w prowadzeniu uprawy roślin wierzy (*Salix viminalis* L.) przy różnych formach aplikacji okrzemek *Navicula* sp.: dolistnej (oprysk), dogłębowej (podlewanie) i mieszanej zgodnie z wariantami doświadczalnymi. Wykonanie doświadczeń na roślinach dla wariantów: Kontrola, 20/0/20°C, 20/40/20°C, 20/0/40/20°C, 10/-5/20/40/20°C, z uwzględnieniem podlewanie ekstraktem z okrzemek, oprysk tym ekstraktem oraz łącznie podlewanie i oprysk. Oznaczanie wzrostu roślin, przewodnictwa elektrolitycznego, indeksu chlorofilu, aktywności enzymatycznej fosfohydrolaz pH 6,0 i pH 7,5, RNazy i dehydrogenaz dla wszystkich wymienionych wariantów. Przygotowanie wszystkich roztworów reakcyjnych i homogenatów roślinnych. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



Romanowska-Duda Z.: mój udział wynosił **30%** i polegał na:

Oznaczaniu wymiany gazowej: fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i stężenia międzykomórkowego CO₂ dla wariantów: Kontrola, 20/0/20°C, 20/40/20°C,

20/0/40/20°C, 10/-5/20/40/20°C, z uwzględnieniem podlewanie ekstraktem z okrzemek, oprysk tym ekstraktem oraz łącznie podlewanie i oprysk. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu. Autor korespondencyjny.



Messyasz B. mój udział wynosił **10%** i polegał na:

Konsultacje w zakresie okrzemek. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.

Beata Messyasz

Krzysztof Piotrowski
Katedra Ekofizjologii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 12.02.2021 r.

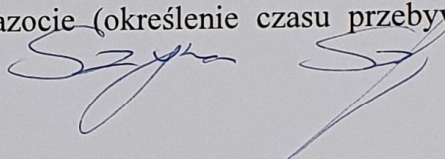
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Szufa S., Piersa P., Adrian Ł., Sielski J., Grzesik M., Romanowska-Duda Z., Piotrowski K., Lewandowska W.. 2020. „Acquisition of Torrefied Biomass from Jerusalem Artichoke Grown in a Closed Circular System Using Biogas Plant Waste”. Molecules 25, 3862.

udział autorów:

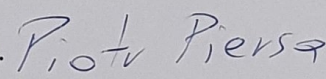
Szufa S.: mój udział wynosił **30%** i polegał na:

Budowie instalacji do toryfikacji biomasy (Topinambura) w azocie. Wykonanie badań nad parametrami procesu toryfikacji Topinambura w azocie (określenie czasu przebywania i temperatury procesu toryfikacji).



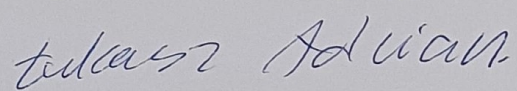
Piersa P.: mój udział wynosił **5%** i polegał na:

Opracowanie wykresów analizy termograwimetrycznej procesu toryfikacji.



Adrian Ł.: mój udział wynosił **5%** i polegał na:

Opracowanie literatury.

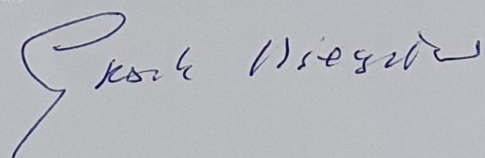


Sielski J.: mój udział wynosił **5%** i polegał na:

Wykonanie analizy SEM toryfikatów i analizy składu mineralnego.

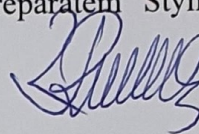
Grzesik M.: mój udział wynosił **15%** i polegał na:

Współudział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, prowadzeniu upraw roślin, oceny wzrostu dla serii doświadczalnych (kontrola, warianty z wirowanymi osadami z biogazowni, w dawce: 0, 10, 20, 30, i 40 m³ ha⁻¹; z niewirowanymi osadami z biogazowni w dawce 40 m³ ha⁻¹ razem z preparatem Apol-humus (10L ha⁻¹) i Stymjod (5L ha⁻¹). Oznaczenia świeżej i suchej masy, Oznaczanie mikro i makroelementów. Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



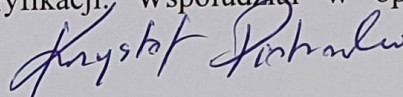
Romanowska-Duda Z.: mój udział wynosił **15%** i polegał na:

Współudział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań. Oznaczaniu wymiany gazowej: fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i stężenia międzykomórkowego CO₂ dla wariantów doświadczalnych, (kontrola, warianty z preparatem Stymjod (Biojodis). Współudział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptu.



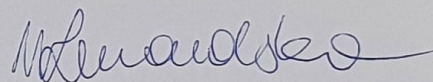
Piotrowski K.: mój udział wynosił **20%** i polegał na:

Współudział w opracowaniu koncepcji i metodologii badań, prowadzenie doświadczeń w zakresie serii doświadczalnych (kontrola, warianty z preparatem Stymjod (Biojodis), ocena aktywności enzymatycznej fosfohydrolazy kwaśniej pH 6,0 i alkalicznej pH 7,5, RNazy i dehydrogenaz oraz opracowanie wyników w tym zakresie. Przygotowanie prób biomasy roślin *Helianthus tuberosus* L. do procesu toryfikacji. Współudział w opracowaniu manuskryptu.



Lewandowska W.: mój udział wynosił **5%** i polegał na:

Opracowanie graficzne publikacji oraz wykonanie schematów metodologii badawczej jak i grafiki stanowiska pomiarowego do toryfikacji biomasy.



Krzysztof Piotrowski, Zdzisława Romanowska-Duda
University of Łódź, Faculty of Biology and Environmental Protection
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
K_piotrow@o2.pl, romano@biol.uni.lodz.pl

Mieczysław Grzesik
Institute of Horticulture
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Mieczyslaw.Grzesik@insad.pl

CLIMATE CHANGE AND THE CULTIVATION OF ENERGY CROPS

Abstract

Atmospheric circulation, temperature, hydrological cycles, and solar radiation affect all organisms on earth. Rapid climate change, with positive and negative effects, forces people to create new and effective solutions in the fields of industry, agriculture and construction in all aspects of the global economy. Developing appropriate strategies for growing energy crops using organic methods will help to reduce the negative effects of global environmental change.

Key words

Climate, climate change, energy crops

Introduction

Climate change at the national and global levels is conducive to increasing the areas and the potential of use of energy crops to produce biomass, and for the introduction of species resistant to biotic and abiotic environmental changes into farming.

Bearing in mind the changes in climate, which are accelerating and often surprising with new phenomena, it is appropriate to move away from the definition of the climate to understand its structure, the influence of external factors and, consequently, the progressing changes. Climate is understood as a characteristic course of weather phenomena, which have been cyclical over many years [1]. Most often observations made over a period of thirty years are considered. The climate is determined by the course of the weather, including a wide variety of factors, such as temperature, precipitation, or wind. On Earth, we can distinguish three basic climate-forming processes: water, heat and air circulation. In addition, geographic factors play an important role, including the height above sea level and the layout of the lands and oceans. The life of organisms and the frequency of their occurrence are conditioned by ecological factors, including the climate.

Climate and environmental changes that have occurred in recent years are due to natural causes. One cannot forget, however, that man and his activities are also contributing significantly to the effects of extreme weather conditions. Over the last decades, researchers have observed that these changes are much larger and are occurring much more quickly because of increased intensity of anthropogenic activities that are unfavorable to the environment. In 1988, on December 6, Resolution 43/53 of the United Nations General Assembly was made, which recognized that climate changes and their negative effects are a common problem for humanity. At the same time, a special unit was also created, the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), which aims to investigate the causes and effects of climate change and to disseminate the information obtained to the authorities of different countries and individuals or institutions interested in this subject [2].

The causes and effects of climate changes

Factors that significantly affect climate change are divided into two main groups. Changes due to natural factors and those that result from human activity (anthropogenic effects). Multiple, unfavorable human activities include, but are not limited to, atmospheric pollution. This is due to excessive CO₂ emission during the combustion process of fossil fuels like coal, crude oil, or natural gas. The significantly increased level of CO₂ results in the retention of heat in the atmosphere and consequently results in global warming.

The dissemination of the opinion on the significant impact of CO₂ emissions on the greenhouse effect has begun activities aimed at extending the idea of protecting the Earth's climate. The most important document to influence the imposition of restrictions associated with CO₂ emissions is the Kyoto Protocol from 1998 [3]. It

complements the United Nations Framework Convention and the international treaty on counteracting global warming. This document came into force on February 12, 2005. According to the provisions of the treaty, the countries that have ratified it have pledged to reduce their greenhouse gas emissions by at least 5% by 2012 compared to the 1990s. Any action taken on a large scale at that time did not bring the expected results. Many countries have not undertaken any commitments to cut CO₂ emissions or have merely decided not to increase it. The absence of any restrictions and sanctions has led to unsatisfactory results in the fight against adverse climate changes.

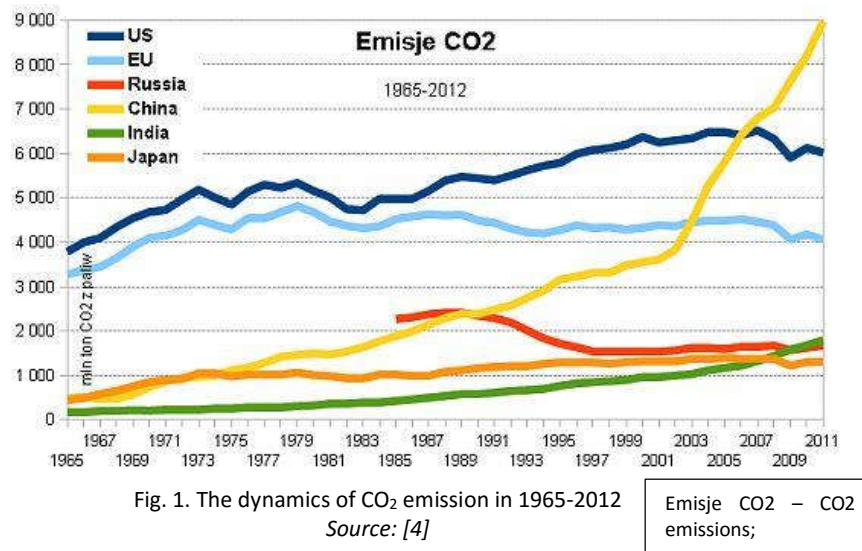


Fig. 1. The dynamics of CO₂ emission in 1965-2012

Source: [4]

The graph above shows that in the 1960s (initial state) almost 70% CO₂ was emitted by Western countries. As of today, this ratio has been significantly reduced. The United States, once responsible for nearly 35% of greenhouse gas emissions, reduced this to only 18%, while the EU countries cut emissions from 29% to 12%. Unfortunately, in the last dozen or so years, new leaders like China or India have increased CO₂ emissions due to rapid economic growth. Most emissions come from the combustion of coal (43%), oil (33%), gas (18%), cement production (5.3%) and gas extraction processes (0.6%). The total CO₂ emissions calculated from the beginning of the Industrial Revolution (approx. 1870) will reach 2,015 billion tons by the end of 2013, with 70% corresponding to the combustion of fossil fuels, and 30% to deforestation and other interferences in land surfaces [5]. Nearly 86% of CO₂ is produced by countries that are non-EU countries that are not covered by the "3x20" directive planned for 2020, and did not ratify the Kyoto protocol. These countries have strongly increased coal mining and CO₂ emissions. The global use of coal will most likely increase more than twice by 2030. Today, the worldwide power industry is 41% based on coal. By 2030, the share of coal in energy production and its use in other industries is expected to rise to 44% [6].

Studies on the mechanisms and effects of climate change are being undertaken. The effects of the progressing climate changes include the melting of ice caps on the poles. At the North Pole, the area covered by arctic ice has decreased by 10%. The thickness of the ice under the surface of the water has decreased by about 40%. The ice cap in Antarctica has undergone similar processes [7]. According to the Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), the area of ice in the Arctic is getting smaller and smaller (Figure 2).

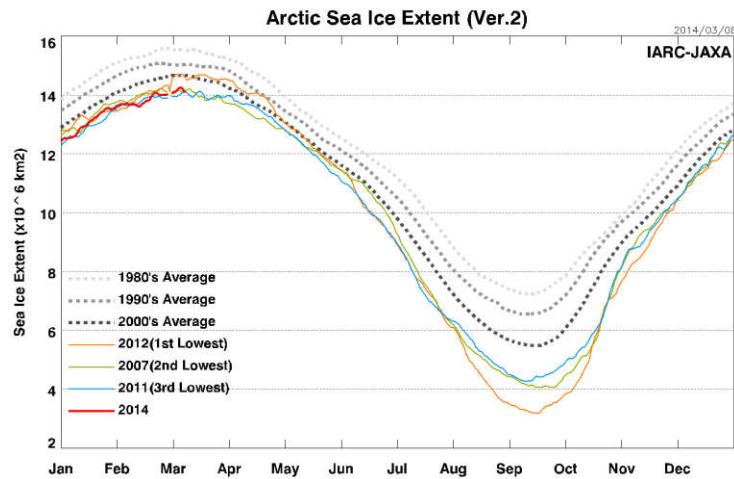


Fig. 2. The range of ice in the Arctic in 2014 against the background of recent years IARC-JAX A

Source: [8]

Another significant change is the shrinking of the glaciers. It is estimated that up to 75% of glaciers will disappear in the Swiss Alps by 2050. It is likely that melting of the glacier covering Kilimanjaro will occur even faster, as early as 2020. The Austrian and Swiss communities are trying to protect the glaciers on their own, covering them with special foils to protect them from being completely melted. Because of global warming, sea levels are rising. During the last century, the water level has risen by as much as 25 centimeters, and is expected to grow further to 88 centimeters by 2100. As a result, low-lying islands and coastal areas may be flooded. Areas located deeper inland may also be flooded by sea water, thus destroying crop areas and causing pollution of fresh water resources. Progressive climate change results in extreme weather conditions, such as hurricanes, floods, storms and droughts. In addition, compared to the previous decades (Fig. 3), the last decade is full of natural disasters, particularly floods and hurricanes. Increasing temperatures can cause significant shortages in access to drinking water, to which 1.1 billion people currently do not have permanent access. The rise of the temperature will increase the number of people suffering from water shortages by up to 3.4 billion.

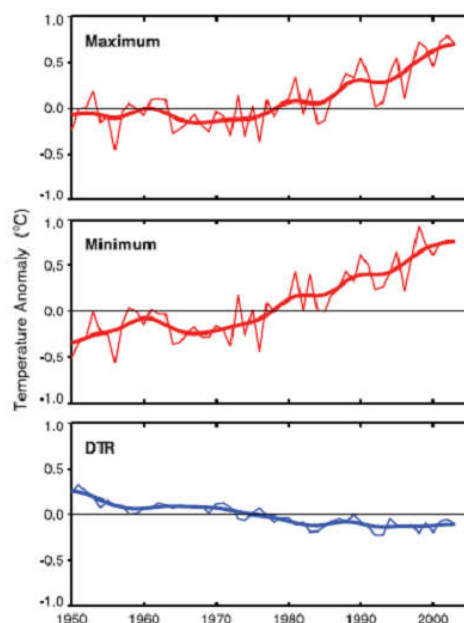


Fig. 3. The average annual anomalies of maximum and minimum daily and daily temperature amplitudes in the period 1950-2004

Source: [9]

An increase of the temperature by 2.5°C means that the current number of 850 million people suffering from chronic hunger will increase by another 50 million. A temperature higher than the current one is also a huge

epidemiological risk and danger due to the spread of infectious diseases by insects. Higher temperatures contribute to the development of disease-carrying insects, which in this case will be able to reach many other regions and will spread the disease even where it has not previously been a major threat. Climate changes have a significant impact on the environment and its ecosystems. By 2050 it is estimated that up to 1/3 of the presently living species can be extinct. Polar bears, seals, walruses and penguins are particularly threatened. The boundaries of ecosystems shift, which results in animals not being able to adapt to the new conditions imposed on them and begin to die out.

Public awareness and European programs

Lack of knowledge and disregard for the problems associated with climate changes still result in insufficient action. An example of this is a 2007 survey conducted by Ipsos MORI in the UK, which revealed that 56% of citizens think scientists are still questioning climate change. The poll suggests that terrorism, graffiti, and crime are more alarming than climate change [10].

Table 1. The social perception of the existence and significance of global warming in the world and in the United States

View	% agreeing	Applicable/Year
Global warming is likely taking place.	85	USA/2006
Global warming is likely taking place.	80	USA/1998
Human activity is a significant cause of climate change.	71	USA/2007
Human activity is a significant cause of climate change.	79	World/2007
Climate change is a serious problem.	76	USA/2006
Climate change is a serious problem.	90	World/2006
Climate change is a serious problem.	78	World/2003
It is necessary to take appropriate action quickly.	59	USA/2007
It is necessary to take appropriate action quickly.	65	World/2007

Source: Ipsos MORI poll from June, 2007 in the UK

A report published by the European Environment Agency titled "Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012" stated that average temperatures were rising throughout Europe, and there was also a decrease in precipitation in the southern regions and an increase in precipitation in Northern Europe. Greenland's ice cap, Arctic sea ice, and many glaciers in Europe are melting, most of the permafrost is warming up, and the extent of the snow cover has decreased significantly. There is a high likelihood that in the future we can expect further negative consequences of global climate change, which will have a significant impact on the global economy [11]. This implies the need to take steps at several levels, at the local, regional and national levels. The size and the strength of the negative effects depend to a large extent on the socio-economic, geographical or climatic conditions of the region [12]. The European Union report shows that all European countries are exposed to sudden and unpredictable climate changes, but not all regions are equally affected. The effects of climate change will significantly contribute to increasing social disparities across the EU. We must pay close attention to the social groups and regions that are most at risk and that are already in a difficult situation.

Therefore, to reduce the effects of climate change, many joint adaptation projects have been developed between countries, regions or cities. Most of these types of programs are partly or fully financed by the European Union. An example is the 2014-2020 Research and Innovation Framework Program Horizon 2020, with a budget of more than 77 billion euros [13]. This program is intended to fund particularly small and medium-sized enterprises, which can be pioneers in developing projects and services to combat climate change, by exploiting the opportunity to conduct business around the world. These innovative strategies aim to promote a low-emission economy that is immune to climate change, and to promote sustainable development. Another program is LIFE +, whose main objective is sustainable development of the environment through the implementation and updating of community policies [14]. These actions are supported by EU funds and international institutions, including the European Investment Bank and the European Bank for Reconstruction and Development.

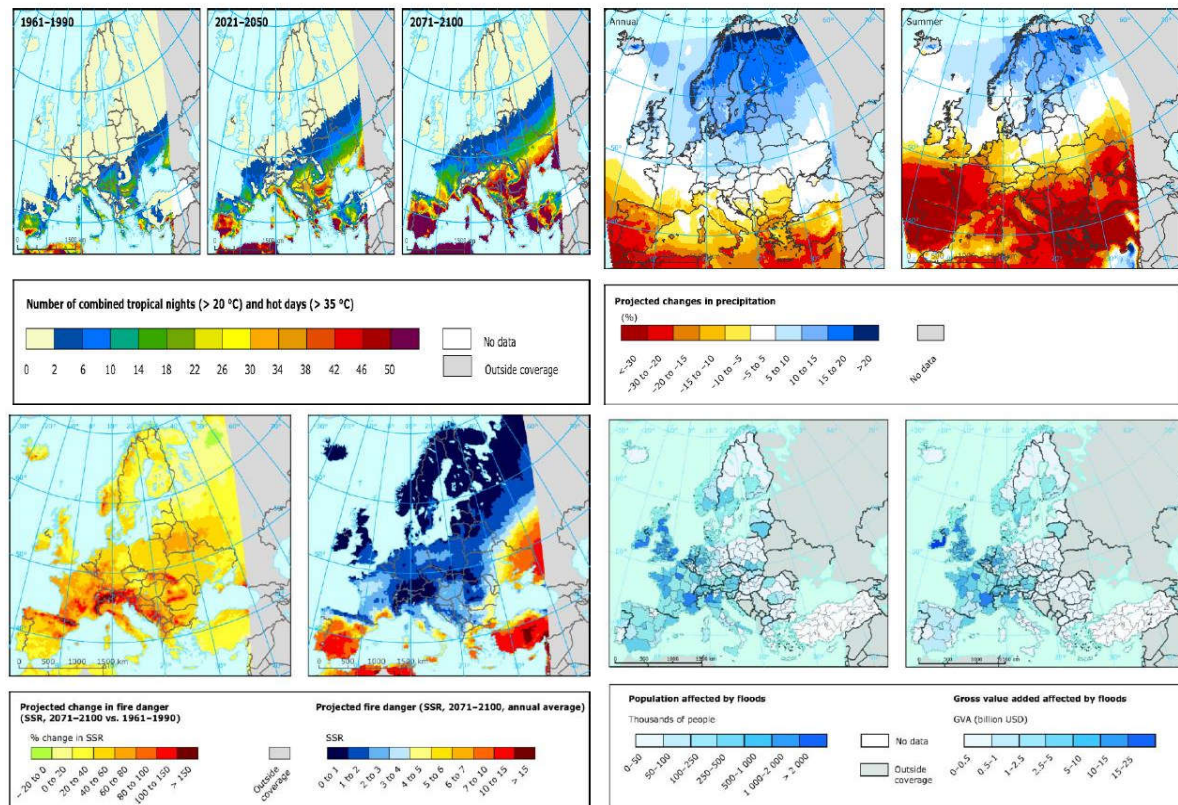


Fig. 4. The predicted effects of climate change and the related risks. *Based on the EEA report on the effects of climate change and vulnerability in Europe (2012)*
Source: [15]

Most industries, a significant proportion of the economy, global agriculture, and tourism are either directly or indirectly dependent on climatic conditions. One of the many examples of the effects associated with the changes are disturbances in the water management of ecosystems, the impact of heavy rainfall on the sudden rise of groundwater levels, and thus the impact of this process on surface water quality (Figure 4) [16].

Climate changes in Poland

Rapid climate change and unexpected weather anomalies like hurricanes, tornadoes, high temperature fluctuations, violent precipitation, and long-lasting droughts have become a reality in the last dozen or so years. Because of its geographic location, Poland is in a place conducive to the clashing of various masses of air, resulting in the formation of extremely different weather conditions, and consequently affecting the climate of our country. Poland's climate is characterized by high volatility and significant fluctuations, which can be exemplified by the recent turn of the weather. Warm winters, hot and rainy summers, and a short autumn and spring have a significant impact on the environment and thus on the economy. The lack of rainfall, low humidity, droughts and previously unprecedented temperatures are of great importance for all ecosystems and water relations in the surrounding region. Such phenomena are particularly noticeable in southern and southeastern Poland. According to scientists from the Institute of Meteorology and Water Management, the main cause of this situation is the process of climate change. Global weather changes affect the climate situation on both the regional and national levels. In the future, there will be significant changes in the hydrological cycle. The results of these changes will have a significant impact on the environment of the whole country.

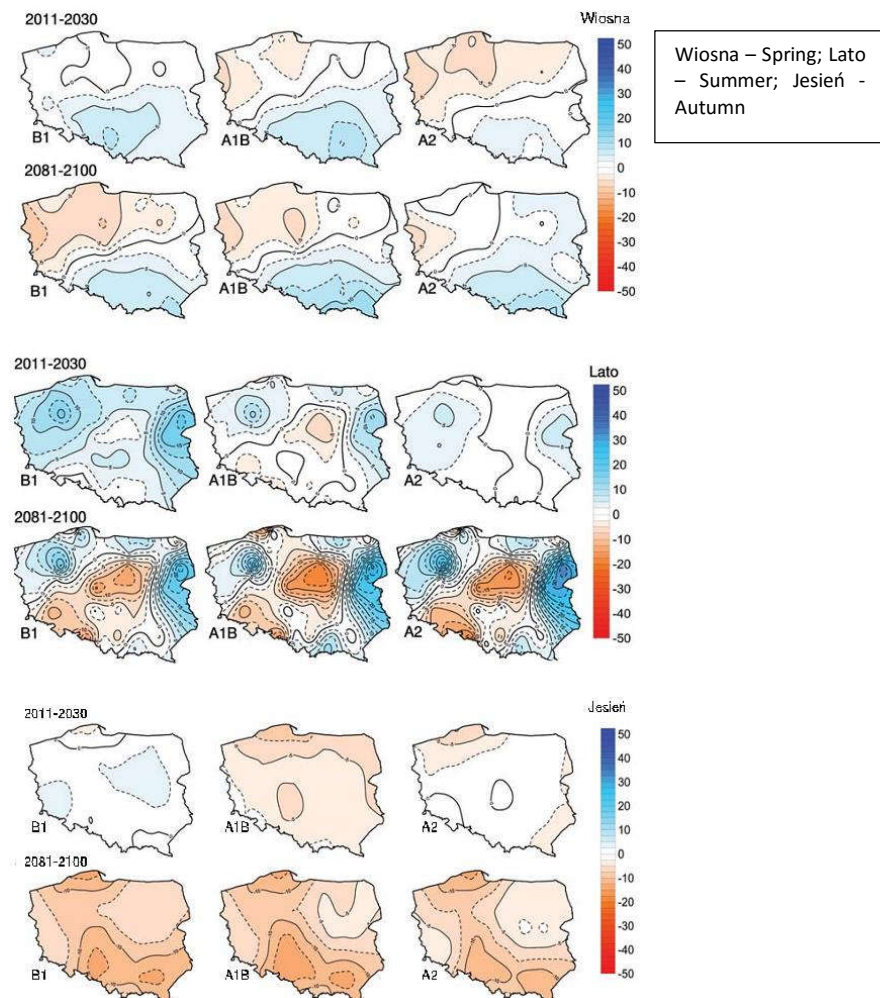


Fig. 5. A scenario of change of the sums of rainfall in Poland in spring, summer and autumn season for the periods 2011-2030 and 2081-2100

Source: [17]

An analysis of the average annual precipitation in Poland from the last decade indicates a significant decrease in the so-called average annual precipitation in the southwest of the country by almost 5% and an increase of the average annual precipitation in the east by about 4% (Fig. 5). It must be stressed, however, that in the case of temperature, all forecasts jointly indicate growth tendencies, whereas in the case of precipitation the results are significantly different from one another. Despite the ambiguity of forecasts, it is necessary to consistently improve the system of water resources management in Poland.

Energy crops and climate change

Extreme climatic events that are widespread around the globe lead to a significant decrease in crop yields, including energy crops. Human activities increase the intensity of the natural greenhouse effect. This leads to significant changes in the temperature values and to related phenomena taking place throughout the climate system. The last decade of the 20th century was the warmest in the whole century. Hitherto unrecorded temperatures, torrential rains, unprecedented droughts, hurricanes, exceptionally warm and snow-free winters, hot summers affect food production all over the world. The relationship between agriculture and the climate is direct and indirect. Because of direct exposure, higher temperatures modify the uptake of nutrients from the substrate and increase the plants' demand for water, the soil evaporates faster, and the plants breathe more deeply (the process of evapotranspiration). As the temperature rises, the amount of water vapor in the air also changes, the level of matter content decreases and the soil exhibits a smaller water storage capacity. These factors hamper the growth of plants including energy crops. Both indirect and direct temperatures endanger crop yields. If a temperature range that is optimal for a given plant is exceeded in a region, the plant usually reacts negatively, resulting in reduced yields. Most plants are sensitive to high air temperatures. A temperature of 45-55°C for at

least 30 minutes causes leaf damage in most plants. Even lower temperatures (35 to 40°C) can be destructive to plants if they persist for a long time. A temperature above 36°C can make corn pollen die, while a temperature of about 20°C hampers the formation and growth of potato tubers. The susceptibility to damage by high temperatures is different at different stages of plant development. Plants in the early stages of development are particularly sensitive to extreme weather phenomena. High temperatures are very harmful also in the reproduction phase, for example for corn during the corymb stage, for soybeans during flowering, and for wheat when the ears fill. On the other hand, it is also possible that higher temperatures may accelerate the growth of some plant species, as predicted for the staghorn sumac.

There is a growing deficit of water in the EU countries, which already has a very low nutrient content [20]. Drought causes wilting and slows down the development of plants, and changes the proportions of nutrients (carbon/nitrogen) contained in them, thus reducing the resistance to nematodes and insects. Weakened plants are more prone to attack by fungal pathogens, especially in shoot and root areas. Dry and warm weather is conducive to the growth of insect populations and epidemics of viral diseases, such as the locust plague associated with drought in Mexico (1999). Energy crops can suffer most if the dry periods occur during important phases of plant development, such as the reproduction phase. Most plants are particularly sensitive to water stress during flowering, pollinating and sprouting. The effects of drought can be avoided, for example by early planting of fast-growing plant varieties. Weeding and the introduction of microorganisms beneficial for the soil environment [16-20] can also be used to maintain proper soil moisture.

Precipitation, which is the primary source of moisture in the soil, is probably the most important factor in plant yield. Climate models forecast an overall increase in the average amount of precipitation in the world, but their results also suggest the possibility of a change of precipitation regimes in many places. Climate changes can cause an increase or decrease in the total precipitation in different seasons. Water management of energy crops is sensitive to factors such as higher temperatures, dryer air, and higher wind speeds, which accelerate evapotranspiration during the day and change its seasonal pattern. Drought is not only caused by reduced rainfall, but may also be the smaller amount of snow in winter and early melting of snow in spring. In dry regions, this may reduce the outflow of water in rivers and reservoirs used for irrigation of fields during the vegetative season. Periods of high relative humidity, frost or hail may also affect yields. Heat stress and water stress often occur together and act synergistically. Usually they are accompanied by high levels of solar radiation and strong winds. Under drought conditions, crop plants close their stomata to limit transpiration. As a result, the temperature inside the plant increases, which can cause damage.

Precipitation is probably the most important factor in determining how plants respond to pests and diseases. Very wet summers can cause lower yields, and water-soaked soils cause root rot and higher air humidity is conducive to increased pests and diseases, especially in the early phases of development. Rapid downpours can damage younger plants as well as accelerate soil erosion. The degree of damage to agricultural crops depends on the duration of rainfall and flooding, as well as the plant development phase and the air and soil temperature. Increased air humidity is conducive to epidemics and the spread of pathogens, such as the famine caused by rice brown in Bengal where 2 million people died in 1942. The yellow rust epidemic in China's most important manufacturing regions contributed to famine in the 1960s. Movement of soil due to increased erosion and simultaneous surface runoff causes the spread of pathogens to new areas. Pest infestations often coincide over time with changes in weather, such as early or late rains, drought or excessive rainfall. Warm and humid conditions are conducive to the development of most pests. Plants weakened by water deficit during drought are more easily attacked by pests such as the Asian lady beetle compared to plants that are not exposed to such stress.

The climate also affects the effectiveness of pesticides used to combat or prevent pest infestations. The intensity and duration of rainfall determines how long pesticides remain active and to what extent. In turn, temperature and light affect the length of their effective operation by accelerating their chemical degradation. Most analyses confirm that in the changing climate, pests can become more active than they are today and can increase their geographical range. There is concern that more chemicals will be used in agriculture in the future, and this will have health, environmental and economic consequences. Hence, it is necessary to draw attention to the ecological nature of crops.

The climate affects not only the crops, but also weeds that compete with crops for nutrients in the soil, for light and for space. Drought increases the competition between crops and weeds for the water contained in the soil, while high humidity promotes the spread of weeds.

The advantage of investing in renewable energy sources is that they are the projects with the lowest level of risk in the long run. They can also result in energy independence and security of a given area, communes, and voivodeships of the whole country. They can contribute to improving the energy supply of areas with underdeveloped energy infrastructure, particularly areas prone to high unemployment, which will also create new jobs [26]. In practice, the use of local sources of energy also means subsidizing at the local, communal, county or voivodeship level. The cultivation of energy crops significantly reduces CO₂, has a positive influence on the landscape, reduces fossil fuel consumption, and thus minimizes costs.

Poland, as a member of the European Union, must reduce emissions of greenhouse gases according to the previous findings. One of the most important ways to execute this task is to introduce and disseminate renewable energy sources, especially replacing some of the traditional transport fuels with biofuels, and replacing coal with energy crop biomass.

The high interest in energy crops is due to many factors. The desire to reduce CO₂ emissions, the occurrence of extreme weather phenomena, rapid growth and resilience to these phenomena, relatively low financial outlays for obtaining energy, numerous co-financing and projects have allowed for the creation of new directions in agricultural production and in the economy itself. The most commonly used raw material to produce biofuels is waste wood or straw. This condition will persist until the intensive development of energy crops.

In Poland, the most popular plants used in the so-called agricultural energetics include basket willow (*Salix viminalis*), Sida (*Sida hermaphrodita*), corn (*Zea mays*), Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), giant miscanthus (*Miscanthus sinensis gigantea*), giant knotweed (*Polygonum sachalinense*), and Japanese rose (*Rosa Multiflora*). The latest forecasts indicate that soon, the supply of biomass in the energy market in Poland will be supplemented by the widespread use of energy crops plantations, established and operated on land not yet used by agriculture. Based on recent research, it can be stated unequivocally that the area of energy willow cultivation in the coming years will grow to a significant extent. Most of the plants used in bioenergetics are plants with low soil requirements, and an advantage of growing such plants is the chance to develop many barren lands in Poland.

The climatic changes observed so far in the country are conducive to increasing the potential usefulness of areas for production of energy crops and introducing into the cultivation of thermophilic species like sorghum, sunflower, and soybeans. Higher temperatures, longer growing seasons, and an increase in the sum of precipitation result in an increase in the productivity of these crops and do not adversely affect the grain and grass used in renewable energy production. The observed increase in air temperature contributes to the extension of the vegetation period by approximately 10 days. This influences the change of the dates of establishing energy plantations and the period of other agrotechnical works. For example, in the new climatic conditions, the dates of spring cereal sowing will be accelerated and the winter cereal, delayed by about 3 weeks. The harvest of cereals for energy needs may be one to four weeks earlier. Improved thermal conditions and a warmer zone moving northward increase the chances of growing thermophilous plants in the central and northwestern parts of the country. The increase in temperature by another degree will result in the absence of thermal barriers in Poland to grow medium-late corn. However, the decreasing availability of water in some areas and the increased irrigation needs in the conditions of more frequent droughts in the summer months will require a change in the assortment of cultivated energy crops. It will be necessary to replace the plantations existing in these areas, requiring humid soils (basket willow and corn), with plants with low water content requirements, such as silphium, millet, Virginia mallow, and sorghum. So far, the forecasts presented are not clear, some indicate growth, and others indicate a decline in yields in the changing climate.

The problem of growing energy crops in the changing climatic conditions of Poland will be the acceleration of the growth rate of weeds like that warmth and the emergence of new and hard to exterminate pests (the corn rootworm, the corn earworm), as well as the increase in the populations of pests with low harmfulness (aphids, Oscinella frit, root fly, Phytomyza pubicornis, thrips). Mild winters will increase the risk of some diseases. This will require the intensification of the use of energy crop protection agents against diseases and pests, which in the case of the existing integrated crop system is costly and difficult due to the limited assortment of pesticides. Another problem related to weather anomalies is the increasing variability of energy crop yields, which requires growing a wide range of crops to ensure a steady delivery to the recipient.

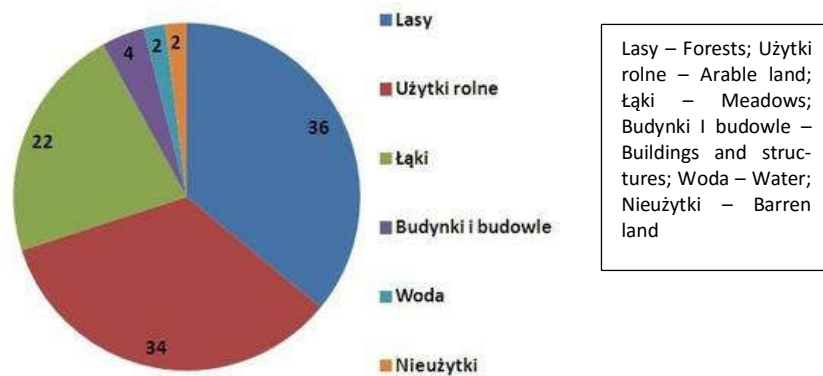


Fig. 6. The territory of Poland broken down into developed lands

Source: [21]

According to Eurostat data for 2013, Poland is mainly covered by forests, which account for almost 36% of the territory (Fig. 6). A relatively large part of Poland, approximately 34%, is also covered by agricultural land. Barren land in Poland accounts for almost 2% of the area. It is worth noting that on average in the European Union a total of 6% of the territory of the various countries is wasted.

It is also worth stressing that plantations of energy crops and all sorts of related treatments are covered by many aid programs, which include the SAPARD Program, the PHARE Fund, the EU LIFE+ program, the EU HORYZONT 2020 program, which will be launched in 2014. Many national and regional institutions are providing co-financing, such as the Voivodeship Environmental Protection and Water Management Fund [22] or the Rural Area Development Program.

The future of the climate

Earth's climate is a highly complex process, and to understand its very complex mechanisms and dependencies, scientists need to use general circulation models (GCM). This is a mathematical model describing the behavior of the climate based on the equations of fluid mechanics and other equations from the realm of physics and chemistry, describing processes important for climate change (Fig. 7).

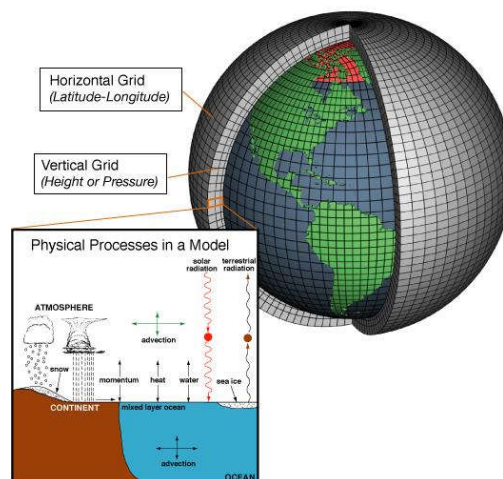


Fig. 7. An exemplary model describing the behavior of the climate based on the equations of fluid mechanics and other equations from the realm of physics and chemistry, describing processes important for climate change

Source: [23]

The use of this type of operation allows for tracking and investigating many processes taking place in the atmosphere, and to analyze possible interactions. These models allow for determining the directions of the changes in the coming years. An example of this type of simulation is the use of the variant with the ever-increasing concentrations of greenhouse gases in the atmosphere. Another example of a simulation that considers the increase in CO₂ in the atmosphere is the impact of sulfur aerosols. These compounds dissipate and reflect sunlight back

into space and cause cloud formation, and this simulation also includes the temperature reduction factor. At present, several models of this type have been developed, a significant part of which are used to predict the impact of increased concentrations of greenhouse gases on the world climate. GCM results unequivocally indicate an increase in the average temperature between 1.4°C and 5.8°C (Fig. 8). Both the increase of the amount of aerosols in the atmosphere and the increase of the amount of CO₂ will greatly reduce the amount of sunlight reaching Earth, and thus cool the planet.

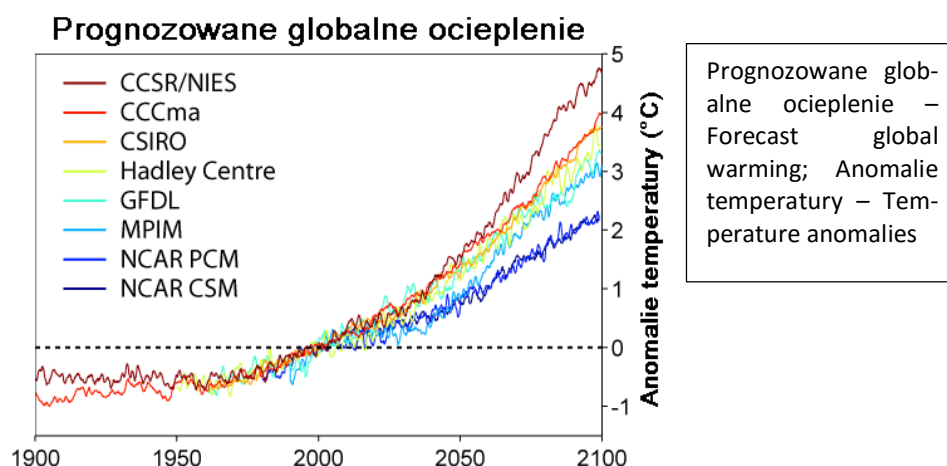


Fig. 8. Predicted increase in temperature according to different general circulation models

The general circulation models also predict average rainfall in the world to grow by about 520%. They also allow to indicate regions in the world where warming can be much higher than the global average. Minimum temperatures in winter and at night will continue to rise faster than average temperatures. Disorders in the global water economy will greatly increase the frequency of anomalies such as droughts and floods. The increase in the occurrence of snowless winters, and consequently the decline of spring thaw, will potentially increase the effects of spring and summer droughts. Despite the many doubts and criticisms of the unrefined circulation models by scientists, it is obvious that the above weather disturbances will directly affect the world economy, particularly agricultural production. It is very likely that many regions of the world today characterized by high productivity will have to abandon crop production. The very likely changes in air temperature and water circulation in the natural environment will have serious consequences both for the functioning of most ecosystems and for the human economy. As a result, the frequency, territorial extent, and intensity of weather disasters will increase significantly. The only opportunity to minimize the effects of anomalies and losses in food production is to adapt agriculture and its agro-technology, forest management, water management, and other sectors of the economy to the altered climatic conditions.

References

- [1] Szczygieł L., Powstrzymanie zmian klimatycznych – konieczność czy kosztowne fanaberie?, Energetyka, 2008.
- [2] Błażejczyk B., Żmudzka E., Globalne zmiany klimatu – spojrzenie po 25 lat prac IPCC, Kosmos, 2013.
- [3] Matczak P., Adaptacja do zmian klimatu, Kosmos, 2008.
- [4] BP Statistical Review of World Energy, 2013.
- [5] Marsz A., Changes in the sea ice cover in the Arctic at the turn of the XX and XXI centuries and their correlation with the atmospheric circulation, Problemy Klimatologii Polarnej, 2008.
- [6] Klich J., Czaja P., Rola węgla w polskiej gospodarce-oczekiwania i możliwości ich spełnienia przez naukę i przemysł, 2011.
- [7] Raport International Arctic Research Center - Japan Aerospace Exploration Agency (IARC-JAXA), Atmospheric pressure, 2013.
- [8] Raport International Arctic Research Center - Japan Aerospace Exploration Agency (IARC-JAXA), Atmospheric pressure, 2013.
- [9] Wibig J., Współczesne zmiany klimatyczne - przesłanki wpływu czynników antropogenicznych, 2009.
- [10] Downing P., Scepticism over climate claims, BBC 2007.
- [11] Raport EEA nr 12/2012, Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012.

- [12] Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów, 2012.
- [13] Rosa P., Ehrenfreund P., Horneck G., Thiele G., European space research in support of international partnership, 2013.
- [14] http://www.ekoportal.gov.pl/opencms/opencms/ekoportal/dla_przedsiębiorców_i_inwestorów/fundusze_unijne/life
- [15] Raport EEA nr 12/2012, Climate change, impacts and vulnerability in Europe 2012.
- [16] Quevauviller P., Adapting to climate change: reducing water-related risks in Europe – EU policy and research considerations, Elsevier, 2011.
- [17] Instytut Meteorologii i Gospodarki Wodnej, Wpływ zmian klimatu na środowisko, gospodarkę i społeczeństwo, 2012.
- [18] Grzesik M., Z. Romanowska-Duda 2007. Vineyard under environmental constraints. Adaptations to climate change. Book of Abstracts COST Action Workshop 18-20.10.2007 Łódź. 1-5.
- [19] Romanowska-Duda Z., M. Grzesik, P. Woźnicki, M., Andrzejczak, D. Warzecha 2007. Influence of various algal species on sunflower (*Helianthus L.*) seed germination and development. Acta Physiol. Plant. 103. Romanowska-Duda Z., M. Grzesik, M.E. 2007.
- [20] Nisha R., Kaushik A., Kaushik C.P. 2007. Effect of indigenous cyanobacterial application on structural stability and productivity of an organically poor semi-arid soil. Geoderma 138:49-56.
- [21] DeLuca T.H., Zackrisson O. 2007. Enhanced soil fertility under *Juniperus communis* in arctic ecosystems. Plant Soil 294:147-155.
- [22] Karthikeyan N., Prassana R., Nain L., Kaushik B.D. 2007. Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. European Journal of Soil Biology 43:23-30.
- [23] Khan Z., Kim Y.H., Kim A.G., Kim H.W. 2007. Observations on the suppression of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) on tomato by incorporation of cyanobacterial powder (*Oscillatoria chlorina*) into potting field soil. Bioresource Technology 98:69-73.
- [24] Janowicz L., Biomasa w Polsce, 2006.
- [25] Eurostat, Buildings, roads and other artificial areas cover 5% of the EU ...and forests 40%, 2013.
- [26] National Science Academies, <http://www.globalwarmingart.com/>
- [27] National Centre for Atmospheric Science, 2011.
- [28] Intergovernmental Panel of Climate Change (IPCC) Third Assessment Report - Climate Change 2001, 2001

CLIMATE CHANGE AND GROWTH OF ENERGY PLANTS

Abstract

Atmospheric circulation, temperature, hydrological cycles, and the impact of solar radiation affect condition of all life on Earth. Rapid climate change may have positive and negative effects, forcing people to create new solutions in the field of industry, agriculture, and construction. Developing appropriate strategies for this type of crop plants can help reduce the negative effects of global environmental change.

Key words

climate change, global adaptation, energetic plants, energy demand

Diatoms (Bacillariophyceae) as an effective base of a new generation of organic fertilizers

Okrzemki (*Bacillariophyceae*) jako efektywne bazy nawozów ekologicznych nowej generacji

DOI: 10.15199/62.2015.3.27

Willow plants (Salix viminalis L.) were fertilized with a com. synthetic fertilizer (up to 1.0 g/plant) and then with water-suspended diatoms (Navicula sp.) (600 000 cells in 1 mL of water, sonification at 20 Hz for 15 min, foliar application). The use of diatoms resulted in an increase in the quantity of microelements in plants (N, P, K) but did not affect their energetic properties (heat of combustion, calorific value and ash content) in the working state. The diatoms showed perspective potential as a new generation biofertilizer in prodn. of energy willow.

Określono możliwości stosowania okrzemek jako bionawozu nowej generacji w uprawie wierzby wiciowej w warunkach zredukowanego nawożenia syntetycznego i sprawdzono potencjał użyźniania roślin poprzez dolistną aplikację *Navicula* sp. Wpływ bionawożenia zależał od poziomu wzbogacenia gleby w nutrieny zawarte w syntetycznym nawozie. Pozytywny wpływ okrzemek na wzrost roślin (wysokość, liczba pędów, suma ich długości, plon świeżej i suchej biomasy) był związany ze wzrostem aktywności fizjologicznej (transpiracji, fotosyntezy, przewodnictwa szparkowego, stabilności cytomembran, zawartości chlorofilu w liściach), a także aktywności enzymatycznej (fosfatazy kwaśnej i alkalicznej, RNaz oraz

dehydrogenaz). Dolistna aplikacja okrzemek zwiększyła zawartość makroelementów w biomase roślin wierzby (N, P, K) i nie wpłynęła ujemnie na wartości parametrów energetycznych (ciepło spalania w stanie analitycznym, wartość opałowa w stanie roboczym i zawartość popiołu w stanie roboczym). Okrzemki, jako nowy bionawóz w uprawie wierzby energetycznej, umożliwiają zmniejszenie stosowanych dawek nawozów sztucznych.

Obowiązek uprawy roślin metodami integrowanymi i ekologizacja rolnictwa w krajach Unii Europejskiej wymaga pilnego ograniczenia stosowania chemicznych nawozów oraz środków ochrony roślin i zastąpienia ich naturalnymi związkami o podobnym i korzystnym wpływie na rośliny, nie zanieczyszczającymi środowiska. Stosowanie nawożenia substancjami organicznymi (bionawożenie) może być alternatywą dla nawozów syntetycznych, jest przyjazne dla środowiska i organizmów żywych, zapewnia korzyści ekonomiczne i ekologiczne oraz pozytywnie wpływa na wzrost, plonowanie i walory konsumpcyjne roślin¹⁾. Oczekuje się, że nawożenie materią organiczną ograniczy zużycie nawozów sztucznych i pestycydów, które są niebezpieczne dla środowiska i zdrowia ludzi²⁾. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem mikroalg w rolnictwie ekologicznym, w tym okrzemek (*Bacillariophyceae*). Zastosowanie nawozów nowej generacji bazujących na nietoksycznych okrzemkach jest wysoce perspektywiczne. Okrzemki stanowią liczną grupę glonów (ponad 10 tys. gatunków). Rozpowszechnione



Prof. dr hab. Mieczysław GRZESIK w roku 1971 ukończył studia na Wydziale Ogrodniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Jest profesorem zwyczajnym w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach. Specjalność – fizjologia, produkcja i uszlachetnianie nasion oraz roślin uprawianych w systemach konwencjonalnych, integrowanych i ekologicznych.



Dr hab. Zdzisława ROMANOWSKA-DUDA, prof. nadzw. UŁ, w roku 1980 ukończyła studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Jest profesorem nadzwyczajnym Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Specjalność – fizjologia roślin, ekotoksykologia, kultury *in vitro*, mikroalgi, bioindykacja.

* Autor do korespondencji:

Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-131 Łódź, tel.: (42) 635-44-21, fax: (42) 635-44-23, e-mail: romano@biol.uni.lodz.pl

są w morzach i w wodach słodkich. Spotyka się je także poza środowiskiem wodnym w glebie, na skałach oraz na korze drzew. Są organizmami jednokomórkowymi z możliwością tworzenia kolonii. Ich ściana komórkowa jest złożona z substancji pektynowych oraz wysyciona krzemionką, która może stanowić nawet połowę suchej masy komórki. Cytoplazma w komórkach okrzemek ściśle przylega do ściany komórkowej i zajmuje całe wnętrze komórki. Chromatofory położone są przysięnnie. Chloroplasty okrzemek zawierają chlorofil *a* i *c* oraz karotenoidy (karoten) i fukoksantynę. Okrzemki rozmnażają się przez podział komórki, a części skorupki macierzystej zawarte w komórkach potomnych stają się wieczkami. Dobudowywana jest część mniejsza, zwana denkiem. Okrzemki należą do autotrofów, a produktami procesu fotosyntezy są tłuszcze o dużej wartości odżywczej i polisacharydy (chryzolaminaryna). Wśród okrzemek występuje wiele gatunków zdolnych do wzrostu heterotroficznego, np. *Navicula pelliculoza*. Wydziela ona galaretowatą otoczkę, złożoną z reszt kwasu glukuronowego. Wydzielane śluz mogą zawierać również ksylozę, mannozę, fukozę i galaktozę, co ma znaczenie w dolistnej aplikacji nawozu z okrzemek i pozytywnie wpływa na wzrost roślin oraz plon biomasy.

W chemicznym ujęciu glony są bardzo wartościowym nawozem. W porównaniu z obornikiem zawierają mniej azotu i fosforu, ale są znacznie bardziej bogate w sole potasowe. Ponadto na powierzchni glonów znajdują się bakterie asymilujące azot atmosferyczny, co stanowi dodatkowe źródło tego pierwiastka. Plon roślin uprawnych może być stymulowany przez mikroalgi dzięki ich zdolności do syntetyzowania i/lub gromadzenia dużej ilości różnorodnych związków organicznych, w tym hormonów, aminokwasów, lipidów, polisacharydów, białek, witamin, makro- i mikroelementów oraz wielu innych substancji i wtórnych metabolitów stymulujących aktywność fizjologiczną, rozwój oraz odporność na stres i niektóre patogeny. Jeden ze szczepów mikroalg (sinice) ma możliwości syntetyzowania atmosferycznego azotu, nawet do 20–60 kg/ha/sezon, który następnie może być wykorzystany przez rośliny lub gromadzony w glebie. Wyselekcjonowane szczepy mikroalg wykazują też korzystny wpływ na strukturę oraz właściwości fizyczne i życie biologiczne gleby, a także zapobiegają rozwojowi chorób. W Rosji przeprowadzono wiele doświadczeń³⁾ dotyczących nawożenia gleby glonami i okazało się, że w przypadku użycia kompostu glonowego uzyskano zwiększenie plonu soi o 600%, sałaty o 400% i rzodkiewki o 60%. Okrzemki zastosowane jako bionawozy nowej generacji, oprócz wykazanych funkcji i gromadzenia istotnego dla roślin krzemu, odgrywają ważną rolę w globalnym obiegu węgla nieorganicznego. Szacuje się, że wytwarzany przez nie węgiel organiczny stanowi ok. 20% jego produkcji na świecie w ciągu roku i ok. 40% produkcji w akwenach morskich⁴⁾. Ze względu na niewielką ilość danych w tym zakresie, na świecie podejmuje się intensywne badania w celu opracowania nawozów na bazie mikroalg, które będą stosowane w ekologicznej i integrowanej produkcji roślin uprawnych, co przyczyni się do poprawy jakości agroeosystemów.

Stosowanie na dużą skalę nawozów chemicznych w uprawach rolniczych stwarza wiele problemów i powoduje uciążliwe zanieczyszczenie środowiska agrorolniczego i wodnego. Aby temu zapobiec, w ostatnim czasie podejmuje się próby całkowitego lub częściowego

ich zastąpienia nawozami organicznymi, bionawozami i preparatami mikrobiologicznymi, które korzystnie wpływają na wzrost roślin uprawnych i ekosystem. Mikroalgi, do których należą również okrzemki, w tym *Navicula* sp., mogą odegrać kluczową rolę w poprawie jakości gleby i jej życia biologicznego oraz stymulacji wzrostu roślin i mikroorganizmów⁵⁾. Znaczna grupa tych organizmów wykazuje możliwości fotosyntezy oraz syntezy i gromadzenia wielu związków organicznych, które zaaplikowane do roślin wyższych stymulują ich wzrost i rozwój (tabela 1).

Celem pracy było zbadanie przydatności okrzemek jako ekologicznego nawozu nowej generacji w uprawie roślin i ocena wpływu dolistnej aplikacji monokultur *Navicula* sp. na wzrost, aktywność metaboliczną i parametry energetyczne wierzby wiciowej jako rośliny modelowej.

Table 1. Number of shoot (per plant) and their annual increase in willow, as affected by its triple foliar spray with *Navicula* sp. and soil fertilization with fertilizer YaraMila

Tabela 1. Liczba pędów na roślinie oraz roczny przyrost pędów wierzby wiciowej, opryskanej trzykrotnie monokulturami *Navicula* sp. i nawożonej nawozem YaraMila

Dolistna aplikacja okrzemek	Liczba pędów na roślinie			Przyrost długości pędów, %		
	Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę			Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę		
	1,0	0,5	0,0	1,0	0,5	0,0
Kontrola	1,67 b*	1,33 a	1,07 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
<i>Navicula</i> sp.	2,67 d	2,46 d	2,10 c	119,7 c	120,2 c	108,5 b
NIR _{0,05} **	0,33			4,0		

*Dane oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$; **NIR skalkulowano przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Część doświadczalna

Surowce

Rośliny wierzby (*Salix viminalis* L.) uzyskano z sadzonek zdrewniałych, ukorzenionych zgodnie z procedurą stosowaną w produkcji towarowej.

Użyty do nawożenia roślin syntetyczny nawóz kompleksowy YaraMila Complex (Yara Polska Sp. z o.o.) zawierał azot (12%), fosfor (11% P_2O_5), potas (18% K_2O), magnez (2,65% MgO), siarkę (19,9% SO_3) i mikroelementy (0,02% Zn i 0,015% B).

Monokultury *Navicula* sp. (okrzemki, *Bacillariophyceae*) wyhodowano na pożywce BG11 (ATCC Medium 616) w 27°C przy oświetleniu lampami Farel (18 W), zgodnie z procedurą opracowaną przez Romanowską-Duda i współprac.⁶⁾ Podliczano liczbę komórek okrzemek za pomocą hemocytometru Fuchsa i Rosenthala. W użytych do doświadczeń monokulturach liczba komórek w 1 mL wody wynosiła 600 000. Przed zaaplikowaniem do roślin komórki monokultur wirowano przez 2 min (4000 rpm) i zawieszono w wodzie. Następnie monokultury sonifikowano za pomocą ultradźwiękowego homogenizatora (Omni-Ruptor 4000, Omni International) przez 15 min przy użyciu



Mgr Krzysztof PIOTROWSKI w roku 2006 ukończył studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Jest doktorantem w Studium Doktoranckim Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej tego Wydziału. Specjalność – uprawa roślin energetycznych metodami ekologicznymi w warunkach globalnych zmian klimatycznych i środowiskowych.



Dr Regina JANAS w roku 1981 ukończyła studia na Wydziale Rolnym Akademii Rolniczej w Szczecinie. Jest adiunktem w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach. Specjalność – patologia nasion oraz poprawa wzrostu roślin uprawianych w systemie ekologicznym, integrowanym i konwencjonalnym.

głowicy tytanowej z częstotliwością ultradźwięków 20 kHz, przy amplitudzie 80% i impulsach 0,7-sekundowych w odstępach co 0,3 s.

Metodyka badań

Zdrewniałe sadzonki wierzby wiciowej ukorzeniano, a uzyskane z nich rośliny uprawiano w 3-litrowych pojemnikach wypełnionych pozbawionym makro- i mikroelementów substratem (mieszanka torfu sfagnowego i piasku kwarcowego w stosunku objętościowym 1:1), w kontenerowni, w warunkach zależnych od pogody. W miarę potrzeby rośliny podlewano wodą wodociągową. W drugim tygodniu uprawy rośliny nawieziono nawozem syntetycznym YaraMila Complex w dawce 0,33; 0,17 i 0,0 g/L podłoża (1,0; 0,5 i 0,0 g/roślinę). Następnie rośliny trzykrotnie opryskano, co 3 tygodnie w ciągu okresu wegetacyjnego, sonifikowanymi wodnymi monokulturami *Navicula* sp. Pierwszą aplikację dolistną nawozem okrzemkowym wykonano przy wysokości roślin 15 cm. Przydatność stosowanych monokultur jako ekologicznego nawozu nowej generacji w uprawie wierzby oceniono na podstawie pomiarów biometrycznych roślin, ich aktywności fizjologicznej, zawartości makroelementów i wartości energetycznej.

Efektywność aplikacji *Navicula* sp. jako bionawozu oceniano na podstawie pomiarów biometrycznych wierzby wiciowej (co 4 tygodnie: wysokości i zdrowotności roślin, liczby pędów i sumy ich długości), plonu świeżej i suchej biomasy, indeksu zawartości chlorofilu aparatem Minolta SPAD-502, Konica Minolta^{7, 8)} oraz na podstawie aktywności fotosyntetycznej, transpiracji, przewodności szparkowej i stężenia międzykomórkowego CO₂ za pomocą analizatora wymiany gazowej TPS-2, PP Systems, USA⁹⁾. Ponadto oceniono aktywność

enzymatyczną fosfatazy kwaśnej (pH = 6,0) i zasadowej (pH = 7,5)¹⁰⁾, RNazy¹⁰⁾ oraz dehydrogenaz, stosując spektrofotometr UVmini-1240 Shimadzu⁶⁾, a także przepuszczalność membran cytoplazmatycznych za pomocą konduktometru CC-551 Elmetron⁶⁾. Stosowane testy oceny aktywności fizjologicznej roślin są powszechnie uznane za użyteczne markery aktywności metabolicznej oraz reakcji roślin na bodźce zewnętrzne, co stwierdzono w poprzednich badaniach i literaturze światowej¹¹⁾. Skład chemiczny (N, P, K w liściach) i właściwości energetyczne roślin (wartość kaloryczna w stanie roboczym, ciepło spalania w stanie analitycznym i zawartość popiołu w stanie roboczym) zostały zbadane w certyfikowanych laboratoriach⁷⁾.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono metodą losowanych bloków, w 3 seriach i w 3 powtórzeniach dla każdego traktowania. Każde powtórzenie zawierało 30 roślin uprawianych w 3-litrowych pojemnikach wypełnionych mieszaniną torfu sfagnowego i piasku kwarcowego (1:1 obj.). Uzyskane średnie z serii i powtórzeń opracowano statystycznie, stosując analizę wariancji. Średnie wybranych parametrów zostały pogrupowane za pomocą testu Duncana na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Omówienie wyników badań

Wyniki badań wskazały, że jednym z ekologicznych nawozów organicznych mogą być okrzemki, które korzystnie wpływają na wzrost i rozwój wierzby wiciowej. Wykazały także, że bionawożenie sonifikowanymi komórkami monokultur *Navicula* sp., co 3 tygodnie w formie dolistnej aplikacji, zwiększyło dynamikę wzrostu pędów wierzby wiciowej, co przełożyło się na wyższy plon świeżej i suchej biomasy (rys. 1 i 2). Stymulujący wpływ zastosowania

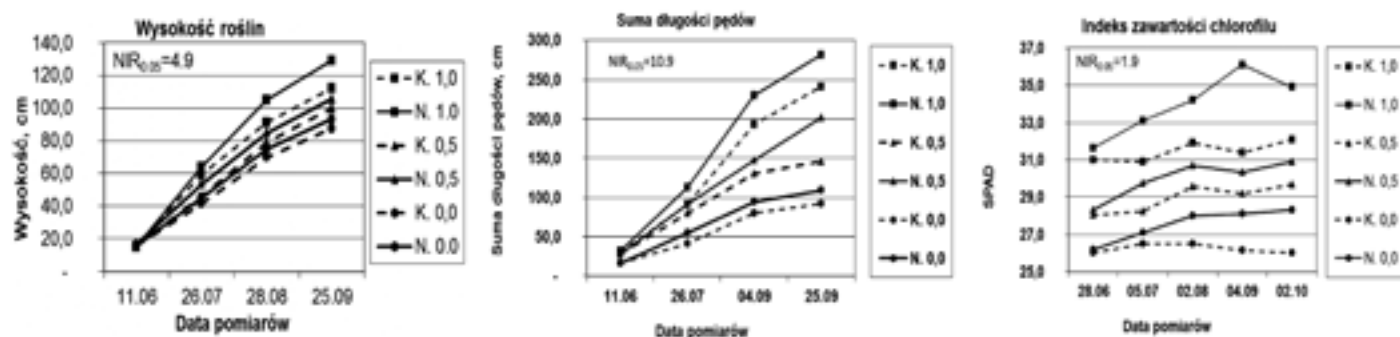


Fig. 1. Dynamics of growth of plants, total length of shoots and index of chlorophyll content in willow leaves, fertilized with a fertilizer YaraMila Complex and sprayed 3 times, in 3 week interval with monocultures *Navicula* sp. (N). Control (K) plants were sprayed with distilled water. LSD at the significance level of $p = 0.05$

Rys. 1. Dynamika wzrostu roślin, suma długości pędów i indeks zawartości chlorofilu w liściach wierzby wiciowej nawożonej kompleksowym nawozem YaraMila Complex i opryskiwanej 3-krotnie, co 3 tygodnie monokulturami *Navicula* sp. (N). Kontrolę (K) stanowiły rośliny opryskiwane wodą destylowaną. NIR przy poziomie istotności $p = 0,05$

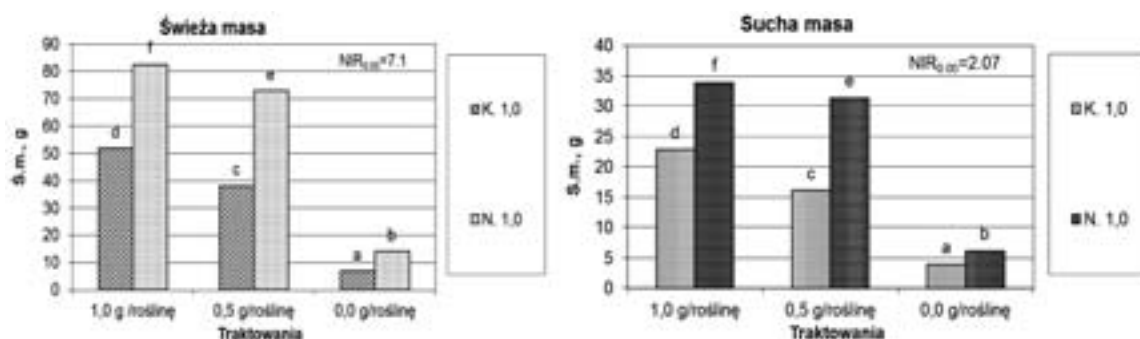


Fig. 2. Fresh and dry weight of willow plants grown in 3-liter containers, fertilized with a fertilizer YaraMila Complex and sprayed 3 times, in 3 week interval with monocultures *Navicula* sp. (N). Control (K) plants were sprayed with distilled water. LSD at the significance level of $p = 0.05$. Data marked with the same letter are not statistically different at a significance level of $p = 0.05$

Rys. 2. Świeża i sucha masa roślin wierzby wiciowej uprawianych w 3-litrowych pojemnikach nawożonych kompleksowym nawozem YaraMila Complex i opryskiwanych 3-krotnie, co 3 tygodnie, monokulturami *Navicula* sp. (N). Kontrolę (K) stanowiły rośliny opryskiwane wodą destylowaną. NIR przy poziomie istotności $p = 0,05$. Dane oznaczone tą samą literą nie różnią się statystycznie przy poziomie istotności $p = 0,05$

wanej okrzemki stwierdzono przy wszystkich poziomach nawożenia doglebowego syntetycznym nawozem YaraMila Complex, jednak największe przyspieszenie wzrostu zaobserwowano przy wyższych dawkach nawozu (1,0 i 0,5 g/roślinę). Rośliny traktowane sonifikowanymi okrzemkami odznaczały się również większą zdrowotnością. Podobne obserwacje odnotowano w przypadku zastosowania wyciągu z wodorostu listownicy palczastej (*Laminaria digitata*), który stymulował mechanizmy odpornościowe roślin i zwiększał ich ochronę przed zainfekowaniem mączniakiem prawdziwym u truskawek oraz zarazą ogniową w uprawach sadowniczych. Możliwości zastosowania mikroalg jako bionawozów wykazali również Falch i współpr.¹²⁾, Kreitlow i współpr.¹³⁾, Burja i współpr.¹⁴⁾, Nain i współpr.¹⁵⁾ oraz Rana i współpr.¹⁶⁾, którzy wskazywali ich stymulujący wpływ na wzrost pszenicy oraz na zdolność tych organizmów do syntezy związków czynnych hamujących rozwój patogenicznych bakterii i grzybów. Według Romanowskiej i współpr.¹⁷⁾ oraz Rastogi i Singha¹⁸⁾ niektóre gatunki mikroalg mogą syntetyzować również metabolity wtórne (cyjanotoksyny) wykazujące toksyczny wpływ na organizmy żywe. Niektóre z nich mogą mieć ekologiczne zastosowanie jako allelochemikalia o charakterze glonobójczym, herbicydów i insektycydów. Bioelicitory syntetyzowane przez *Ulva lactuca* zmniejszały rozwój chorób na rozsadzcie pomidorów, spowodowanych przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*¹⁹⁾. Bionawozowe, stymulujące wzrost właściwości wielu szczepów mikroalg stwierdzono również u ryżu, jęczmienia, owsa, pomidora, rzodkiewki, bawełny, trzciny cukrowej, chili, sałaty, pszenicy, słonecznika, goździka, winorośli i kukurydzy^{2, 8, 20–28)}.

Przyspieszony wzrost i rozwój oraz zwiększony plon biomasy wierzby wiciowej był konsekwencją zintensyfikowania wielu procesów fizjologicznych przez aplikowane monokultury okrzemek. Między innymi zwiększyła się aktywność enzymatyczna fosfatazy kwaśnej i zasadowej (odpowiedzialnej za gospodarkę fosforem w roślinie), RNazy (regulującej rozkładanie wiązań fosfodiesterowych w kwasach rybonukleinowych, RNA) i dehydrogenaz (kluczowych enzymów cyklu oddechowego); tabela 2. Korzystny wpływ okrzemek na wzrost wierzby wiciowej był też następstwem ich pozytywnego oddziaływania na integralność membran cytoplazmatycznych, co wykazano na podstawie wpływu mniejszej ilości elektrolitów z tkanek, jak również zwiększenia zawartości chlorofilu, którego miernikiem jest indeks zawartości chlorofilu (rys. 1). Okrzemki zwiększyły też aktywność fotosyntetyczną i zintensyfikowały transpirację oraz przewodność szparkową, co spowodowało mniejszą zawartość międzykomórkowego CO₂ (rys. 3). Zastosowane testy oceny aktywności fizjologicznej roślin są powszechnie uznane jako

Table 2. Activity of selected enzymes in willow leaves, as affected by their triple foliar spray with *Navicula* sp. and soil fertilization with fertilizer YaraMila

Tabela 2. Aktywność wybranych enzymów w liściach wierzby wiciowej trzykrotnie opryskanej monokulturami *Navicula* sp. i nawożonej nawozem YaraMila

Dolistna aplikacja okrzemek	Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę			Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę		
	1,0	0,5	0,0	1,0	0,5	0,0
	Fosfataza kwaśna (pH 6,0), mU/g ś.m.			Fosfataza alkaliczna (pH 7,5), mU/g ś.m.		
Kontrola	0,52 c*	0,43 b	0,29a	0,18 c	0,13 b	0,9 a
<i>Navicula</i> sp.	0,84 d	0,79 d	0,39 b	0,32 e	0,29 d	0,15 bc
NIR _{0,05} **	0,05			0,03		
	RNaza, mU/g ś.m.			Dehydrogenazy, mg formazan/g liść		
Kontrola	2,58 c	2,10 b	1,48 a	0,75 c	0,60 b	0,42 a
<i>Navicula</i> sp.	3,99 d	3,60 d	2,19 bc	1,40 d	1,27 d	0,65 bc
NIR _{0,05} **	0,41			0,14		

*Dane oznaczone tymi samymi literami (odnośnie poszczególnych enzymów) nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$; **NIR skalkulowano przy poziomie istotności $p = 0,05$.

bardzo użyteczne markery aktywności metabolicznej, w istotnym stopniu decydującej o rozwoju roślin, i jednocześnie są one czułymi wskaźnikami reakcji organizmów roślinnych na bodźce zewnętrzne^{7, 8, 11)}.

Bionawozowy charakter mikroalg, wyrażający się stymulacją wzrostu roślin, jest wynikiem oddziaływania wielu syntetyzowanych przez te organizmy związków: auksyn (IAA), giberelin (GA), cytokinin, aminokwasów, makroelementów (N, P, K, Ca, Mg), mikroelementów (Si, S, Zn, Fe, Mn, Cu, Mo, Co), poliamin i wielu innych wtórnych metabolitów^{2, 28–35)}. Hussain i Hasnain³⁶⁾ uważają, że skuteczność fitohormonów pochodzenia mikrobiologicznego jest porównywalna ze skutecznością standardowych cytokinin i IAA.

W przypadku bionawożenia zasadna była dolistna aplikacja mikroalg ze względu na mniejsze stężenie naturalnych substancji syntetyzowanych i zawartych w ich tkankach niż stężenie makro- i mikroelementów w skondensowanych nawozach syntetycznych. Podczas dolistnego nawożenia rośliny wykorzystują ponad 90% związków, a w przypadku doglebowego nawożenia tylko 10%. Dolistna aplikacja może zatem zwiększyć plony o 12–25% w porównaniu z nawożeniem

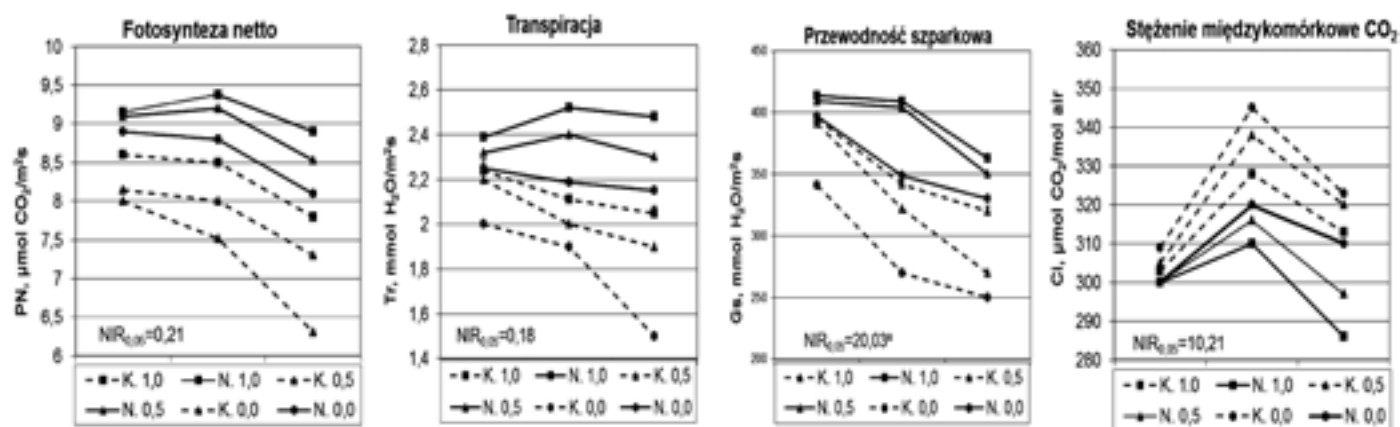


Fig. 3. Net photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, intercellular concentration of CO₂ in the leaf of willow grown in 3-liter containers, fertilized with fertilizer YaraMila Complex and sprayed 3 times, in 3 week interval with monocultures *Navicula* sp. (N). Control (C) plants were sprayed with distilled water. LSD at the significance level of $p = 0,05$

Rys. 3. Fotosynteza netto, przewodność szparkowa, transpiracja i stężenie międzykomórkowego CO₂ w liściach wierzby wiciowej uprawianej w 3-litrowych pojemnikach, nawożonej nawozem YaraMila Complex i opryskiwanej 3-krotnie, co 3 tygodnie, monokulturami *Navicula* sp. (N). Kontrolę (K) stanowiły rośliny opryskiwane wodą destylowaną. NIR przy poziomie istotności $p = 0,05$

doglebowym³⁷⁾. Ponadto niektóre biosubstancje słabo przemieszczają się w roślinie, co wykazano na przykładzie mikroalgi *Nostoc* sp., która stymuluje aktywność mitozy w komórkach gospodarza tylko w pobliżu miejsca penetracji³⁸⁾.

Przeprowadzone badania wskazały ponadto na korzystny wpływ dolistnej aplikacji okrzemek jako bionawozów na zawartość makroelementów (N, P, K) w roślinach wierzby. Mogło to świadczyć o migracji makroelementów do roślin z komórek okrzemek^{11,23,24)}. Podobnie jak w przypadku wierzby, zwiększoną zawartość N, P i K pod wpływem dolistnej aplikacji mikroalg zaobserwowali także Abd El-Moniem i Abd-Allah²⁵⁾ w liściach winorośli. Ponadto zwiększoną zawartość N, P, K, B, Fe i Zn w winorośli stwierdzili Khan i współpracownicy³⁹⁾ pod wpływem wielokrotnego opryskiwania mieszaniną aminokwasów i ekstraktu z wodorostów. Aplikacja mikroalg miała również znaczący wpływ na zwiększone pobieranie składników odżywczych przez pszenicę⁴⁰⁾. Zależność pobierania azotu przez rośliny od absorpcji fosforu wykazali także Swamalakshmi i współpracownicy⁴¹⁾, którzy stosowali mikroalgi jako matryce dla rolniczo użytecznych bakterii (*Azotobacter*, *Mesorhizobium*, *Serratia* i *Pseudomonas*) w uprawach pszenicy.

Dolistna aplikacja okrzemek nie miała istotnego wpływu na parametry energetyczne wierzby wiciowej (wartość kaloryczna w stanie roboczym, ciepło spalania w stanie analitycznym, zawartość popiołu w stanie roboczym), co jest szczególnie ważne przy pozyskiwaniu biomasy na cele energetyczne (tabela 3 i 4).

Bionawożenie roślin ekstraktami z okrzemek spowodowało podobne zwiększenie aktywności fizjologicznej, długości pędów i plonu biomasy jak w przypadku doglebowego nawożenia wierzby wiciowej syntetycznym nawozem YaraMila Complex w dawkach 1,0 i 0,5 g/roślinę. Okrzemki spowodowały również zwiększenie, jakkolwiek w mniejszym stopniu, plonu biomasy roślin nie nawożonych tym nawozem (tabela 1 i 2, rys. 1–3). Dane te wskazywały na możliwość stymulacji wzrostu i zwiększenia plonu biomasy roślin wierzby wiciowej poprzez bionawożenie okrzemkami w warunkach ograniczonego stosowania nawozów sztucznych i zmniejszenia poleceń ich dawek, bez negatywnego wpływu na wielkość plonu biomasy wierzby. Jest to zgodne z badaniami Hegazi i współpracownicy⁴²⁾, którzy wskazali, że po zastosowaniu niektórych szczepów mikroalg zalecane dawki azotu można było zmniejszyć nawet o 25–50%. Ponadto mikroalgi, w tym okrzemka *Navicula* sp., stanowią ważny składnik różnorodnych ekosystemów, które odgrywają znaczącą rolę w obiegu węgla i azotu. Wiele ich szczepów wykazuje znaczną zdolność do tworzenia symbiotycznych związków z roślinami eukariotycznymi będącymi gospodarzami, należącymi do różnych grup^{43–45)}. Badacze poszukują ekologicznych i wydajnych rozwiązań dla hodowli mikrogolonów poprzez zamknięte systemy produkujące ich biomasę, gdzie odchody zwierzęce są stosowane jako pożywka⁴⁵⁾.

Podsumowanie i wnioski

Wodne monokultury *Navicula* sp. (okrzemki, *Bacillariophyceae*) mogą być stosowane jako ekologiczne bionawozy w uprawie wierzby wiciowej i stanowią wyzwanie dla zrównoważonego rolnictwa. Trzykrotna, co 3 tygodnie, aplikacja dolistna tych monokultur stymuluje wzrost, rozwój i aktywność fizjologiczną oraz zwiększa zdrowotność roślin wierzby wiciowej, niezależnie od poziomu nawożenia mineralnego nawozem syntetycznym. Jednocześnie zwiększa zawartość makroelementów w roślinach i nie wpływa na ich wartość energetyczną. Stosowanie ekologicznych nawozów w postaci ekstraktów okrzemkowych jest ekonomiczne i przyjazne dla środowi-

Table 3. Content of NPK in willow plants, as affected by their triple foliar spray with *Navicula* sp. and soil fertilization with fertilizer YaraMila

Tabela 3. Zawartość N, P i K w liściach wierzby wiciowej trzykrotnie opryskanej monokulturami *Navicula* sp. i nawożonej nawozem YaraMila

Dolistna aplikacja okrzemek	N, %			P, mg/kg s.m.			K, mg/kg s.m.		
	Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę			Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę			Dawka nawozu YaraMila, g/roślinę		
	1,0	0,5	0,0	1,0	0,5	0,0	1,0	0,5	0,0
Kontrola	2,85 e*	2,17 c	1,26 a	2243 d	1 810 c	1 210 a	24 811 e	19 923 c	14 239 a
<i>Navicula</i> sp.	3,08 f	2,28 d	1,37 b	2 273 e	2 019 d	1 238 b	25 120 f	20 225 d	14 645 b
NIR _{0,05} **	0,10			24,9			300,3		

*Dane oznaczone tymi samymi literami (osobno dla N, P, K) nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$; **NIR skalkulowano przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Table 4. Energy properties of plants, as affected by their triple foliar spray with *Navicula* sp. and fertilization with fertilizer YaraMila at dose of 1.0 g/plant

Tabela 4. Parametry energetyczne wierzby trzykrotnie opryskanej monokulturami *Navicula* sp. i nawożonej nawozem YaraMila (1,0 g/roślinę)

Dolistna aplikacja okrzemek	Wartość kaloryczna w fazie operacyjnej, kJ/kg	Ciepło spalania w fazie analitycznej, kJ/kg	Zawartość popiołu w fazie <i>working state</i> , %
Kontrola	15 127 a*	18 699 a	1,63 a
<i>Navicula</i> sp.	15 138 a	18 656 a	1,49 a
NIR _{0,05} **	119,1	122,2	0,35

*Dane oznaczone tymi samymi literami (osobno dla parametrów) nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$; **NIR skalkulowano przy poziomie istotności $p = 0,05$.

ska, zwiększa produktywność upraw wierzby i może ograniczyć stosowanie nawozów chemicznych, powodujących zanieczyszczenie otoczenia. Zastosowanie bionawozów jako stymulatorów wzrostu roślin, ich naturalnej odporności na patogeny i stres oraz częściowo jako alternatywa dla nawozów chemicznych jest uważane za jedną z najbardziej obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie roślin.

Ze względu na ograniczoną ilość danych literaturowych i wzrastające zapotrzebowanie na opracowanie technologii stosowania mikroalg w uprawie roślin i pozyskiwaniu biopaliw, konieczne są dalsze badania w celu pełniejszego zrozumienia tych procesów, jak również identyfikacji związków aktywnych uwalnianych przez te organizmy i ich wpływu na poszczególne gatunki roślin^{46, 47)}.

Praca wykonana w ramach grantu Nr NN304 102940 „Innowacyjne technologie wykorzystania metabolitów glonów i eliminacji nawozów sztucznych w ekologicznej produkcji roślin energetycznych oraz ochronie środowiska” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Otrzymano: 10-02-2015

LITERATURA

- G.V. Bloembergen, A.H.M. Wijnfies, G.E.M. Lamers, N. Stuurman, B.J.J. Lugtenberg, *Molecular Plant Microbe Interaction* 2000, **13**, 1170.
- D. Sahu, I. Priyadarshani, B. Rath, *CIBTech J. Microbiol.* 2012, **1**, nr 2-3, 20.
- Z. Podbielkowski, *Głony*, Wyd. Szkolne i Pedagogiczne, Warszawa 1996.
- C.B. Field, M.J. Behrenfeld, J.T. Randerson, P.G. Falkowski, *Science* 1998, **281**, 237.
- H. Saadatnia, H. Riahi, *Plant Soil Environ.* 2009, **55**, nr 5, 207.
- Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, A. Pszczółkowska, W. Pszczółkowski, *Mat. ESNA 2013, European Society for New Methods in Agricultural Research*, 4–8 września 2013 r., Perrotis College, American Farm School, Thessaloniki, Ellas (Grecja), 58.
- K. Gornik, M. Grzesik, *Acta Physiol. Plantarum* 2002, **24**, nr 4, 379.
- M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, *Polish J. Environ. Study* 2014, **23**, nr 4, 1147.

9. M.H. Kalaji, R. Carpentier, S.I. Allakhverdiev, K. Bosa, *J. Photochem. Photobiol.* 2012, **112**, 1.
10. J.S. Knypl, E. Kabzińska, *Biochem. Physiol. Pflanzen* 1977, **171**, 279.
11. B. Badek, Z. Romanowska-Duda, B. Van Duijn, M. Grzesik, *J. Hort. Res.* 2014, **22**, 2.
12. B.S. Falch, G.M. König, A.D. Wright, O. Sticher, C.K. Angerhofer, J.M. Pezzuto, H. Bachmann, *Planta Medica* 1995, **61**, 321.
13. S. Kreitlow, S. Mundt, U. Lindequist, *J. Biotechnol.* 1999, **70**, 61.
14. A.M. Burja, B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J.G. Burgess, P.C. Wright, *Tetrahedron* 2001, **57**, 9347.
15. L. Nain, A. Rana, M. Joshi, S.D. Jadhav, D. Kumar, Y.S. Shivay, S. Paul, R. Prasanna, *Plant Soil* 2010, **331**, 217.
16. A. Rana, M. Joshi, R. Prasanna, R.S. Shivay, L. Nain, *Eur. J. Soil Biol.* 2012, **50**, 118.
17. Z. Romanowska-Duda, J. Mankiewicz, M. Tarczyńska, Z. Walter, M. Zalewski, *Polish J. Environ. Studies* 2002, **11**, nr 5, 561.
18. R.P. Rastogi, R.P. Sinha, *Biotechnol. Adv.* 2009, **27**, 521.
19. C. El Modafar, M. Elgadda, R. El Boutachfaitib, E. Abouraicha, N. Zehhara, E. Petit, Z. El Alaoui-Talibia, B. Courtoisb, J. Courtoisb, *Sci. Hort.* 2012, **138**, 55.
20. H. Spiller, M. Gunasekaran, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990, **33**, nr 4, 477.
21. N. Thajuddin, G. Subramanian, *Current Sci.* 2005, **89**, 47.
22. T. Song, L. Martensson, T. Eriksson, W. Zheng, U. Rasmussen, *Federation Europ. Materials Societies Microbiology Ecology* 2005, **54**, 131.
23. M. Nilsson, U. Rasmussen, B. Bergman, *FEMS Microbiology Lett.* 2005, **245**, 139.
24. N. Karthikeyanb, R. Prasanna, L. Nainb, B.D. Kaushik, *Eur. J. Soil Biol.* 2007, **43**, nr 1, 23.
25. E. Abd El-Moniem, A.S.E. Abd-Allah, *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2008, **4**, nr 4, 427.
26. N.T. Shanan, A.M. Higazy, *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2009, **5**, nr 6, 1162.
27. Z. Romanowska-Duda, A. Wolska, A. Malecka, *Mat. COST 858: Water Transport and Aquaporins in Grapevines, Alcudia (Hiszpania) 20-23 października 2004 r.*, 10.
28. W. Pszczolkowski, Z. Romanowska-Duda, A. Owczarczyk, M. Grzesik, T. Sakowicz, A. Chojnacka, [w:] *Phycological Reports: Current advances in algal taxonomy and its applications: phylogenetic, ecological and applied perspective*, Instytut Botaniki PAN, Kraków 2012, 195-203.
29. S.A. Haroun, M.H. Hussein, *Asian J. Plant Sci.* 2003, **2**, nr 13, 944.
30. J. Masojidek, O. Prášil, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 2010, **37**, nr 12, 1307.
31. A. Chojnacka, Z.B. Romanowska-Duda, M. Grzesik, W. Pszczolkowski, T. Sakowicz, *Mat. 29th Intern. Phycological Conf. Krakow 2010*, 81-82.
32. J.K. Nunnery, E. Mevers, W.H. Gerwick, *Current Opinion Biotechnol.* 2010, **21**, nr 6, 787.
33. O. Perez-Garcia, F.M.E. Escalante, L.E. De-Bashan, Y. Bashan, *Water Res.* 2011, **45**, 11.
34. G. Markou, E. Nerantzis, *Biotechnol. Adv.* 2013, **31**, 1532.
35. B. Górka, J. Lipok, P.P. Wiczorek, *Przem. Chem.* 2013, **92**, nr 6, 1061.
36. A. Hussain, S. Hasnain, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, **28**, 1459.
37. Ecochem, Foliar applied fertilizer 2014, http://www.ecochem.com/t_foliar.html
38. C. Johansson, B. Bergman, *Planta* 1992, **188**, 403.
39. A.S. Khan, B.M.J. Ahmad, R. Jaskani, W. Ahmad, A.U. Malik, *Int. J. Agric. Biol.* 2012, **14**, 383.
40. K. Mohammadi, A. Ghalavand, M. Aghaalkhani, *World Academy Sci., Engin. Technol.* 2010, **46**, 233.
41. K. Swarnalakshmi, C.R. Prasanna, A. Kumar, S.C. Pattnaik, K.C. Chakravarty, Y.S.A. Shiv, B.R. Singh, A.K. Saxena, *Eur. J. Soil Biol.* 2013, **55**, 107.
42. A.Z. Hegazi, M.S.S. Mostafa, H.M.I. Ahmed, *Nature Sci.* 2010, **8**, nr 11, 183.
43. B. Metting, W.J. Zimmerman, I. Crouch, J. Van Staden, [w:] *Introduction to applied phycology* (red. I. Akatsuka), SPB Academic Publishing, The Hague 1990, 589-628.
44. S.H.A. Al-Khiat, *Effect of Cyanobacteria as a soil conditioner and bio-fertilizer on growth and some biochemical characteristics of tomato (Lycopersicon esculentum L.) seedlings*, praca doktorska, King Saud University, Faculty of Science, 2006, 1-190.
45. O.A. Gorelova, *Microbiology* 2006, **75**, nr 4, 465.
46. K. Chojnacka, A. Saeid, I. Michalak, *Chemik* 2012, **66**, nr 11, 1235.
47. J.J. Valenzuela, *Investigation into the metabolic control of lipid accumulation in the marine diatom (Phaeodactylum tricornutum)*, praca doktorska, Montana State University Bozeman, Montana 2013.

TYLKO w Prenumeracie PLUS

stały dostęp do wiedzy fachowej



W pakiecie **PLUS** otrzymasz – poza wersją papierową zaprenumerowanego czasopisma – również stały, łatwy i szybki dostęp do elektronicznych wersji artykułów opublikowanych w nim w latach 2004–2015, z szybką wyszukiwarką tematyczną.

Wejdź na www.sigma-not.pl zakładka „prenumerata” lub skontaktuj się z naszym Zakładem Kolportażu 22 840 30 86, kolportaz@sigma-not.pl

PRASA FACHOWA
SIGMA-NOT
www.sigma-not.pl



Cyanobacteria, Asahi SL and Biojodis as stimulants improving growth and development of the *Sida hermaphrodita* L. Rusby plant under changing climate conditions

Cyanobacteria, Asahi SL i Biojodis jako biostymulatory poprawiające wzrost i rozwój ślazuwca pensylwańskiego w zmieniających się warunkach klimatycznych

DOI: 10.15199/62.2016.8.31

Mixts. of 3 strains of *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*) and 2 com. biostimulators were added to soil used for growing *Sida hermaphrodita* L. Rusby plants at temp. varying over a wide range (from -5°C to $+40^{\circ}\text{C}$) applied at 3 week intervals (20% soil moisture) and excessive hydration (60%). Foliar application of *Cyanobacteria* mixts. and biostimulators significantly reduced the negative influence of hydrothermal stress and a positive influenced on the growth and physiol. activity of plants, increased the productivity of the plant, and can reduce the use of chem. fertilizers and pesticides.

Mieszanie trzech monokultur *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105, *Anabaena variabilis*) oraz dwóch handlowych biostymulatorów zastosowano w szerokim zakresie temp. (od -5°C do $+40^{\circ}\text{C}$) i wilgotności 20% (zwiększonej do 60%) na glebę stosowaną do hodowli ślazuwca pensylwańskiego. Dolistne stosowanie mieszanin *Cyanobacteria* i biostymulatorów znacznie

zmniejszało hydrotermalny stres i korzystnie wpływało na wzrost i fizjologiczną aktywność roślin, zwiększało ich plon oraz mogło ograniczyć konieczność stosowania nawozów mineralnych oraz pestycydów.

Postępujące zmiany klimatyczne o zasięgu globalnym zmuszają do opracowania innowacyjnych technologii upraw roślin energetycznych metodami ekologicznymi, które umożliwią produkcję biomasy w nieprzyjających warunkach środowiskowych. Zakłada się, że wykorzystanie stymulatorów wzrostu pochodzenia naturalnego w znacznym stopniu zwiększy odporność roślin na niekorzystne warunki stresu środowiskowego, ograniczy stosowanie pestycydów oraz zmniejszy koszty uprawy, a tym samym pozytywnie wpłynie na ich rozwój i plonowanie.

Wykorzystanie w rolnictwie nawozów naturalnych stanowi alternatywę dla nawozów syntetycznych oraz wpływa pozytywnie na środowisko i organizmy żywe. Przewiduje się, że stosowanie preparatów wyprodukowanych na bazie materii organicznej zmniejszy w znacznym stopniu wykorzystywanie niebezpiecznych dla środowiska i zdrowia ludzi pestycydów i nawozów sztucznych¹⁾. Jedną z tego typu alternatyw są preparaty



Mgr Krzysztof PIOTROWSKI w roku 2006 ukończył studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Jest doktorantem w Studium Doktoranckim Mikrobiologii, Biotechnologii i Biologii Eksperymentalnej tego Wydziału. Specjalność – uprawa roślin energetycznych metodami ekologicznymi w warunkach globalnych zmian klimatycznych i środowiskowych.



Dr hab. Zdzisława ROMANOWSKA-DUDA, prof. nadzw. UŁ, w roku 1980 ukończyła studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Jest profesorem nadzwyczajnym Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Specjalność – fizjologia roślin, ekotoksykologia, kultury *in vitro*, mikroalgi, bioindykacja.

* Autor do korespondencji:

Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-131 Łódź, GSM: +48 606-118-955, tel.: (42) 635-44-21, fax: (42) 635-44-23, e-mail: romano@biol.uni.lodz.pl

nowej generacji bazujące na nietoksycznych gatunkach *Cyanobacteria*. Ich wykorzystanie w przyszłościowym rolnictwie ekologicznym jest wysoce perspektywiczne²⁾. W chemicznym ujęciu *Cyanobacteria* są bogatym źródłem wielu makro- i mikroelementów, hormonów, witamin i metabolitów wtórnych warunkujących wzrost roślin. Ponadto mają one zdolność asymilacji azotu atmosferycznego, co stanowi dodatkowe źródło tego pierwiastka. Organizmy te występują powszechnie, a ich hodowla jest ekonomiczna i prosta po opanowaniu odpowiednich technik, co przemawia na korzyść w ich wykorzystaniu w rolnictwie³⁾. Duże nadzieje wiąże się również ze stosowaniem biostymulatorów, które dodatnio wpływają na wzrost roślin i często zwiększają ich odporność na niekorzystny wpływ niesprzyjających warunków środowiskowych.

Celem doświadczeń było zbadanie wpływu dolistnej aplikacji (oprysk) mieszaniny wyselekcjonowanych gatunków *Cyanobacteria* oraz biostymulatorów wzrostu Asahi SL i Biojodis na aktywność fizjologiczną i rozwój roślin ślazuca pensylwańskiego w niekorzystnych warunkach temperatury i wilgotności gleby oraz wykazanie przydatności stosowania wymienionych stymulatorów w uprawie tego gatunku w warunkach zmieniającego się klimatu.

Część doświadczalna

Surowce

Wyselekcjonowane partie roślin ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby), wieloletniej rośliny polikarpicznej o corocznie zamierających pędach, rekomendowanej do uprawy w Polsce na cele energetyczne, traktowano co trzy tygodnie, w postaci 1-, 2-, 3- i 4-krotnej aplikacji dolistnej, trzema gatunkami nietoksycznych *Cyanobacteria* oraz biostymulatorami Asahi SL i Biojodis.

Pochodzące z kolekcji KEiRR UŁ monokultury *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 i *Anabaena variabilis*, wyhodowano na pożywce ATCC Medium 616 w 27°C, przy oświetleniu lampami Farel (18 W). Przed aplikacją do roślin monokultury te sonifikowano za pomocą ultradźwiękowego homogenizatora (Omni-Ruptor 4000, Omni International) przez 15 min z zastosowaniem głowicy tytanowej z częstotliwością ultradźwięków 20 kHz, przy amplitudzie 80% oraz impulsach trwających 0,7 s w odstępach co 0,3 s.

Płynny preparat organiczny Biojodis (Jodavita, Jeznach Sp. J.) wyprodukowany był na bazie ekstraktu biohumusu, ulepszonego biologicznie aktywnym jodem i mikroorganizmami glebowymi. Jod występował w postaci jonów IO_3^- i I^- (rys. 1) i miał silne właściwości stymulujące wzrost bakterii glebowych, odpowiedzialnych za kompleksy organiczno-mineralne. Preparat Biojodis zawierał 5–8%

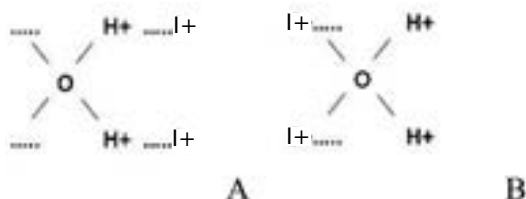


Fig. 1. Specific behaviour of iodine in the Biojodis formulation; A – conventional chemical bond, B – chemical bond in Biojodis formulation

Rys. 1. Jod w preparacie Biojodis; A – klasyczne wiązanie chemiczne, B – wiązanie chemiczne w preparacie Biojodis

substancji organicznych, 10^7 – 10^{10} CFU/g mikroorganizmów glebowych, 0,15–0,7% makro- i mikroelementów, w tym jod oraz humus rozpuszczalny w wodzie (pH 7,1–7,8).

Asahi SL (Arysta LifeScience) wyprodukowany był na bazie trzech substancji aktywnych z grupy nitrofenoli, naturalnie występujących w roślinach: *o*-nitrofenolanu sodu (ONP) (0,2%), *p*-nitrofenolanu sodu (PNP) (0,3%), 5-nitrogwajakolanu sodu (5NG) (0,1%) (rys. 2).



Fig. 2. Chemical formulas of main active substances of Asahi SL biostimulator

Rys. 2. Wzory chemiczne głównych substancji aktywnych biostymulatora Asahi SL

Metodyka badań

Badania przeprowadzono na ślazuca pensylwańskim, uprawianym z nasion, w 3-litrowych pojemnikach wypełnionych substratem (mieszanka torfu sfagnowego i piasku kwarcowego w stosunku objętościowym 1:1), w szklarni lub pokojach klimatyzowanych z 16-godzinny oświetleniem dobowym światłem sodowym o gęstości strumienia fotonów światła fotosyntetycznie czynnego $100 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, emitowanym przez lampy SON-T Agro 400. Rośliny uprawiano w szeroko zróżnicowanych warunkach temperatury i wilgotności gleby, określonych w tabelach 1 i 2 jako warianty doświadczeń.

Poszczególne partie tak uprawianych roślin podczas sezonu wegetacyjnego podlewano, opryskiwano lub jednocześnie podlewano i opryskiwano 1–4-krotnie, w odstępach trzytygodniowych, stosując (i) monokultury *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 i *Anabaena variabilis*) osobno lub w mieszaninie, (ii) Biojodis w stężeniu: 1, 2 i 3%, lub (iii) Asahi SL w stężeniu 0,1, 0,2, 0,4 i 0,8%.

Efektywność aplikacji testowanych preparatów oceniano na bazie pomiarów biometrycznych i aktywności fizjologicznej ślazuca pensylwańskiego. Co 4 tygodnie określano wysokość i zdrowotność roślin, indeks zawartości chlorofilu (a+b) aparatem Minolta SPAD-502 (Konica Minolta)^{4, 5)}, a w połowie i na koniec okresu wegetacyjnego oznaczono parametry wymiany gazowej: fotosyntezę netto, transpirację, przewodność szparkową i stężenie międzykomórkowe CO_2 za pomocą analizatora wymiany gazowej TPS-2, PP Systems (USA)⁶⁾, a także aktywność enzymatyczną fosfatazy kwaśnej (pH 6,0) i alkalicznej (pH 7,5) oraz RNazy za pomocą spektrofotometru UVmini-1240 Shimadzu⁷⁾, a także przepuszczalność membran cytoplazmatycznych za pomocą konduktrometru CC-551 Elmetron⁷⁾. Testy te są powszechnie uznane za użyteczne markery aktywności metabolicznej oraz reakcji roślin na bodźce zewnętrzne, co stwierdzono w poprzednich badaniach i w literaturze światowej⁸⁾.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w 3 seriach i w 3 powtórzeniach dla każdego traktowania. Każde powtórzenie zawierało 30 roślin rozmieszczonych metodą losowanych bloków. Uzyskane średnie z serii i powtórzeń opracowano statystycznie, stosując analizę wariancji. Średnie wybranych parametrów zostały pogrupowane za pomocą testu Duncana na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki badań

Uzyskane wyniki wykazały przydatność stosowania monokultur *Cyanobacteria* oraz biopreparatów Asahi SL i Biojodis do stymulacji wzrostu roślin ślazuca pensylwańskiego w optymalnych warunkach środowiskowych i łagodzenia niekorzystnego wpływu ekstremalnych temperatur oraz wilgotności gleby, które zgodnie z przewidywaniami mogą wystąpić w warunkach zmieniającego się klimatu. Badania wykazały, że kilkakrotne (co 3 tygodnie) aplikowanie *Cyanobacteria*, Asahi SL i Biojodis do roślin, uprawianych w warunkach korzystnych



Prof. dr hab. Mieczysław GRZESIK w roku 1971 ukończył studia na Wydziale Ogrodniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Jest profesorem zwyczajnym w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach. Specjalność – fizjologia, produkcja i ulepszenie nasion oraz roślin uprawianych w systemach konwencjonalnych, integrowanych i ekologicznych.

Table 1. Physiological activity in the leaves of *Sida* (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) grown under conditions of changing temperature and soil moisture and sprayed three times every three weeks with a mixture of three species of *Cyanobacteria* and preparations Asahi SL (0.4%) and Biojodis (3%)

Tabela 1. Aktywność fizjologiczna w liściach ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianego w warunkach zmieniającej się temperatury i wilgotności gleby i opryskiwanych trzykrotnie, co trzy tygodnie mieszaniną trzech gatunków *Cyanobacteria* oraz preparatami Asahi SL (0,4%) i Biojodis (3%)

Wariant doświadczenia	Parametry aktywności fizjologicznej				
	Wyciek elektrolitów, μS/(g·mL)		Fosfataza kwaśna (pH 6), mU/g ś.m.	Fosfataza zasadowa (pH 7,5), mU/g ś.m.	RNaza, mU/g ś.m.
	po 2 h	po 4 h			
Zmienna temperatura, stała wilgotność gleby 30%					
Kontrola	20,0 bc ^a	24,8 b	0,6 cd	0,2 b	3,0 c
20/0/20°C	20,1 bc	24,9 b	0,5 bc	0,2 b	2,1 b
20/40/20°C	16,0 a	21,7 ab	1,4 h	0,5 e	5,0 e
20/0/40/20°C	22,4 cd	25,2 b	0,7 de	0,2 b	3,0 c
10/-5/20/40/20°C	25,1 de	29,3 cd	0,1 a	0,05 a	0,5 a
Temp. 20°C, zmienna wilgotność gleby 20–60% co 3 tygodnie					
Kontrola	20,0 bc	24,8 b	0,6 cd	0,2 b	3,0 c
20–60%	26,3 ef	28,9 c	0,4 b	0,1 a	1,9 b
20–60% + mieszanina <i>Cyanobacteria</i>	17,7 ab	23,3 b	0,8 ef	0,3 c	3,7 cd
20–60% + Asahi SL	20,0 bc	23,1 b	0,9 f	0,3 c	3,8 cd
20–60% + Biojodis	15,8 a	21,2 a	1,1 g	0,3 c	4,0 d
Temp. 10** lub 40°C*, stała wilgotność gleby 30%					
Kontrola	**35,4 g	**41,6 f	*0,5 bc	*0,2 b	*3,0 c
Mieszanina <i>Cyanobacteria</i>	**26,3 ef	**32,1 de	*0,8 ef	*0,3 c	*3,9 d
Asahi SL	**29,8 f	**35,7 e	*0,8 ef	*0,3 c	*3,9 d
Biojodis	**26,5 ef	**32,6 de	*0,8 ef	*0,4 d	*4,0 d
NIR _{0,05}	3,5	3,5	0,15	0,09	0,8

*Średnie oznaczone tymi samymi literami, w ramach poszczególnych kolumn, nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$

Table 2. Gas exchange in the leaves of *Sida* (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) grown under conditions of changing temperature and soil moisture and sprayed three times every three weeks or a mixture of *Cyanobacteria* preparations Asahi SL (0.4%) and Biojodis (3%)

Tabela 2. Wymiana gazowa w liściach ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianego w warunkach zmieniającej się temperatury i w glebie o zmiennej wilgotności oraz opryskiwanych trzykrotnie, co trzy tygodnie mieszaniną *Cyanobacteria* lub preparatami Asahi SL (0,4%) i Biojodis (3%)

Wariant doświadczenia	Parametry wymiany gazowej			
	Zużycie netto H_2O do fotosyntezy, $\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	Transpiracja, $\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	Przewodność szparkowa H_2O , $\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	Zawartość międzykomórkowego CO_2 , $\mu\text{mol}/\text{mol}$ powietrza
Zmienna temperatura, stała wilgotność gleby 30%				
Kontrola	4,5 cd ^a	1,28 c	453 c	298 d
20/0/20°C	4,1 b	0,98 b	380 b	320 e
20/40/20°C	5,5 g	1,49 e	538 e	270 bc
20/0/40/20°C	4,1 bc	1,27 c	480 cd	316 de
10/-5/20/40/20°C	3,8 a	0,21 a	53 a	52 a
Temp. 20°C, wilgotność gleby zmienna co 3 tyg. 20–60%				
Kontrola	4,5 cd	1,28 c	453 c	298 d
20–60%	3,8 a	1,03 b	375 b	330 e
20–60% + miesz. <i>Cyanobacteria</i>	4,8 e	1,35 d	495 d	270 bc
20–60% + Asahi SL	4,7 de	1,36 d	503 d	275 c
20–60% + Biojodis	5,2 f	1,45 e	545 e	250 b
NIR _{0,05}	0,2	0,05	31	20

*Średnie oznaczone tymi samymi literami, w ramach poszczególnych kolumn, nie różnią się istotnie wg testu Duncana przy poziomie istotności $p = 0,05$

i niekorzystnych dla ich wzrostu, pozytywnie wpływało na dynamikę rozwoju roślin (rys. 3–7). Zastosowane monokultury *Cyanobacteria* wpłynęły korzystnie na wzrost roślin w podobnym stopniu niezależnie od metody aplikacji, a najbardziej efektywna była mieszanina tych szczepów (rys. 4). Pozytywny wpływ na wzrost roślin wykazały również preparaty Asahi SL i Biojodis, stosowane we wszystkich testowanych stężeniach, niezależnie od sposobu aplikacji (rys. 5 i 6).

Dolistna aplikacja testowanej mieszaniny *Cyanobacteria* oraz preparatów Asahi SL i Biojodis stymulowała wzrost roślin uprawianych w korzystnej i niekorzystnej temperaturze, przy czym w temp. 10°C, w której wzrost roślin był niemal zahamowany, ten pozytywny wpływ był znikomy. Stwierdzono również korzystniejszy wpływ preparatu Biojodis na rośliny uprawiane w ekstremalnych warunkach w porównaniu z pozostałymi traktowaniami (rys. 7). Korzystny wpływ *Cyanobacteria* oraz Asahi SL i Biojodis na wzrost ślazuca pensylwańskiego był następstwem ich pozytywnego oddziaływania na zwiększenie integralności membran cytoplazmatycznych, co wykazano na podstawie wypływu mniejszej ilości elektrolitów z tkanek, jak również zwiększenia zawartości chlorofilu w liściach roślin, którego miernikiem był indeks zawartości chlorofilu (tabela 1).

Przyspieszony wzrost i rozwój oraz zwiększony plon biomasy ślazuca pensylwańskiego był również konsekwencją zintensyfikowania aktywności enzymatycznej fosfatazy kwaśnej i zasadowej (odpowiedzialnej za gospodarkę fosforem w roślinie) oraz RNazy (regulującej specyficzne rozłożenie wiązań fosfodiesterowych w kwasach rybonukleinowych, w wyniku czego powstają mono- oraz oligonukleotydy (tabela 1)).

Stosowana mieszanina monokultur *Cyanobacteria* oraz biostymulatory spowodowały również zwiększenie wymiany gazowej w tkankach roślinnych, co wykazano na podstawie pomiarów podwyższonej wartości fotosyntezy netto, transpiracji, przewodności szparkowej i niższej zawartości międzykomórkowego CO_2 (tabela 2).

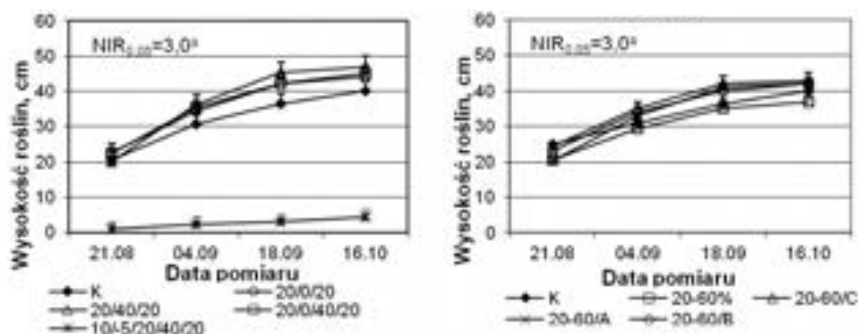


Fig. 3. Height of the *Sida hermaphrodita* L. Rusby plant grown: I – in the soil with moisture content of 30% and at various successive temperatures; II at 20°C, variable soil moisture (20–60%) and treated with a mixture of monocultures *Cyanobacteria* (C) or Asahi SL formulations of 0.2% (A) and Biojodis 3% (B)

Rys. 3. Wysokość roślin ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianych: I – w glebie o wilgotności 30% oraz w różnych kolejno następujących po sobie temperaturach; II – w 20°C i w zmiennej wilgotności gleby (20–60%) oraz traktowanych mieszaniną monokultur *Cyanobacteria* (C) lub preparatami Asahi SL 0,2% (A) i Biojodis 3% (B)

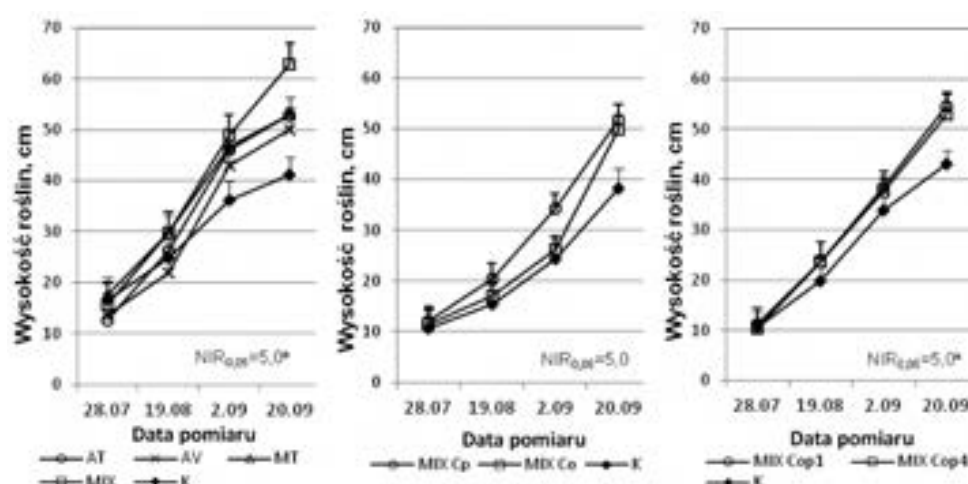


Fig. 4. Height of the *Sida hermaphrodita* L. Rusby plant grown at 20°C and in the soil with moisture content of 30%: I – treated with monocultures *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon (AT), *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 (MT) and *Anabaena variabilis* (AV) and a mixture (MIX); II – sprayed (MIXCo) and watered (MIXCp) with mixture of three monocultures *Cyanobacteria*; III – sprayed and watered once (MIXCp1) or four times every 3 weeks (MIXCp4) with a mixture of three *Cyanobacteria* monocultures

Rys. 4. Wysokość roślin ślazuca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianych w 20°C oraz w glebie o wilgotności 30%: I – traktowanych monokulturami *Cyanobacteria*: *Anabaena* sp. Trebon (AT), *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 (MT) i *Anabaena variabilis* (AV) oraz ich mieszaniną (MIX); II – opryskiwanych (MIXCo) i podlewanych (MIXCp) mieszaniną trzech monokultur *Cyanobacteria*; III – opryskiwanych i podlewanych jednokrotnie (MIXCp1) lub czterokrotnie co 3 tygodnie (MIXCp4) mieszaniną trzech monokultur *Cyanobacteria*

Stosowane metody oceny aktywności fizjologicznej roślin są powszechnie uznane jako użyteczne markery procesów metabolicznych, które w istotnym stopniu decydują o rozwoju roślin. Są też rekomendowanymi wskaźnikami reakcji organizmów roślinnych na bodźce zewnętrzne^{6, 8, 9}.

Podsumowanie

Korzystny wpływ *Cyanobacteria* na wzrost i aktywność fizjologiczną roślin jest wynikiem oddziaływania wielu syntetyzowanych przez te organizmy związków: aminokwasów, węglowodanów, mikro- i makroelementów, auksyn (IAA), giberelin (GA), cytokinin, witamin i wielu innych wtórnych metabolitów². Dotychczasowe badania wskazały, że skuteczność fitohormonów pochodzenia mikrobiologicznego jest porównywalna ze skutecznością standardowych cytokinin i IAA¹⁰. Dodatkową zaletą wymienionych organizmów jest zdolność wiązania przez nie azotu atmosferycznego, co jest wykorzystywane od wielu lat w rolnictwie oraz w przemyśle¹¹. Ponadto *Cyanobacteria* stanowią ważny składnik różnorodnych ekosystemów, które odgrywają znaczącą rolę w obiegu węgla i azotu. Wiele ich szczepów wykazuje znacz-

ną zdolność do tworzenia symbiotycznych związków z roślinami eukariotycznymi będącymi gospodarzami, należącymi do różnych grup^{9, 12}. Pozytywny wpływ preparatu Biojodis na wzrost i metabolizm roślin jest konsekwencją oddziaływania zawartych w nim ekstraktów biohumusu oraz aktywnego jodu i mikroorganizmów glebowych. Pozytywny wpływ tego preparatu związany jest przede wszystkim z jonami jodu, które w nim występują^{2, 13}. Dotychczasowe badania wskazują na bardzo istotny wpływ tego pierwiastka w regulacji rozwoju roślin. Jony jodu biostymulują procesy metaboliczne (składnik enzymów, koenzymów, katalizatorów, pobudzają syntezę białek), przyczyniają się do wzrostu odporności na choroby grzybowe (rozpad fenyloalaniny), aktywują reakcje fosforylacji, które normalizują reakcje obronne przed stresami, ograniczają dyfuzję substancji odżywczych od roślin do pasożyta i odwrotnie, stymulują procesy regeneracji uszkodzeń roślin przez zwiększenie form anionowych peroksydaz wywołujących syntezę ligniny i polisacharydów. Jod zwiększa wytrzymałość błon komórkowych na przenikanie strzępek zarodnika grzybów.

Z kolei stymulujący wpływ Asahi SL na wzrost i aktywność fizjologiczną roślin wynika z oddziaływania zawartych w nim trzech substancji aktywnych z grupy nitrofenoli, które naturalnie występują w roślinach. Traktowane preparatem Asahi SL rośliny warzywne charakteryzują się intensywniejszym wzrostem i rozwojem oraz wyższą produkcją biomasy. Asahi SL jest też uznanym biostymulatorem, który zwiększa odporność roślin ogrodniczych na stres środowiskowy¹⁴. Wysokie parametry plonotwórcze są wynikiem zwiększonej efektywności wymiany gazowej, korzystnej gospodarki wodnej w roślinie oraz wzrostu zawartości składników organicznych.

Wnioski

Wyniki badań wskazały na różną wrażliwość roślin ślazuca pensylwańskiego na zastosowane ekstremalne warunki temperatury i wilgotności gleby, a także na trzykrotną aplikację dolistną mieszaniny ekstraktów wodnych trzech szczepów *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. Trebon, *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 i *Anabaena variabilis*) oraz biopreparatów Asahi SL i Biojodis.

Wahające się w szerokim zakresie temperatury (od –5 do +40°C) oraz stosowana co 3 tygodnie na przemian susza glebowa (wilgotność gleby 20%) i nadmierne uwodnienie (60%), niekorzystnie wpływały na dynamikę wzrostu roślin. Stosowana mieszanina *Cyanobacteria* i biopreparaty w znacznym stopniu zmniejszyły negatywne skutki wpływu stresu hydrotermicznego i pozytywnie wpływały na dynamikę wzrostu oraz aktywność fizjologiczną roślin. Szczególnie pozytywny skutek zaobserwowano w przypadku aplikacji dolistnej i dogłębowej preparatu Biojodis o stężeniu 1–3% i w nieco mniejszym stopniu Asahi SL. Wykorzystanie ekologicznych stymulatorów (mieszaniny monokultur *Cyanobacteria* oraz Asahi SL i Biojodis) jest ekonomiczne i przyjazne dla środowiska, zwiększa produktywność ślazuca pensylwańskiego i może sprzyjać ograniczeniu stosowania nawozów chemicznych i pestycydów, które niekorzystnie wpływają na środowisko. Zastosowanie tych środków jako stymulatorów wzrostu roślin, zwiększających często ich naturalną odporność na patogeny i stres jest uważane za jedną z najbardziej obiecujących strategii w ekologicznej i integrowanej uprawie roślin¹³.

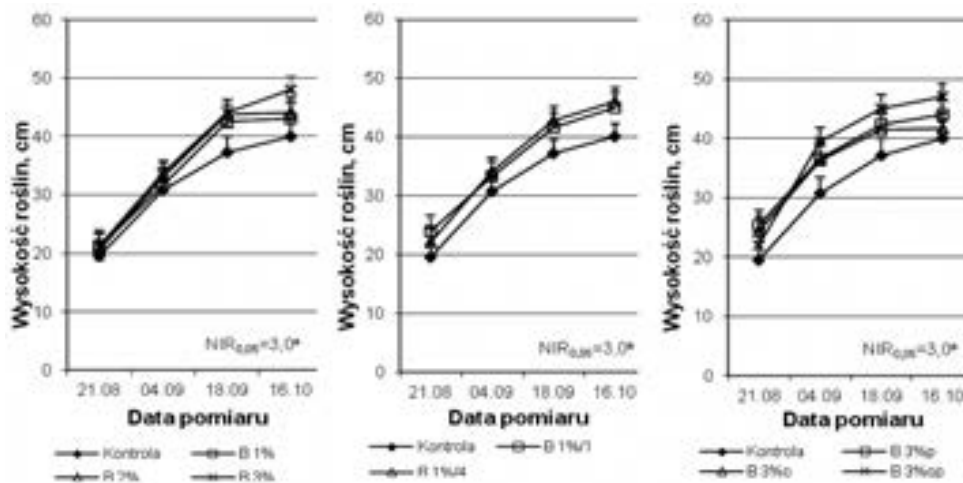


Fig. 5. Height of the *Sida hermaphrodita* Rusby L. plant grown at 20°C and in the soil with a moisture content of 30% and treated with formulation Biojodis by: I – spraying at concentrations of 1%, 2% and 3%, II – spraying in a concentration of 1% once with B (1%/1) and four with B (1%/4) every three weeks, III – a single spray at a concentration of with 3% (B3%o), watering (B3%p) and the spraying and watering (B3%op)

Rys. 5. Wysokość roślin ślazuwa pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianych w 20°C oraz w glebie o wilgotności 30% i traktowanych preparatem Biojodis metodą: I – opryskiwania w stężeniach 1%, 2% i 3%, II – opryskiwania w stężeniu 1% jednokrotnie B(1%/1) i czterokrotnie B(1%/4) co trzy tygodnie, III – jednorazowego oprysku w stężeniu 3% (B3%o), podlewania (B3%p) oraz oprysku i podlewania (B3%op)

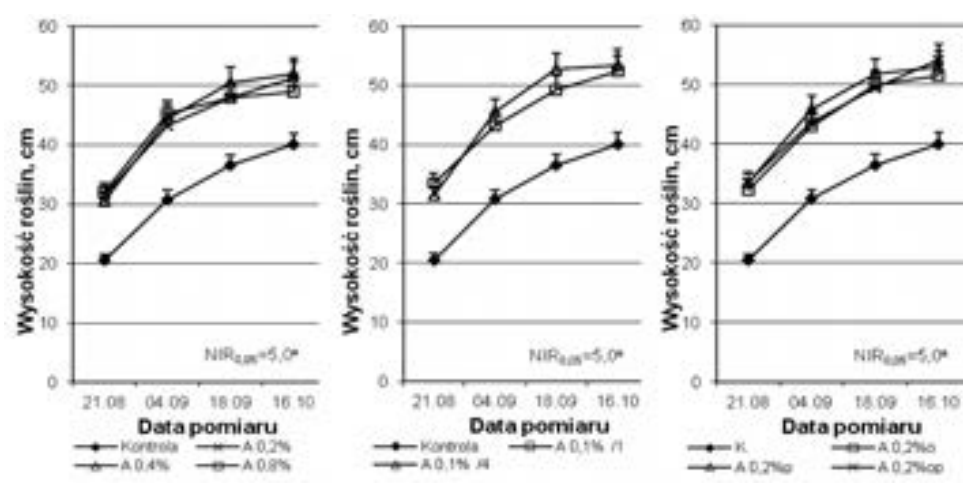


Fig. 6. Height of the *Sida hermaphrodita* L. Rusby plant grown at 20°C and in the soil with moisture content of 30% and treated with preparation method Asahi SL: I – spraying at concentrations of 0.2%, 0.4% and 0.8%; II – spraying in a concentration of 0.1% once (A0.1%/1) to four (0.1%/4) every three weeks; III – single-sprayed at a concentration of 0.2% (A0.2% o), watering (A0.2% p) and the spraying and watering (A0.2% op)

Rys. 6. Wysokość roślin ślazuwa pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianych w 20°C oraz w glebie o wilgotności 30% i traktowanych preparatem Asahi SL metodą: I – opryskiwania w stężeniach 0,2%, 0,4% i 0,8%; II – opryskiwania w stężeniu 0,1% jednokrotnie (A0,1%/1) i czterokrotnie (A0,1%/4) co trzy tygodnie; III – jednorazowego oprysku w stężeniu 0,2% (A0,2%o), podlewania (A0,2%p) oraz oprysku i podlewania (A0,2%op)

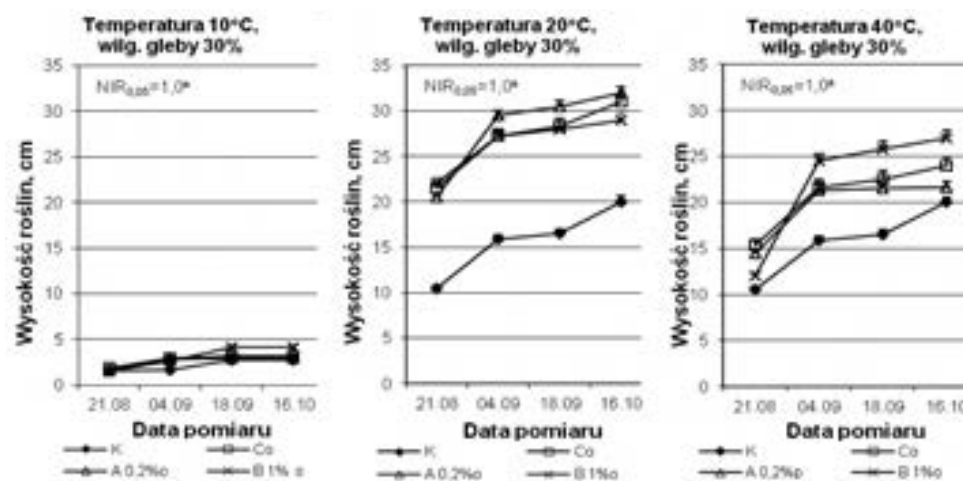


Fig. 7. Height of the *Sida hermaphrodita* L. Rusby plant grown at 10, 20 and 40°C and the soil moisture content of 30% and sprayed three times with three monocultures Cyanobacteria (Co) and preparations Asahi SL 0.2% (0.2%A) Biojodis and 1% (1%B)

Rys. 7. Wysokość roślin ślazuwa pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita* L. Rusby) uprawianych w 10, 20 i 40°C oraz w glebie o wilgotności 30% i opryskiwanych trzykrotnie mieszaniną trzech monokultur Cyanobacteria (Co) oraz preparatami Asahi SL 0,2% (A0,2%) i Biojodis 1% (B1%)

LITERATURA

Otrzymano: 29-04-2016

- [1] G.V. Bloembergen, A.H.M. Wijnfies, G.E.M. Lamers, N. Stuurman, B.J.J. Lugtenberg, *Molecular Plant Microbe Interaction* 2000, **13**, 1170.
- [2] K. Piotrowski, Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, *Pol. J. Environ. Stud.* 2016, **25**, nr 2, 741.
- [3] M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, *Pol. J. Environ. Stud.* 2014, **23**, nr 4, 1147.
- [4] K. Górnik, M. Grzesik, *Acta Physiol. Plantarum* 2002, **24**, nr 4, 379.
- [5] M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, *Polish J. Environ. Stud.* 2014, **23**, nr 4, 1147.
- [6] M.H. Kalaji, R. Carpentier, S.I. Allakhverdiev, K. Bosa, *J. Photochem. Photobiol.* 2012, **112**, 1.
- [7] Z. Romanowska-Duda, M. Grzesik, A. Pszczółkowska, W. Pszczółkowski, *Mat. ESNA 2013, European Society for New Methods in Agricultural Research*, 4–8 września 2013 r., Perrotis College, American Farm School, Thessaloniki, Ellas (Grecja), 58.
- [8] B. Badek, Z. Romanowska-Duda, B. Van Duijn, M. Grzesik, *J. Hort. Res.* 2014, **22**, 2.
- [9] S.H.A. Al-Khiat, *Effect of cyanobacteria as a soil conditioner and bio-fertilizer on growth and some biochemical characteristics of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings*, Praca doktorska, King Saud University, Faculty of Science, 2006, 1–190.
- [10] A. Hussain, S. Hasnain, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2012, **28**, 1459.
- [11] M. Grzesik, Z. Romanowska-Duda, M. Owczarczyk, H. Mazur-Marzec, *Mat. 20th Intern. Conf. on Plant Growth Substance (IPGSA), Book of abstracts*, 28 lipca–2 sierpnia 2010 r., Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain, **118**, 2010.
- [12] O.A. Gorelova, *Microbiology* 2006, **75**, nr 4, 465.
- [13] A. Jeznach, *Effect of iodine on the cabbage fruits ontogenesis and seed quality*, Praca magisterska, WSEH, Skierniewice 2011, 1–69.
- [14] K. Górnik, M. Grzesik, A. Mika, *Folia Horticulture* 2007, **19**, nr 2, 57.

Positive impact of bio-stimulators on growth and physiological activity of willow in climate change conditions

Krzysztof Piotrowski and Zdzisława Romanowska-Duda*

Laboratory of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Łódź, Banacha 12/16
90-237 Łódź, Poland

Received November 24, 2017; accepted December 29, 2017

Abstract. The aim of this research was to evaluate the physiological activity and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants cultivated under the conditions of adverse temperature and soil moisture content, and to assess the effect of the foliar application of Biojodis (1.0%) and Asahi SL (0.03%) bio-stimulators, or a mixture of *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 and *Anabaena* PCC 7120 cyanobacteria under such changing growth conditions. The obtained results showed different reactions to the applied constant or periodically changed temperature and soil moisture content. The plants which grew at periodically changed adverse temperature (from -5 to 40°C) or in scantily (20% m.c.) or excessively (60% m.c.) watered soils, grew slowly, in comparison with those growing at 20°C and in optimally moistened soil (30% m.c.). Foliar application of Biojodis and Asahi SL cyanobacteria increased the growth of willow at optimal and adverse temperature or in scantily and excessively moistened soil. The changes in plant growth were associated with the changes in electrolyte leakage, activity of acid or alkaline phosphatases, RNase, index of chlorophyll content in leaves and gas exchange. The above indicates that the foliar application of the studied cyanobacteria and bio-stimulators partly alleviates the harmful impact of adverse temperature and water stress on growth and physiological activity of willow plants.

Keywords: willow, bio-stimulators, growth, physiological activity

INTRODUCTION

Willow (*Salix viminalis* L.) is one of the more important crops cultivated for energy purposes in central and northern Europe. There are concerns that with the progressive climate changes increasing deficit of water in soil and resulting in inadequate rainfalls, the area favourable for the cultivation of this species will decrease. In addition, the

use of large quantities of chemical fertilizers, to achieve high yields of willow biomass, creates a risk of their run-off into water reservoirs, causing pollution of soil and water. Therefore, various methods of treatment and substances that do not contaminate the environment while simultaneously having a beneficial effect on growth of plants and increasing their resistance to adverse temperature and soil aridity have become the focus of interest (Wu *et al.*, 2017). The application of bio-stimulators and natural fertilizers in energy crops are alternatives to synthetic fertilizers, and these have a positive impact on the environment (Ananieva *et al.*, 2004; Grzesik *et al.*, 2015; Piotrowski *et al.*, 2016a, b).

Non-toxic cyanobacteria are an alternative to synthetic substances. Their use in the future-oriented ecological agriculture is highly promising (Grzesik and Romanowska-Duda, 2014). Cyanobacteria are able to synthesize many compounds, i.a. amino acids, carbohydrates, micro and macrolelements, auxin (IAA), gibberellins (GA), cytokinin, vitamins and several other secondary metabolites, which, when absorbed by plants, regulate their growth. Moreover, they have the ability to assimilate atmospheric nitrogen while having important impact on plant development. Previous studies have shown that the effectiveness of plant hormones of microbial origin was comparable to that of standard cytokinins and IAA. Cyanobacteria are commonly found in the natural environment and can be cultured on a large production scale with the use of appropriate technology (Hussain and Hasnain, 2012). Selected species of cyanobacteria have been observed to have beneficial effect on the growth of some energy crops cultivated under favourable environmental conditions (Grzesik *et al.*,

*Corresponding author e-mail: romano@biol.uni.lodz.pl

2015; Piotrowski *et al.*, 2016a, b). However, information about the impact of a mixture of cyanobacteria species on the energy crop growth under adverse temperature and soil moisture conditions is very limited.

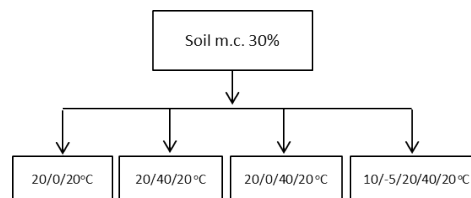
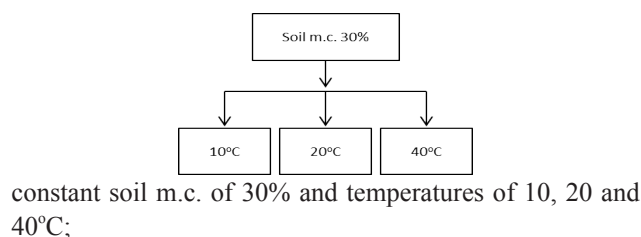
The research performed on vegetables (Virginia mallow and corn) has revealed the beneficial impact of the Biojodis and Asahi SL bio-stimulators on the growth of these plants under different environmental conditions. Such bio-stimulators have also been noted to enhance the plants' ability to increase resistance to adverse temperatures and soil water shortage (Anyszka *et al.*, 2008; Gawrońska *et al.*, 2008; Jeznach, 2011; Piotrowski *et al.*, 2016a, b). Biojodis is a liquid extract that is manufactured on the basis of biohumus. It contains active iodine present in the form of ions (JO_3 and J) which have a strong stimulating impact on the growth of the soil bacteria responsible for the organic-mineral complex (Babik, 2006; Grzesik *et al.*, 2011; Grzesik and Romanowska-Duda, 2009). Asahi SL is another bio-stimulant recommended in vegetable plant production. It is a compound based on three active substances from the nitrophenol group that naturally occur in plants (sodium ortho-nitrophenol ONP (0.2%), sodium para-nitrophenol PNP (0.3%) and sodium 5-nitroguajakolan 5NG (0.1%) (Grzesik *et al.*, 2009). According to the literature data, horticultural plants sprayed with Asahi SL exhibit improved growth and higher yield. The latter is the result of higher efficiency of gas exchange, as well as increased water and organic compound content (Anyszka *et al.*, 2008; Gawrońska *et al.*, 2008). It should be noted that tuber content of polyphenols is affected by cultivars, herbicides and bio-stimulants as well as weather conditions during the growing season. Indeed, herbicides and bio-stimulants increase the concentration of polyphenol compounds compared with control tubers (Zarzecka *et al.*, 2017).

Still, while some knowledge of the effect of cyanobacteria and the aforementioned bio-stimulators is known in horticultural crops, information concerning the effect of cyanobacteria, as well as Biojodis and Asahi SL bio-stimulators on energy willow growth under adverse temperature and soil moisture conditions is hard to find in literature.

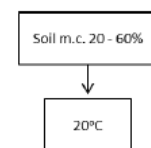
The aim of this research was to investigate the effect of a mixture of cyanobacteria monocultures (*Microcystis aeruginosa* MKR 0105 and *Anabaena* PCC 7120) or Asahi SL and Biojodis bio-stimulators on the growth and physiological activity of willow (*Salix viminalis* L.) cultivated under the adverse temperature and soil moisture conditions which seem likely to appear in Europe in the near future.

MATERIAL AND METHODS

The cuttings were rooted and the obtained plants were grown in 3 l pots filled with a mixture of sand and peat (1:1=v:v). The pots were kept in growth chambers under constant or periodically changed temperature and soil moisture content (m.c.) conditions. These were as follows:



constant soil m.c. of 30% and changing temperature, during the first month after rooting of the cuttings, in 1-week intervals: 20/0/20, 20/40/20, 20/0/40/20, 10/-5/20/40/20°C, so as to simulate the temperature changes during spring and the vegetation season. The temperatures of 0 and -5°C were used for 8 h only to simulate the night light frost in spring;



constant temperature of 20°C and soil m.c. changed periodically from 20 to 60% m.c., in 3-week intervals, to simulate aridity and excessive soil moistening during plant growth.

Next the plants were kept at 20°C and 30% soil m.c. up to the end of the vegetation season. The cuttings and plants were kept under an 8 h dark 16 h⁻¹ light cycle – SON-T AGRO 400 W, 100 μmolm⁻² s⁻¹. The moisture content of the soil was evaluated twice a day using a Moisture Meter (Delta-T Devices Ltd) equipped with WET sensors. The media moisture content was expressed as a percentage of volumetric water content (% vol.) (Gornik and Grzesik, 2002). When needed, the soil was additionally watered to obtain the desired m.c.

During the vegetation season, the selected batches of willow plants grown under the above mentioned conditions were triple-sprayed, in three week intervals, with non-toxic cyanobacteria (a mixture of monocultures of *Microcystis aeruginosa* MKR 0105 and *Anabaena* sp. PCC 7120) or Biojodis bio-stimulator (1%; Jodavita, Lithuania) or Asahi SL bio-stimulator (0.03%; Asahi Chemical Co Ltd, Japan).

The studied cyanobacteria monocultures were cultivated on BG11 medium (ATCC Medium 616) at 27°C under FAREL lamp 18 W, according to the procedure elaborated by Romanowska-Duda (Romanowska-Duda *et al.*, 2010). Prior to application, each monoculture was centrifuged for 2 min (4000 r.p.m.) and suspended in water. Then, the number of cells was counted using a Fuchs-Rosenthal hemocytometer. The cell density used in the experiments was estimated to be 2.5 × 10⁵ cells ml⁻¹ water.

For each plant treatment, three replicates in three series were prepared and every replicate contained 30 plants grown in 30 separate containers.

The impact of the used cyanobacteria and biostimulators on plant development under adverse temperature and soil moisture content conditions was evaluated on the basis of plant height, electrolyte leakage from leaves, activities of acid and alkaline phosphatases and RNase, index of chlorophyll content and gas exchange in leaves (net photosynthesis, transpiration, stomatal conductance and concentration of intercellular CO₂). The selected measurements were performed several times during the vegetation season, depending on the intensity of plant growth.

Plant height was measured with a ruler from the soil level to the upper part of a shoot (Gornik and Grzesik, 2002). Electrolyte leakage was assessed at 20°C, with 1-gram leaf segments placed in test-tubes and 3 ml of distilled water added. The electrolyte leakage was measured after 2 and 4 h, using microcomputer conductivity meter CC-551 Elmetron (Gornik and Grzesik, 2002; Szwonek, 2009). The activities of acid and alkaline phosphatases and RNase in the leaves were examined according to the methods described by Knypl and Kabzinska (1977) (Smolen, 2009). The index of chlorophyll content in the leaves was evaluated using Minolta SPAD-502, Japan. The gas exchange was measured using the gas analyser apparatus TPS-2 (PP Systems, USA) (Kalaji *et al.*, 2012).

The obtained results were analysed using the analysis of variance. The means were separated using Tukey's lowest significant difference (LSD) at an alpha level of 0.05. The data presented in the graphs were expressed also as the average $\pm$ the standard deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

The tests used to assess plant physiological activity are commonly recognized as useful markers of metabolic activity and plant responses to external stimuli (Badek *et al.*, 2014).

The obtained results revealed the legitimacy of the use of cyanobacteria monocultures and Asahi SL and Biojodis in the cultivation of willow plants (*Salix viminalis* L.), both under optimal and adverse environmental conditions (the latter characterized by extreme temperatures and soil moisture). The studied preparations applied in different forms to plants during the growing season significantly relieved the symptoms of environmental stress, increased plant resistance to diseases and enhanced their metabolic activity. The most promising results were obtained after triple application of Biojodis at the concentration of 1% to soil or leaves. In the variant with variable temperatures and soil moisture content of 30%, the highest increase in plant growth was observed after application of Biojodis (1%). A similar effect was obtained using Asahi SL or a mixture of the two cyanobacteria monocultures, as compared with a control series (Figs 1, 2). The beneficial effect of the Asahi SL and Biojodis cyanobacteria monocultures markedly improved the growth and physiological functions of the test plants, both under variable temperatures (−5 to +40 °C) and at a constant temperature of 20°C, while under variable soil moisture (20-60%) conditions.

The positive impact was also reflected by the increased integrity of the cytoplasmic membranes. Electrolyte leakage from the leaves was lowest after application of Biojodis. After application with Asahi SL or cyanobacteria monocultures, it was still lower than in the control. This indicated lower permeability of cytomembranes in

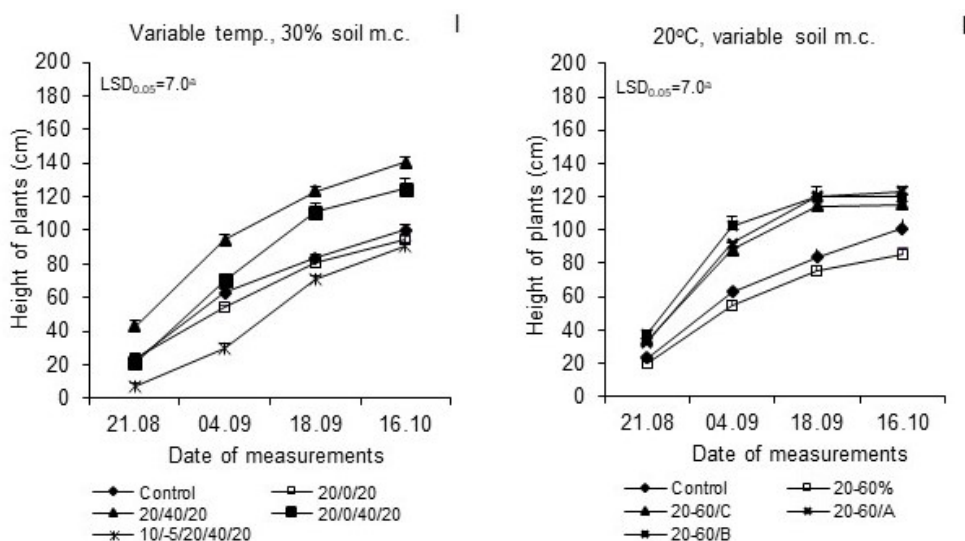


Fig. 1. Height of willow (*Salix viminalis* L.) plants grown under: I - constant soil moisture content (m.c.) of 30% and changing temperatures during the first month of growth; II - constant temperature, 20°C and periodically changed soil m.c. from 20 to 60%. Additionally, the plants were sprayed three times with cyanobacteria (C), Asahi SL (0.3%) (A) or Biojodis (1%) (B). Vertical bars denote $\pm$ SE. LSD at alpha level of 0.05.

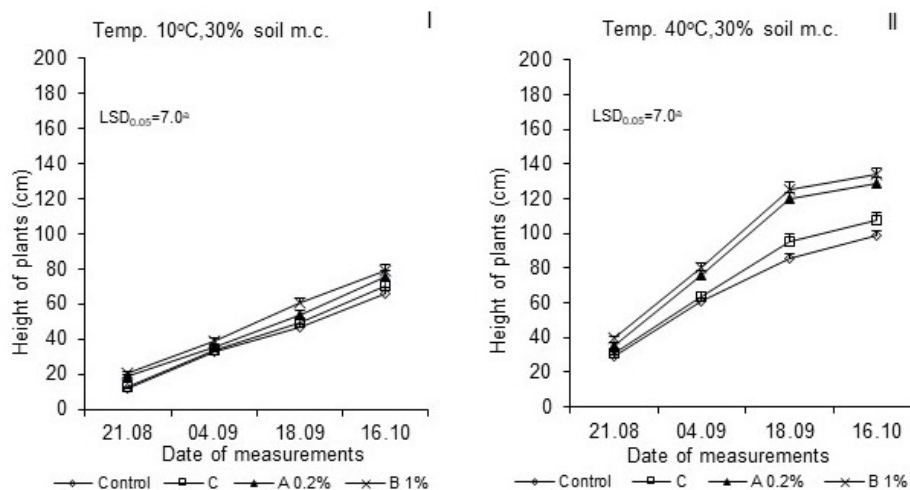


Fig. 2. Height of willow (*Salix viminalis* L.) plants grown under: I – constant temperature, 10°C and soil moisture content (m.c.) of 30%; II – constant temperature, 40°C and soil m.c. of 30%. Explanations as in Fig. 1.

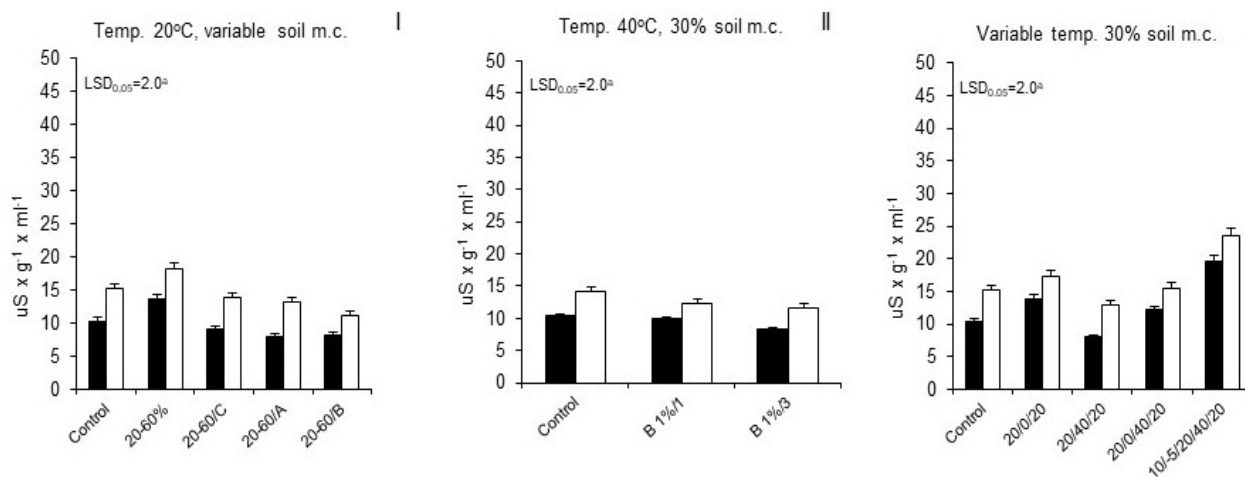


Fig. 3. Electrolyte leakage (after placement in water for 2 and 4 h) from willow (*Salix viminalis* L.) plants grown under: I – temperature of 20°C and in periodically changed soil moisture content from 20 to 60% m.c. during plant growth – additionally, the plants were sprayed with cyanobacteria (C), Asahi SL (A) or Biojodis (B); II – temperature of 40°C and 30% soil m.c. – the plants were sprayed with Biojodis (1%), once (1%/1) and three times (1%/3); III – temperatures changing during the first month and 30% soil moisture content. Vertical bars denote $\pm$ SE. LSD at alpha level of 0.05.

the treated variants (Fig. 3). It is important to note that variable temperature (-5 to + 40°C) and changing soil moisture content conditions gave rise to weaker plant growth and, in some cases, to complete inhibition of plant development.

The increased activity of enzymes, acid and alkaline phosphatases and RNase confirmed the effectiveness of the used preparations, thus justifying their application in order to increase the resistance of plants to unfavourable conditions resulting from the changing climate. Foliar and soil application of Biojodis (1%) mostly intensified the enzymatic activity of phosphatases responsible for the management of phosphorus and RNase in plants, the main function of which is the unfolding of phosphodiester bonds

in ribonucleic acids (RNA) (Figs 4 and 5). A similar effect was caused by both Asahi SL and a monoculture mixture of cyanobacteria, as compared with the control series.

Variable thermal and moisture conditions adversely affecting willow plant growth, significantly limited its physiological activity. This effect was reflected also by the index of chlorophyll content in the leaves (Fig. 6). The use of the mixture of two cyanobacteria monocultures, as well as the bio-stimulators also resulted in an increase in gas exchange in plant tissues which was expressed by the increased value of net photosynthesis, stomatal conductance, transcription and lower levels of intercellular CO₂ (Figs 7 and 8). Biojodis, applied to leaves and soil at the concentration of 1%, was revealed to be the most beneficial with regarded to the growth and physiological activity

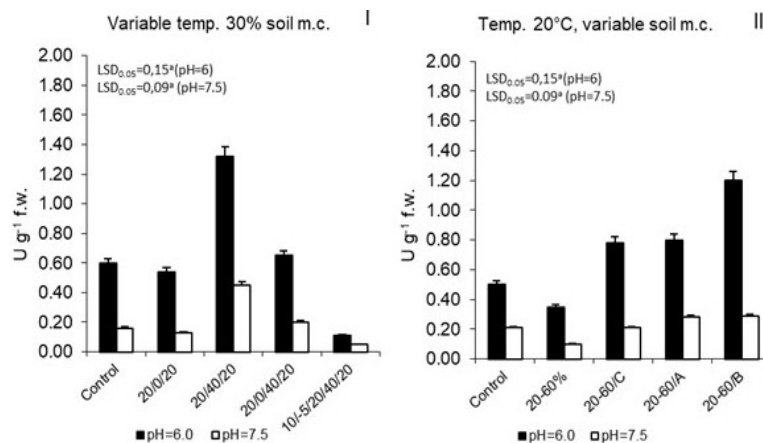


Fig. 4. Activity of acid (pH=6) and alkaline (pH=7.5) phosphatase in willow (*Salix viminalis* L.) plants grown at: I – variable changing temperature during the first month; II – constant 20°C and soil m.c. changed periodically from 20 to 60% m.c. during plant growth. Explanations as in Fig. 1.

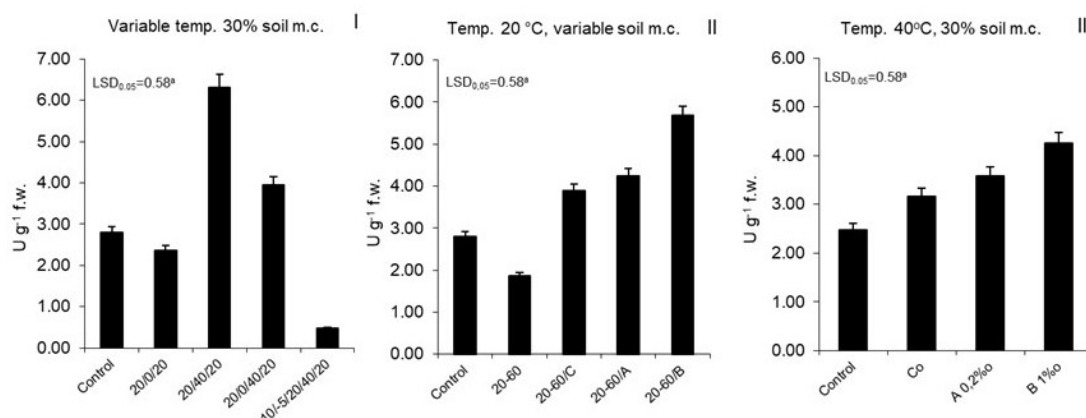


Fig. 5. RNase activity in willow (*Salix viminalis* L.) plants grown under: I – changing temperatures and 30% soil m.c.; II – constant 20°C and periodically changed soil m.c. from 20 to 60% - the plants were sprayed with cyanobacteria (C), Asahi SL (0.02%) (A) or Biojodis (1%) (B); III – constant 40°C and 30% soil m.c. - the plants were sprayed with cyanobacteria (C), Asahi SL (0.03%) (A) or Biojodis (1%) (B). Vertical bars denote $\pm$ SE. LSD at alpha level of 0.05.

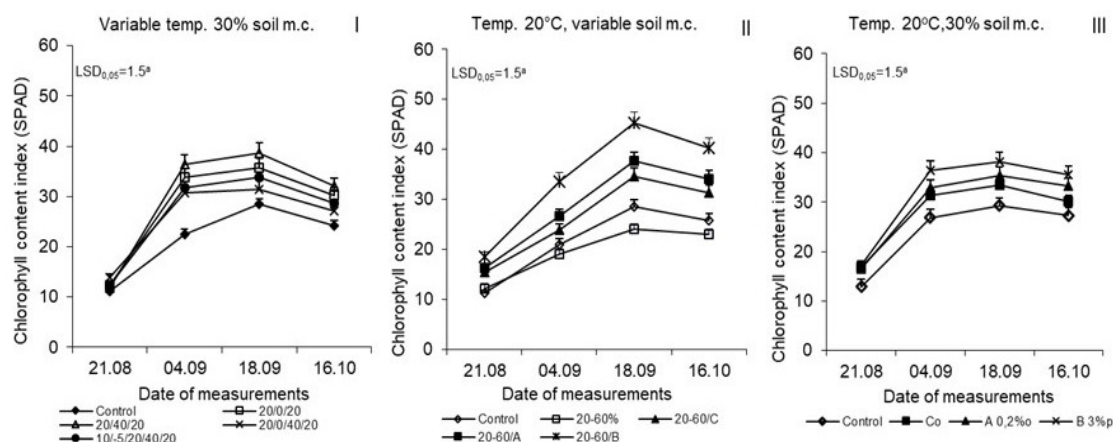


Fig. 6. Chlorophyll content index (SPAD) in willow (*Salix viminalis* L.) plants grown under: I – variable temperatures and 30% soil m.c.; II – constant 20°C and periodically changed soil m.c. from 20 to 60% - the plants were sprayed with cyanobacteria (C), Asahi SL (0.03%) (A) or Biojodis (1%) (B); III – constant 20°C and 30% soil m.c. - the plants were sprayed with cyanobacteria (C), Asahi SL (0.03%) (A) or Biojodis (1%) (B). Vertical bars denote $\pm$ SE. LSD at alpha level of 0.05.

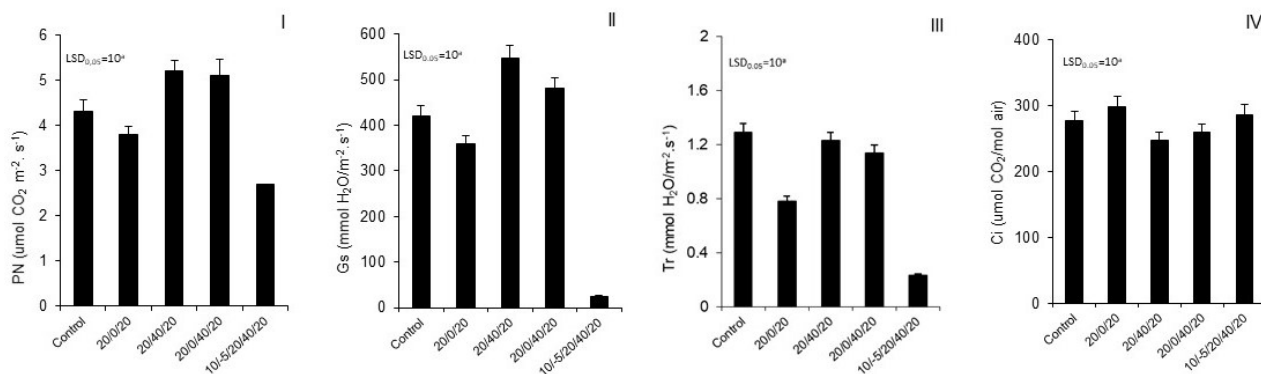


Fig. 7. Net photosynthesis (PN) (I), stomatal conductance (Gs) (II), transpiration (Tr) (III) and concentration of intercellular (Ci) CO₂ (IV) in willow (*Salix viminalis* L.). The plants were grown at changing temperatures as of the first month of growth, as well as at soil moisture content of 30%. Vertical bars denote $\pm$ SE. LSD at alpha level of 0.05.

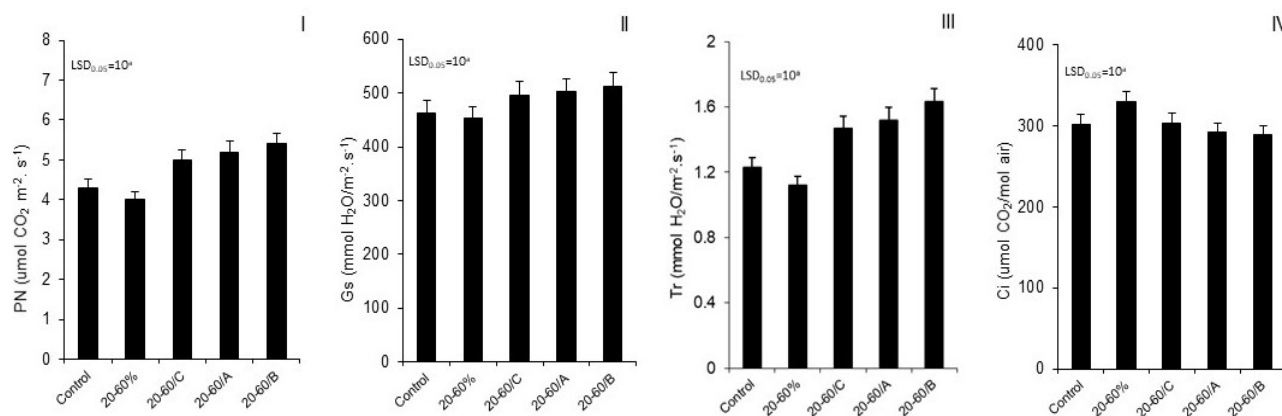


Fig. 8. Net photosynthesis (I), stomatal conductance (II), transpiration (III) and concentration of intercellular CO₂ (IV) in willow (*Salix viminalis* L.) plants grown at a temperature of 20°C and in periodically changed soil m.c. from 20 to 60% m.c. The plants were sprayed with cyanobacteria (C), Asahi SL (0.03%) (A) or Biojodis (1%) (B). Vertical bars denote $\pm$ SE. LSD at alpha level of 0.05.

of plants in all experimental variants. The influence of Asahi SL or a mixture of cyanobacteria monocultures was weaker but still promising. The observed positive effects of Biojodis may be the result of its active iodine content, which is the main component of this preparation. Iodine ions are a component of enzymes and co-enzymes, and take part in many important physiological processes in plants, as well as being involved in basic metabolic processes such as the synthesis of proteins (Jeznach, 2011; Smolen, 2009). These ions also increase the intensity of chemical reactions and stabilise the genetic determinants of different processes at the cellular level. Furthermore, they take an active part in the stabilization of other ions, affect the immune defence in the soil under stress conditions, reduce the permeability of cell membranes in plants and restrict the diffusion of nutrients. Iodine ions also stimulate the regenerative processes in plants, enhancing the synthesis of lignin and polysaccharides (Piotrowski *et al.*, 2016a, b; Smolen *et al.*, 2011).

While having lower potency than Biojodis, Asahi SL also produced favourable effects, as compared to the control. Consisting of active substances from the nitro phenols group, its chemical composition influenced plant growth and development. The application of Asahi SL increased plant growth, intensified the respiratory processes of photosynthesis, improved water management and intensified absorption of nutrients. All the aforementioned effects resulted in higher production of plant biomass. Moreover, this substance reduced the negative effects of adverse environmental conditions and increased the resistance of plants to abiotic stress, primarily to low temperature, excessive moisture and heavy metal concentration. In addition, by way of influencing a number of metabolic processes in plants, it contributed to the reduction of oxidative stress (Anyszka *et al.*, 2008; Gawrońska *et al.*, 2008; Gornik *et al.*, 2007). Previous research has also shown that a single spraying of plants with Asahi SL has a positive effect on seed regeneration, increasing the number and weight of

seeds and the number of pods (Kocira *et al.*, 2015). Indeed, in our work, the highest seed weight was found with the application of 0.1% Asahi SL solution, or in our control (Kocira *et al.*, 2015).

It should be noted that our Control (without bio-stimulator or cyanobacteria application) was characterized by the lowest performance factors.

The performed research also indicated the positive effects of the mixture of two cyanobacteria monocultures. It enhanced the growth of the plants and reduced the negative impact of adverse environmental conditions. In addition, the non-toxic cyanobacteria strains (MKR *Microcystis aeruginosa* 0105 and *Anabaena* sp. PCC 7120) increased the willow plant (*Salix viminalis* L.) metabolic activity, as compared to the control series. This positive effect resulted from these strains' ability to synthesize many organic compounds, including the amino acids, carbohydrates, the phytohormones (auxin, gibberellin, cytokinin), macro- and microelements and vitamins, as well as many other secondary metabolites (Piotrowski *et al.*, 2016a, b). These organisms can fix nitrogen from atmosphere and enrich the soil with nitrogen compounds (Haroun and Hussein, 2003; Nain *et al.*, 2010; Perez-Garcia *et al.*, 2011).

CONCLUSIONS

1. The research performed on willow plants (*Salix viminalis* L.), cultivated under favourable and unfavourable humidity-thermal environmental conditions, indicated their variable sensitivity to the tested growth stimulants, the mixtures of cyanobacteria, as well as the bio-stimulants Asahi SL and Biojodis. The used cyanobacteria mixtures and bio-stimulant preparations significantly improved plant growth both under favourable and unfavourable conditions of temperature and soil moisture content, and alleviated their negative effects.

2. The used stimulants can become important elements of organic tree-farming. Their application to plants or soil can reduce the use of chemical fertilizers and pesticides, thus significantly decreasing their negative impact on the environment and soil quality. The use of organic fertilizers is one of the most promising strategies for sustainable and integrated crop production in agriculture, forestry and horticulture.

Conflict of interest: The Authors do not declare conflict of interest.

REFERENCES

- Ananieva E.A., Christov K.N., and Popova L.P., 2004. Exogenous treatment with Salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to Paraquat J. Plant Physiol., 161, 319-328.
- Anyszka Z., Dobrzański A., and Palczyński J., 2008. The reaction onions and carrots on biostimulant Asahi SL used with herbicides. Conf. Biostimulators in Modern Crop Production, February 7-8, Warsaw, Poland.
- Babik J., 2006. Evaluation of the usefulness of Biojodis for use in the cultivation of vegetables. Raport of the Institute of Vegetable Crops, Skierniewice, Poland.
- Badek B., Romanowska-Duda Z., Grzesik M., and Van Duijn B., 2014. Rapid evaluation of primed China aster seed (*Callistephus chinensis* Ness.) germinability using physiological and biochemical markers. J. Horticultural Res., 22(2), 5-18.
- Gawrońska H., Przybysz A., and Słowiński A., 2008. Biological basis of action biostimulant Asahi SL. Conf. Biostimulators in Modern Crop Production, February 7-8, Warsaw, Poland.
- Gornik K. and Grzesik M., 2002. Effect of Asahi SL on China aster 'Aleksandra' seed yield, germination and some metabolic events. Acta Physiologiae Plantarum, 24(4), 379-383.
- Gornik K., Grzesik M., and Mika A., 2007. Improvement of grapevines rooting and growth of plants under stress conditions by Asahi SL. Folia Horticulture, 19(2), 57.
- Grzesik M. and Romanowska-Duda Z., 2009. The effect of potential climatic changes, Cyanobacteria, Biojodis and Asahi SL on development of the Virginia fanpetals (*Sida hermaphrodita*) plants. Pamiętnik Puławski, 151, 483-491.
- Grzesik M. and Romanowska-Duda Z., 2014. Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with cyanobacteria and microalgae. Pol. J. Environ. Stud., 23(4), 1147-1153.
- Grzesik M., Romanowska-Duda Z., Piotrowski K., and Janas R., 2015. Diatoms (*Bacillariophyceae*) as an effective base of a new generation of organic fertilizers. Przemysł Chemiczny, 94(3), 391-396, DOI: 10.15199/62.2015.3.27
- Grzesik M., Romanowska-Duda Z. and Piotrowski K., 2009. The effect of potential change in climatic conditions on the development of the energy willow (*Salix viminalis*) plants. Proc. 2nd Int. Conf. Environmental Management, Engineering, Planning and Economics (CEMEPE) and SECOTOX Conf., Mykonos, June 21-26, GRAFIMA Publ., D. Gounari, Thessaloniki, Greece.
- Grzesik M., Romanowska-Duda Z. and Piotrowski K., 2011. Influence of Biojodis on the physiological activity of corn plants in the predicted environmental constraints. 15th Int. Symp. Toxicity Assessment, ISTA, July 3-8, Hong Kong.
- Haroun S.A. and Hussein M.H., 2003. The promotive effect of algal biofertilizers on growth, protein pattern and some metabolic activities of *Lupinus termis* plants grown in siliceous soil. Asian J. Plant Sci., 2(13), 944-951.
- Hussain A. and Hasnain S., 2012. Comparative assessment of the efficacy of bacterial and cyanobacterial phytohormones in plant tissue culture. World J. Microbiol. Biotechnol., 28, 1459-1466.
- Jeznach A., 2011. Effect of iodine on the cabbage fruits ontogenesis and seed quality (in Polish). M.Sc. Thesis, WSEH Skierniewice, Poland.
- Kalaji M.H., Schansker G., Ladle R.J., Golt-Sev V., Boska K., Allakhverdiev S., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dabrowski P., Elsheery N., Ferroni L., Guidi L., Hogewoning S.W., Jajoo A., Misra A.N., Nebauer S.G., Pancaldi S., Penella C., Poli D., Pollastrini M., Romanowska-Duda Z.B., Rutkowska B., Serodio J., Suresh K., Szulc W., Tambussi E., Yanniccari M., and

- Zivcak M., 2014.** Frequently Asked Questions about chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis Res.*, 122, 121-158.
- Knypl J.S. and Kabzinska E., 1977.** Growth, phosphatase and ribonuclease activity in phosphate deficient *Spirodela oligorrhiza* cultures. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 17, 279-287.
- Kocira A., Kocira S., and Stryjecka M. 2015.** Effect of Asahi SL application on common bean yield. 7th Int. Sci. Symp. Farm Machinery and Processes Management in Sustainable Agriculture, Agriculture and Agricultural Science Procedia, November 25-27, Gembloux, Belgium.
- Li X., Brestic M., Tan DX, Zivcak M., Zhu X., Liu S., Song F., Reiter R.J., and Liu F., 2017.** Melatonin alleviates low PS I limited carbon assimilation under elevated CO₂ and enhances the cold tolerance of offspring in chlorophyll b-deficient mutant wheat. *J. Pineal Res.*, DOI: 10.1111/jpi.12453
- Nain L., Rana A., Joshi M., Jadhav S.D., Kumar D., Shivay Y.S., Paul S., and Prasanna R., 2010.** Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. *Plant Soil*, 331, 217- 230.
- Perez-Garcia O., Escalante F.M.E., De-Bashan L.E., and Bashan Y., 2011.** Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, 45, 11-36.
- Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., and Grzesik M., 2016a.** How Biojodis and Cyanobacteria alleviate the negative influence of predicted environmental constraints on growth and physiological activity of corn plants. *Pol. J. Environ. Stud.*, 25(2), 741-751, DOI: 10.15244/pjoes/60894
- Piotrowski K., Romanowska-Duda Z., and Grzesik M., 2016b.** Cyanobacteria, Asahi SL and Biojodis as stimulants improving growth and development of the *Sida hermaphrodita* L. Rusby plant under changing climate conditions. *Przemysł Chemiczny*, 95/8, 1569-1573, DOI: 10.15199/62.2016.8.31
- Romanowska-Duda Z., Grzesik M., Owczarczyk A., and Mazur-Marzec H., 2010.** Impact of intra and extracellular substances from Cyanobacteria on the growth and physiological parameters of grapevine (*Vitis vinifera*). 20th Int. Conf. Plant Growth Substance (IPGSA), Book of abstracts July 28–August 2, University Rovira and Virgili, Tarragona, Spain.
- Smolen S., 2009.** Effect of nitrogen and iodine fertilization on the mineral content in carrot. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, 40, 270-277.
- Song W.Y., Yang H.Ch., Shao H.B., Zheng A.Z., and Brestic M., 2014.** The Alleviative effects of salicylic acid on the activities of catalase and superoxide dismutase in malting barley (*Hordeum uhulgare* L.) seedling leaves stressed by heavy metals. *CLEAN - soil, air, water*, 42(1), 88-97, DOI: 10.1002/clen.201200310
- Szwonek E., 2009.** Impact of Foliar Fertilizer Containing Iodine on “Golden Delicious” Apple Trees. *Proc. Int. Plant Nutrition Colloquium*, XVI, Department of Plant Sciences, US Davis, CA, USA.
- Wu W., Zhang Q., Ervin E.H., Yang Z., and Zhang X., 2017.** Physiological mechanism of enhancing salt stress tolerance of perennial ryegrass by 24-Epibrassinolide. *Front. Plant Sci.*, 8, 1017, DOI: 10.3389/fpls.2017.01017
- Zarzecka K., Gugala M., Sikorska A., Mystkowska I., Baranowska A., Niewęglowski M., and Dołęga H., 2017.** The effect of herbicides and biostimulants on polyphenol content of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and leaves. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2017.02.004>



Cultivation of energy crops by ecological methods under the conditions of global climate and environmental changes with the use of diatom extract as a natural source of chemical compounds

K. Piotrowski¹ · Z. Romanowska-Duda¹ · B. Messyas²

Received: 15 April 2020 / Revised: 23 July 2020 / Accepted: 28 August 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Modern agriculture must be subject to some adaptation processes due to unpredictable climate changes. One of the activities that enables the production of plant biomass in adverse climatic conditions is the development of ecological and innovative crop technologies using natural plant extracts. The elimination of synthetic fertilizers and their replacement with products based on organic matter will increase the plant's resistance to negative conditions of environmental stress, will have a positive effect on the development and yielding of plants and will reduce cultivation costs. The plant material: willow (*Salix viminalis*), Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*). The natural extract was obtained from *Navicula* sp. (Bacillariophyceae) monocultures, which was applied to plants in three variants: watering, spraying (foliar application) and watering and spraying. Every 2 weeks: plant height and chlorophyll content index were determined and at the end of the growing season, an analysis was made of: fresh and dry biomass, gas exchange activity in plants (net photosynthesis, transpiration, stomatal conductivity and intercellular CO₂ concentration). The enzymatic activity of acid (pH = 6.0) and alkaline (pH = 7.5) phosphatase, RNase, dehydrogenases, as well as the integrity of cytoplasmic membranes was determined. The obtained results confirmed the positive effect of diatom monoculture extract on the growth and development of the plants. The analyzed physicochemical parameters were characterized by 15–20% higher values in comparison with the control. The use of natural extracts from *Navicula* sp. can be an alternative to chemical fertilizers and is considered one of the promising strategies in organic agriculture.

Keywords *Salix viminalis* · *Helianthus tuberosus* · *Sida hermaphrodita* · Bacillariophyceae · Biostimulators · Biofertilizer

Introduction

Limiting the use of chemical fertilizers in agriculture due to their negative impact on the environment and human health is one of the priority assumptions of modern, sustainable

European policy. The latest regulation of the European Parliament from June 2019 radically changes the approach in the use and production of artificial fertilizers in the European Union. Thanks to the new regulations, only fertilizers that meet stringent EU-wide quality and safety requirements will be allowed to enter the EU market. Current contaminants in EU phosphate fertilizer products (heavy metals) may pose a threat to human and animal health, as well as all levels of the ecosystem. A modern and sustainable approach in organic farming must be based on natural organic substances (biostimulators) (Grzesik et al. 2015). The conducted research and numerous literature data indicate that bio-fertilization may become an alternative to dangerous synthetic fertilizers and pesticides. Their main advantage is primarily ecological and environmentally friendly origin and a positive impact on the growth, development and yielding of cultivated plants. Silicon is one

Communicated by P. Wojtaszek.

✉ Z. Romanowska-Duda
zdzielawa.romanowska@biol.uni.lodz.pl

¹ Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Banacha Str. 12/16, 92-237 Lodz, Poland

² Department of Hydrobiology, Faculty of Biology, Institute of Environmental Biology, Adam Mickiewicz University in Poznan, Str. Umultowska 89, 61-614 Poznań, Poland

of the most common elements in the earth's crust. However, due to its specific chemical properties, it occurs in a form most often inaccessible to plants, often as silica in the form of quartz — a substance insoluble in water. The form available for plants is silicic acid which is very unstable and easily turns back into forms inaccessible to plants (Abro et al. 2009; Sommer et al. 2006). Research to date has shown that silicon fertilization increases plant resistance to diseases and pests, water shortage, light and salt stress. The use of silicon also mitigates the effects of phytotoxic excess of some ions in the root environment, such as sodium, manganese, aluminum and heavy metals. Despite the undoubted benefits of using silicon in plant development, the use of this element in crops is still underestimated, and one of the reasons is the lack of a sufficiently stable fertilizer product (Meena et al. 2014; Farooq and Dietz 2015). Technological advancement, producer awareness and increasingly restrictive international regulations have given the chance to use natural organisms including diatoms as biostimulants and a natural source of silicon. The use of specific and unique properties of diatoms in modern and sustainable economy is highly prospective and creates many opportunities, including as a base for the production of new generation fertilizers. These organisms are diverse and cover over 100,000 species. These organisms live as single cells or form colonies that resemble several-centimeter threads, starfish or bushes (Witkowski et al. 2006; Prygiel et al. 1993; Round et al. 1992; Simental and Sanchez-Saavedra 2003). Their cultivation is relatively simple, does not generate high costs and they are a source of many bioactive chemical compounds widely used in the pharmaceutical industry to produce antiviral and antibacterial drugs (Fimbres-Olivarria et al. 2018). It is an interesting and positive fact that the biochemical composition of diatoms is variable and depends on the properties of the environment in which they live. The presence of red light during microalgae growth stimulated the synthesis of carbohydrates, and the exposure of blue light significantly increased the protein content (Jungandreas et al. 2014). High content of antioxidant compounds in diatoms is successfully used in the cosmetics and nutraceutical industry (Karthikeyan et al. 2013; Abd El Baky et al. 2013). High content of silicon, nitrogen, phosphorus and biologically active compounds allows the use of these organisms as a base for innovative preparations for growing plants. Diatoms are unicellular organisms with the ability to form colonies, they occur in freshwater and marine environments, as well as on rocks, in soil and bark of trees — wherever there is moisture and light (Grzesik et al. 2015; Descy et al. 1991; Kwadrans et al. 1998). They inhabit not only clean waters, but they can also be found in highly polluted places, such as sewers, where no other organisms can survive (Broda et al. 2015). Being highly sensitivity to the content of nutrients and availability of light, diatoms are used as an indicator of the eutrophication process (Noga et al. 2013). High content of heavy metals in water makes diatom cells deformed and much

smaller than under conditions favorable to their development (Peszek et al. 2014). Characteristic structure and composition of a cell wall distinguish these algae from other organisms. Hydrated silica ($\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$) and diatopetines — an acid polysaccharide are — their main components. (Round et al. 1992). The specific properties of diatom structure, such as the ability to form silica armor and to produce mucus rich in mannose, fucose and galactose can be used in the process of applying fertilizers from diatoms, and thus can have a positive effect on biomass and crop yielding (Round 1990). Due to the high content of fats and proteins, they form the base of the food chain in oceans, seas and inland waters. They are thought to be responsible for a quarter of global oxygen production. They are capable of phytoremediation — absorption of heavy metal ions (lead, zinc, nickel, cadmium, titanium) (Rakowska 2003). Despite the lower content of nitrogen and phosphorus in diatoms compared to synthetic fertilizers, these elements are better absorbed by plants. In addition, diatomaceous bacteria are present on the surface of diatom cells, which can be directly absorbed by plants or stored in soil through denitrification processes (Allen et al. 2011). The use of diatoms as new generation fertilizers can stimulate growth and development of cultivated plants as well as their resistance to pathogens and stressors, such as sudden climate changes. Research to date and literature data have confirmed the positive effect of other microorganisms (*Cyanobacteria*) on crop growth and the ecosystem (Piotrowski et al. 2016; Grzesik and Romanowska-Duda 2014). Diatoms, including *Navicula* sp., can play a key role in improving soil quality and biological life and in stimulating plant and microorganism growth. The aim of the study was (1) analysis of the growth and metabolic activity of energy plants (*Salix viminalis*, *Helianthus tuberosus*, *Sida hermaphrodita*) grown under the conditions simulating climate change and treated with an extract obtained from diatoms (2) assessment of the usefulness of diatoms as a source of natural silicon in agro. The positive effect of diatoms on the growth, development and metabolic activity of energy plants has been demonstrated. The possibility of using diatoms in the production of new generation fertilizers which are based on natural and ecological ingredients of organic origin was pointed out. The development and application of diatom preparations can significantly reduce or completely eliminate synthetic fertilizers and pesticides that are dangerous to humans and ecosystems.

Materials and methods

Selection of plant material

The research was carried out using three popular plant species: willow (*Salix viminalis*), Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*). The choice of plant material was dictated by their specific

properties: rapid growth, low cultivation costs, occurrence in various climatic zones, high calorific value. The course of the experiment strictly depended on the growing season of the selected plant species. The experiment was carried out in three variants: Variant I—vegetation room (controlled conditions: soil moisture, temperature, lighting); Variant II—greenhouse (controlled soil humidity, temperature dependent on weather), soil drought alternating every 3 weeks (20% soil moisture) and excessive soil moisture (60%), the soil moisture level was monitored using a soil moisture measurement ThetaProbe ML3, Delta-T; Variant III—field (weather-dependent conditions), soil moisture, temperature, weather dependent on sun exposure, time of day, season of the year. In variant I, the experimental plants were subjected to variable temperatures that may occur in the conditions of a changing climate. The simulation of temperature changes is presented in Table 1. 20/0/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered three times every 14 days to 0 °C for 24 h; 20/40/20 °C—plants grown at 20 °C were raised three times to 40 °C for 24 h every 14 days; 20/0/40/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered to 0 °C twice for 24 h after 14 and 42 days of cultivation and one temperature increase to 40 °C for 24 h on the 28th day of the experiment; 10/−5/20/40/20 °C—the plants for the first 14 days of the experiment were grown at 10 °C, then the temperature was lowered to −5 °C for 24 h, for the next 42 days, the plants were grown at 20 °C, meanwhile, the 28th day the temperature was raised to 40 °C for 24 h.

Plants in all variants (I–III) were grown in 3-L pots filled with a mixture of sand and peat (1:1 = v:v). The first applications of diatomaceous fertilizer were made at a plant height of 15 cm. The experiment was carried out in

five replicates for each treatment. Each lot consisted of 30 plants of each species, arranged by random blocks. The obtained means from each parameter were grouped using the Duncan test at significance level $\alpha = 0.05$.

Diatom cultivation and preparation for plant treatment

During the growing season, all plants were treated with *Navicula* sp. monoculture extract. The biopreparation was applied every 3 weeks in three ways: by direct watering, spraying (fertilizer in the form of an aerosol), and watering and spraying. Monoculture *Navicula* sp. came from the KER collection, Department BiOŚ, UŁ, cultured in a phytotron room on BG11 medium (ATCC Medium 616) rich in micro- and macroelements at 27 °C with Farel lamps (18 W), according to the procedure developed by Romanowska-Duda et al. (2010). The number of *Navicula* sp. cells was determined using a Fuchs and Rosenthal hemocytometer. In the monocultures used for the experiments, the number of cells in 1 mL of water was 600,000. Then, the diatom cells were subjected to a 2-min centrifugation (4000 rpm) and suspended in water. Before starting the application of the monoculture, it was subjected to a sonication process of 15 min (ultrasound frequency 20 kHz, with an amplitude of 80% and impulses of 0.7 s at intervals of 0.3 s) using an ultrasonic homogenizer (Omni-Ruptor 4000, Omni International). Depending on the experimental variant, each plant was sprayed with 20 ml, 20 ml watered or 40 ml *Navicula* sp. monoculture mixture sprayed and watered.

Table 1 List of variants according to which the experiment was conducted

<i>Salix viminalis</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>Sida hermaphrodita</i>
Variant I—vegetation room (controlled conditions: soil moisture, temperature, sunlight—controlled)		
Variable temperature 20/0/20 °C; 20/40/20 °C 20/0/40/20 °C; 10/−5/20/40/20 °C		
Diatom monoculture application in the form of watering	Diatom monoculture application in the form of spraying	Diatom monoculture application in the form of watering and spraying
Variant II—greenhouse (soil humidity controlled, temperature dependent on weather), applied every 3 weeks, alternately soil drought (20% soil moisture) and excessive soil moisture (60%)		
Temp. 20 °C, Variable soil moisture 20–60%, every 3 weeks		
Diatom monoculture application in the form of watering	Diatom monoculture application in the form of spraying	Diatom monoculture application in the form of watering and spraying
Variant III—field (weather-dependent conditions), soil moisture, temperature, weather-dependent sun exposure, time of day, time of year		
Temperature and humidity vary		
Diatom monoculture application in the form of watering	Diatom monoculture application in the form of spraying	Diatom monoculture application in the form of watering and spraying

Research methodology

The assessment of the usefulness and effectiveness of the *Navicula* sp. monoculture mixture as a bio fertilizer were determined on the basis of biometric measurements of plants. Every 4 weeks, plant growth and development were determined, and the chlorophyll content index of plant leaves was determined using a Minolta SPAD-502 apparatus (Konica Minolta) (Górník et al. 2002). The measurement was made by closing the measuring head on a leaf. Since the leaf is not cut off or damaged in any other way, the same leaf was measured during the growth period of the plant. At the end of the growing season, fresh and dry biomass as well as gas exchange activity in plants (net photosynthesis, transpiration, stomatal conductivity and intercellular CO₂ concentration) using the TPS-2-PP Systems analyzer, USA were assessed. Measurement of gas exchange parameters was carried out in laboratory conditions at a constant temperature of 24 °C and constant lighting 2 × 18 W/840. Gas exchange parameters have been marked in accordance with the manufacturer instruction: “using infrared gas analysis techniques, where CO₂ concentration was determined with an accuracy of 1 ppm. The TPS-2 passes a measured flow of air over a leaf sealed into a chamber called the “leaf cuvette”. Using a “gas switching” technique, the TPS-2 first samples the CO₂ and H₂O of the air going to the cuvette (reference) and then the air leaving the cuvette (analysis). From the flow rate and the change in concentrations, the assimilation rate of CO₂ and transpiration rate of water can be determined. This technique is commonly referred to as the “open” system method of measurement and is the method employed by the TPS-2. Designed for use under the most demanding field conditions (high temperature and humidity, dust), the system is equipped with an internal, hydrophobic filtering system ensuring that all internal parts are fully protected. The TPS-2 is a high-precision instrument. It features a single, non-dispersive infrared gas analyzer for accurate measurement of CO₂. The gas analyzer includes an infrared source, a gold-plated and highly polished sample cell and detector. The analyzer acts as an absorptiometer measuring only in the 4.26 µm waveband ensuring accurate, rapid and stable CO₂ results. The optical bench is thermostatted and completely insulated to ensure accurate measurements under changing ambient temperatures. The enzymatic activity of acid (pH = 6.0) and alkaline (pH = 7.5) phosphatases (Knypl and Kabzińska 1977), RNase (Knypl and Kabzińska 1977) (using the UVmini-1240 Shimadzu spectrophotometer) were measured. Phosphatase 8 mM *p*-nitrophenylphosphate in glycine-maleate-Tris-citrate buffer was used as a substrate for phosphatase assay at pH 6.0 and 7.5 (as measured in a whole assay mixture at 30 °C) The assay mixture contained 0.1, 0.2 and 0.5 ml eluate in a final volume of 1.5 ml. Reaction was allowed to proceed for 20 min at 30 °C and stopped

by adding 1.0 ml of 0.3 N NaOH. Absorbance at 404 nm was read and corrected for blanks into which NaOH solution was added before the eluate. The phosphatase activity is expressed as $\Delta A_{404} \text{ nm (0.5 ml eluate)}^{-1}$ per an equivalent of fresh weight of tissue, or per such a volume of nutrient medium which was equivalent to 1 g of floating plants at the very time of analyses. Phosphatase activity in crude nutrient media is expressed as $\Delta A_{404} \text{ nm (0.2 ml eluate)}^{-1}$. RNase 0.1 ml of highly polymerized RNA was mixed with 0.1 ml of 0.1 M citrate buffer (pH 6.0), and 0.1 ml of eluate. Reaction was allowed to proceed for 60 min at 30 °C, then stopped by adding 3.0 ml of magnesium–lanthanum precipitating reagent (Ambellan and Hollander 1966). Absorbance at 260 nm was read and values of A 260 nm corrected for 11-fold dilution with the precipitating reagent and for to blanks into which enzyme was added after the precipitating reagent. RNase activity is expressed as $\Delta A_{260} \text{ nm (0.1 ml eluate)}^{-1}$ per equivalent of g fresh weight. The integrity of cytoplasmic membranes was determined using a conductivity meter (CC-551 Elmetron) (Górník et al. 2002).

Results

The obtained test results confirmed the positive effect of the *Navicula* sp. monoculture mixture on the growth and development of energy plants of all three species. The substances used accelerated growth, which was expressed by greater height, they improved quality of plants and biomass yield as well as their metabolic activity.

The conducted experiment showed that treating plants with the mixture of diatom monocultures positively affected the growth of energy plants (Figs. 1, 2, 3). The use of the biostimulator increased the plant height compared to the control sample by 12–25%. In the variant carried out in the phytotron room, all three plants were characterized by better growth and higher resistance to adverse temperature conditions. It was shown that the most optimal form of application of the tested biostimulator in the form of diatom extract (15% higher) was simultaneous watering and spraying of plants.

A positive effect of the *Navicula* sp. monoculture extract was also observed in the greenhouse plant cultivation variants (with variable weather-dependent temperature and variable soil humidity 20–60% (simulation of drought and flooding) (Fig. 2) and in completely weather-dependent conditions—in field (3). Analyzing the dynamics of plant growth, it was indicated that simultaneous watering and foliar application (spraying) with the sonicated diatom extract accelerated the growth and development of the tested energy plant species compared to the control series (15% more favorable growth), a slightly weaker effect was obtained in the other variants, i.e., watering alone (increase

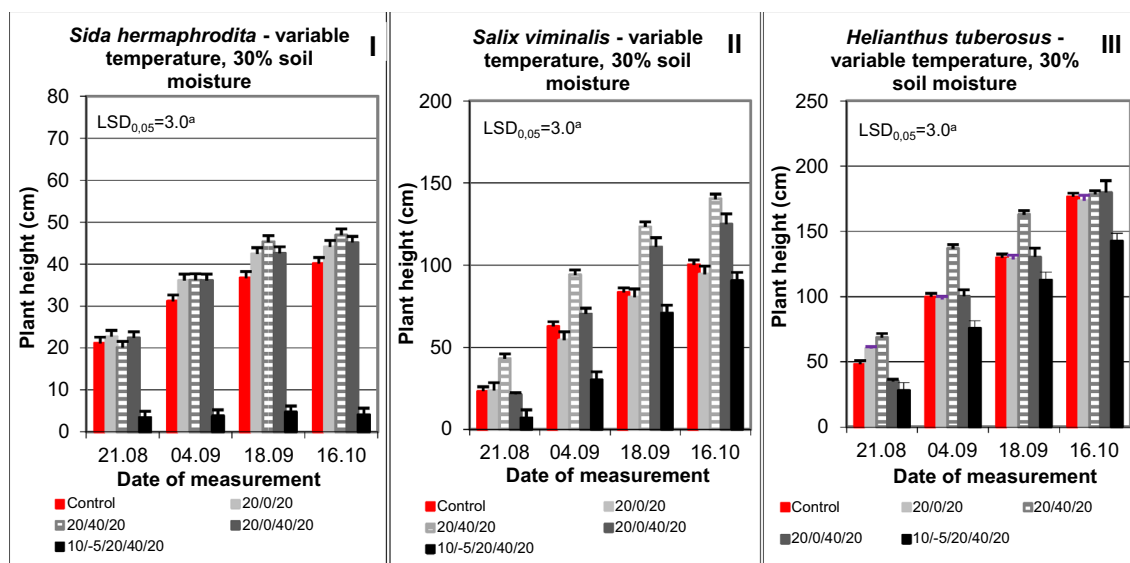


Fig. 1 Growth dynamics of plants (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*), (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in a phytotron room with variable temperature and constant soil humidity. Diatom monoculture extract applied in the form of watering and spraying every 3 weeks. Variable temperature: 20/0/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered three times every 14 days to 0 °C for 24 h; 20/40/20 °C—plants grown at 20 °C were raised three times to 40 °C for 24 h every

14 days; 20/0/40/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered to 0 °C twice for 24 h after 14 and 42 days of cultivation and one temperature increase to 40 °C for 24 h on the 28th day of the experiment; 10/-5/20/40/20 °C—the plants for the first 14 days of the experiment were grown at 10 °C, then the temperature was lowered to -5 °C for 24 h, for the next 42 days, the plants were grown at 20 °C, meanwhile, the 28th day the temperature was raised to 40 °C for 24 h

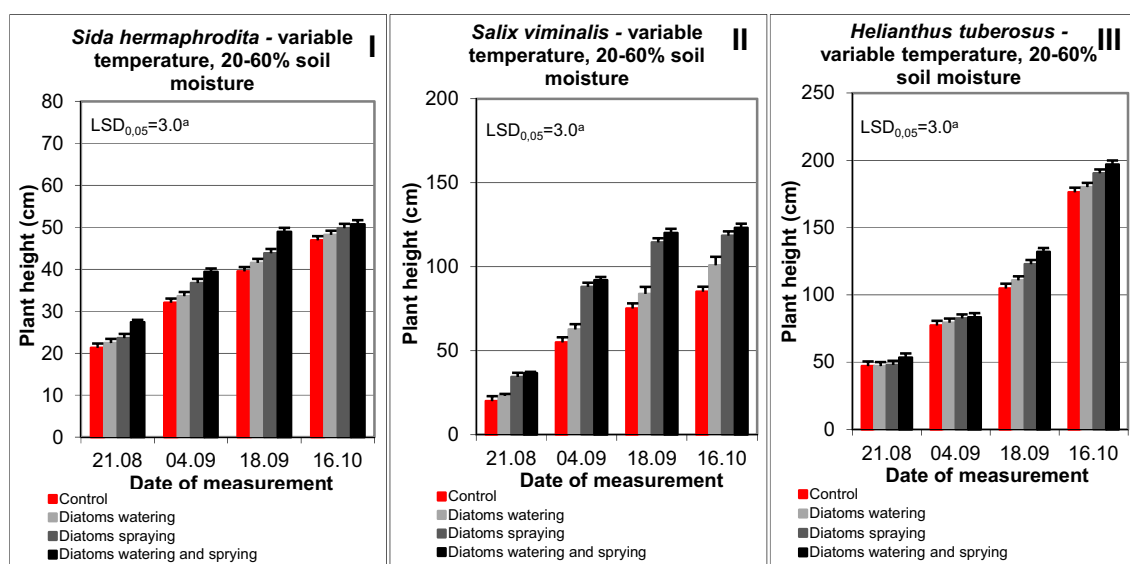


Fig. 2 Growth dynamics of plants (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in a greenhouse with vari-

able temperature (depending on weather) and variable soil moisture 20–60% (drought and flooding). A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks

by 5%), foliar application (increase by 7%). It was also found that the plants treated with the diatom mixture were characterized by higher resistance to adverse environmental conditions, showed much less sensitivity to stress factors (every 3 weeks drought alternating with flooding).

A beneficial effect of the extract based on diatoms was also observed during the analysis of the physicochemical parameter—chlorophyll content index (CCI). Plants grown in different temperature conditions compared to the control series were characterized by a higher content of chlorophyll

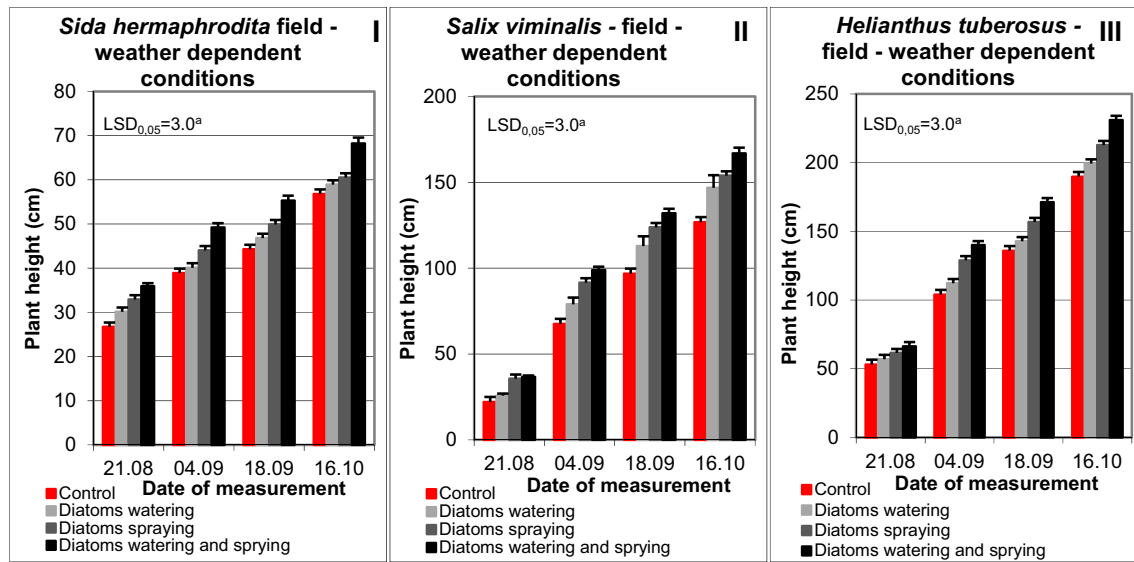


Fig. 3 Growth dynamics of plants (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in field conditions with variable

temperature and variable soil moisture. A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks

in the leaves (Fig. 4). Similarly to the analysis of growth dynamics, the CCI index was the highest in the series of plants treated with the mixture by both watering and spraying (Figs. 5, 6). The plants were characterized by a faster and more decisive response to stressors—sudden and

extreme temperature changes as well as extreme drought and flooding.

The consequence of the beneficial effect of the *Navicula* sp. monoculture extract on the tested plant species was the increase in the integrity of cytoplasmic membranes, which

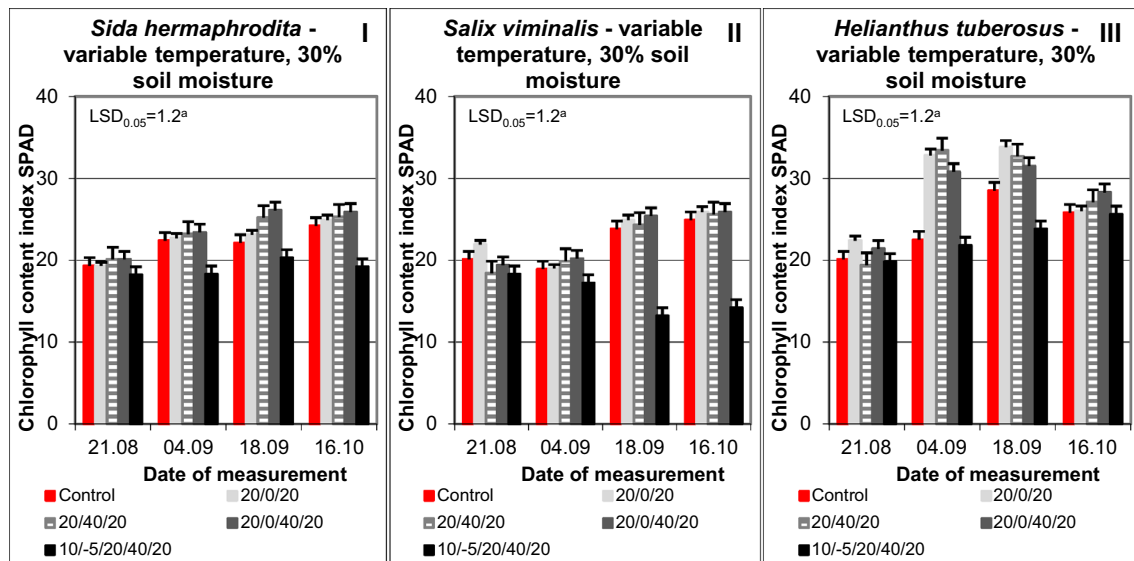


Fig. 4 Index of chlorophyll content in the leaves of (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in a phytotron room with variable temperature and constant soil humidity. A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks. Variable temperature: 20/0/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered three times every 14 days to 0 °C for 24 h; 20/40/20 °C—plants grown at 20 °C were raised three times to 40 °C

for 24 h every 14 days; 20/0/40/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered to 0 °C twice for 24 h after 14 and 42 days of cultivation and one temperature increase to 40 °C for 24 h on the 28th day of the experiment; 10/-5/20/40/20 °C—the plants for the first 14 days of the experiment were grown at 10 °C, then the temperature was lowered to -5 °C for 24 h, for the next 42 days, the plants were grown at 20 °C, meanwhile, the 28th day the temperature was raised to 40 °C for 24 h

was demonstrated by the outflow of smaller amounts of electrolytes from tissues. Unfavorable conditions for plant development, such as high and low temperatures, significantly increase the permeability of cell membranes. Measurements in the experimental variant carried out in variable temperature in the phytotron room indicated a beneficial effect of diatom extract on plant tissues (Fig. 7). Compared with the control series, plants grown under high-temperature conditions had a lower degree of

cytoplasmic membrane integrity, which was demonstrated by electrolyte leakage both after 2 h and 4 h. The same relationship was confirmed in the variants grown in the greenhouse (Fig. 8) and in the field (Fig. 9). All three plant species tested, Virginia mallow, willow and Jerusalem artichoke were characterized by lower (by 10%) leakage of electrolytes from tissues compared to the control sample, which proves the increased integrity of cytoplasmic membranes.

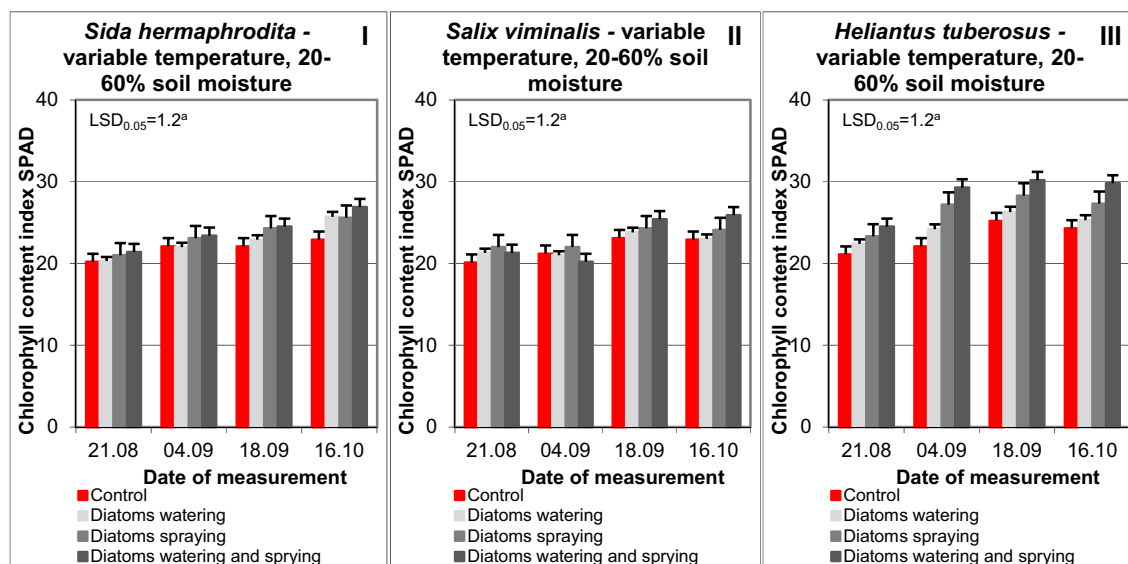


Fig. 5 Index of chlorophyll content in the leaves of (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in a greenhouse with a

variable temperature (depending on weather) and variable soil moisture 20–60% (drought and flooding). A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks

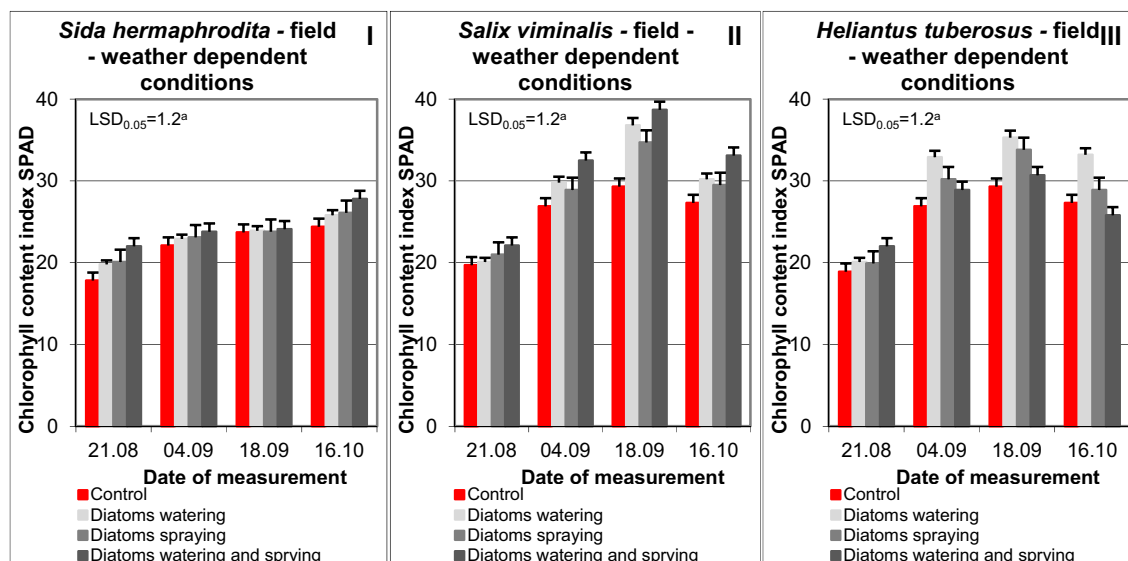


Fig. 6 Index of chlorophyll content in the leaves of (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in field conditions

with variable temperature and variable soil moisture. A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks

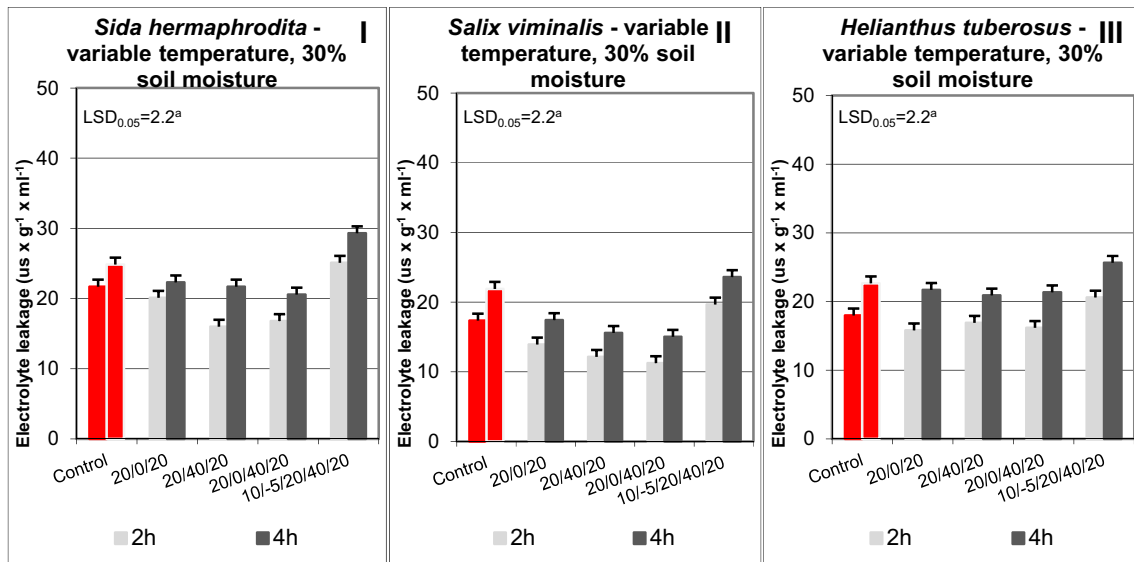


Fig. 7 Electrolyte leakage from the leaves of (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in a phytotron room with variable temperature and constant soil humidity. A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks. Variable temperature: 20/0/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered three times every 14 days to 0 °C for 24 h; 20/40/20 °C—plants grown at 20 °C were raised three times to 40 °C

for 24 h every 14 days; 20/0/40/20 °C—plants grown at 20 °C were lowered to 0 °C twice for 24 h after 14 and 42 days of cultivation and one temperature increase to 40 °C for 24 h on the 28th day of the experiment; 10/-5/20/40/20 °C—the plants for the first 14 days of the experiment were grown at 10 °C, then the temperature was lowered to -5 °C for 24 h, for the next 42 days the plants were grown at 20 °C, in meanwhile the 28th day the temperature was raised to 40 °C for 24 h

Increased plant development was also the consequence of the increased activity of enzymes responsible for the regulation of phosphorus management—acid (APs) and alkaline phosphatases (ALP), as well as RNase (enzymes responsible for breaking down phosphodiester bonds

in ribonucleic acids into mono- and oligonucleotides) (Table 2). The results of the analyzes indicated that in the plants treated with the diatom extract biochemical activity was by 25% higher compared to the control series.

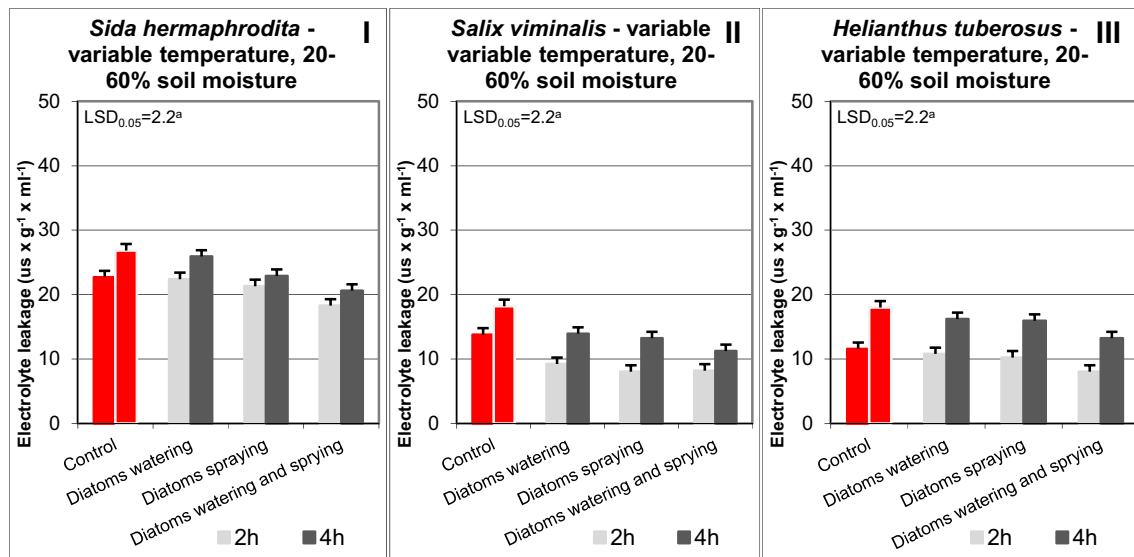


Fig. 8 Electrolyte leakage from the leaves of (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in a greenhouse with

variable temperature (depending on weather) and variable soil moisture 20–60% (drought and flooding). A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks

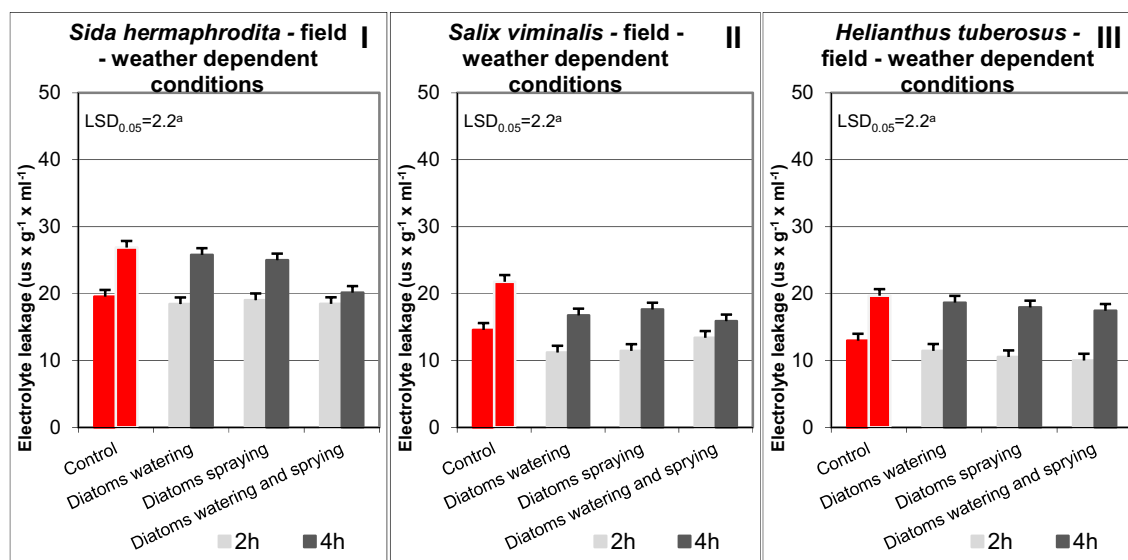


Fig. 9 Electrolyte leakage from the leaves of (I) Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), (II) willow (*Salix viminalis*) and (III) Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in field conditions with

variable temperature and variable soil moisture. A mixture of diatom monocultures applied in the form of watering and spraying every 3 weeks

Table 2 Physiological activity in the leaves of Virginia mallow (*Sida hermaphrodita*), willow (*Salix viminalis*) and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) grown in conditions of changing soil tempera-

ture and humidity with every 3 weeks of application with a mixture of diatom monocultures

Experimental variant	APs (pH 6.0), U/g f.w	ALP (pH 7.5), U/g f.w	RNase mU/g f.w	APs (pH 6.0), U/g f.w	ALP (pH 7.5), U/g f.w	RNase mU/g f.w	APs (pH 6.0), U/g f.w	ALP (pH 7.5), U/g f.w	RNase mU/g f.w
Variable temperature, 30% soil moisture									
	<i>Sida hermaphrodita</i>			<i>Salix viminalis</i>			<i>Helianthus tuberosus</i>		
Control	0.5cd	0.15b	3.1c	0.5cd	0.15b	3.0c	0.6dc	0.2d	4.1c
20/0/20 °C	0.6bc	0.2b	2.2b	0.65b	0.2a	3.2b	0.5ba	0.3b	3.2a
20/40/20 °C	1.3h	0.3e	5.3e	0.7h	0.5e	5.2e	1.6de	0.5e	6.3d
20/0/40/20 °C	0.7de	0.3b	3.2c	1.2de	0.3b	3.8c	0.9bd	0.45d	4.2b
10/-5/20/40/20 °C	0.2a	0.05a	0.7a	0.1a	0.05a	0.04a	0.15a	0.05a	0.8a
Variable temperature, 20–60% soil moisture									
Control	0.6bc	0.2b	1.9c	0.9cd	0.5c	5.3d	0.7cd	0.3b	5.1c
Diatoms watering	0.5ef	0.2c	2.2c	0.8b	0.6a	5.8b	1.3b	0.4c	4.7c
Diatoms spraying	0.8ab	0.25b	3.2f	0.8ef	0.3c	4.8d	2.1ef	0.3e	4.7f
Diatoms watering and spraying	1.0a	0.4a	3.2g	1.2dc	1.2c	5.1c	2.2a	1.2b	5.6c
Field—weather-dependent conditions									
Control	0.5cd	0.25c	3.0d	1.3bc	1.3b	5.2c	0.9bc	0.4b	4.3c
Diatoms watering	0.8b	0.3f	3.1c	0.9ef	1.5e	4.9f	1.4ef	0.6d	5.1d
Diatoms spraying	0.8c	0.2bc	3.9b	1.4ef	1.4e	4.3f	1.1ed	1.05e	5.5d
Diatoms watering and spraying	0.75ef	0.4fg	4.1f	1.3f	0.9c	5.8c	1.2 g	0.9c	6.05c
LSD _{0.05}	0.9	0.09	0.9	0.1	0.1	0.9	0.2	0.1	0.9

^aMeans marked with the same letters within individual columns do not differ significantly according to Duncan's test at significance level $p=0.05$

The applied extract from *Navicula* sp. monocultures had a positive effect on the gas exchange process in the tissues of the tested plant species (Tables 3, 4 and 5). Analysis of individual parameters using modern equipment (TPS-2-PP Systems analyzer, USA) proved the relationship between the form of application of the tested stimulator and increased values of net photosynthesis [$\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], transpiration [$\text{mmol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], stomatal conductivity [$\text{mmolH}_2\text{O}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$] and lower intercellular CO_2 content [$\mu\text{molCO}_2/\text{mol} \cdot \text{air}$]. Simultaneous watering and application in the form of an aerosol caused the best effect compared to the control series in all variants of the experiment. High indices of individual gas exchange parameters translated directly into better vigor of plants and increased biomass yield.

The methods used in the experiment and the analysis of the physiological and biochemical activity of plants are widely used and recognized as tools to obtain useful markers of metabolic processes which are also recommended as indicators of plant responses to external stimuli, in particular responses to stressors caused by adverse climatic conditions.

Discussion

The experiment and analysis of individual physicochemical parameters confirmed the legitimacy of using the mixture of *Navicula* sp. monocultures in energy crops, both in optimal and unfavorable conditions, characterized by extreme temperatures and soil moisture. The scale of the positive effect depended on the form of application of the tested preparation. The preparation used significantly alleviated the symptoms of environmental stress and increased plant metabolic activity, which translated into higher biomass. The high content of silicon and other necessary macro- and micronutrients found in the diatom cells can directly translate into faster growth and development of cultivated plants (Kaya et al. 2006). Research to date has shown a large variety of biologically active substances and a high content of antioxidant compounds found in the diatom cells (Fimbres-Olivarria et al. 2018). Foliar application and direct watering of plants with the mixture of monocultures at the same time caused faster plant growth, intensified plant gas exchange processes, had a positive effect on water and enzymatic management, and improved the absorption of nutrients from soil. All of the above-mentioned effects contributed to obtaining higher plant biomass. In addition, due to the influence of natural stimulators on a number of metabolic processes, the

Table 3 Gas exchange in the leaves of *Sida hermaphrodita* grown under of changing temperature and soil moisture (every 3 weeks application of diatom extract)

<i>Sida hermaphrodita</i>				
Experimental variant	Netto photosynthesis [$\text{mmol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$]	Transpiration [$\text{mmol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$]	Stomatal conductance [$\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$]	Concentration intercellular CO_2 [$\mu\text{mol CO}_2 / \text{mol air}$]
Variable temperature, 30% soil moisture				
Control	4.1cd ^a	1.29c	456c	296d
20/0/20 °C	4.2b	1.02b	378b	322e
20/40/20 °C	5.3 g	1.62e	564e	276bc
20/0/40/20 °C	4.0bc	1.34c	478cd	324de
10/−5/20/40/20 °C	3.2a	0.22a	59a	54a
Variable temperature, 20–60% soil moisture				
Control	4.3cd	1.32c	451c	288d
Diatoms watering	4.3b	1.30b	441c	287d
Diatoms spraying	4.4e	1.43e	452e	292d
Diatoms watering and spraying	4.5f	1.54e	477ef	298f
Field—weather-dependent conditions				
Control	4.2fg	1.45g	438g	284g
Diatoms watering	4.2e	1.40bc	411e	267e
Diatoms spraying	4.3bc	1.38de	422d	271e
Diatoms watering and spraying	4.4e	1.35f	438g	284g
LSD _{0.05}	0.2	0.05	33	21

^aMeans marked with the same letters within individual columns do not differ significantly according to Duncan's test at significance level $p=0.05$

Table 4 Gas exchange in the leaves of *Salix viminalis* grown under of changing temperature and soil moisture (every 3 weeks application of diatom extract)

<i>Salix viminalis</i>				
Experimental variant	Netto photosynthesis [mmol/m ² s]	Transpiration [mmol/m ² s]	Stomatal conductance [mmol H ₂ O/m ² s ⁻¹]	Concentration intercellular CO ₂ [μmol CO ₂ / mol air]
Variable temperature, 30% soil moisture				
Control	4.0cd ^a	1.24c	446d	287d
20/0/20 °C	4.1b	1.08bc	388c	342c
20/40/20 °C	4.8e	1.68d	584d	226bc
20/0/40/20 °C	3.1f	1.37e	488e	314c
10/−5/20/40/20 °C	3.1a	0.22a	51a	51a
Variable temperature, 20–60% soil moisture				
Control	4.1cd	1.42d	441d	298c
Diatoms watering	4.1e	1.37d	431d	281bc
Diatoms spraying	4.2de	1.33f	462f	289ef
Diatoms watering and spraying	4.5f	1.44e	467e	271b
Field—weather-dependent conditions				
Control	4.1cd	1.35d	428c	294c
Diatoms watering	4.1e	1.30d	416d	281c
Diatoms spraying	4.2f	1.25cd	432d	279c
Diatoms watering and spraying	4.4ef	1.32e	448e	274d
LSD _{0.05}	0.2	0.06	31	19

^aMeans marked with the same letters within individual columns do not differ significantly according to Duncan's test at significance level $p=0.05$

Table 5 Gas exchange in the leaves of *Helianthus tuberosus* grown under of changing temperature and soil moisture (every 3 weeks application of diatom extract)

<i>Helianthus tuberosus</i>				
Experimental variant	Netto photosynthesis [mmol/m ² s]	Transpiration [mmol/m ² s]	Stomatal conductance [mmol H ₂ O/m ² s ⁻¹]	Concentration intercellular CO ₂ [μmol CO ₂ / mol air]
Variable temperature, 30% soil moisture				
Control	4.2cd ^a	1.49c	446c	301e
20/0/20 °C	4.2b	1.12a	387b	312bc
20/40/20 °C	4.9g	1.52e	490c	256b
20/0/40/20 °C	4.2bc	1.64e	468cd	334d
10/−5/20/40/20 °C	3.1a	0.29a	56a	51a
Variable temperature, 20–60% soil moisture				
Control	4.2cd	1.42c	459c	298d
Diatoms watering	4.3a	1.36b	451bc	297de
Diatoms spraying	4.4bc	1.53c	442d	272b
Diatoms watering and spraying	4.5f	1.64c	467d	278bc
Field—weather-dependent conditions				
Control	4.1cd	1.35c	458c	294d
Diatoms watering	4.2b	1.45b	451d	277bc
Diatoms spraying	4.1e	1.48d	442b	281d
Diatoms watering and spraying	4.4f	1.39bc	448bc	294e
LSD _{0.05}	0.3	0.06	35	25

^aMeans marked with the same letters within individual columns do not differ significantly according to Duncan's test at significance level $p=0.05$

plants respond with a much lower oxidative stress, as confirmed by (Anyszka et al. 2008; Gawrońska et al. 2008). The use of a mixture of diatoms in modern, innovative economy can become an alternative and significantly reduce the use of chemical fertilizers that are harmful to the environment (Simental et al. 2003). Low production costs are another aspect that indicates the legitimacy of using sonicated diatom cells as natural biostimulants. In 1992, McAnally-Salas et al. (1992) in their research showed that the production of diatomaceous fertilizers compared to standard conventional fertilizers can be cheaper by almost 98%. Valenzuela-Espinoza (1997) came to similar conclusions, his natural agricultural preparation had eight times lower production costs.

The conducted experiment confirmed the legitimacy of the use of diatomaceous extracts and their beneficial effect on the growth, development and physiological activity as well as vigor of energy plants in adverse conditions of climate change. Such pro-ecological activities create a chance to significantly reduce chemical fertilizers dangerous for the environment and humans, while reducing the production costs of energy crops.

Conclusion

The obtained results confirmed the positive effect of the diatom monoculture extract on the growth and development of the cultivated plants. The analyzed physicochemical parameters were 15–20% higher in comparison with the control sample. The extract used stimulated plant growth and development, which was confirmed by their increased height and biomass yield as well as metabolic activity. The use of natural extracts from *Navicula* sp. diatoms as plant growth stimulants can be an alternative to chemical fertilizers and is considered one of the promising strategies in organic and integrated plant cultivation.

Author contributions statement KP was responsible for investigations and writing the original draft and editing of the manuscript; ZRD was responsible for review and editing of the manuscript; KP, ZRD, BM were responsible for methodology; KP was responsible for formal analysis; KP was responsible for visualization of figures and tables; ZRD was responsible for the resources, supervision; KP, ZRD, BM, were responsible for review and editing of the manuscript.

Acknowledgements This study was supported by by National Science Center Grant No N305 322035.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Abd El Baky H, Hanaa El Baz KF, EL-Latife SA (2013) Induction of sulfated polysaccharides in *Spirulina platensis* as response to nitrogen concentration and its biological evaluation. J Aquacult Res Dev 5(1):18. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000206>
- Abro SA, Qureshi R, Soomro FM, Mirbahar AA, Jakhar GS (2009) Effects of silicon levels on growth and yield of wheat in silty loam soil. Pak J Botany 41(3):1385–1390
- Allen AE, Dupont ChL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR (2011) Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. Nature 473:203–207. <https://doi.org/10.1038/nature10074>
- Ambellan E, Hollander VP (1966) A simplified assay for RNase activity in crude tissue extracts. Analytical Biochem 17:474–484. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90182-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90182-5)
- Anyszka Z, Dobrzański A, Pałczyński J (2008) The reaction onions and carrots on biostimulant Asahi SL used with herbicides. Conf Biostimulators in Modern Crop Production. Warsaw, Poland
- Broda M, Królikowska-Pataraja K (2015) Diatoms: beauty in micro-scale. Aura 12:8–10. <https://doi.org/10.15199/2.2015.12.1>
- Descy JP, Coste M (1991) A test of methods for assessing water quality based on diatoms. Verh Internat Verein Theor Angew Limnol 24:2112–2116
- Farooq MA, Dietz KJ (2015) Silicon as versatile player in plant and human biology: overlooked and poorly understood. Front Plant Sci 6(2015):1–14
- Fimbres-Olivarria D, Carvajal-Millan E, Lopez-Elias JA, Martinez-Robinson KG, Miranda-Baeza A, Martinez-Cordova LR, Enriquez-Ocaña F, Valdez-Holguina JE (2018) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Navicula* sp. Food Hydrocolloids 75:229–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.002>
- Gawrońska H, Przybysz A, Słowiński A (2008) Biological basis of action biostimulant Asahi SL. Conf. Biostimulators in Modern Crop Production. Warsaw, Poland
- Górník K, Grzesik M (2002) Effect of Asahi SL on China aster 'Aleksandra' seed yield, germination and some metabolic events. Acta Physiol Plant 24:379–383. <https://doi.org/10.1007/s11738-002-0033-5>
- Grzesik M, Romanowska-Duda Z (2014) Improvements in Germination, growth and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with cyanobacteria and microalgae. Polish J Environ Studies 23(4):1147–1153
- Grzesik M, Romanowska-Duda Z, Piotrowski K, Janas R (2015) Diatoms (*Bacillariophyceae*) as an effective base of a new generation of organic fertilizers. Przem Chem 94(3):391–396. <https://doi.org/10.15199/62.2015.3.27>
- Jungandreas A, Costa BS, Jakob T, Von Bergen M, Baumann S, Wilhelm C (2014) The acclimation of *Phaeodactylum tricornutum*

- to blue and red light does not influence the photosynthetic light reaction but strongly disturbs the carbon allocation pattern. *PLoS ONE* 9(8):4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099727>
- Karthikeyan P, Manimaran K, Sampathkumar P, Jaikumar M, Robin RS, Saravanakumar C, Sureshkumar C (2013) In Vitro antioxidant activity of marine diatoms. *OSR J Environ Sci Toxicol Food Technol* 5(2):32–37 (e-ISSN: 2319-2402, p-ISSN: 2319-2399)
- Kaya C, Tuna L, Higgs D (2006) Effect of silicon on plant growth and mineral nutrition of maize grown under water-stress conditions. *J Plant Nutr* 29(8):1469–1480. <https://doi.org/10.1080/01904160600837238>
- Knypl JS, Kabzinska E (1977) Growth phosphatase and ribonuclease activity in phosphate – deficient *Spirodela oligorrhiza* cultures. *Biochem Physiol Pflanzen* 171:279–287
- Kwandrans J, Eloranta P, Kawecka B, Wojtan K (1998) Use of benthic diatom communities to evaluate water quality in rivers of southern Poland. *J Appl Phycol* 10:193–201
- McAnally-Salas LS, Ocampo-Aranda F, Garc a-Pa manes LE (1992) Efecto de la microalga *Pavlova lutheri* (Droop) cultivada con fertilizantes agr colas en el crecimiento y supervivencia de larvas y postlarvas del mejill n *Mytilus edulis* (L). *Ciencias Marinas* 18:57–74
- Meena VD, Dotaniya ML, Coumar V, Rajendiran S, Kundu S, Rao AS (2014) A case for silicon fertilization to improve crop yields in tropical soils. *Proc Natl Acad Sci Ind Sec Biol Sci* 84(4):505–551
- Noga T, Stanek-Tarkowska J, Paj czek A, Peszek  , Kochman N (2013) Ecological characteristics the diatoms of river Wis ok using their role of indicators for assessing water quality. *J Ecol Eng* 14(3):18–27
- Peszek  , Noga T, Stanek-Tarkowska J, Paj czek A, Kochman N (2014) Rola bioindykacyjna i biologia okrzemek (*Bacillariophyceae*) Bioindication role and biology of diatoms (*Bacillariophyceae*). *Acta Carpathica* 12:41–47
- Piotrowski K, Romanowska-Duda ZB, Grzesik M (2016) How Biojodis and *Cyanobacteria* alleviate the negative influence of predicted environmental constraints on growth and physiological activity of corn plants. *Pol J Environ Stud* 25(2):741–751. <https://doi.org/10.15244/pjoes/60894>
- Prygiel J, Coste M (1993) The assessment of water quality in the Artois-Picardie water basin (France) by the use of diatom indices. *Hydrobiol* 269(279):343–349
- Rakowska B (2003) Okrzemki – organizmy, kt re odnios y sukces. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych* 52:307–314
- Romanowska-Duda Z, Grzesik M, Owczarczyk A, Mazur-Marzec H (2010) Impact of intra and extracellular substances from *Cyanobacteria* on the growth and physiological parameters of grapevine (*Vitis vinifera*) 20th Int. Conf. Plant Growth Substance (IPGSA), Book of abstracts July 28 – August 2. University Rovira and Virgili, Tarragona, Spain
- Romanowska-Duda Z, Grzesik M, Janas R (2019) Maximal efficiency of PSII as a marker of sorghum development fertilized with waste from a biomass biodigestion to methane. *Front Plant Sci* 1920(9):1920. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01920>
- Round FE (1990) The diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press, Cambridge
- Round TE, Crawford RM, Mann DG (1992) The Diatoms – biology and morphology of the genera Cambridge University Press. *Syst Biol* 41(1):125–126. <https://doi.org/10.1093/sysbio/41.1.125>
- Simental JA, S nchez-Saavedra MP (2003) The effect of agricultural fertilizer on growth rate of benthic diatoms. *Aquacult Eng* 27(4):265–272. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00087-0)
- Sommer M, Kaczorek D, Kuzyakov Y, Breuer J (2006) Silicon pools and fluxes in soils and landscapes. *J Plant Nutr Soil Sci* 169(3):310–329
- Valenzuela-Espinoza E (1997) Uso de un medio alterno al ‘f/2’ para el cultivo de *Isochrysis aff Galbana* (clone t-ISO). M. Sc. Thesis, Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Auto noma de Baja California Ensenada, Baja California, Mexico
- Witkowski A, B k M, Wojtal A,  elazna-Wieczorek J (2006) Systematyka i ekologia okrzemek – (*Bacillariophyceae*, *Diatomophyceae*). *G ówny Inspektorat Ochrony  rodowiska* 4:1–19

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Acquisition of Torrefied Biomass from Jerusalem Artichoke Grown in a Closed Circular System Using Biogas Plant Waste

Szymon Szufa ^{1,*}, Piotr Piersa ¹, Łukasz Adrian ¹, Jan Sielski ², Mieczysław Grzesik ³, Zdzisława Romanowska-Duda ⁴, Krzysztof Piotrowski ⁴ and Wiktoria Lewandowska ⁵

¹ Faculty of Process and Environmental Engineering, Lodz University of Technology, Wolczanska 213, 90-924 Lodz, Poland; piotr.piersa@p.lodz.pl (P.P.); lukasz.adrian@p.lodz.pl (Ł.A.)

² Department of Molecular Engineering, Lodz University of Technology, Wolczanska 213, 90-924 Lodz, Poland; jan.sielski@p.lodz.pl

³ Department of Variety Studies, Nursery and Gene Resources, Research Institute of Horticulture, Str. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Poland; mieczyslaw.grzesik@inhort.pl

⁴ Department of Plant Ecophysiology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Str. Banacha 12/16, 92-237 Lodz, Poland; zdzislawa.romanowska@biol.uni.lodz.pl (Z.R.-D.); k_piotrow@o2.pl (K.P.)

⁵ Faculty of Chemistry, University of Lodz, Tamka 12, 91-403 Lodz, Poland; wiktoria.lewandowska.uni.lodz@gmail.com

* Correspondence: szymon.szufa@p.lodz.pl; Tel.: +48-606-134-239

Academic Editor: Alejandro Rodríguez and Eduardo Espinosa

Received: 31 July 2020; Accepted: 23 August 2020; Published: 25 August 2020

Abstract: The aim of the research was to investigate the effect of biogas plant waste on the physiological activity, growth, and yield of Jerusalem artichoke and the energetic usefulness of the biomass obtained in this way after the torrefaction process. The use of waste from corn grain biodigestion to methane as a biofertilizer, used alone or supplemented with Apol-humus and Stymjod, caused increased the physiological activity, growth, and yield of Jerusalem artichoke plants and can limit the application of chemical fertilizers, whose production and use in agriculture is harmful for the environment. The experiment, using different equipment, exhibited the high potential of Jerusalem artichoke fertilized by the methods elaborated as a carbonized solid biofuel after the torrefaction process. The use of a special design of the batch reactor using nitrogen, Thermogravimetric analysis, Differential thermal analysis, and Fourier-transform infrared spectroscopy and combustion of Jerusalem artichoke using TG-MS showed a thermo-chemical conversion mass loss on a level of 30% with energy loss (torgas) on a level of 10%. Compared to research results on other energy crops and straw biomass, the isothermal temperature of 245 °C during torrefaction for the carbonized solid biofuel of Jerusalem artichoke biomass fertilized with biogas plant waste is relatively low. An SEM-EDS analysis of ash from carbonized Jerusalem artichoke after torrefaction was performed after its combustion.

Keywords: torrefaction; Jerusalem artichoke; biofuel; energy crops; agriculture

1. Introduction

One of the greatest global problems is increasing energy consumption, which, in the face of the need to limit the use of fossil fuels, forces the development of crops that will produce the maximum yield of biomass, which could be converted into energy fuel using modern technologies [1]. For this

reason, research is necessary to select plants having a high potential of biomass and energy yield on poor soils and to develop plant cultivation technologies that, in addition to high biomass yield and energy efficiency, will be conducive to the environment by reducing the use of chemistry in agricultural production and will strengthen energy security [2].

Compared to other renewable energy sources, biomass provides continuous electricity generation, and is the only widespread source of renewable heat. Biomass co-firing and biomass combustion will contribute to the reduction of CO₂ and SO₂ emissions, support sustainable development, and increase energy security and regeneration of rural areas, due to the increase of forestry and agricultural activity and the provision of heat and electrical energy production. To increase the biomass share up to a 30% or even 40% caloric value, the biomass particles must be milled down to sizes where high caloric values can be expected. There are many different biomass pre-treatment methods that can be used to convert it into more coal-like matter. There are a number of barriers to overcome in order to expand the exploitation of biomass for heat and electricity production. One of them concerns the limitations connected to biomass fuel characteristics [3–5].

When coal is compared with wood biomass, which are both still the dominant solid fuels in heat and electricity production in Poland, the inferior properties of biomass are often revealed. Wood biomass fuel has in most cases a high moisture content, resulting in storage complications, such as self-heating and biological degradation, and lower energy densities. It is also a bulkier fuel (with poorer transportation and handling characteristics), and it is more tenacious (the fibrous nature of biomass makes it difficult to reduce it to small homogeneous particles). The biomass properties mentioned above have negative impacts during energy thermal conversion, such as gasification and lower combustion and co-firing efficiencies [6].

Among the methodologies that can be applied to improve the properties of plant biomass and make it a more coal-like material, torrefaction (biomass carbonization) seems to provide many advantages. Carbonization, or torrefaction, is a thermal degradation of biomass structures, which occurs by heating them without air contact under atmospheric pressure. It removes low-weight organic volatile components and moisture as well as depolymerizes the long polysaccharide chains of biomass. This kind of process of wood carbonization is quite a complex research subject due to the fact that wood contains different fractions. Wood cells are built from microfibrils, bundles of cellulose molecules 'coated' with hemicellulose. Another component of wood biomass is lignin, which is deposited between microfibrils and in some types of biomass in the amorphous regions of the microfibril. All of those three fractions exhibit different thermal behavior [7]. The product of torrefaction is a hydrophobic solid fuel with greatly increased grindability and energy density (on a mass basis). More importantly, the energy requirement for processing the torrefied biomass decreases and it no longer requires additional separate handling facilities when we co-combust new fuel with coal in operating power plants. It is suggested that torrefied biomass can be compacted into high-grade pellets with substantially superior fuel properties compared with standard wood pellets from un-treated biomass. The carbonization process can be combined together with the drying and pelletization process, with both energy and economical benefits. The biomass torrefaction process has proved suitable for feedstock for flow gasification, which has not been considered feasible before for raw biomass. This is due to the fact that carbonized biomass forms more solid fuel spherical-shaped particles during milling or grinding than raw biomass. To produce high caloric value carbonized solid biofuel, which will have a reasonable price (lower torrefaction process costs can be achieved by using superheated steam), with better physical-chemical properties before thermo-chemical conversion, such as a hydrophobic nature, low moisture content, and better grindability, several process conditions have to be optimal. These include a 30% loss of the mass and 10% loss in energy in volatile matter plus a low as possible temperature and residence time in the reactor, which can ensure successful sale on the Polish and European market.

Important parameters in the choice of highly efficient plant species for energy and torrefaction purposes comprise their physiological properties, decisive for high biomass yield and the amount of energy obtained. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) meets these requirements and it is well adapted to the conditions of central Europe. The biomass of this species is an important raw material

for the production of bioethanol, for burning to obtain heat energy, and is widely used in the feed, food, and medical industries [8–10].

A serious problem in the production of energy plants is the excessive use of artificial fertilizers and pesticides, which pollute the environment. There is a resulting need to decrease their volume without reducing the yield potential. Replacement of chemical fertilization by natural fertilizers, including waste from biogas plants, seems to be one of the ways to address this problem. Due to the fact that this waste contains the majority of nutrients necessary for plant growth, it seems that their use in agriculture can support soil fertilization. At the same time, this solves the problem of utilization and storage, which is dangerous for the environment. The problem is, however, that the fertilizing value of this waste and its impact on plant physiological activity depends on the type of biodegradable biomass, which requires separate research into the methods of its application and management. These difficulties become serious because biogas plants turn out to be a fast developing branch of energy production and they use of different raw materials. Alburquerque et al. [11], Jasiulewicz and Janiszewska [12], and Łagocka et al. [13] indicated that, given the environmental risks and benefits, the use of this waste in agriculture is most rational, provided that methods for its use are developed. The limitation of environmentally harmful synthetic fertilization by the use of biogas plant waste seems to be very important, as has been similarly demonstrated in the case of microalgae and water plants from the family *Lemnaceae*, which applied to medium enabled a reduction of the recommended artificial fertilizer doses [14–17]. The use of waste from biogas plants for fertilizing purposes is part of the strategy of the circulating production of energy plants in which waste becomes a raw material in the next crop cycle. Another unknown problem is the usefulness of the biomass energy produced from the waste of a biogas plant and the possibility of its torrefaction for energy purposes. The world literature available on these issues, especially concerning agricultural management of waste from the corn grain biodigestion to the methane process together with preparations stimulating growth, their influence on physiological processes that regulate plant energy properties, and the development of torrefaction technologies converting such produced biomass into energy fuel, is hard to find. In the majority of cases, it refers to the waste produced by specific biogas plants and to the raw materials used there [18]. Additionally, the possibilities of torrefaction of the biomass produced on this waste, as well as its energy properties so far are not known.

The purpose of this work was to describe the impact of waste from the corn grain biodigestion to methane process, used as biofertiliser either separately or together with Apol-humus and Stymjod, on the growth, yield, and physiological properties of Jerusalem artichoke biomass and the possibility of converting it into valuable energy fuel using the torrefaction processes.

2. Results

The waste from the corn grain biodigestion to methane process had a beneficial influence on the growth biomass yield and physiological activity of Jerusalem artichoke. All quantities of applied waste accelerated the Jerusalem artichoke growth and biomass yield, with 30–40 m³ ha^{−1} being the most favorable for plant development. The positive impact of this natural fertilizer on growth was enhanced by the additional application of Apol-humus to soil (10 L ha^{−1}) and, furthermore, to a higher degree by supplementary double plant spraying with Stymjod (5 L ha^{−1}) (Figures 1 and 2).

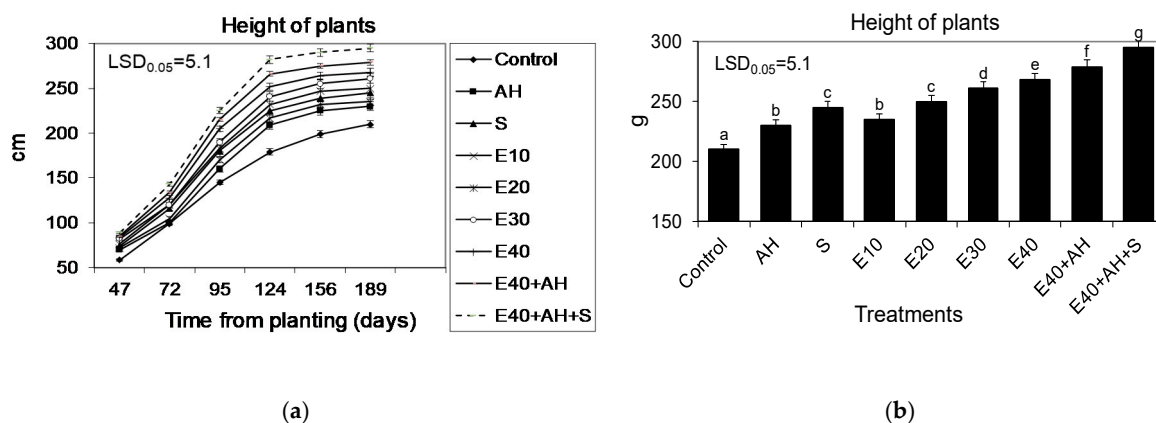


Figure 1. Kinetics of the growth (a) and final height of Jerusalem artichoke plants (b) cultivated in a field and fertilized with liquid, non-centrifuged waste from corn grain digestion to methane (E10, 40 $m^3 ha^{-1}$), Apol-humus (AH; 10 $L ha^{-1}$), and Stymjod (S; 5 $L ha^{-1}$). The data marked with the same letters are not significantly different, according to the Newman–Keuls multiple range test at an alpha level of 0.05. The data presented are the average over the years and 10 plants in each repetition of a particular experimental variant.

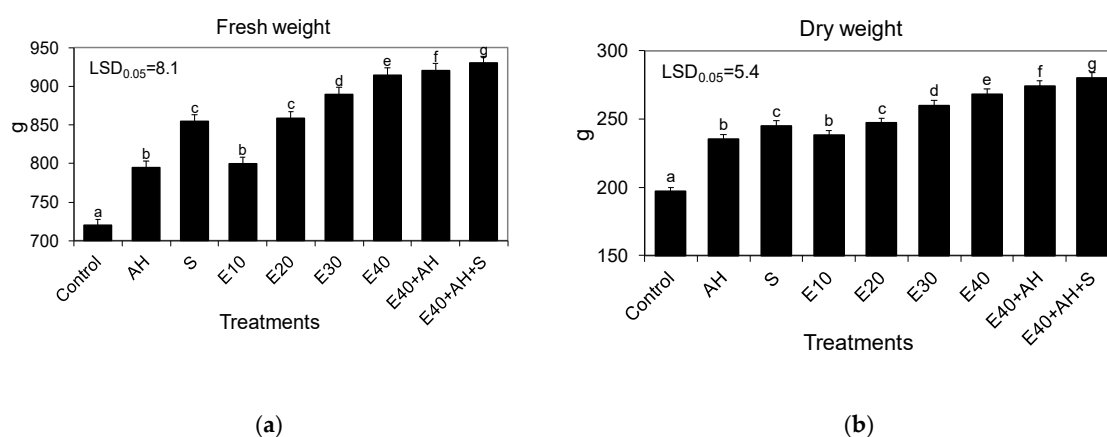


Figure 2. Fresh (a) and dry biomass (b) of one Jerusalem artichoke plant cultivated in a field and fertilized with liquid non-centrifuged waste from corn grain digestion to methane (E10, 40 $m^3 ha^{-1}$), Apol-humus (AH; 10 $L ha^{-1}$), and Stymjod (S; 5 $L ha^{-1}$). The data marked with the same letters are not significantly different, according to the Newman–Keuls multiple range test at an alpha level of 0.05. The data presented are the average over the years and five plants in each repetition of a particular experimental variant.

Biogas plant waste, applied alone or supplemented with Apol-humus and Stymjod, increased the activity of acid and alkaline phosphorylases, RNase, and dehydrogenases. The activities of these enzymes were closely related to the increasing doses of fertilizers (Table 1).

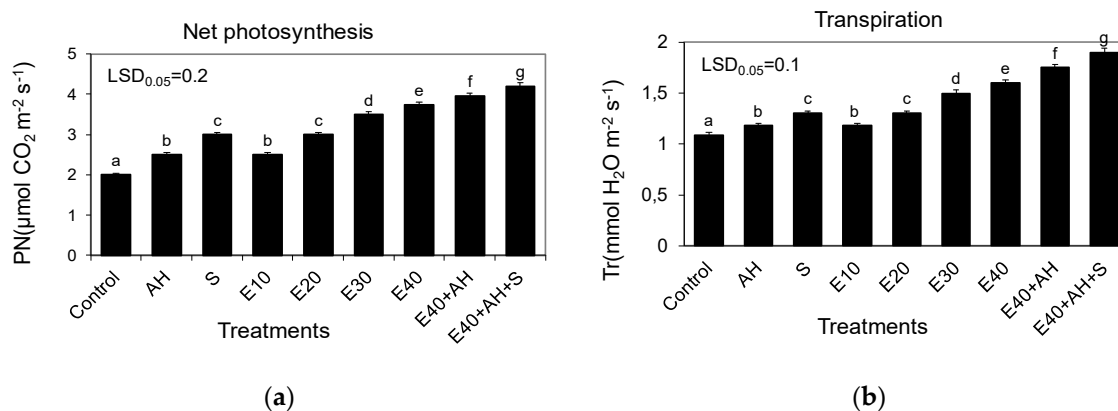
Table 1. Activities of the selected enzymes in leaves of Jerusalem artichoke plants grown in a field and fertilized with liquid non-centrifuged waste from corn grain digestion to methane (E10, 40 m³ ha⁻¹), Apol-humus (AH; 10 L ha⁻¹), and Stymjod (S; 5 L ha⁻¹).

Waste Doses and Biopreparations Applied to Soil	Phosphorylases		RNase [U g ⁻¹ f.w.]	Total Dehydrogenases [mg Formazan g Leaf ⁻¹]
	(pH = 6.0) [U g ⁻¹ f.w.]	(pH = 7.5) [U g ⁻¹ f.w.]		
Control	0.60 a	0.26 a	2.6 a	0.50 a
AH	0.63 b	0.28 b	2.8 b	0.52 b
S	0.66 c	0.31 c	3.2 c	0.66 c
E10	0.63 b	0.28 b	2.9 b	0.52 b
E20	0.67 c	0.31 c	3.3 c	0.66 c
E30	0.71 de	0.33 de	3.6 de	0.69 d
E40	0.73 e	0.34 e	3.7 e	0.72 e
E40 + AH	0.77 f	0.39 f	4.2 f	0.76 f
E40 + AH + S	0.81 g	0.42 g	4.4 g	0.79 g
LSD _{0.05}	0.02	0.01	0.1	0.15

The data marked with the same letters within a column are not significantly different, according to a Newman–Keuls multiple range test at an alpha level of 0.05. The data presented are the average over the years and 10 plants in each repetition of a particular experimental variant.

The established correlations between the favorable changes in plant growth and biomass yield and the fertilizer doses studied were also confirmed by the proportionally increased activity of gas exchange and the index of the chlorophyll content in leaves. The growing doses of waste, used alone or supplemented with Apol-humus and Stymjod, also increased the index of the chlorophyll content, net photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance, and decreased intercellular CO₂ concentration, inversely proportional to the above-mentioned three parameters of gas exchange. These relationships between the doses used of waste and parameters of gas exchange and the index of the chlorophyll content were similar to those observed between the amount of the fertilizers used and the plant growth and biomass yield (Figures 1–4).

The use of biogas plant waste slightly increased the heat of combustion in the analytical state and calorific value in the working state and decreased the ash content in the plants. Table 2 presents the results of the main experiment using a batch reactor for conducting a Jerusalem artichoke torrefaction process in a nitrogen atmosphere. The most important observation is that under 245 °C and a residential time of 13 min, the mass reduction was the closest one of all experimental results to 30%, which is due to the large amount of literature on the most optimal ratio.



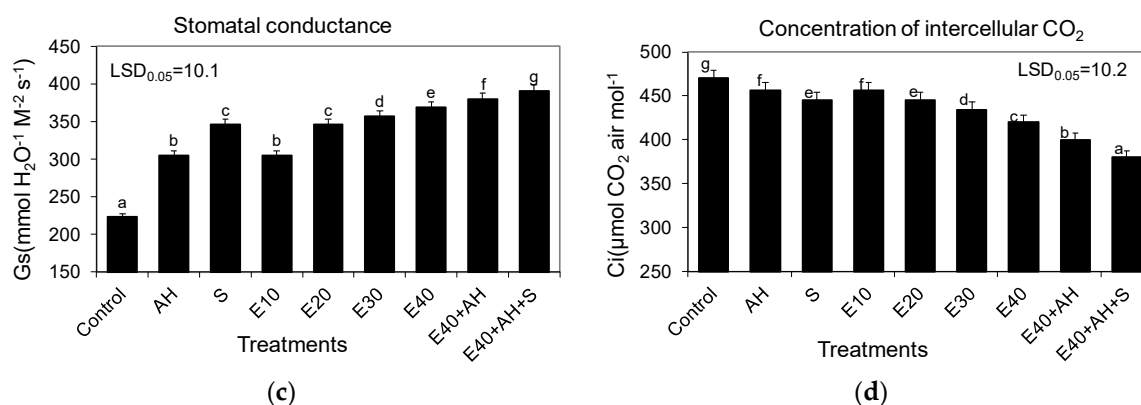


Figure 3. Gas exchange in the leaves of Jerusalem artichoke plants (Net photosynthesis (a), Transpiration (b), Stomatal conductance (c), Concentration of intercellular CO_2 (d)) cultivated in a field and fertilized with liquid non-centrifuged waste from corn grain digestion to methane (E10, $40 \text{ m}^3 \text{ha}^{-1}$), Apol-humus (AH; 10 L ha^{-1}), and Stymjod (S; 5 L ha^{-1}). The data marked with the same letters are not significantly different, according to a Newman–Keuls multiple range test at an alpha level of 0.05. The data presented are the average over the years and 10 plants in each repetition of a particular experimental variant.

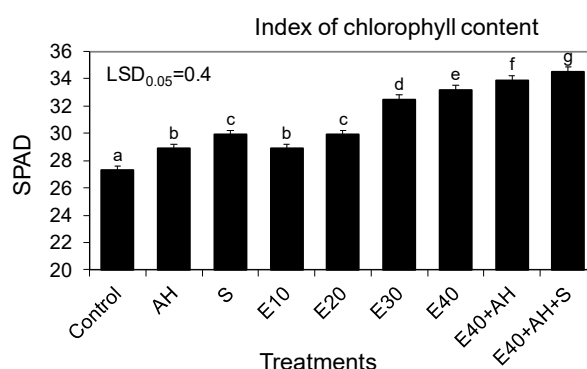


Figure 4. Index of the chlorophyll content in leaves of the Jerusalem artichoke plants cultivated in a field and fertilized with liquid non-centrifuged waste from corn grain digestion to methane (E10, $40 \text{ m}^3 \text{ha}^{-1}$), Apol-humus (AH; 10 L ha^{-1}), and Stymjod (S; 5 L ha^{-1}). The data marked with the same letters are not significantly different, according to a Newman–Keuls multiple range test at an alpha level of 0.05. The data presented are the average over the years and 10 plants in each repetition of a particular experimental variant.

Table 2. Experimental research results of the Jerusalem artichoke torrefaction process in nitrogen using a batch reactor.

Sample Number	Mass Reduction,g	Mass Loss,%	Residential Time, min	Torrefaction Temp., °C
1	20/14, 64	26, 80	12	251, 17
2	20/14, 38	28, 10	13	245, 17
3	20/13, 47	32, 65	14	247, 90
4	20/14, 50	27, 50	13	242, 17
5	20/14, 21	28, 95	14	243, 45
6	20/12, 51	37, 45	17	254, 06
7	20/15, 26	23, 70	10	241, 64

In Table 3, the results of a proximate analysis of Jerusalem artichoke before and after the thermo-chemical conversion process are presented. It is quite clear that the C% (weight) in the biomass thermo-chemical process of bio-products increases in tandem with an enhancement in the Jerusalem artichoke torrefaction process temperature. This was contrary to the weight percentages of C_H and O, which showed a decreasing trend. From the above mechanism, it is clear that dehydration takes place as well as de-carbonization during the Jerusalem artichoke torrefaction process. This clearly shows that the emission of CO₂, CO, or H₂O will result in a decrease in the H and O contents of torrefied biomass. The rising % of the C content was only due to a decrease in the O content.

Table 3. Elemental analysis and technical analysis of Jerusalem artichoke before and after the torrefaction process.

Energy Crop	Moisture(%)	C ^{ad} , (%)	N ^{ad} , (%)	H ^{ad} , (%)	S ^{ad} , (%)	Cl, (%)	Volatiles ^{ad} (%)	Ash (%)	High Heating Value, (MJ/kg)
Jerusalem artichoke	5.3	48.5	0.27	6.20	0.05	0.115	91.29	2.3	15.82
Torrefied Jerusalem artichoke:									
(243, 45 °C, 14 min)	2.8	54.37	0.19	5.37	0.05	0.014	73.37	3.94	21.70
(245, 17 °C, 13 min)	2.7	55.04	0.19	5.34	0.05	0.014	72.81	3.84	22.12
(242, 17 °C, 13 min)	2.8	54.79	0.19	5.39	0.05	0.014	72.27	3.71	22.09

^{ad} Add dry basis.

An FTIR analysis during the thermogravimetric analysis of the Jerusalem artichoke torrefaction process under 245 °C for the production of carbonized solid biofuel shows what kind of volatile matter components are produced, so-called torgas: H₂O, CO, CO₂, CH₄, and C₂ (Figures 5 and 6).

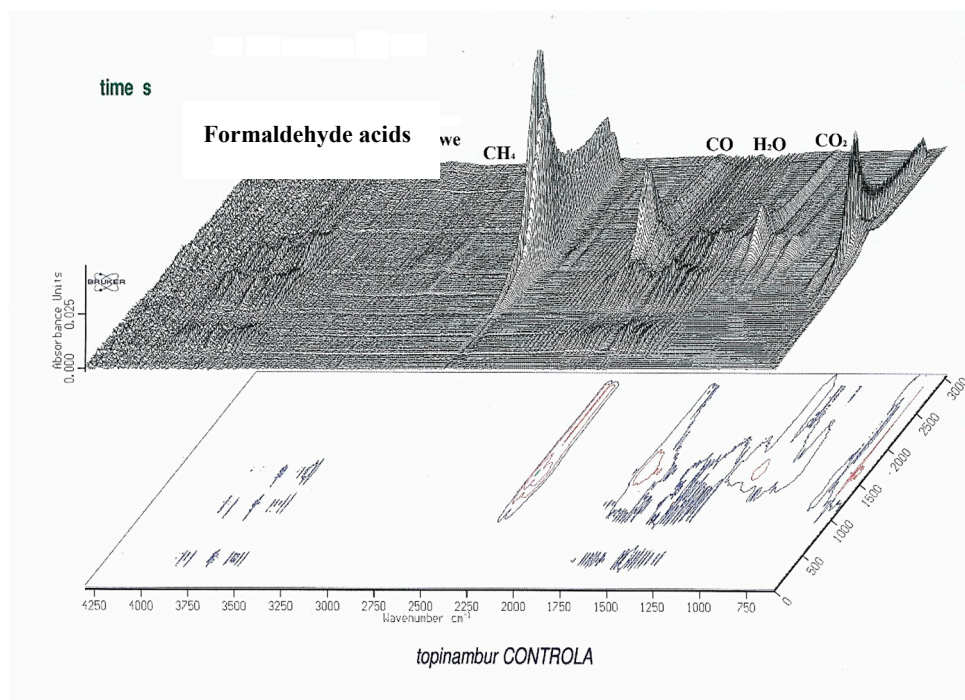


Figure 5. FTiR analysis of Jerusalem artichoke torrefaction by-products: torgas during the torrefaction process under 245 °C.

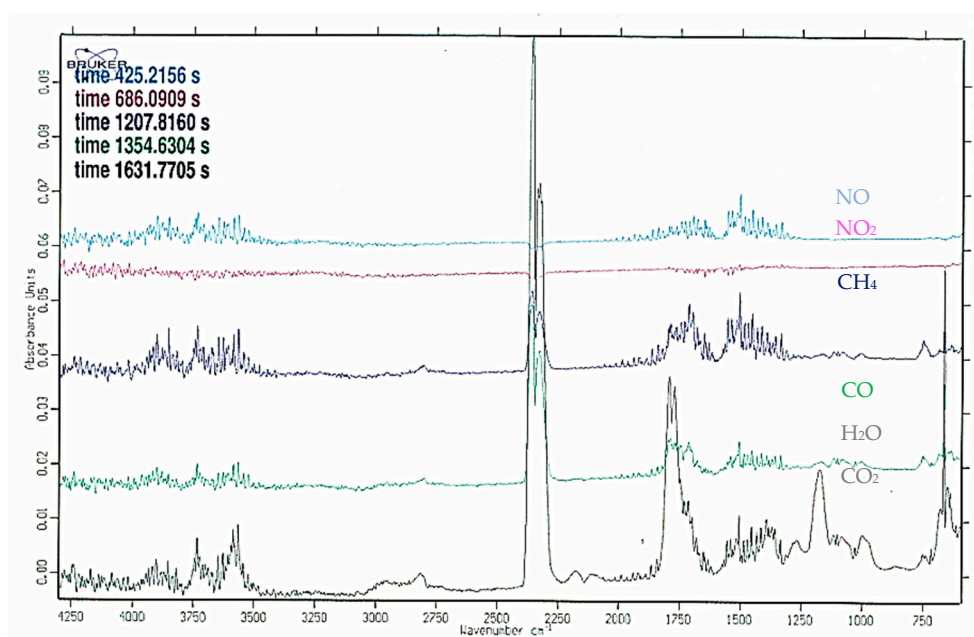


Figure 6. FTiR analysis of Jerusalem artichoke torrefaction by-products: torgas during the torrefaction process under 245 °C.

Figures 7–10 presents the thermogravimetric analysis of the combustion process of torrefied Jerusalem artichoke and TG-MS analysis, which shows what kind of component occurs during combustion. The colored lines represent what kind of volatile components are formulated during the combustion process: H₂O, CO₂, NO, SO₂, NO₂, formaldehyde, and C.

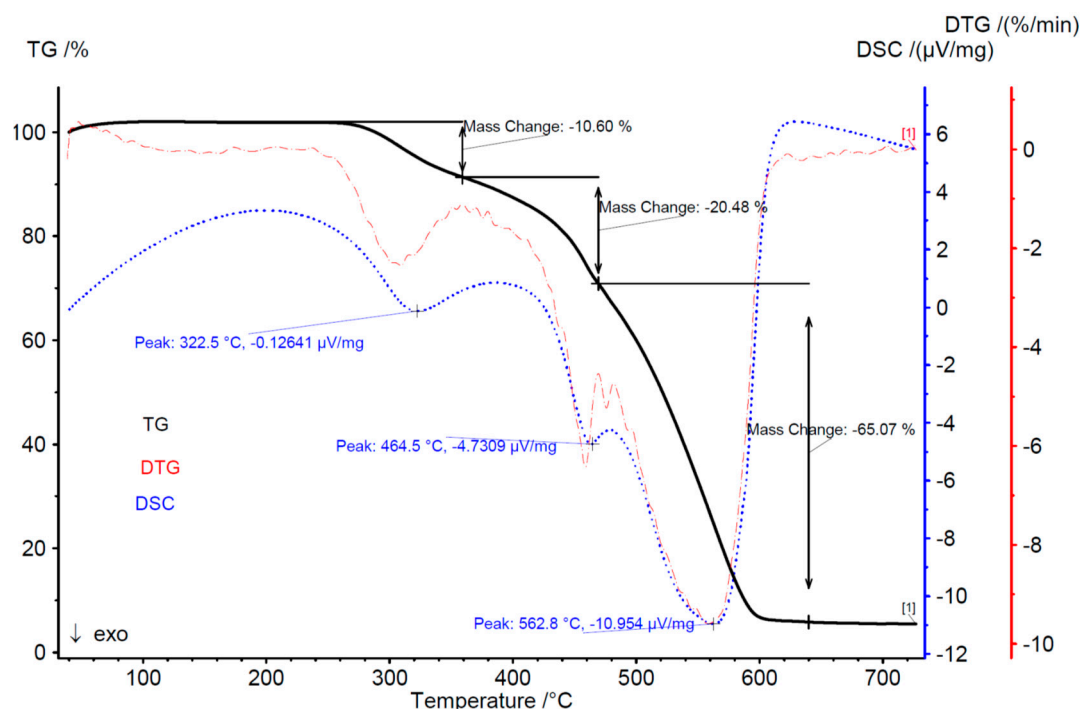


Figure 7. Thermogravimetric analysis of torrefied Jerusalem artichoke combustion process.

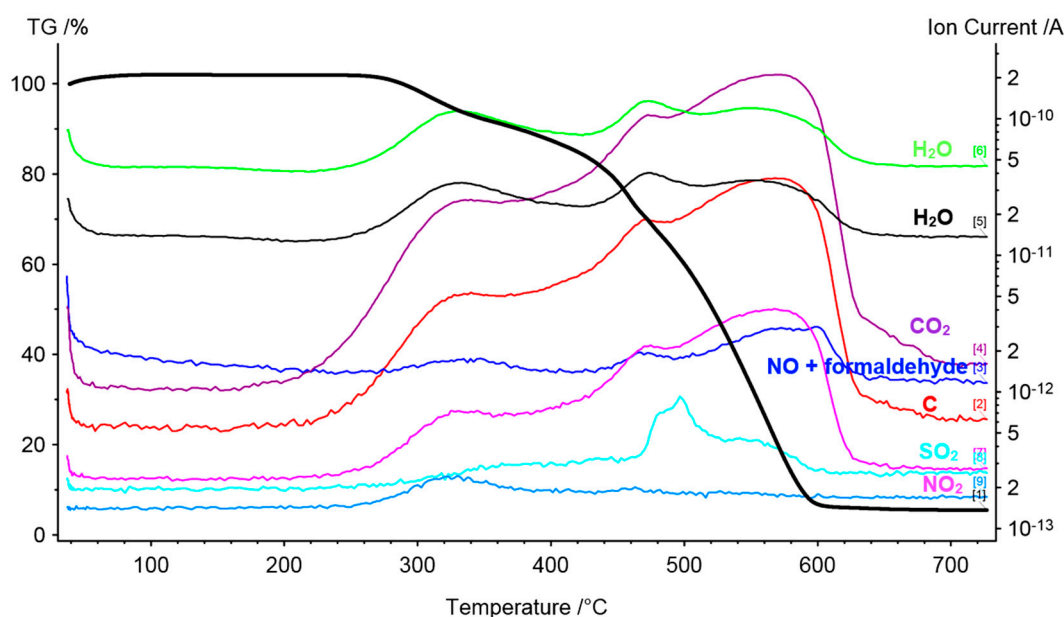


Figure 8. TGA-MS analysis of the Jerusalem artichoke combustion process.

An elemental analysis shows that during the TG-MS analysis of the torrefaction process of Jerusalem artichoke under 245 °C in torgas, there is 0.1% of CH₄, 0.05% of C₂, 81.2% of CO₂, and 18.6% of CO (Figure 8). Figure 9 represents the mass and energy balance of the Jerusalem artichoke torrefaction process using a batch reactor and in an inert atmosphere of nitrogen. It was calculated that 266.76 (±0.420) kJ is the external energy, which is necessary to produce carbonized solid biofuel (with a 30% mass loss and 10% energy loss) from Jerusalem artichoke. The novelty of this research is based on the fact that there is a lack of publications describing the use of Jerusalem artichoke growing in Poland on low-class soils with the addition of wastes and biofertilizers as a feedstock for the torrefaction process with a focus on the torrefaction process's optimal parameters for biofuel

production and physical and chemical analysis of torrefied biofuels and uses ashes as carriers of C for biofertilisers (Table 4).

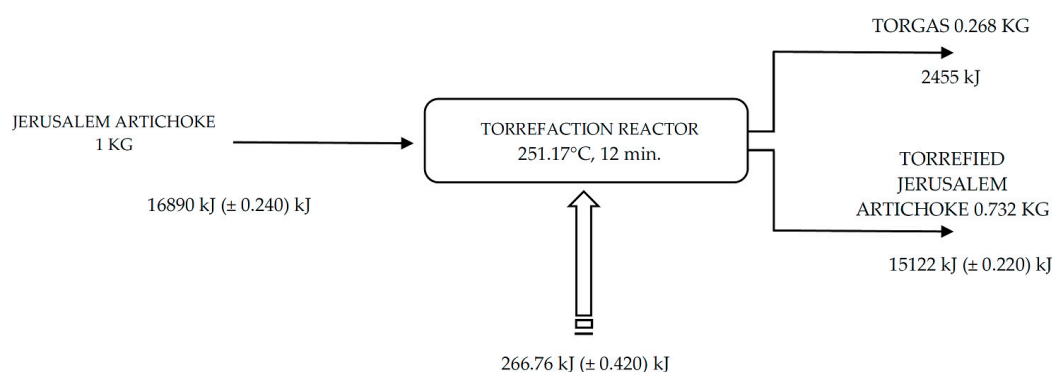


Figure 9. Mass and energy balance of the Jerusalem artichoke torrefaction process ($t = 251.17^{\circ}\text{C}$, 12 min).

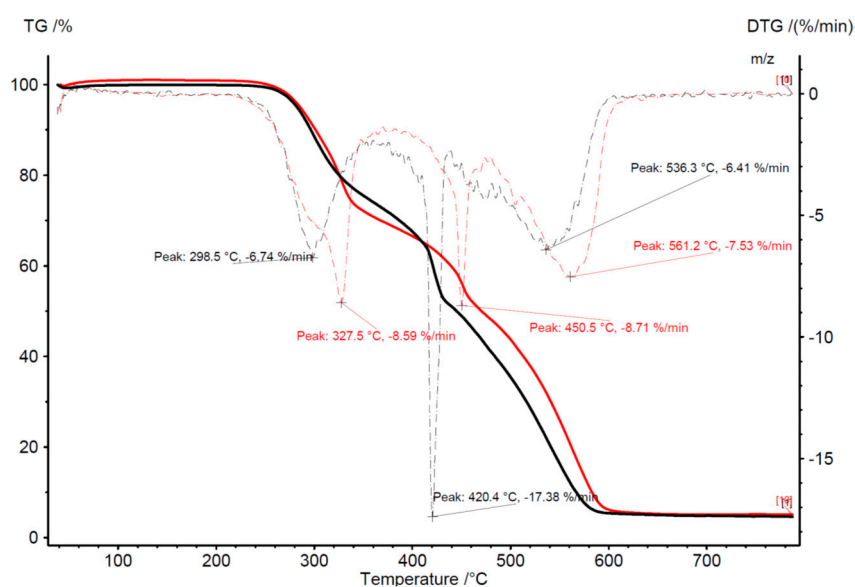


Figure 10. TGA-MS analysis of the torrefied Jerusalem artichoke combustion process.

Table 4. Content of elements in the ash from untreated Jerusalem artichoke and torrefied Jerusalem artichoke burnt biomass.

Assessed Material	C	O	K	Ca	Mg	Fe	Si	P	S	Cl	Dry Mass
	[Atomic, %]										[%]
Ash composition from torrefied Jerusalem artichoke (average values)	21.75	46.82	23.01	2.63	0.81	0.02	0.34	3.02	0.19	1.41	100.00
Standard deviation, σ	3.00	2.18	2.83	0.51	0.30	0.00	0.10	0.60	0.05	0.40	- *
Ash composition from untreated Jerusalem artichoke (average values)	31.53	36.05	20.09	2.22	0.98	0.11	0.46	1.16	0.19	3.13	100.00
Standard deviation, σ	3.32	4.00	3.88	0.72	0.27	0.01	0.42	0.62	0.05	1.19	- *

* The values of standard deviations do not add up.

Torrefaction is a thermal pre-treatment step for biomass co-firing or biofuel combustion purposes, which takes place in a relatively low temperature range of 225–350 °C to produce a fuel with a bigger energy density mainly by the decomposition of hemicellulose fractions (Figure 11).

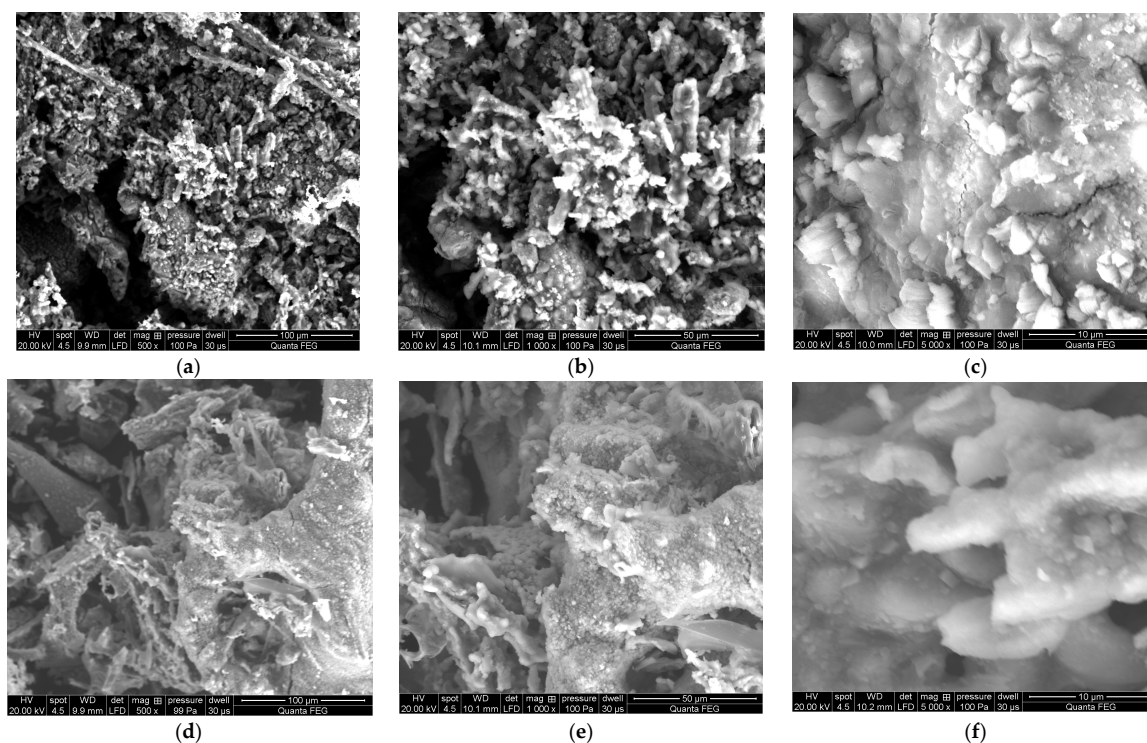


Figure 11. SEM-EDS microscopic images (a) 100 µm, (b) 50 µm, (c) 10 µm of ashes from torrefied Jerusalem artichoke after combustion and (d) 100 µm, (e) 50 µm, (f) 10 µm of ashes from untreated Jerusalem artichoke after combustion.

3. Discussion

Jerusalem artichoke is a very realistic high production potential energy plant that can be used to produce large amounts of biomass (aerial part) and biofuels (using tubers). The amount of yield depends primarily on the plant genotype and soil fertility. Biomass yield can even reach 110 t ha⁻¹, including green mass of 75.6 t ha⁻¹, and tubers of 32.4 t ha⁻¹. The raw material for energy purposes can be tubers that can be used for the production of ethanol or biogas and above-ground parts used for biogas fabrication, burning, or for fuel briquettes and pellets. This plant grows well and produces large amounts of biomass in a wide range of conditions, including moderately compact, well-ventilated, nutrient-rich, and sufficiently moist soils. It can also be cultivated in worse positions for energy needs, especially if it is fertilized with biogas plant waste, as the research presented demonstrates [9].

The main goal of the research was to examine mechanisms controlling the torrefaction process, to determine selected torrefaction parameters of Jerusalem artichoke growing in low-class soils, and to determine the impact of the torrefaction process on the Jerusalem artichoke co-firing with coal process, including the level of pollution reduction. The main thesis of the research is the assumption that the torrefaction process causes an increase in the calorific value of carbonized Jerusalem artichoke, positively affects the improvement fuel values during carbonization, and favorably affects the process of co-firing torrefied biomass with coal, thus limiting a number of operational problems arising as a result of co-firing biomass with hard coal. This research is becoming important as it is commonly estimated that in 2050, about 75% of energy will come from renewable energy sources [19]. Therefore, it is necessary to undertake intensive actions to develop technology for sustainable energy crop production, its conversion into useful biofuel, and to limit the use of synthetic fertilizers, as their production and use in agriculture are energy intensive and cause pollution of the environment. The research performed showed that fertilization with the waste from corn grain

biodigestion to methane in a dose of 10–40 m³ ha^{−1} of Apol-humus and Stymjod increased plant growth, biomass yield, gas exchange, enzymatic activity, and energy value of Jerusalem artichoke biomass proportionally to the fertilizer doses, as was shown in several labour-intensive tests. The correlations found were observed in all tests performed on physiological activity and they were similar regardless of the fact that these plants were cultivated for three subsequent years in podzolic soil. This indicates the proper selection of the plant assessment used tests to show the response of plants to the applied treatments and the possibility of obtaining positive effects from the developed methods of fertilization with waste irrespective of the climatic conditions. The tests implemented also explain the correlation between particular physiological events and their role in regulating growth and yield [20,21]. The changes observed in the kinetics of Jerusalem artichoke growth, biomass yield, gas exchange, and enzyme activity in relation to the fertilization methods demonstrated the positive impact of all used non-centrifuged waste doses, with 30–40 m³ ha^{−1} being the most favorable for plant growth and physiological activity [19].

The results obtained show that the amounts of nutrients contained in the waste used could influence the photochemical processes of photosynthesis, as was also demonstrated by Kalaji et al. [22] in corn and tomato. They showed that photosynthetic system activity, measured by chlorophyll fluorescence, is related to the nutrient content in plants. The research presented showed also that the increasing doses of waste applied to soil were proportionally related to a higher chlorophyll content in leaves and accelerated growth of plants. Chlorophyll content is the most widely used proxy for N content, as was demonstrated by the studies of Herrmann et al. [23], Homolová et al. [24], and Camino et al. [25]. According to Hamann et al. [26], measurement of the chlorophyll content and nitrogen balance can be a useful non-destructive method to estimate the physiological status of plants, as was found in young apple trees cultivated under water stress conditions.

Research shows that the applied waste from biogas plants influenced the activity of enzymes, which have a key impact on plant growth, biomass yield, physiological processes, and energy properties. Similarly, as in the case of gas exchange, it enhanced the activities of acid and alkaline phosphorylases, RNase, and dehydrogenase in a dose-dependent manner. The alkaline and acid phosphorylases are responsible for the distribution of phosphorus in plants and they catalyze the hydrolysis of organic phosphorus. They also regulate the mineralization potential of organic phosphorus, which can influence the biomass energy value [27]. Stimulation of RNase activity by the waste studied may play an important role in strengthening defense mechanisms in plant tissues, as was also observed in willow and corn plants under the influence of microalgae used as fertilizer. Dehydrogenases play a crucial role in respiration processes important for growth and biomass yield [21]. A close relationship between different fertilization methods, the enzyme activities studied, and plant development was also found in other energy plants, such as Virginia fanpetals, corn and willow treated with algae [17,21,28,29], and in some energy plants fertilized with sewage sludge and ash [30,31].

The studies indicated that enhanced fertility, resulting in higher gas exchange and enzyme activity, also slightly increased the heat of combustion in the analytical state and calorific value in the working state, as well as decreased the ash content in plants proportionally to the applied fertilizer doses. These properties are important when plants are produced for energetic purposes and show that Jerusalem artichoke fertilized with the waste from a biogas plant is suitable for this use. In line with the research of Kordas et al. [32], the results obtained state that increasing the dose of mineral fertilization contributed to the increase in the heat value of plant combustion.

The additional stimulating impact on plant development of the biopreparations added to the waste from the biogas plant in the combined treatments could be caused by humid acids and chitosan polymers contained in Apol-humus and by-nutrients, and humid acids and iodine present in Stymjod. The positive impact of humid acids on plant development has been described in the literature [33]. The favorable impact of chitosan on the development and health of plants under hydrothermal stress was revealed by Górnik et al. [34] in grapevines. The demonstrated stimulatory influence of Stymjod, used with the waste studied, on Jerusalem artichoke plant development could be an effect of macro- and microelements, humid acids, and above all of the presence of iodine [35,36].

Jeznach [36] demonstrated the positive influence of iodine on the cyto-morphological changes in cabbage and tomato, the enlarged diameter of phloem and xylem, and more frequent stomata opening, which resulted in increased gas exchange in the leaves. The application of iodine to cabbage enhanced its resistance to stress and the quantity of several elements in leaves [36]. According to Smoleń et al. [37], iodine application increased the content of phosphorus, potassium, and calcium and decreased the accumulation of iron in stored carrot roots. The intensified physiological processes found in vegetable crops under the influence of iodine could also occur in Jerusalem artichoke and influence its biomass energy properties and sensitivity to growing conditions.

The research presented indicates that biogas plant waste use in Jerusalem artichoke crops under different climate conditions subsequently not only allows a reduction in the doses of synthetic fertilizers that contaminate the surroundings but can also solve the serious problem of utilization and storage, which is expensive and dangerous for the environment [38,39]. Additionally, the use of this waste as a plant fertilizer is safer than sewage sludge, which may often contain harmful compounds that must be removed prior to its use in agriculture [40]. Research indicates that fertilization with the waste from a biogas plant enables a high yield of energy and biomass to be obtained, which could be used in its torrefaction, and may lead to a decrease in the recommended doses of artificial fertilizers, thus limiting environmental pollution. The highest fertilization level of Jerusalem artichoke enables a high quantity of fuels to be obtained as was found in sorghum, which can be a raw material for producing 8455 Nm³ of biogas ha⁻¹ and 200,000 MJ ha⁻¹ per year [10].

Regarding research results on the Jerusalem artichoke torrefaction process using a batch reactor, the findings of the torrefaction process temperature are quite important when designing commercial continuous reactors for the production of carbonized solid biofuels. These results indicate that, as is well known in the production of carbonized solid biofuels, in order to obtain the best process conditions of the torrefaction process and a reasonable price of the final product, it is important to achieve a mass loss on a level of 30% and an energy loss (torgas) on a level of 10% in the thermo-chemical conversion. Compared to research results on other energy crops and straw biomass, Jerusalem artichoke's temperature of 245 °C during torrefaction for carbonized solid biofuel production under isothermal conditions is relatively low [41–49]. Research on the Jerusalem artichoke has shown that the amount of ash after the torrefaction process is still at a relatively low level compared to biomass not subjected to the torrefaction process (Jerusalem artichoke unprocessed as a result of the torrefaction process has an ash content of <3%), and solid fossil fuels, such as Polish hard coal, have an ash content of <15%. An SEM-EDS analysis of the ash composition of torrefied Jerusalem artichoke after burning at 700 °C showed a very favorable composition of mineral substances that can be reused as additives to organic fertilizers, a carrier of such elements as K (20.46%) and P (3.36%) and C (22.51%).

An SEM-EDS analysis was performed on fly ash of Jerusalem artichoke sintered at 700 °C.

The method of growing Jerusalem artichoke presented in the experiments carried out is ecological and improves the parameters of the torrefaction process. The Jerusalem artichoke produced as a result of ecological fertilization is characterized by low cultivation costs and the heat energy produced in this carbonized solid biofuel requires about 25% less expenditure than during fertilization with chemical fertilizers.

4. Materials and Methods

4.1. Plants, Waste, and Biopreparations

The bulbs of Jerusalem artichoke used in the experiments were purchased from Chmiel Ecological Farm (Poland). The non-centrifuged liquid waste was obtained from Gamawind Sp. z o.o., Piaszczyzna, Poland, a distillery integrated with the biogas plant, which produces alcohol and biogas using corn grain as raw material. Apol-humus, the new generation soil improver, was purchased from the manufacturer Poli-Farm Sp. z o.o., Poland, whereas Stymjod, a nano-organic-mineral fertilizer, was supplied by the producer PHU Jeznach Sp. J., Poland.

4.2. Ultimate Analysis

The ash content of the raw samples of Jerusalem artichoke was measured using an electrical oven using the standard procedure. A main assumption was taken that no ash is lost during the torrefaction stage. Therefore, an ash content value was calculated for each solid residue from the overall mass yields. The C, H, N, and S contents were measured using a Perkin/Elmer Analyser and the elemental analyses procedure was used. All three different samples of Jerusalem artichoke were analyzed: Measurements were repeated in triplicate and the average value, which was corrected for moisture content, is presented in Table 1.

4.3. Plant Treatments and Experimental Design

The research was performed in north Poland in a field where the temperature oscillates from 11 to 21 °C, precipitation is 655 mm, and moist air from the Baltic Sea is noted. The experiments were carried out in podzolic soil, on 7 plots, which were fertilized in April with:

- Non-centrifuged waste from a corn grain biodigestion to methane process in dosages of 0, 10, 20, 30, and 40 m³ ha⁻¹;
- Non-centrifuged waste, 40 m³ ha⁻¹ together with Apol-humus (10 L ha⁻¹); and
- Non-centrifuged waste, 40 m³ ha⁻¹ together with Apol-humus (10 L ha⁻¹) and Stymjod (5 L ha⁻¹).

All the experimental variants and elemental characteristic of wastes and biofertilisers are shown in Figures 1–4 and Table 1 and Table 5. Waste and Apol-humus were mixed with the soil after their application while Stymjod was applied twice to leaves in July at a two-week interval. Jerusalem artichoke tubers were planted in the soil (enriched previously in April with waste and Apol-humus) in the first 10 days of May, 10–15 cm deep, 50 cm apart in a row, and 70 cm between rows, as is recommended. Non-fertilized plots/plants served as the control (Figure 12). The applied dosages of waste, Apol-humus, and Stymjod were chosen on the basis of previous research performed in a laboratory, container area, and field [19]. Jerusalem artichoke biomass was collected in November, evaluated for fresh and dry biomass, then chopped in a chopper and torrefied.

Table 5. Content of elements in the non-centrifuged waste from corn grain biodigestion to methane, Stymjod, and Apol-humus.

Assessed Material	pH	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Dry mass
		[mg L ⁻¹]										[%]
Waste	7.6	2455	278	996	300	115	9.0	0.324	0.175	0.976	3.365	1.4
Stymjod	5.4	1230	6650	62722	945	11574	18.7	885	680	1470	573	-
Apol-humus	12	15.21	15.8	20.2	468	70	140	5.95	0.87	2.40	0.92	-



Figure 12. Jerusalem artichoke plants fertilized with various doses of biogas plant waste in Piaszczyzna, (north Poland). The plot on the left fertilized with the dose of 10 m³ ha⁻¹, in the middle the control (0 m³ ha⁻¹) and on the right 40 m³ ha⁻¹. Photo was taken on June 15 (a) and 2 of July (b).

4.4. Fuel Characteristics

4.4.1. Caloric Value

The caloric value was determined by using two methods. The first one was performed by using a calorimetric bomb and the second one by calculating the CV based on the carbon, hydrogen, and nitrogen content. One type of equation for CV calculation was used to find the value, called the partial least squares regression (PLS) method (Equation (1)), and this gave a higher heating value (HHV) on a dry basis. HHV was calculated using the formula:

$$\text{HHV(PLS)} = 5.22C^2 - 319C - 1647H + 38.6CH + 133N + 21028 \quad (1)$$

where C = carbon, H = hydrogen, and N = nitrogen content expressed on a dry mass percentage basis. All caloric values from numerical calculations are the medium values of the determined results and are finally corrected by the dry ash content on a free basis.

The methodology of the experimental analysis of the Jerusalem artichoke torrefaction process for carbonized solid biofuel production comprised several analytical techniques:

- Analysis of the TGA, DTA, TG-FTiR, and TG-MS torrefaction process and biomass co-firing;
- Elemental analysis of biomass torrefaction process products;
- Analysis of the gases formed as a result of torrefaction: FTiR analysis and MS analysis;
- Technical analysis of biomass torrefaction products; and
- SEM-EDS ash analysis of torrefied Jerusalem artichoke after combustion.

Experimental research on the torrefaction process of carbonized energy crops using a specially designed biomass torrefaction installation with a batch reactor was performed in an inert atmosphere, nitrogen (Figure 13).

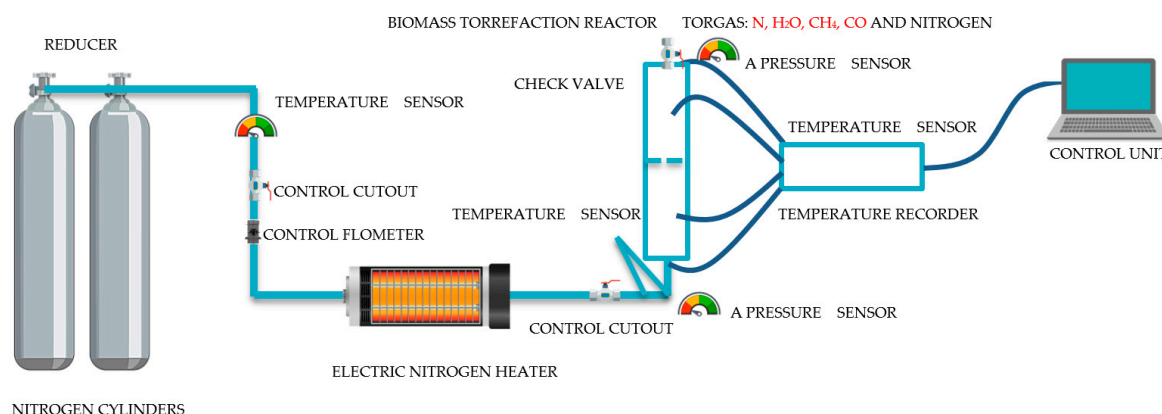


Figure 13. Scheme: installation with a batch reactor for the Jerusalem artichoke torrefaction process using nitrogen.

During biomass decomposition, three zones were distinguished on the weight loss curves of wood during torrefaction using installation with batch reactor Figure 12. The first one corresponded to the most reactive component, hemicellulose, whose decomposition started at 225 °C and finished at 325 °C; the second one was cellulose, whose decomposition temperature rate is from 300 °C up to 375 °C; and the last one was lignin, which represents the widgets' temperature rate of 250–500 °C. The carbonization process of lignocellulosic biomass was described by weight loss kinetics by using different experimental devices. Among those many devices were fluidized bed reactors, thermogravimetric analyzers, and tube furnaces. In the research presented, a method with a thermogravimetric analyser (TGA) was chosen to determine the weight loss kinetics of energy crop torrefaction. By using this kind of experimental method, we obtained dynamic conditions in which the sample with biomass was placed at a specific heating rate, but it is important to know that experimental heating rates are very often slower than those in real process equipment, such as combustors, reactors, or gasifiers.

4.4.2. Ash Analysis of Torrefied Jerusalem Artichoke

The samples were investigated by scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) using an SEM FEI Quanta 200FEG microscope equipped with an EDX Oxford X-Max spectrometer. Measurements by the EDX technique were performed in at least 10 different spots for a given sample, and then an average atom concentration and its standard deviation were calculated for each of the identified elements. The electron energy of 20 keV was used in investigations.

4.5. Assessments of Plant Physiological Activity and Growth

The effects of fertilization treatments were assessed by periodical height measurements of whole plants during the vegetative season and evaluation of their biomass yield and energy value in the autumn. Assessments of the physiological activity of plants (gas exchange, index of chlorophyll content, enzyme activity) were carried out on fully developed leaves situated under the top of plants. In each experimental variant, one leaf from each of 10 plants was taken for the evaluation of gas exchange and enzyme activity. The material was collected in the third week of July in a temperature range of 25–30 °C, in sunshine and air humidity of 50–60%.

The height of the plants was measured at monthly intervals throughout the growing season [17]. The weights of fresh green biomass, and dry (dried at 130 °C for 3 days) were assessed in November on the basis of 5 plants taken from each experimental variant. The data presented were calculated for one plant as an average for the treatment [17]. Assessments of gas exchange (net photosynthesis, transpiration, stomatal conductance, and intercellular CO₂ concentration) were performed using a TPS-2 -Portable Photosynthesis System (PP Systems, Amesbury, MA, USA) [17,20].

An index of the chlorophyll content in leaves was estimated using a SPAD-502 chlorophyll meter (Konica Minolta, Osaka, Japan) [17]. The activities of acid (pH 6) (EC 3.1.3.2) and alkaline (pH 7.5) (EC 3.1.3.1) phosphorylases (U g⁻¹ (FM) min⁻¹) in leaves and RNase (EC 3.1.27.5) (U g⁻¹(FM) min⁻¹) were studied using the methods demonstrated by Knypl and Kabzinska [50]. The activity of total dehydrogenases (EC 1.1.1.-) was measured using the procedure presented by Górník and Grzesik [20,51] with a spectrophotometer (UVmini-1240, Shimadzu, Japan) for formazan determination at a wavelength of 480 nm.

4.6. Assessments of Biomass Energy Properties and Torrefied Materials

The energy crop samples were pre-prepared before the experiments, and the biomass was separated from foreign bodies, cleaned from contamination, chopped, and ground so as to reach the appropriate geometric dimensions. The plants were cut into sections of 2 to 4 cm, ground, and then sieved on a special automatic screen and dried in an electric oven at 110 °C for 4 h. Then, the samples were tightly closed and sent for technical and elemental analysis. The content of the elements carbon, hydrogen, nitrogen, and sulphur were determined and the volatility, moisture content, ash, combustion heat, and calorific values were determined (the same analysis was performed after the torrefaction process). The weight of the samples was determined before and after the drying process and the results were used to determine the moisture content. In each Jerusalem artichoke torrefaction process experiment, the dried biomass was divided into three separate samples of 20 g and each of them was evenly distributed on three horizontal screens of a reactor metal structure with different perforations made of acid-proof steel. The nitrogen was heated up by using electrical heaters to the set temperature (for this experimental research, temperatures between 220 °C and up to 280 °C were measured and the torrefied products were analyzed according to the mass loss and caloric value increase). Only selected samples were analyzed because, as a result of previous studies, a too high weight loss of more than 35% results in a very high degree of carbonization and high energy loss (above 10% of original energy content). The reverse is achieved with a mass loss below 25%, which is too low, and the biomass, in the end, is not fully roasted (it is not fragile and still has a high degree of moisture absorption and low calorific value).

4.7. Statistical Analysis

The investigations presented were performed in the field for three years (in a series) in northern Poland in three replicates for each experimental variant. The experimental plots and replicates, with differently fertilized plants, were situated randomly. Because of the similar climate conditions and growth in subsequent years, the data obtained were presented as means from the years and 10 plants (measuring height, gas exchange, index of chlorophyll content, enzyme activity) or 5 plants (taking weights of fresh green biomass) from each replicate. These were processed applying analysis of variance (ANOVA I), by Statistica 12. The means of the chosen parameters were grouped employing the Dunett's test and the contrast between the control sample and the remaining samples was used at the $\alpha = 0.05$ significance level.

5. Conclusions

The research presented shows the prospects of increasing the energy efficiency of Jerusalem artichoke crops by ecological use of the waste from corn grain biodigestion to methane, applied separately or together with Apol-humus, a new generation soil improver, and Stymjod, a nano-organic-mineral fertilizer, as an alternative to artificial fertilizers, which pollute the environment.

The research presented shows that the temperature at which we obtained a 30% weight loss and a 10% energy loss as a result of the Jerusalem artichoke torrefaction process is 245 °C. The research shows an increase in the calorific value as a result of the Jerusalem artichoke torrefaction process from 15.82 to 22.12 MJ kg⁻¹. Research on the Jerusalem artichoke torrefaction process Figure 14 has shown that the amount of ash after the torrefaction process in Jerusalem artichoke is still at a relatively low level compared to biomass not subjected to the torrefaction process (Jerusalem artichoke unprocessed as a result of the torrefaction process has an ash content of <3%) and solid fossil fuels, such as Polish hard coal, has an ash content of <15%. An SEM-EDS analysis of the ash composition after burning at 700 °C of torrefied Jerusalem artichoke showed a very favorable composition of mineral substances that can be reused as additives to organic fertilizers, a carrier of such elements as: K (20.46%) and P (3.36%) and C (22.51%).

An SEM-EDS analysis was performed on the fly ash of Jerusalem artichoke sintered at 700 °C and leaching toxicity of heavy metals was analyzed by a horizontal vibration extraction procedure (HVEP). It was found that the structure of fly ash is strengthened with an increase of the temperature, which is conducive to the stabilization of heavy metals.

The method of growing Jerusalem artichoke presented in the experiments carried out is ecological and improves the parameters of the torrefaction process. The Jerusalem artichoke produced as a result of ecological fertilization is characterized by low cultivation costs and the heat energy produced in this carbonized solid biofuel requires about 25% less expenditure than during fertilization with chemical fertilizers.

The research also demonstrates that biomass obtained under the influence of such fertilization can be used for energy purposes and, for example, can be converted to high energy density torrefied solid biofuel. It was demonstrated that Jerusalem artichoke could be a promising high-yielding energy crop. Its ecological fertilization with the waste from biogas plants (30–40 m³ ha⁻¹), Apol-humus, and Stymjod positively influenced gas exchange (net photosynthesis, transpiration, stomatal conductance, and intercellular CO₂ concentration), the index of chlorophyll content, the activity of the selected enzymes (acid and alkaline phosphorylase, RNase, and dehydrogenase), and energetic parameters, which markedly affected the Jerusalem artichoke growth kinetics during the whole vegetative season as well as the yield of fresh and dry biomass. The waste studied can be used as a cost-effective and environmentally friendly biofertilizer, if it is applied in defined doses and in agreement with the national legal regulations on the safe application of these components. The research shows that a torrefaction process temperature of around 245 °C is one of the most optimal temperatures for the production of carbonized solid biofuel from Jerusalem artichoke. Compared to research results on other energy crops and straw biomass, an isothermal temperature of 245 °C during torrefaction for carbonized solid biofuel of Jerusalem artichoke biomass fertilized with biogas plant waste is relatively low. In the near future, biomass plants will be a major source of biofuel production and may inhibit the growth of oil prices [52].

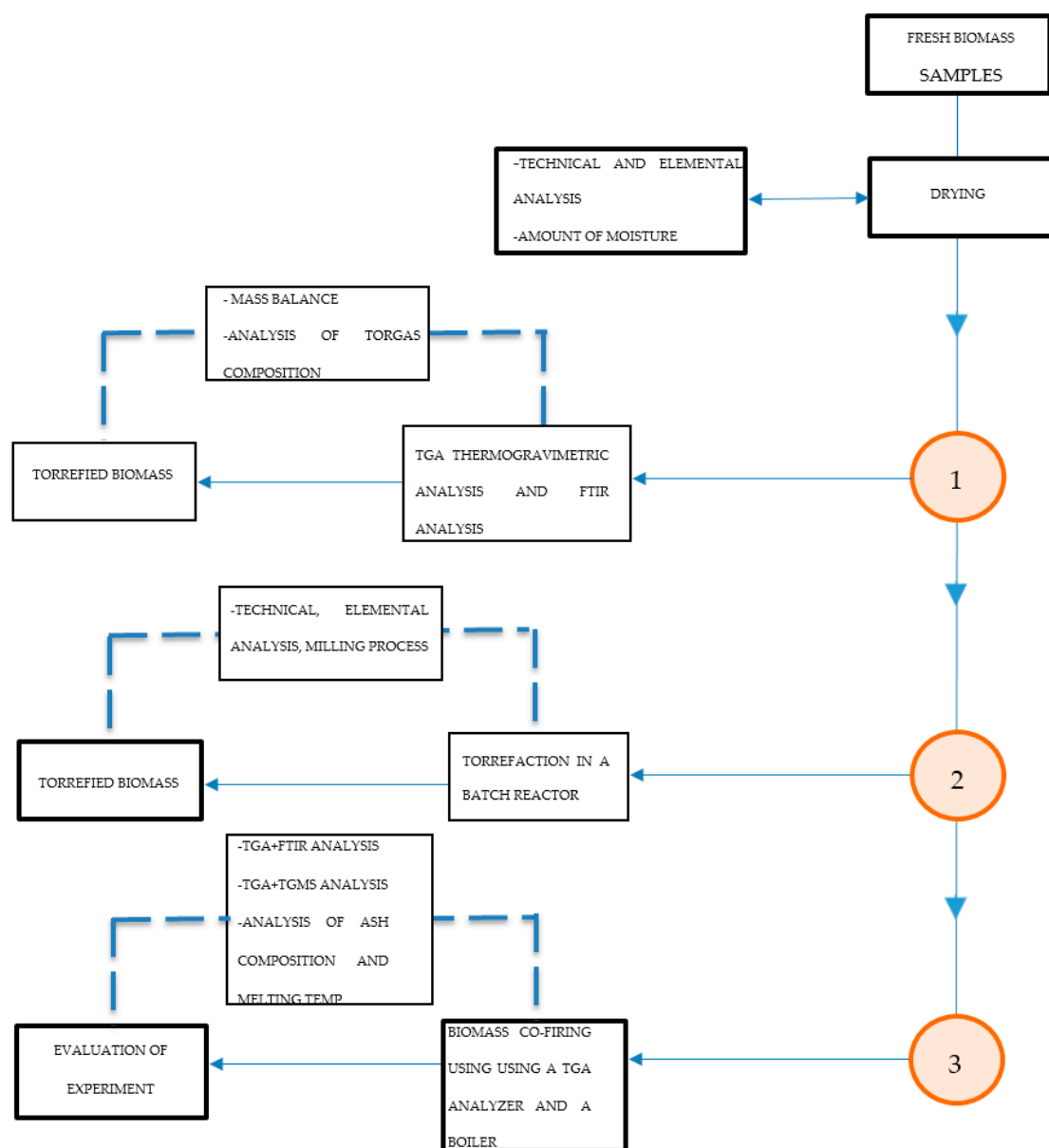


Figure 14. Scheme of the Jerusalem artichoke torrefaction process analytical method order: TGA, DTA, TG-FTiR, TG-MS torrefaction process, and biomass combustion plus SEM-EDS ash analysis.

Author Contributions: S.S., Z.R.-D., M.G.; methodology, P.P., Z.R.-D., K.P., J.S.; software, S.S., Z.R.-D., M.G.; validation, S.S., P.P., J.S. and M.G.; formal analysis, S.S., Ł.A. and K.P.; investigation, S.S., Z.R.-D. and M.G.; resources, S.S., P.P.; data curation, S.S., W.L., J.S. and Z.R.-D.; writing—original draft preparation, S.S., Z.R.-D., M.G., K.P.; writing—review and editing, S.S., P.P., W.L. and Ł.A.; visualization, S.S., Z.R.-D.; supervision, S.S. and P.P.; project administration, S.S.; funding acquisition, S.S., M.G. and Z.R.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research results in this article were financed by the National Centre for Research and Development Grant from Warsaw Poland—LIDER (grant no. 0155/L-9/2017). The research was supported by the National Centre for Research and Development Grant No. BIOSTRATEG2/296369/5/NCBR/2016 and Nr: 2011/03/N/ST8/02776

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Biofuels Progress Report. Report on the progress made in the use of biofuels and other renewable fuels in the Member States of the European Union. 2007. Available online: <https://www.ebb->

- eu.org/legis/biofuels%20progress%20report%20100107%20provisional%20version.pdf (accessed on 2 April 2020).
2. Biofuels in the E.U. A vision for 2030 and beyond. 2006. Available online: https://ec.europa.eu/research/energy/pdf/draft_vision_report_en.pdf (accessed on 1 April 2020).
 3. Faaij, A.P.C. Bio-energy in Europe: changing technology choices. *Energy Policy* **2006**, *34*, 322–342. doi:10.1016/j.enpol.2004.03.026.
 4. Fernando, A.L.; Retteenmaier, N.; Soldatos, P.; Panoutsou, C. *Sustainability of Perennial Crops Production for Bioenergy and Bioproducts*; Academic Press: London, UK, 2018; pp. 245–283.
 5. Zawadzka, A.; Imbierowicz, M. *Investowanie w Energetykę Odnawialną*; PAN Oddział w Łodzi, Komisja Ochrony Środowiska: Łódź, Poland, 2010; pp. 169–184. (In Polish)
 6. Bridgeman, T.G.; Jones, J.M.; Shield, I.; Williams, P.T. Torrefaction of reed canary grass, wheat straw and willow to enhance fuel qualities and combustion properties. *Fuel* **2008**, *87*, 844–856.
 7. Prins, M.J. Thermodynamic analysis of biomass gasification and torrefaction. PhD Thesis, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, The Netherlands, 2005.
 8. Lin, Y.-L. Effects of Microwave—Induced torrefaction on waste straw upgrading, *Int. J. Chem. Eng. Appl.* **2015**, *6*, 401–404.
 9. Gao, K.; Zhang, Z.; Zhu, T.; Tian, X.; Gao, Y.; Zhao, L.; Li, T. The influence of leaf removal on tuber yield and fuel characteristics of *Helianthus tuberosus* L. in a semi-arid area. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *131*, 8–13, doi:10.1016/j.indcrop.2019.01.024.
 10. Krzystek, L.; Wajszczuk, K.; Pazera, A.; Matyka, M.; Slezak, R.; Ledakowicz, S. The influence of plant cultivation methods on biogas production: Energy efficiency. In Proceedings of the WasteEng 2018 Conference, Prague, Czech Republic, 2–5 July 2018.
 11. Alburquerque, A.J.; Fuente, C.; Ferrer-Costa, A.; Carrasco, L.; Cegarra, Abad M.; Bernal, P.M. Assessment of the fertilizer potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass Bioen.* **2012**, *40*, 181–189. doi:10.1016/j.biombioe.2012.02.018.
 12. Jasiulewicz, M.; Janiszewska, A.D. Possible opportunities for the development of biogas plants on the example of the Zachodniopomorskie province. *Inżynieria Rol.* **2013**, *2*, 91–102.
 13. Łagocka, A.; Kamiński, M.; Cholewiński, M.; Pospolita, W. Health and environmental benefits of utilization of post-fermentation pulp from agricultural biogas plants as a natural fertilizer. *Kosmos* **2016**, *65*, 601–607.
 14. Pszczolkowska, A.; Pszczolkowski, W.; Romanowska-Duda, Z. Potential of *Chlorella vulgaris* culture for waste treatment from anaerobic biomass biodigestion at the Piaszczyzna (Poland) integrated facility. *J. Phycol.* **2019**, *55*, 816–829, doi:10.1111/jpy.12856.
 15. Romanowska-Duda, Z.; Piotrowski, K.; Jagiełło, N.; Dębowski, M.; Zieliński, M. Development of new Lemnaceae breeding technology using Apol-humus and biogas plant waste. *Inter. Agrophysics* **2019**, *33*, 297–302, doi: 10.31545/intagr/108975.
 16. Dębowski, M.; Rusanowska, P.; Zieliński, M.; Dudek, M.; Romanowska-Duda, Z. Biomass production and nutrient removal by *Chlorella vulgaris* from anaerobic digestion effluents. *Energies* **2018**, *11*, 1654, doi:10.3390/en11071654.
 17. Grzesik, M.; Romanowska-Duda, Z.; Kalaji, H.M. Effectiveness of cyanobacteria and green algae in enhancing the photosynthetic performance and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants under limited synthetic fertilizers application. *Photosynthetica* **2017**, *55*, 510–521, doi:10.1007/s11099-017-0716-1.
 18. Lalak, J.; Kasprzycka, A.; Paprota, E. M.; Tys, J.; Murat, A. Development of optimum substrate compositions in the methane fermentation process. *Int. Agrophysics* **2015**, *29*, 313–321, doi: 10.1515/intag-2015-0037.
 19. Romanowska-Duda, Z.; Grzesik, M.; Janas, R. Maximal efficiency of PSII as a marker of sorghum development fertilized with waste from a biomass biodigestion to methane. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1920, doi: 10.3389/fpls.2018.01920.
 20. Grzesik, M.; Górnik, K.; Janas, R.; Lewandowski, M.; Romanowska-Duda, Z.; van Duijn, B. High efficiency stratification of apple cultivar Ligol seed dormancy by phytohormones, heat shock and pulsed radio frequency. *J. Plant. Physiol.* **2017**, *21*, 81–90, doi:10.1016/j.jplph.2017.09.007.
 21. Grzesik, M.; Romanowska-Duda, Z.B. Ability of Cyanobacteria and microalgae in improvement of metabolic activity and development of willow plants. *Pol. J. Environ. Stud.* **2015**, *24*, 1003–1012, doi: 10.15244/pjoes/34667.

22. Kalaji, H.; Oukarroum, A.; Kouzmanova, M.; Brestic, M.; Zivcak, M.; Samborska, I.A.; Cetner, M.D.; Allakhverdiev, S.I.; Goltsev, V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiol. and Bioch.* **2014**, *81*, 16–25, doi: 10.1016/j.plaphy.2014.03.029.
23. Herrmann, I.; Karnieli, A.; Bonfil, D.J.; Cohen, Y.; Alchanatis, V. SWIR-based spectral indices for assessing nitrogen content in potato fields. *Int. J. Remote Sens.* **2010**, *31*, 5127–5143, doi: 10.1080/01431160903283892.
24. Homolová, L.; Malenovský, Z.; Clevers, J.G.P.W.; García-Santos, G.; Schaepman, M.E. Review of optical-based remote sensing for plant trait mapping. *Ecol. Complex* **2013**, *15*, 1–16, doi: 10.1016/j.ecocom.2013.06.003.
25. Camino, C.; González-Dugo, V.; Hernández, P.; Sillero, J.C.; Zarco-Tejada, P. J. Improved nitrogen retrievals with airborne-derived fluorescence and plant traits quantified from VNIR-SWIR hyperspectral imagery in the context of precision agriculture. *Int. J. Appl. Earth Obs. Geoinf.* **2018**, *70*, 105–117, doi: 10.1016/j.jag.2018.04.013.
26. Hamann, F.A.; Czaja, S.; Hunsche, M.; Noga, G.; Fiebiga, A. Monitoring physiological and biochemical responses of two apple cultivars to water supply regimes with non-destructive fluorescence sensors. *Scientia Hort.* **2018**, *242*, 51–61, doi: 10.1016/j.scienta.2018.07.008.
27. Dick, W.A.; Tabatabai, M.A. Significance and potential uses of soil enzymes. *Environ. Manag.* **1992**, 95–125.
28. Grzesik, M.; Romanowska-Duda, Z.B.; Piotrowski, K. The effect of potential climatic changes, *Cyanobacteria*, *Biojodis* and *Asahi SL* on development of the Virginia fanpetals (*Sida hermaphrodita*) plants. *Pamiętnik Puławski* **2009**, *151*, 483–491.
29. Grzesik, M.; Romanowska-Duda, Z. Improvements in germination, growth, and metabolic activity of corn seedlings by grain conditioning and root application with cyanobacteria and microalgae. *Pol. J. Environ. Stud.* **2014**, *23*, 1147–1153.
30. Romanowska-Duda, Z.; Grzesik, M.; Kalaji, H.M. Phytotoxkit test in growth assessment of corn as an energy plant fertilized with sewage sludge. *Environ. Prot. Eng.* **2010**, *36*, 73–81.
31. Romanowska-Duda, Z.; Janas, R.; Grzesik, M. Application of Phytotoxkit in the quick assessment of ashes suitability as fertilizers in sorghum crops. *Inter. Agrophysics* **2019**, *33*, 145–152, doi: 10.31545/intagr/104597.
32. Kordas, L.; Gienza-Mikoda, M.; Jabłońska, M. Evaluation of energy value of sorghum varieties depending on the time, sowing density and fertilization. *Fragm. Agron.* **2012**, *29*, 114–119.
33. Fahramand, M.; Moradi, H.; Noori, M.; Sobhkhizi, A.; Adibian, M.; Abdollahi, S.; Rigi, K. Influence of humic acid on increase yield of plants and soil properties. *Inter. J. Farm. Alli. Sci.* **2014**, *3*, 339–341.
34. Górnik, K.; Grzesik, M.; Romanowska-Duda, B.Z. The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. *J. Fruit Orn. Plant Res.* **2008**, *16*, 333–343.
35. Piotrowski, K.; Romanowska-Duda, Z.; Grzesik, M. How biojodis and cyanobacteria alleviate the negative influence of predicted environmental constraints on growth and physiological activity of corn plants 2016. *Pol. J. Environ. Stud.* **2016**, *25*, 741–751, doi: 10.15244/pjoes/60894.
36. Jeznach, A. General description of organic and mineral fertilizer “Stymjod” intended for foliar fertilization of plants. 2015. Available online: http://www.phu-jeznach.com.pl/doc/Stymjod/Opis_preparatu_STYMJOD_2.pdf (accessed 28 July 2018).
37. Smoleń, S.; Sady, W.; Rożek, S.; Ledwożyw-Smoleń, I.; Strzetelski, P. Preliminary evaluation of the influence of iodine and nitrogen fertilization on the effectiveness of iodine biofortification and mineral composition of carrot storage roots. *J. Elementol.* **2011**, *16*, 275–285.
38. Pszczółkowska, A.; Romanowska-Duda, Z.; Pszczółkowski, W.; Grzesik, M.; Wysokińska, Z. 2012. Biomass production of selected energy plants: Economic analysis and logistic strategies. *Comp. Econ. Res.* **2012**, *15*, 77–103.
39. Romanowska-Duda, Z.; Piotrowski, K.; Wolska, B.; Dębowski, M.; Zieliński, M.; Dziugan, P.; Szufa, S. *Stimulating Effect of Ash from Sorghum on the Growth of Lemnaceae—A New Source of Energy Biomass*; Springer International Publishing: New York, NY, USA, 2020; pp. 341–349.
40. KołECKA, K.; Gajewska, M.; Obarska-Pempkowiak, H. Integrated dewatering and stabilization system as the environmentally friendly technology in sewage sludge management in Poland. *Ecol. Eng.* **2017**, *98*, 346–353, doi:10.1016/j.ecoleng.2016.08.011.
41. Dzikuć, M.; Kuryło, P.; Dudziak, R.; Szufa, S.; Dzikuć, M.; Godzisz, K. Selected aspects of combustion optimization of coal in power plants. *Energies* **2020**, *13*, 2208, doi:10.3390/en13092208.

42. Szufa, S.; Wielgosiński, G.; Piersa, P.; Czerwińska, J.; Dzikuć, M.; Adrian, Ł.; Lewandowska, W.; Marczak, M. Torrefaction of straw from oats and maize for use as a fuel and additive to organic fertilizers—TGA analysis, kinetics as products for agricultural purposes. *Energies* **2020**, *13*, 2064, doi:10.3390/en13082064.
43. Jewiarz, M.; Wróbel, M.; Mudryk, K.; Szufa, S. Impact of the drying temperature and grinding technique on biomass grindability. *Energies* **2020**, *13*, 3392, doi: 10.3390/en13133392.
44. Szufa, S.; Dzikuć, M.; Adrian, Ł.; Piersa, P.; Romanowska-Duda, Z.; Lewandowska, W.; Marczak, M.; Błaszczuk, A.; Piwowar, A. Torrefaction of oat straw to use as solid biofuel, an additive to organic fertilizers for agriculture purposes and activated carbon—TGA analysis, kinetics. In proceedings of 6th International Conference—Renewable Energy Sources, Krynica, Poland, 12–14 June 2019.
45. Szufa, S.; Adrian, Ł.; Piersa, P.; Romanowska-Duda, Z.; Ratajczyk-Szufa, J. Torrefaction process of millet and cane using batch reactor. In *Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation, Springer Proceedings in Energy*; Wróbel, M., Jewiarz, M., Szłęk, A., Eds.; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2019; pp. 371–379.
46. Szufa, S.; Adrian, Ł.; Piersa, P.; Romanowska-Duda, Z.; Grzesik, M.; Cebula, A.; Kowalczyk, S. Experimental studies on energy crops torrefaction process using batch reactor to estimate torrefaction temperature and residence time. In *Renewable Energy Sources: Engineering, Technology, Innovation*; Springer: Cham, Switzerland, 2018; pp. 365–373.
47. Szufa, S.; Romanowska-Duda, B.Z.; Grzesik, M. Torrefaction proces of the phragmites communis growing in soil contaminated with cadmium. In Proceedings of the 20th European Biomass Conference and Exhibition, Milan, Italy, 18–22 June 2014; pp. 628–634.
48. Ławińska, K.; Szufa, S.; Obraniak, A.; Olejnik, T.; Siuda, R.; Kwiatek, J.; Ogrodowczyk, D. Disc granulation process of carbonation lime mud as a method of post-production waste management. *Energies* **2020**, *13*, 3419, doi.org/10.3390/en13133419.
49. Arias, B.; Pevida, C.; Famoso, J.; Plaza, M.G.; Rubiera, F.; Pis, J.J. Influence of torrefaction on the grindability and reactivity of woody biomass. *Fuel Process. Technol.* **2008**, *89*, 169–175.
50. Knypl, J.S.; Kabzińska, E. Growth, phosphatase and ribonuclease activity in phosphate deficient *Spirodela oligorrhiza* cultures. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **1977**, *171*, 279–287, doi: 10.1016/S0015-3796(17)30311-6.
51. Górnik, K.; Grzesik, M. Effect of Asahi SL on China aster ‘Aleksandra’ seed yield, germination and some metabolic events. *Acta Physiol. Plant.* **2002**, *24*, 379–383, doi:10.1007/s11738-002-0033-5.
52. Szufa, S.; Piersa, P.; Czerwińska, J.; Adrian, Ł.; Dzikuć, M.; Lewandowska, W.; Wróbel M.; Jewiarz, M.; Knapczyk, A. Drying and torrefaction processes of miscanthus for use as a pelletized solid biofuel and carrier to organic fertilizers—Kinetics, TGA-analysis and VOC-analysis. *Energies* **2020**, in press.

Sample Availability: Samples of the compounds of untreated and torrefied Jerusalem Artichoke plus their ashes are available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).