

---

# Praktyczne zastosowania badań mikro- BIOLOGICZNYCH

pod redakcją  
Wojciecha Truszkowskiego





# Praktyczne zastosowania badań mikrobiologicznych



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Praktyczne zastosowania  
badań mikrobiologicznych**

pod red. Wojciecha Truszkowskiego

Olsztyn 2019

# Praktyczne zastosowania badań mikrobiologicznych

Monografia naukowa pod redakcją  
dr. Wojciecha Truszkowskiego

Recenzenci:

dr hab. Anna Biedunkiewicz

dr hab. Marta Damszel

Korekta:

Irmina Sitkowska

Nakład: 30 egz.

10 ark. wyd.

ISBN 978-83-943385-9-6

© Katedra Agrotechnologii, Zarządzania Produkcją Rolniczą i Agrobiznesu,  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Druk: Zakład Poligraficzny Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie

Olsztyn 2019

Monografia zawiera teksty artykułów nadesłane przez uczestników 48. MSKN „Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych. Kola naukowe szkołą twórczego działania” i to autorzy ponoszą odpowiedzialność za przedstawione treści.

## SPIS TREŚCI

<b>WPROWADZENIE</b> .....	7
<b>ROZDZIAŁ I. WPLYW MIKROORGANIZMÓW NA BEZPIECZEŃSTWO SANITARNE I EKOLOGICZNE</b>	
MARTYNA BUTA Obecność genów integrazy wśród bakterii ściekowych .....	11
KAROLINA NOWACKA Różnorodność gatunkowa grzybów fitopatogenicznych fylosfery wybranych makrofitów jezior Skanda i Kortowskie .....	22
WIKTOR ZIELIŃSKI Występowanie grzybów rodzaju <i>Aspergillus</i> w wodzie z fontanny w Parku Centralnym w Olsztynie .....	37
KAMILA KULESZA Obce i inwazyjne gatunki grzybów fitopatogenicznych w Polsce .....	48
MILENA TRAUT Endobakterie porostów wybranych gatunków występujących na Spitsbergenie .....	58
<b>ROZDZIAŁ II. ZNACZENIE WIEDZY MIKROBIOLOGICZNEJ W ROLNICTWIE I OGRODNICTWIE</b>	
DAMIAN IWAŃSKI, MICHAŁ DZIWAŁ Wpływ wybranych cytokinin na wydajność mikrorozmnażania <i>Alternanthera reineckii</i> 'roseafolia' .....	69
MICHAŁ DZIWAŁ, DAMIAN IWAŃSKI, IZABELA WIERUCKA Wpływ cytokinin na regenerację kaptownicy oskrzydłonej ( <i>Sarracenia alata</i> ) .....	80
MARTA KOTŁOWSKA, KAROLINA PRZETAKIEWICZ, GRZEGORZ DZIENIS Charakterystyka grzybów występujących na liściach cyklamena ( <i>Cyclamen L.</i> ) .....	87
KAROLINA PRZETAKIEWICZ, MARTA KOTŁOWSKA, GRZEGORZ DZIENIS Występowanie grzybów na liściach fiołka ogrodowego ( <i>Viola wittrockiana</i> ) wykazujących objawy chorobowe .....	100

### ROZDZIAŁ III. ZASTOSOWANIE MIKROBIOLOGII W WYBRANYCH PROCESACH PRZEMYSŁOWYCH

IZABELA KONIUSZEWSKA

Wpływ mikroorganizmów na jakość piwa – ocena mikrobiologiczna surowców, produktu i procesu technologicznego ..... 113

KAROLINA SZACHERSKA

Wpływ limitacji azotu na syntezę polihydroksykwasów ..... 124

PAULINA MARCINIAK

Wpływ warunków limitujących na syntezę polihydroksykwasów przez *Pseudomonas* sp. *GL01* ..... 136

### ROZDZIAŁ IV. WPLYW WIEDZY O MIKROORGANIZMACH NA PROJEKTOWANIE BADAŃ NAUKOWYCH

JAKUB TADEUSZ KOWALIK

Zastosowanie technik mikroskopowych w badaniach konsorcjów mikrobialnych ... 149

TOMASZ BAŁABAŃSKI

Wymagania pokarmowe grzybów w kontekście zasad konstruowania podłoży diagnostycznych ..... 168

SYLWIA MACHCIŃSKA

Częstość izolowania mikrogrzybów z wybranych ontocenoz myszy laboratoryjnych ..... 178

KAROL MAKOWCZENKO

Charakterystyka genomu mitochondrialnego *Fusarium avenaceum* (Fr. & Sacc., 1886) ..... 185

### ROZDZIAŁ V. WPLYW MIKROORGANIZMÓW NA ZDROWIE CZŁOWIEKA

MARTYNA BUCZKOWSKA

Zearalenon - wpływ mykotoksyny na zdrowie oraz życie człowieka i zwierząt ... 199

JAKUB HUBENY

Antybiotykooporność i bakteriocynogenność bakterii izolowanych z jamy ustnej człowieka ..... 209



# Wprowadzenie

Wiedza mikrobiologiczna znajduje szerokie zastosowanie w rozwiązywaniu problemów życia codziennego. Szczególną uwagę zwraca się na dziedziny, w których drobnoustroje mogą spowodować znaczące straty lub wpłynąć korzystnie na efektywność prowadzonych procesów produkcyjnych.

Wspomaganie uprawy roślin, udział w produkcji żywności, możliwość zapobiegania jałowieniu gleby, powstrzymywanie psucia się żywności oraz leczenie chorób ludzi i zwierząt, stawia badania mikrobiologiczne w rzędzie najistotniejszych dyscyplin nauki. Tym bardziej, że szczególne właściwości bakterii, pierwotniaków, wirusów, glonów i grzybów, pozwalają na odkrywanie coraz to nowych sposobów wykorzystania metabolitów dostarczanych przez mikroorganizmy w medycynie, w przemyśle i ochronie środowiska. Badania mikrobiologiczne pozwalają na lepsze zrozumienie i sterowanie procesami biochemicznymi oraz tworzenie szczepów o pożądanym właściwościach.

Celem monografii jest prezentacja różnorodnych zastosowań wyników badań mikrobiologicznych wraz z oceną możliwości rozwoju poszczególnych kierunków badawczych.

Aby osiągnąć cel, poszczególne rozdziały przedstawiono zgodnie z podziałem funkcjonalnym mikrobiologii. W rozdziale pierwszym zwrócono uwagę na znaczenie środowiskowe mikroorganizmów. Poruszono zagadnienia występowania drobnoustrojów w wybranych ekosystemach. Skupiono się także na znaczeniu tych organizmów w oczyszczaniu ścieków.

Rozdział drugi poświęcono mikrobiologii rolniczej i wpływowi drobnoustrojów na glebę oraz efektywność prowadzonej produkcji w rolnictwie oraz gospodarstwach ogrodniczych.

W rozdziale trzecim umieszczono prace wskazujące na związek tej dyscypliny naukowej z projektowaniem procesów przemysłowych. Posłużono się przykładami zarówno z przemysłu spożywczego, jak i produkcji biodegradowalnych tworzyw sztucznych.

Rozdział czwarty obejmuje rozważania dotyczące mikrobiologii ogólnej. Przedstawia przebieg wybranych procesów. Przede wszystkim skupiono się na wpływie przygotowania środowiska laboratoryjnego do prowadzenia wiarygodnych badań.

Rozdział piąty przedstawia wykorzystanie mikroorganizmów w naukach medycznych. Uwzględniono tu także zjawisko antybiotykooporności.

Monografia została zredagowana z prac przygotowanych i przedstawionych przez uczestników 48. Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych, które odbyło się na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie w dniach 11-12 kwietnia 2019 r. Opracowanie zawiera referaty z zakresu nauk biologicznych. Autorami rozdziałów są studenci i doktoranci realizujący badania w ramach pracy kół naukowych. Każdy rozdział został zrecenzowany przez dwóch pracowników naukowych.

Za powstanie niniejszego opracowania podziękowania należą się przede wszystkim uczestnikom 48. MSKN – autorom prac, recenzentom, osobom zaangażowanym w sprawną organizację poszczególnych sekcji oraz Konferencji, jako całości, a także władzom Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa.

*Wojciech Truszkowski*

## **Rozdział I**

# **Wpływ mikroorganizmów na bezpieczeństwo sanitarne i ekologiczne**



## Obecność genów integrazy wśród bakterii ściekowych

### The presence of integrase genes among wastewater bacteria

Martyna Buta

Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie  
Wydział Nauk o Środowisku  
Naukowe Koło Mikrobiologów Molekularnych „COCCUS”  
Opiekun koła: dr hab. inż. Monika Harnisz, prof. UWM

#### Abstract

Nowadays, wastewater treatment plants use many kinds of technological solutions to purify sewage. According to the type of supplied sewage, it can contain different quantities and species of microorganisms. The most hazardous are sewage which are delivered from hospitals because they contain pathogenic bacteria derived from the hospital patients. Equally important part of the wastewaters are industrial and domestic sewage. Those bacteria owe their virulence mainly to mobile genetic elements that include plasmids, transposons and integrons.

The aim of the study was to demonstrate a presence of integrase genes of classes 1 and 2 in the wastewater bacteria that were inoculated on mFc and TSA medium. The presence of *intI1* and *intI2* genes were analyzed by standard PCR reaction using specific primers and thermal- time profile. Samples of the treated and untreated wastewater was collected from 13 WWTPs of the Warmia and Mazury region. All chosen to this study WWTPs were characterized by different treatment systems. Results of this study indicate the presence of both genes regardless of the type of purifying system. Genes *intI1* and *intI2* were identified in both untreated and treated wastewater which is alarming concern for human health. The results of this study indicate a possibility of spreading the integrase genes, which are responsible for acquisition of antibiotic resistance by bacteria genes, into the environment. The results also underline the importance to improve new modification of purifying systems in WWTPs in order to effectively eliminate integrase genes from wastewater and restrict a risk of contamination of surface water reservoirs receiving WWTPs' effluents.

**Keywords:** integrons, integrase genes, wastewater, antibiotic resistance

#### Wstęp

Zgodnie z Ustawą z dn. 22 kwietnia 2005r., praca przy oczyszczaniu ścieków znajduje się w wykazie prac stanowiących zagrożenie dla zdrowia, pod kątem szkodliwych czynników biologicznych, w skład których wchodzi bakterie, wirusy, grzyby i pasożyty wewnętrzne człowieka (DZ.U.05.81.716 2008.04.05). Drobnoustroje, które posiadają potencjał chorobotwórczy lub które nabyły go na drodze przepływu genów m.in. przez horyzontalny transfer genów (HTG) czy w wyniku wykształcenia ich w ramach działania czynników ewolucyjnych jako adaptacje do niekorzystnego lub zmieniającego się środowiska, są

mikroorganizmami szczególnie niebezpiecznymi dla zdrowia i życia ludzi (Calo i in. 2013; Li, Zhang 2012). Elementy odpowiedzialne za zjadliwość takich drobnoustrojów to m.in. adhezyny, mucynazy, toksyny, syderofory oraz wiele syntetyzowanych przez komórki białek wirulencji o szeregu różnych funkcji.

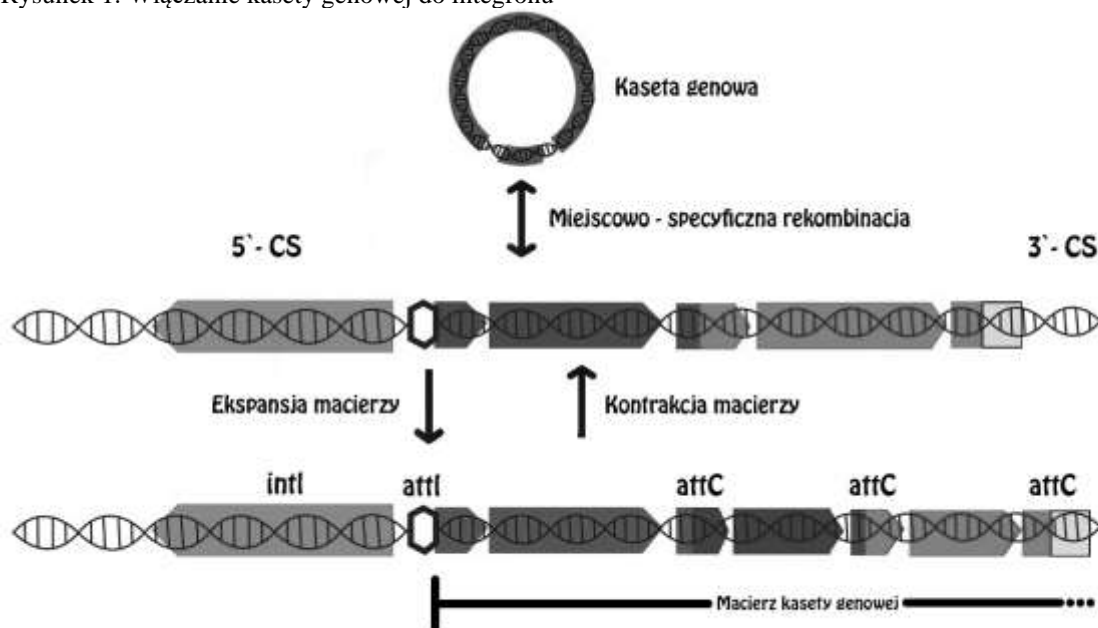
Poza biochemicznymi elementami gwarantującymi zjadliwość drobnoustrojów, istnieje także wiele molekularnych czynników wirulencji, do których zalicza się m.in. plazmidy, transpozony, retrotranspozony czy integrony mające związek z mechanizmem HTG.

Integrony są krótkimi fragmentami DNA, zwanymi ruchliwymi elementami genetycznymi (MGEs), które mogą być przenoszone między bakteriami tego samego lub różnych gatunków. Razem z transpozonami, plazmidami integracyjnymi czy wyspami genomowymi, stanowią główny mechanizm genetyczny odpowiedzialny za rozpowszechnianie genów determinujących wirulencję i oporność, które są przenoszone i powielane wskutek HTG (Nikonorow i in. 2013; Jaworski i in. 2016).

Wszystkie integrony charakteryzują się trzema zasadniczymi cechami budowy. Pierwszą cechą stanowi obecność *intI*, genu kodującego integrację (*intI*) – tyrozinę należącą do enzymów z rodziny rekombinaz. Na podstawie sekwencji aminokwasowej integrazy, wyodrębniono podział integronów na klasy. Enzym ten katalizuje reakcję rekombinacji pomiędzy włączanymi kasetami genowymi a związanym z integronem miejscem rekombinacji *attI*, które stanowi drugą podstawową jego cechę. Podczas takiej rekombinacji, dochodzi do ekspresji trzeciego specyficznego obszaru integronu – promotora, *P<sub>c</sub>*, umożliwiającego ekspresję ramek odczytu, które kodowane są przez włączane kasety genowe (Gillings 2014). Taka struktura określana jest mianem miejsca konserwatywnego 5', stanowiącego niezbędne minimum dla aktywności integronu (Wolinowska i in. 2002).

Wychwytywanie ze środowiska genów w postaci wolnego materiału genetycznego i integrowanie go z własnym, ma udział w kształtowaniu się zmienności, przez co ma ogromne znaczenie ewolucyjne (Rowe-Magnus i Mazel 2001). Integrony potrafią przyłączyć pojedynczy nowy gen lub grupę genów w obrębie chromosomu, jak i w pozachromosomalnym DNA (Sandvang i in. 1998). Kasety genowe mogą być włączane przypadkowo lub na skutek oddziaływania czynników środowiska, jako mechanizm adaptacyjny do zmieniających się warunków (Abella i in. 2015).

Rysunek 1. Włączanie kasety genowej do integronu



Źródło: Opracowanie własne na podstawie Gillings 2014, Escudero i in. 2014.

Większość poznanych dotychczas integronów, niesie niemal wyłącznie nowe geny odpowiedzialne za oporność na antybiotyki. Stanowi to poważny i powszechny już na całym świecie problem związany z brakiem skutecznych sposobów leczenia zakażeń wywołanych przez drobnoustroje.

Oczyszczanie ścieków komunalnych polega na wykorzystaniu metod mechanicznych, biologicznych, chemicznych a także mieszanych oraz dezynfekcji. Mimo, że procesy oczyszczania umożliwiają zredukowanie liczby bytujących w ściekach drobnoustrojów o ponad 99%, ścieki odprowadzane wciąż zawierają znaczne ilości wskaźnikowych bakterii kałowych, kształtujące się w granicach  $10^4 - 10^6/100 \text{ cm}^3$  (Ołańczuk–Neyman i in. 2003). Ważny jest zatem odpowiedni dobór procesów technologicznych oraz kontrola ich parametrów.

## Cel i metody

Celem niniejszej pracy była identyfikacja genów integrazy integronów klasy pierwszej i drugiej w próbkach materiału biologicznego, pochodzącego ze ścieków nieoczyszczonych oraz oczyszczonych, pobieranych na terenie trzynastu oczyszczalni zlokalizowanych w obrębie województwa warmińsko – mazurskiego.

W celu analizy laboratoryjnej pobrane zostały próbki ścieków oczyszczonych (2L) i nieoczyszczonych (1L), pochodzące z dopływów i odpływów ścieków do gleby lub zbiorników powierzchniowych z 13 oczyszczalni zlokalizowanych w obszarze województwa warmińsko – mazurskiego. Każda z oczyszczalni charakteryzowała się stosowaniem innych rozwiązań technologicznych w oczyszczaniu ścieków z wykorzystaniem osadu czynnego, m.in. układ A2/0, oczyszczanie mechaniczno – biologiczne (MB), oczyszczanie mechaniczno – biologiczne z podwyższonym stopniem usuwania związków biogennych, reaktor okresowy (SBR), oczyszczanie mechaniczno – biologiczno – chemiczne z podwyższonym stopniem usuwania związków biogennych (CBR – FOS), oczyszczanie biologiczne (BIOPAK), oczyszczanie mechaniczno – biologiczno – chemiczne z podwyższonym stopniem usuwania związków biogennych (Bordenpho 3 – stopniowe), oczyszczanie SBR z podwyższonym stopniem usuwania związków biogennych.

Pobrane próbki ścieków w objętości 10, 1,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  cm<sup>3</sup>, poddane zostały filtracji z wykorzystaniem filtrów membranowych o średnicy 0,45 μm (Millipore), które następnie umieszczono w płytkach Petriego z podłożem TSA (Oxoid) służącym do określenia ogólnej liczby drobnoustrojów i z podłożem mFc (Merck), umożliwiającym hodowlę pałeczek jelitowych, bez oraz z dodatkiem antybiotyków: amoksycyliny, cefotaksymu, doksycyliny i oksytetracykliny w stężeniach zgodnych z zaleceniami EUCAST (Komitet Europejski ds. testowania wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe). Tak przygotowane wysiewy, inkubowane były w warunkach: TSA- 30°C/ 48 h, mFc- 44.5±0.2°C/24 h.

Po inkubacji zliczono charakterystyczne dla wzrostu *E. coli* kolonie o ciemnoniebieskim zabarwieniu. Następnie drobnoustroje razem z filtrami z obu podłoży przeniesiono do jałowych probówek Falcon, po czym dodano 30 cm<sup>3</sup> roztworu PBS i wytrząsano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, przy częstotliwości 300 rpm. Po wytrząsaniu filtry usunięto a roztwór PBS odwirowano w probówkach Eppendorf w warunkach 4°C/10 minut/9000 rpm. Uzyskany w ten sposób osad został zawieszony w 100 μl buforu Tris, który zapoczątkował lizę zawieszonych komórek.

Uzyskaną w wyniku hodowli, płukania i wirowania zawiesinę drobnoustrojów, poddano izolacji bakteryjnego genomowego DNA z wykorzystaniem dwóch zestawów: Genomic Micro AX Bacteria oraz Gravity (A&A Biotechnology). Każda z metod izolacji DNA została przeprowadzona zgodnie z zaleceniami zawartymi w protokole producenta. Uzyskany bakteryjny gDNA przechowywano w temperaturze -20°C do momentu dalszych analiz.



W celu przystąpienia do wykonania reakcji PCR, przygotowano mieszaninę reakcyjną o objętości 20  $\mu$ l/próbkę. Dokładny skład mieszaniny zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR wg Goldstein

Odczynnik	Objętość [ $\mu$ l] / 1 próbkę
10 $\mu$ M starter forward	0,5
10 $\mu$ M starter reverse	0,5
Run polimeraza 1U A&A Biotechnology	1
10 x PCR bufor	2
100 mM DTP Mix	0,6
DNA	2
dd H <sub>2</sub> O jałowa	13,4

Źródło: Opracowanie własne.

Do reakcji amplifikacji użyto odpowiednich starterów zgodnie z tabelą 2. Próbkę poddawane były reakcji PCR w termocyklerze firmy Eppendorf. Dokładny profil temperaturowo – czasowy podano w tabeli 6.

Tabela 2. Używane startery w reakcji PCR wg Goldstein

Oznaczany gen	Użyte primery		Długość zamplifikowanego produktu (pz)
<i>intI1</i>	Forward	CCTCCCGCACGATGATC	280
	Reverse	TCCACGCATCGTCAGGC	
<i>intI2</i>	Forward	TTATTGCTGGGATTAGGC	233
	Reverse	ACGGCTACCCTCTGTTATC	

Źródło: Opracowanie własne.

Po wykonaniu reakcji PCR przystąpiono do sporządzenia 2% żelu agarozowego. W tym celu rozpuszczono agarozę w buforze (1 x TAE) umieszczonego w szklanej butelce typu SIMAX. Do rozpuszczonej, lekko ostudzonej agarozy, dodano bromek etydyny (0,5  $\mu$ g/ cm<sup>3</sup>) i delikatnie wymieszano. Tak przygotowany żel wylano do sanek z umieszczonymi w nich grzebieniami i odczekano do całkowitego ścięcia się żelu. Po polimeryzacji żelu usunięto grzebienie oraz umieszczono go w wypełnionym buforem (1 x TBE) aparacie do elektroforezy.

Przed przeniesieniem próbek do studzienek w żelu agarozowym, zostały one zmieszane z buforem obciążającym. Następnie każda ze 104 próbek została umieszczona w osobnej studzience. Na początku i na końcu rzędów studzienek, naniesiono marker wielkości DNA. Elektroforezę prowadzono w warunkach 130V przez 15 minut a następnie w 80V przez kolejne 60 minut. Żel z uzyskanymi produktami obserwowano z wykorzystaniem transiluminatora.

Tabela 3. Parametry etapów reakcji PCR wg Goldstein

Etap		Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna		94 °C	5 min.	1
Denaturacja		94 °C	45 sek.	35
Hybrydyzacja (annealing)	<i>intI1</i>	54 °C	45 sek.	
	<i>intI2</i>	68 °C	1 min.	
Elongacja		72 °C	10 min.	
Przetrzywanie		4 °C	∞	1

Źródło: Opracowanie własne.

## Wyniki

Analizując produkty rozdziału elektroforetycznego, pochodzące z próbek ścieków nieoczyszczonych, z których drobnoustroje wyhodowane zostały na podłożu mFc, należy stwierdzić, że *intI1* były obecne w 11 na 13 próbek. W próbkach pochodzących ze ścieków po procesie oczyszczania, geny te zostały odnotowane w 10 próbkach.

W przypadku materiału genetycznego, izolowanego z hodowli na podłożu TSA z próbek ścieków nieoczyszczonych, produkty rozdziału pozwoliły na stwierdzenie obecności genu *intI1* w większości próbek, z wyłączeniem czterech z nich. W próbkach po procesie oczyszczania, geny integrazy kodujące integrony należące do klasy 1, były obecne już tylko w pięciu próbkach.

Frekwencja genu *intI2* była wysoka zarówno w przypadku próbek pochodzących ze ścieków oczyszczonych, jak i nieoczyszczonych. Dotyczyło to zarówno materiału genetycznego pochodzącego z hodowli na podłożu mFc, jak i TSA. Uzyskane produkty rozdziału elektroforetycznego wskazywały na absencję *intI2* tylko w jednej próbce ścieków nieoczyszczonych, materiału pochodzącego z hodowli na podłożu mFc oraz w próbce pochodzącej ze ścieków po procesie oczyszczania (materiał z hodowli na pożywce TSA).

## Dyskusja

Pomimo postępującej technologii, której przejawy można zauważyć także w nowych systemach dążących do oczyszczania i unieszkodliwiania ścieków o różnym pochodzeniu, wciąż istotnym problemem są pozostające w ściekach po procesie ich oczyszczania znaczne ilości drobnoustrojów (Korzeniewska, Harnisz 2018). W ich skład wchodzi m.in. mikroorganizmy potencjalnie chorobotwórcze, które nierzadko mogą posiadać w swoim genomie elementy odpowiedzialne za wylapywanie ze środowiska i wbudowywanie we własny materiał genetyczny genów m.in. kodujących oporność na antybiotyki. Efektywność oczyszczania ścieków z występujących w nich mikroorganizmów sięgać może nawet 99,7-

99,9 % (Korzeniewska, Harnisz 2018; Osińska i in 2017a), jednak tę pozostałość wciąż stanowić może około  $10^4 - 10^6$  jtk/100 cm<sup>3</sup> wskaźnikowych bakterii typu kałowego (Szumilas i in. 2001).

Tabela 4. Występowanie genów integrazy w bakteryjnym materiale genetycznym pochodzącym z podłoża mFc oraz TSA

Rodzaj ścieków	Nieoczyszczone												
Podłoże I	mFc												
Numer próbki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>intI1</i>	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	-	ob	ob	-	ob
<i>intI2</i>	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	-	ob	-	ob	ob
Podłoże II	TSA												
<i>intI1</i>	ob	ob	ob	ob	ob	ob	-	ob	ob	-	-	ob	-
<i>intI2</i>	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob
Rodzaj ścieków	Oczyszczone												
Podłoże I	mFc												
Numer próbki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>intI1</i>	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	-	ob	ob	-	ob
<i>intI2</i>	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	-	ob	-	ob	ob
Podłoże II	TSA												
<i>intI1</i>	-	ob	-	ob	ob	-	-	-	ob	-	-	ob	-
<i>intI2</i>	ob	ob	-	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob	ob

Źródło: Opracowanie własne. Legenda: obecność genu (ob); brak obecności genu (-).

Niniejsze badania wskazują na wysoką frekwencję genu *intI1* zarówno w ściekach przed, jak i po oczyszczaniu w materiale genetycznym, pochodzącym od drobnoustrojów wyhodowanych na podłożu mFc. Z tego faktu wynika, iż pałeczki jelitowe, które dopływają wraz ze ściekami do oczyszczalni, są obarczone tym genem, który zostaje tam nawet po procesie oczyszczania. W przypadku trzech oczyszczalni, po procesie oczyszczania nie odnotowano już *intI1* w próbkach, w których były one obserwowane przed procesem oczyszczania, jednak zaobserwowano także sytuacje, w których *intI1* pojawiają się po procesie oczyszczania, pomimo że nie były one obecne w próbkach ścieków nieoczyszczonych. Jest to

dość niepokojący wynik, który wskazuje jednoznacznie na kontaminację ścieków materiałem genetycznym zawierającym integrony klasy 1 na jednym z etapów oczyszczania. Literatura odnotowała już wcześniej podobne przypadki, które stawiają stosowane powszechnie systemy oczyszczania ścieków w niekorzystnym świetle. Z wcześniej prowadzonych badań wynika, że oczyszczalnie ścieków, stanowią potencjalne miejsce rozprzestrzeniania się drobnoustrojów chorobotwórczych i opornych na antybiotyki a drobnoustroje te oraz same ich geny, mogą być przyczyną rozpowszechniania zjadliwości w środowisku (Calhau i in. 2015; Osińska i in. 2017b). Korzeniewska i Harnisz (2018) obserwowały znacznie większą liczbę ARB w miejscach odpływu ścieków z tych samych oczyszczalni, w porównaniu z miejscami ich dopływu. Szczególnym rezerwuarem genów wirulencji oraz mikroorganizmów posiadających takie geny są szpitale, na skutek działalności których, nieczystości z tych ośrodków odprowadzane są do oczyszczalni (Jakobsen i in. 2008).

Kolejnym bardzo prawdopodobnym elementem przyczyniającym się do rozprzestrzeniania genów lekooporności w oczyszczalniach, jest materia organiczna i nieorganiczna, dostająca się do nich wraz ze ściekami komunalnymi czy bytowo - gospodarczymi. Istotę stanowią tutaj antybiotyki i/lub ich pozostałości, których zawartość w doprowadzanych do oczyszczalni ściekach wzrasta wraz z nadchodzącym sezonem zimowym, w którym notuje się wzmożone zużycie antybiotyków. Fakt ten wiąże się z kolei z notowaną w tym okresie podwyższoną frekwencją genu *intI1* w wodzie rzecznej w pobliżu ujścia ścieków po procesie oczyszczania (Mokracka i in. 2016). Po analizie wyników odnotowanych dla próbek ścieków przed procesem oczyszczania, z których zawiesiny bakteryjne inkubowane były na podłożu TSA, stwierdzić należy, że do wielu z badanych oczyszczalni dopływają ścieki zawierające *intI1*. Widać jednak także, iż stosowane przez trzy oczyszczalnie (nr 1, 6 i 8) systemy oczyszczania ścieków skutecznie usunęły drobnoustroje posiadające ten gen. Trudno o stwierdzenie, że konkretny system oczyszczania przyczynia się istotnie do usuwania zagrożenia, jakim są m.in. geny integrazy w ściekach (Korzeniewska, Harnisz 2018). Absencję tych elementów stwierdzono w ściekach oczyszczonych z instalacji stosujących różne technologie oczyszczania. Brakuje także korelacji pomiędzy ilością dopływających ścieków do oczyszczalni czy ich rodzajem, a częstotliwością występowania genów integrazy klasy 1 i 2. Uzyskane wyniki podczas prowadzenia powyższych badań, wskazują na całkowitą losowość występowania genów *intI1* oraz *intI2* wśród bakterii ściekowych, co jest odmienną sytuacją w stosunku do badań prowadzonych przez Korzeniewską i Harnisz (2018), które wskazują na związek częstości występowania ARGs

w miejscu odpływu ścieków z rodzajem stosowanego systemu oczyszczania. W przypadku powyższej pracy, wspomniana losowość dotyczy zarówno materiału genetycznego pozyskanego od bakterii jelitowych (podłoże mFc), jak i pozostałych bakterii występujących w ściekach (podłoże TSA).

W celu redukcji zagrożenia, wynikającego z obecności w odprowadzanych do wód powierzchniowych ściekach znacznych ilości bakterii potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka, zaleca się stosowanie przez oczyszczalnie systemów opartych na metodach membranowych. Metoda membranowa polega na filtracji ścieków przez filtry o średnicy porów od 10  $\mu\text{m}$  do nawet 0,0001  $\mu\text{m}$  (Konieczny 2015). Podstawową rolą filtrów jest usunięcie zawiesin, które wpływają niekorzystnie na później stosowane metody dezynfekcji ścieków, jednak dodatkowo przyczyniają się one do redukcji liczebności bakterii mezofilnych, psychrofilnych, pałeczek jelitowych, paciorkowców kałowych oraz ogólnej liczby bakterii z grupy coli nawet do 60% (Quant i in. 2009). Dużą rolę odgrywają także zastosowane metody dezynfekcji, których rodzaj oraz parametry należy dostosowywać do typu oczyszczanych ścieków. Stosowanie wcześniej wspomnianej filtracji, pozwala z kolei na obniżenie dawki promieniowania podczas zastosowania dezynfekcji z użyciem promieniowania UV o nawet 20-30% przy zachowaniu wysokiej skuteczności redukcji mikroorganizmów, co przekłada się na korzyści ekonomiczne. Każda z metod filtracji czy dezynfekcji ma swoje wady i zalety, związane przede wszystkim z kosztami, problematycznością w sferze doboru metody do typu ścieków dopływających do danej oczyszczalni oraz wielu elementów natury technicznej (Konieczny 2015; Quant i in. 2009). Niemniej jednak, wyniki badań powyższej pracy, jak i badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich lat przez innych autorów, wskazują na zasadność pochylenia się nad problemem jakości mikrobiologicznej ścieków trafiających do wód użytkowanych przez ludzi i zwierzęta. Wskazane są także dalsze badania nad opracowaniem nowych metod, wysoce skutecznych w redukcji liczebności mikroorganizmów ściekowych lub inteligentne i przemyślane stosowanie metod już dostępnych, które przy odpowiedniej kombinacji, mają wysoką skuteczność w tej materii.

### **Podsumowanie i wnioski**

Ścieki różnego typu, pomimo ich oczyszczania w oczyszczalniach z wykorzystaniem odmiennych modyfikacji systemów oczyszczania, wciąż stanowią zagrożenie dla ludzi i środowiska.

Niedoczyszczone ścieki zawierające znaczne liczby drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych, w genomie których obecne są geny integrazy, mogą prawdopodobnie przyczynić się do rosnącej antybiotykooporności.

Możliwą przyczyną pojawiania się genów integrazy w ściekach po procesie ich oczyszczania jest transmisja tych genów pomiędzy drobnoustrojami na poszczególnych etapach oczyszczania ścieków.

Wskazana jest dalsza praca nad modyfikacją stosowanych metod oczyszczania ścieków w celu ograniczenia ryzyka kontaminacji częściowo oczyszczonych już ścieków oraz wzrostu redukcji ilości bakterii obecnych w ściekach odprowadzanych do wód powierzchniowych.

## Literatura

- Abella J., Bielen A., Huang L., Delmont T.O., Vujaklija D., Duran R., Cagnon C. 2015. *Integron diversity in marine environment*. Environ Sci Pollut Res. 22: 15360 - 15369.
- Calhau V., Mendes C., Pena A., Mendonca N., Da Silva G.J. 2015. *Virulence and plasmidic resistance determinants of Escherichia coli isolated from municipal and hospital wastewater treatment plants*. J Water Health. 13(2): 311-318.
- Calo S., Billmyre R., Heitman J. 2013. *Generators of phenotypic diversity in evolution of pathogenic microorganisms*. PLoS Pathog. 9(3): e1003181.
- DZ.U.05.81.716 2008.04.05 ZM. DZ.U.08.48.288 Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 22 kwietnia 2005r.
- Escudero J., Loot C., Nivina A., Mazel D. 2014. *The integron: adaptation on demand*. Microbiol Spectrum. 3(2): MDNA3-0019- 2014.
- Gillings M.R. 2014. *Integrans: Past, Present, and Future*. Microbiol Mol Biol R. 78(2): 257 – 277.
- Jakobsen, L., Sandvang, D., Hansen, L. H., Bagger-Skjot, L., Westh, H., Jorgensen, C., Sorensen, S. J. 2008. *Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant Escherichia coli from a Danish university hospital to the wastewater environment*. Environ Int. 34(1): 108-115.
- Jaworski A., Jurczak I., Adamczyk J. 2016. *Molecular mechanisms and cellular processes responsible for appearance and spread – out of bacterial species resistant to antibiotics in natural environment*. J Health Stu Med. 3: 29 – 50.
- Konieczny K. 2015. *Efektywność oczyszczania ścieków przy zastosowaniu reaktora membranowego*. Roczn. Ochr. Sr. 17(2): 1034-1052.
- Korzeniewska E., Harnisz M. 2018. *Relationship between modification of activated sludge wastewater treatment and changes in antibiotic resistance of bacteria*. Sci Total Environ. 639: 304–315.
- Li J., Zhang K. 2012. *Genetic diversity of microorganisms*. Yi Chuan. 34 (11): 1399 – 1408.
- Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A. 2002. *Wyspy patogenności*. Post Mikrobiol. 41(1): 51 – 69.

- Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M. 2013. *Oporność bakterii z rodziny Enterobacteriaceae na antybiotyki  $\beta$  – laktamowe wynikająca z wytwarzania  $\beta$  – laktamaz*. Post Mikrobiol. 52(3): 261 – 271.
- Ołańczuk – Neyman K., Geneja M., Quant B., Dembińska M., Kruczałak K., Kulbat E.,Haustein E., Mikołajski S., Gielert M. 2003. *Elimination of the chemical and microbiological pollutants in the modernized wastewater treatment plant „Wschód” in Gdańsk.*[w: ] *Environmental Engineering Studies. Polish Research on the way to the EU*. Ed.: Kluwer Academic/ Plenum Publishers USA: 235-258.
- Osińska A., Korzeniewska E., Harnisz M., Niestępski S.2017. *Impact of type of wastewater treatment process on the antibiotic resistance of bacterial populations*. E3S Web Conf. 17: 00070.
- Osińska A., Korzeniewska E., Harnisz M., Niestępski S. 2017. *The prevalence and characterization of antibiotic-resistant and virulent Escherichia coli strains in the municipal wastewater system and their environmental fate*. Sci Total Environ. 577: 367–375.
- Quant B., Bray R., Ołańczuk-Neyman K., Jankowska K., Kulbat E., Łuczkiwicz A., Sokołowska A., Fudala S. 2009. *Badania nad dezynfekcją ścieków oczyszczonych odprowadzanych do wód powierzchniowych*. Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk vol. 61, III Kongres Inżynierii Środowiska tom 4: 19–29.
- Roux K. H. 2009. *Optimization and troubleshooting in PCR*. Cold Spring Harb Protoc. 4: pdb-ip66.
- Rowe-Mangus D.A., Mazel D. 2001. *Integrans: natural tools for bacterial genome evolution*. Curr Opin Microbiol. 4(5): 565- 569.
- Sandvang D., Aerestrup F. M., Jensen L.B. 1998. *Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant Salmonella enterica Typhimurium DT104*. FEMS Microbiol Lett. 160: 37 – 41.
- Szumilas T., Michalska M., Bartoszewicz M. 2001. *Charakterystyka bakteryjnego zanieczyszczenia ścieków komunalnych dużej aglomeracji miejskiej i ocena stopnia redukcji tego zanieczyszczenia w procesie biologicznego oczyszczania ścieków*. ROCZN. PZH, 52 (2):155-164.
- Wolinowska R., Masny A., Płucienniczak A. 2002. *Integrony*. Kosmos Ser A. 51(3): 353 – 364.

## Różnorodność gatunkowa grzybów fitopatogenicznych fylosfery wybranych makrofitów jezior Skanda i Kortowskie

Species diversity of phytopathogenic phyllosfera fungi of selected  
macrophytes of Skanda and Kortowskie lakes

Karolina Nowacka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Studenckie Koło Naukowe Mykologów  
Opiekun: dr hab. Anna Biedunkiewicz

### Abstract

Fungi, from many systematic and trophic groups, are one of the basic components of the microbiological loop of waters of various origins, on which the functioning of the entire ecosystem depends. The occurrence of phytopathogenic fungi in the vegetation of the coastal zone and the underwater zone planted with plants determines the health condition of these plants. Available literature provides mainly information on research conducted in natural environments. In environments undergoing strong anthropopression of mycological research, there is little. Therefore, the aim of the study was to assess the species diversity of phytopathogenic fungi isolated from selected plants of the littoral zone of Lakes Skanda and Kortowskie.

From the selected rushes vegetation of the lakes studied, a total of 211 fungal isolates were obtained. The greatest species diversity of fungi - 25, was recorded at *Glyceria aquatica*. The lowest number of isolates was obtained on *Nuphar lutea* - 7.

**Keywords:** phytopathogenic fungi, phyllosphere, macrophytes

### Wstęp

Organizmy żyjące na innych organizmach i wywołujące u nich procesy chorobowe, nazywamy patogenami, czynnikami chorobotwórczymi lub etiologicznymi. Korzystając z substancji odżywczych gospodarza, zaburzają one większość procesów fizjologicznych, niszczą tkanki oraz osłabiają wzrost. Dość często patogeny doprowadzają do przedwczesnego zamierania rośliny (Fiederow i in. 1999).

Najliczniejszą grupę infekcyjnych czynników chorobotwórczych roślin stanowią grzyby. Powodują one około 85% chorób, wyrządzając w produkcji roślinnej straty sięgające 20% (Kochman 1986). Na roślinach, w warunkach naturalnych, dominującą grupę stanowią grzyby fitopatogeniczne oraz organizmy grzybopodobne. Choroby, które powodują, określa się



mykozami. Grzyby, znacznie wcześniej niż bakterie czy wirusy, zostały rozpoznane, jako patogeny roślin. Mają one wszechstronne możliwości rozprzestrzeniania się w uprawach roślin oraz przystosowywania do szerokiego spektrum warunków środowiska.

Przebieg choroby powodowanej przez grzyby, jej kolejne objawy oraz cały obraz (syndrom), zależą m.in. od miejsca i sposobu bytowania grzyba na/w roślinie oraz od mechanizmu odżywiania się tego grzyba. Często obraz ten dopełniają oznaki etiologiczne, czyli wytwory samego grzyba widoczne na zasiedlonej roślinie. Zmiany chorobowe mogą obejmować całe rośliny, oddzielne organy lub określone tkanki (Kryczyński 2002).

### Charakterystyka wybranych makrofitów

**Manna mielec (*Glyceria aquatica* (L.) Wahlb.)** to roślina należąca do rodziny wiechlinowatych (F: *Poaceae*), osiągająca wysokość do 70 cm. Nazywana jest również manną wodną, dużą lub wielką. Jest gatunkiem rodzimym pospolitym i występuje na terenie całego kraju (również w Europie i Azji). W Polsce najczęściej spotykana jest na terenach nizinnych. Występuje nad brzegami wód stojących i płynących oraz na wilgotnych, mokrych, żyznych łąkach, długotrwanie zalewanych. Jest szuwarowym makrofitem o szarozielonej barwie i lancetowatym kształcie liści. Ta obupłciowa roślina kwitnie od czerwca do sierpnia, a jej kwiatostanem jest okazała, wszechstronnie rozpierzchła piramidalna wiecha, z licznymi kłoskami (*Wirtualny Atlas Roślin*. <https://atlas.roslin.pl/>) (Rys.1).

Rysunek 1. Manna mielec



Źródło: <https://atlas.roslin.pl/plant/7090>

**Turzyca (*Carex* sp. L.).** Gatunki turzyc, należące do rodziny ciborowatych (F: *Cyperaceae*), stanowią ważny element wielu zbiorowisk wodnych, tworząc zazwyczaj duże obszarowo szuwały. Często są mylone z trawami, jednak ich łodygi są pełne, pozbawione kolanek oraz prawie zawsze trójkątnie w przekroju, liście są długie, rynienkowate, pochwiaste, ustawione w 3 prostnicach. Kwiaty są zredukowane i zebrane w kłosowate kwiatostany. Różnicując turzyce, zwraca się szczególną uwagę na:

- fizjonomię tworzonych przez nie skupień (mogą występować w formie darniowej lub kępkowej),
- budowie kwiatostanów (w okresie kwitnienia),
- liczbie znamion w słupku (Szoszkiewicz i in. 2010) (Rys.2.).

Rysunek. 2. Turzyca



Źródło: [https://sadzawka.pl/Carex\\_nigra-Turzyca\\_pospolita](https://sadzawka.pl/Carex_nigra-Turzyca_pospolita)

**Pałka wąskolistna (*Typha angustifolia* L.).** Gatunek należący do rodziny pałkowatych (F: *Typhaceae*) o szerokim spektrum zasiedlania. W Europie, Azji, Ameryce Północnej jest rośliną dziko rosnącą, w Polsce jest dość pospolity, szczególnie na terenach nizinnych. W wyższych partiach górskich występuje bardzo rzadko. Jest rośliną spotykaną w wodach stojących oraz wolno płynących, od oligotroficznych do eutroficznych, na podłożach piaszczystych lub gliniastych, tworząc duże szuwały roślinności przybrzeżnej najdalej wnikającej w toń wodną. Charakteryzuje ją znaczny udział w zarastaniu zbiorników wodnych, jednak stanowi fitocenozę dość krótkotrwałą, gdyż rozwija się tylko w siedliskach, na których jej korzenie i kłącza są zanurzone w wodzie (*Wirtualny Atlas Roślin*. <https://atlas.roslin.pl/plant/8127>) (Rys. 3).

Rysunek 3. Pałka wąskolistna



Źródło: <https://atlas.roslin.pl/plant/8127>

**Pałka szerokolistna (*Typha latifolia* L.)** Roślina należąca do rodziny pałkowatych (F: *Typhaceae*). Rozprzestrzeniona na całym świecie, w Polsce jest gatunkiem pospolitym. Spotykana na brzegach wód stojących oraz wolno płynących, tworząc rozległe, przeważnie jednogatunkowe szuwary. Należy do jednych z najważniejszych roślin jadalnych rosnących w dzikiej przyrodzie.

Pałka szerokolistna jest podobna do pałki wąskolistnej, od której różni się wyglądem kwiatostanu oraz wyraźną szerokością liści – u pałki wąskolistnej nie przekracza 1 cm, natomiast u pałki szerokolistnej osiąga 2cm (Szoszkievicz i in. 2010) (Rys.4.).

Rysunek 4. Pałka szerokolistna



Źródło: <https://atlas.roslin.pl/plant/8128>

**Grażel żółty** (*Nuphar lutea* L.) Inaczej bączywie, jest gatunkiem byliny wodnej, należącej do rodziny grzybieniowatych (F: *Nymphaeaceae*). Roślina o dużym zasiedleniu, w Europie oraz Azji jest gatunkiem pospolitym. Spotykany w stojących lub wolno płynących zbiornikach wodnych, w częstym towarzystwie grzybienia białego, jednak w odróżnieniu od niego wchodzi na większe głębokości (*Wirtualny Atlas Roślin*. <https://atlas.roslin.pl/plant/7455>) (Rys.5).

Rysunek 5. Grażel żółty



Źródło: <https://atlas.roslin.pl/plant/7455>

## Charakterystyka jezior

### Jezioro Skanda

Położone na terenie miasta Olsztyn, w województwie warmińsko-mazurskim. Należy ono do zbiorników o zaawansowanej eutrofii. Jest intensywnie wykorzystywane do celów turystyczno – rekreacyjnych (Furgała-Selezniow i in. 2011). Całkowita powierzchnia zbiornika wynosi 51,1 ha, a głębokość maksymalna sięga 12,0 m. Podążając wzdłuż jeziora, pokonamy odległość 1200 m, natomiast szerokość w najdłuższym przekroju wynosi 700 m (Jańczak 1999).

Według oceny stopnia antropizacji linii brzegowej, jezioro Skanda charakteryzuje się przewagą brzegów wyraźnie przekształconych, z widocznymi śladami ingerencji człowieka. Dlatego też należy ono do klasy III szeregu bonitacyjnego, stworzonego przez Sroczyńskiego

(2006). Klasa ta charakteryzuje się brzegami oddalonymi od zabudowy, ale licznie odwiedzanymi, zaśmiecanymi oraz wydeptanymi (Rys.6.).

Rysunek 6. Jezioro Skanda



Źródło: <http://fotowojeik.pl/id/WW080051>

### **Jezioro Kortowskie**

Zbiornik wodny należący do grupy jezior olsztyńskich, położony na Pojezierzu Mazurskim (Szymański i in. 2013). Jezioro o zaawansowanej eutrofii, intensywnie wykorzystywane do celów turystyczno – rekreacyjnych. Całkowita powierzchnia jeziora wynosi 90,4 ha, a maksymalna głębokość mierzy 17,2 m. Długość zbiornika wynosi 1860 m, natomiast jego szerokość 875 m, podążając linią brzegową 4500 m.

Rysunek 7. Jezioro Kortowskie



Źródło: <http://fotowojeik.pl/id/WW133341>

Zbiornik ten jest zasilany przez 5 cieków: rzeka Kortówka, Potok Starodworski, Potok Parkowy, Potok Leśny oraz przewód drenarski. Jezioro to ma jeden odpływ powierzchniowy, którym jest rzeka Kortówka (Dunalska i in. 2007) (Rys. 7).

### **Znaczenie grzybów w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych**

Makrofity od lat są wykorzystywane w biodynkacji ekosystemów wodnych. Ich budowa stanowi przystosowanie do ciągłego kontaktu z wodą. Mają one szeroko rozbudowany system wchłaniania różnych mikroelementów ze środowiska, zarówno tych niezbędnych do ich funkcjonowania, jak i tych szkodliwych (Rabajczyk, Józwiak 2008). Kondycja zdrowotna roślin, jest determinowana przez występowanie grzybów fitopatogenicznych wśród roślinności strefy brzegowej jezior a także strefy podwodnej porośniętej roślinami (Załączowski 1997). Zasadlają one najczęściej fylloferę, którą charakteryzują części nadziemne roślin wraz z obecną na ich powierzchni mikrobiotą i mikrofauną (Dix, Webster 1995). Kondycja zdrowotna roślin ma pośredni wpływ na życie ryb w zbiornikach wodnych, co stanowi istotny element modyfikujący warunki gospodarki rybackiej jezior. Dla większości gatunków ryb, roślinność naczyniowa oczerzetów, jest podłożem do składania ikry czy też stanowi schronienie dla młodego, słabo pływającego wylęgu (Załączowski 1997).

W polskiej literaturze mykologicznej jest niewiele informacji na temat występowania grzybów fitopatogenicznych w jeziorach o silnej antropopresji. W większości są to opracowania mykosocjologiczne opisujące badania prowadzone na terenach chronionych, tj.: parki narodowe czy rezerwaty przyrody (Czerniawska i in. 2010).

Celem badań była ocena różnorodności gatunkowej grzybów fitopatogenicznych, wyizolowanych z wybranej roślinności strefy litoralu jezior Skanda i Kortowskie.

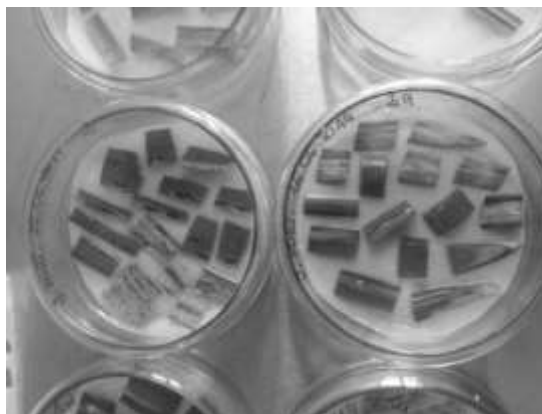
### **Material i metody**

Badania przeprowadzono na terenie Olsztyna, w strefie szuwarowej jezior Skanda oraz Kortowskie, od czerwca do września w 2014 roku.

Material badawczy stanowiły liście makrofitów, zebrane zgodnie z terminami zalecanymi w fitopatologii. Za jedną próbę przyjęto fragment rośliny z widocznymi zmianami

chorobowymi. Zebrany materiał przeniesiono do laboratorium mykologicznego. W celu wyizolowania grzybów z uzyskanego materiału, wykonano komory wilgotne (płytki Petriego z wilgotną bibułą) (Rys.8.). Miejsca chorobowe dezynfekowano 70% alkoholem etylowym. Następnie wysterylizowanymi nożyczkami wycinano fragmenty roślinne z widocznymi zmianami chorobowymi i jałową pęsetą wykładano je na zwilżoną bibułę.

Rysunek 8. Przykład komory wilgotnej z porażonymi fragmentami roślin



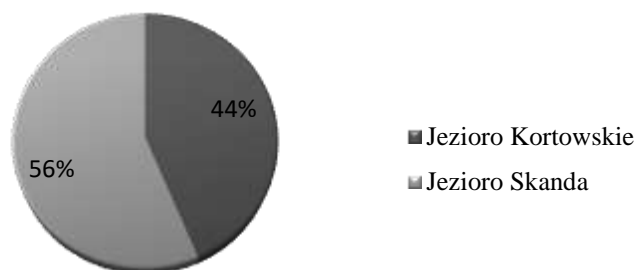
Źródło: Opracowanie własne.

Obserwację przeprowadzono po 48h. Gdy na zebranych materiale wyrosły kolonie grzybów, wykonano preparaty wg Gerlacha (1972) (błękit anilinowy z laktofenolem, taśma klejąca, szkiełka podstawowe oraz nakrywkowe). Do identyfikacji wykorzystano klucze: Brandenburgera (1985), Brauna (1995,1998), Ellisa (1971).

## Wyniki

Ogółem uzyskano 211 izolatów grzybów z dwóch badanych zbiorników wodnych. Z jeziora Skanda uzyskano – 119 izolatów, nieco mniej – 92 izolaty, z jeziora Kortowskiego (Rys. 9). Analizując próby pochodzące z trzech kolejnych zbiorów poszczególnych jezior, stwierdzono różnice w liczbie izolatów grzybów.

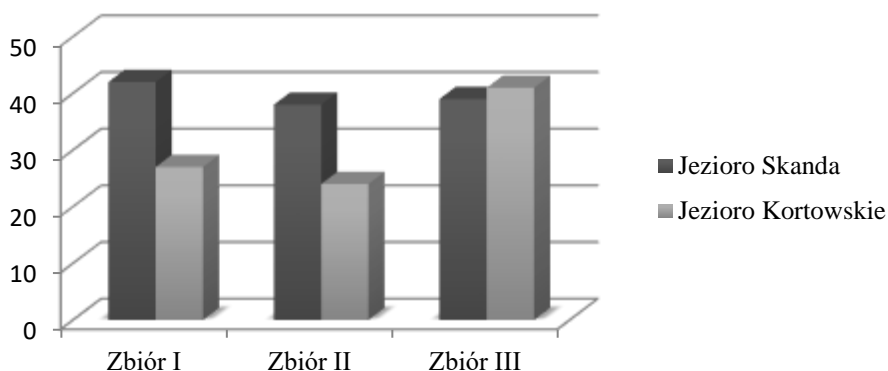
Rysunek 9. Procentowy udział prób z izolatami grzybów



Źródło: Opracowanie własne.

W I oraz II zbiorze, najwięcej izolatów otrzymano z jeziora Skanda, odpowiednio 42 oraz 38. Natomiast z jeziora Kortowskiego uzyskano ich znacznie mniej (odpowiednio 27 oraz 24). W zbiorze III otrzymano z obu jezior, podobną liczbę izolatów, jezioro Skanda – 39, jezioro Kortowskie – 41 (Rys. 10).

Rysunek 10. Liczba izolatów grzybów w poszczególnych zbiorach z obu jezior



Źródło: Opracowanie własne.

Ogółem wyizolowano 47 gatunków grzybów (Tab. 1). Osiemnaście gatunków było wspólnych w badanych jeziorach. Gatunkami charakterystycznymi dla jeziora Kortowskiego były m.in. *Didymella exitialis*, *Stigmina negundinis* czy *Uromyces caricis-sempervirentis*. Gatunki takie jak: *Leptosphaeria typharum*, *Metasphaeria mosana*, *Puccinia coronta* oraz *Trichothyria norfolciana*, wystąpiły tylko na roślinach jeziora Skanda.



Tabela 1. Gatunki grzybów wyizolowane z roślin z poszczególnych jezior

Lp.	Gatunek grzyba	Jez. Skanda	Jez. Kortowskie
1.	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	+	+
2.	<i>Alternaria longipes</i> (Ellis & Everh.)	+	+
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	+	+
4.	<i>Ascochyta kirulsi</i> H. Ruppr.	+	+
5.	<i>Ascochyta nymphaeae</i> Pass.	-	+
6.	<i>Ascochyta</i> sp.	+	+
7.	<i>Ascochyta stipae</i> Died.	+	-
8.	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	-	+
9.	<i>Chaetomium</i> sp.	-	+
10.	<i>Chaetospermum chaetosporum</i> (Pat.) A.L. Sm. & Ramsb.	-	+
11.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.)	+	+
12.	<i>Cladosporium</i> sp.	+	+
13.	<i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) G.W. Wilson	-	+
14.	<i>Colletotrichum truncatum</i> (Schwein.) Andrus & W.D.	+	-
15.	<i>Curvularia</i> sp.	-	+
16.	<i>Cylindrosporium typhae</i> Sacc.	-	+
17.	<i>Deightonella arundinacea</i> (Corda) S. Hughes	+	+
18.	<i>Didymella exitialis</i> (Morini) E. Müll.	-	+
19.	<i>Dreschlera</i> sp.	+	+
20.	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	+	+
21.	<i>Fusarium</i> sp.	+	+
22.	<i>Geotrichum</i> sp.	+	-
23.	<i>Hendersonia culmiseda</i> Sacc.	+	+
24.	<i>Leptosphaeria</i> sp.	+	-
25.	<i>Leptosphaeria typharum</i> (Desm.) P. Karst.	+	-
26.	<i>Metasphaeria mosana</i> Mouton	+	-
27.	<i>Nigrospora</i> sp.	+	-
28.	<i>Phaeosphaeria typhae</i> (P. Karst.) Shoemaker & C.E. Babc.	+	+
29.	<i>Phoma glomerata</i> (Corda) Wollenw. & Hochapfel	-	+
30.	<i>Phoma multirostrata</i> (P.N. Mathur, S.K. Menon & Thirum.) Dorenb. & Boerema	-	+
31.	<i>Phoma</i> sp.	+	+
32.	<i>Phyllosticta coralliobola</i> Bubák & Kabát	+	+
33.	<i>Phyllosticta</i> sp.	+	+
34.	<i>Phyllosticta typhina</i> Sacc. & Malbr.	+	-
35.	<i>Pithomyces</i> sp.	-	+
36.	<i>Puccinia coronata</i> Peturson	+	-
37.	<i>Ramularia</i> sp.	+	+
38.	<i>Ramularia typhae</i> Vasyag.	+	-
39.	<i>Scolecosporella typhae</i> (Oudem.) Petr.	+	+
40.	<i>Selenophoma straussiana</i> (Sacc.) Luc	-	+
41.	<i>Septoria</i> sp.	-	+
42.	<i>Septoria tritici</i> Desm.	-	+
43.	<i>Septoriella phragmitis</i> Oudem.	+	-
44.	<i>Stagonospora</i> sp.	-	+
45.	<i>Stigmina negundinis</i> (Berk. & M.A. Curtis) M.B. Ellis	-	+
46.	<i>Trichothyria norfolciana</i> J.P. Ellis	+	-
47.	<i>Uromyces caricis-sempervirentis</i> E. Fisch.	-	+

Źródło: Opracowanie własne.

Wśród zebranych gatunków roślin, największą różnorodność taksonomiczną grzybów fitopatogenicznych, stwierdzono na *Glyceria aquatica* – 25 gatunków grzybów, najmniejszą na *Nuphar lutea* – 5 gatunków grzybów (Tab.2).

Tabela 2. Liczba gatunków grzybów wyizolowana z poszczególnych gatunków roślin

Lp.	Gatunek rośliny	Liczba gat. grzybów	Gatunek grzyba
1.	<i>Glyceria aquatica</i> (L.) Wahlenb.	25	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Ascochyta</i> sp., <i>A. stipae</i> , <i>Chaetomium</i> sp., <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>C. truncatum</i> , <i>Curvularia</i> sp., <i>Didymella exitalis</i> , <i>Dreschlera</i> sp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Hendersonia culmiseda</i> , <i>Leptosphaeria</i> sp., <i>Nigrospora</i> sp., <i>Phaeosphaeria typhae</i> , <i>Phoma</i> sp., <i>Phyllosticta</i> sp., <i>Ramularia</i> sp., <i>Septoria</i> sp., <i>Septoria tritici</i> , <i>Stigmina negundinis</i>
2.	<i>Typha angustifolia</i> L.	16	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Chaetospermum chaetosporum</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Cylindrosporium typhae</i> , <i>Dreschlera</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Phaeosphaeria typhae</i> , <i>Phoma multirostrata</i> , <i>Phyllosticta coralliobola</i> , <i>P. typhina</i> , <i>Pithomyces</i> sp., <i>Ramularia typhae</i> , <i>Selenophoma straussiana</i>
3.	<i>Typha latifolia</i> L.	14	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Leptosphaeria typharum</i> , <i>Phaeosphaeria typhae</i> , <i>Phoma glomerata</i> , <i>Phyllosticta coralliobola</i> , <i>P. typhina</i> , <i>Scolecosporella typhae</i> , <i>Septoriella phragmitis</i> , <i>Stagonospora</i> sp.
4.	<i>Carex</i> sp. L.	13	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. longipes</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Deightonella arundinacea</i> , <i>Dreschlera</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Geotrichum</i> sp., <i>Metasphaeria mosana</i> , <i>Puccinia koronata</i> , <i>Stagonospora</i> sp., <i>Trichothyria norfolciana</i> , <i>Uromyces caricis-sempervirentis</i>
5.	<i>Nuphar lutea</i> (L.) Sibth. & Sm.	5	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta kirulsi</i> , <i>A. nymphaeae</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp.

Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

Z literatury wiadomo, że tereny o znikomej ingerencji człowieka, z reguły odznaczają się dużą różnorodnością mykobioty pasożytniczej. Dowiodły tego badania mykosocjologiczne fitopatogenów prowadzone w licznych miejscach na terenie Polski. Badania te najczęściej prowadzono na terenach chronionych, tj.: parki narodowe czy rezerwaty przyrody. Na terenie Drawieńskiego Parku Narodowego, Mazurkiewicz-Zapałowicz i in. (2012) uzyskali 300

izolatów grzybów. Adamska i Błaszowski (2000) ze Słowińskiego Parku Narodowego otrzymali 272 gatunki a Adamska i in. (1999) na tym samym terenie odnotowali – 270 izolatów. Z terenu Białowieskiego Parku Narodowego, Majewski (1971) podaje 12 gatunków. Ruszkiewicz-Michalska i in. (2012), na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego odnotowali 188 gatunków grzybów fitopatogenicznych, a Mułenko i in. (1995) 141 gatunków w Tatrzańskim Parku Narodowym.

Jeziora eutroficzne charakteryzują się ubogą gatunkowo roślinnością. Wśród niewielkiej liczby opracowań, dotyczących grzybów patogenicznych roślinności szuwarowej eutroficznych jezior, znajdują się badania Czerniawskiej i in. (2010) eutroficznego jeziora Wąsosze, z którego uzyskano 24 gatunki grzybów zasiedlających 13 gatunków roślin. Podobne prace, dotyczące występowania grzybów patogenicznych w miejscach poddanych silnej antropopresji, przeprowadzono na terenie Małopolski, w oczkach wodnych, z których uzyskano 88 gatunków (Kowalik 2012). Literatura mykologiczna opisuje także prace prowadzone w Olsztynie i jego okolicach (Sucharzewska, Dynowska 2005; Sucharzewska 2010) oraz w parkach miejskich na terenie Poznania (Gołębniak, Karolewski 2008). W badaniach własnych, podczas jednego sezonu wegetacyjnego, z wybranych roślin szuwarowych, odnotowano większą liczbę grzybów fitopatogenicznych z jeziora Skanda niż z roślinności jeziora Kortowskiego, co wiąże się z większym stopniem eutrofizacji pierwszego z jezior.

Badania nad różnorodnością grzybów fitopatogenicznych, występujących na gatunkach roślin szuwarowych, mają najczęściej charakter czysto poznawczy a prac dotyczących tej problematyki, jest bardzo niewiele zarówno w Polsce jak i w Europie. Rośliną współtworzącą bardzo często zespół szuwarowy, jest rodzaj *Carex*, z którego we własnych badaniach wyizolowano interesujące gatunki grzybów: *Metasphaeria mosana* czy *Trichothyria norfolciana*. Dodatkowo, pojawił się gatunek rzadki *Uromyces caricis-sempervirentis*, który dotychczas notowany był tylko dwa razy na terenie Polski.

Wśród typowej roślinności szuwarowej występują również gatunki rodzaju *Typha*. Najpowszechniejsze z nich to: *Typha latifolia* oraz *T. angustifolia*. Z dostępnej literatury wynika, że charakterystycznymi gatunkami grzybów zasiedlającymi fylosferę *Typha*, są *Pyrenophora typicola*, *Phaeosphaeria typharum*, *Phyllosticta typhina*, *Scolecosporiella typhae* oraz według Pugh i Mulder (1971) – *Cladosporium herbarum* i *Aureobasidium pulullans*. Badania własne potwierdzają występowanie *Phyllosticta typhina* oraz *Scolecosporiella typhae*

na tych żywicielach. Dodatkowo, w badaniach własnych, stwierdzono gatunki rzadkie dla Polski, jakimi są: *Chaetospermum chaetosporum* oraz *Leptosphaeria typharum*.

Wśród roślinności szuwarowej coraz częściej notuje się *Glyceria aquatica*. Badania przeprowadzone przez Adamczewskiego (2007), na terenie Drawieńskiego Parku Narodowego, wskazały nowe fitopatogeny występujące na tej roślinie. Były to głównie gatunki rodzaju *Ascochyta*: *A. antarctica*, *A. gracilispora*, *A. kirulisii* oraz *A. melicae*, a także rodzaju *Puccinia* – *P. coronata* i *P. melicae*. W badaniach własnych nie stwierdzono żadnego z wyżej wymienionych. Natomiast zaobserwowano *A. stipae* oraz liczne występowanie grzybów rodzaju *Fusarium*. Te ostatnie nie są podawane przez innych autorów badających stan zdrowotny tej rośliny (Ellis, Ellis 1985). Powszechnie występującym gatunkiem na *Glyceria aquatica*, jest również *Zymoseptoria tritici* (Kochman, Majewski 1973), wyizolowany także w badaniach własnych. Na uwagę zasługuje odnotowanie *Stigmina negundinis* i *Didymella exitialis*. Ten drugi, w Polsce był notowany dwukrotnie.

Z przeprowadzonych badań wynika, że grzyby fitopatogeniczne znajdują doskonałe warunki do rozwoju na roślinności szuwarowej jezior w środowisku zmienionym przez człowieka. Rozwijając się, powodują destrukcję roślin, przyczyniając się w ten sposób do obniżenia walorów estetycznych krajobrazu oraz pośrednio do zakłócenia funkcjonowania ekosystemu jezior.

## Podsumowanie

Ogólnie uzyskano 211 izolatów grzybów. Najwięcej izolatów grzybów otrzymano z eutroficznego jeziora Skanda – 119, nieco mniej z jeziora Kortowskiego – 92. Największą różnorodność gatunkową odnotowano na *Glyceria aquatica* (manna mielec) – 25 gatunków grzybów, najmniej uzyskano na *Nuphar lutea* (grążel żółty) – 5 gatunków.

## Literatura

- Adamczewski A. 2007. *Grzyby mikroskopowe roślin szuwarowych jezior Marta i Sitno w Drawieńskim Parku Narodowym*. Praca magisterska. Akademia Rolnicza w Szczecinie. Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Szczecin.
- Adamska I., Błaszczkowski J. 2000. *Microscopic fungus-like organisms and fungi of the Słowiński National Park*. I. Acta Mycol., 35(2): 243-259.

- Adamska I., Madej T., Czerniawska B., Błaszowski J. 1999. *Parasitic and saprotrophic fungi from Słowiński National Park*. Acta Mycol., 34(1): 971-103.
- Brandenburger W. 1985. *Parasitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart – New York.
- Braun U. 1995. *A monograph of Cercospora, Ramularia and allied genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 1, IHW-Verlog, Germany.
- Braun U. 1998. *A monograph of Cercospora, Ramularia and allied genera (Phytopathogenic Hyphomycetes)*. Vol. 2, IHW-Verlog, Germany.
- Czerniawska B., Adamska I., Dzięgielewska M. 2010. *Grzyby pasożytnicze na roślinności szuwarowej eutroficznego Jeziora Wąsosze*. Proceedings of ECOpole. 4(2): 329-333.
- Dix N.J., Webster J. 1995. *Fungal ecology*. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman Hall: 549.
- Dunalska J., Wiśniewski G., Mientki Cz. 2007. *Assessment of multi-year (1956-2003) hypolimnetic withdrawal from Lake Kortowskie, Poland*. Lake Reserv. Manage. 23: 377-387.
- Ellis M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.
- Ellis M.B., Ellis J.P. 1985. *Microfungi on land plants*. An identification handbook. Macmillan Publishing Company, New York.
- Fiedorow Z., Gołębiak B., Weber Z. 1999. *Fitopatologia ogólna*. Wyd. Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego, Poznań: 191.
- Furgała-Selezniow G., Cudnik M., Skrzypczak A., Mamcarz A. 2011. *Zmiany w przestrzeni turystycznej jezior pod wpływem użytkowania rekreacyjnego ich strefy brzegowej (na przykładzie jezior Skanda i Kortowskie)*. [w:] (red.) Durydiwka M., Duda-Gromada K. *Przestrzeń turystyczna. Czynniki, różnorodność, zmiany*. Uniwersytet Warszawski Wydział Geografii i Studiów Regionalnych, Warszawa.
- Gerlach D., 1972. *Zarys mikrotechniki botanicznej*. PWRiL, Warszawa.
- Gołębiak B., Karolewski Z. 2008. *Wpływ warunków atmosferycznych na występowanie chorób na ozdobnych krzewach liściastych w wybranych parkach Poznania w latach 2006-2007*. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych. 531: 51-56.
- Internetowa Encyklopedia drzew. <http://encyklopediadrzew.pl/autorzy.php?g=3> (dostęp 24 stycznia 2019r.)
- Jańczak J. (red.) 1999. *Atlas jezior Polski. Tom III. Jeziora Pojezierza Mazurskiego i Polski południowej*. Bogucki Wyd. Naukowe S.C., Poznań.
- Kiziewicz B., Godlewska A., Muszyńska E., Mazalska B. 2011. *Grzyby i organizmy grzybobopodobne izolowane ze stawu kąpieliskowego w dzielnicy Dojlidy w Białymstoku. Streszczenia referatów i postępów. Polskie tradycje użytkowania grzybów oraz ich ochrony wkładem do europejskiego dziedzictwa kultury*, Łódź.
- Kochman J. 1986. *Zarys mikologii dla fitopatologów*. SGGW-AR, Warszawa.
- Kochman J., Majewski T. 1973. *Grzyby (Mycota). Podstawczaki (Basidiomycetes), główńiowce (Ustilaginales), tom V*. PAN. Instytut Botaniki. Warszawa-Kraków.

- Kowalik M. 2012. *Phyllosphere mycobiota on garden pond plants*. Acta Mycol., 47(1): 11-19.
- Kryczyński S. 2002. *Podstawy fitopatologii*. Fundacja, Rozwój SGGW, Warszawa.
- Majewski T. 1971. *Grzyby pasożytnicze Białowieskiego Parku Narodowego na tle mikoflory Polski (Peronosporales, Erysiphales, Uredinales, Ustilaginales)*. Acta Mycol., 7: 299-388.
- Mazurkiewicz-Zapałowicz K., Adamczewski A., Ładczuk D., Silicki A. 2012. *Mikroskopowe mikrobiota w zbiorowiskach szuwarowych Jeziora Sitno (Drawieński Park Narodowy)*. [w:] Szczepkowski A., Obidziński A. (red.) *Planta in vivo, in vitro et in silico*. Streszczenia referatów i plakatów.
- Muńko W., Sałata B., Wołczańska A. 1995. *Mycological notes from the Tatra National Park. II*. Acta Mycol., 30(1): 65-79.
- Pugh G.J., Mulder J.L. 1971. *Mycoflora associated with Typha latifolia*. Transactions of the British Mycological Society, 57(2): 273-282.
- Rabajczyk A., Józwiak A.M. 2008. *Możliwości wykorzystania makrofitów jako bioindykatorów metali ciężkich zdeponowanych w osadach dennych*. Monitoring Środowiska Przyrodniczego, Kielce, 9: 19-26.
- Ruszkiewicz-Michalska M., Tkaczuk C., Dynowska M., Sucharzewska E., Szkodzik J., Wrzosek M. 2012. *Preliminary studies of fungi in the Biebrza National Park (NE Poland)*. I. *Micromycetes*. Acta Mycol., 47(2): 213-234.
- Sroczyński W. (red.) 2006. *Studium form i mechanizmów degradacji środowiska w systemach rekreacyjnych brzegów jezior zaporowych południowo-wschodniej Polski*. IGSM i EPAN, Kraków.
- Sucharzewska E. 2010. *Key survival strategies of the Savadaea tulasnei parasite on its Acer platanoides host under conditions of varied anthropopression*. Pol. J. of Environ. Stud. 19(5): 1013-1017.
- Sucharzewska E., Dynowska M. 2005. *Life strategies of Erysiphe palczewskii in the conditions of diversified antropopressure*. Acta Mycol., 40(1): 103-112.
- Szoszkiewicz K., Jusik S., Zgoła T. 2010. *Klucz do oznaczania makrofitów dla potrzeb oceny stanu ekologicznego wód powierzchniowych*. Biblioteka Monitoringu Środowiska. Warszawa.
- Szymański D., Dunalska J.A., Jaworska B., Bigaj I., Zieliński R., Nowosad E. 2013. *Sezonowa zmienność produkcji pierwotnej i respiracji fitoplanktonu w litoralu jeziora eutroficznego. Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska*. Tom 15, ISSN 1506-218X, UWM, Olsztyn: 2573-2590.
- Wirtualny Atlas Roślin <https://atlas.roslin.pl/> (dostęp 24 stycznia 2019r.)
- Załachowski W. 1997. *Ryby*. PWN, Warszawa.

## Występowanie grzybów rodzaju *Aspergillus* w wodzie z fontanny w Parku Centralnym w Olsztynie

### Occurrence of *Aspergillus* fungi in water from a fountain in the Central Park in Olsztyn

Wiktor Zieliński

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Studenckie Koło Naukowe Mykologów  
Opiekun: dr hab. Anna Biedunkiewicz

#### Abstract

Fountains are a decorative element of the landscape, but it often happens that people treat them as bathing places. This creates a huge health risk due to microorganisms in the water, including potentially pathogenic fungi. The molecules in the bioaerosol are also a big threat, to which we can include fungi and their spores and their metabolism products. The aim of the work was to examine the microbiological quality of water in the fountain in the Central Park in Olsztyn, for the presence of potentially pathogenic fungi.

The research was carried out over three seasons: spring, summer and autumn, in the morning and evening seasons. The test material consisted of fungi isolated from water and air surrounding the fountain, which cultures were carried out on Sabouraud with chloramphenicol. Macroscopic and microscopic features were checked during and after incubation.

Among the isolated *Aspergillus* species, *A. fumigatus* and *A. niger* were dominant. The obtained research results show how large microbial species diversity occurs in water from fountains, which is a potential source of epidemiological threat. People should not treat them as a bathing area because of the potential danger to health and life.

**Keywords:** fountain, fungi, *Aspergillus*, water, bioaerosol

#### Wstęp

Fontanny są elementami krajobrazu, mającymi za zadanie zwiększyć walory dekoracyjne terenu, polepszając atrakcyjność otoczenia (Burkowska-But 2013). Pełnią one również funkcję miejsca wypoczynkowego dla ludzi oraz są obszarem wodopoju dla zwierząt, w tym najczęściej dla psów oraz ptaków (Biedunkiewicz 2009). Niezależnie od ich ozdobnego znaczenia, mają również pewne funkcje klimatyczne i zdrowotne – przede wszystkim wzbogacają atmosferę w parę wodną oraz obniżają temperaturę otoczenia. Ponadto, rozprysk wody jest skutecznym sposobem, aby usunąć drobiny zanieczyszczeń z powietrza, co wpływa na jego jakość. Coraz częściej ludzie traktują fontanny jako miejsca kąpieliskowe.

Spowodowane jest to przede wszystkim szybkim, nieograniczonym i łatwym dostępem do wody, która w upalne dni daje ochłodę.

W powietrzu zewnętrznym – atmosferycznym, jak i wewnętrznym, znajdują się zanieczyszczenia występujące w postaci aerozolu biologicznego. Bioaerozol ma budowę fazowo-koloidalną, składającą się z części rozpraszającej – powietrza oraz w nim rozpraszanej. Aerozole biologiczne stanowią kompleks składający się z mikroorganizmów takich jak: cząsteczki wirusów, pierwotniaków, komórek bakteryjnych, fragmentów grzybni i zarodników grzybów (Gaska-Jędruch i Dudzińska 2009). W ich skład wchodzi również bardzo liczne produkty metabolizmu mikroorganizmów. Do tej grupy możemy zaliczyć przede wszystkim: egzotoksyny i endotoksyny, enzymy i mykotoksyny (Agranovski i in. 2002). Każde z wymienionych czynników, stanowią szkodliwe dla zdrowia czynniki, powodujące pogorszenie stanu higienicznego powietrza i w konsekwencji, mogą być przyczyną zakażeń ludzi i zwierząt (Biedunkiewicz 2009). Bioaerozole bardzo mocno wpływają na czystość powietrza, a także na zdrowie człowieka. Mogą być przyczyną wielu niekorzystnych objawów i stanów chorobowych takich jak: katar sienny czy astma, zaś metabolity bardzo często stanowią czynnik alergizujący (Lee i Jo 2006). Poza mikroorganizmami i ich produktami metabolizmu, w skład bioaerozoli wchodzi szczytka i pyłki roślin, fragmenty naskórka ludzi oraz zwierząt (Chmiel i in. 2015).

Grzyby rodzaju *Aspergillus* spp. są wszechobecne. Występują w glebie, wodzie, powietrzu oraz na niszczonej roślinności. Gatunki rodzaju *Aspergillus* są częstymi przyczynami inwazyjnych zakażeń grzybiczych u pacjentów z obniżoną odpornością. Co najmniej trzydzieści gatunków rodzaju *Aspergillus* jest przyczyną mykoz. *A. fumigatus* jest grzybem saprotroficznym, który odgrywa zasadniczą rolę w recyklingu środowiskowego węgla i azotu. Zarodkuje on obficie, a każdy konidiofor jest zdolny do produkcji tysięcy konidiów. Mały rozmiar konidiów sprawia, że utrzymują się zarówno w powietrzu wewnętrznym, jak i zewnętrznym. Badania środowiskowe wskazują, że wszyscy ludzie wdychają co najmniej kilkaset konidiów *A. fumigatus* dziennie, które są w stanie dotrzeć aż do pęcherzyków płucnych. Rzadko mają one działanie niepożądane, ponieważ są skutecznie eliminowane przez wrodzoną odpowiedź immunologiczną człowieka.



## Cel i metody badawcze

Celem przeprowadzonych badań była analiza mikrobiologiczna wody z fontanny w Parku Centralnym w mieście Olsztyn, pod kątem obecności potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka grzybów, które stanowią duże zagrożenie epidemiologiczne.

Obiektem badań była fontanna znajdująca się w Parku Centralnym w Olsztynie, na obszarze położonym w bliskim sąsiedztwie rzeki Łyny – między ulicami: Seweryna Pieniężnego, 22 Stycznia, Emilii Plater i Niepodległości. Uzdatnianie wody odbywa się poprzez usuwanie zanieczyszczeń fizycznych – filtrację i biologicznych poprzez regulację odczynu pH, dezynfekcję roztworem chloru oraz usuwaniu glonów.

Badania prowadzono od kwietnia do września 2017 roku. Wodę pobierano z fontanny w Parku Centralnym w Olsztynie dwukrotnie w miesiącu, w dniach: 24.04; 8.05, 22.05; 5.06, 19.06; 3.07, 17.07; 7.08, 28.08; 11.09, 25.09. Próby pobierane były dwa razy na dobę o godzinie 8:00 i 18:00. Do analizy wyników, terminy poboru prób zostały podzielone na trzy sezony: wiosna, lato i jesień.

Materiał do badań stanowiły grzyby wyizolowane z wody oraz z powietrza znajdującego się w pobliżu fontanny (próby sedymentacyjne). Materiały pobierane były z jednego stanowiska. Jałowe, szklane butelki uzupełniano 1000 cm<sup>3</sup> wody, zaś próbę sedymentacyjną wykonywano z użyciem otwartej płytki Petriego z podłożem Sabouraud z chloramfenikolem, na którą przez 15 minut opadały cząsteczki bioaerozolu. Badany materiał był dokładnie opisywany oraz transportowany do laboratorium Katedry Mikrobiologii i Mykologii, gdzie wykonywano dalsze czynności.

Do izolowania grzybów zastosowano metodę filtrów membranowych. Z każdej próby, 500 cm<sup>3</sup> wody przepuszczano przez filtr membranowy Millipore o wielkości porów 0,45µl przy pomocy pompy próżniowej PL 2/2 przy ciśnieniu 0,2 bar. Następnie filtr umieszczano na płytce Petriego ze stałym podłożem Sabouraud z chloramfenikolem o składzie: 40 g glukoza, 10 g pepton, 20 g agar, 0,25 g chloramfenikol.

Składniki zostały uzupełnione wodą destylowaną do 1000 cm<sup>3</sup>. Po autoklawowaniu ustalono pH.

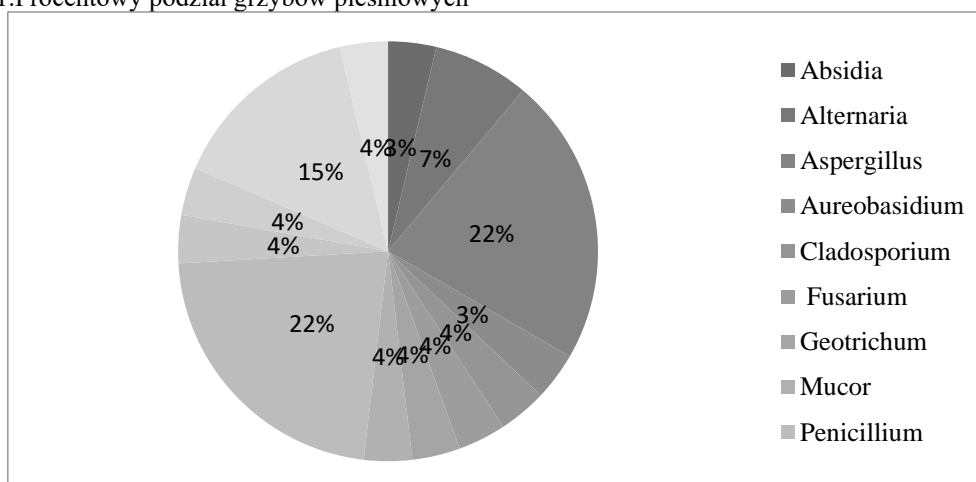
Wzrost grzybów pleśniowych kontrolowano makroskopowo po 24 i 48 godzinach. Z uzyskanych kolonii, wykonywano preparaty metodą odciskową Gerlacha z użyciem taśmy klejącej i zabarwiano błękitem anilinowym z laktofenolem, w celu oznaczenia

taksonomicznego grzybów pleśniowych na podstawie cech mikroskopowych (kształtów konidioforów, sporangioforów, budowie zarodników itp.). Do identyfikacji gatunkowej wykorzystano dwa atlasy mykologiczne: De Hoog i in. (2000); Kurtzman i Fell (2000).

## Wyniki

Wśród grzybów pleśniowych, stwierdzono 13 różnych rodzajów: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Trichophyton*. Spośród nich dominowali przedstawiciele rodzajów: *Aspergillus* (22%) oraz *Penicillium* (22%), a także *Trichoderma* (15%) (Rys. 1).

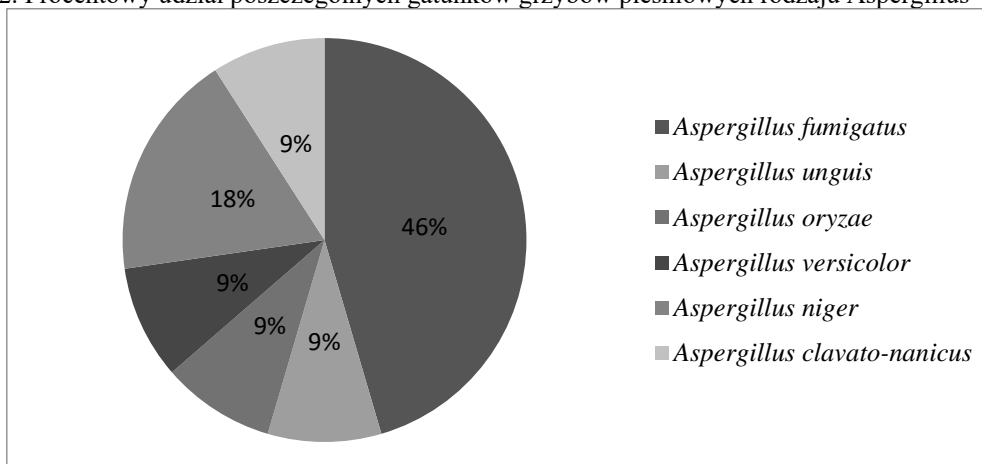
Rysunek 1. Procentowy podział grzybów pleśniowych



Źródło: Opracowanie własne.

Spośród wyizolowanych grzybów pleśniowych, należących do rodzajów *Aspergillus*, odnotowano 6 gatunków. Dominował *A. fumigatus* (46%), mniej stwierdzono *A. niger* (18%), a pozostałe gatunki notowano sporadycznie (po 9%).

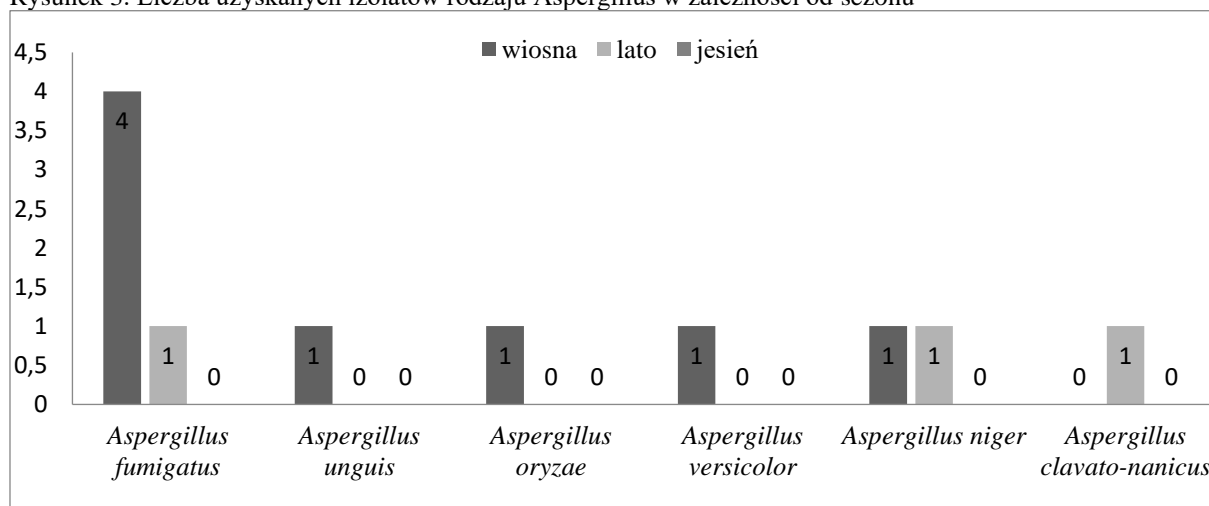
Rysunek 2. Procentowy udział poszczególnych gatunków grzybów pleśniowych rodzaju *Aspergillus*



Źródło: Opracowanie własne.

Na rysunku 3, przedstawiono zróżnicowanie liczebności uzyskanych izolatów grzybów rodzaju *Aspergillus* w poszczególnych sezonach badawczych. Można zauważyć, że najwięcej izolatów uzyskano w sezonie wiosennym, gdzie aż cztery izolaty należały do gatunku *A. fumigatus*. W sezonie letnim uzyskano zaledwie trzy jednogatunkowe izolaty. Jesienią zaś, nie udało się uzyskać żadnego izolatu rodzaju *Aspergillus*.

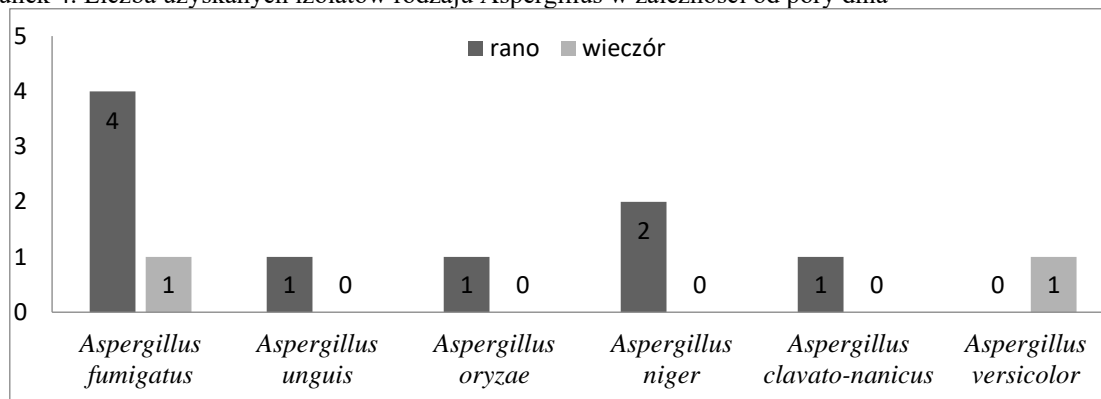
Rysunek 3. Liczba uzyskanych izolatów rodzaju *Aspergillus* w zależności od sezonu



Źródło: Opracowanie własne.

W zależności od pory dnia, uzyskano znaczne różniące się pod względem liczebności wyniki. Zauważono, że rano stwierdzano znacznie więcej izolatów, w porównaniu do pory wieczornej, a także uzyskano większą różnorodność gatunkową (rano – 5 gatunków, wieczór – 2 gatunki).

Rysunek 4. Liczba uzyskanych izolatów rodzaju *Aspergillus* w zależności od pory dnia



Źródło: Opracowanie własne.

Uwzględniając klasyfikację biobezpieczeństwa (BSL) spośród wyizolowanych grzybów, 1 gatunek przyporządkowano do grupy BSL-2 oraz 5 gatunków do grupy BSL-1. (Tab. 1).

## Dyskusja

Fontanna w Parku Centralnym w Olsztynie charakteryzuje się zamkniętym obiegiem – woda wprowadzana jest na początku sezonu (kwiecień) i krąży do jego zakończenia (październik). Nie ulega ona wymianie i uzdatniana jest w regularnych odstępach czasu, co powinno zapewnić jej czystość mikrobiologiczną. Podczas lata, gdy temperatura otoczenia jest wysoka, notorycznie zdarza się, że do fontanny wchodzi dzieci oraz dorośli i korzystają z niej jako miejsca kąpieliskowego, pomimo że jest to niedozwolone. Podczas kontaktu skóry z wodą, dochodzi do zmięczenia naskórka (maceracja), co sprawia że w wodzie mogą znajdować się mikroorganizmy bytujące na skórze ludzi. W tej sytuacji, gdy człowiek znajduje się w wodzie, nie tylko staje się narażony na infekcje, ale sam jest źródłem potencjalnych patogenów.

Badanie wody znajdującej się w ekosystemach wodnych pod kątem obecności i liczebności grzybów jest bardzo ważne ze względów bezpieczeństwa zdrowia oraz rozprzestrzeniania się drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych. Przeprowadzony kilkuletni monitoring mykologiczny udowodnił obecność grzybów w środowisku wodnym (Biedunkiewicz i Ozimek 2009). Ich liczebność i skład jakościowy zależy od wielu czynników, gdzie największe znaczenie ma postępująca degradacja środowiska spowodowana działalnością ludzi. Grzyby, które powszechnie występują w środowisku, stosunkowo łatwo kolonizują różne ontocenozy, a wzrost liczby zakażeń grzybiczych zarejestrowanych na całym

świecie jest spowodowany rosnącą liczbą czynników predysponujących i zmniejszeniem naturalnej odporności u osób zdrowych (Biedunkiewicz i in. 2014).

Tabela 1. Wykaz wyizolowanych gatunków grzybów pleśniowych rodzaju *Aspergillus* z uwzględnieniem klasyfikacji BSL, miejsca występowania oraz danych dotyczących chorobotwórczości\*

Gatunek	BSL	Miejsce występowania*	Dane literaturowe dotyczące odr chorób*
<i>Aspergillus clavato-nanicus</i> (Bat., H. Maia&Alecrim 1955)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infekcje paznokci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Batista i in., 1955</li> </ul>
<i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresen. 1863)	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspergilloza u osób z osłabioną odpornością</li> <li>• Osoby po przeszczepach</li> <li>• Pacjenci z AIDS</li> <li>• Pacjenci leczenia sterydowo</li> <li>• Infekcje ucha zewnętrznego</li> <li>• Infekcje tkanki skórnej u pacjentów leczonych immunosupresyjnie</li> <li>• Infekcje u zwierząt</li> <li>• Infekcje jamy nosowej u pacjentów z osłabioną odpornością</li> <li>• Infekcje jamy nosowej u pracowników budowy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Johnson 1987; Bodey&amp;Vartivarian 1989; Vogeser i in., 1997</li> <li>• Waller i in., 1991; Egan i in., 1996</li> <li>• Mylonakis i in., 1996</li> <li>• Miller i in., 1994</li> <li>• RoweJones i in., 1993; Min i in., 1996; Klossek i in., 1996</li> <li>• Katz i in., 1993</li> <li>• Moore i in., 1993; Pastor i in., 1993</li> <li>• Anderson i in., 1996</li> <li>• Opal i in., 1986</li> </ul>
<i>Aspergillus niger</i> (Tiegh. 1867)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infekcje ucha zewnętrznego</li> <li>• Infekcje skórne u osób po przeszczepie szpiku</li> <li>• Aspergilloza płucna</li> <li>• Zapalenia płuc u osób z cukrzycą</li> <li>• Infekcje paznokci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bayo i in., 1994</li> <li>• Johnson i in., 1993</li> <li>• Korzeniowska-Kosela i in., 1990</li> <li>• Severo i in., 1997</li> <li>• Tosti&amp;Piraccini 1998</li> </ul>
<i>Aspergillus unguis</i> (Thom& Raper 1934)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infekcje paznokci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schonborn&amp;Schmoranz er 1970</li> </ul>
<i>Aspergillus versicolor</i> (Tirab. 1908)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mykozy u ludzi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rippon 1988</li> </ul>
<i>Aspergillus oryzae</i> (Cohn 1884)	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infekcje jamy nosowej</li> <li>• Zapalenia płuc</li> <li>• Infekcje paznokci</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Green i in., 1969; Byard i in., 1986</li> <li>• Retamal i in., 1984; Wan-Qing 1988</li> <li>• Ota 1923</li> </ul>

\* Na podstawie: De Hogg i in. 2000; Kurtzman i Fell 2000.

Źródło: Opracowanie własne

W trakcie badań własnych, przeprowadzonych w czasie sześciu miesięcy, wyizolowano z wody oraz prób opadowych 13 rodzajów grzybów pleśniowych. Dominantami wśród grzybów pleśniowych byli przedstawiciele rodzaju *Aspergillus*. Jak podaje Biedunkiewicz (2009), w badaniach fontann w Olsztynie, w latach poprzednich wyizolowano 27 gatunków grzybów, co stanowiło 23,33% wyników dodatnich. Tylko 4 gatunki należały do grzybów pleśniowych (14,81%). W badaniach ilościowych grzybów przeprowadzonych przez Budzińską i in. (2017), w próbkach wody z czterech fontann, uzyskano zakres liczebności komórek grzybów od  $2,75 \cdot 10^2$  jtk/cm<sup>3</sup> do  $1,8 \cdot 10^3$  jtk/cm<sup>3</sup>. Należy również wspomnieć, że nie odnotowano prób ujemnych.

Jak pokazują własne badania, pomiędzy sezonami badawczymi nie zaobserwowano dużej różnicy w liczbie uzyskanych izolatów. Największą ilość uzyskano wiosną – 8, latem – 3, zaś jesienią nie uzyskano żadnych izolatów. Najwięcej gatunków rodzaju *Aspergillus* uzyskano wiosną – 5, natomiast latem – 3. W innych badaniach sezonowych, największe zróżnicowanie gatunkowe odnotowano wczesną jesienią – 22 gatunki, zaś znacznie mniej występowało latem oraz wiosną, odpowiednio 6 oraz 4 (Biedunkiewicz 2009). Można zaobserwować, że pomiędzy wynikami otrzymanymi przez Biedunkiewicz (2009), a wynikami własnymi, istnieje odwrotna proporcja w liczbie uzyskanych gatunków grzybów.

Jak wynika z przeprowadzonych analiz, najczęściej izolowanym gatunkiem był *Aspergillus fumigatus*. Zaliczany jest on do patogenów pierwotnych oraz oportunistycznych, a także jest jednym z głównych alergenów. Jest on najbardziej rozpowszechnionym patogenem, przenoszonym drogą powietrzną w krajach rozwiniętych, a u pacjentów z obniżoną odpornością wywołuje zazwyczaj śmiertelną inwazyjną aspergilozę (Latge 2001). Grzyb ten charakteryzuje się również wysoką opornością na antybiotyki np. na triazole u osób ze zdiagnozowaną aspergilożą (Snelders i in. 2008). Klasyfikowany jest on do grupy BSL-2, czyli należy do potencjalnych drobnoustrojów chorobotwórczych, które przy odpowiednich warunkach mogą wywołać niebezpieczne infekcje. *A. fumigatus* wielokrotnie został wykryty w związku z szeregiem zakażeń płucnych, ze względu na wytwarzanie metabolitów, takich jak alergeny polipeptydowe odpowiedzialne za astmę i zapalenie błony śluzowej nosa, wytwarzanie mykotoksyn, takich jak gliotoksyny, które mają negatywny wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt, a także  $\beta$ -1,3 glukany, które są znanymi modyfikatorami układu odpornościowego (Fisher i in. 2000). Poprzez inhalację następuje dostawanie się do organizmu mikroorganizmów oraz ich elementów takich jak np. fragmenty ściany komórkowej, a także szerokiej gamy produkowanych metabolitów (np. endotoksyny, mykotoksyny, peptydoglikany). Może też

dojść do reakcji alergicznych oraz innych groźnych dla zdrowia człowieka chorób układu oddechowego (Gładysz i in. 2010). Dodatkowo, należy wspomnieć, że ze względu na bardzo małe rozmiary zarodników (2-100 $\mu$ m), mogą one penetrować drogi oddechowe człowieka, dostając się aż do pęcherzyków płucnych (Żukiewicz-Sobczak i in. 2015). Wykazano, że prawie 10% ludzi na świecie ma alergię na grzyby (Burge 2001). Jak podaje literatura, w badaniach powietrza zewnętrznego, uzyskano liczebność grzybów na poziomie 7610,68 jtk/m<sup>3</sup> i wyróżniono aż dwadzieścia sześć gatunków grzybów należących do 12 rodzajów. Z rodzaju *Aspergillus* udało się zidentyfikować pięć gatunków: *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* oraz *A. terreus* (Pavan, Manjunath 2014). W innej analizie bioaerozolu, uzyskano stężenie grzybów na poziomie około 500 jtk/m<sup>3</sup>, a największą koncentrację zanotowano podczas lata i jesieni, zaś najmniejszą wiosną i zimą. Do najpowszechniej izolowanych grzybów zaliczono rodzaje: *Cladosporium*, *Penicillium* i *Aspergillus* (Shelton i in. 2002).

## Podsumowanie

Hydrosfera oraz aerosfera to środowiska stanowiące rezerwuary dla wielu grup mikroorganizmów, które mogą być potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka. Fontanny oraz podobne miejsca rekreacyjne, nie powinny być traktowane jako miejsca kąpieliskowe. Podczas wypoczynku należy zachować ostrożność i ograniczyć kontakt z wodą oraz powstałym przez rozprysk wody aerozolem, ponieważ są to miejsca występowania niebezpiecznych mikroorganizmów. Badania jakości mikrobiologicznej wody, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 roku, w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, dotyczą bakterii mezofilnych, heterotroficznych oraz grupy bakterii wskaźnikowych. Należy zwrócić uwagę na to, że woda znajdująca się w fontannach zawiera również potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka grzyby (należące do kategorii BSL-2), których analizy są często pomijane w wykonywanych badaniach. Bardzo ważne ze względów epidemiologicznych jest wprowadzenie rozporządzeń prawnych określających kryteria dla wody w fontannach. Sprawi to, że staną się one obiektem regularnych badań, w tym analiz jakości mikrobiologicznej wody. Zapewni to większe bezpieczeństwo osobom korzystającym z tego typu obiektów i przebywających w ich pobliżu.

## Literatura:

- Agranovski I.E., Reponen T., Willeke K., Grinshupun S.A. 2002. *Development and evaluation of a New personal sampler for culturable airborne microorganisms*. Atmos. Environ., 36: 889-898.
- Biedunkiewicz A. 2009. *Mikrogrzyby fontann miejskich w monitoringu środowiskowym – zagrożenie epidemiologiczne*. Ochr. Środ. i Zasob. Natur., 41: 163-171.
- Biedunkiewicz A., Kowalska K., Schulz Ł., Stojek K., Dynowska M., Ejdyś E., Sucharzewska E., Kubiak D. 2014. *Mycological monitoring of selected aquatic ecosystems in the context of epidemiological hazards. Drinking water*. Ann. Parasitol., 60(3): 191–198.
- Biedunkiewicz A., Ozimek T. 2009. *Qualitative and Quantitative Changes of Potentially Pathogenic Fungi in a Hydrophyte Wastewater Treatment Plant*. Pol. J. Environ. Stud., 18(2): 161-166.
- Budzińska K., Pyrc N., Szejniuk B., Pastela R., Traczykowski A., Michalska M., Berleć K. 2017. *Microbiological Contamination of Water in Fountains Located in the Ciechocinek Health Resort*. Ann, Set The Environ. Prot., 19: 181-199.
- Burkoska-But A., Świontek Brzezińska M., Walczak M. 2013. *Microbiological contamination of water in fountains located in the city of Toruń, Poland*. Ann. Agr. Env. Med., 20(4): 645-648.
- Chmiel J.M., Frączek K., Grzyb J. 2015. *Problemy monitoringu zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie (I-III)*. T. 15. Z. 1(49): 17-27.
- De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. 2000. *Atlas of clinical fungi. Second edition*. ASM, 1160.
- Fisher G., Muller T., Schwalb R., Ostrowski R., Dott W. 2000. *Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities*. Int. J. Hyg. Envir. Heal., 203: 37–104.
- Gąska-Jędruch U., Dudzińska M.R. 2009. *Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w powietrzu wewnętrznym*. [w:] Ozonek J., Pawłowski A. (red.). Polska Inżynieria Środowiska pięć lat po wstąpieniu do Unii Europejskiej, tom 2. Monografie Komitetu Inżynierii Środowisk, 59: 31-40.
- Gładysz J., Grzesiak A., Nieradko-Iwanicka B., Borzęcki A. 2010. *Wpływ zanieczyszczeń powietrza na stan zdrowia i spodziewaną długość życia ludzi*. Prob. Hig. i Epidem., 91(2): 178–180.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. 2000. *The yeasts, a taxonomic study. Fourth edition*. Elsevier, Amsterdam, 1076.
- Latge J.P. 2001. *The pathobiology of Aspergillus fumigatus*. Clin. Microbiol. Rev., 12(2): 310-350.
- Lee J.H., Jo W.K., 2006. *Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols AT Korean high-rise apartment buildings*. Environ. Res., 101: 11-17.
- Pavan R., Manjunath K. 2014. *Qualitative analysis of indoor and outdoor airborne fungi in Cowshed*. J. Mycol.: 1-8.



- Shelton B.G., Kirkland K.H., Flanders W.D., Morris G.K. 2002. *Profiles of Airborne Fungi in Buildings and Outdoor Environments in the United States*. Appl. Environ. Microb., 68(4): 1743–1753.
- Snelders E., Van der Lee H.A.L., Kuijpers J., Rijs A.J.M.M., Varga J., Samson R.A., Mellado E., Donders A.R.T., Melchers W.J.G., Verweij P.E. 2008. *Emergence of azole resistance in Aspergillus fumigatus and spread of a single resistance mechanism*. PLoS Medicine, 5(11): 219.
- Żukiewicz-Sobczak W., Cholewa G., Sobczak P., Zagórski J., Wojtyła-Buciora P. 2015. *Health risks associated with exposure to fungi*. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 7: 313 – 317.

## Obce i inwazyjne gatunki grzybów fitopatogenicznych w Polsce

### Alien and invasive species of phytopathogenic fungi in Poland

Kamila Kulesza

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Studenckie Koło Naukowe Mykologów  
Opiekun: dr hab. Anna Biedunkiewicz

#### **Abstract:**

The aim of the work is to review the literature about invasive alien species entering to Poland, with particular emphasis on plant pathogens of economic importance.

As alien and invasive species, they are referred to, among other fungi causing plant diseases, i.e. phytopathogens. Until now in Poland the most common species belonging to the following orders: Erysiphales (powdery mildew) and Uredinales (rust), causing dangerous diseases of cultivated and ornamental plants. Most of the species of fungi recorded so far parasitize on alien plants cultivated for economic or decorative purposes, or accidentally introduced into Poland.

Although many reports have been published so far regarding alien and invasive phytopathogenic fungi species in Poland, there is still a lack of comprehensive data, mainly ecological, necessary to analyze changes in the expansion and species composition of fungi in our country.

**Keywords:** phytopathogenic fungi, alien species, invasive species

#### **Wstęp**

Inwazja biologiczna jest zjawiskiem polegającym na gwałtownym rozprzestrzenianiu się gatunku na obszarze, który występuje poza granicami jego naturalnego występowania. Obecnie uważa się, że inwazje są jednym z najpopularniejszych zagrożeń dla różnorodności biologicznej (Thiele, Otte 2008).

Jako organizmy inwazyjne określa się wysoce ekspansywne gatunki allochtoniczne, rozprzestrzeniające się w sposób naturalny lub w wyniku ludzkiej działalności, stanowiące zagrożenie dla fauny i flory całego ekosystemu oraz zdolne do wypierania gatunków autochtonicznych (Meyerson, Mooney 2007). Gatunki inwazyjne charakteryzują się m.in. obcym pochodzeniem geograficznym, zdolnością przystosowywania się do środowiska antropogenicznego lub półnaturalnego (np. łąka, torfowisko), łatwością rozprzestrzeniania się i rozmnażania. Wzrost tempa inwazji pojawił się wraz z wielkimi odkryciami geograficznymi (XV i XVI wiek). Pokonywane były szybciej coraz większe dystanse, zaś ilość importowanych

produktów wzrosła. Przypuszcza się, że tempo inwazji biologicznych będzie wzrastało proporcjonalnie do nasilenia zmian klimatycznych (Pearson, Dawson 2005). Inwazyjność przejawiają organizmy z różnych grup systematycznych (także mikroorganizmy). W ich przypadku, o wiele częściej do inwazji dochodzi poprzez przypadkowe zawleczenie gatunku, niż w wyniku celowego działania. Grzyby stanowią grupę wysoce inwazyjnych gatunków, jednakże wyłącznie niektóre patogeny roślin i zwierząt zostały dobrze opisane (Desprez-Loustau i in. 2007). W wielu opublikowanych dotychczas pracach, nie ma wystarczającej liczby danych ekologicznych, niezbędnych do analizy ciągłych zmian ekspansji oraz składu gatunkowego grzybów w Polsce (Mułenko i in. 2010).

Pojęcie gatunku obcego (allochtonicznego, nierodzimego) dotyczy gatunku, podgatunku lub niższego taksonu systematycznego, który został wprowadzony przy bezpośrednim lub pośrednim udziale człowieka, w sposób świadomy bądź przypadkowy. Jest to organizm pojawiający się poza obszarem swojego naturalnego występowania. Za obce nie uznaje się gatunków, które zwiększają obszar bytowania w wyniku zmiany klimatu lub siedliska oraz organizmy zmodyfikowane genetycznie (GMO). Do introdukcji gatunku na nowy teren może dojść poprzez żywe osobniki lub ich części umożliwiające rozmnażanie. Zazwyczaj wprowadzenie gatunków allochtonicznych, nie ma negatywnego wpływu na lokalną przyrodę (Solarz 2008). Gatunki obce charakteryzują się ogromną ekspansywnością, dlatego zasięg ich występowania zwiększa się. Muszą one jednak pokonać wiele barier związanych z rozprzestrzenianiem oraz reprodukcją. Gatunek obcy, który zasiedli się i staje się zagrożeniem dla rodzimej różnorodności biologicznej oraz wypiera elementy autochtonicznej fauny i flory, jest definiowany jako gatunek inwazyjny (Richardson i in. 2000). Wśród wszystkich gatunków obcych zasługujących na uwagę są te, które mogą wypierać gatunki autochtoniczne, negatywnie wpływać na gospodarkę, zdrowie a w skrajnych przypadkach, na życie ludzi. Są one określane jako inwazyjne gatunki obce (ang. invasive alien species – IAS) (Tokarska-Guzik i in. 2012).

Obce i inwazyjne gatunki grzybów fitopatogenicznych, wywierają negatywny wpływ na gatunki rodzime, tj. wypieranie, konkurencja o niszę ekologiczną i zasoby środowiska. Niekiedy gatunki obce mają możliwość krzyżowania się ze spokrewnionymi gatunkami autochtonicznymi lub przenoszą na nie czynniki chorobotwórcze. Doprowadzić to może do spadku liczebności, a nawet całkowitego wyginięcia gatunków rodzimych (Solarz 2007).

## Cel pracy

Celem pracy jest przegląd literatury dotyczącej napływających do Polski obcych gatunków grzybów inwazyjnych, ze szczególnym uwzględnieniem patogenów roślin mających znaczenie gospodarcze.

## Zjawisko inwazyjności w Polsce

Szybko postępujący synantropizm flory i celowe wprowadzanie nowych gatunków roślin, stały się przyczyną coraz częstszego występowania obcych gatunków grzybów fitopatogenicznych. Grzyby rozprzestrzeniają się przede wszystkim wraz ze swymi gospodarzami, a w korzystnych warunkach, mogą powodować ich choroby. Działalność ludzi może przyczyniać się do ekspansji grzybów, zaś skuteczna kontrola może ograniczyć ich występowanie oraz nasilenie chorób roślin (Mułenko i in. 2010). Stanowią one istotny element różnorodności biologicznej, nie tylko ze względu na ogromną liczbę gatunków, ale także dzięki znaczeniu w ewolucji, ekologii i gospodarce. Zaliczane są do grupy wysoce inwazyjnych organizmów (Desprez-Loustau i in. 2007).

Wiele opublikowanych dotychczas prac na temat obcych i inwazyjnych grzybów w Polsce, nie posiada kompletnych danych ekologicznych, w związku z czym informacje, niezbędne do przeprowadzenia analiz trwających zmian w ekspansji i składzie gatunkowym fitopatogenów w naszym kraju, są także niewystarczające (Mułenko i in. 2010).

Szeroką grupę grzybów fitopatogenicznych stanowią mikrogrzyby, wśród których odnotowane są liczne gatunki obce i inwazyjne dla Polski (Kryczyński, Weber 2010). W ostatnich dekadach można było zaobserwować szybkie rozprzestrzenianie się wielu gatunków inwazyjnych, na przykład *Erysiphe flexuosa* (Werner i in. 2009; Zimmermannová-Pastříčáková i in. 2002) czy *Erysiphe palczewskii* (Lebeda i in. 2008; Sucharzewska, Dynowska 2005).

Na polskiej liście gatunków uznawanych za obce i inwazyjne lub potencjalnie inwazyjne, znalazły się głównie mikrogrzyby fitopatogeniczne z gromady Ascomycota (głównie z rzędu Erysiphales), Basidiomycota (głównie rząd Pucciniales), Chytridiomycota oraz lęgniowce Oomycota (przede wszystkim rząd Peronosporales). Lista ta zawiera 86 gatunków, wybranych na podstawie danych literaturowych. Jest ona względnie obszerna lecz niekompletna, ponieważ zawiera jedynie gatunki, które zostały dobrze udokumentowane. Inwazyjność niektórych taksonów nadal jest dyskusyjna (Mułenko in. 2010).

## Grzyby z gromady Ascomycota

Szacuje się, że do Polski przybyło 31 gatunków zaliczanych do Ascomycota, w tym 24 z rzędu Erysiphales (mączniaki prawdziwe). Grupa ta została dobrze opisana na całym świecie, w Europie dotychczas odnotowano 150 gatunków (Kirk i in. 2008).

Pierwsze dokumenty w polskiej literaturze dotyczące inwazyjnych mączniaków prawdziwych, pojawiają się w drugiej połowie XIX wieku, zaś dane o wzroście ekspansji tych grzybów, datuje się na koniec ubiegłego wieku. Mączniaki zostały zarejestrowane na 209 nowych (dla nich) roślinach żywicielskich (Mułenko i in. 2008). Gatunek *Golovinomyces cichoracearum* infekuje najwięcej gatunków roślin (41), następnie *Golovinomyces oronti* (16) oraz *Blumeria graminis* (15) (Mułenko i in. 2010).

Charakterystyczną cechą tej grupy grzybów jest wstępna produkcja zarodników, przez które grzyby szybko rozprzestrzeniają się i infekują rośliny żywicielskie. Stadium doskonałe (teleomorfa) zwykle pojawia się znacznie później, czasem po wielu latach lub nie jest wytwarzane w ogóle. Przykładem takiego gatunku jest *Erysiphe alphitoides* porażający dęby (Sucharzewska 2009). Inne gatunki, takie jak *Erysiphe elevata* (Ale-Agha i in. 2004), *E. flexuosa* (Sucharzewska i in. 2018) i *E. palczewskii* zostały znalezione w obu stadiach równocześnie (Sucharzewska, Dynowska 2005).

Mączniaki rozprzestrzeniają się w bardzo szybkim tempie, np. *Erysiphe palczewskii* (Sucharzewska, Dynowska 2005) i *Erysiphe vanbruntiana* var. *sambuci-racemosae* (Bacigálová, Marková 2006) stały się powszechne w Europie w ciągu 20 lat. Obecnie najwyższą ekspansywność obserwuje się u *Erysiphe palczewskii* i *Erysiphe syringae-japonicae*. Masowo infekują one rośliny żywicielskie i produkują dużą liczbę owocników i askospor. *E. palczewskii* notowany jest na coraz to nowych żywicielach (Braun 2000).

Przykładem gatunku fitopatogenicznego z rzędu Erysiphales jest *Erysiphe necator*, dla którego najbardziej znaczącym gospodarzem jest winorośl, szczególnie europejski gatunek *Vitis vinifera*. Przyjmuje się, że grzyb ten pochodzi z Ameryki Północnej. Bez intensywnego stosowania fungicydów, *E. necator* znacząco zmniejsza zdrowotność winorośli, jakość i wydajność owoców oraz powoduje znaczne straty gospodarcze (English-Loeb, Norton 2007).

Do rzędu Erysiphales należy również gatunek *Podosphaera mors-uvae*, wywołujący chorobę zwaną amerykańskim mączniakiem agrestu. Został zaobserwowany w Europie pod koniec XIX wieku i powszechnie występuje na agrestie i porzeczkach. W Polsce amerykański mączniak agrestu jest znany od dawna, lecz nie miał większego wpływu na wyżej wymienione rośliny, ze względu na ich niewielkie znaczenie gospodarcze (Kryczyński, Weber 2011).

Najlepszą metodą chroniącą rośliny przed tym fitopatogenem, jest stosowanie zabiegów chemicznych (Meszka i in. 2011).

Innym przykładem może być *Erysiphe alphitoides*, patogen wywołujący mączniaka prawdziwego dębu. Grzyb ten jest rozpowszechniony w całej Europie, Azji, Ameryce, Australii i Nowej Zelandii. Choroba wywołana przez niego została zawleczona do Europy z Ameryki Północnej w XIX wieku i rozprzestrzeniła się w szybkim tempie. W Polsce, po raz pierwszy został udokumentowany w 1909 roku jako anamorfa, zaś w 1922 roku w stadium płciowym. Od tej pory stadium doskonale było odnotowywane dość często. *E. alphitoides* atakuje drzewa w różnym wieku i powoduje zmniejszenie ich rocznego przyrostu. Często zajmuje rośliny znajdujące się na terenach o wysokim poziomie antropopresji (Sucharzewska 2009).

Z kolei mączniak prawdziwy kasztanowca jest chorobą wywołaną przez gatunek *Erysiphe flexuosa*. Po raz pierwszy odnotowano go w Europie w 2000 roku. Grzyb ten został zawleczony ze Stanów Zjednoczonych, bardzo szybko rozprzestrzenił się i obecnie występuje epidemicznie, od 2002 roku także w Polsce (Adamska 2002; Piątek 2002). Pierwsze objawy zainfekowania rośliny przez mączniaka, mogą uwidaczniać się na liściach w postaci delikatnego, białego nalotu, lecz często nie są one dostrzegane. Warunki klimatyczne krajów europejskich są korzystne dla rozwoju *E. flexuosa*, na co wskazuje rosnąca z roku na rok liczba zainfekowanych kasztanowców. Nasilenie epidemii może również wynikać z dużej zdolności reprodukcyjnej grzyba (Werner i in. 2009). Środowisko antropogeniczne nie ogranicza występowania *E. flexuosa*, zaś częstość jego notowania i wysoki stopień porażania roślin żywicielskich, wskazuje na inwazyjny charakter tego gatunku (Sucharzewska i in. 2018).

Gatunkiem uznawanym za wysoce inwazyjny i powodującym wyparcie gatunków rodzimych jest *Erysiphe palczewskii*. Infekuje liście wielu roślin z rodzaju *Caragana* i *Colutea*. Objawami choroby są liście pokryte białawą, pajęczastą lub pajęczasto-mączystą warstwą. W Polsce *E. palczewskii* obserwowano na *Caragana arborescens* po raz pierwszy dopiero w 1981 roku. Obecnie jest znany w miejscach w środkowej i północno-wschodniej Polsce (Sucharzewska, Dynowska 2005).

### **Grzyby z gromady Basidiomycota**

Grzyby zaliczane do Basidiomycota i traktowane jako obce, są reprezentowane przez 28 gatunków, z czego 15 należy do rzędu Pucciniales (rdzowce). Zwykle w polskiej florze odnotowywane są na roślinach nierodzimych, a jedynie kilka gatunków ma charakter

zdecydowanie inwazyjny m.in. *Puccinia horiana*, *Puccinia komarovii*, *Puccinia malvaceraum* czy głowniowiec *Ustilago maydis* (Mułenko i in. 2010).

Gatunkiem prawdopodobnie wprowadzonym najwcześniej do Polski, tuż po odkryciu Ameryki Północnej, był *Ustilago maydis*. Na przełomie XIX i XX wieku patogen ten był powszechnie notowany na kukurydzy (*Zea mays*) w wielu regionach Polski. Gatunek ten jest patogenem wywołującym chorobę zwaną głownią guzowatą kukurydzy. Zazwyczaj infekuje nadziemne części roślin, w wyniku czego powoduje straty wynoszące 5-10% zbiorów. Objawami tej choroby są powstające narośla różnego kształtu i o różnej wielkości, znajdujące się na kolbach i łodygach. Grzybnia powoduje nadmierne powiększanie i dzielenie komórek tkanki rośliny. Często kolby zostają całkowicie zniszczone. Aby chronić rośliny przed tym patogenem, stosuje się działające powierzchniowo lub systemicznie zaprawy nasion w przypadku, gdy kukurydza jest siana na danym obszarze po raz pierwszy. Dodatkowo stosuje się płodozmian, który niszczy chore rośliny i ich części (Marcinkowska 2010).

### **Grzyby z gromady Chytridiomycota**

W Polsce dotychczas odnotowano wyłącznie jeden gatunek *Synchytrium endobioticum* zaliczany do tej gromady. Ostatnie informacje na temat występowania tego organizmu w Polsce, datuje się na lata 70. XX wieku, co wskazuje na prawdopodobne ustąpienie tego gatunku z naszego kraju (Desprez-Loustau i in. 2010).

### **Grzyby Protista z gromady Oomycota**

Istnieje 27 gatunków należących do gromady Oomycota, głównie do rzędów Peronosporales i Saprolegniales, które zostały introdukowane do Polski i mogą być traktowane jako inwazyjne. Większość z nich wywołuje ogromne szkody w regionach, gdzie uprawiana jest roślina żywicielska (Mułenko i in. 2010).

Jako przykłady lęgniowców fitopatogenicznych powszechnych na terenach uprawnych w Polsce można wymienić: *Peronospora destructor*, *Plasmopara viticola*, *Pseudoperonospora cubensis* oraz *Phytophthora infestans*.

*Peronospora destructor* wywołuje chorobę zwaną mączniakiem rzekomym cebuli. Najczęściej występuje na cebuli zwyczajnej, czasami również na cebuli szalotce oraz szczypiorku. W uprawie może powodować straty (często wynoszące ponad 50%). Porażeniu ulegają liście, pędy kwiatowe oraz cebula. Z zakażonych cebul wyrastają rośliny charakteryzujące się jasnozielonymi liśćmi. Rośliny, które wyrosły z chorych cebul, zamierają

przedwcześnie. Istotną rolę w ochronie roślin pełni izolacja oraz usuwanie porażonych cebul z upraw, jak również stosowanie fungicydów (Kryczyński i in. 2011).

Z kolei *Plasmopara viticola* jest patogenem wywołującym chorobę zwaną mączniakiem rzekomym winorośli. Do Europy został przeniesiony przez przypadek w drugiej połowie XIX wieku z Ameryki Północnej. *P. viticola* powoduje poważne straty w europejskich winnicach. Pierwsze objawy zwykle widoczne są po 5-7 dniach od infekcji. Na liściach pojawiają się okrągłe plamy oleistego kształtu. Przy korzystnych warunkach mogą pokryć większość powierzchni liścia (Ash 2000; Łuszczynski 2002). W celu ochrony winorośli, konieczne jest odpowiednie zagęszczenie roślin na plantacji, systematyczne przycinanie pędów oraz niszczenie wszystkich opadłych liści. Dodatkowo stosuje się chemiczne środki ochrony roślin, które są niezbędne zwłaszcza podczas częstych opadów (Kryczyński i in. 2011).

Innym przykładem organizmu grzybopodobnego fitopatogenicznego, często notowanego na terenach uprawnych, jest *Pseudoperonospora cubensis*. Wywołuje chorobę zwaną mączniakiem rzekomym roślin dyniowatych. Jest jednym z bardziej powszechnych i ważniejszych ekonomicznie fitopatogenów. *P. cubensis* atakuje liście dyniowatych, czasami również inne nadziemne części roślin. Infekuje żywe tkanki gospodarza podczas każdego ze stadium rozwojowego (sadzonki, młode i dorosłe rośliny). Pierwszymi objawami zakażenia *P. cubensis* są bladeżółte, nieregularne plamy na górnej stronie liścia, często ograniczone nerwami, przez co mają kształt wieloboczny. Podczas rozwoju plamy te, łączą się w coraz większe uszkodzenia, a z czasem mogą nawet objąć całą powierzchnię liścia. Na dolnej blaszce liściowej pojawia się szary, następnie fioletowoczarny nalot, w tych samych miejscach, gdzie na górnej powierzchni liścia znajdują się plamy (Lebeda, Cohen 2010). Aby zapobiegać infekcjom, należy uprawiać wyłącznie odmiany odporne na dany patogen, plantacje powinny znajdować się w miejscach otwartych, przewiewnych, z dala od zbiorników wodnych, łąk i zadrzewień. Podczas pojawienia się pierwszych objawów choroby, należy zastosować fungicydy (Robak, Sobolewski 2012).

W Polsce *Phytophthora infestans* występuje od drugiej połowy XIX wieku. Jest sprawcą zarazy ziemniaka i powoduje znaczne straty w uprawach ziemniaków, pomidorów i petunii. *Ph. infestans* infekuje wszystkie nadziemne części roślin, które są narażone na działanie czynnika chorobotwórczego, na każdym etapie rozwoju. Grzybnia patogena przerasta tkanki rośliny, prowadząc do charakterystycznych nekrotycznych objawów zarazy. Zaraza ziemniaka może szybko rozprzestrzeniać się w czasie chłodnej, deszczowej pogody, niszcząc w ciągu kilku dni całą uprawę. Patogen ten ma globalny zasięg, jest szeroko rozpowszechniony



w krajach europejskich, także w Polsce. W XIX wieku został zawleczony ze Stanów Zjednoczonych do Irlandii, gdzie wywołał wielki głód, przez co stał się przyczyną śmierci miliona ludzi, zaś 1-5 milionów zmuszonych było do emigracji (Nelson 2008). Ochrona roślin przed *Ph. infestans* polega na uprawie odmian odpornych na daną chorobę, zabiegach agrotechnicznych i stosowaniu środków chemicznych (Marcinkowska 2010).

## Podsumowanie

Dla Polski stworzono bazę danych „Gatunki obce w Polsce”, w której zgromadzono dotychczas 1781 gatunków roślin, zwierząt i grzybów. W 2013 roku, lista obejmowała jedynie 1239 organizmów. Wśród nich są takie, których obecność stwierdzono sporadycznie. Ogromna część wprowadzanych na nasz teren gatunków ginie i nie tworzy trwałej, rozmnażającej się populacji, jednak konieczne jest stałe monitorowanie tych zmian.

Do tej pory opisano 86 obcych i inwazyjnych gatunków grzybów fitopatogenicznych znajdujących się na terenie całej Polski. Z lęgniowców Oomycota uwzględniono 27 gatunków, Chytridiomycota wyłącznie jeden gatunek, z Ascomycota odnotowano 30 gatunków, natomiast z gromady Basidiomycota 28 gatunków. Ich liczba jest prawdopodobnie znacznie większa, a brak danych na ten temat, wynika z niedoceniaenia tego typu badań. Dlatego wskazany jest ciągły monitoring środowiska w celu detekcji gatunków obcych zagrażających biocie naszego kraju.

## Literatura

- Adamska I. 2002. *Grzyby pasożytnicze roślin ozdobnych i ziół Szczecina*. Acta Agrobot. 5(1): 7–15.
- Ale-Agha N., Bolay A., Braun U., Feige B., Jage H., Kummer V., Lebeda A., Piątek M., Shin H., Zimmermannová-Pastričáková K. 2004. *Erysiphe catalpae and Erysiphe elevata in Europe*. Mycol. Progr., 3: 291-292.
- Ash G. 2000. *Downy mildew of grape*. *The Plant Health Instructor*. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Oomycetes/Pages/DownyMildewGrape.aspx> (dostęp: 26.02.2018 r.).
- Bacigálová K., Marková J. 2006. *Erysiphe azalae (Erysiphales) – a new species of powdery mildew for Slovakia and further records in Czech Republic*. Czech Mycol., 58: 189-199.
- Braun U. 2000. *Miscellaneous notes on some micromycetes*. Schlechtendalia, 5: 31–56.
- Desprez-Loustau L., Courtecuisse R., Robin C., Husson C., Moreau P.A., Blancard D., Selosse M.A., Lung-Escarmant B., Piou D., Sache I. 2010. *Species diversity and drivers of spread of alien fungi (sensu lato) in Europe with a particular focus on France*. Biol. Inv., 12: 157–172.

- Desprez-Loustau M.L., Robin C., Buée M., Courtecuisse R., Garbaye J., Suffert F., Sachne I., Rizzo M. 2007. *The fungal dimension of biological invasions*. Trends Ecol. Evol., 22: 472-480.
- English-Loeb G., Norton A.P. 2007. *Biological Control of Grape Powdery Mildew Control Mycophagus Mites*. Plant Dis.: 421-429.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of Fungi*. CAB International, Wallingford.
- Kryczyński S., Weber Z. 2011. *Fitopatologia*. Powszechne Wyd. Rolnicze i Leśne, Poznań: 464.
- Lebeda A., Cohen Y. 2011. *Cucurbit downy mildew (Pseudoperonospora cubensis)—biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control*. Eur. J. Plant Pathol., 129: 157-192.
- Lebeda A., Mieslerová B., Sedlářová M., Pejchal M. 2008. *Occurrence of Anamorphic and Teleomorphic Stage of Erysiphe palczewskii (syn. Microsphaera palczewskii) on Caragana arborescens in the Czech Republic and Austria and its Morphological Characterisation*. Plant Protect. Sci., 44: 41-48.
- Łuszczynski J. 2002. *Przewodnik do ćwiczeń z mykologii*. Wyd. Akademii Świętokrzyskiej, Kielce: 159.
- Marcinkowska J. 2010. *Oznaczanie rodzajów ważnych organizmów fitopatogenicznych (Fungi, Oomycota, Plasmodiophorida)*. Wyd. SGGW, Warszawa: 216.
- Meszka B., Broniarek-Niemiec A., Bielenin A. 2011. *Aktualne problemy ochrony roślin jagodowych przed chorobami*. Fitopatologia: zdrowe rośliny – zdrowi ludzie: 156-158.
- Meyerson L.A., Mooney H.A. 2007. *Invasive alien species in an era of globalization*. Front. Ecol. Environ., 5: 199-208.
- Mułenko W., Majewski T., Ruskiewicz-Michalska M. 2008. *A preliminary checklist of micromycetes in Poland*. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- Mułenko W., Piątek M., Wołczańska A., Kozłowska M., Ruskiewicz-Michalska M. 2010. *Plant parasitic fungi introduced to Poland in modern times, alien and invasive species*. Biol. Invasions in Poland, 1: 49-71.
- Nelson S.C. 2008. *Late Blight of Tomato (Phytophthora infestans)*. Plant. Dis., 45: 1-10.
- Pearson R. G., Dawson T. P. 2005. *Long-distance plant dispersal and habitat fragmentation: identifying conservation targets for spatial landscape planning under climate change*. Biol. Cons., 123(3): 389-401.
- Piątek M. 2002. *Erysiphe flexuosa, a new for Poland powdery mildew causing disease of Aesculus hippocastanum*. Phytopathol. Pol., 24: 67-71.
- Richardson D. M., Pyšek P., Rejmanek M., Barbour M. G., Panetta F. D., West C. J. 2000. *Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions*. Div. Distrib., 6: 93-107.
- Robak J., Sobolewski J. 2012. *Metodyka integrowanej ochrony roślin warzywnych przed chorobami*. Inst. Ogródnictwa Skierniewice, Zakład Ochrony Roślin Warzywnych: 36.

- Solarz W. 2007. *Inwazje biologiczne jako zagrożenie dla przyrody*. Prog. Plant Prot., 47: 128-133.
- Sucharzewska E. 2009. *The development of Erysiphe alphitoides and E. hypophylla in the urban environment*. Acta Mycol., 44: 109-123.
- Sucharzewska E., Dynowska M. 2005. *Life strategies of Erysiphe palczewskii in the conditions of diversified anthropopressure*. Acta Mycol., 40: 103-112.
- Sucharzewska E., Kulesza K., Ejdyś E., Dynowska M., Kubiak D., Biedunkiewicz A. 2018. *Erysiphe flexuosa (Fungi, Erysiphales) – life strategies and threats to chestnut trees including Cameraria orhidella (Lepidoptera, Gracillariidae) pest in the urban environment*. Pol. J. Nat. Sci., 33(2): 233-246.
- Thiele J., Otte A. 2008. *Invasion patterns of Heracleum mantegazzianum in Germany on the regional and landscape scales*. J. Nat. Conserv., 16(2): 61–71.
- Tokarska- Guzik B., Dajdok Z., Zając M., Zając A., Urbisz A., Danielewicz W., Hołdyński C. 2012. *Rośliny obcego pochodzenia w Polsce ze szczególnym uwzględnieniem gatunków inwazyjnych*. Wydział Wyd. i Poligrafii, Warszawa: 195.
- Werner M., Karolewski Z., Andrzejak R. 2009. *Mączniak prawdziwy (Erysiphe flexuosa U. Braun & S. Takamatsu) nowym zagrożeniem dla kasztanowców*. Progr. Plant Prot., 49: 759-762.
- Zimmermannová-Pastričáková K., Adamska I., Błaszowski J., Bolay A., Braun U. 2002. *Epidemic spread of Erysiphe flexuosa (North American powdery mildew of horse-chestnut) in Europe*. Schlechtendalia, 8: 39-45.

## Endobakterie porostów wybranych gatunków występujących na Spitsbergenie

### The endobacteria of selected species of lichens of the Spitsbergen

Milena Traut

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Naukowe Koło Mikrobiologów  
Opiekun: dr hab. Dorota Górniak

#### Abstract

The aim was to isolate and determinate metabolic features of endobacteria from six species of lichens: *Parmelia stygia*, *Xanthoria elegans*, *Flavocetraria nivalis*, *Solorina crocea*, *Ochrolechia frigida* and *Cetrariella delisei*, which were collected in June 2017 in the Brattegga Valley. To eliminate all microbes from the thallus, the optimization of disinfection of the thallus was used. The Biosca method (2016) with modifications was applied.

Preparing 200 mg of thallus and rinsed the samples in 3% hydrogen peroxide in Petri dish (1 minute). Washing the sample twice in distilled H<sub>2</sub>O and placed in 3 cm<sup>3</sup> of sterile nutrient broth and placed it in a ball mill capsule and homogenized (15 seconds at 3 thousand rpm.). Then add 3 cm<sup>3</sup> of peptone water. Before use, the capsules were sterilized and then cooled. The homogenate was incubated on ice. Ten-fold dilutions of the homogenate in Ringer were plated on nutrient agar and Kinga B medium. The cultures were incubated at 20°C/14 days and sifted to obtain pure cultures. Macroscopic, microscopic analysis was performed and the respiratory system was checked. On the culture media was tested the ability to produce lipases, proteases, phosphatases, cellulases and nitrate reductase.

The research methods allowed isolate 44 bacterial strains. Among all isolates 61% were Gram negative rods, 34% Gram positive rods and 5% Gram positive cocci. All strains produce catalase, 86.4% produce cytochrome oxidase. More than half of the isolated strains produce dehydrogenases but 4.5% showed lipases production and 86% proteases. The 89% of the tested strains produce phosphatases. The isolates increase on a nitrogen-free support (diazotrophy) and produce nitrate reductase.

**Keywords:** lichens, endobacteria, microbial associations, Spitsbergen

#### Wstęp

Porosty są organizmami pionierskimi ze względu na zdolność do występowania w niekorzystnych dla większości organizmów warunkach środowiska oraz przy niskiej podaży składników odżywczych (Selbmann i in. 2010). Nawet w ekstremalnie niesprzyjających warunkach, niektóre gatunki mogą występować w środowisku nawet przez tysiąc lat (Grube, Hawksworth 2007). Początkowo porosty były uważane za symbiotyczną wspólnotę tylko między grzybem oraz glonem. Zauważono jednak, że w plechach porostowych istnieje większa

liczba współistniejących symbiontów. Uważa się, że skrajna tolerancja na stres oraz możliwość tolerowania niekorzystnych warunków przez porosty, jest wynikiem mutualistycznej symbiozy między występującymi w nich mikroorganizmami. Porosty są uważane za zlichenizowane grzyby, tworzące obligatoryjne relacje troficzne z autotroficznymi glonami i/lub sinicami. Ich plechy mogą jednak być skolonizowane również przez bakterie. Różnorodność i obfitość niewidocznych społeczności bakteryjnych jest nadal słabo poznana (Lawrey, Diederich 2003). Unikalna struktura porostów zapewnia wciąż niezbadane środowisko życia dla drobnoustrojów (Grube i in. 2009).

Pierwszymi badaczami zajmującymi się tym zjawiskiem byli Henkel i Yuzhakova (1936) oraz Iskina (1938), którzy wykryli bakterie wiążące azot u porostów, poprzez hodowlę na wolnym od azotu podłożu Ashby i przydzielili wyizolowane szczepy do rodzaju *Azotobacter*. We wcześniejszych badaniach nad mikrobiomem porostów, poza szczepami *Azotobacter*, stwierdzono przy wykorzystaniu metod hodowlanych także inne endobakterie. Wykryte szczepy to: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium* i *Pseudomonas* (Henkel i Plotnikova 1973). Wyniki ostatnio przeprowadzonych badań molekularnych wykazały, że różnorodność bakterii może być znacznie wyższa (Cardinale i in. 2006). Zasugerowano wówczas, że występują prawdopodobnie nawet miliony komórek bakterii na gram plechy porostów. Endobakterie porostowe okazały się wysoce zróżnicowane i wykazano, że czynnie przyczyniają się do odporności holobiomu porostów (Grube i in. 2015). Porosty zostały określone jako „skrzynia skarbów dla komunikacji, regulacji i bioaktywności międzyorganistycznej” (Boustie i in. 2011).

Chociaż w porostach występują różne związki wtórne o działaniu antagonistycznym uznano, że tylko zróżnicowany ochronny mikrobiom, może skutecznie utrzymywać stabilność przez dłuższy czas, aby zapobiec atakom patogenów (Boustie i in. 2011).

Endobakterie porostów mogą odgrywać nie tylko rolę w obiegu dodatkowych składników odżywczych, ale także w obronie/allelopatii przeciwko specyficznym grupom drobnoustrojów (Cernava i in. 2015). Bakterie rodzaju *Actinobacteria*, powszechnie są wykrywane metodami molekularnymi w plechach różnych gatunków porostów (Strobel i in. 2004). Są znane ze swoich właściwości przeciwdrobnoustrojowych i potencjału biosyntezy. Według Cernava i in. (2015), bakterie wyizolowane z porostów, są zaangażowane w mechanizm obronny porostów. W związku z tym, porównano symbiozy porostów do mikroekosystemów, w których fotobionty są producentami, mykobionty odgrywają rolę

konsumentów a bakterie są odpowiedzialne są za pozyskiwanie składników odżywczych, recykling i antagonizm wobec innych grup drobnoustrojów (Aschenbrenner i in. 2016).

W wielu ostatnich badaniach funkcjonalnych i metagenomicznych, jedną z sugerowanych cech mikrobioty bakteryjnej porostów, jest ich szeroki zakres aktywności litycznych, w tym chitynolizy, proteolizy i glukanolizy (Lee i in. 2014). Te zewnątrzkomórkowe enzymy występują stosunkowo w dużych ilościach w obrębie endobakterii porostów i sugeruje się, że biorą udział w dostępności składników odżywczych w symbiozie porostów i przyczyniają się do hydrolizy związków organicznych. Mykobiont stanowi znaczną część plechy porostu, a komórki grzybów są mieszaninami polisacharydów i białek, więc szczepy bakterii o aktywności litycznej, prawdopodobnie degradują starsze części plechy, w których nie występują już związki przeciwbakteryjne. Wiele porostów skorupiastych i krzaczkowatych rośnie w środowiskach bogatych w celulozę i często występują w bliskim sąsiedztwie mchów i innej roślinności, w związku z czym, celuloza może być szczególnie ważna dla symbiozy wielu porostów, chociaż porosty na ogół uzyskują swój węgiel od partnera fotosyntetyzującego (Palmqvist i in. 2008). Stwierdzono, że układy celulazy, znajdujące się w obrębie porostów, są wykorzystywane do aktywności saprotroficznej, co może być korzystne dla symbiozy, np. gdy porosty pokryte są śniegiem (Beckett i in. 2013).

Porosty, które są klasycznym przykładem samowystarczalnych symbioz, są interesującym modelem badań antagonistycznych. W obrębie tych mini-ekosystemów, współpraca między symbiontami mikrobiologicznymi, ułatwia w ekstremalnych warunkach ekologicznych stabilność i długowieczność symbiozy, mimo zagrożenia ze strony allochtonicznych bakterii i grzybów (Mushegian i in. 2011).

## Cel i metody

Celem przeprowadzonych badań była izolacja bakterii endolichenicznych, pochodzących z sześciu gatunków porostów występujących na południowo-zachodnim Spitsbergenie oraz określenie wybranych cech ich metabolizmu.

Do badań użyto sześciu gatunków porostów (*Parmelia stygia*, *Xanthoria elegans*, *Flavocetraria nivalis*, *Solorina crocea*, *Ochrolechia frigida* i *Cetrariella delisei*) pozyskanych podczas letniej wyprawy do Polskiej Stacji im. Siedleckiego w Hornsundzie na Spitsbergenie. W celu wyeliminowania wszystkich drobnoustrojów z powierzchni plechy, zastosowano optymalizację dezynfekcji powierzchni plech. Zbadano skuteczność dwóch dezynfektantów: 3% nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oraz 70% alkohol etylowy. W celu wyizolowania endobakterii

porostów, zastosowano metodę wg Biosca (2016) z modyfikacjami. Na początku sporządzono nawązkę plechy o wadze 200 mg poprzez odcięcie jałowym skalpelem, następnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej przez 1 minutę. Próbki dezynfekowano w 3% nadtlenu wodoru w sterylnej płytce Petriego przez 1 minutę. Dwukrotnie przemywano w sterylnej H<sub>2</sub>O destylowanej przez 5 minut. Następnie umieszczono w 3 cm<sup>3</sup> jałowego bulionu odżywczego. Tak przygotowaną próbkę umieszczano w sterylnej kapsule młynka kulowego i homogenizowano przez 15 sekund przy 3 tys. rpm. Do kapsuły dodawano 3 cm<sup>3</sup> wody peptonowej. Przed użyciem kapsuły sterylizowano, a następnie schładzano. Następnie homogenizat inkubowano na lodzie przez 10 minut. Dziesięciokrotne rozcieńczenia homogenizatu w jałowym płynie Ringera (pH 7) wysiano powierzchniowo na agar odżywczy (AO) oraz podłoże Kinga B (KB) w 2 powtórzeniach. Hodowle inkubowano w 20°C przez 14 dni. Po okresie inkubacji określono cechy makroskopowe uzyskanych kolonii. Następnie kolonie przesiewano w celu uzyskania czystych kultur. Dokonywano analizy makroskopowej i mikroskopowej (barwienie Grama) uzyskanych szczepów bakterii. Następnie określano aktywność oddechową wyizolowanych szczepów. Uzyskane szczepy poddano analizie określającej wybrane właściwości metaboliczne. Na podłożach hodowlanych określano zdolność do wytwarzania lipaz – TWEEN, proteaz - SMA, fosfataz – PVK, celulaz – CMC oraz reduktazy azotanowej. Posiewy inkubowano w temperaturze 20°C przez 48 godzin. Zdolność do wytwarzania fosfataz oraz reduktazy azotanowej określano po 7 dniach wzrostu. Zdolność endobakterii do wytwarzania wymienionych enzymów oceniono wg skali (0 - brak aktywności, 1 – mała aktywność, 2 – średnia aktywność, 3 – duża aktywność).

### **Wyniki badań**

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że bardziej skutecznym dezynfekantem jest 3% roztwór H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i zastosowano go do dalszych badań. Zastosowane metody badań udowodniły obecność oraz pozwoliły na wyizolowanie endobakterii z badanych porostów. Ze wszystkich 6 porostów uzyskano 44 szczepy bakterii. Na podłożu King B wyizolowano 5 kolonii, natomiast na agarze odżywczym 39 kolonii, stanowiących 88,6% wszystkich badanych szczepów. Uzyskane izolaty charakteryzowały się odmiennymi cechami makroskopowymi. Najwięcej wyizolowano kolonii małych (52,3%), o barwie kremowej (59,1%), kształcie okrągłym (75%), brzegu równym (77,3%), powierzchni gładkiej (77,3%), przejrzystych (82,8%) i lekko wzniesionych nad powierzchnią (81,8%). Wśród wszystkich izolatów, 61% stanowiły Gram-ujemne pałeczki, 34% Gram-dodatnie laseczki i 5% Gram-dodatnie ziarniaki. Formy morfologiczne uzyskanych izolatów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Formy morfologiczne oraz barwienie metodą Grama wyizolowanych endobakterii.

Nr szczepu	Pochodzenie	Formy morfologiczne	Barwienie
1	<i>Solorina crocea</i>	laseczki	G +
2		laseczki	G +
3		pałeczki	G -
4		pałeczki	G -
5		pałeczki	G -
6		pałeczki	G -
7	<i>Ochrolechia frigida</i>	laseczki	G +
8		laseczki	G +
9		pałeczki	G -
10		pałeczki	G -
11		pałeczki	G -
12		pałeczki	G -
13	<i>Xanthoria elegans</i>	laseczki	G +
14		laseczki	G +
15		pałeczki	G -
16		pałeczki	G -
17		laseczki	G +
18		ziarniaki	G +
19	ziarniaki	G +	
20	<i>Cetrariella delisei</i>	pałeczki	G -
21		pałeczki	G -
22		pałeczki	G -
23		pałeczki	G -
24		pałeczki	G -
25		pałeczki	G -
26		pałeczki	G -
27		laseczki	G +
28		pałeczki	G -
29	laseczki	G +	
30	<i>Flavocetraria nivalis</i>	pałeczki	G -
31		laseczki	G +
32		laseczki	G +
33		pałeczki	G -
34		pałeczki	G -
35		pałeczki	G -
36		pałeczki	G -
37		laseczki	G +
38		laseczki	G +
39	pałeczki	G -	
40	<i>Parmelia stygia</i>	pałeczki	G -
41		pałeczki	G -
42		laseczki	G +
43		pałeczki	G -
44		laseczki	G +

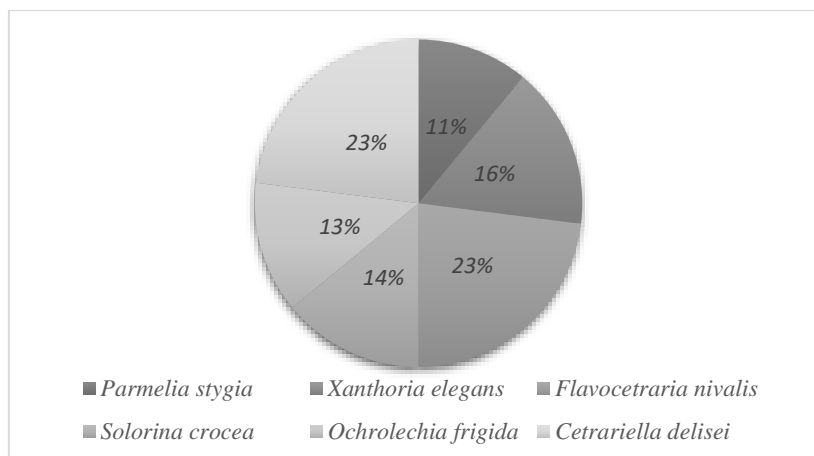
Źródło: pracowanie własne.



Wszystkie szczepy charakteryzowała zdolność do produkcji katalazy, natomiast 86,4% wykazywało zdolność do wytwarzania oksydazy cytochromowej. Zdolność do produkcji dehydrogenaz stwierdzono u ponad połowy wyizolowanych szczepów (59,1%).

Wśród wyizolowanych szczepów 4,5% wykazywała zdolność do produkcji lipaz a 86% do wytwarzania proteaz. Zdolność do produkcji fosfataz wykazywało 89% badanych szczepów. Stwierdzono wzrost wszystkich badanych izolatów na podłożu bezazotowym (diazotrofia). Z porostu *Solorina crocea* uzyskano sześć szczepów bakterii. Wśród wyizolowanych szczepów dominowały Gram-ujemne pałeczki, których wyizolowano cztery szczepy i stanowiły one 66,7% wszystkich izolatów. Pozostałą część stanowiły Gram-dodatnie laseczki. Z porostu *Ochrolechia frigida* wyizolowano sześć szczepów bakterii. Gram-ujemne pałeczki, uzyskane z tego porostu, stanowiły podobnie jak w przypadku *Solorina crocea*, 66,7% wszystkich wyizolowanych izolatów, natomiast Gram-dodatnie laseczki 33,3% uzyskanych szczepów. Z porostu *Xanthoria elegans* uzyskano siedem szczepów bakterii. Wśród nich wyróżniono Gram-dodatnie laseczki, Gram-ujemne pałeczki oraz Gram-dodatnie ziarniaki. Najwięcej wyróżniono Gram-dodatnich laseczek – 3 izolaty, które stanowiły 42,9% wszystkich wyizolowanych szczepów z tego gatunku porostu. Gram-ujemnych pałeczek oraz Gram-dodatnich ziarniaków uzyskano po 2 izolaty, które stanowiły po 28,6% wszystkich wyizolowanych szczepów. Z porostu *Cetrariella delisei* uzyskano 10 szczepów bakterii. Najwięcej wyizolowano Gram-ujemnych pałeczek (8 izolatów), które stanowiły 80% wszystkich wyizolowanych szczepów z tego gatunku. Pozostałe 2 izolaty należały do Gram-dodatnich laseczek i stanowiły one 20% wszystkich wyizolowanych szczepów. Z porostu *Flavocetraria nivalis* wyizolowano 10 gatunków szczepów bakterii. Najwięcej uzyskano Gram-ujemnych pałeczek – 6 izolatów, które stanowiły 60% uzyskanych szczepów. Pozostałą część stanowiły Gram-dodatnie laseczki, których uzyskano 4 izolaty – 40% wszystkich wyizolowanych szczepów. Z porostu *Parmelia stygia* uzyskano 5 szczepów bakterii. Najwięcej wyizolowano Gram-ujemnych pałeczek – 3 izolaty, które stanowiły 60% wszystkich wyizolowanych szczepów. Najmniej uzyskano Gram-dodatnich laseczek – 2 izolaty, które stanowiły 40% wyizolowanych szczepów.

Rysunek 1. Procentowy udział szczepów bakterii wyizolowanych z poszczególnych gatunków porostów



Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

Dotychczas z powodu trudności w izolacji i hodowli, tylko nieliczne badania wykazały obecność bakterii heterotroficznych u kilku gatunków porostów (Cardinale i in. 2006). Prawdopodobnie przyczyną jest wykorzystanie metod analizy bakteriologicznej porostów, które związane są z wykorzystaniem konwencjonalnych pożywek hodowlanych, nie odtwarzających złożonych warunków pokarmowych endobakterii występujących w porostach (Selbmann i in. 2010). W badaniach dotyczących izolacji endobakterii z porostów antarktycznych, uzyskano szereg szczepów bakterii psychrotolerancyjnych (Selbmann i in. 2010). Spośród trzydziestu badanych izolatów, zidentyfikowano także bakterie z grupy *Deinococcus-Thermus*. W przeprowadzonych w pracy badaniach z porostu *Xanthoria elegans* również wyizolowano Gram-dodatnie ziarniaki. Lee i in. (2014) prowadzili badania nad mikrobiotą dziewięciu różnych porostów. Uzyskane metody, pozwoliły wówczas na wyizolowanie następujących typów bakterii: Actinobacteria, Bacteroidetes, *Deinococcus-Thermus*, Firmicutes, Alaproteobacteria, Betaproteobacteria i Gammaproteobacteria. Większość izolatów alfabroteobakterii była spokrewniona z rodzajem *Sphingomonas* i wyizolowana z porostów zebranych z Arktyki i Antarktydy. Oprócz *Sphingomonas*, bakterie z rodzajów *Frondehabitans*, *Hymenobacter* i *Burkholderia* również wyizolowano z próbek porostów zarówno z Arktyki, jak i Antarktydy. Wyizolowano także: *Nakamurella*, *Streptomyces*, *Deinococcus*, *Paenibacillus*, *Aurantimonas*, *Methyloferula*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* i *Rhodanobacter*. Poprzez zastosowanie testów enzymatycznych stwierdzono, że mikrobiota porostów arktycznych i antarktycznych, wykazuje aktywność proteazy i lipazy i przypuszcza się, że bierze udział w dostarczaniu składników odżywczych dla całej symbiozy

(Lee i in. 2014). Metody hodowlane udowodniły, że endobakterie większości porostów należą do następujących gromad: Actinobacteria, Firmicutes i Proteobacteria. W nielicznych stwierdzono występowanie: Deinococcus-Thermus, Bacteroidetes i Acidobacteria (Lee i in., 2014).

### Podsumowanie

Endobakterie zidentyfikowane w przeprowadzonych badaniach należą do gatunków występujących w środowisku naturalnym. Zastosowane metody badań pozwoliły na wykazanie obecności oraz izolację bakterii endolichenicznych oraz udowodniły, że stanowią one trzeci element mutualistycznej symbiozy między grzybem oraz glonem. Uzyskane szczepy bakteryjne wykazują odmienne cechy metaboliczne, które umożliwiły zaadaptowanie porostów do zmieniających się warunków otoczenia. Zdolność do wytwarzania lipaz, proteaz, fosfataz, celulaz oraz reduktazy azotanowej przez endobakterie pozwala na wzrost i rozwój porostów w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Większość wyizolowanych szczepów wykazywała zdolność do produkcji fosfataz, które odpowiedzialne są za dostarczenie substancji odżywczych dla porostów, poprzez zwiększenie dostępności fosforu w wyniku uwalniania jego organicznych oraz nieorganicznych związków z gleby w procesie solubilizacji i mineralizacji. Wzrost wszystkich badanych izolatów na podłożu bezazotowym, pozwala zaklasyfikować je do diazotrofów. Wyizolowane szczepy wytwarzają nitrogenazę, katalizującą reakcję syntezy  $N_2$  (który pozyskują z atmosfery) do  $NH_3$ , dzięki czemu dostarczają porostom azotu. Umożliwia to porostom pionierski tryb życia na pierwotnych glebach polarnych, ubogich w azot organiczny.

### Literatura

- Aschenbrenner I., Cernava T., Berg G. 2016. *Understanding microbial multi-species symbioses*. Front. Microbiol. 7: 1–9.
- Beckett R., Zavarzina A., Liers C. 2013. *Oxidoreductases and cellulases in lichens: Possible roles in lichen biology and soil organic matter turnover*. Fungal. Biol. 117: 431–438.
- Biosca E., Flores R., Santander D., Díez-Gil J., Barreno E. 2016. *Innovative approaches using lichen enriched media to improve isolation and culturability of lichen associated bacteria*. PLoS One, 11(8), e0160328.
- Boustie J., Tomasi S., Grube M. 2011. *Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source*. Phytochem. Rev. 10: 287–307.
- Cardinale M., Puglia A., Grube M. 2006. *Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities*. FEMS Microbiol. Ecol. 57: 484–495.

- Cernava T., Müller H., Aschenbrenner I. 2015. *Analyzing the antagonistic potential of the lichen microbiome against pathogens by bridging metagenomic with culture studies*. *Front. Microbiol.* 6: 1–11.
- Grube M., Berg G. 2009. *Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis*. *Fungal. Biol. Rev.* 23: 72–85.
- Grube M., Hawksworth D. 2007. *Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era*. *Mycol. Res.* 111: 1116–1132.
- Grube M., Cernava, T., Soh J., Fuchs S., Aschenbrenner, I., Lassek C., Wegner U., Becher D., Riedel K., Sensen C., Berg G. 2015. *Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics*. *ISME J.* 9: 412–424.
- Henkel P., Yuzhakova L. 1936. *Nitrogen-fixing bacteria in lichens*. *Izv. Biol. Inst. Permsk. Gos. Univ.* 10: 9–10.
- Henkel P., Plotnikova T. 1973. *Nitrogen-fixing bacteria in lichens*. *Izv. Nauk Ser. Biol.* 1973: 807–813.
- Iskina R. 1938. *On nitrogen fixing bacteria in lichens*. *Isv. Biol. Inst. Permsk.* 11: 133–139.
- Lawrey J., Diederich P. 2003. *Lichenicolous fungi: interactions, evolution, and biodiversity*. *Bryologist* 106: 81–120.
- Lee Y., Kim E., Lee H., Hong S. 2014. *Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens associated bacteria*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 2711–2721.
- Mushegian A., Peterson C., Baker, C., Pringle A. 2011. *Bacterial diversity across individual lichens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4249–4252.
- Palmqvist K., Dahlman L., Jonsson A., Nash T. 2008. *The carbon economy of lichens*. In: Nash TH (ed), *Lichen Biology*. Cambridge University Press: 182–215.
- Selbmann L., Zucconi L., Ruisi S., Grube M., Cardinale M., Onofri S. 2010. *Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance*. *Polar Biology* 33(1): 71–83.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. 2004. *Natural products from endophytic microorganisms*. *Journal of Natural Products* 67(2): 257–268.

## **Rozdział II**

### **Znaczenie wiedzy mikrobiologicznej w rolnictwie i ogrodnictwie**



## Wpływ wybranych cytokinin na wydajność mikrorozmnażania *Alternanthera reineckii* 'roseafolia'

The effect of selected cytokinin on the efficiency of micropropagation  
of *Alternanthera reineckii* 'roseafolia'

Damian Iwański  
Michał Dziwak  
Agata Olejnik

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Wydział Przyrodniczo-Technologiczny  
Studenckie Koło Naukowe Genetyków i Hodowców Roślin  
Opiekun: dr hab. inż. Renata Galek, prof. nadzw.

### Abstract

The purpose of the experiment was to determine the effect of selected growth regulators on secondary explants of *Alternanthera reineckii*. The starting materials were nodal segments, which were fragments of shoot with a pair of leaves, devoid of the apical meristem. The laboratory experiment was established in four replicates for 7 substrate combinations. The term repetition means placement of 10 explants in one culture vessel. As a control, explants were placed on 1/3 MS and 1/3 MS with the addition of 6-benzyladeninopurine ( $0.66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), kinetin ( $0.66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), and 2-isopentyladenine ( $0.66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) were used to determine the effect of different doses of cytokinin on plant development. After six weeks of growth, measurements and observations of regenerating plants were made on seven substrate variants. The length of shoots (cm), the total number of main and lateral shoots, root length (cm), number of segments, and the value of fresh and dry mass (g) were determined.

Considering the mean values for the analyzed traits, the influence of growth regulators on the direction of morphogenesis and organogenesis was found. The most intensive elongation growth of the shoot was observed in plants growing on the control medium, and on the substrate with the addition of  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2-isopentyladenine. The longest roots were observed in plants on substrates with the addition of  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  of 2-isopentyladenine. A large number of side and adventitious shoots were observed in plants growing on substrates with the addition of  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetin. The highest value of fresh mass was observed in plants growing on nutrient solution with the addition of  $1.33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  of 2-isopentyladenine, and in the case of dry matter the highest achieved value was observed in plants growing on the control medium.

**Keywords:** *Alternanthera*, medium, growth regulator, tissue culture.

### Wstęp

Rośliny akwariowe stanowią grupę roślin spełniających różne funkcje. Odpowiadają za filtrowanie i dotlenianie wody. Oprócz stwarzania kryjówek dla ryb, są źródłem pokarmu. Zapobiegają także rozrastaniu się glonów w zbiorniku i pełnią funkcje ozdobne. Z tego powodu,

jednym z uprawianych powszechnie w akwariach gatunków, jest *Alternanthera reineckii*. Jej odmiany wykazują czerwone wybarwienie spodniej strony liści, co dobrze komponuje się z pobliskimi roślinami o klasycznych, zielonych liściach. *A. reineckii* 'Roseafolia' jest odmianą pochodzącą z Południowej Ameryki, dorastającą do wysokości około 50 centymetrów. Roślina zachowuje swój pokrój w wodzie dzięki obecności tkanki aerenchymy, czyli miękiszu powietrznego, który stanowi rodzaj szkieletu (Sharpe 2019). W celu rozmnażania roślin akwariowych warto wykorzystać metodę kultur tkankowych. Rośliny uzyskane *in vitro* mają jednakowy materiał genetyczny, co pozwala na rozmnażanie roślin, które w przypadku rozmnażania generatywnego mogłyby wykazać się rozszczepieniem i zmiennością cech. Umożliwia to również wyprodukowanie w krótkim czasie wielu roślin, co nie byłoby możliwe w przypadku zwykłego rozmnażania wegetatywnego poprzez sadzonkowanie. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu kultur *in vitro*, otrzymuje się gwarancję otrzymania w pełni zdrowych roślin wolnych od szkodników i chorób bakteryjnych, grzybowych lub wirusowych (Bieńkowska-Mochtak 1982). Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych związków z grupy cytokinin na rozwój *Alternanthera reineckii* 'Roseafolia'.

### **Material i metody badań**

W celu przeprowadzenia doświadczenia wykorzystano młode rośliny *Alternanthera reineckii* 'Roseafolia'. Wybrane rośliny wykazywały się dużą zdrowotnością, nie były porażone przez patogeny bakteryjne, grzybowe lub wirusy oraz były wolne od szkodników. W celu wprowadzenia ich do kultur tkankowych, przygotowano roztwór służący odkażeniu roślin, składający się ze sterylnej wody redestylowanej z dodatkiem podchlorynu sodu (3%), który jest główną substancją czynną w produkcie Domestos. Dla dezynfekcji materiału roślinnego użyto rozcieńczonego do 1/3 roztworu Domestosu. Fragmenty roślin, zawierające węzły z pąkami bocznymi, odkażono, umieszczając je w roztworze podchlorynu sodu na około 8 minut. Później, w komorze z laminarnym przepływem powietrza, zostały przełożone kolejno do trzech naczyń ze sterylną redestylowaną wodą – dwa razy na pięć minut i trzeci raz na 10 minut – w celu usunięcia środka odkażającego, który pozostając dłużej na roślinie, mógłby uszkodzić jej tkanki powodując zamieranie eksplantatów. Następnie eksplantaty zostały wyłożone na wysterylizowaną w autoklawie przez 20 minut w 121°C pod ciśnieniem jednej atmosfery pożywkę MS (Murashige i Skoog 1962) o zmniejszonej do 1/3 ilości mikro oraz



makroskładników. Skład pożywki MS z uwzględnieniem sacharozy oraz agaru wraz z ilością przygotowywanych roztworów bazowych, przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Skład pożywki MS z uwzględnieniem sacharozy i agaru

Składnik	Zawartość w pożywce [mg·dm <sup>-3</sup> ]	Ilość roztworu bazowego do sporządzenia pożywki [cm <sup>3</sup> ·dm <sup>-3</sup> ]	Zawartość składnika w roztworze bazowym [mg]
<b>ŹRÓDŁO MAKROELEMENTÓW</b>			
KNO <sub>3</sub>	1900	30	31650
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650		27500
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440	5	6630
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370	2	18500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	2	8500
<b>ŹRÓDŁO MIKROELEMENTÓW</b>			
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	2	1865
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8		1390
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,3	2	630
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	22,3		2230
ZnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	8,6		860
KI	0,83		83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25		25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025		2,5
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025		2,5
<b>WITAMINY</b>			
Amid kwasu nikotynowego	0,5	1	50
Pirydoksyna	0,5		50
Tiamina	1		100
<b>ZWIĄZKI ORGANICZNE</b>			
Mezoinozytol	100	2	5000
Glicyna	2	2	100
Sacharoza	30g		
Agar	8g		

Źródło: Opracowanie własne.

Po skutecznym wprowadzeniu roślin do kultur tkankowych, przygotowano pożywki doświadczalne z różnymi stężeniami różnych cytokinin. W doświadczeniu użyta została 6-benzyloadeninopuryna (BAP), kinetyna (Kin) oraz 2-izopentyloadenina (2iP). Łącznie przygotowano 7 kombinacji pożywki:

- 1/3 MS (KONTROLA)
- 1/3 MS + 0,66 mg·dm<sup>-3</sup> Kin
- 1/3 MS + 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> Kin
- 1/3 MS + 0,66 mg·dm<sup>-3</sup> 2iP
- 1/3 MS + 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> 2iP
- 1/3 MS + 0,66 mg·dm<sup>-3</sup> BA
- 1/3 MS + 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> BA

Materiałem wyjściowym były segmenty nodalne, czyli fragmenty pędu wraz z parą liści, pozbawione merystemu wierzchołkowego oraz dodatkowo dla podłoża zawierającego 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> BA, fragmenty z merystemem apikalnym (na rysunkach opisywane jako BA C). Doświadczenie laboratoryjne założono w czterech powtórzeniach. Pod pojęciem powtórzenia rozumie się wykładanie 10 eksplantatów do jednego naczynia hodowlanego. Jako kontrolę potraktowano eksplantaty umieszczone na pożywce 1/3 MS. Rośliny rosły w pokoju hodowlanym w warunkach 12 godzinnego dnia i w temperaturze 20°C przez 6 tygodni. Po tym czasie wykonano pomiary regenerujących roślin, które były uprawiane na siedmiu wariantach podłoża. Wyznaczono długość pędu (cm), łączną liczbę pędów przybyszowych i bocznych, długość korzeni (cm), liczbę segmentów, oraz wyznaczono wartość świeżej i suchej masy (g).

## Wyniki badań

Indukcja kultur *Alternanthera reineckii* 'Roseafolia' na zastosowanej pożywce 1/3 MS, okazała się skuteczna. Rośliny rozmnażane metodą kultur tkankowych potrzebują źródła węgla do budowy tkanek. W szkle może wystąpić niedobór tlenu węgla (IV) w powietrzu, dlatego powszechnie stosowane są cukry. Różne cukry, w zależności od stopnia złożenia, mogą wykazywać się innym działaniem na rośliny (De Paiva Neto i Otoni 2003). W tym doświadczeniu zastosowano sacharozę jako dodatek do pożywki, stanowiącą źródło węgla dla roślin. Rośliny wykładane na pożywkę nie mogą się w niej zanurzać całkowicie z powodu ewentualnych problemów z wymianą gazową. Optymalnie eksplantaty powinny być umieszczone w odpowiednio gęstej pożywce. W tym celu stosuje się różne środki żelujące (Asai i in. 1986). Dla celów tego doświadczenia zdecydowano się na użycie agaru. Ułatwia on

kontrolę czystości mikrobiologicznej hodowli. Dla realizacji celu pracy wykorzystano wybrane regulatory wzrostu (PGR), ze szczególnym uwzględnieniem cytokinin.

Podczas przeprowadzonego doświadczenia, żadne z naczyń hodowlanych nie zostało zanieczyszczone przez bakterie lub grzyby. Rośliny z grupy kontrolnej po zakończeniu doświadczenia rozwinęły się formując pokrój kulisty (Rys.1). Pierwsze dwa liście były wyraźnie większe od pozostałych. Wytworzone zostały wielosegmentowe pędy o krótkich międzywęźlach. Pędy boczne były dobrze ukorzenione. U niektórych roślin jeden z pędów bocznych rozwijał się intensywniej od pozostałych przejmując rolę pędu głównego.

Rośliny uprawiane na pożywce 1/3 MS z dodatkiem  $0,66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetyny wykazały się symetrycznym wzrostem pędów bocznych. Występował u nich brak wyodrębnionego pędu głównego oraz ciemnobordowa barwa tkanek (Rys. 1).

W przypadku reprezentantów grupy roślin rosnących na pożywce z dodatkiem  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetyny, pojawiło się zielone zabarwienie liści, niekiedy intensywne. Rośliny miały krzaczasty i gęsty układ pędów. Praktycznie nie wytworzyły korzeni lub były one zredukowane (Rys. 1).

Stężenie  $0,66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2iP, skutkowało u roślin wystąpieniem liści pierwszego segmentu o wyraziście czerwonej barwie. Rośliny miały zbity, kulisty kształt, o symetrycznie rozmieszczonych pędach bocznych, które przejęły rolę pędu głównego.

U roślin z wariantu pożywki z dodatkiem  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2iP, tylko boczne pędy miały wytworzone korzenie, rośliny miały symetryczny układ pędów, boczny pęd przejął funkcję głównego.

Dodatek do pożywki  $0,66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BA, skutkował wytworzeniem wydłużonej blaszki liściowej u roślin, przejaśnieniami w barwie, obfitym ulistnieniem. Pędy boczne przejęły rolę pędu głównego. Liście segmentu pierwszego były widocznie większe od innych.

Stężenie  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BA, wpłynęło na zwarty pokrój roślin. Pędy boczne przejęły rolę pędu głównego, korzenie były słabo rozwinięte.

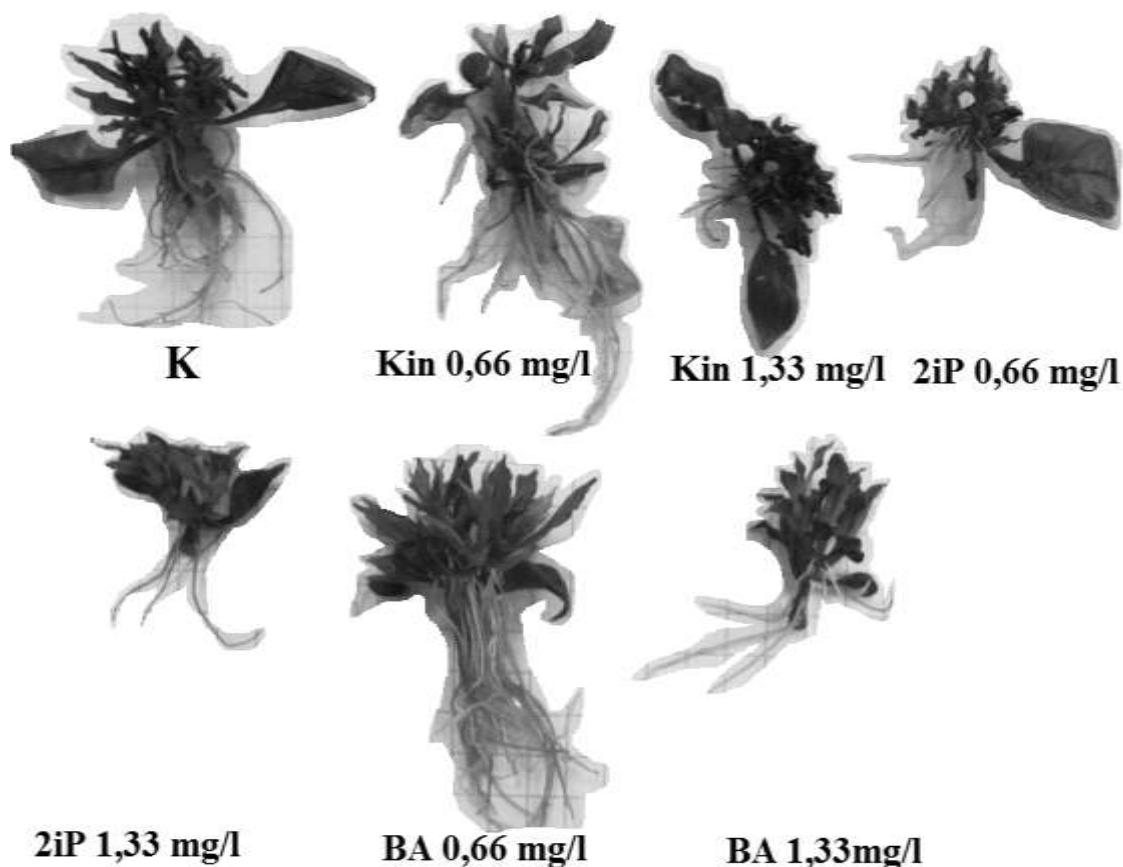
W przypadku roślin z merystemem apikalnym, umieszczonym również na pożywce z dodatkiem  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BA, zaobserwowano wytwarzanie kalusa. Pęd główny przestał być dominującym.

Najwyższą średnią wysokość uzyskały rośliny rosnące na pożywce kontrolnej bez dodatku regulatorów wzrostu. Najniższą wartością wykazały się rośliny na pożywce z dodatkiem  $0,66 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2iP oraz eksplantaty z merystemem apikalnym na pożywce z  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BA (Rys. 2).

Cytokininy, jako grupa hormonów, nie są odpowiedzialne za rozwój korzeni (Niewiadomska i in. 2015), jednak ich powstawanie i wzrost został zaobserwowany w przypadku przeprowadzonego doświadczenia. Najwyższą średnią długością korzeni wykazały się rośliny uprawiane na pożywce z dodatkiem  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2iP (Rys. 3).

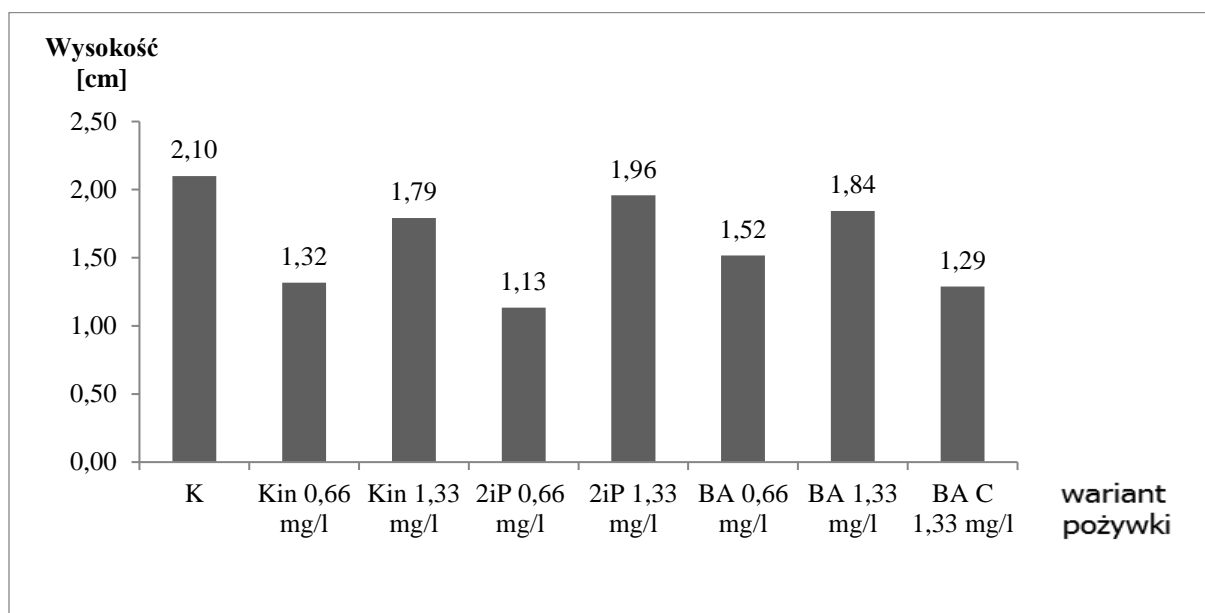
Najwięcej pędów bocznych zostało wytworzonych u eksplantatów rosnących na pożywce z dodatkiem  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetyny (Rys. 4). Dodatek  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2iP oraz  $0,66$  i  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BA, nie różnicował roślin pod względem wytworzonych pędów, w porównaniu z roślinami uprawianymi na pożywce kontrolnej - bez zawartości regulatorów wzrostu.

Rysunek 1. Reprezentanci roślin dla danych wariantów regulatorów wzrostu w pożywce



Źródło: Opracowanie własne.

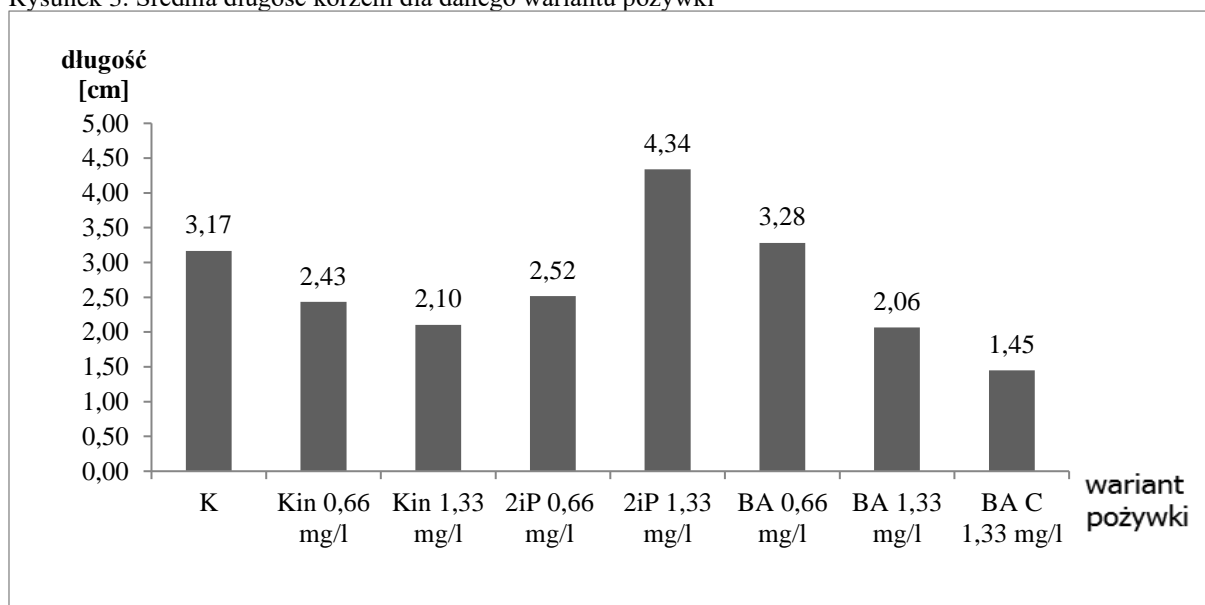
Rysunek 2. Średnia wysokość roślin dla danego wariantu pożywki



Źródło: Opracowanie własne.

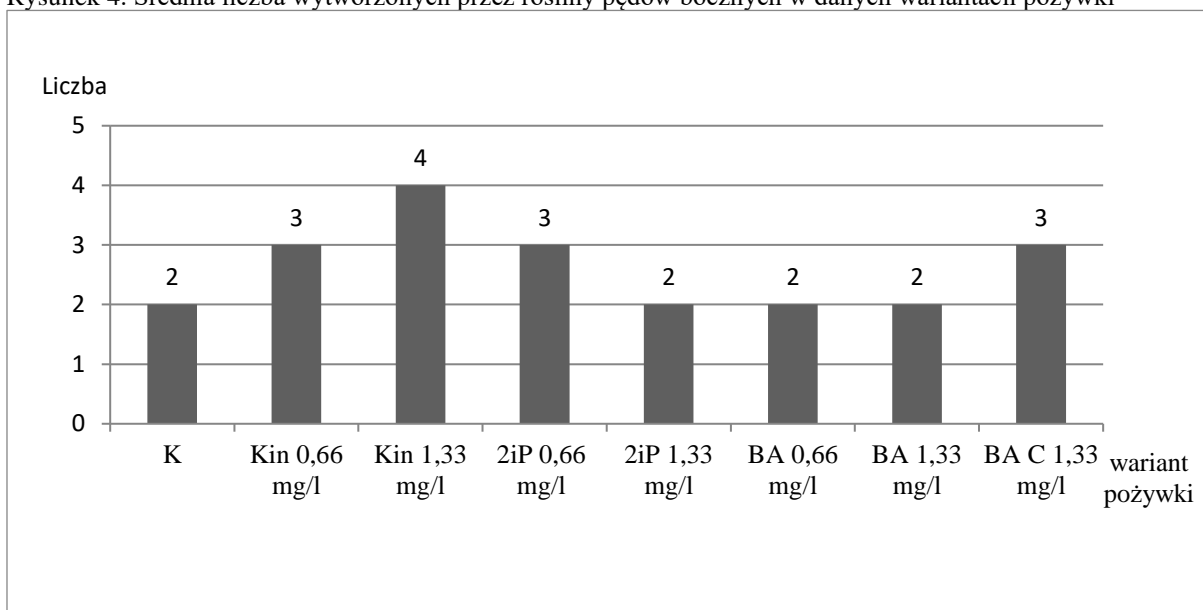
W przypadku długości wytworzonych nowych pędów bocznych najwyższą średnią wartość stwierdzono u roślin rosnących na pożywce z dodatkiem  $1,33 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2iP (Rys. 5). Niewiele gorszy wynik uzyskały rośliny na pożywce kontrolnej. Pozostałe warianty, użyte w doświadczeniu dla mikrorozmnażania roślin wykazały, że średnia długość powstałych bocznych pędów, jest mniejsza w porównaniu do roślin uprawianych na pożywce bez PGR.

Rysunek 3. Średnia długość korzeni dla danego wariantu pożywki



Źródło: Opracowanie własne.

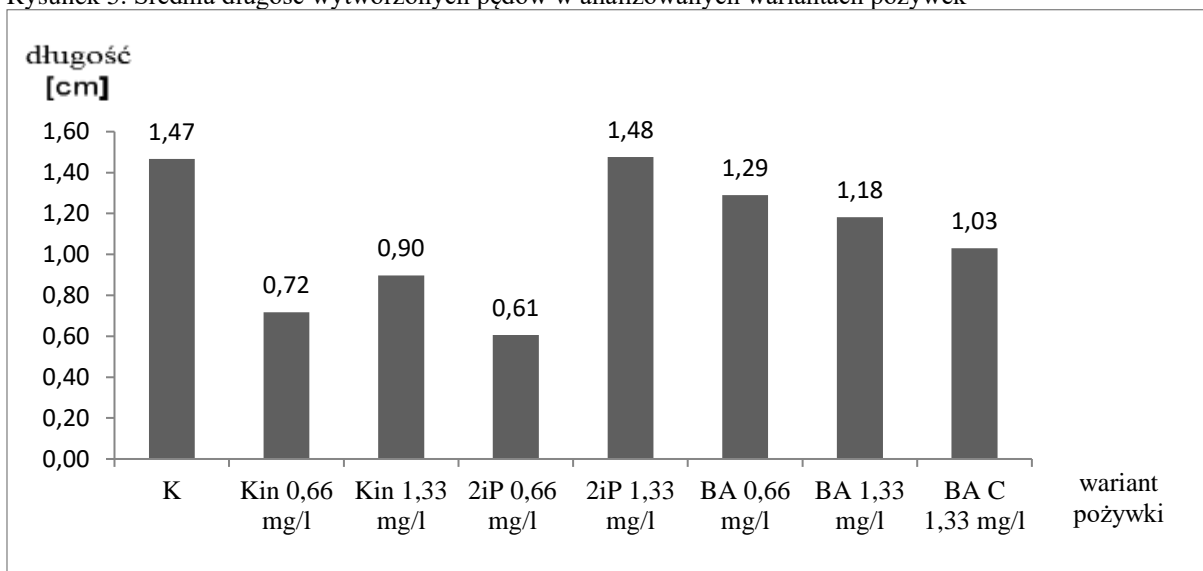
Rysunek 4. Średnia liczba wytworzonych przez rośliny pędów bocznych w danych wariantach pożywki



Źródło: Opracowanie własne.

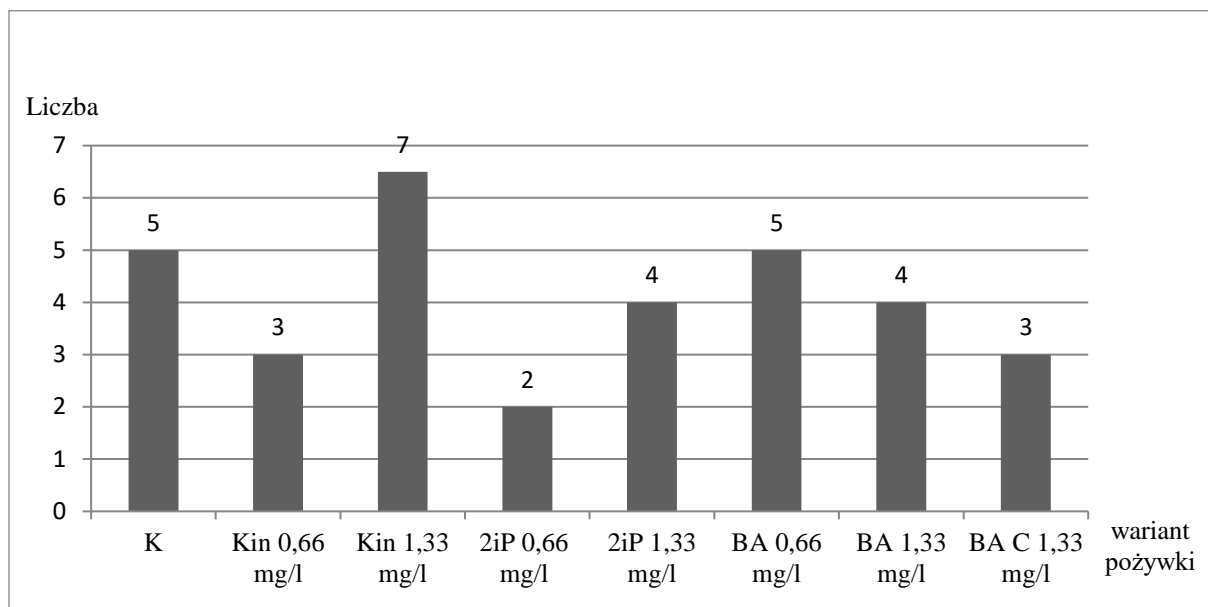
Najwyższą średnią liczbą wytworzonych segmentów wykazały się eksplantaty wyłożone na pożywkę z zawartością 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> kinetyny (Rys. 6). Były to jedyne rośliny uzyskujące pod tym względem wyższy wynik niż podczas wzrostu na pożywce kontrolnej.

Rysunek 5. Średnia długość wytworzonych pędów w analizowanych wariantach pożywek



Źródło: Opracowanie własne.

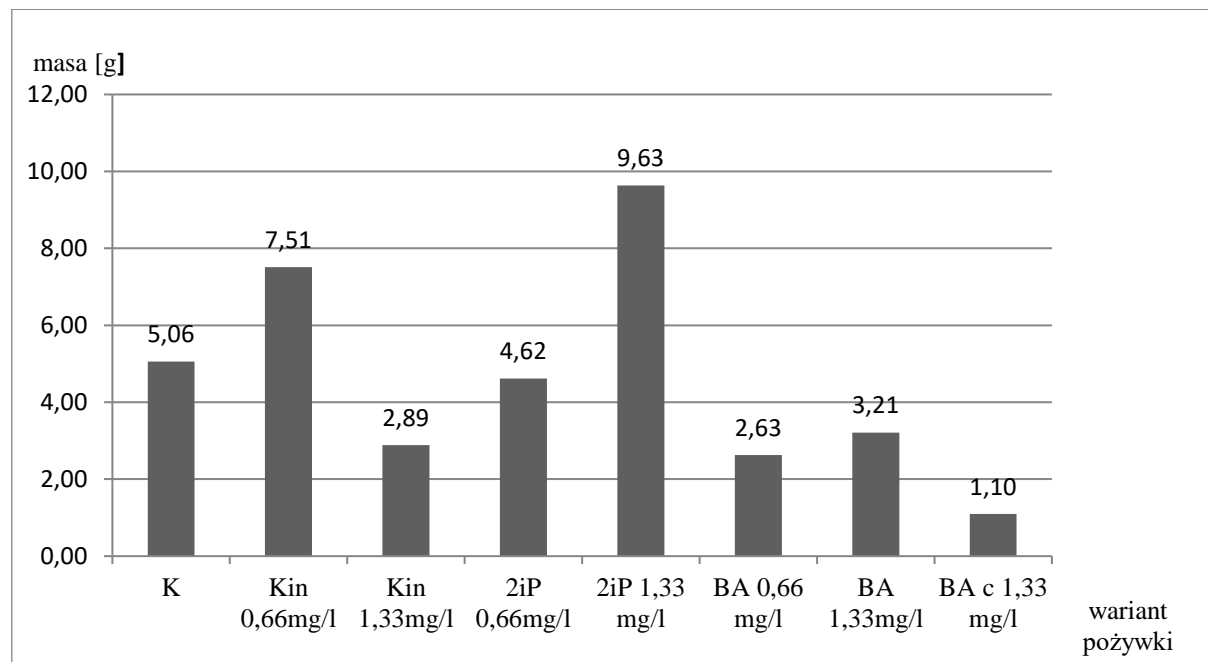
Rysunek 6. Średnia liczba wytworzonych segmentów u roślin dla analizowanych wariantów pożywki



Źródło: Opracowanie własne.

Najwyższy wskaźnik świeżej masy posiadały rośliny uprawiane na pożywce z dodatkiem 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> 2iP (Rys. 7). Ponad dziewięciokrotnie niższą łączną świeżą masę, uzyskały eksplantaty z merystemem apikalnym na pożywce z 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> BA.

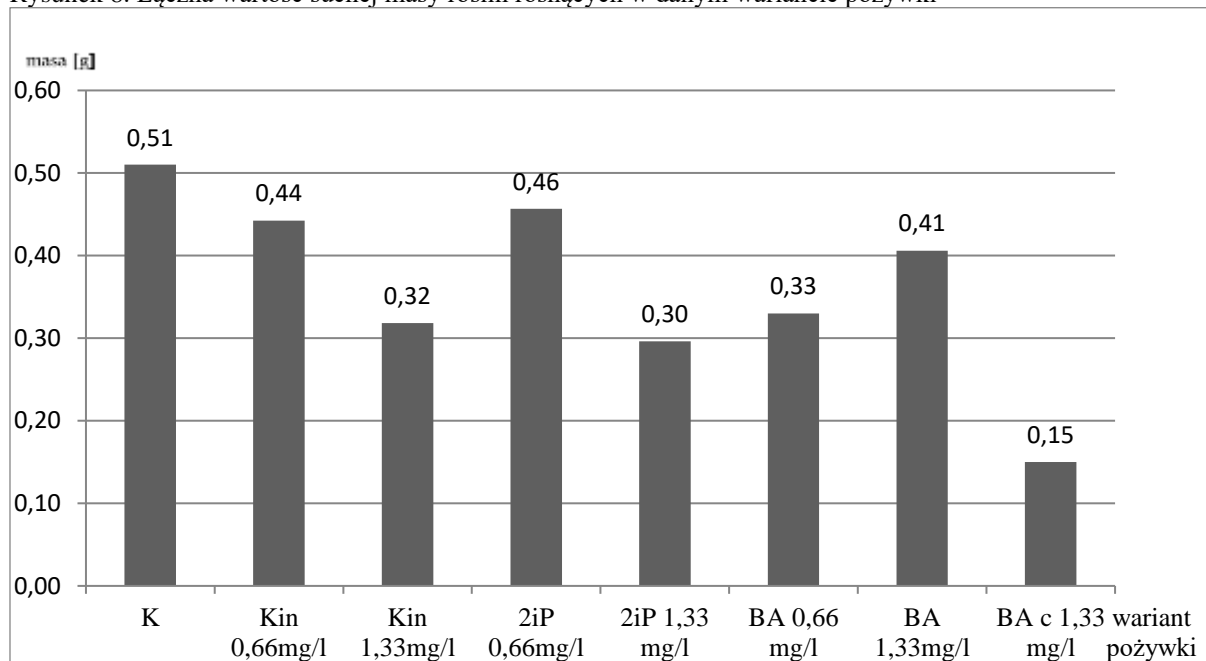
Rysunek 7. Łączna świeża masa roślin dla analizowanych wariantów pożywki



Źródło: Opracowanie własne.

Rośliny ze wszystkich wariantów pożywek poddano również suszeniu termicznemu pod normalnym ciśnieniem. Następnie pozostałości wszystkich roślin, rosnących w danej pożywce zważono. Najwyższą łączną masę uzyskały eksplantaty na pożywce kontrolnej, a najniższą rośliny posiadające merystem apikalny na pożywce 1,33 mg·dm<sup>-3</sup> BA (Rys. 8).

Rysunek 8. Łączna wartość suchej masy roślin rosnących w danym wariantcie pożywki



Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja i podsumowanie

Dezynfekcja materiału roślinnego, z użyciem podchlorynu sodu, okazała się skuteczną metodą wprowadzenia eksplantatów do kultur tkankowych, chociaż pracując z tym samym gatunkiem, z powodzeniem można użyć 10% nadtlenu wodoru (Chalenko i Cherednichenko 2017). W pracy Chalenci i Cherednichenki (2017), najlepszą wartością odczynu zastosowaną do prowadzenia kultur, było pH pomiędzy 5 a 6. W przeprowadzonym doświadczeniu zostało zastosowane pH= 5,8, co mieści się w przedziale najkorzystniejszego odczynu dla wzrostu tego gatunku.

Biorąc pod uwagę wartości średnie dla analizowanych cech, stwierdzono wpływ regulatorów wzrostu na kierunek morfogenezy i organogenezy. Można wskazać bezpośredni skład podłoża, który będzie najbardziej optymalny w zależności od etapu kultury, biorąc pod uwagę masowe mnożenie czy elongację i przygotowanie do uprawy *in vivo*. Dodatek 2iP w stężeniu 1,33 mg·dm<sup>-3</sup>, znacząco wpłynął na wzrost elongacyjny korzeni oraz przyrost



świeżej masy. Badane stężenia kinetyny negatywnie wpływają na długość pędów bocznych i przybyszowych eksplantatów, ale wyższa dawka, stymuluje powstawanie nowych. Przeprowadzone badanie ukazuje również wpływ cytokinin na wytwarzanie i wzrost korzeni u eksplantatów, co nie było początkowo brane pod uwagę przy planowaniu założenia, ze względu na znane właściwości tej grupy fitohormonów. Obecność merystemu apikalnego w materiale początkowym przy założeniu doświadczenia, również ma wpływ na dalsze wyniki.

### Literatura

- Asai, I., Ichi, T., Hatanaka, A., Koda, T., Sekiya, J. 1986. *Effects of Gelling Agents on in Vitro Culture of Plant Tissues*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(9): 2397–2399.
- Bieńkowska-Mochtak E. 1982. *Zastosowanie kultur in vitro w uprawie hodowli roślin*. PWRiL: 17-36.
- Chalenko Y. V., Cherednichenko M. Y. 2017. *In vitro Introduction and Cultivation of Aquatic Plant Alternanthera reineckii Briq.*
- De Paiva Neto V. B., Otoni W. C. 2003. *Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?* *Scientia Horticulturae*, 97(3-4): 193–202.
- Murashige T., Skoog F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia plantarum*, 15(3): 473-497.
- Niewiadomska E., Pilarska M., Skowron E. 2015. *Cytokininy a fotosynteza*. *Postępy Biochemii*, 61: 61-68.
- Sharpe S. 2019. *The spruce pets* <https://www.thesprucepets.com/alternanthera-reineckii-roseafolia-1378703> (dostęp 20.03.2019r.).

## Wpływ cytokinin na regenerację kaptownicy oskrzydłonej (*Sarracenia alata*)

The effect of cytokinin on the regeneration of *Sarracenia alata*

Michał Dziwak,  
Damian Iwański,  
Izabela Wierucka

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Wydział Przyrodniczo-Technologiczny  
Studenckie Koło Naukowe Genetyków i Hodowców Roślin  
Opiekun: dr hab. inż. Renata Galek, prof. nadzw.

### Abstract

The genus *Sarracenia* belongs to the group of plants called carnivorous. Because this kind of plant have been colonized habitats poor in nutrients - mainly nitrogen - they have evolved in the course of evolution a strategy for acquiring the elements they need to function through the decomposition of animal organic matter. Nowadays, people more and more often notice aesthetic and practical values of *Sarracenia* genus such as insectivity. For that moment, *Sarracenia*, from a botanical curiosity enclosed in botanical gardens, slowly became a plant commonly available for sale. Despite the growing popularity, we still don't have knowledge about the optimization of reproduction of these plants. In the case of mass production, it is a reasonable step to use micropropagation in tissue culture. However, in order to obtain the optimal growth of explants, series of studies are needed to identify chemical and physical factors which have a positive impact on the development of the culture. The presented experiment compares the influence of various cytokinin phytohormones on the regeneration of *Sarracenia alata* explants.

**Keywords:** cytokinin, *in vitro*, micropropagation, phytohormones, *Sarracenia alata*

### Wstęp

Globalizacja sprzyja rozpowszechnianiu się informacji oraz rozmaitych dóbr na cały świat. Procesowi temu podlegają również rośliny z całego świata. Zazwyczaj dzieje się to poprzez ukierunkowaną działalność człowieka, który udomawiając rośliny, przyczynił się do ich rozprzestrzenienia. Obecnie obserwujemy rosnącą popularność roślin owadożernych. Jest to spowodowane ich wyjątkowością w oczach potencjalnych nabywców i bez względu na ich pochodzenie, są one aktualnie obecne na rynku konsumenckim. Rośliny rodzajów *Dionaea*, *Drosera*, *Nepenthes*, *Sarracenia* (mucholówka, rosiczka, dzbanecznik, kapturnica), coraz częściej widzimy w sprzedaży przeznaczonej dla codziennego klienta, toteż powoli przestają być one domeną hodowców-hobbistów, czy ogrodów botanicznych. Istnieje jednak problem

wzrastającego popytu oraz metod rozmnażania kaptownic, niemogących sprostać potrzebom rynku.

Dzisiejszy poziom technologiczny pozwala nam na rozmnażanie organizmów roślinnych w sposób wegetatywny, w sterylnych warunkach na skalę produkcyjną. Kultury *in vitro*, o których mowa, są tanią i skuteczną metodą mikrorozmnażania roślin, wykorzystującą zjawisko totipotencji opisane przez Haberlandta w 1902 roku. Teoria wyjaśniająca ten fenomen przekazuje nam informację, iż „każda żywa komórka w odpowiednich warunkach, jest zdolna do odtworzenia całego organizmu”. Jednak pierwszym i jednym z ważniejszych problemów, jaki napotykamy, jest uzyskanie odpowiednich warunków dla konkretnego gatunku, gdyż nie istnieje jedno medium pozwalające nam na stabilny rozwój każdej rośliny. Wskazówką dla każdego naukowca, parającego się roślinnymi kulturami *in vitro*, jest środowisko naturalne danego gatunku, toteż analizując zasobność gleby w mikro- i makroelementy oraz czynniki takie jak: natężenie promieniowania słonecznego, wilgotność powietrza oraz fotoperiod, jesteśmy w stanie utworzyć w środowisku kontrolowanym podobne warunki. Następnym krokiem powinno być ustalenie metody dezynfekcji materiału roślinnego oraz optymalizacja wzrostu za pomocą czynników chemicznych i fizycznych.

Kaptownica oskrzydłona charakteryzuje się zielonymi liśćmi pułapkowymi z mniej lub bardziej widocznym czerwonym unerwieniem oraz niezwykle zróżnicowaną kolorystyką kwiatów, gdyż mogą być one kremowe do białego, zielonkawego, żółtego lub czerwonego. Poza sporą gamą barw kwiatostanu *Sarracenia alata* niewiele różni się od *S. rubra*. Można je rozpoznać po różnicach w unerwieniu, ponieważ u *S. rubra* układa się ono w siatkę, a u kaptownicy oskrzydłonej jest proste i ciągnie się wzdłuż liścia. Ponadto *S. alata* dorasta do większych rozmiarów.

### **Cel i metodyka pracy**

Celem doświadczenia jest zbadanie wpływu fitohormonów z grupy cytokinin na regenerację kaptownicy oskrzydłonej (*Sarracenia alata*) w warunkach *in vitro*.

Do przeprowadzenia doświadczenia zastosowano pożywkę Murashigeego i Skooga (MS) zmodyfikowaną przez trzykrotne obniżenie zawartości makroelementów. Zastosowano pięć wariantów pożywek z trzema fitohormonami z grupy cytokinin: 2-izopentyloadenina (2iP), 6-benzyloadenina (BA), kinetyna (KIN). Do zagęszczenia pożywki użyto agaru o stężeniu 8 g/dm<sup>3</sup>. Jako źródło węgla posłużyła sacharoza. Zastosowano pH 5,7. Schemat doświadczenia przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Schemat doświadczenia

Próba	Pożywka
Kontrola	1/3 MS
1	1/3 MS + 2,0 mg/dm <sup>3</sup> 2iP
2	1/3 MS + 4,0 mg/dm <sup>3</sup> 2iP
3	1/3 MS + 2,0 mg/dm <sup>3</sup> KIN
4	1/3 MS + 2,0 mg/dm <sup>3</sup> BA
5	1/3 MS + 4,0 mg/dm <sup>3</sup> BA

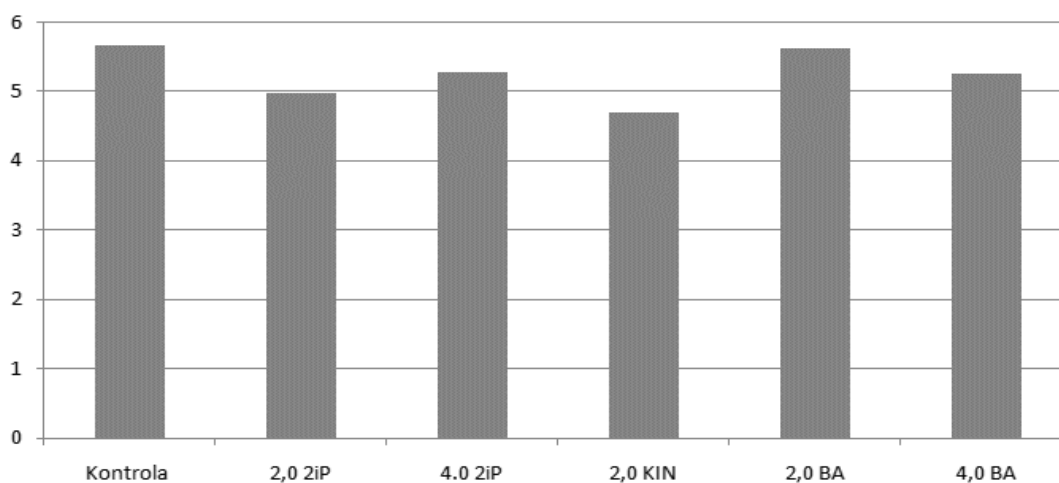
Źródło: Opracowanie własne.

Do założenia doświadczenia wykorzystano istniejącą uprawę kaptownicy w kulturach tkankowych, która została założona poprzez odkażenie nasion w 3% roztworze podchlorynu sodu przez 8 minut. Nasiona zostały następnie przełożone do naczynia ze sterylną redestylowaną wodą w celu wypłukania substancji odkażającej z powierzchni nasion. Następnie nasiona zostały wyłożone na agarową pożywkę 1/3 MS. Kielkowanie nastąpiło po trzech tygodniach od wprowadzenia nasion do kultur tkankowych. Pasażu materiału roślinnego na pożywki doświadczalne, dokonano w sterylnych warunkach, w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Każda próba była powtórzona w 5 słoikach, w których znajdowało się po 5 eksplantatów. Kultury *in vitro* obserwowano przez 8 tygodni, po czym nastąpił pomiar oraz analiza wyników. Dokonano pomiarów takich parametrów jak: wysokość całej rośliny, długość liści pułapkowych, długość korzeni, świeża oraz sucha masa. Zliczono również liczbę nowych liści pułapkowych oraz liczbę korzeni.

## Wyniki

Jednym z podstawowych parametrów mierzonych przy doświadczeniach roślinnych, jest wysokość całej rośliny. Średnie wartości przedstawiono na rysunku 1. Zauważamy, że ich wartości oscylują wokół 5 cm, jednakże najwyższe wartości przypadają na próbę kontrolną oraz pożywkę z dodatkiem 2,0 mg/dm<sup>3</sup> BA. Najbardziej wyrównane wyniki otrzymano w próbie z obecnymi 2,0 mg/dm<sup>3</sup> 2iP (wariancja równa 0,58), a najmniej wyrównana okazała się próba z dodatkiem 2,0 mg/dm<sup>3</sup> kinetyny (wariancja równa 2,13).

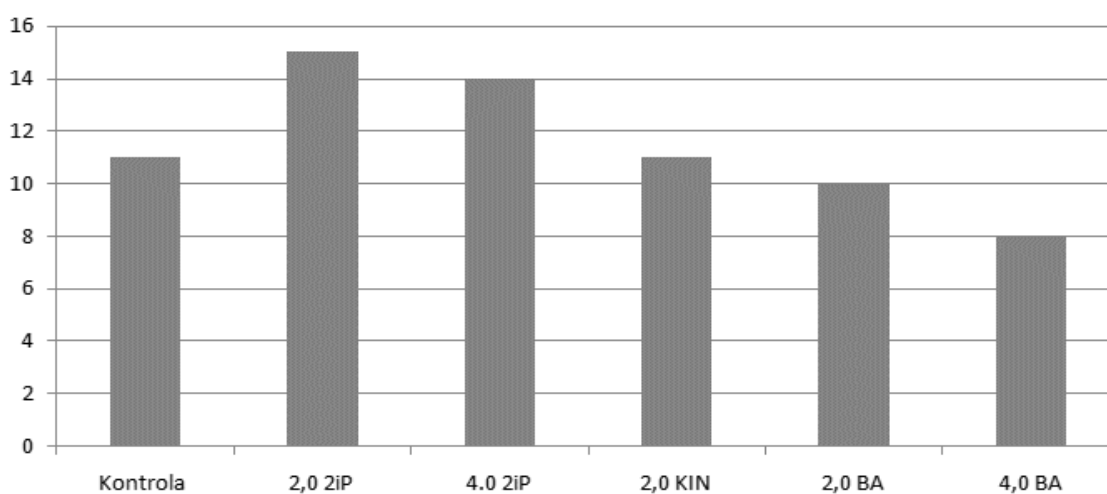
Rysunek 1. Wysokość całej rośliny [cm]



Źródło: Opracowanie własne.

Kolejny parametr, czyli średnia ilość nowych liści pułapkowych, obrazuje zdolność rośliny do wytwarzania nowych liści w warunkach gwarantowanych przez skład pożywki. Wyniki wykazują pozytywne działanie 2-izopentyloadeniny (2iP) na regenerację pułapek względem próby kontrolnej zarówno w stężeniu 2,0 mg/dm<sup>3</sup>, jak również 4 mg/dm<sup>3</sup>. Najmniejszą ilością liści pułapkowych charakteryzowała się próba 5 z dodatkiem 6-benzyloadeniny. Wyniki przedstawiono na rysunku 2. Średnia długość liści pułapkowych dla kontroli wyniosła 3,24 cm, najniższą odnotowaną średnią była 2,91 cm, dla pożywki zawierającej 2 mg/dm<sup>3</sup> 2iP, a najwyższą 3,67 cm dla 4 mg/dm<sup>3</sup> 2iP.

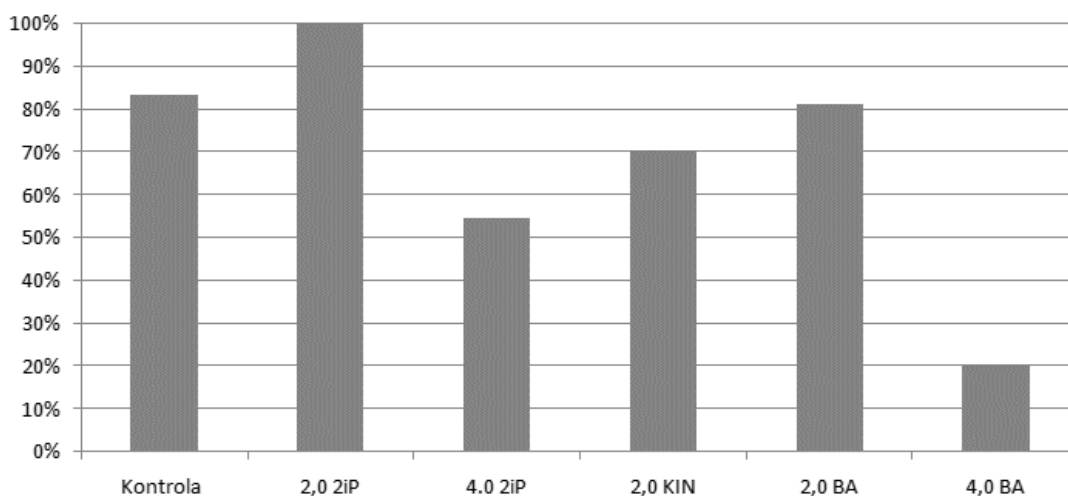
Rysunek 2. Średnia liczba nowych liści pułapkowych



Źródło: Opracowanie własne.

Jednym z interesujących parametrów w naszym doświadczeniu, była obecność korzeni w poszczególnych wariantach pożywki. Zazwyczaj w celu ukorzenia roślin, w kulturach tkankowych używa się auksyn, zatem stosując cytokininy w doświadczeniu, nie założono obserwacji wytwarzających się korzeni. Aspekt ten jest jednak o tyle istotny, iż bez dobrze rozwiniętych korzeni aklimatyzacja eksplantatów bywa niezwykle trudna, gdyż roślina nie będzie zdolna do pobierania substancji odżywczych z podłoża. Zauważono, iż obecność w pożywce  $2,0 \text{ mg/dm}^3$  2iP, wpływa najlepiej na proces regeneracji systemu korzeniowego. Za to obecność  $2,0 \text{ mg/dm}^3$  BA daje zbliżone efekty co próba kontrolna. Reszta wariantów pożywki wpływa negatywnie na regenerację korzeni u kaptownicy oskrzydłonej U eksplantatów posiadających system korzeniowy stwierdzono występowanie przeważnie dwóch korzeni o długościach w przedziale od 2 mm do 12 mm. Średnia długość korzenia u eksplantatów to 4,4 mm. Najwyższą średnią długością korzeni charakteryzowała się próba z dodatkiem  $2 \text{ mg/dm}^3$  2iP i wynosiła 0,6 cm (Rys. 3).

Rysunek 3. Obecność korzeni



Źródło: Opracowanie własne.

Wszystkie rośliny rosnące na wariantach pożywek, oprócz tego z dodatkiem  $2 \text{ mg/dm}^3$  BA, wykazały większą świeżą masę względem roślin na próbie kontrolnej (0,96 g), z czego najwyższy wynik 1,77 g należał do próby zawierającej 2iP w stężeniu  $2 \text{ mg/dm}^3$ . Porównując suchą masę, próba kontrolna osiągnęła najwyższą wagę (0,23 g). Najbliższy tej wartości był wariant z dodatkiem  $2 \text{ mg/dm}^3$  2iP z masą 0,2 g. Najniższą suchą masę osiągnęła próba zawierająca kinetynę (0,13 g).

## Dyskusja

Kapturnice to niezwykle ciekawe rośliny, które w procesie adaptacji do warunków środowiskowych, wykształciły strategię pozyskiwania substancji odżywczych z materii organicznej (tutaj organizmów zwierzęcych). Świadomość ich unikalności oraz ich obecność na rynku, z roku na rok rośnie, lecz ilość dostępnych publikacji na ich temat jest znikoma. Na polskim rynku piśmienniczym również niewiele jest dostępnych pozycji książkowych, traktujących o roślinach owadożernych. Szczególne braki zauważamy w kontekście badań nad mikrorozmnażaniem tych niecodziennych roślin. Być może jest to spowodowane małym zainteresowaniem środowiska naukowego, gdyż rośliny te mają wartość przede wszystkim estetyczną, lecz ma również potencjał naukowy, gdyż mechanizmy wytwarzania oraz działania enzymów trawiennych, nie są jeszcze do końca poznane. Rozmnażaniem kaptownic w warunkach *in vitro* obecnie zajmują się przede wszystkim firmy komercyjne, które niechętnie dzielą się swoją wiedzą ze środowiskiem naukowym.

Jednym z najważniejszych czynników gwarantującym nam udaną regenerację roślinnych kultur *in vitro*, jest dobór odpowiednich parametrów chemicznych dla pożywki, która jest źródłem substancji odżywczych dla eksplantatu. Opracowując pożywkę, powinniśmy zwrócić szczególną uwagę na naturalne siedliska danego gatunku. Badany gatunek występuje na ubogich w składniki odżywcze torfowiskach, toteż chcąc zapewnić bogaty zakres mikro- i makroelementów, do doświadczenia została wybrana pożywka Murashigego i Skooga (MS), lecz aby upodobnić podłoże do naturalnych warunków, postanowiono zmniejszyć ilość makroelementów do jednej trzeciej. Na owym wariacie pożywki MS zaindukowano z powodzeniem matecznik kaptownicy oskrzydłonej użyty do niniejszego badania.

W przedstawionym doświadczeniu udowodniony został pozytywny wpływ niektórych fitohormonów z grupy cytokinin na rozwój kultur *in vitro* kaptownicy. Dla optymalnego rozwoju ważne jest, aby poznać najbardziej skuteczne hormony oraz dobrać odpowiednią ich dawkę, gdyż zarówno zbyt małe, jak również zbyt duże stężenia, mogą wpływać negatywnie na regenerację eksplantatów. Jednakowoż pełna optymalizacja wymagać będzie kolejnych badań choćby z zakresu działania fitohormonów z grupy auksyn na kaptownicę, a także współdziałania fitohormonów z obydwu grup, czy użycia innych pożywek. Innymi czynnikami możliwymi do przebadania, są również między innymi temperatura, natężenie światła czy fotoperiod.

Rozmnażając rośliny rodzaju *Sarracenia* w kulturach *in vitro*, powinniśmy zwracać uwagę na kilka aspektów. Pierwszym z nich jest obecność i wielkość korzeni. Jest to niezwykle

ważne przy procesie aklimatyzacji, gdyż roślina bez systemu korzeniowego, nie ma możliwości pobierania substancji mineralnych oraz wody z podłoża. Dobrą metodykę charakteryzuje również wysokie wyrównanie, gdyż chcąc rozmnażać kapturnice na skalę produkcyjną, powinniśmy dobierać takie parametry, aby nasze rośliny nie odstawały od siebie pod względem wyglądu. Trzecim ważnym aspektem jest ilość liści pułapkowych oraz ich okazałość, gdy przy produkcji nastawionej na sprzedaż, klient przede wszystkim będzie zwracać uwagę na wizualną prezentację kapturnicy.

### Podsumowanie

Spośród przebadanych fitohormonów z grupy cytokinin, najkorzystniejszy wpływ na wytwarzanie liści pułapkowych u kapturnicy oskrzydłonej (*Sarracenia alata*) wykazały oba stężenia 2-izopentyloadeniny (2iP). Parametry te mogłyby zostać użyte przy masowym namnażaniu. Obecność 2iP w stężeniu 2 mg/dm<sup>3</sup>, wpływała pozytywnie na regenerację systemu korzeniowego. Żadne z badanych stężeń cytokinin nie działało pozytywnie na długość roślin.

### Literatura

- Ellison, A. M., & Gotelli, N. J. (2002a). *Nitrogen availability alters the expression of carnivory in the northern pitcher plant, Sarracenia purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (7): 4409-4412.
- Ellison, A. M., & Parker, J. N. (2002b). *Seed dispersal and seedling establishment of Sarracenia purpurea (Sarraceniaceae)*. *American Journal of Botany*, 89 (6): 1024-1026
- Godt, M. J. W., & Hamrick, J. L. (1998). *Genetic divergence among infraspecific taxa of Sarracenia purpurea*. *Systematic Botany*, 23 (4): 427-438.
- Juniper, B. E., Robins, R. J., & Joel, D. M. (1989). *The carnivorous plants* London, etc.: Academic Press.: 512-13.
- Krasuska, U., Glinka, A., & Gniazdowska, A. (2012). *Menu roślin mięsożernych*. *Kosmos*, 4 (61): 635-646.
- Krasuska, U., Dzierżyńska, A., Ciąćka, K., Andrzejczak, O., Staszek, P., & Gniazdowska, A. (2015). *Rośliny mięsożerne jako przykład adaptacji do niesprzyjających warunków środowiska naturalnego*. *Polskie Towarzystwo Botaniczne (red) Bajguza A., Ciereszko I.*: 77-88.
- Szweykowska, A., Szweykowski, J. (2008). *Botanika tom 1: Morfologia*, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 220-221: 232-234.



## Charakterystyka grzybów występujących na liściach cyklamena (*Cyclamen L.*)

Characteristics of fungi occurring on cyclamen leaves (*Cyclamen L.*)

Marta Kotłowska  
Karolina Przetakiewicz  
Grzegorz Dzień

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa  
Koło Naukowe Diagnostyki i Fitopatologii Molekularnej „Biohazard”  
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Adam Okorski, prof UWM

### Abstract

Cyclamen is commonly referred to as alpine violet, it is a valuable potted ornamental plant, propagated primarily by sowing seeds, as well as by dividing the tubers. It is a plant very susceptible to gray mold, tuber rot, powdery mildew etc. The aim of the study was to characterize fungi occurring on cyclamen leaves by traditional method and using qPCR markers. The research covered plant material originating from a gardening farm in Rumia. Mycological studies were carried out on 10 Mammoth cv. cyclamen seedlings. Molecular analyzes were performed using the TaqMan PCR technique with primers specific for *F. avenaceum* and *F. poae* (2 replicates per study variant). Genomic DNA from infected cyclamen leaves was isolated by column method. The amount and quality of the extracted gDNA was verified using the Nandorop ND 2000C spectrophotometer. The presence of pathogenic DNA was verified by TaqMan PCR. The studies showed the presence of cyclamen showing pathogenic species of pathogenic species: *Alternaria alternata*, *F. avenaceum*, *B. cinerea* and *Colletotrichum* spp. Moreover, the presence of saprotrophic fungi *Cladosporium* and *Penicillium* was also found. Molecular analyzes revealed the presence of *F. aveanceum* and *F. poae* DNA in all tested Samales.

**Key words:** detection, TaqMan PCR, qPCR, fungi, leaves, cyclamen

### Wstęp

Cyklamen należy do rodziny pierwiosnkowatych, a potocznie nazywany jest fiołkiem alpejskim. Jest rośliną ozdobną, uprawianą zarówno jako roślina jednoroczna, jak i wieloletnia z racji tego, że rozmnażana jest przez bulwy. Posiada barwne kwiaty oraz zielone liście ze srebrnym wzorem (Chlebowski i Mynett 1995), ma charakterystyczne liście kształtu sercowatego oraz kwiaty na długich szypułkach. Roślina osiąga do 30 cm wysokości (Menderska 2016). Bulwę można przezimować w donicy z ziemią przy zachowaniu optymalnej wilgotności, temperatury oraz ilości światła. Kwiat ten zazwyczaj zdobi stoły czy też parapety w naszych domach. Kwitnie od listopada do marca (Oszkinis 1994).

Cyklamen, produkowany w gospodarstwach ogrodniczych, sadzony jest w doniczkach tak, aby bulwa wystawała powyżej powierzchni gleby. Najczęściej produkowany jest na stołach i matach podsiąkowych. Przed rozstawieniem podlewany podsiąkowo, a po rozstawieniu nawadniany oraz zasilany nawozami za pomocą kapilar.

Roślina ta lubi umiarkowane uwilgotnienie (podlewanie od dołu a nie z góry). Podłoże rekomendowane do uprawy powinno mieć od pH 4,5 do 5,5. W trakcie wzrostu powinno się zapewnić umiarkowany dostęp światła. Cyklamen perski nie jest rośliną mrozoodporną (Menderska 2016).

W uprawach cyklamenów w Polsce wyróżnić możemy odmiany: wielkokwiatowe, miniaturowe, o karbowanych płatkach kwiatów, a dostępne odmiany mogą różnić się pokrojem, kolorem oraz wielkością rośliny.

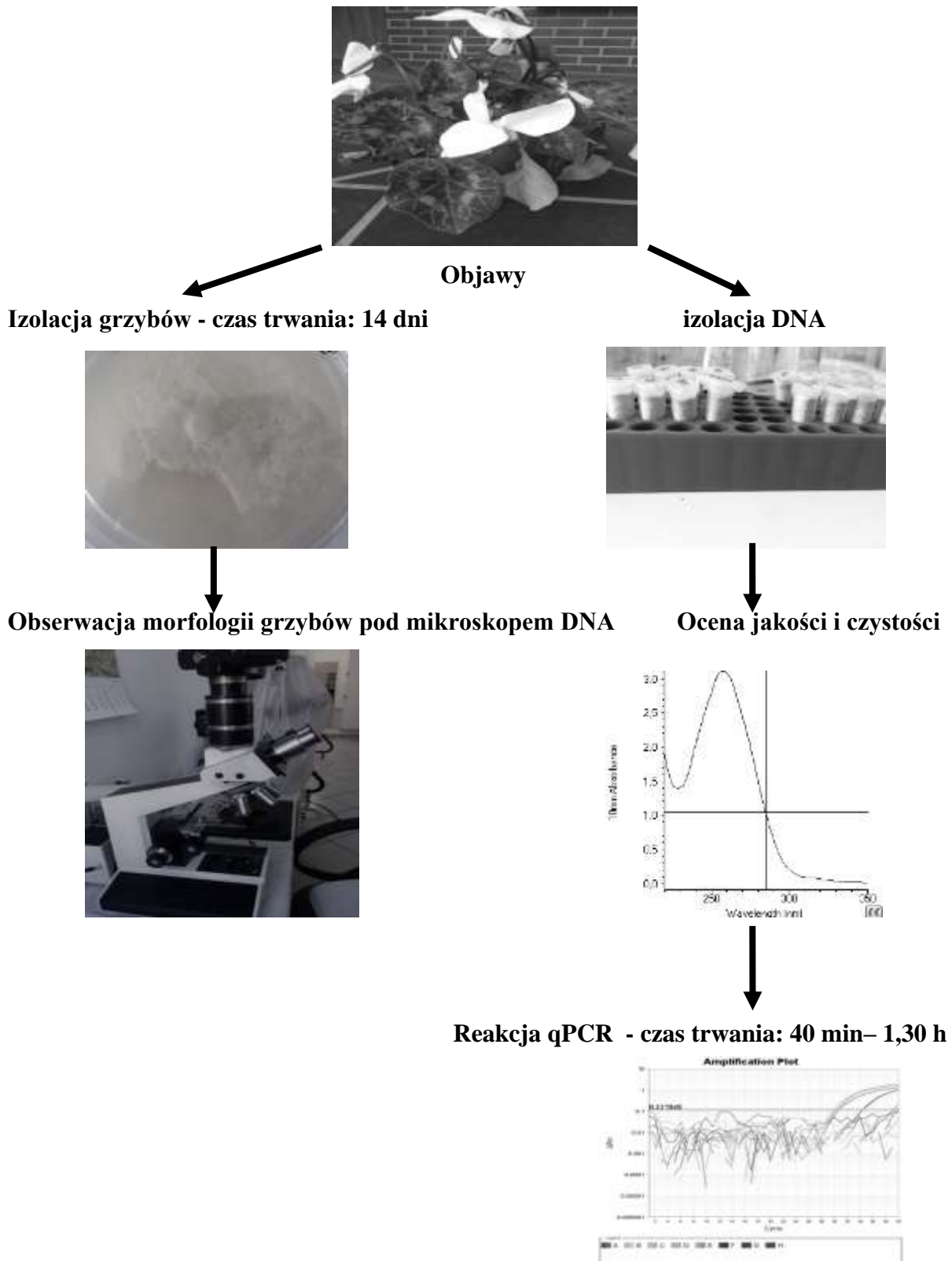
Dostępne w uprawach odmiany cyklamena to wielkokwiatowe: Maxora Friged, Super Serie XL, Super Serie Mammoth; średniokwiatowe: Synchron, Canto Silver, Super Serie Allure, Super Serie Macro i miniaturowe: SeeWhy, Winfall, Silverado, Super Serie Picasso, Super Serie MiniWinter, Rocolina (Syngenta 2019).

W uprawie cyklamen atakowany jest przez grzyby takie jak szara pleśń, fuzarioza, antraknoza czy też lęgniowce gatunków *Phytophthora parastica* oraz *Ph. nicotianae*, które powodują gnicie korzeni, a także uszkodzenia liści oraz łodyg, a ponadto patogeniczne bakterie rodzaju *Erwinia*. Silne zasiedlanie tkanek cyklamena przez grzyby, może prowadzić do zamierania roślin. Sprawcami antraknozy są: *Gloeosporium cyclaminis* oraz przedstawiciele *Colletotrichum* sp., które powodują na pędach czarną zgniliznę. Charakterystyczne dla sprawców antraknozy jest tworzenie zarodników barwy różowo-pomarańczowej. Integrowana ochrona roślin wymaga od producentów wdrażania metod detekcji patogenów, stanowiących podstawę dla wykonania zabiegów ochronnych. Metodą typową w tym zakresie jest diagnostyka molekularna.

Za pomocą technik PCR, możliwa jest jakościowa i ilościowa analiza patogenego DNA jednocześnie w wielu próbach. Wykonanie analiz jest szybkie a także możliwe w stosunku różnorodnego badawczego materiału (Rynans i in. 2015).

Obecnie diagnostyka molekularna jest najbardziej precyzyjną techniką w określaniu przyczyny objawów chorobowych występujących na roślinach, rekomendowana jest przez EPPO (The European and Mediterranean Plant Protection Organization) i EFSA (European Food Safety Authority).

Rysunek. 1. Schemat zastosowania metod diagnostyki w badaniach własnych



Źródło: Opracowanie własne.

Pozwala ona w szybki i sprawny sposób wykryć patogeny, a także stanowi rekomendację do ich zwalczania. Techniki oparte o PCR, przeważają nad tradycyjnymi metodami określania sprawców chorób, ponieważ pozwalają na zdiagnozowanie w organizmie roślinnym bezobjawowej fazy choroby (Dorak 2006).

Celem niniejszej pracy była charakterystyka grzybów zasiedlających pędy i liście cyklamenów wykazujących objawy chorobowe metodą hodowlaną i qPCR.

### Material i metody badań

Materiałem wyjściowym były rośliny cyklamena odmiana Mammoth, pobrane z gospodarstwa ogrodniczego zlokalizowanego w miejscowości Rumia koło Gdyni w województwie pomorskim. Badania prowadzono w latach 2018-2019. Rośliny posadzono w doniczki ustawione na stołach wyłożonych matami podsiąkowymi oraz nawadniano i zasilano za pomocą kapilar utrzymując stały poziom wilgotności – 70 %.

Na roślinach w fazie kwitnienia zauważono objawy chorobowe na liściach w postaci brunatnych, nekrotycznych plam, a u podstawy bulw w postaci gnijących pędów. Porażenie stwierdzono u około 40 sztuk na 100 roślin, z czego około 10% roślin zamierało.

Tabela 1. Wykaz starterów specyficznych wykorzystanych w reakcji TaqMan PCR do wykrywania obecności *Fusarium avenaceum* i *Fusarium poae*

Patogen	Nazwa startera	Sekwencja startera/sondy	Literatura
<i>F. avenaceum</i>	avenaceum MB-F	CAAGCCCACAGACACGTTGT	Waalwijk i in. (2004)
	avenaceum MGB-R	ACGCAATTGACTATTGC	
	avenaceum MGB probe	AACATACCTTAATGTTGCCTCGG	
<i>F. poae</i>	poae 1-F	AAATCGGCGTATAGGGTTGAGATA	Waalwijk i in. (2004)
	poae 1-R	GCTCACACAGAGTAACCGAAACCT	
	poae probe	CAAATCACCCAACCGACCCTTTC	

Zródło: Opracowanie własne.

Do badań pobrano losowo po 10 roślin w trzech miejscach. W laboratorium Katedry Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej rośliny dokładnie oczyszczono. Analizy mykologiczne oraz badania molekularne przeprowadzono zgodnie ze schematem zaprezentowanym na Rys. 1. Uzyskane fragmenty (organy) badanych roślin odkażono według następującej procedury: zlewki z materiałem roślinnym zalewano 70% alkoholem etylowym (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) na 5 minut, następnie dokładnie przepłukano wodą destylowaną, po czym materiał w sterylnych zlewkach zalewano podchlorynem sodu (NaClO) na 5 minut. Po upływie

wskazanego czasu, po raz kolejny badany materiał przepłukano dokładnie wodą destylowaną. Zdezynfekowany materiał roślinny został podzielony przy użyciu skalpela i pęsety na mniejsze fragmenty, które wykładano po 5 fragmentów na szalkę z pożywką PDA (pożywka agarowo-ziemniaczana). Dla każdego z badanych organów wykładano 10 (w 3 powtórzeniach na wariant badawczy) płytek Petriego. Po upływie 14 dni uzyskano kultury grzybów i lęgniowców, które zostały przeszczepione na skosy zestaloną pożywką PDA, którą następnie zidentyfikowano co do gatunku za pomocą dostępnych kluczy i monografii (Borowska 1986, Ellis 1971, Gams 1971, Kwaśna i in. 1991, Ramirez 1982).

Analizy molekularne w przypadku każdej próby wykazały obecność DNA *F. avenaceum* i *F. poae*. Z pozostałych fragmentów jednocześnie wykonano izolacje DNA metodą kolumnkową, z wykorzystaniem buforu ekstrakcyjnego CTAB. W celu oczyszczenia DNA, membrany minikolumn przemywano 70% etanolem. Metoda izolacji DNA została przeprowadzona zgodnie z zalecaną przez producenta procedurą (A&A Biotechnology). Po przeprowadzeniu ekstrakcji DNA wykonano ocenę jego czystości a także jego ilości w dwóch powtórzeniach dla każdego wariantu badawczego, za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND 2000C. Zdjęcia grzybów *F. avenaceum* i *F. poae* wykonane zostały za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse 80i.

Tabela 2. Warunki reakcji qPCR w badaniach własnych

Lp.	Etapy reakcji qPCR	Warunki
1.	Denaturacja	95°C - 3 min.
2.	Wstępna denaturacja	95°C - 15 sek.
3.	Przyłączenie starterów	60°C - 15 sek.
4.	Wydłużanie	72°C - 1 min.
Liczba cykli		40

Źródło: Opracowanie własne.

W wyniku izolacji DNA metodą kolumnkową, otrzymano gDNA, które zostało użyte jako matryca w reakcji TaqMan PCR ze starterami specyficznymi wobec *F. avenaceum* i *F. poae*. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym została przeprowadzona zgodnie z protokołem dla badanych patogenów *F. avenaceum* i *F. poae* (Tab. 1).

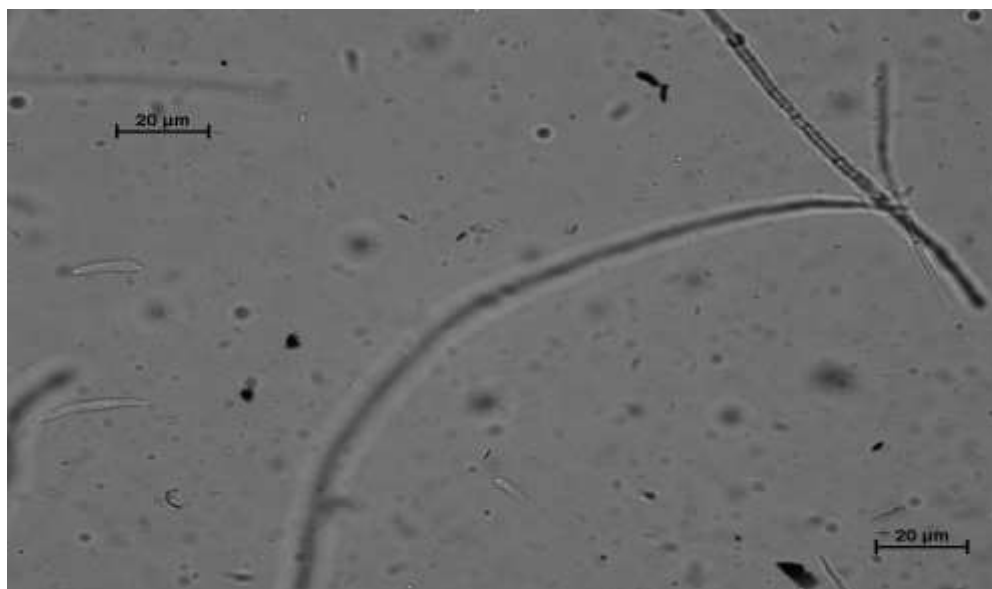
Dla każdej matrycy gDNA, otrzymanej w wyniku ekstrakcji, reakcję TaqMan PCR przeprowadzono w dwóch powtórzeniach. Reakcję qPCR dla obu badanych gatunków przeprowadzono zgodnie z profilem termicznym zaprojektowanym w tabeli 2.

Tabela 3. Grzyby wyizolowane z liści i pędów cyklamena

Gatunek grzybów	Liście	Pędy
<i>Acremonium</i> sp.	1	3
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl	20	15
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	4	2
<i>Cladosporium cladoporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	8	15
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	2
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	10	12
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.	11	14
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	2	8
<i>Penicillium</i> spp.	4	2
<i>Thielaviopsis basicola</i> (Berk. & Broome) Ferraris	2	3
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	5	6
<i>Zygorhynchus heterogamus</i> (Vuill.) Vuill.	1	1
<b>Razem saprotrofy</b>	<b>23</b>	<b>38</b>
<b>Razem patogeny</b>	<b>46</b>	<b>45</b>
<b>SUMA</b>	<b>152</b>	

Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 2. Mikrokonidia *F. avenaceum* (powiększenie 40x)

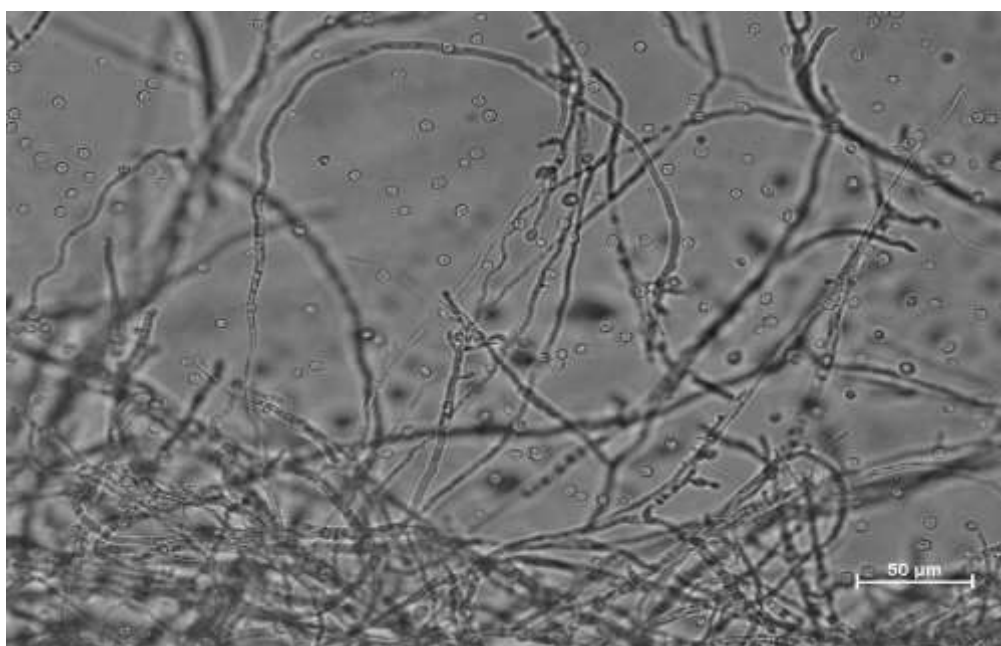


Źródło: Opracowanie własne.

## Wyniki

Analiza mykologiczna pozwoliła na wyizolowanie 152 izolatów grzybów należących do 12 gatunków i rodzajów (Tabela 3). Uzyskane wyniki są typowe dla tego typu analiz. W badaniach stwierdzono małą różnorodność grzybów zasiedlających liście i pędy cyklamena. Wśród patogenów wyizolowanych dominowały grzyby: *Alternaria alternata*, *Fusarium avenaceum* (Rys. 2), *Fusarium poae* (Rys. 3), nielicznie izolowano także *Botrytis cinerea* oraz przedstawiciela rodzaju *Colletotrichum*. Grzyby saprotroficzne wyizolowano z liści i pędów cyklamena reprezentowane były przez przedstawicieli rodzajów: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Thielaviopsis*, *Trichoderma*, *Zygorhynchus*. Gatunki saprotroficzne stanowiły odpowiednio 33% i 46% grzybów wyizolowanych z liści i pędów rośliny, pozostały odsetek, w obu przypadkach, stanowiły gatunki patogeniczne.

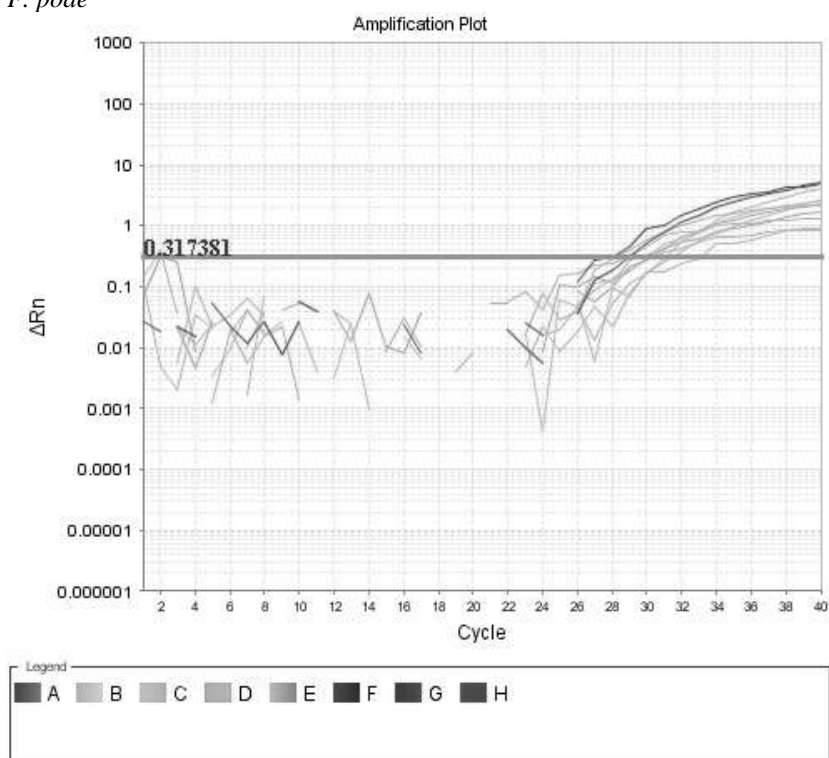
Rysunek 3. Mikrokonidia *F. poae* (powiększenie 40 x)



Źródło: Opracowanie własne.

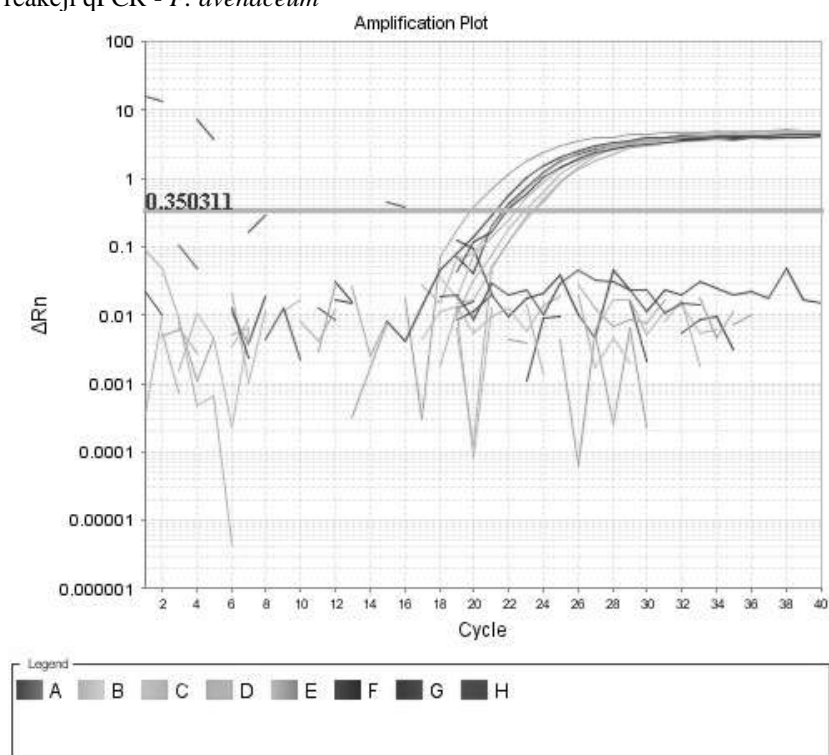
Analizy molekularne techniką qPCR prowadzono wyłącznie na próbach DNA, charakteryzujących się wysoką jakością  $A_{260}/A_{280} > 1,8$ , co potwierdzono za pomocą metody spektrofotometrycznej (Rys. 1). Zastosowanie techniki TaqMan qPCR pozwoliło na wykazanie obecności w tkankach cyklamena obecności gDNA *F. poae* oraz *F. avenaceum*, co potwierdzają krzywe amplifikacji zaprezentowane na rysunkach 4 i 5.

Rysunek 4. Wykres amplifikacji DNA prób wyizolowanych z liści i pędów cyklamena ze starterami specyficznymi w reakcji qPCR - *F. poae*



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 5. Wykres amplifikacji DNA prób wyizolowanych z liści i pędów cyklamena ze starterami specyficznymi w reakcji qPCR - *F. avenaceum*



Źródło: Opracowanie własne.



Tabela 4. Detekcja grzybów *Fusarium avenaceum* i *Fusarium poae* z liści i pędów cyklamena metodą qPCR (Ct-cykl progowy)

Próba	<i>F. avenaceum</i>		<i>F. poae</i>	
	pędy	liście	pędy	liście
1	19,2	22,3	28,21	31,21
2	20,2	22,4	28,43	31,42
3	20,45	23,24	28,34	32,13
4	20,36	23,43	30,12	32,41
5	21,41	24,12	30,33	32,51

Źródło: Opracowanie własne.

Określenie ilościowe występowania gDNA obu badanych gatunków prowadzono w oparciu o wykreślenie krzywej odcięcia, określającej występowanie tzw. cyklu progowego oznaczającego przyrost logarytmiczny produktu reakcji PCR. Na podstawie analiz stwierdzono, że rośliny cyklamena były silnie porażone przez gatunek *F. avenaceum*, co potwierdzają wyniki zaprezentowane w tabeli 4. Wartości Ct uzyskane w przypadku tego gatunku, wynosiły 19,2-21,4 dla pędów oraz 22,3-24,12 dla łodyg. Drugi z badanych metodą molekularną patogenów – *F. poae* w mniejszym stopniu odpowiadają za powstawanie objawów chorobowych na roślinach cyklamena (Rys. 5, Tab. 4), a zanotowane wartości Ct wynosiły odpowiednio dla pędów 28,21-30,33 oraz liści 31,21-23-51, dla poszczególnych powtórzeń biologicznych.

## Dyskusja

W badaniach własnych określano sprawców objawów chorobowych występujących na roślinach cyklamena, wskazując na podstawie analizy mykologicznej jako najważniejsze gatunki patogeniczne: *A. alternata*, *F. aveaceum*, *F. poae*, *B. cinerea* oraz *Colletotrichum*.

W badaniach przeprowadzonych przez Rivera i in. (2009) wykazano, że tkanki cyklamena perskiego, zasiedlone były przez liczne gatunki patogeniczne: *F. lateritum*, *F. chlamydosporum* var. *fuscum*, *F. sambucinum*, *F. semitectum* oraz *Phoma* spp. Ponadto, w badaniach wykazano obecność na tkankach cyklamena gatunków sprotroficznych rodzajów *Acremonium*, *Penicillium*, *Trichoderma* a łącznie wyizolowano przedstawicieli 36 jednostek systematycznych. W badaniach własnych uzyskano zbieżne wyniki, bowiem gatunki saprotroficzne stwierdzone na pędach i liściach cyklamena, reprezentowane były przez przedstawicieli rodzajów: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillum*, *Thielaviopsis*, *Trichoderma*, *Zygorhynchus*. W innych pracach wykazano, że ważnym patogenem cyklamena

jest *F. oxysporum* (Maya, Matsabura 2013, Woudt i in. 1995) oraz *B. cinerea* (Köhl i in. 1998). W badaniach przeprowadzonych przez Żołą i in. (2012), w stosunku do zbiorowisk grzybów występujących na kwiatach różanecznika wykryto, że były one zasiedlane najczęściej przez między innymi grzyby z gatunku *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. avenaceum*. Gatunki te powodowały zasychanie kwiatów, zaś przebarwienia płatków różanecznika, powodował grzyb *A. alternata*. Efektem występowania patogenów jest spadek walorów dekoracyjnych roślin ozdobnych. W badaniach własnych objawy chorobowe występowały na liściach oraz innych organach a infekcja grzybowa objawiała się w postaci przebarwień, brunatnych nekroz oraz powodowała gnicie pędów u nasady bulwy, co też wpływało istotnie na wygląd cyklamena. W pracach badawczych prowadzonych przez Szopińską i Tylkowską (2009) wykazano, że poprawę zdrowotności roślin, można uzyskać poprzez kondycjonowanie nasion. Autorki wykazały, że zabieg ten zwiększa zdolność kiełkowania nasion oraz powoduje zmniejszenie liczby porażonych siewek roślin ozdobnych, co wpływa na ogólny stan zdrowotności. Zabieg ten spowodował, że na nasionach grzyby: *A. alternata*, *B. cinerea*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, pojawiały się w większej ilości. W innej pracy badawczej (Król i in. 2017) wykryto, że w momencie mikrorozmnażania czosnku ozdobnego, dochodziło do zanieczyszczenia jego mikropędów przez grzyby i bakterie. Z trzech wyizolowano między innymi 5 izolatów *Pectobacterium*. W dalszych badaniach potwierdzono ich patogeniczność, ponieważ były przyczyną powstawania zgnilizny na pędach badanej rośliny. W badaniach Machury i Kurzawińskiej (2017), materiałem poddanym analizie mykologicznej była pelargonja bluszczolistna. Aktywność grzybów zasiedlających tkanki rośliny uzależniona była od stężenia użytych olejków eterycznych a także gatunku grzyba. Olejek kminowy w stężeniu 1% najskuteczniej hamował porażenie roślin. Podczas analiz wykazano, że objawy chorobowe występują u podstawy łodygi (brunatnienie i przewężenie) a także na korzeniach (czarnienie i zamieranie korzeni). W badaniach wykazano, że sprawcami choroby był *Ph. Nicotianae*, będące gatunkami wskazanymi w badaniach własnych, jako sprawcy uszkodzeń cyklamena odmiany Mammoth. Gnicie pędów i nekrozy na liściach, wywołane przez patogeny, prowadziły do więdnienia części nadziemnych, a następnie przyczyniały się do ich zamierania. Na korzeniach cyklamena perskiego, w badaniach prowadzonych przez Kurzwińską (2010) wykryto *P. verrucosum*, *Fusarium*, *A. alternata*, które powodowały na korzeniach zmiany nekrotyczne. Podczas analiz prowadzonych przez Kopackiego i Wagnera (2004) na chryzantemie wykryto *F. avenaceum* oraz *F. oxysporum*. Grzyby te badano pod kątem patogeniczności. Największą patogeniczność wobec chryzantem wykazywało *F. avenaceum*.

W badaniach własnych w oparciu o technikę qPCR wykazano, że gatunek ten w największym stopniu był odpowiedzialny za powstawanie objawów chorobowych.

Ograniczenie objawów chorobowych na roślinach cyklamenu można uzyskać np. poprzez walkę biologiczną. W badaniach przeprowadzonych Köhl i in. (1998) wykazano, że ograniczenie objawów powodowanych przez *B. cinerea* można uzyskać poprzez zastosowanie *Ulocladium atrum* i *Gliocladium roseum*. W innej pracy wykazano skuteczność zaszczepiania roślin gatunkiem *Glomus fasciculatum* (AMF) w ograniczaniu fuzariozy i antraknozy cyklamenu. W badaniach Ogórka i Płaskowskiej (2011) *Epicoccum nigrum* wykazywał działanie biotyczne, dzięki czemu mógł być skutecznym środkiem do zwalczania *Fusarium* spp. natomiast szczepy *E. nigrum* mogą być zwalczane przez *B. cinerea*, który ogranicza ich dalszy wzrost. Wykorzystywanie technik diagnostyki molekularnej pozwala na wykrywanie wirusów, grzybów porażających rośliny ozdobne, które występują w bardzo małej ilości (Hasiów-Jaroszewska i in. 2016). Wielokrotnie wykazano skuteczność metod molekularnej detekcji patogenów w identyfikacji sprawców chorób roślin, izolowane przez innych autorów wskazywane jako patogeny *A. alternata* (Solfrizzo i in. 2005), *F. avenaceum* (Kopacki, Wagner 2005) i *F. poae* (Vogelgsang i in. 2008). W badaniach własnych również wykazano dużą skuteczność metody qPCR w określeniu sprawców objawów chorobowych.

## Wnioski

W badaniach mykologicznych wykazano obecność gatunków: *A. alternata*, *F. avenaceum*, *B. cinerea* oraz nielicznych szczepów rodzaju *Colletotrichum*.

Wyizolowane z tkanek cyklamenu saprotrofy należały do rodzajów: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Thielaviopsis*, *Trichoderma*, *Zygorhynchus*.

Zastosowanie metody qPCR ze starterami specyficznymi dla *F. avenaceum* oraz *F. poae*, potwierdziło znaczący udział obu badanych gatunków w infekcji roślin cyklamenu.

## Literatura

- Borowska A., 1986. *Flora Polska. Grzyby (Mycota). Grzyby Niedoskonałe (Deuteromycetes)*. PWN, Warszawa-Kraków.
- Chlebowski B., Mynett K., 1995. *Kwiaciarnictwo*, Wydanie VII poprawione, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa: 185-186.
- Dorak M., 2006. *Real-time PCR*, Taylor & Francis: 1-362.
- Ellis M.B., 1971. *Dematiace hypomyce* X. *Mycological Papers*. 125: 1-30.

- Gams W., 1971. *Cephalosporium-artige. Schimmelpilze (Hyphomycetes)*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Hasiów-Jaroszewska B., Budzyńska D., Borodynko-Filas N., Pospieszny H., 2016, *Zastosowanie wybranych technik biologii molekularnej do wykrywania wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (Tomato black ring virus) w soku roślinnym*, Progress In Plant Protection, 56 (4): 462-467.
- Köhl J., Gerlagh M., De Haas B. H., Krijger M. C., 1998, *Biological Control of Botrytis cinerea in Cyclamen with Ulocladium atrum and Gliocladium roseum under Commercial Growing Conditions*, Phytopathology, 88 (6): 568-574.
- Kopacki M., Wagner A., 2004, *Pathogenicity of Fusarium spp. to chrysanthemum (Dendranthema grandiflora Tzvele)*, Latvian Journal Agronomy, 7: 158-159.
- Kopacki M., Wagner A. 2005, *Grzyby zasiedlające chore rośliny chryzantemy [Chrysanthemum x grandiflorum [Ramat.] Kitam] uprawianej pod osłonami w rejonie Sandomierza*. Acta Agrobotanica, 58(2): 213-223.
- Król E., Kozak D., Parzymies M., Marcienk B., Świstowska A., 2017, *Mikroorganizmy zasiedlające kultury in vitro gloriozy (Gloriosa rothschildiana O'Brien) i czosnków ozdobnych (Allium L.)*, Annales UMCS sectio EEE Horticultur, XXVII (3): 22-29.
- Kurzwińska H., 2010, *Fungi Inhabiting The Rhizosphere of Persian Cyclamen And Their Impact on Potential Pathogens Of The Plant*, The Polish Phytopathological Society, Poznań, 57: 5–10.
- Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P., 1991. *Grzyby (Mycota). T. 12*. PAN. Warszawa.
- Machura M., Kurzawińska H., 2017, *Oddziaływanie naturalnych olejków eterycznych na wzrost phytophthora spp. – patogenów wyizolowanych z sadzonek pelargonii*, Inżynieria Ekologiczna/Ecological Engineering, Vol. 18 (5): 84–91.
- Maya M. A., Matsubara Y., 2013, *Tolerance to Fusarium wilt and anthracnose diseases and changes of antioxidative activity in mycorrhizal cyclamen*, Crop Protection 47: 41-48.
- Menderska M., 2016, *Atlas roślin doniczkowych*, wydawnictwo SMB, Warszawa, : 63-65.
- Ogórek R., Płaskowska E., 2011, *Epicoccum nigrum for biocontrol agents in vitro of plant fungal pathogens*. Commun, Agric. Appl. Biol. Sci., 76 (4): 691-697.
- Oszkinis K., 1994. *Kwiaty od A do Z*, Wydanie II poprawione i rozszerzone, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa: 484.
- Ramirez J., 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia*, Eisevier Biomedical Press, Amsterdam, New York and London.
- Rivera M. C., López M. V., Lopez S.E., 2009, *Mycobiota from Cyclamen persicum and its interaction with Botrytis cinerea*, Mycologia, 101 (2): 173-181.
- Rynans S., Walter de Walthoffen S., Dzieciatkowski T., Młynarczyk G., 2015. *Zastosowanie techniki real-time PCR w wirusologii*, Publikacje metodyczne Post. Mikrobiol., 54 (1): 75-82.
- Solfrizzo M., Girolamo A. D., Vitti C., Tylkowska K., Grabarkiewicz-Szczęsn, J., Szopińska D., Dorna, H., 2005. *Toxigenic profile of Alternaria alternata and Alternaria radicina occurring on umbelliferous plants*. Food additives and contaminants, 22(4): 302-308.
- Syngenta – rośliny doniczkowe + Astry 2019, FloriPro Services.

- Szopińska D., Tylkowska S., 2009. *Effect of osmopriming on germination, vigour and location of fungi in zinnia elegans seeds*, The Polish Phytopathological Society, Poznań, 54: 33–44.
- Vogelgsang S., Sulyok M., Hecker A., Jenny E., Krska R., Schuhmacher R., Forrer H. R., 2008, *Toxigenicity and pathogenicity of Fusarium poae and Fusarium avenaceum on wheat*. European Journal of Plant Pathology, 122(2): 265-276.
- Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schoen C., Costrel-de Corainville G., Häuser-Hahn I., Kastelein P., Köhl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G.H.J., 2004. *Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan*, European Journal of Plant Pathology, 110: 481-494.
- Woudt L. P., Nevuel A., Sikkema A., Grinsven M. Q., Milliani W. A., Campbell C. L., Leslie J. F., 1995, *Genetic variation in Fusarium oxysporum from cyclamen*, Phytopathology 85: 1348 – 1355.
- Żoła M., Kierpiec B., Kowalik M., 2012. *Patogeny obniżające walory dekoracyjne kwiatów różanecznika (Rhododendron L.)*, Progress In Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin, 52 (4) : 1074-107.

## Występowanie grzybów na liściach fiołka ogrodowego (*Viola* × *wittrockiana*) wykazujących objawy chorobowe

Fungi on the leaves of the garden Violet (*Viola* × *wittrockiana*) showing symptoms

Karolina Przetakiewicz  
Marta Kotłowska  
Grzegorz Dzienis

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa  
Koło Naukowe Diagnostyki i Fitopatologii Molekularnej "Biohazard"  
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Adam Okorski, prof. UWM

### Abstract

Pansy is a two-year-old plant, used most often because of its aesthetic value in rebate casting, flowerpots and balcony boxes. The aim of the study was to determine the species of pathogens found on the leaves of the garden violet. The research covered plant material originating from a gardening farm located in Rumia. Studies on the occurrence of fungal pathogens were carried out by means of classical mycological analysis and molecular diagnostics on seedlings of the Delta cv. Molecular analyzes were performed with qPCR with starters specific for *F. avenaceum*. DNA isolation from infected violet leaves was performed by the column method. The quantity and quality of the obtained DNA was verified by spectrophotometric method (Nandorop ND 2000C). The results DNA was a matrix in the qPCR reaction. Studies have shown the occurrence of pathogenic species of pathogenic leaves on the leaves of the pansy: *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* and *Phoma*, the presence of saprotrophic fungi *Acremonium*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Trichoderma* was also found. Molecular analyzes by the qPCR method showed the presence of *F. avenaceum* DNA in all tested samples from viola plants tissues.

**Keywords:** pansy, fungal diseases, molecular diagnostics, decorative plants

### Wstęp

Bratek (fiołek ogrodowy) należy do rodziny fiołkowatych (*Violaceae*). Jest rośliną dwuletnią, otrzymaną na drodze krzyżowania *V. tricolor* L. × *V. altaica* (Ker-Gawl) × *V. lutea* (Huds). Do najważniejszych odmian (grup) bratków zaliczamy: wczesnie kwitnące (Hiemalis, Pirnańskie, Vorbote), późno kwitnące (Holenderskie wielkokwiatowe, Szwajcarskie, Trimardeau) (Oszkinis 1994). Pierwsze prace hodowlane dotyczące bratka, rozpoczęły się w Anglii w XIX wieku, a następnie były kontynuowane we Francji, Belgii

i Niemczech. Celem prac badawczych było uzyskanie roślin o dużych kwiatach, czystości barw płatków korony, zrównoważonej wczesności kwitnienia oraz zwiększenie mrozoodporności (Chmiel i in. 2000). Bratek należy do kwiatów ozdobnych, dzięki czemu jest on wykorzystywany jako wiosenny kwiat rabatowy oraz sadzony w skrzynkach i pojemnikach balkonowych i okiennych. Jest również uprawiany w celu urozmaicenia zieleni miejskiej oraz jako dekoracja nagrobków. Kolejnym jego zastosowaniem jest możliwość uprawy w donicach jako kwiat cięty (Chmiel i in. 2000). W kwietnikach bratki tworzą wzorzyste dywany, a odmiany o mniejszej gamie barw i niższym wzroście, znajdują zastosowanie w rabatach sezonowych jako rośliny pierwszoplanowe (Herwig, Riou 1992). Poza niewątpliwymi walorami estetycznymi, kwiatostany bratków są jadalne i stanowią ozdobę wykwintnych dań w ekskluzywnych restauracjach (Augustynowicz 2013).

Fiołek ogrodowy charakteryzuje się czterokanciastą, gładką, wyprostowaną łodygą, tworzy dolne jajowato-sercowate liście, górne liście są lancetowate oraz pięciopłatkowymi grzbiecistymi kwiatami na długich szypułkach osadzonych w kątach liści. Kwiaty posiadają bogatą gamę kolorystyczną od białej, różowej, czerwonej, pomarańczowej, żółtej, fioletowej, niebieskiej do prawie czarnej. Występują także kwiaty kilkubarwne z tzw. oczkiem. Średnia wysokość roślin wynosi 15-30 cm (Oszkinis 1994; Owen 2006). Uprawiany jest na glebach żyznych, próchnicznych w stanowisku słonecznym lub półcienistym. Rośliny fiołka posadzone w cieniu, charakteryzują się wybujałością oraz osłabionym kwitnieniem, zaś w bardzo wysokiej temperaturze kwiaty drobnieją. Bratki preferują lekko kwaśny oraz obojętny odczyn gleby (Augustynowicz 2013; Oszkinis 1994). Rozwój następuje z nasion wysiewanych do inspektów lub na rozsadnik na przełomie czerwca i lipca. Na stałe rośliny wysadza się w kwietniu bądź na początku maja. Rośliny nie tolerują przesadzania w okresie kwitnienia (Oszkinis 1994). Fiołki najczęściej rozmnaża się przez podział, a bardzo rzadko z sadzonek. Uprawa tunelowa bratka charakteryzuje się dużą wilgotnością oraz wysoką temperaturą, co skutkuje porażeniem przez patogeny grzybowe. Liście są miejscem żerowania przedziorków, mączlików i mszyc, które uszkadzając tkanki, przyczyniają się do tworzenia wrót infekcji. Do głównych chorób występujących na roślinach bratka należą: fytoftoroza (*Phytophthora cactorum*, *Phytophthora megasperma*), plamistość liści (*Colletotrichum viola-tricoloris*), mączniak rzekomy (*Peronospora violae*), mączniak prawdziwy (*Sphaerotheca humuli*), rdza (*Puccinia violae*), zgnilizny podstawy pędu oraz zgnilizna korzeni (*Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*), szara pleśń (*Botrytis cinerea*) oraz wirus mozaikowy.

Detekcja chorób metodami molekularnymi jest obecnie najlepszą metodą identyfikacji sprawców chorób, co stanowi podstawy do ograniczenia strat w uprawach ogrodniczych. Ze względu na podobieństwo objawów chorobowych, szczególnie na początku infekcji, lustracja objawów jest zawodna. Metody molekularne umożliwiają w bardzo krótkim czasie na rozpoznanie sprawców chorób na poziomie DNA/RNA, pozwalając na wykrycie patogenu, zanim wystąpią objawy chorobowe, co skutkuje zastosowaniem odpowiedniej metody zwalczania. Niezwykle istotnym elementem prewencji jest sukcesywne kontrolowanie stanu zdrowotności sadzonek. Metody molekularne opierają się na polimorfizmie DNA organizmu docelowego z wykorzystaniem reakcji PCR, qPCR i sekwencjonowania (Pszczółkowska, Okorski 2015). Atutem tych metod jest uniwersalność zastosowania w stosunku do różnorodnego materiału badawczego. Ponadto, tego typu badania, umożliwiają wykrycie gatunków, których hodowla w warunkach *in vitro* jest problematyczna. Jednak wymagają stosunkowo dużych nakładów finansowych. Reakcja PCR umożliwia powielenie konkretnego odcinka matrycy DNA. Zastosowanie starterów specyficznych wobec wybranych gatunków patogenów, umożliwia ich wykrycie i na tej podstawie określenie sprawców zmian chorobowych na roślinach. Soki komórkowe roślin stanowią mieszaninę DNA/RNA, a ponadto zawierają zanieczyszczenia oraz inhibitory reakcji enzymatycznych. W celu wydobycia z izolatu matrycy DNA, stosuje się mechaniczne niszczenie struktur komórkowych poprzez ucieranie w ciekłym azocie, następnie w dalszej kolejności przeprowadza się inaktywację nukleaz oraz oczyszczenie DNA. Do dalszych badań można zakwalifikować materiał charakteryzujący się wysokimi parametrami jakościowymi badany za pomocą aparatu Nanodrop ND2000C przy absorbancji A260/230 i A260/280.

Tabela 1. Sekwencje starterów/sondy do detekcji qPCR *Fusarium avenaceum*

Patogen	Nazwa startera	Sekwencja	Literatura:
<i>Fusarium avenaceum</i>	Av-MGB-F	CCATCGCCGTGGCTTTC	Waalwijk i in. 2004
	Av-MGB-R	CAAGCCCACAGACACGGTTGT	
	Av-MGB_probe	ACGCAATTGACTATTGC	

Źródło: Opracowanie własne.



Wiele patogenów roślin ozdobnych może występować w glebie, bytując w niej na resztkach lub w stadium saprotroficznym stanowiąc potencjalne źródło materiału infekcyjnego dla roślin. W celu prewencji należy wykonać analizy gleby, które potwierdzą bądź wykluczą występowanie tam zbiorowiska konkretnych patogenów stanowiących zagrożenie dla konkretnych gatunków roślin. Metody molekularne pozwalają w tym wypadku na wykluczenie z uprawy porażonych podłoży ogrodniczych oraz zapewniają zmniejszenie ryzyka porażenia przez ewentualne patogeny glebowe, poprzez zastosowanie prewencyjne rekomendowanych na podstawie badań preparatów ochronnych.

Celem pracy było określenie występowania grzybów na liściach fiołka ogrodowego (*Viola × wittrockiana*) wykazujących objawy chorobowe.

Tabela 2. Warunki reakcji qPCR ze starterami specyficznymi wobec *Fusarium avenaceum*

Etapy reakcji qPCR		Warunki
1	Wstępna denaturacja	95 °C – 3 min
2	Denaturacja	95 °C – 20 sek.
3	Przyłączanie starterów	62 °C – 20 sek.
4	Wydłużanie	72 °C – 1 min
Liczba cykli		40

Źródło: Opracowanie własne.

## Material i metody

Materiał do badań pobrano z gospodarstwa ogrodniczego położonego w województwie pomorskim, powiecie wejherowskim, w miejscowości Rumia. Badania rozpoczęto w 2018 roku i kontynuowano w 2019 roku. Materiał wyjściowy stanowiły rośliny bratka odmiany Delta. Rośliny uprawiane były w tunelach foliowych na matach, podlewane i zasilane z góry za pomocą zraszaczy. W okresie wegetacji na roślinach zaobserwowano chlorotyczne (żółte) przebarwienia na liściach i u podstawy korzeni. Porażenie stwierdzono na ok. 1000 szt. bratka wysadzonego w ilości 15 000 sztuk (porażenie obejmowało około 10% roślin). Na terenie gospodarstwa pobrano losowo 10 prób roślin. Dostarczone do Katedry Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej rośliny oczyszczono z zanieczyszczeń płuczając pod bieżącą wodą, a następnie liście i pędy odkażono w alkoholu etylowym (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) przez 5 minut, następnie przez kolejne 5 minut w podchlorynie sodu (NaOCl), po czym nasiona przepłukano sterylną wodą destylowaną. Zdezynfekowany materiał roślinny został podzielony

na dwie części. Z pierwszej wykonano analizę mykologiczną, drugą wykorzystano do analiz molekularnych. Analizy mykologiczne obejmowały izolację grzybów zasiedlających pędy i liście z objawami chorobowymi. W tym celu wyłożono po 5 fragmentów kwiatów wyciętych za pomocą skalpela i pęsety z liści bratka na pożywkę PDA przygotowaną z: 200 g ziemniaków (gotowanych w 0,5 litra wody), 16 g glukozy, 18 g agaru, wody destylowanej do 1000 cm<sup>3</sup>. Wyłożono po 10 szalek na wariant badawczy. Po inkubacji (14 dni) określono co do gatunku wyrastające kolonie grzybów za pomocą dostępnych kluczy i monografii (Borowska 1986, Domsch, Gams 1972, Ellis 1971, Gerlach, Nirenberg 1982, Kwaśna i in. 1991, Ramirez 1982).

Tabela 3 Grzyby wyizolowane z liści i pędów bratka (*Viola × wittrockiana*) wykazujących objawy chorobowe

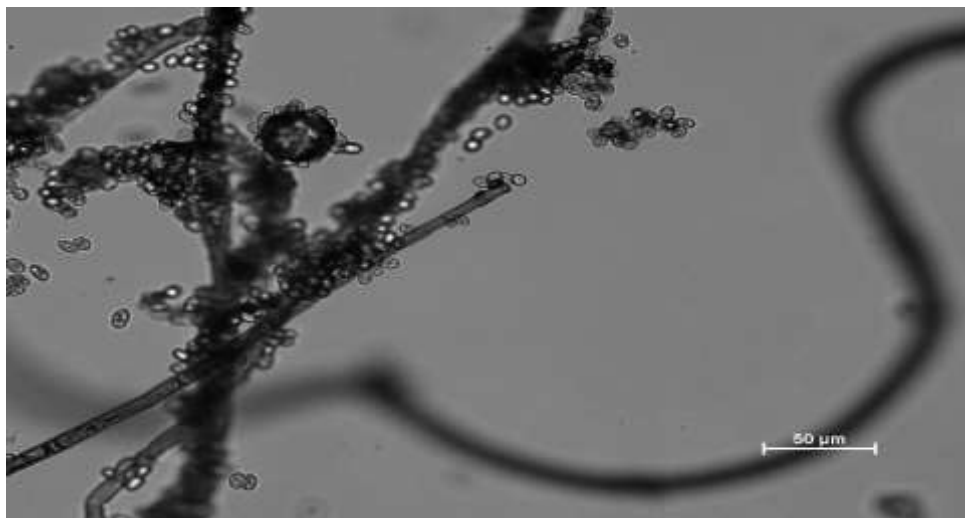
Gatunek grzybów	Pędy	Liście
<i>Acremonium</i> sp.	2	1
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	21	13
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	3	8
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	11	21
<i>Colletotrichum</i> spp.	1	1
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	23	15
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc	2	1
<i>Fusarium oxysporum</i> sensu Smith & Swingle	4	2
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw	23	7
<i>Gliocladium catenulatum</i> J.C. Gilman & E.V. Abbott	2	1
<i>Mortierella humilis</i> Linnem	2	1
<i>Penicillium</i> spp.	4	7
<i>Phoma</i> spp.	2	-
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	4	5
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link) Rifai	2	4
<b>Razem saprotrofy</b>	<b>27</b>	<b>40</b>
<b>Razem patogeny</b>	<b>79</b>	<b>43</b>
<b>Ogółem</b>	<b>106</b>	<b>83</b>

Źródło: Opracowanie własne.

Druga część odkażonego materiału posłużyła do wyizolowania totalnego gDNA metodą kolumnkową. Izolacja DNA została przeprowadzona zgodnie z zalecaną procedurą. Następnie za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000C oznaczono parametry jakościowe i ilościowe dla każdego z dwóch powtórzeń wariantu badawczego. Uzyskane gDNA wykorzystano w reakcji qPCR do wykrycia *F. avenaceum* za pomocą specyficznych starterów (Tab. 1). Dla każdej analizowanej matrycy qDNA wykonano analizę qPCR w dwóch

powtórzeniach. Reakcje przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym w stosunku do badanego gatunku grzyba (Tab. 2). Do wykrycia *F. avenaceum* zastosowano zestaw odczynników firmowych A&A Biotechnology, reakcje qPCR przeprowadzono w aparacie ABI 7500 FAST (Applied Biosystem). Zdjęcia mikroskopowe zostały wykonane aparatem NIKON ECLIPSE 80i.

Rysunek 1. Zarodniki oraz grzybnia *B. cinerea* (powiększenie 400 x)



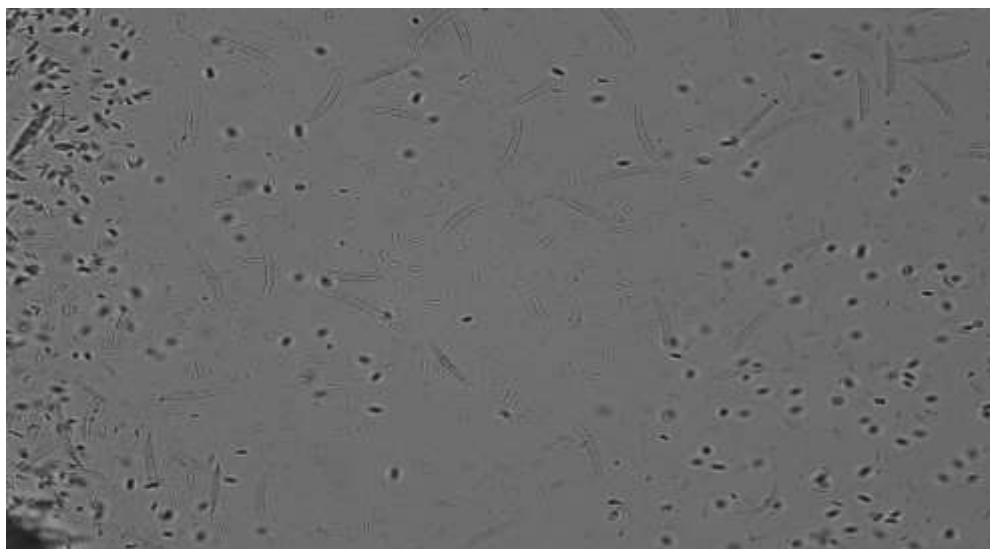
Źródło: Opracowanie własne.

## Wyniki

Badania wykazały występowanie na liściach bratka wykazujących objawy chorobowe 83 izolatów grzybów należących do 13 gatunków (Tab. 3).

Z pędów bratka wyizolowano łącznie 104 izolaty grzybów reprezentujące 14 gatunków. Gatunki patogeniczne występujące na porażonych organach fiołka to: *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* oraz *Phoma*. Z pędów bratka wyizolowano łącznie 79 izolatów grzybów patogenicznych, co stanowiło 74,5% wszystkich grzybów wyosobnionych z pędów. Grzyby patogeniczne mniejszy odsetek – 51,8%, stanowiły na liściach bratka, z których wyizolowano 43 kultury (Tab. 3).

Rysunek 2. Mikrokonidia i makrokonidia *F. oxysporum* (powiększenie 400x)



Źródło: Opracowanie własne.

W wyniku analiz mikologicznych, na roślinach bratka stwierdzono także obecność grzybów saprotroficznych, reprezentowanych przez przedstawicieli rodzajów: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Trichoderma*. Przeprowadzone prace badawcze, obejmowały także analizy molekularne z wykorzystaniem techniki qPCR ze starterami specyficznymi wobec licznie występujących na roślinach fiołka izolatów *F. avenaceum*. W oparciu o wyniki reakcji qPCR udowodniono, że w tkankach porażonych bratków (pędy i liście) występowało w stosunkowo dużej ilości DNA *F. avenaceum*. Powyższą tezę potwierdzają wyniki detekcji qPCR, wyrażone wartościami cyklu progowego (CT) (Tab. 4). Obecność gDNA *F. avenaceum* wykazano w organach wszystkich badanych sadzonek fiołka.

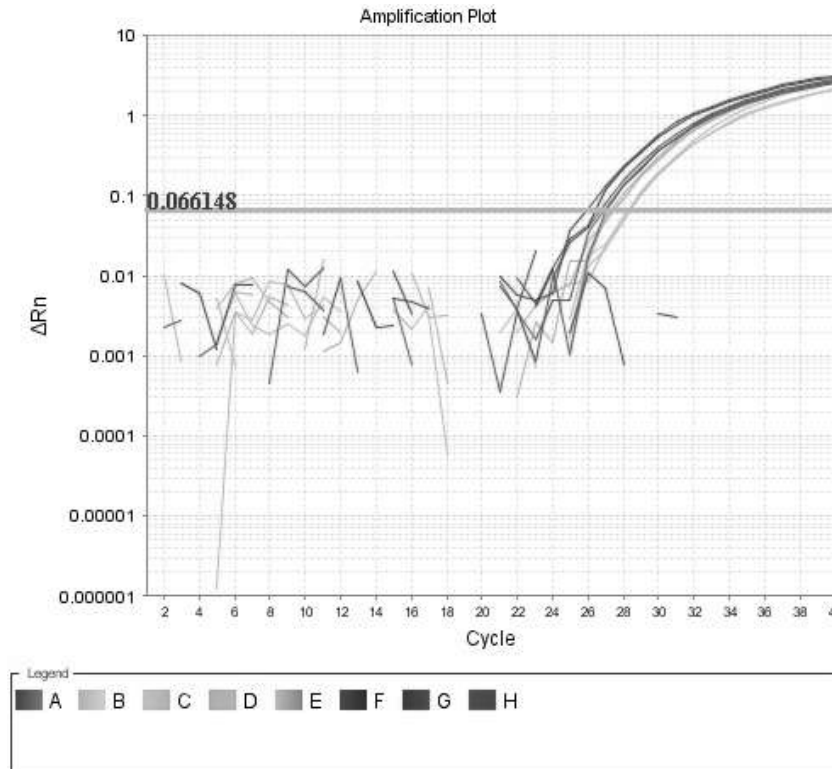
Tabela 4. Kwantyfikacja qPCR *Fusarium avenaceum* w pędach i liściach bratka (Ct)

Próba	Pędy	Liście
1	26,21	27,30
2	25,96	27,46
3	26,63	27,41
4	26,87	28,30
5	27,09	28,35
6	27,32	28,25

Źródło: Opracowanie własne.

Największą ilość DNA *F. avenaceum* wykazano: w pędach- próba 2: Ct-25,96 oraz liściach – próba 1: 27,3 Ct. Najmniej gDNA badanego gatunku stwierdzono w próbach pędy - 6: Ct-27,32; oraz liście 5- Ct- 28,35 (Tab. 4, Rys. 1).

Rysunek 3 Wykres amplifikacji prób DNA wyizolowanego metodą kolumnkową z pędów i liści bratka ze starterami specyficznymi wobec *Fusarium avenaceum* w reakcji qPCR



Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

badaniach własnych wykazano, że gatunki patogeniczne występujące na porażonych tkankach, to przedstawiciele: *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* oraz *Phoma*. Saprotrofy wyizolowane z tkanek fiołka były reprezentowane przez przedstawicieli rodzajów: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Trichoderma*. Badania przeprowadzone przez Katoch i in. (2017) wykazały, że rośliny fiołka wonnego (*Viola odorata*) zasiedlone były przez gatunki patogeniczne: *Colletotrichum destructivum*, *C. siamense*, *C. trifolii*, *C. truncatum*, *Fusarium nematophilum*, *F. oxysporum*, określając częstotliwość występowania przedstawicieli rodzaju *Colletotrichum* na poziomie 25,9% oraz *Fusarium* 22,2%. W badaniach własnych stwierdzono udział przedstawicieli rodzaju *Fusarium* na porażonych pędach - 49% oraz liściach 25,3% a rodzaj *Colletotrichum* reprezentowany był nielicznie.

Badania prowadzone przez Kućmierz i Kaczyńską (2005) potwierdziły największe porażenie nasion werbeny przez *A. alternata* (24%), *Fusarium oxysporum* (9%) oraz *Botrytis cinerea* (6%). Porażenie roślin ozdobnych przez grzyby, obniża ich walory estetyczne oraz przyspiesza ich zamieranie. Potwierdzają to również badania wykonane na roślinach różanecznika przeprowadzone przez Żołą i innych (2012). Rośliny poddane badaniom molekularnym, wykazywały objawy chorób powodowanych najczęściej przez *A. alternata* (29%) oraz w mniejszym stopniu przez *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Często na roślinach ozdobnych występuje szara pleśń powodowana przez *Botrytis cinerea*, która w dużym stopniu poraża pelargonie, a w mateczniku aż 65 % roślin może być porażanych (Kućmierz i Pilch, 2008). W badaniach własnych stwierdzono nieliczne występowanie izolatów *B. cinerea* jednak w sprzyjających warunkach dostępność inokulum może spowodować objawy chorobowe. Kolejne badania prowadzone przez Kowalika (2009) na różaneczniku, wykazały obecność na badanych roślinach takich patogenów jak: *B. cinerea*, *Colletotrichum*. Na liściach z objawami nekroz występowały przedstawiciele rodzajów takich jak: *Alternaria*, *Fusarium*. Obserwacje prowadzone przez Kowalik i Wandzel (2005) na wrzosach potwierdzają, że znekrotyzowane pędy roślin ozdobnych najczęściej zasiedlają grzyby: *Alternaria alternata*, *Epicocum nigrum purpurascens*, *Botrytis cinerea*. W badaniach tych nie stwierdzono obecności *Colletotrichum*, *Phytium*, *Fusarium* i *Rhizoctonia*. Badania Kopackiego i Wanger (2005) również potwierdzają, że rośliny ozdobne, takie jak chryzantemy, narażane są na porażenia systemu korzeniowego powodowane przez grzyby należące do rodzajów *Fusarium*, *Sclerotinia* i *Rhizoctonia*. Według Wikee i in. (2011) *Colletotrichum* wykryte na jaśminie, znacząco zmniejszyło plon kwiatów. Wyizolowane gatunki przyczyniają się do powstawania chlorotycznych plam z jaśniejszymi (jasnobrązowymi) nekrotycznymi centrami, które następnie powodują zamieranie roślin. W wyniku badań zidentyfikowano obecność *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum siamense*. W badaniach prowadzonych przez Kowalika i Dudę (2014) w celu wykrycia przyczyny zamierania liści powojnika, wykryto 46 gatunków patogenów grzybowych. Najliczniejszą grupę stanowiły: *Alternaria alternata*, *Epicocum nigrum*, następnie, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*. Badania zdrowotności gatunków z rodzajów *Acer*, *Malus* i *Rosa* prowadzone przez Adamską i in. (2012) również potwierdziły obecność *Botrytis cinerea*, *Marssonina rosae*, *Peronospora sparsa* i *Podosphaera pannosa*, które zasiedlały róże. W pracach badawczych zaplanowanych w ramach badań własnych do określenia poziomu infekcji poprzez detekcję DNA *F. avenaceum*

wykorzystano także technikę qPCR, której zastosowanie wykazało infekcję wszystkich porażonych roślin *F. avenaceum*. Skuteczność technik molekularnych, w szczególności w określaniu poziomu infekcji różnych gatunków roślin, wykazano w licznych pracach badawczych Pappu i in. (2005), Alaei i in. (2009), Rigotti i in. (2002) oraz Salm i Geider (2004).

### Wnioski

Gatunki patogeniczne występujące na roślinach fiołka to *A. alternata*, *B. cinerea*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. poae* oraz *Phoma*. W oparciu o analizy mikologiczne, wykonane w ramach badań własnych, jako głównych sprawców chorobowych wskazano przedstawicieli rodzaju *Fusarium*.

Analiza qPCR wykazała wysoki poziom gDNA *F. avenaceum* w pędach i liściach porażonych roślin fiołka, co wskazuje że gatunek ten w znaczącym stopniu odpowiadał za infekcję roślin.

### Literatura

- Adamska I., Ziolo E., Kocanowski J., 2012, *Healthstate of plants in the urban garden „Różanka” in Szczecin*. Progress in Plant Protection, 52 (3): 609-613.
- Alaei H., Baeyen S., Maes M., Hofte M., Heungens K., 2009. *Molecular detection of Puccinia horiana in Chrysanthemum × morifolium through conventional and real-time PCR*. Journal of Microbiological Methods 76(2): 136-145.
- Augustynowicz M., 2013. *Piękny ogród*. PWH ARTI, Warszawa.
- Borowska A., 1986. *Flora Polska. Grzyby (Mycota). Grzyby niedoskonale (Deuteromycetes)*. PWN, Warszawa-Kraków.
- Chmiel H. (red.), 2000. *Uprawa roślin ozdobnych*. PWRiL, Warszawa.
- Domsch K.H., Gams W., 1972. *Fungi In Agriculture Soils*. Longman Group Limited, London.
- Ellis G.F.R., 1971. *In General Relativity and Cosmology. Proceedings of the XLVII Enrico Fermi Summer School*. Edited by: Sachs R.K. Academic Press, New York.
- Gerlach W., Nirenberg H., 1982. *The genus Fusarium – a pictorial atlas*. Biologische Bundesanstalt für Land- Und Forstwirtschaft. Berlin, Germany.
- Herwig R., Riou C., 1992. *350 roślin ogrodowych*. ELIPSA, Warszawa.
- Katoch M., Paul A., Singh G., Srid S.N.C., 2017. *Fungal endophytes associated with Viola odorata Linn. as bioresource for pancreaticlipase inhibitors*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 17: 385.
- Kopacki M., Wagner A., 2005. *Grzyby zasiedlające chore rośliny chryzantemy (Chrysanthemum x grandiflorum /Ramat./ Kitam) uprawianej pod osłonami w rejonie Sandomierza*. Acta Agrobotanica, 58 (2): 213-224.

- Kowalik M., 2009. *Bioróżnorodność grzybów występujących w fylloferze różanecznika zimozielonego Rhododendron L.* Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych T. 531 (1).
- Kowalik M., Duda K., 2014. *Causal agents of dieback of clematis (Clematis L.) leaves.* Progress in Plant Protection 54 (4).
- Kowalik M., Wandzel A., 2005. *Grzyby powoduje zamieranie sadzonek wrzosu.* Acta Agrobotanica, 58(2): 237-242.
- Kućmierz J., Kaczyńska A., 2005. *Fungi isolated from Verbena hybrida seeds, their pathogenicity to seedlings and attempts at the control.* Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus, 4(2): 39-44.
- Kućmierz J., Pilch B., 2008. *Szara pleśń (Botryotinia fuckeliana, stadium konidialne Botrytis cinerea) na pelargonjach (Pelargonium spp.).* Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych T. 531.
- Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P., 1991. *Grzyby (Mycota). t. 12.* PAN, Warszawa.
- Oszknis K., 1994. *Kwiaty od A do Z.* PWRiL, Warszawa.
- Owen J., 2006. *Praktyczna encyklopedia ogrodnictwa.* ELIPSA, Warszawa.
- Pappu H.R., Wyatt S.D., Druffel K.L., 2005. *Dahlia Mosaic Virus: Molecular Detection and Distribution in Dahlia in the United States.* HortScience 40 (3): 697-699.
- Pszczołkowska A., Okorski A., 2015. *Identyfikacja patogenów grzybowych roślin z wykorzystaniem metod molekularnych.* Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie Oddział w Radomiu.
- Ramirez C., 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia* Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam, New York and London.
- Rigotti S., Gindro K., Richter H., Viret O., 2002. *Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of Botrytis cinerea Pers.: Fr. In strawberry (Fragaria × ananasa Duch.) using PCR.* FEMS Microbiology Letters, 209(2): 169-174.
- Salm H., Geider K., 2004. *Real-time PCR for detection and quantification of Erwinia amylovora, the causal agent of fireblight.* Plant Pathology, 53(5): 602-610.
- Waalwijk C., van der Heide R., de Vries I., van der Lee T., Schoen C., Costrel-de Corainville G., Hauser-Hahn I., Kastelein P., Kohl J., Lonnet P., Demarquet T., Kema G.H.J., 2004. *Quantitative detection of Fusarium species in wheat using TaqMan.* European Journal of Plant Pathology, 110: 481-494.
- Wikee, S., Cai, L., Pairin, N., McKenzie E.H.C., Su Y-Y., Chukeatirote E., Thi H. N., Bahkali A.H., Moslem M.A., Abdelsalam K. i Hyde K.D., 2011. *Colletotrichum species from Jasmine (Jasminumsambac).* Fungal Diversity, 46 (1): 171-182.
- Żoła M., Kierpiec B., Kowalik M., 2012. *Pathogens decreasing decorative values of rododendron (Rhododendron L.) flowers.* Progress in Plant Protection 52 (4): 1074-1077.



## **Rozdział III**

### **Zastosowanie mikrobiologii w wybranych procesach przemysłowych**



## Wpływ mikroorganizmów na jakość piwa – ocena mikrobiologiczna surowców, produktu i procesu technologicznego

Impact of microorganisms on beer quality – microbiological evaluation of raw materials, product and technological process

Izabela Koniuszewska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Naukowe Koło Mikrobiologów Molekularnych „COCCUS”  
Praca wykonana pod kierunkiem dr inż. Beaty Nalepy

### Abstract

The aim of this thesis was to define the microbiological quality of technological process hygiene and beer, including raw materials and finished product. Research was carried out in local brewery in nord-eastern Poland. The microbiological analysis included indication of total number of bacteria (UBA medium), number of fungi (YGC medium), number of bacteria from *Enterobacteriaceae* family or presence of coli group (VRBG medium) and also number of bacteria from *Enterococcus* genus (Slanetz-Bartley medium). The results showed that microbiological quality revealed the differences between each sample. Granulated hop characterized with poor quality, however technological water and typical yeast in beer production characterized with fine quality. „Jasne” beer was characterized by good quality (single bacteria cells, no fungal cells), while "Ciemne" beer was characterized by poor microbiological quality (high number of bacteria and fungi). The presence of bacteria and/or fungi has been demonstrated in samples taken from bottles and from selected sites of the processing line. Procedures related to storage of raw materials, cleaning and disinfection as well as delivery of unit packaging to a processing line require inspection and change so as to improve microbiological purity and the related quality of the final product - beer.

**Keywords:** quality of beer, beer, microbiological quality

### Wstęp

Piwo jest napojem alkoholowym, który otrzymuje się w procesie fermentacji alkoholowej brzeczki piwnej, przygotowywanej z wody, surowców skrobiowych, jak np. słód jęczmienny i chmiel oraz poprzez działanie szczepów drożdży piwowskich (Pazera i Rzemieniuk 1998). Browar odpowiedzialny jest za produkcję wysokiej jakości produktów spełniających oczekiwania klienta (Baryłko-Pikielna 1995). W tym celu browary muszą obligatoryjnie stosować systemy zapewniania jakości produktu oraz zachowywać kryteria higieny.

Większość bakterii, które powodują zanieczyszczenia piw, należy do pałeczek fermentacji mlekowej, głównie rodzajów *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Bakterie te w piwie powodują jego „jedwabiste” zmętnienie oraz ciągliwość a także zmiany cech smakowych piwa, nadając mu kwaśny i/lub maślany posmak. W warunkach niskiego stężenia etanolu, niskiego poziomu składników goryczkowych chmielu i pH powyżej 4,5, może rozwijać się *Micrococcus kristinae*, odpowiedzialny za tworzenie nietypowego, owocowego aromatu piwa. Drobnoustroje Gram-ujemne także mogą przyczyniać się do powstawania wad piwa i szczególnie niepożądanymi w piwowarstwie, są tlenowe bakterie fermentacji octowej *Gluconobacter* i *Acetobacter*. Wśród drobnoustrojów beztlenowych powstawanie wad piwa najczęściej powodują bakterie rodzaju *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Zymomonas* i *Zymophilus*. Objawami zanieczyszczenia piwa przez *Pectinatus* i *Megasphaera* są silne zmętnienie oraz zapach zepsutych jaj (Satora i Tuszyński 2004). Zakażenia pałeczkami należącymi do rodziny *Enterobacteriaceae*, są jednym z poważniejszych problemów w browarnictwie. *E.coli* oraz szczepy rodzajów *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* czy *Yersinia*, są bezpośrednią przyczyną biegunek, czerwonki bakteryjnej, duru brzuszego i innych schorzeń. Drożdże dzikie oraz grzyby pleśniowe również często zanieczyszczają surowce i produkty w przemyśle piwowarskim. W piwie najczęściej zanieczyszczenia powodują drożdże z rodzajów *Candida*, *Torula*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* czy *Zygosaccharomyces* (Baca 1997, Satora i Tuszyński 2004). O zanieczyszczeniu drożdżami dzikimi świadczą zmętnienia, osady oraz błonki występujące na powierzchni piwa (Czajkowska 1996), natomiast źle przechowywane ziarno przeznaczone na słód, porasta pleśniami a niekorzystny pleśniowy smak i zapach, przechodzą do piwa (Tuszyński i Makarewicz 1998).

Celem pracy była mikrobiologiczna ocena jakości surowców (słodu jęczmiennego, granulatu chmielu, drożdży piwnych, wody), gotowych produktów (piwa jasnego i ciemnego), brzeczek z karmelem w trakcie fermentacji oraz procesu technologicznego. W pracy oceniono także jakość mikrobiologiczną opakowań jednostkowych. W posiewach oznaczono ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD), liczbę grzybów, liczbę/obecność pałeczek z grupy coli, liczbę *Enterococcus* oraz liczbę pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae*.

## **Materialy i metody**

W niniejszej pracy wykonano analizy mikrobiologiczne próbek pobranych w różnych etapach produkcji piwa w browarze w północno - wschodniej Polsce. Były to:

- słód jęczmienny, granulaty chmielu, drożdże piwowarskie,
- woda technologiczna,
- brzeczka z karmelem oraz piwo jasne i ciemne,
- opakowania jednostkowe (butelki o pojemności 500 cm<sup>3</sup>),
- wymazy pobrane z powierzchni urządzeń linii technologicznej.

Zachowując jałowe warunki, pobrano 100 gramów chmielu granulowanego. Pobrano także 100 cm<sup>3</sup> drożdży płynnych, brzeczki piwnej z karmelem oraz słodu jęczmiennego. Próbkę ujednolicono z użyciem stomachera i przygotowano szereg 10- krotnych rozcieńczeń. Wybrane rozcieńczenia posiewano w 3 powtórzeniach na odpowiednie podłoża celem oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby grzybów, liczby pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Tabela 1. Podłoża oraz warunki oznaczeń mikrobiologicznych

		Podłoże	Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [h]
Oznaczenia mikrobiologiczne	*OLD	UBA (Merck)	30	48
	Liczba grzybów	YGC z chloramfenikolem (Merck)	25	120
	Liczba pałeczek rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	VRBD (Merck)	37	48
	Obecność pałeczek grupy coli	Płynne podłoże z żółcią, zielenią brylantową, laktozą i rurką Dürhama (Merck)	37	48
	Liczba <i>Escherichia coli</i> w wodzie technologicznej	McConkey (Merck)	37	48
	Liczba <i>Enterococcus</i> w wodzie technologicznej	Slanetz- Bartley (Merck)	37	48

\*OLD- ogólna liczba drobnoustrojów

Źródło: Opracowanie własne.

Wodę pobrano z kranu po dezynfekcji, który znajdował się w pomieszczeniach laboratorium. Wodę pobrano do jałowych butelek typu Schott w objętości 2 x 500 cm<sup>3</sup>. Oznaczenia liczby pałeczek *E. coli* i *Enterococcus* wykonano metodą filtracji trzech porcji wody o objętości 100 cm<sup>3</sup> przez filtry membranowe o porowatości 0,45µm.

Piwo jasne i ciemne, pobrano do jałowych butelek typu Schott w ilości 5 próbek po 100 cm<sup>3</sup>. Próbkę piwa przefiltrowano przez filtry membranowe o porowatości 0,45µm, a filtry

umieszczono na powierzchni podłoży w celu oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby grzybów, obecność bakterii z grupy coli.

Do butelek wlewano 20 cm<sup>3</sup> płynu płuczącego, zamykano jałowym korkiem i wytrząsano na wytrząsarce przez 15 minut. Popłuczyny zlewano a następnie wykonywano analizy mikrobiologiczne obejmujące oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów, liczby grzybów i obecności pałeczek grupy coli.

Tabela 2. Wyniki analizy mikrobiologicznej surowców

Próbka	Drobnoustroje	Liczba [jtk/g lub cm <sup>3</sup> ]
Słód jęczmienny	OLD*	1,53x10 <sup>4</sup>
	Liczba grzybów	1,0 x10 <sup>4</sup>
	Liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	0
Chmiel granulowany	OLD*	3,0 x10 <sup>3</sup>
	Liczba grzybów	9,0 x10 <sup>3</sup>
	Liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	0
Drożdże płynne	OLD*	0
	Liczba grzybów (tu drożdży)	2,3x10 <sup>4</sup>
	Liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	0
Brzeczka z karmelem w trakcie fermentacji	OLD*	3,4x10 <sup>3</sup>
	Liczba grzybów (tu drożdży)	9,5x10 <sup>4</sup>
	Liczba bakterii z rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	0

\*OLD- ogólna liczba drobnoustrojów. Opracowanie własne.

Źródło: Opracowanie własne.

Do badań pobrano wymazy z rury służącej do zlewania piwa z tankofermentatora oraz kraników służących do rozlewu piwa. Wymazy pobrano dwukrotnie: przed i po dezynfekcji urządzeń. Wymazy z kraników oznaczonych nr 1, 2, 3 pobrano wymazówką zwilżoną w jałowym płynie do rozcieńczeń i wytrząsano przez 5 min., po czym w popłuczynach oznaczano OLD, liczbę grzybów i obecność pałeczek grupy coli.

Liczbę drobnoustrojów oznaczano w 3 powtórzeniach posiewając badaną próbkę lub jej rozcieńczenia na odpowiednie podłoże. Podane wartości w Tabeli 1 są wartościami średnimi.

## Wyniki badań

Analiza mikrobiologiczna słodu jęczmiennego wykazała, że ogólna liczba drobnoustrojów wynosi  $1,5 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. Liczba grzybów wynosiła  $1,0 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. W próbkach chmielu granulowanego ogólna liczba drobnoustrojów wynosiła  $3,0 \times 10^3$  jtk/g, natomiast liczba grzybów wynosiła  $9,0 \times 10^3$  jtk/g. Liczba grzybów w drożdżach płynnych wynosiła  $2,3 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. Nie stwierdzono obecności bakterii tlenowych mezofilnych (Tab. 2).

W brzezce z karmelem, liczba drożdży wynosiła  $9,5 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. Nie odnotowano bakterii rodziny *Enterobacteriaceae* w próbkach wszystkich surowców (Tab. 2).

Tabela 3. Wyniki analizy mikrobiologicznej wody technologicznej

Próbka	Drobnoustroje	Liczba [jtk/100 cm <sup>3</sup> ]
Woda technologiczna	<i>Escherichia coli</i>	0
	<i>Enterococcus</i>	0

Źródło: Opracowanie własne.

W analizie mikrobiologicznej wody technologicznej nie odnotowano bakterii kałowych *Escherichia coli* i *Enterococcus* (Tab. 3).

Tabela 4. Wyniki analizy mikrobiologicznej piwa jasnego oraz ciemnego

Próbka	Drobnoustroje	Liczba [jtk/100 cm <sup>3</sup> ]
Piwo jasne	OLD	3
	Liczba grzybów	0
	Liczba bakterii rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	0
Piwo ciemne	OLD	22
	Liczba grzybów	7
	Liczba bakterii rodziny <i>Enterobacteriaceae</i>	0

\*OLD- ogólna liczba drobnoustrojów.

Źródło: Opracowanie własne.

W posiewach z piwa jasnego OLD wynosiła 3 jtk w 100 cm<sup>3</sup>. Nie odnotowano bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz grzybów. W przypadku piwa ciemnego OLD była znacznie wyższa i wynosiła 22 jtk w 100 cm<sup>3</sup> piwa. Wykazano także wzrost grzybów w liczbie 7 jtk/100 cm<sup>3</sup>. Nie wykazano obecności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (Tab. 4).

Tabela 5. Wyniki analizy mikrobiologicznej posiewów popłuczyn z opakowań jednostkowych

Próbka	Drobnoustroje	Liczba [jtk/1cm <sup>3</sup> ]/ Obecność [w 1cm <sup>3</sup> ]
Posiew z butelki nr 1	OLD*	0
	Liczba grzybów	2
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
Posiew z butelki nr 2	OLD*	0
	Liczba grzybów	0
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
Posiew z butelki nr 3	OLD*	0
	Liczba grzybów	0
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>

\*OLD- ogólna liczba drobnoustrojów.

Źródło: Opracowanie własne.

W przypadku jednej butelki wykazano obecność grzybów (pleśni) w liczbie 2 jtk/cm<sup>3</sup> popłuczyn (Tabela 5).

W przypadku kraników nr 15 i 16 odnotowano wzrost pojedynczych kolonii bakterii mezofilnych oraz grzybów. W posiewach popłuczyn z kranika nr 15 i 16 OLD wynosiła odpowiednio 3 oraz 4 jtk/cm<sup>3</sup> popłuczyn. W przypadku kranika nr 15 odnotowano także wzrost 2 jtk /cm<sup>3</sup> grzybów z popłuczyn.

W przypadku badania czystości mikrobiologicznej rur do zlewania piwa z tankofermentorów przed dezynfekcją w próbkach 3 posiewów OLD wynosiła od 9 do 16 jtk/cm<sup>3</sup> popłuczyn, a liczba grzybów wynosiła od 5 do 8 jtk/cm<sup>3</sup>. Nie odnotowano obecności pałeczek grupy *coli* w 1 cm<sup>3</sup> popłuczyn. Po dezynfekcji, jedynie w próbce nr II stwierdzono występowanie grzybów w liczbie 3 jtk/ cm<sup>3</sup>. W próbkach nie stwierdzono obecności pałeczek z grupy *coli* w 1 cm<sup>3</sup>. Na kranikach 15 i 16 oraz w II posiewie z rur spustowych wykazano obecność bakterii i grzybów tuż po procesie dezynfekcji (Tab. 6).



Tabela 6. Wyniki analizy mikrobiologicznej posiewów z kraników do rozlewu piwa oraz z rurarzu do zlewania piwa pobrane przed i po dezynfekcji

Próbka	Drobnoustroje	Liczba [jtk/cm <sup>3</sup> ]/ Obecność [w 1cm <sup>3</sup> ]
Kranik nr 16	OLD*	4
	Liczba grzybów	0
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
Kranik nr 15	OLD*	3
	Liczba grzybów	2
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
Kranik nr 11	OLD*	0
	Liczba grzybów	0
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
I posiew z rurarzu do zlewania piwa przed dezynfekcją	OLD*	13
	Liczba grzybów	8
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
II posiew z rurarzu do zlewania piwa przed dezynfekcją	OLD*	16
	Liczba grzybów	7
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
III posiew z rurarzu do zlewania piwa przed dezynfekcją	OLD*	9
	Liczba grzybów	5
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1cm <sup>3</sup>
I posiew z rurarzu do zlewania piwa po dezynfekcji	OLD*	0
	Liczba grzybów	0
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1 cm <sup>3</sup>
II posiew z rurarzu do zlewania piwa po dezynfekcji	OLD*	0
	Liczba grzybów	3
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1 cm <sup>3</sup>
III posiew z rurarzu do zlewania piwa po dezynfekcji	OLD*	0
	Liczba grzybów	0
	Obecność pałeczek grupy <i>coli</i>	Nieobecne w 1 cm <sup>3</sup>

\*OLD- ogólna liczba drobnoustrojów.

Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

Według badaczy (Kunze 1999; Satora i Tuszyński 2004), piwo nie jest dobrym produktem do rozwoju mikroorganizmów, a nawet uznają piwo za produkt bezpieczny i stabilny mikrobiologicznie. Substancje, które stabilizują piwo to etanol, antybakteryjne substancje zawarte w chmielu, dwutlenek węgla oraz inne (Lyumugabe i in. 2010). Jednocześnie Satora i Tuszyński (2004) podają, że najczęstszymi przyczynami powstawania zanieczyszczeń mikrobiologicznych, są błędnie wykonane konstrukcje lub nieprawidłowy montaż urządzeń w linii technologicznej, zanieczyszczenia wody oraz brak odpowiedniej higieny pracowników, którzy wprowadzają zanieczyszczenia pochodzące ze środowiska zewnętrznego. Często zdarzają się także zanieczyszczenia wtórne, powstające np. po gotowaniu brzezki piwnej z chmielem, dlatego tak istotna jest kontrola zanieczyszczeń mikrobiologicznych w poszczególnych punktach procesu produkcyjnego.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazują, że możliwe jest powstawanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych na każdym etapie produkcji. Wyniki oznaczeń mikrobiologicznych wskazały, że w badanych surowcach występowały drobnoustroje, które mogą wpływać na jakość produktu końcowego. W słodzie jęczmiennym, ogólna liczba drobnoustrojów wynosiła  $1,53 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup> a liczba grzybów –  $1,0 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. Vaughan i in. (2012) oraz Papadopoulou i in. (2012) podają, że jest to najczęściej zanieczyszczenie pochodzące z ziarna jęczmienia, które może utrudniać słodowanie poprzez osłabienie kiełkowania i w dalszych etapach produkcji, może wpływać na jakość piwa. W chmielu granulowanym stwierdzono występowanie zarówno bakterii, jak i grzybów w populacjach rzędu  $10^3$  jtk/g. Granulat przechowywany był w nieodpowiednich warunkach (otwarte opakowanie, wysoka temperatura wynosząca 23°C i wysoka wilgotność), podczas gdy producent zaleca przechowywanie tego surowca w suchym i chłodnym miejscu w temperaturze 0-5°C. Nieprawidłowe przechowywanie tego surowca mogło być przyczyną namnożenia się drobnoustrojów w granulacie chmielu, z którym wprowadza się je do brzezki, zwiększając ryzyko powstawania wad piwa. W kulturze starterowej drożdży piwnych oznaczono ich liczbę na poziomie  $2,3 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. Nie zaobserwowano wzrostu bakterii ani drożdży dzikich i pleśni. Uzyskane wyniki czystości mikrobiologicznej drożdży piwnych są zgodne z wytycznymi normy branżowej BN-75-8-143-05, według której niedopuszczalne jest zanieczyszczenie drożdży starterowych drożdżami dzikimi, a liczba bakterii nie powinna być wyższa od  $10^3$  jtk/cm<sup>3</sup>. Ze względu na brak drożdży dzikich, pleśni oraz bakterii surowiec określono jako czysty mikrobiologicznie. W brzezce z dodatkiem karmelu stwierdzono obecność komórek bakteryjnych w liczbie  $3,4 \times 10^3$  jtk/cm<sup>3</sup> oraz drożdży w liczbie  $9,5 \times 10^4$  jtk/cm<sup>3</sup>. Wojcieszak

(1958) podaje, że liczba drożdży jest dopuszczalna ze względu na początkowy etap fermentacji. Niepokojącym jest fakt występowania dość dużej populacji bakterii, która najprawdopodobniej została wprowadzona do brzezki wraz z dodatkiem karmelu.

Gotowe produkty, zarówno piwo jasne oraz ciemne, poddane procesowi filtracji, zawierały komórki drobnoustrojów mezofilnych w  $1 \text{ cm}^3$ . W piwie jasnym były to 3 jtk/ $100 \text{ cm}^3$  a w piwie ciemnym oznaczono 22 jtk/ $100 \text{ cm}^3$ . Przeliczenie tych danych na objętość 0,5l butelki daje wynik 15 jtk (piwo jasne) i 110 jtk (piwo ciemne) w opakowaniu. Czajkowska i Witkowska-Gwiazdowska (1997) podają, że już 3-4 komórki bakterii mogą doprowadzić do zanieczyszczenia piwa w opakowaniu jednostkowym. Uzyskane w pracy wyniki wskazują na niedostateczną skuteczność procesu utrwalania piwa poprzez filtrację. W przypadku piwa ciemnego, gdzie zanieczyszczenie w butelce wyniosły aż 110 jtk bakterii i 35 jtk grzybów (tu głównie pleśni), należy zwrócić większą uwagę na warunki przeprowadzania filtracji lub też rozważyć zmianę metody utrwalania na pasteryzację, zwłaszcza w odniesieniu do piwa ciemnego.

Ocena czystości mikrobiologicznej butelek wykazała dobrą czystość opakowań, lecz i tu w jednym przypadku na trzy powtórzenia, odnotowano występowanie pojedynczych kolonii grzybów pleśniowych. Zarodniki pleśni mogły dostać się do opakowań z powietrza otwartej hali produkcyjnej lub z zewnątrz, podczas przeładowywania palet z butelkami na wózek widłowy i w dalszym transporcie do hali na linię produkcyjną. Gniewosz i współpracownicy (2011) przeprowadzili ilościową i jakościową ocenę stopnia zanieczyszczenia powietrza w wytwórni wyrobów alkoholowych. Autorzy wykazali, że najwyższy stopień zanieczyszczenia powietrza pleśniami odnotowano w hali rozlewu produktu do butelek, i że wynika to ze zwiększonej liczby oraz ruchu pracowników obecnych w hali rozlewu oraz panującej wysokiej wilgotności (Gniewosz i in. 2011). Również czystość urządzeń ma ogromne znaczenie w zapewnianiu trwałości produktu. Pomimo regularnie prowadzonego procesu mycia i dezynfekcji wykazano, że wybrane do badań miejsca linii technologicznej (kraniki nalewaków i zawory spustowe), okazjonalnie wykazują obecność bakterii i grzybów w niewielkiej liczbie. Żyrek (2008) wykazała, że ryzyko powstawania zanieczyszczeń mikrobiologicznych zależy głównie od układu linii technologicznej, a powstawanie wad mikrobiologicznych piwa od błędów browaru, związanych z usterkami technicznymi, uchybień w procedurach mycia i dezynfekcji, jakości mediów tj. woda,  $\text{CO}_2$ , powietrze, ogólnego stanu higieny i braku procedur reagowania na sygnały o przekroczeniu standardów.

## Podsumowanie i wnioski

Z uzyskanych wyników badań i danych literaturowych wywnioskowano, iż kontrola jakości surowców, mediów, jak i gotowych produktów, a także kontrola głównego procesu oraz warunków higienicznych, powinna być nieustającym priorytetem browarników, ponieważ nawet drobne zaniechania, mogą stać się przyczyną zagrożenia zdrowia konsumentów oraz wielkich strat finansowych. To właśnie unikalne cechy smakowe i jakość są głównymi powodami, dla których konsumenci wybierają piwa regionalne zamiast produkowanych przez wielkie koncerny (Podeszwa 2015), dlatego tak ważne jest utrzymanie standardów w produkcji piw, by zadowolony klient ponownie kupił i polecił lokalną markę. Na podstawie uzyskanych wyników badań wywnioskowano, iż jakość mikrobiologiczna surowców używanych w browarze, znacznie się różniła. Procedury związane z przechowywaniem surowców, myciem i dezynfekcją oraz procedury dostarczania opakowań jednostkowych na linię technologiczną powinny zostać skontrolowane i zmienione tak, by poprawić czystość mikrobiologiczną i związaną z tym jakość produktu końcowego.

## Literatura

- Baca E. 1997. *Określenie punktów kontroli zagrożeń mikrobiologicznych dla linii technologicznej w browarze*. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*. 41(3): 12-13.
- Baryłko-Pikielna N. 1995. *Konsument a jakość żywności*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 4(5): 3-10.
- Czajkowska D. 1996. *Szkodliwe mikroorganizmy w przemyśle piwowarskim*. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*. (40) 10: 12-13.
- Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A. 1997. *Wykrywanie mikroorganizmów szkodliwych w procesie produkcji piwa*. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*. 41(4): 10- 13.
- Dz. U. z 2015 r. poz. 139 i 1893 *Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi*.
- Gniewosz M., Stobnicka A., Pisarczyk T. 2011. *Ocena ilościowa i jakościowa stopnia zanieczyszczenia powietrza w wytwórni wyrobów alkoholowych*. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*. 55: 11-12.
- Kunze W. 1999. *Technologia piwa i słodu* (wyd. 8). Piwochmiel/VLB, Berlin.
- Lyumugabe F., Kamaliza G., Bajyana E., Thonart PH. 2010. *Microbiological and physico-chemical characteristic of Rwandese traditional beer "Ikigage"*. *African Journal of Biotechnology*. 9(27): 4241-4246.
- Norma Branżowa BN-75-8-143-05. *Drożdże piwne*.

- Papadopoulou A., Wheaton L., Muller R. 2012. *The Control of Selected Micro-Organisms During the Malting Process*. *Journal of the Institute of Brewing*. 106(3): 179-178.
- Pazera T., Rzemieniuk T. 1998. *Browarnictwo*. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne. Warszawa: 10.
- PN-A-79093-1:2000. *Piwo. Metody badań. Ocena sensoryczna*. Polski Komitet Normalizacyjny (Uchwała nr 20/2000-o).
- Podeszwa T. 2015. *Browarnictwo rzemieślnicze (craft-brewing) - oddolna aktywność mikrowytwórców stymulantem rozwoju rynku i samokształcenia*. *Acta Innovations* 15: 1-6.
- Satora P., Tuszyński T. 2004. *Zakażenia mikrobiologiczne piwa. Laboratorium- Przegląd Ogólnopolski*. 4: 13-18.
- Tuszyński T., Makarewicz M. 1998. *Drożdże dzikie w przemyśle piwowarskim –zagrożenia i wybrane metody wykrywania*. *Żywność – Nauka, Technologia, Jakość*. 3(16): 43-57.
- Vaughan A., O’Sullivan T., van Sinderen D. 2005. *Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer- A Review*. *Journal of the Institute of Brewing*. 111(4): 355–371.
- Wojcieszak P. 1958. *Poradnik mikrobiologa w przemyśle fermentacyjnym i owocowo-warzywnym*. Warszawa, WPLiS.
- Żyrek E. 2008. *Zagrożenia mikrobiologiczne przy „aseptycznym” rozlewie piwa*. *Agro Przemysł*. 6: 23-28.

## Wpływ limitacji azotu na syntezę polihydroksykwasów

### The limited effect of nitrogen on synthesis of polyhydroxyalkanoates

Karolina Szacherska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Naukowe Koło Mikrobiologów  
Opiekun: dr hab. Dorota Górniak

#### Abstract

Industrial waste produced from synthetic materials poses a serious threat to the environment. Therefore, researchers have recently become interested in polymers of microbiological origin. Among them, the most attention is focused on polyhydroxyalkanoates (PHA) characterized by biodegradability, thermoplasticity and biocompatibility. Thanks to this property, biopolymers can be used in many fields of industry. The synthesis of polyhydroxyalkanoates on an industrial scale is still difficult due to the high cost of obtaining the final product. Accordingly, research is being conducted to optimize the technological processes of polyhydroxyalkanoates synthesis. At the same time, the aim is to improve the production of PHA among others by searching for new microorganisms that effectively accumulate biopolymers and optimize the technological processes that will provide the efficient polyhydroxyalkanoates synthesis.

The aim of this thesis is to assess the ability and effectiveness of polyhydroxyalkanoates synthesis by the KT2440 strain belonging to the *Pseudomonas putida* under nitrogen-limiting condition. The study allowed to estimate the effect of nitrogen deficiency and the use of two metabolically different sources of carbon on bacterial cell growth and the efficiency of PHA accumulation by microorganisms.

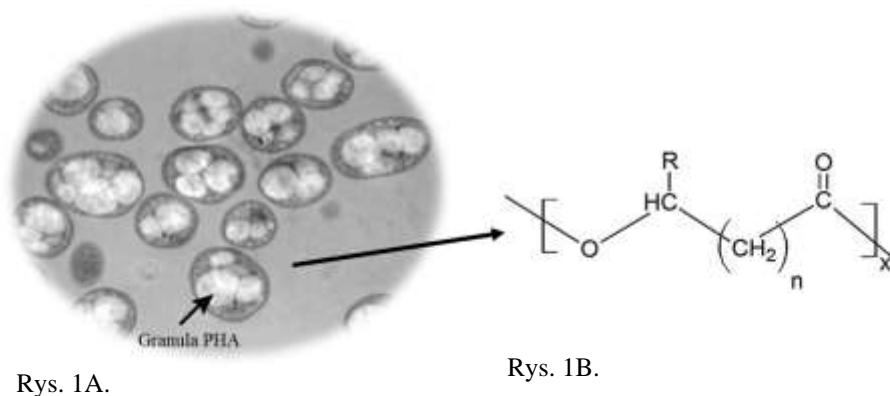
**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, biopolymers, PHA, bioplastics, *Pseudomonas putida* KT2440

#### Wstęp

Rozwój gospodarczy związany jest z powstawaniem odpadów komunalnych oraz przemysłowych, stanowiących zagrożenie dla środowiska. Od lat 40. notuje się gwałtowny wzrost produkcji i zużycia tworzyw sztucznych poprzez masowe ich wykorzystanie w wielu sektorach gospodarki (Poirier i in. 1995). W konsekwencji, kumulacja odpadów może przyczynić się do zagrożenia środowiska naturalnego i zdrowia ludzkiego (Luengo i in. 2003). Wśród naukowców wzrosło zainteresowanie polimerami naturalnymi jako substytutu tworzyw sztucznych. Biopolimery wykazują właściwości fizyczne, chemiczne, mechaniczne i termiczne podobne do tworzyw sztucznych. Różnicą jest to, że ulegają one całkowitej biodegradacji do związków naturalnie występujących w środowisku naturalnym (Ojumu i in. 2004).

Na przestrzeni ostatnich czterech dekad, wykonano wiele badań dotyczących mikrobiologicznej produkcji polihydroksykwasów (poliestrów hydroksykwasów alkanowych, PHA). Są to nierozpuszczalne w wodzie polimery, zbudowane z reszt kwasów hydroksykarboksylowych (Rys. 1B). Są one kumulowane w cytoplazmie mikroorganizmów w formie granul o szerokości 300-500 nm w procesie fermentacji cukrów lub lipidów (Rys. 1A).

Rysunek 1. Kumulacja polihydroksykwasów w komórkach *Pseudomonas putida*



Rys. 1A.

Rys. 1B.

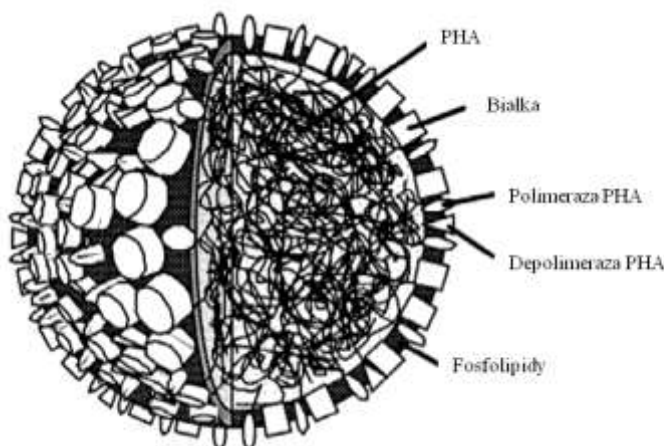
Źródło: Ward i in. 2005.

Granula otoczona jest pojedynczą błoną, w skład której wchodzi fosfolipidy, białka strukturalne i regulatorowe a także enzymy powiązane z syntezą i rozkładem polihydroksykwasów (Rys. 2) (Paul i Liu 2012). Substancje te są materiałem zapasowym stanowiącym źródło węgla i energii w warunkach ograniczonej ilości ważnych składników pokarmowych, takich jak azot czy fosfor. PHA charakteryzują się termoplastycznością, wysokim stopniem polimeryzacji, nietoksycznością oraz biokompatybilnością (Steinbüchel 2001). Cechuje je zdolność do biodegradacji w środowisku naturalnym oraz właściwości przeciwutleniające i piezoelektryczne. Z danych literaturowych wynika, że ze względu na powyższe właściwości, mogą znaleźć zastosowanie m.in.: w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, służbach komunalnych, rolnictwie i radioelektronice. W dalszym ciągu prowadzone są badania nad wykorzystaniem polihydroksykwasów w medycynie i inżynierii tkankowej m.in. do produkcji implantów, nici chirurgicznych, opatrunków i kompresów. PHA zostały również przetestowane w ortopedii do odtwarzania uszkodzonych chrząstek i tkanki kostnej a także jako śruby łączące kości (Verlinden i in. 2007).

Rozwój wiedzy na temat polihydroksykwasów jest ważny, ponieważ są to unikalne związki wykazujące podatność na biodegradację oraz mogą być syntetyzowane z odnawialnych

surowców, zasobów kopalnianych, produktów ubocznych czy kwasów organicznych (Din i in. 2006). W celu zmniejszenia nakładów finansowych podczas produkcji PHA, wykorzystywane są tanie surowce odpadowe np. oleje roślinne, melasa czy ścieki.

Rysunek 2. Schemat budowy granuli PHA



Źródło: Zinn i in.2001.

Bakterie wytwarzają szereg polihydroksykwasów różniących się budową chemiczną. Składają się od 100 do 30 000 monomerów, które łączą się ze sobą wiązaniami estrowymi. Polihydroksykwasy klasyfikuje się ze względu na liczbę atomów węgla występujących w cząsteczce biopolimeru. Wyróżnia się trzy rodzaje PHA: krótkołańcuchowe (PHA<sub>SCL</sub>), średniołańcuchowe (PHA<sub>MCL</sub>) i długołańcuchowe (PHA<sub>LCL</sub>). Pierwszy rodzaj polihydroksykwasów zawiera od 3 do 5 atomów węgla w cząsteczce np.: kwas poli-3-hydroksywalerianowy oraz kwas poli-3-hydroksymasłowy. Drobnoustrojem produkującym ten rodzaj PHA, jest m.in. *Cupriavidus necator*. Mogą one znaleźć zastosowanie w przemyśle przy produkcji opakowań codziennego użytku. Drugi rodzaj polihydroksykwasów zawiera od 6 do 14 atomów węgla w cząsteczce np.: kwas poli-3-hydroksyoktanowy oraz poli-3-hydroksydekanowy. PHA średniołańcuchowe są syntezowane głównie przez bakterie rodzaju *Pseudomonas*. Dzięki swoim właściwościom mogą znaleźć szerokie zastosowanie w produkcji farb i pigmentów oraz w medycynie i farmacji. Trzeci rodzaj PHA zawiera więcej niż 14 atomów węgla np.: kwas poli-3-hydroksyheksadekanowy (Singh i Malick 2008).

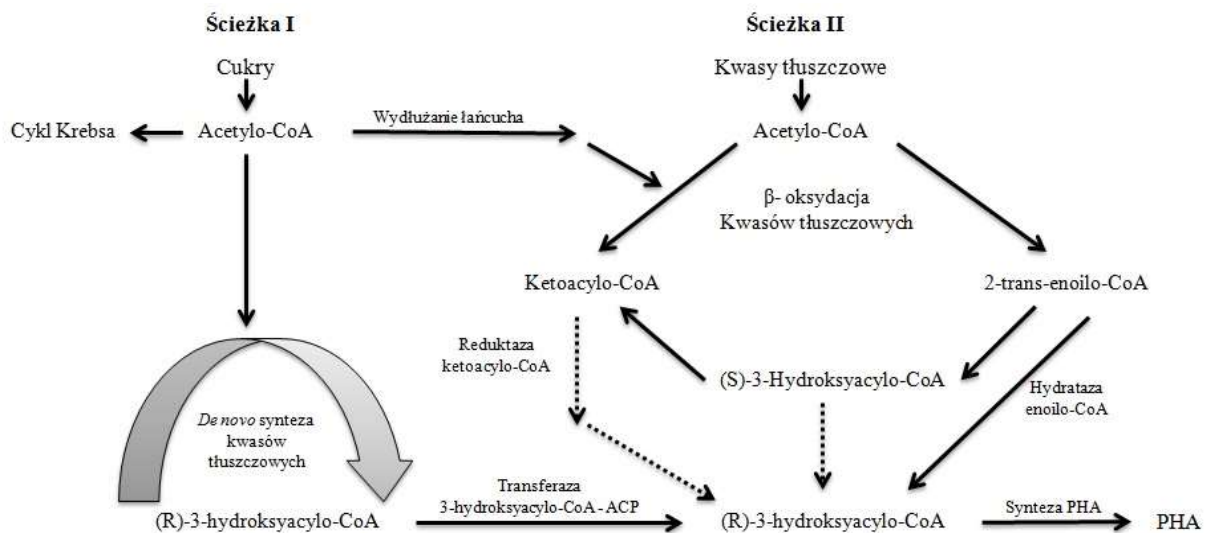
Pierwszy szlak biosyntezy PHA odkryto u *Cupriavidus necator*. Kluczową rolę w tym szlaku odgrywają trzy enzymy:  $\beta$ -ketotiolazy (PhaA), reduktazy acetoacetylo-CoA uzależnione od NADPH (PhaB) oraz polimerazy PHA (PhaC) (Chen 2010). Pierwszy etap biosyntezy polihydroksykwasów następuje w chwili połączenia się dwóch cząsteczek acetylo-CoA przy



udziale enzymu PhaA, wskutek czego tworzy się acetoacetylo-CoA. Następnie acetoacetylo-CoA, przy udziale enzymu PhaB, przekształca się do (R)-3-hydroksybutylo-CoA, który z kolei ulega polimeryzacji do kwasu poli-3-hydroksymasłowego (Chen 2010).

Drugi szlak syntezy PHA odkryto u *Rhodopseudomonas rubrum*, który wykorzystuje proces  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych. Pierwszy etap procesu polega na redukcji acetoacetylo-CoA do (L)-(+)-3-hydroksybutylo-CoA przy udziale enzymu PhaB. W następnym etapie (L)-(+)-3-hydroksybutylo-CoA redukowany jest do (D)-(+)-3-hydroksybutylo-CoA przez (R)-enoilo-CoA. Z kolei (D)-(+)-3-hydroksybutylo-CoA ulega polimeryzacji do kwasu poli-3-hydroksymasłowego przy udziale PhaC (Kim i in. 2007). Szlaki biosyntezy polihydroksykwasów przedstawiono na rysunku 3.

Rysunek 3. Szlaki biosyntezy PHA



Źródło: KIM i in. 2007.

## Cel i metoda

Celem niniejszej pracy było oszacowanie zdolności syntezy polihydroksykwasów przez *Pseudomonas putida* KT2440 przy wykorzystaniu dwóch źródeł węgla oraz oszacowanie wpływu limitacji azotu na efektywność kumulacji PHA oraz wzrost drobnoustrojów.

*Pseudomonas putida* KT2440, zawieszony w glicerolu przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Przed rozpoczęciem hodowli właściwej mikroorganizmy namnożono w płynnej pożywce Luria Bertani (LB), zawierającej w swoim składzie w ( $\text{g}/\text{dm}^3$ ): 10 tryptonu, 5 ekstraktu drożdżowego i 10 NaCl. Hodowlę prowadzono przez 24 h w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem z szybkością 200 obr./min.

Eksperyment prowadzono z wykorzystaniem dwóch źródeł węgla: glukonianu sodu i kwasu oleinowego. Przy użyciu wyżej wymienionych substratów przeprowadzono 48 godziną hodowlę z limitacją azotu. Doświadczenie prowadzono w 3 powtórzeniach. Hodowle w kierunku syntezy polihydroksykwasów prowadzono w 250 cm<sup>3</sup> kolbach Erlenmeyera. Do wykonania pożywki z limitacją azotu użyto następujących składników (w g/dm<sup>3</sup>): 0,7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, od 1 do 4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oraz dodano 3,5 cm<sup>3</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O i 250 µl mikroelementów. Do sporządzonego medium hodowlanego dodano 10 g/dm<sup>3</sup> glukonianu sodu lub 10 cm<sup>3</sup>/dm<sup>3</sup> kwasu oleinowego. Pożywki, a także ich składniki przed dodaniem inokulum, sterylizowano przez 30 minut w temperaturze 120°C.

Hodowle prowadzono przez 48 h w temperaturze 30°C w wytrząsarce obrotowej (IST-4075) przy 200 obr./min. Podczas trwania hodowli w odpowiednich odstępach czasowych, badano gęstość optyczną (OD/ cm<sup>3</sup>) za pomocą spektrofotometru przy długości fali λ=600 nm w celu określenia specyficznej szybkości wzrostu komórek zgodnie z zależnością:

$$\mu = (1/X) \cdot (dX/dt)$$

gdzie:

X – stężenie biomasy [g/dm<sup>3</sup>]

t – czas [h]

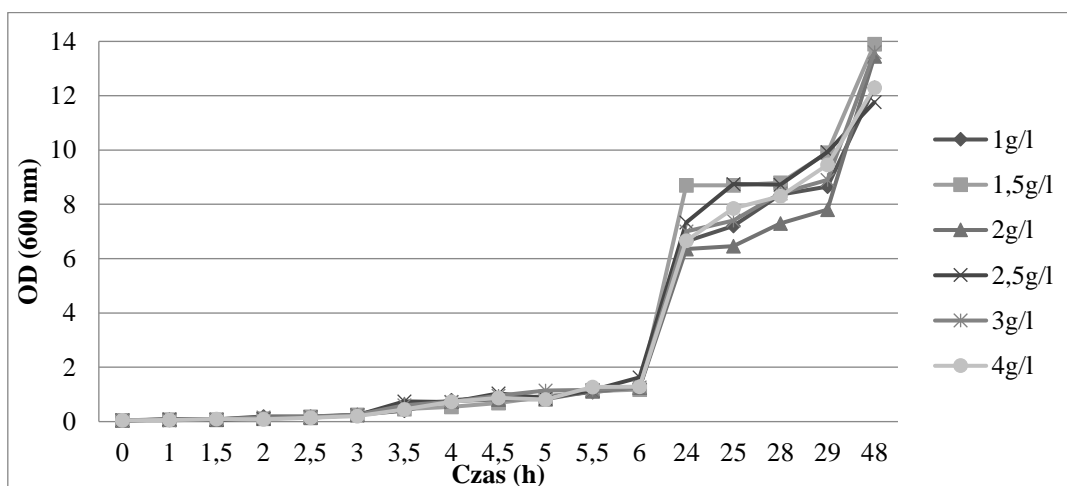
Po zakończeniu hodowli, zawartość kolb przeniesiono do uprzednio zważonych probówek typu falcon i odwirowano za pomocą wirówki (MPW-352) przy 9000 obr/min. Supernatant ostrożnie dekantowano a biomasę przemyto heksanem. Komórki bakteryjne zamrożono w temperaturze -80°C i przeprowadzono proces liofilizacji. Uzyskaną biomasę zważono na wadze analitycznej. W celu przeprowadzenia ekstrakcji PHA, pobrano zliofilizowane komórki, zawieszono w chloroformie i wytrząsano w temperaturze 50°C przy 120 obr/min. Następnie biomasę przefiltrowano przez bibułę Whatmana No.1 i pozostawiono w celu odparowania. Biopolimer wytrącano przy użyciu zimnego 70% metanolu. Uzyskane PHA pozostawiono do wyschnięcia na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Oczyszczony biopolimer zważono przy użyciu wagi analitycznej (RADWAG AS 110.R2).

## Wyniki badań

Podczas trwania hodowli, wzrost komórek badanego szczepu kontrolowano za pomocą gęstości optycznej (OD). Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 4 i Rys. 5, odpowiednio dla hodowli zasilanych glukonianem sodu i kwasem oleinowym. Otrzymane wyniki wykazały, że komórki należące do rodzaju *Pseudomonas*, były zdolne do wzrostu we wszystkich wariantach hodowlanych. W trakcie trwania pierwszej doby eksperymentu odnotowano wzrost gęstości

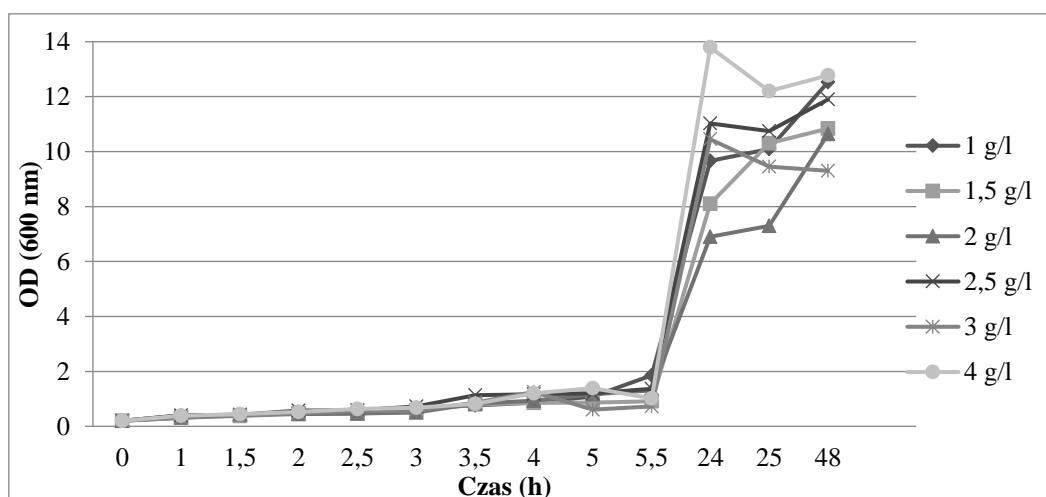
optycznej. Najwyższy poziom OD odnotowano w 24 godzinie hodowli zasilanej kwasem oleinowym, przy stężeniu źródła azotu wynoszącym  $4 \text{ g/dm}^3$ . Natomiast stosując 4-krotnie niższe stężenie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , uzyskano najniższą wartość OD w hodowli zasilanej glukonianem sodu. Z kolei w drugiej dobie eksperymentu najwyższe wartości gęstości optycznej odnotowano w hodowli suplementowanej glukonianem sodu oraz źródłem azotu w stężeniu  $1,5 \text{ g/dm}^3$ , a najniższe w hodowli zasilanej kwasem oleinowym, przy stężeniu źródła azotu wynoszącym  $3 \text{ g/dm}^3$ .

Rysunek 4. Wartości gęstości optycznej dla hodowli zasilanych glukonianem sodu (źródło azotu -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 5. Wartości gęstości optycznej dla hodowli zasilanych kwasem oleinowym (źródło azotu -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

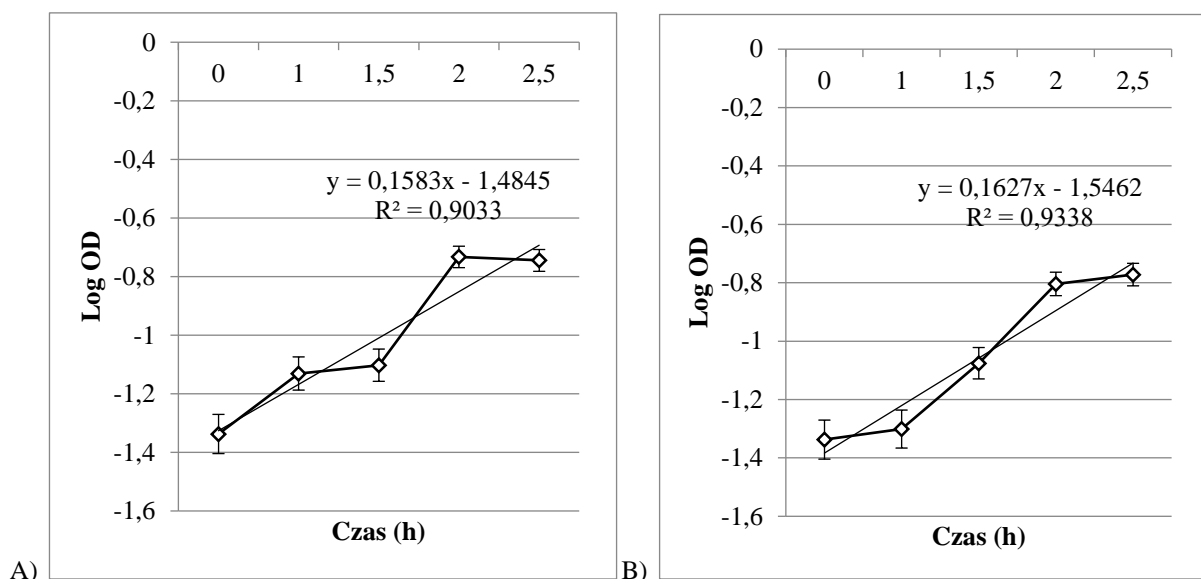


Źródło: Opracowanie własne.

Aby oszacować maksymalną specyficzną szybkość wzrostu ( $\mu_{\max}$ ), uzyskane w toku badań wartości gęstości optycznej, poddano logarytmowaniu (Rys. 6 i 7). Na podstawie

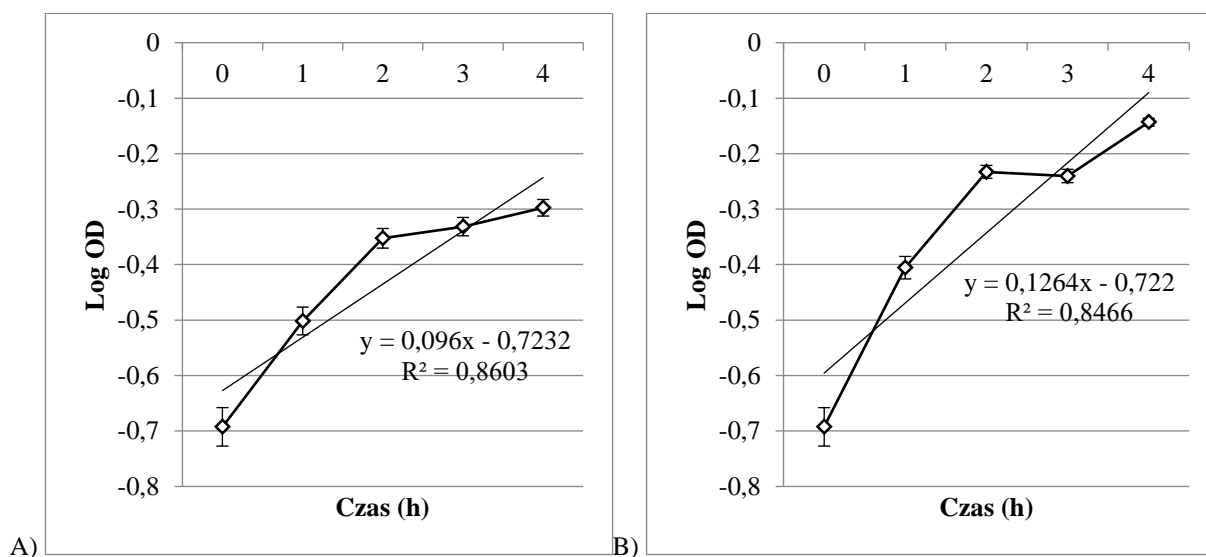
uzyskanych wyników stwierdzono, że tempo wzrostu komórek bakteryjnych jest zależne od stężenia czynnika limitującego wzrost oraz od rodzaju użytego substratu. Najwyższą wartość  $\mu_{\max}$  ( $0,162 \text{ h}^{-1}$ ) wykazano przy stężeniu źródła azotu wynoszącym  $3 \text{ g/dm}^3$  w hodowli zasilanej glukonianem sodu. Wysoką wartość  $\mu_{\max}$  ( $0,158 \text{ h}^{-1}$ ) uzyskano również w hodowli zasilanej glukonianem sodu, przy najniższym zastosowanym stężeniu źródła azotu wynoszącym  $1 \text{ g/dm}^3$ . Najniższą wartość maksymalnej specyficznej szybkości wzrostu ( $0,096 \text{ h}^{-1}$ ) wykazano przy stężeniu źródła azotu wynoszącym  $2 \text{ g/dm}^3$  w hodowli zasilanej kwasem oleinowym.

Rysunek 6. Maksymalna specyficzna szybkość wzrostu dla hodowli zasilanej glukonianem sodu (źródło azotu -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : A)  $1 \text{ g/dm}^3$ , B)  $3 \text{ g/dm}^3$ )

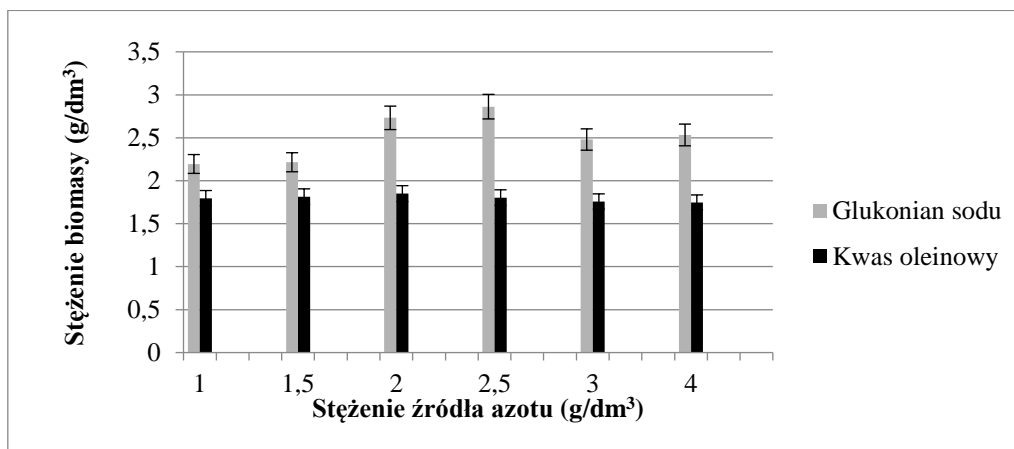


Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 7. Maksymalna specyficzna szybkość wzrostu dla hodowli zasilanej kwasem oleinowym (źródło azotu -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : A)  $2 \text{ g/dm}^3$ , B)  $2,5 \text{ g/dm}^3$ )

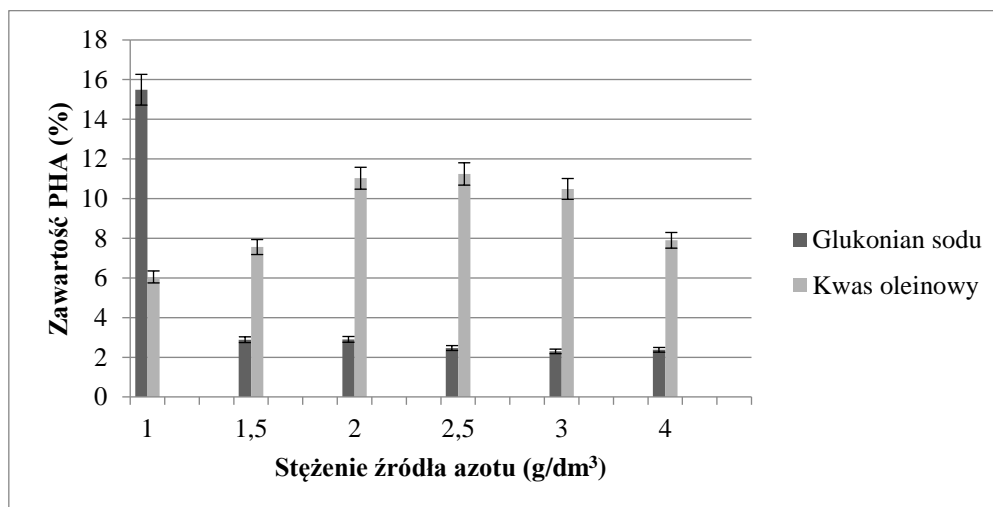


Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 8. Stężenie biomasy w hodowli zasilanej glukonianem sodu i kwasem oleinowym w zależności od stężenia  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

Źródło: Opracowanie własne.

Przeprowadzone doświadczenie wykazało, że stężenie biomasy w hodowli zależało od rodzaju użytego substratu oraz stężenia źródła azotu. Najwyższy przyrost biomasy ( $2,862 \text{ g/dm}^3$ ) odnotowano w hodowli zasilanej glukonianem sodu, przy stężeniu źródła azotu wynoszącym  $2,5 \text{ g/dm}^3$ , natomiast najniższą wartość danego parametru ( $1,747 \text{ g/dm}^3$ ) zaobserwowano przy najwyższym zastosowanym stężeniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , wynoszącym  $4 \text{ g/dm}^3$  w hodowli suplementowanej kwasem oleinowym (Rys. 8). Wykazano, iż glukonian sodu był wykorzystywany przez *Pseudomonas putida* na procesy wzrostu komórek niezależnie od stężenia źródła azotu.

Rysunek 9. Procentowa zawartość PHA w hodowli zasilanej glukonianem sodu i kwasem oleinowym w zależności od stężenia  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

Źródło: Opracowanie własne.

Najwyższy procentowy udział polihydroksykwasów w suchej masie komórek bakteryjnych (15,49 % s.m.) stwierdzono w hodowli zasilanej glukonianem sodu przy najniższym zastosowanym stężeniu źródła azotu, wynoszącym 1 g/dm<sup>3</sup>. W przypadku wyższych stężeń źródła azotu, w hodowlach suplementowanych tym samym substratem, uzyskano niższe wartości procentowego udziału PHA (Rys. 9). Z uzyskanych danych wynika również, że w hodowli zasilanej glukonianem sodu, przy stężeniu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wynoszącym 1 g/dm<sup>3</sup>, uzyskano więcej PHA, niż w hodowli zasilanej kwasem oleinowym przy tym samym stężeniu źródła azotu.

## Dyskusja

Polimery syntetyczne, dzięki takim właściwościom jak: wytrzymałość, odporność na rozkład biologiczny, trwałość oraz lekkość zyskały dużą popularność w wielu gałęziach przemysłu. Znalazły zastosowanie m.in. w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, rolnictwie oraz ochronie środowiska (Klimiuk 2008). Jednakże, masowe wykorzystywanie tworzyw petrochemicznych, stanowi istotny problem środowiskowy związany z ich utylizacją. Ze względu na niekorzystny wpływ polimerów sztucznych na środowisko naturalne, słusznym podejściem jest poszukiwanie tworzyw biodegradowalnych, posiadających pożądane właściwości fizyczne oraz chemiczne. Rozwiązaniem tego problemu mogą stać się biodegradowalne polihydroksykwasy, wytwarzane przez mikroorganizmy. Obecnie koszt mikrobiologicznej produkcji polihydroksykwasów jest wyższy, niż synteza polimerów z wykorzystaniem ropy naftowej. W celu obniżenia kosztów biosyntezy PHA, poszukuje się mikroorganizmów zdolnych do efektywnej kumulacji biopolimeru oraz tanich źródeł węgla (Chee i in. 2010).

W niniejszej pracy sprawdzono zdolność biosyntezy polihydroksykwasów przez *Pseudomonas putida* KT2440 z wykorzystaniem dwóch źródeł węgla, przy limitującym stężeniu azotu. Potwierdzono, że wzrost biomasy oraz kumulacja PHA w warunkach ograniczonego stężenia azotu, zależały od rodzaju stosowanego źródła węgla w hodowli.

Badania przeprowadzone w powyższej pracy potwierdzają, iż szczep KT2440 należący do gatunku *Pseudomonas putida* jest zdolny do biosyntezy oraz kumulacji PHA w hodowlach z zastosowaniem dwóch źródeł węgla przy limitującym stężeniu azotu. Na podstawie wyników można wnioskować, że stosowanie glukonianu sodu oraz kwasu oleinowego, jako jedynych źródeł węgla podczas stresu azotowego, wpływa pozytywnie na wzrost oraz kumulację PHA przez badany szczep.

W badaniach własnych, najwyższe stężenie polihydroksykwasów, wynoszące 15,49% s.m. przy stężeniu biomasy 2,195 g/dm<sup>3</sup>, otrzymano przy najniższym stężeniu źródła azotu wynoszącym 1 g/dm<sup>3</sup> w hodowli zasilanej glukonianem sodu. Zbliżone wyniki otrzymali Możejko i in. (2011), wykorzystując poprodukcyjny olej rzepakowy w suchej biomacie komórek *Pseudomonas* sp. G101. Autorzy uzyskali 20,20 % s.m. PHA przy stężeniu biomasy komórek równym 4,8 g/dm<sup>3</sup>. Niższą wartość polihydroksykwasów otrzymali Ciesielski i in. (2010) wykorzystując glukonian sodu w hodowli *Pseudomonas* sp. G101 otrzymując 2,30 % s.m. PHA przy stężeniu komórek bakteryjnych 2,43 g/dm<sup>3</sup>.

Kim i in. (1997) badali zdolność kumulacji PHA<sub>MCL</sub> w hodowli *Pseudomonas putida*, wykorzystując jako źródło węgla, sól sodową kwasu oktanowego w warunkach ograniczonego stężenia azotu. Autorzy analizowali pierwiastki limitujące przyrost komórek tj. azot, fosfor, magnez, siarkę oraz potas. Doświadczenie wykazało, iż najwyższe stężenie PHA w suchej biomacie komórek, wynoszące 79,8 %, uzyskano w hodowli z niedoborem azotu. Badania prowadzone przez Kim i in. (1997) z zastosowaniem szczepu rodzaju *Pseudomonas* dowodzą, iż bakterie te efektywnie kumulują PHA<sub>MCL</sub> (65,5 % s.m.) w hodowli zasilanej kwasem oleinowym. W badaniach własnych z wykorzystaniem kwasu oleinowego w warunkach limitujących azot, badany szczep także wykazywał efektywną kumulację polihydroksykwasów w suchej masie komórek.

Wykazano, iż *Pseudomonas putida* kumuluje PHA w trakcie trwania wzrostu wykładniczego, kiedy pożywka zawiera niezbędne składniki odżywcze potrzebne do biosyntezy polihydroksykwasów. Jest to jedna z cech niezwykle pożądaných w przypadku mikroorganizmów wykorzystywanych w produkcji biopolimerów w skali przemysłowej. Podobne wyniki zdolności gromadzenia biopolimeru w fazie wzrostu logarytmicznego otrzymał Vallapil i in. (2007) podczas badań przeprowadzonych z wykorzystaniem glukozy jako źródła węgla przez *Pseudomonas* sp. GL13.

Dane literaturowe wskazują, że synteza PHA przez drobnoustroje zachodzi podczas niedoboru pierwiastków, niezbędnych do wzrostu mikroorganizmów tj. azot, fosfor, magnez lub siarka. Wykorzystany w niniejszym badaniu głód azotowy oraz zastosowane źródła węgla w pożywce, miały na celu zdefiniowanie ich wpływu na efektywność kumulacji PHA przez badany szczep. Wzrost syntezy biopolimerów u *Pseudomonas putida* KT2440, przy limitującym stężeniu azotu w pożywce, potwierdzili Follonier i in. (2011). Podobne wyniki uzyskano w niniejszej pracy. Z badań przeprowadzonych przez Lee i in. (2000) wynika, że *Pseudomonas putida* w warunkach limitujących fosfor, wykazuje 3-krotnie wyższe stężenie PHA

w porównaniu z hodowlą, w której nie został zastosowany czynnik limitujący. Według własnych wyników można wnioskować, iż limitacja azotu, efektywnie stymulowała biosyntezę polihydroksykwasów.

### Podsumowanie

Przeprowadzone badania potwierdzają, iż *Pseudomonas putida* KT2440 efektywnie kumuluje polihydroksykwasy w hodowli, w warunkach głodu azotowego, przy wykorzystaniu glukonianu sodu lub kwasu oleinowego jako źródła węgla. Limitacja azotu korzystnie wpłynęła na syntezę i efektywną kumulację PHA. Typ zastosowanego substratu miał wpływ na ilość suchej masy komórek *Pseudomonas putida* KT2440, maksymalną specyficzną szybkość wzrostu, a także procentowy udział polihydroksykwasów.

### Literatura

- Chee J.Y., Yoga S.S., Lau N.S., Ling S.C., Abed R.M., Sudesh K. 2010. *Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into 42 Bioplastics*. In: Mendez-Vilas A. (Ed.). *Curr. Res. Tech. Educ. Top. Appl. Micro. Micro. Biotech.* 2: 1395-1404.
- Chen G.Q. 2010. *Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates*. *Microbiol. Monogr.* 14: 17-37.
- Ciesielski S., Możejko J., Przybyłek G. 2010. *The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of Pseudomonas sp.* *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 511-520.
- Din M.F., Ujang Z., Loosdrecht M.C.M., Ahmad A., Sairan M.F., 2006. *Optimization of nitrogen and phosphorus limitation for better biodegradable plastic production and organic removal using single fed-batch mixed cultures and renewable resources*. *Water Sci. Technol.* 53: 15-20.
- Follonier S., Panke S., Zinn M. 2011. *A reduction in growth rate of Pseudomonas putida KT2442 counteracts productivity advances in medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from gluconate*. *Microb. Cell. Fact.* 10: 25-36.
- Kim Do Y., Kim H., Chung M., Rhee Y. 2007. *Biosynthesis, Modification and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates*. *J. Microbiol.* 45(2): 87-97.
- Kim G.J., Lee I.Y., Yoon S.C., Shin Y.C., Park Y.H. 1997. *Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) in a two-step fed-batch cultivation of Pseudomonas putida by combined use of glucose and octanoate*. *Enzyme Microb. Tech.* 20: 500-505.
- Klimiuk E. (red.). 2008. *Polihydroksykwasy syntezowane przez mikroorganizmy: właściwości, metody wytwarzania i zastosowanie*. Zakład Poligraficzny UWM, Olsztyn.
- Le Meur S., Zinn M., Egli T., Thöny-Meyer L., Ren Q. 2012. *Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered Pseudomonas putida KT2440*. *BMC. Biotechnol.* 12: 53.



- Lee S.Y., Wong H.H., Choi J., Lee S.H., Lee S.C., Han C.S. 2000. *Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of Pseudomonas putida under phosphorus limitation*. Biotechnol. Bioeng. 68: 466-470.
- Luengo J.M., Garcia B., Sandoval A., Naharro G., Olivera E. 2003. *Bioplastics from microorganisms*. Curr. Opin. Microbiol. 6(3): 251-260.
- Możejko J., Przybyłek G., Ciesielski S. 2011. *Waste rapeseed oil as a substrate for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 113: 1550-1557.
- Możejko-Ciesielska J., Kiewisz R., 2016. *Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?* Microbiol. Res. 192: 271-282.
- Ojumu T., Yu J., Solomon B.O., 2004. *Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer*. Afri. J. Biotechnol. 3: 18-24.
- Paul E., Liu Y. 2012. *Biological Sludge Minimization and Biomaterials/Bioenergy Recovery Technologies*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Poirier Y., Nawrath C., Somerville C., 1995. *Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant*. Biotechnol. 13: 142-150.
- Singh A., Malick N., 2008. *Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge isolated Pseudomonas aeruginosa MTCC 7925*. Lett. Appl. Microbiol. 46(3): 350-357.
- Steinbüchel A. 2001. *Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example*. Macromol. Biosci. 1(1): 1-24.
- Valappil S.P., Peiris D., Langley G.J., Herniman J.M., Boccaccini A.R., Bucke C., Roy I. 2007. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized Bacillus spp*. J. Biotechnol. 127: 475-487.
- Verlinden R.A.J., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Radecka I. 2007. *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates*. J. Appl. Microbiol. 102(6): 1364-5072.
- Ward P., Guy de Roo, O'Connor K. 2005. *Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by Pseudomonas putida CA-3*. Appl. Environ. Microbiol. 71(4): 2046-2052.
- Zinn M., Witholt B., Egli T. 2001. *Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate*. Adv. Drug. Deliv. Rev. 53: 5-21.

### Podziękowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2014/15/D/NZ9/04255 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (Polska) pod kierunkiem dr inż. Justyny Możejko-Ciesielskiej.

## Wpływ warunków limitujących na syntezę polihydroksykwasów przez *Pseudomonas* sp. GL01

The impact of limiting conditions on synthesis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. GL01

Paulina Józefa Marciniak

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Koło Naukowe Mikrobiologów  
Opiekun: dr hab. Dorota Górniak

### Abstract

Materials based on synthetic polymers, after use, are deposited in landfills becoming a threat to the natural environment and human health. The good solution is to use a biodegradable substitute - polyhydroxyalkanoates (PHAs). PHA are accumulated in the bacterial cells under unbalanced growth conditions.

The aim of this study was to evaluate the using of pure and waste glycerol from biodiesel production to biomass concentration and polyhydroxyalkanoates synthesis by *Pseudomonas* sp. GL01. Also, the impact of nitrogen and phosphorus limitation on the PHAs production was analyzed.

The results showed that *Pseudomonas* sp. GL01 is not able to growth in the culture with phosphorus limitation and pure glycerol. The highest biomass concentration was observed under nitrogen limitation and the addition of waste glycerol. The maximal PHA concentration was determined in non-limiting culture supplemented with waste glycerol.

In conclusion, *Pseudomonas* sp. GL01 was able to utilize both pure and waste glycerol for the growth. However, the phosphorus limitation inhibits cell growth and PHAs synthesis while nitrogen limitation was a stimulating factor.

**Keywords:** polyhydroxyalkanoates, biopolymers, *Pseudomonas*, biodegradable

### Wstęp

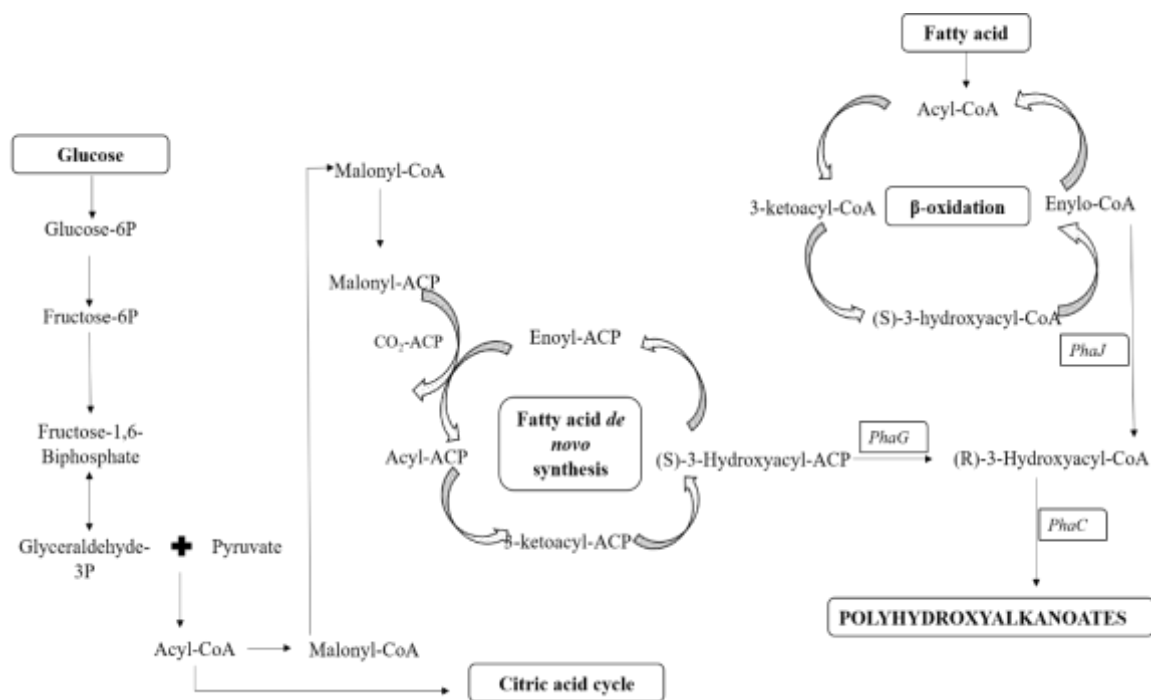
Polimery syntetyczne takie jak: polichlorek winylu (PVC), polistyren (PS), poliolefiny (HDPE, LDPE, PP) czy politereftalan etylenu (PET), znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Rokrocznie rośnie zapotrzebowanie na takiego typu materiały, a co za tym idzie wzrasta ich produkcja. Z raportu Plastics Europe z 2018 roku wynika, że w Europie w 2016 roku wyprodukowano 60 milionów ton tworzyw sztucznych, podczas gdy w 2017 roku produkcja wzrosła, osiągając poziom około 65 milionów ton. Wzrastające problemy środowiskowe, związane z zanieczyszczeniem środowiska lądowego, wód słodkich i słonych, a także zubożenie globalnych zasobów ropy naftowej wymusza poszukiwanie przyjaznych dla środowiska, biodegradowalnych substytutów polimerów syntetycznych.

Dobrym zamiennikiem obecnie stosowanych polimerów ropopochodnych, mogą być poliestry hydroksykwasów alkanowych (polihydroksykwas, PHA). Polihydroksykwasy są to poliestry syntezowane wewnątrzkomórkowo przez wiele mikroorganizmów, w tym bakterie i archeony. Wśród producentów PHA, największą rolę odgrywają mikroorganizmy powszechnie bytujące w środowisku, np. *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia coli*. Polihydroksykwasy syntetyzowane są w postaci granul, które mogą zajmować większą część cytoplazmy komórki (Byrom 1994; Mas i in. 1985). PHA stanowią dla mikroorganizmów swego rodzaju materiał zapasowy. Z przeglądu literatury wynika, że są one gromadzone w warunkach nie zrównoważonego wzrostu, to znaczy w obecności nadmiaru węgla organicznego, przy jednoczesnym niedoborze niezbędnych do prawidłowego wzrostu pierwiastków takich jak: azot, fosfor, magnez czy tlen (Anderson i Dawes 1990; Khanna i Srivastava 2005; Reddy i in 2003). Liczne badania laboratoryjne potwierdzają, że limitacja niektórych pierwiastków, powoduje znaczny wzrost ilości produkowanych PHA (Ciesielski i in. 2010; Freches i Lemon 2017). Przykładem jest produkcja biopolimerów przez *Pseudomonas mendocina* w hodowli zasilanej olejem kokosowym. Wyczerpanie azotu w pożywce spowodowało wzrost ilości kumulowanych polimerów do 55 % s.m. (Basnet i in. 2018). Również Możejko-Ciesielska i in. (2018) donoszą o zwiększonej syntezie PHA<sub>MCL</sub> z 5,34% (w 17 godzinie hodowli) do 17,02% (w 41 godzinie hodowli) przez *Pseudomonas putida* KT2440 w hodowli suplementowanej glukonianem sodu.

Ze względu na budowę polihydroksykwasy podzielono na trzy grupy: polihydroksykwasy krótkołańcuchowe (PHA<sub>SCL</sub>), które zawierają od 3 do 5 atomów węgla w monomerach, polihydroksykwasy średniołańcuchowe (PHA<sub>MCL</sub>), które są zbudowane z 6-14 atomów węgla oraz polihydroksykwasy długołańcuchowe (PHA<sub>LCL</sub>), zawierające powyżej 14 atomów węgla (Anderson i Dawes 1990; Madison i Huisman 1999). Synteza PHA przez bakterie może zachodzić trzema drogami w zależności od wykorzystywanego substratu (Rys. 1).

Najważniejszą cechą odróżniającą polihydroksykwasy od syntetycznych polimerów jest ich biodegradowalność. Rozkład może nastąpić już w ciągu jednego roku. Następuje to w wyniku działania enzymów - depolimeraz PHA, wytwarzanych przez niektóre gatunki bakterii i grzybów. Do kolejnych zalet tych biopolimerów należy hydrofobowość, nierozpuszczalność w wodzie czy też termoplastyczność (Byrom 1994; Cavalheiro i in. 2009; Jendrossek i in. 1996).

Rysunek 1. Szlaki biosyntezy PHA (Chen, Jiang 2018)



Źródło: Opracowanie własne.

PHA mogą znaleźć zastosowanie w produkcji kosmetyków, opakowań czy też folii. Również z powodzeniem mogą być wykorzystywane w przemyśle medycznym, głównie do produkcji osłonek na leki, rusztowań ułatwiających dyfuzję leku, czy też opatrunków. Wyniki badań sugerują, że na bazie PHA jest możliwa produkcja szwów, więzadeł czy też implantów (Lee 1996; Lee i in. 1999; Salehizadeh, van Loosdrecht 2004; Zhao i in. 2003).

Synteza polihydroksykwasów to drogi proces, którego koszty związane są głównie ze źródłem węgla. Dlatego też, w ostatnich latach są prowadzone intensywne prace badawcze nad możliwością wykorzystania tanich, odpadowych substratów, jak na przykład posmażalnicze oleje roślinne (Możejko i in. 2012), glicerol (Cavalheiro i in. 2009) oraz serwatka i jej pochodne (Oliveira i in. 2018). Jednym z takich poprodukcyjnych źródeł węgla jest frakcja glicerynowa z produkcji biodiesla. Frakcja ta powstaje jako produkt uboczny procesu transestryfikacji i może być wykorzystywana do syntezy biopolimerów przez bakterie. Cavalheiro i in. (2009) donoszą o kumulacji PHA w stężeniu wynoszącym 50 % s.m. przez bakterie *Cupriavidus necator* w hodowli zasilanej odpadową frakcją glicerynową.

## Cel i metody

Celem niniejszej pracy było oszacowanie wpływu limitacji azotu i fosforu oraz glicerolu czystego i odpadowej frakcji glicerynowej na wzrost oraz efektywność syntezy polihydroksykwasów przez *Pseudomonas* sp. GL01.

Do przeprowadzenia eksperymentu wykorzystano szczep GL01, należący do rodzaju *Pseudomonas*. Szczep ten należy do Kolekcji Mikroorganizmów Katedry Mikrobiologii i Mykologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

*Pseudomonas* sp. GL01, przechowywany w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , przeniesiono do bulionu lizogennego o następującym składzie (w  $\text{g}/\text{dm}^3$ ): 10 trypton, 5 ekstrakt drożdżowy oraz 10 NaCl. Mikroorganizmy hodowano w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$  przez 16 godzin, z wytrząsaniem z szybkością 180 obr/min.

Hodowlę przeprowadzano w kolbach Erlenmeyera o pojemności  $250\text{ cm}^3$ . Pożywka z limitacją azotu składała się z:  $9\text{ g}/\text{dm}^3\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $2,5\text{ g}/\text{dm}^3\text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ ,  $1,0\text{ g}/\text{dm}^3\text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $3,5\text{ cm}^3\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ ,  $2,5\text{ cm}^3$  mikroelementów. Do przygotowania pożywki z limitacją fosforu użyto:  $0,9\text{ g}/\text{dm}^3\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,35\text{ g}/\text{dm}^3\text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ ,  $10\text{ g}/\text{dm}^3\text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $3,5\text{ cm}^3\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ ,  $2,5\text{ cm}^3$  mikroelementów. Pożywka kontrolna, bez limitacji pierwiastków składała się z:  $9\text{ g}/\text{dm}^3\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $3,5\text{ g}/\text{dm}^3\text{ Na}_2\text{HPO}_2 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ ,  $10\text{ g}/\text{dm}^3\text{ (NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $3,5\text{ cm}^3\text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{ H}_2\text{O}$ ,  $2,5\text{ cm}^3$  mikroelementów. Do przeprowadzenia doświadczenia użyto dwóch źródeł węgla w stężeniu  $10\text{ cm}^3/\text{dm}^3$ : czystego glicerolu oraz odpadowej frakcji glicerynowej z produkcji biodiesla. Hodowlę produkcyjną prowadzono przez 48 godzin w trzech powtórzeniach.

Aby ocenić wpływ źródeł węgla i czynników limitujących na tempo wzrostu komórek bakteryjnych, pobierano materiał hodowlany w odstępach czasowych i mierzono gęstość optyczną  $600\text{ nm}$  z zastosowaniem spektrofotometru UV/VIS.

W celu wyznaczenia stężenia biomasy, mikroorganizmy w 24 i 48 godzinie hodowli przeniesiono do probówek, następnie całość wirowano z szybkością  $10\ 000\text{ obr}/\text{min}$  przez 7 minut. Powstały supernatant usunięto, następnie dodano  $20\text{ cm}^3$  heksanu w celu oddzielenia komórek od pozostałości substratu i ponownie wirowano. Po zdekantowaniu supernatantu komórki bakteryjne mrożono w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ , a następnie suszono w  $45^{\circ}\text{C}$  do uzyskania stałej wagi masy komórek bakteryjnych. Wysuszoną biomasę zważono na wadze analitycznej.

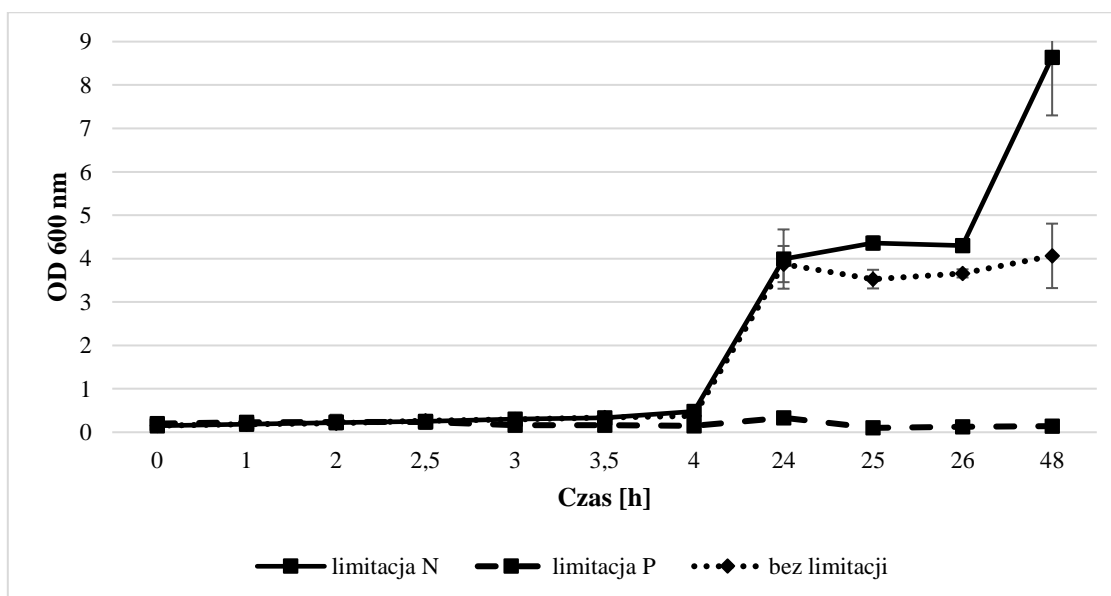
Do biomasy bakteryjnej dodano chloroform i wytrząsano w temperaturze  $50^{\circ}\text{C}$ , z szybkością  $110\text{ rpm}$ . Następnie zawiesinę przesączono przez sączonek Whatmana No.1.

Biopolimery przemywano chloroformem i wytrącano 70% metanolem. Po odparowaniu w temperaturze pokojowej, otrzymane biopolimery ważono na wadze analitycznej.

## Wyniki

Wyniki pomiarów gęstości optycznej dla hodowli zasilanej czystym glicerolem oraz odpadową frakcją glicerynową, przedstawiono na rysunku 2 oraz rysunku 3. Otrzymane wyniki potwierdzają, że bakterie nie wykazywały zdolności wzrostu w warunkach limitacji fosforu z zastosowaniem czystego glicerolu jako źródła węgla, natomiast w przypadku hodowli suplementowanej odpadową frakcją glicerynową z produkcji biodiesla *Pseudomonas* sp. GL01 namnażał się (OD= 3,454). Najwyższą wartość gęstości optycznej odnotowano w 48 godzinie hodowli z limitacją azotu oraz z dodatkiem czystego glicerolu (OD= 8,637). W hodowli bez limitacji pierwiastków i z dodatkiem odpadowej frakcji glicerynowej, odnotowano wyższy wzrost bakterii (OD= 6,036) w porównaniu do hodowli bez limitacji zasilanej czystym glicerolem (OD= 4,064).

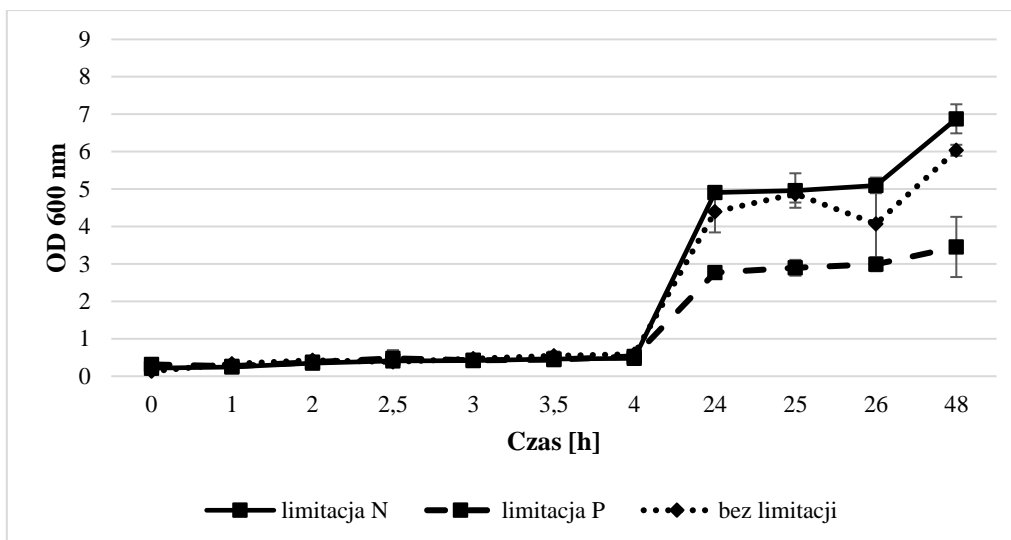
Rysunek 2. Wzrost mikroorganizmów w hodowlach suplementowanych czystym glicerolem



Źródło: Opracowanie własne.

Po pierwszej dobie trwania eksperymentu, najwyższą wartość gęstości optycznej uzyskano w hodowli z limitacją azotu, suplementowanej odpadową frakcją glicerynową. Podobny wzrost odnotowano w hodowli bez limitacji pierwiastków zasilanej tym samym substratem.

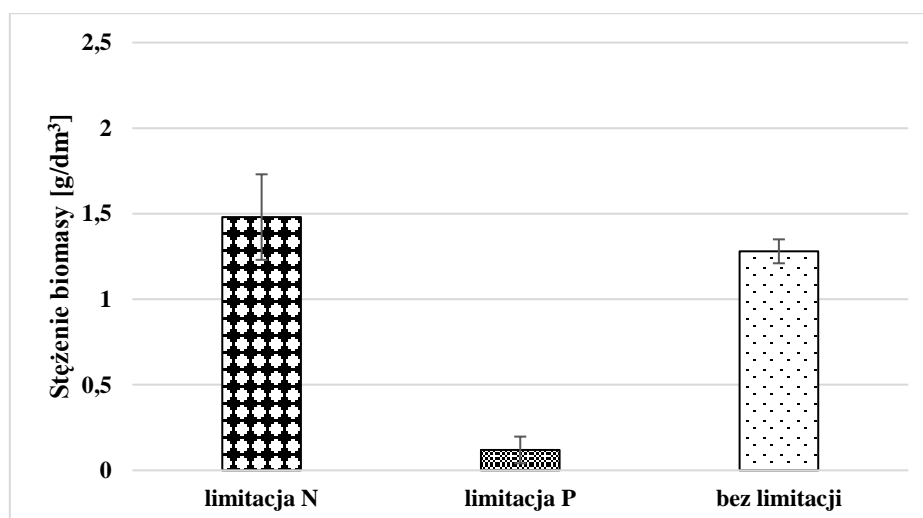
Rysunek 3. Wzrost mikroorganizmów w hodowlach zasilanych odpadową frakcją glicerynową



Źródło: Opracowanie własne.

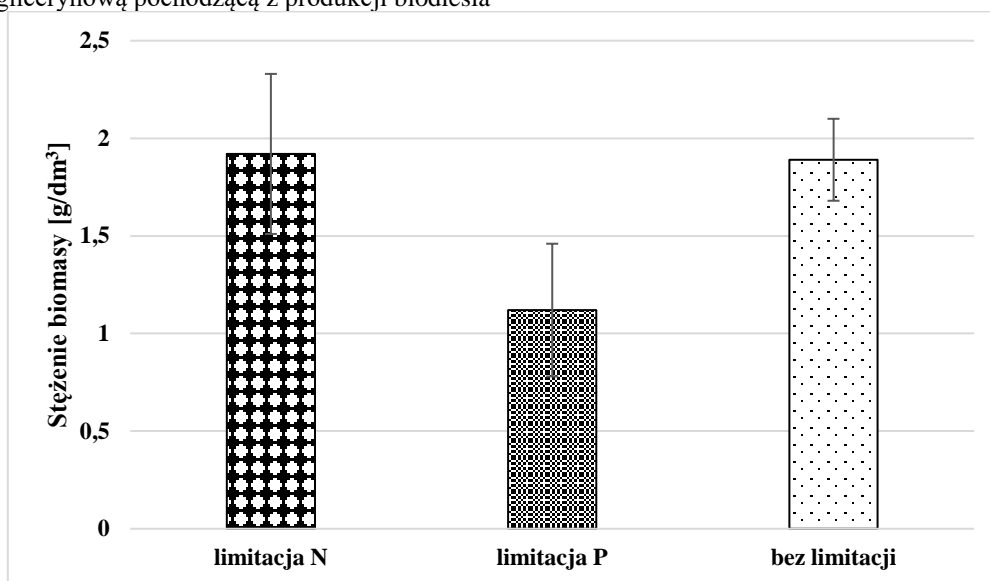
Najniższą ilość biomasy ( $0,118 \text{ g/dm}^3$ ) odnotowano w hodowli z limitacją fosforu z dodatkiem czystego glicerolu. Wyniki badań wskazują, że mikroorganizmy rosły efektywniej przy zastosowaniu odpadowej frakcji glicerynowej w porównaniu z czystym glicerolem, zarówno w hodowlach z limitacją azotu, jak również fosforu. Ta sama zależność została zaobserwowana w hodowlach bez limitacji pierwiastków, gdzie stężenie biomasy było wyższe przy suplementacji odpadową frakcją glicerynową ( $1,89 \text{ g/dm}^3$ ), w porównaniu do hodowli z czystym glicerolem ( $1,28 \text{ g/dm}^3$ ).

Rysunek 4. Stężenie biomasy mikroorganizmów w 48 godzinie hodowli suplementowanej czystym glicerolem



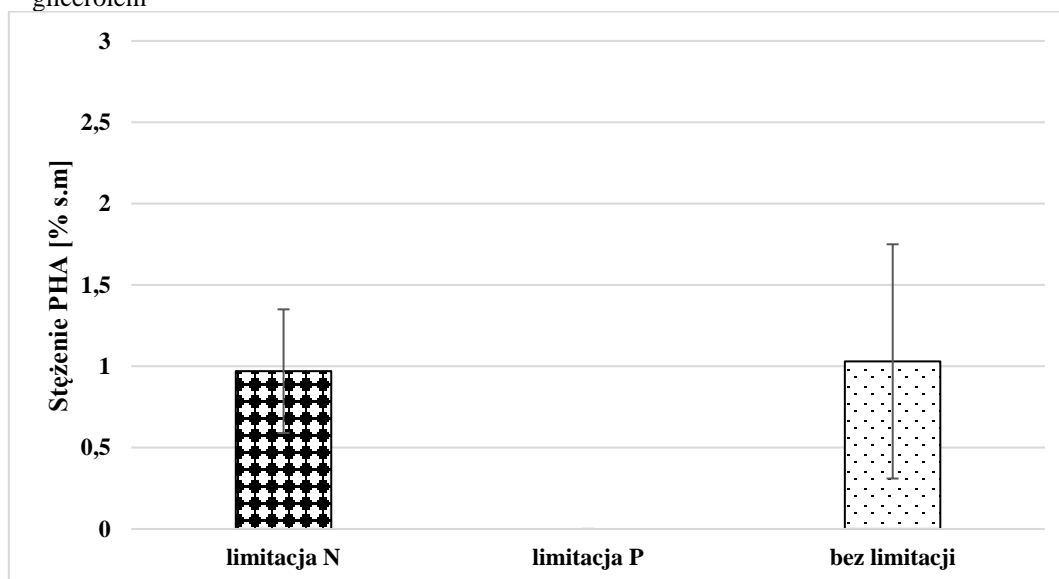
Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 5. Stężenie biomasy mikroorganizmów w 48 godzinie hodowli suplementowanej odpadową frakcją glicerynową pochodzącą z produkcji biodiesla



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 6. Procentowy udział PHA w komórkach bakteryjnych w hodowli suplementowanej czystym glicerolem



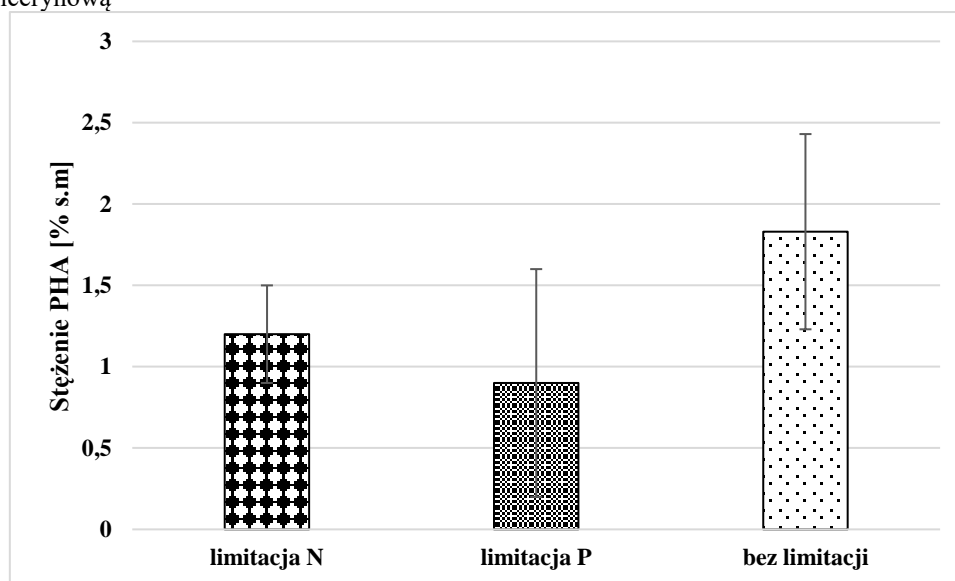
Źródło: Opracowanie własne.

Maksymalną zawartość PHA w suchej masie komórek bakteryjnych (1,8 %) wykazano w hodowli bez stresu pokarmowego, suplementowanej odpadową frakcją glicerynową, pochodzącą z produkcji biodiesla (Rys. 7), podczas gdy, w hodowli bez limitacji, ale z dodatkiem czystego glicerolu, odnotowano wartość PHA równą 1,0 % s.m. Zawartość PHA w suchej masie komórek, w warunkach limitacji azotu w hodowli suplementowanej czystym glicerolem, była niższa (1,0 % s.m.) od tej uzyskanej z hodowli zasilanej odpadową frakcją



glicerynową (1,2 % s.m PHA) (Rys. 6 i Rys. 7). Wykazano, że w warunkach głodu fosforowego, w hodowli z dodatkiem czystego glicerolu, bakterie nie syntezowały polihydroksykwasów. Natomiast w hodowli z limitacją fosforu suplementowanej odpadową frakcją glicerynową, bakterie kumulowały PHA w stężeniu 0,9 % s.m. Powyższe wyniki potwierdzają, że dodatek odpadowego substratu, stymulował komórki do kumulacji poliestrów hydroksykwasów alkanowych.

Rysunek 7. Procentowy udział PHA w komórkach bakteryjnych w hodowli suplementowanej odpadową frakcją glicerynową



Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

Wyniki badań własnych potwierdzają, że odpadowa frakcja glicerynowa i czysty glicerol, stymulowały komórki *Pseudomonas* sp. GL01 do wzrostu. Najwyższe stężenie biomasy uzyskano w hodowli w warunkach limitacji azotu z suplementacją odpadową frakcją glicerynową (1,92 g/dm<sup>3</sup>) a najniższą z dodatkiem czystego glicerolu z limitacją fosforu (0,118 g/dm<sup>3</sup>). Czysty i odpadowy glicerol został także zastosowany przez Pappalardo i in. (2014) jako źródło węgla w hodowli *Pseudomonas mediterranea*. Autorzy wykazali, że sucha masa komórek bakteryjnych wyniosła 3,30 g/dm<sup>3</sup> i 3,10 g/dm<sup>3</sup> odpowiednio dla hodowli zasilanej odpadową frakcją glicerynową i czystym glicerolem. Pereira i in. (2019) także wykorzystywali odpadową frakcję glicerynową z produkcji biodiesla jako źródło węgla do produkcji PHA<sub>MCL</sub>. W tej hodowli stężenie biomasy *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* wyniósł 6,71 g/dm<sup>3</sup>.

Na podstawie wyników własnych można stwierdzić, że *Pseudomonas* sp. GL01 jest zdolny do syntezy niewielkich stężeń poliestrów hydroksykwasów alkanowych w hodowli wykorzystującej jako źródło węgla zarówno czysty glicerol, jak i odpadową frakcję glicerynową, przy czym wyższe stężenia PHA uzyskano podczas suplementacji odpadowym substratem we wszystkich zastosowanych warunkach hodowlanych. De Paula i in. (2017), do syntezy PHA wykorzystali nowo wyizolowany szczep MA03 z rodzaju *Pandora*, a jako źródło węgla, zastosowali odpadową frakcję glicerynową oraz czysty glicerol. Uzyskane przez nich wyniki wskazują na wyższą wydajność syntezy PHA przy suplementacji odpadowym substratem (procentowy udział PHA w suchej masie komórek wynosił 49%). Odpadowy glicerol został także użyty jako źródło węgla do syntezy PHA<sub>MCL</sub> w hodowli *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. Procentowy udział biopolimerów w suchej masie bakteryjnej, wyniósł 17 % (Pereira i in. 2019). Natomiast Volova i in. (2019) donoszą o wydajnej syntezie polihydroksykwasów (około 80 % s.m.) przez bakterie *Cupriavidus eutrophus* B-10646 w hodowli okresowej zasilanej czystym glicerolem.

W badaniach własnych określono również wpływ czynnika limitującego na wzrost i syntezę biopolimerów przez *Pseudomonas* sp. GL01. Najwyższą wartość biomasy (1,92 g/dm<sup>3</sup>) uzyskano w hodowli w warunkach limitacji azotu, z dodatkiem odpadowej frakcji glicerynowej. Natomiast najwyższe stężenie PHA odnotowano w hodowli bez limitacji pierwiastków, suplementowanej tym samym odpadowym substratem. Nie uzyskano polihydroksykwasów w hodowli z limitacją fosforu, zasilanej czystym glicerolem. Poblete-Castro i in. (2012) badali syntezę PHA przez *Pseudomonas putida* w warunkach limitacji azotu. Podczas hodowli uzyskano 4,6 g/dm<sup>3</sup> suchej masy komórek i około 80% udział biopolimeru. W tym samym badaniach przeprowadzono także eksperyment z limitacją węgla, który wykazał niższe stężenie biomasy (1,5 g/dm<sup>3</sup>) i niższy procentowy udział biopolimerów (26 % s.m). Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że głód azotowy stymuluje gromadzenie biopolimeru przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*.

## Podsumowanie

Szczep GL01 rodzaju *Pseudomonas* wykorzystywał do wzrostu zarówno czysty glicerol, jak również odpadową frakcję glicerynową pochodzącą z produkcji biodiesla. Obydwa zastosowane substraty stymulowały komórki bakterii *Pseudomonas* sp. GL01 do produkcji PHA. Natomiast na stężenie uzyskanej biomasy i procentowy udział biopolimeru w suchej masie komórek bakteryjnych, miał wpływ głód azotowy i fosforowy. Limitacja fosforu w pożywce wpłynęła hamująco na wzrost i gromadzenie PHA przez *Pseudomonas* sp. GL01,

natomiast ograniczenie azotu było czynnikiem stymulującym. Uzyskane stężenia PHA są niższe w porównaniu z danymi literaturowymi.

## Literatura

- Anderson A.J., Dawes E.A. 1990. *Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. Microbiol. Rev., 54: 450-72.
- Basnett P., Marcello E., Lukaszewicz B., Panchal B., Nigmatullin R., Knowles J.C., Roy I. 2018. *Biosynthesis and characterization of a novel, biocompatible medium chain length polyhydroxyalkanoate by Pseudomonas mendocina CH50 using coconut oil as the carbon source*. J. Mater. Sci.- Mater. M., 29: 1-11.
- Byrom D. 1994. *Polyhydroxyalkanoates [w:] Plastics from microbes – microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Hanser Publishers, Munich: 5-33.
- Cavalheiro J.M.B.T., de Almeida M.C., Grandfils C., da Fonseca M.M.R. 2009. *Poly(3-hydroxybutyrate) production by Cupriavidus necator using waste glicerol*. Process. Biochem., 44: 509-515.
- Chen G.Q., Jiang X.R. 2018. *Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis*. Curr. Opin. Biotech., 53: 20–25.
- Ciesielski, S., Możejko, J., Przybyłek, G. 2010. *The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of Pseudomonas sp.* J. Ind. Microbiol. Biot., 37: 511–520.
- De Paula F.C., Kakazu S., de Paula C.B., Gomez G.C., Contiero J. 2017. *Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated Pandoraea sp.* J. King Saud. Univ. Sci., 29: 166–173.
- Freches A., Lemos P.C. 2017. *Microbial selection strategies for polyhydroxyalkanoates production from crude glycerol: Effect of OLR and cycle length*. New Biotechnol., 39: 22–28.
- Jendrossek D., Schirmer A., Schlegel H.G. 1996. *Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 46: 451-63.
- Khanna S., Srivastava A.K. 2005. *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*. Process Biochem., 40: 607–619.
- Lee S. Y. 1996. *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. Biotechnol. Bioeng., 49: 1– 14.
- Lee S.Y., Choi J.I., Han K., Song J.Y. 1999. *Removal of endotoxin during purification of poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria*. Appl. Environ. Microbiol., 65: 2762–2764.
- Madison L.L., Huisman G.W. 1999. *Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic*. Microbiol. Mol. Biol. R., 63: 21-53.
- Mas J., Pedrós-Alió C., Guerrero R. 1985. *Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmic inclusions on volume and density of microorganisms*. J. Bacteriol., 164: 749-756.

- Możejko-Ciesielska J., Pokój T., Ciesielski S. 2018. *Transcriptome remodeling of Pseudomonas putida KT2440 during mcl-PHAs synthesis: effect of different carbon sources and response to nitrogen stress*. J. Ind. Microbiol. Biot., 45: 433–446.
- Możejko J., Ciesielski S., Przybyłek G. 2012. *Mcl-PHAs produced by Pseudomonas sp. GL01 using fed-batch cultivation with waste rapeseed oil as carbon source*. J. Microbiol. Biotechnol., 22: 371-377.
- Oliveira C.S.S., Silva M.O.D., Silva C.E., Carvalho G., Reis MA.M. 2018. *Assessment of Protein-Rich Cheese Whey Waste Stream as a Nutrients Source for Low-Cost Mixed Microbial PHA Production*. Appl. Sci., 8: 1-16.
- Pappalardo F., Fragala M., Mineo P.G., Damigella A., Catara A.F., Palmeri R., Rescifina A. 2014. *Production of filmable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates produced from glycerol by Pseudomonas mediterranea*. Int. J. Biol. Macromol., 65: 89-96.
- Pereira J.R., Araújo D., Marques A.C., Neves L.A., Grandfils C., Sevrin C., Alves V.D., Fortunato E., Reis M.A.M., Freitas F. 2019. *Demonstration of the adhesive properties of the medium-chain-length polyhydroxyalkanoate produced by Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca from glycerol*. Int. J. Biol. Macromol., 122: 1144-1151.
- Plastics – the Facts 2018. An analysis of European plastics production, demand and waste data.* [https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics\\_the\\_facts\\_2018\\_AF\\_web.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf) (dostęp 29 stycznia 2019 r.).
- Poblete-Castro I., Binger D., Oehlert R., Rohde M. 2014. *Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different Pseudomonas putida strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions*. BMC Biotechnol., 14: 1-11.
- Reddy C. S. K., Ghai R., Kalia V. C. 2003. *Polyhydroxyalkanoates: an overview*. Bioresour. Technol., 87: 137-146.
- Salehizadeh H., Van Loosdrecht M.C. 2004. *Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance*. Biotechnol. Adv., 22: 261-79.
- Volova T., Demidenko A., Kiselev E., Baranovskiy E., Shishatskaya E., Zhila N. 2019. *Polyhydroxyalkanoate synthesis based on glycerol and implementation of the process under conditions of pilot production*. Appl. Microbiol. Biot., 103: 225-237.
- Zhao K., Deng Y., Chen J.C., Chen G. Q. 2003. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility*. Biomaterials: 24: 1041-1045.

Praca została napisana pod kierunkiem dr inż. Justyny Możejko-Ciesielskiej.

## **Rozdział IV**

### **Wpływ wiedzy o mikroorganizmach na projektowanie badań naukowych**



# Wykorzystanie technik mikroskopowych w badaniach konsorcjów mikrobialnych

## Use of the microscopy technics in microbial communities research

Jakub Tadeusz Kowalik

Uniwersytet Warmiński – Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Naukowe Koło Mikrobiologów  
Opiekun: dr hab. Dorota Górniak

### Abstract

The paper presents an attempt to compare different fluorescence techniques to visualize microbial assemblies. The test material was a polar microbial mat from Ecology Glacier (King George Island, Antarctica) and plaque. To fluorescent used acridine orange, DAPI and the Live/Dead staining kit. The research involved the use of epifluorescence, confocal and light microscopy techniques using the Nomarski contrast. The obtained images were analyzed using three types of photo processing software. Significant differences were found in the images obtained in terms of individual staining. Confocal microscopy is characterized by almost zero depth of field and enables multi-layered image formatting in specialized software. Epifluorescence microscopy is a simpler and more accessible technique. The studies showed the difference between the tested software. The most important of them concerned differences in the possibilities and accuracy of deconvolution of images and putting them on each other in a way that allows obtaining a flat image composed of many layers.

**Keywords:** microbial mat, biofilm, fluorescence, microscopy, confocal microscopy

### Wstęp

Opracowane w XVII wieku pierwsze urządzenia optyczne, pozwoliły na wizualizację obiektów niedostrzegalnych gołym okiem. Nowe technologie mikroskopowe dały podstawę dla rozwoju wielu nauk biologicznych. Opublikowana w 1677 roku praca van Leewenhoek'a (van Leewenhoek 1677), opisująca morfologię bakterii, była początkiem rozwoju nauk mikrobiologicznych. Rozwijane w toku dziesięcioleci metody barwienia pozwalają na wizualizację struktur bezbarwnych i niedostrzegalnych w mikroskopach amplitudowych. Przełomowe znaczenie w badaniach miało opracowanie technologii kontrastu fazowego, kontrastu interferenco-dyferencjalnego DIC oraz metod fluorescencyjnych (Bartoszek i Rosowski 2017; Bayer 1871; Gest 2004; Masters 2009; Nomarski 1957). We wszystkich tych technikach, podstawowe znaczenie ma zwiększenie kontrastu pomiędzy obiektem a tłem preparatu. Opracowana przez Fritsa Zernike technika kontrastu fazowego wykorzystwała efekt przesunięcia fazowego fali świetlnej, przechodzącej przez obiekty amplitudowe (Zernike

1942). Wyjaśnienie tego zjawiska i opracowanie urządzeń do rejestracji i wizualizacji tego typu obiektów, znalazło uznanie w świecie nauki i nagrodzone zostało nagrodą Nobla. Grzegorz Nomarski, konstruując mikroskop do badań materiałów natywnych, wykorzystał zjawisko polaryzacji światła, dyfrakcji i interferencji (Nomarski 1957). Zjawiska te umożliwiają wizualizację obiektów amplitudowych bez efektu „halo” charakterystycznego dla kontrastu fazowego (Allen i in. 1969; Brutkowski 2013; Kucia 2013). Przełomowe znaczenie w mikroskopii optycznej miało wprowadzenie technologii fluorescencyjnej (Renz 2013). Zjawisko fluorescencji oparte jest na efekcie emisji światła długofalowego przez niektóre materiały naświetlane światłem krótkofalowym - UV. Współcześnie, jest to jedna z podstawowych technologii mikroskopowych, stosowanych w naukach biologicznych. Stosując różnorodne pigmenty fluoroforowe, możliwe jest uzyskanie wybiórczego wybarwienia obiektów. Procedury barwienia i jego efekty są dostosowane do określonych wymogów badawczych. Coraz częściej stosowane są zestawy barwiące, które pozwalają określić nie tylko parametry morfologiczne badanych obiektów, ale również jego własności fizjologiczne. Od kilkudziesięciu lat dominującą techniką w mikroskopii fluorescencyjnej jest epifluorescencja, w której preparat oświetlony jest poprzez obiektyw. Zestaw odpowiednio dobranych lusterek dichroicznych reguluje przeniesienie światła o określonych parametrach, zarówno w fazie wzbudzenia jak również w fazie emisji (Chalfie i in. 1994; Joux i Lebaron 2000; Giepmans i in. 2006; Meyer i Dworkin 2007; Tsien 1998). Rozwijające się technologie fluorescencyjne doprowadziły w ostatnich latach do opracowania bardzo efektywnej mikroskopii konfokalnej (Lawrence i in. 1991). Wykorzystanie laserów, jako źródła światła wzbudzającego, umożliwia uzyskanie efektu niemalże zerowej głębi ostrości, co w praktyce niweluje zjawisko konwolucji. Podstawową techniką pracy urządzeń konfokalnych jest tworzenie zestawu zdjęć w osi wertykalnej, a następnie ich cyfrowa obróbka. Nakładanie zdjęć, pozwala uzyskać efekt uprzestrzennienia obrazu badanego obiektu. W badaniach konsorcjów bakteryjnych, biofilmów oraz mat mikrobialnych, jest to preferowana metoda wizualizacyjna (Cardinale 2014; Neu i in. 2010).

Znaczna część mikroorganizmów, występujących w środowiskach naturalnych, ma tendencję do skupiania się na granicy faz i tworzenia biofilmów (Kołwzan 2011). W przyjętej powszechnie definicji biofilm to osiadła społeczność komórek, która nieodwracalnie związana jest z powierzchnią biotyczną lub abiotyczną (Baj i Markiewicz 2012; Nagar i Schwarz 2015; Sadekuzzaman i in. 2015). Biofilmy zazwyczaj tworzą przestrzenne, wysoce zorganizowane i wielowarstwowe struktury, złożone z komórek jednego gatunku, bądź też kilku gatunków (Kalicińska i Tyski 2009). Biofilmy często tworzą formę heterogenicznej mozaiki, złożonej



z wielu mikrokoloni otoczonych żelowym matriks (Baj i Markiewicz 2012; Ferández-Delgado i in. 2015; Wimpenny i in. 2000). Biofilmy, utworzone przez heterogenne zespoły mikroorganizmów, zapewniają tym drobnoustrojom istotne korzyści: pokarmowe, fizjologiczne i molekularne. Szczególnie interesujący, mający znaczenie kliniczne, jest związek zachodzący pomiędzy lekoopornością mikroorganizmów i tendencją do tworzenia biofilmów. Struktura biofilmu umożliwia bakteriom przetrwanie w wysokich stężeniach substancji antybakteryjnych. Według niektórych autorów, oporność bakterii w biofilmie, może zwiększyć się tysiąckrotnie (Choong i Whitfield 2000; Hall-Stoodley i Stoodley 2009). Udowodniono, że w składzie egzopolisacharydowego matriksu mogą znajdować się betalaktamazy i inne enzymy, rozkładające antybiotyki (Gilbert i in. 2002), natomiast kliniczne biofilmy bakteryjne, są skutecznie chronione przed fagocytozą makrofagów (Bjarnsholt 2013; Hall-Stoodley i Stoodley 2009). Dodatkowym aspektem zainteresowania badaczy w przypadku biofilmów jest efektywnie przebiegający proces horyzontalnego transferu genów (Baj i Markiewicz 2012; Madsen i in. 2012; Van Houdt i Michiels 2010).

Istotną formą konsorcjów bakteryjnych w środowiskach naturalnych są maty mikrobialne. Struktury te są zazwyczaj bardzo heterogennymi zespołami mikroorganizmów auto i heterotroficznych. Wysoka oporność mat mikrobialnych, umożliwia ich występowanie w środowiskach ekstremalnych (van Gemerden 1993; Klatt i in. 2016; Ley i in. 2006). Badanie konsorcjów mikrobiologicznych jest współcześnie jednym z bardziej dynamicznie rozwijających się kierunków. Liczne badania kliniczne potwierdzają znaczenie biofilmów w patogenezie. Maty mikrobialne charakteryzują się wysoką opornością na czynniki środowiskowe i są cennym źródłem organizmów, które mogą być wykorzystane, między innymi w biotechnologii. Jednym z istotnych problemów badawczych jest opracowanie struktury konsorcjów mikrobiologicznych. W pracy przedstawiono próbę porównania różnych technik fluorescencyjnych wizualizacji zespołów drobnoustrojów.

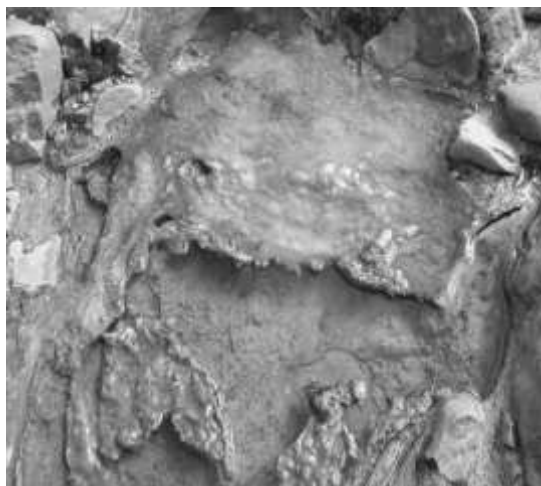
## **Cel i metody**

Celem prowadzonych badań było określenie możliwości wykorzystania różnych technik mikroskopowych i barwień fluorescencyjnych w badaniach konsorcjów mikrobialnych oraz zastosowanie oprogramowania wspomagającego w analizach obrazów mikroskopowych.

Badania nad strukturą konsorcjów mikrobiologicznych prowadzono w oparciu o dwa typy materiału biologicznego, wykorzystując trzy techniki mikroskopowe i trzy metody barwienia.

Badany materiał biologiczny stanowiła mata mikrobialna oraz biofilm bakteryjny, pobrany z przestrzeni międzyzębowych. Matę mikrobialną (Rys. 1) pozyskano z rejonu przylodowcowego Lodowca Ekologii (Wyspa Króla Jerzego, Antarktyka). Miksotroficzne maty rozwijają się w wodach roztopowych w okresie lata antarktycznego i tworzą kilkumilimetrowej grubości kożuchy, wypływające na powierzchnię strumieni wodnych. Zasadniczą grupę mikroorganizmów stanowią fotoautotroficzne sinice oraz eukariotyczne glony, głównie okrzemki. W obrębie mat rozwijają się obficie chemolitotrofy i heterotroficzne bakterie, grzyby oraz pierwotniaki. Matę pobrano w czasie wyprawy antarktycznej w 2013 roku i zamrożono w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . W tej formie przechowywano ją do dalszych badań laboratoryjnych.

Rysunek 1. Mata mikrobialna



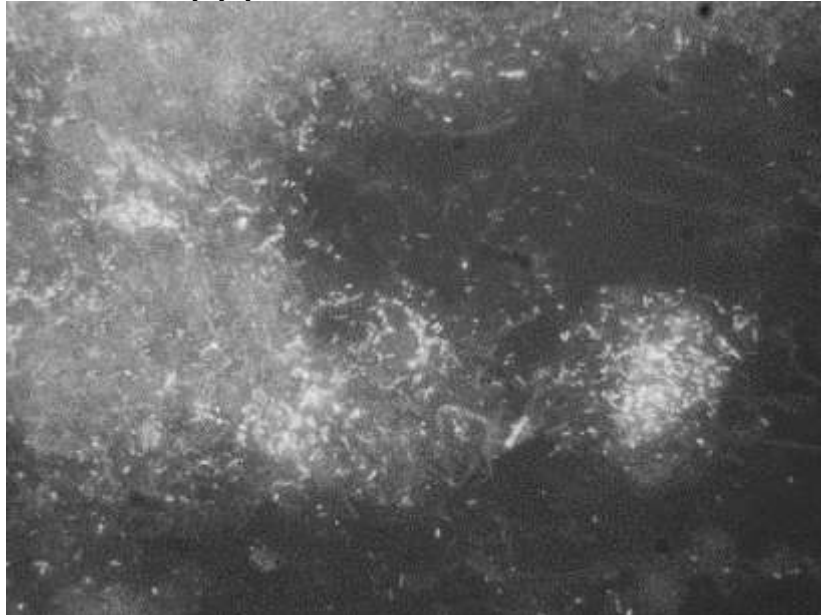
Źródło: Opracowanie własne.

Biofilmy przyzębowe stanowią stałą mikrobiotę komensalną jamy ustnej. Korzystne warunki panujące w rejonach dziąseł, sprzyjają ich kolonizacji. Najliczniejszą grupę stanowią heterotroficzne gram dodatnie bakterie cylindryczne i kuliste. Rozwijające się obficie biofilmy w strefie międzyzębowej, prowadzą często do odtleniania środowiska i rozwoju beztlenowych form maczugowatych oraz grzybów.

Fragmety rozmrożonej maty o wymiarach 5 x 3 mm umieszczono na szkiełku mikroskopowym z łożką i traktowano roztworem barwnika. Brzegi łożki uszczelniano wazeliną kosmetyczną i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym o obniżonej fluorescencji, dedykowanym do mikroskopii fluorescencyjnej. Materiał ze strefy przyzębowej pobierano bezpośrednio przed przygotowaniem preparatu. Materiał pobierano za pomocą jałowej

wykałaczki i umieszczono go w łożcu szkiełka mikroskopowego. Po wprowadzeniu barwnika nakładano szkiełko nakrywkowe.

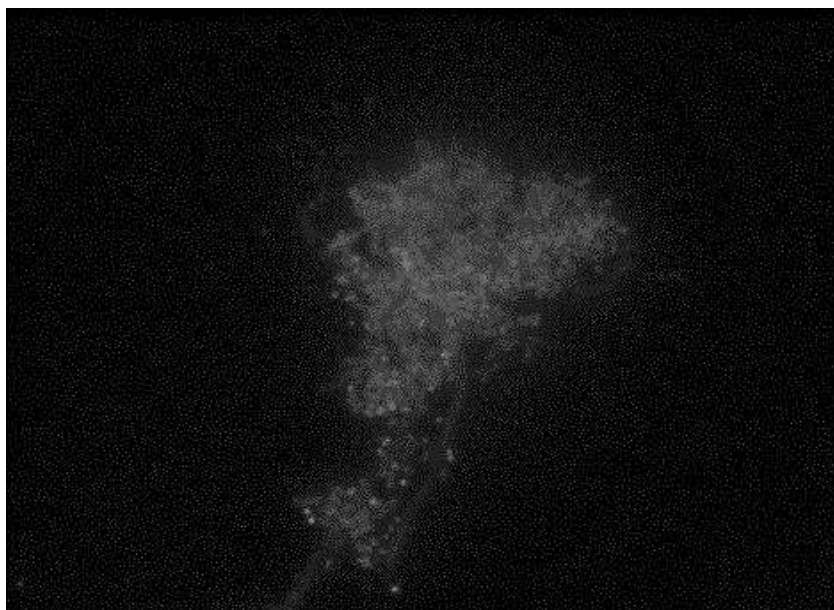
Rysunek 2. Barwienie oranżem akrydyny



Źródło. Opracowanie własne.

W badaniach wykorzystano trzy typy barwników: oranż akrydynowy (OA) (Rys. 2), 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI) (Rys. 3), oraz zestaw barwiący Live/Dead składający się z dwóch barwników SYTO 9 i jodku propidyny (Rys. 4).

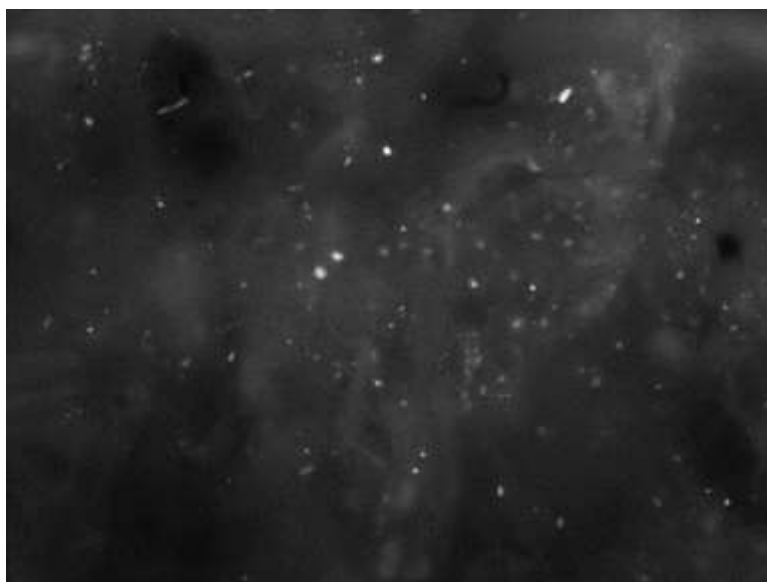
Rysunek 3. Barwienie DAPI



Źródło: Opracowanie własne.

Oranż akrydynowy jest chromoforem interkalującym, wnikającym w strukturę DNA. Charakterystyczną cechą barwnika jest zróżnicowanie fluorescencji w zależności od rodzaju kwasu nukleinowego. Jednoniciowy DNA i RNA barwią się oranżem akrydynowym, emitując charakterystyczne pomarańczowe światło. Dwuniciowy DNA i RNA barwi się emitując fluorescencyjne światło zielone. Przed wprowadzeniem barwienia różnicowego Live/Dead, barwienie oranżem było wykorzystywane w ocenie żywotności komórek. Komórki żywe emitują światło czerwone, a martwe zielony. Oranż akrydyny o stężeniu  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  наносzono na preparaty, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym po czym inkubowano przez dwie minuty w ciemności.

Rysunek 4. Barwienie Live/Dead

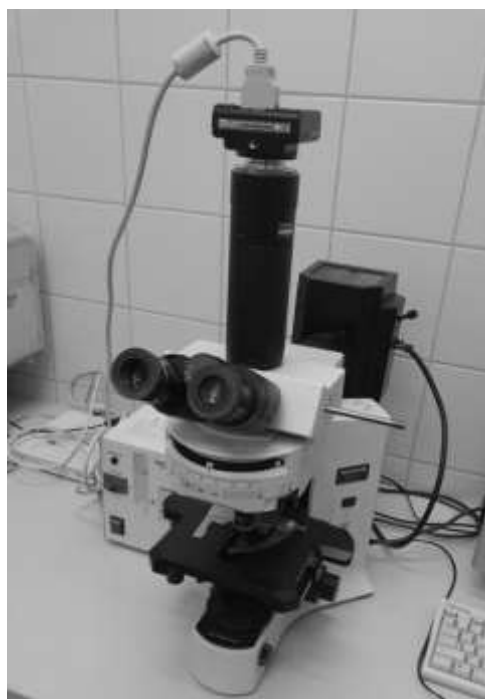


Źródło: Opracowanie własne.

Barwnik DAPI wprowadzony został do barwienia komórek bakteryjnych w latach osiemdziesiątych w związku z wykazaną znaczną toksycznością oranżu akrydynowego. Barwnik wiąże się z powierzchnią DNA emitując jasno niebieskie światło fluorescencyjne. Charakterystyczną cechą tego barwnika jest niższa oporność na efekt Blichingu - szybkiej utraty emisji światła fluorescencyjnego. Zjawisko to utrudnia badania wielowarstwowych materiałów. Barwienie DAPI przeprowadzano nanosząc na przygotowane preparaty  $10 \mu\text{l}$  roztworu o stężeniu  $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , następnie zabezpieczano preparat szkiełkiem nakrywkowym i inkubowano w ciemności przez 5 minut.

Zestaw barwiący Live/Dead wprowadzony został do praktyki mikrobiologicznej na początku lat dziewięćdziesiątych przez firmę Microprobe. Zasadniczą cechą barwników jest wielkość fluorowych cząstek, które mogą przenikać przez nienaruszoną błonę lipidową (jodek propidyny) oraz po jej uszkodzeniu (SYTO 9). W zależności od zabarwienia, możliwe jest określenie żywotności komórek. Bakterie z nieszkodzoną membraną są wybarwione jedynie SYTO 9 na zielono. Wniknięcie do wnętrza komórki poprzez uszkodzenia błony jodku propidyny, barwi komórki na czerwono. Barwienie zestawem barwników Live/Dead *BacLight* polegało na naniesieniu po 5  $\mu$ l roztworu barwników SYTO 9 i jodku propidyny na materiał umieszczony na szkiełku. Następnie zamykano preparat szkiełkiem nakrywkowym i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 minut.

Rysunek 5. Mikroskop epifluorescencyjny Olympus BX-41



Źródło: Opracowanie własne.

Epifluorescencja klasyczna realizowana była z wykorzystaniem dwóch mikroskopów Olympus: BX41 (Rys. 5) i BX51. Oba mikroskopy wyposażone były w rtęciowe żarniki o mocy 100 W oraz zestawy fluorescencyjne, składające się z kompletu obiektywów, filtrów wzbudzających, luster dichroicznych i filtrów emitujących wykorzystywanych w poszczególnych technika fluorescencyjnych. Epifluorescencja konfokalna realizowana była przy wykorzystaniu mikroskopu Leica TCS SP5 (Rys. 6).

Rysunek 6. Mikroskop konfokalny Leica TCS SP5



Źródło: Opracowanie własne.

Kontrast Nomarskiego realizowano przy wykorzystaniu mikroskopu Nikon wyposażonego w osprzęt umożliwiający finalizację tej techniki. Kontrast Nomarskiego wykorzystano do analizy natywnych preparatów maty mikrobialnej.

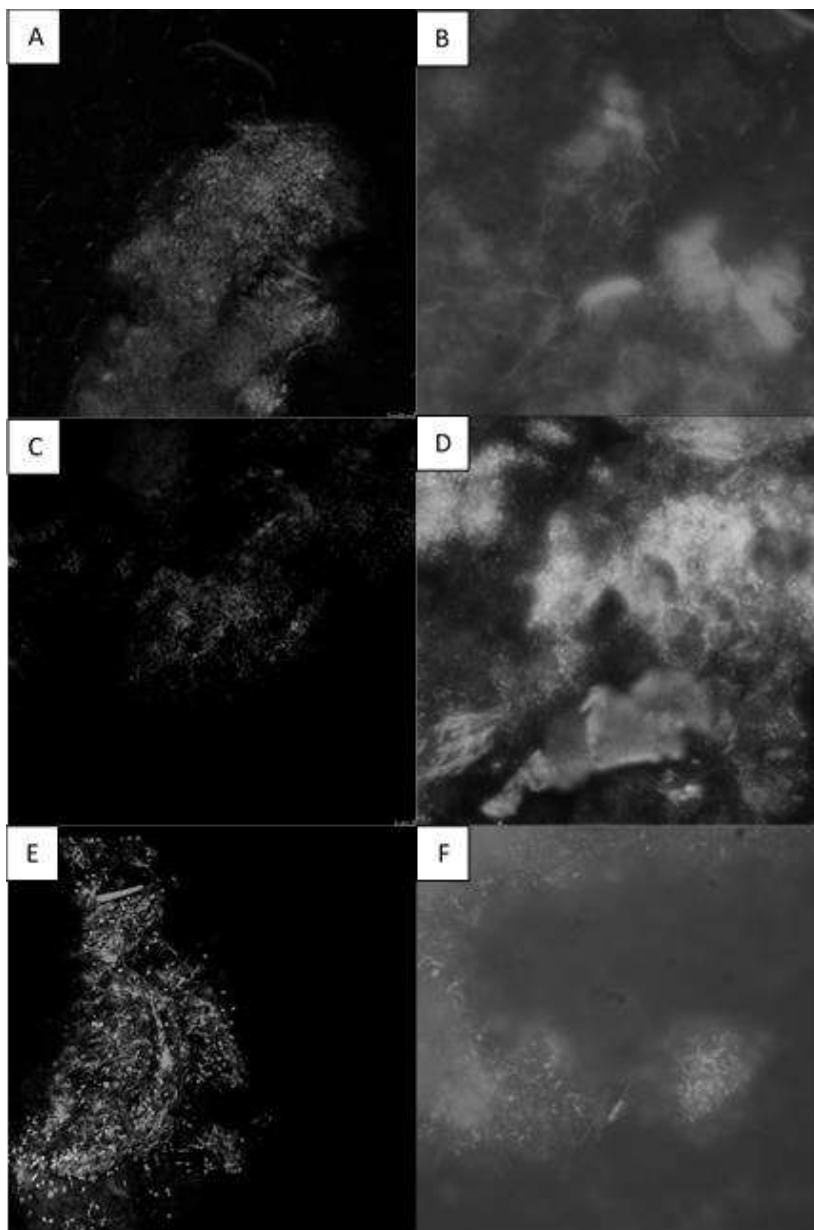
Wszystkie mikroskopy były wyposażone w cyfrowe kamery umożliwiające przenoszenie obrazów do komputera i zapisywanie ich w nim. W badaniach prowadzonych w mikroskopach epifluorescencyjnych wykorzystano kamery Nikon DS-Fi1c wraz ze sterownikiem Nikon DS-U2 i oprogramowaniem NIS-Elements F 4.30.01. W przypadku badań prowadzonych w mikroskopie konfokalnym, korzystano z detektorów załączonych do mikroskopu przez producenta wraz z oprogramowaniem LAS – Leica Application Suite 2.0.2 build 2038. Badania prowadzono w oparciu o akwizycję obrazu w zależności od użytej techniki oraz założeń badawczych dla jednego pola widzenia, skanowane od 1 do 60 warstw w układzie wertykalnym. Odległość skanowanych pól wynosiła od 0,5 do 3  $\mu\text{m}$ . Do obróbki oraz składania obrazów mikroskopowych z mikroskopów epifluorescencyjnych oraz kontrastu Nomarskiego, wykorzystano trzy zestawy oprogramowania: Z.S. 1.04; H.F. 7.0.2 oraz A.P. 2019.

## **Wyniki badań**

Przeprowadzone badania wykazały istotne zróżnicowanie efektywności technik mikroskopowych stosowanych w analizach konglomeratów mikrobiologicznych. Obie z użytych technik fluorescencyjnych, klasyczna i konfokalna, wykazały przydatność tego typu badania. Zasadnicza różnica w parametrach pracy obu mikroskopów, jakim jest głębokość ostrości, skutkowałą jakością utworzonych obrazów mikroskopowych. Na rysunku 7. przedstawiono

efekty obrazowania biofilmów bakteryjnych przy wykorzystaniu różnych technik mikroskopowych oraz metod barwienia.

Rysunek 7. Kontrast i głębia ostrości przy zastosowaniu różnych technik mikroskopowych i metod barwienia. A – barwienie DAPI, mikroskop konfokalny; B – barwienie DAPI, mikroskop fluorescencyjny; C – barwienie LD, mikroskop konfokalny; D – barwienie LD, mikroskop fluorescencyjny; E – barwienie OA, mikroskop konfokalny; F – barwienie OA, mikroskop fluorescencyjny

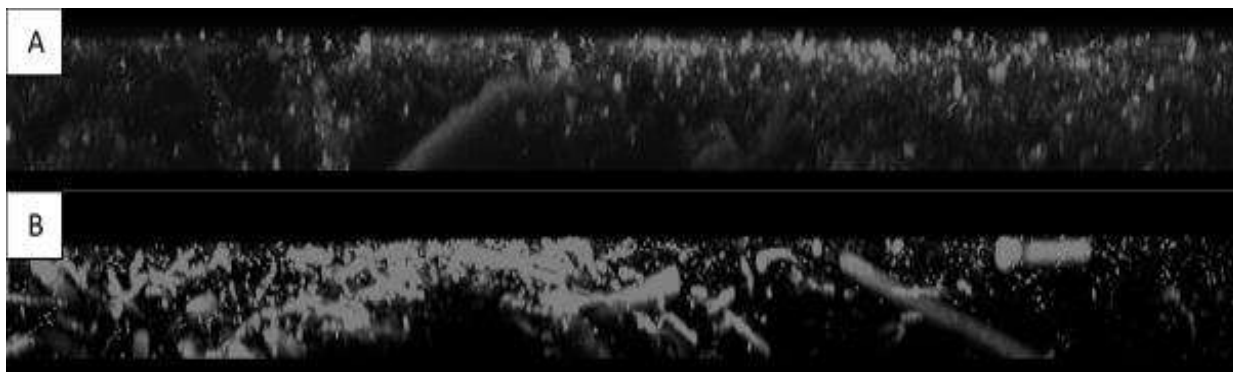


Źródło: Opracowanie własne.

Najsilniejszy kontrast i rozdzielczość obrazów uzyskano w mikroskopie konfokalnym. We wszystkich technikach barwienia w klasycznym mikroskopie epifluorescencyjnym, charakterystycznym zjawiskiem było nieznaczne rozświetlenie tła obrazu, będące konsekwencją wyższej głębi ostrości oraz niższej rozdzielczości w obrazowaniu obiektów

badawczych. Pewnym ograniczeniem przy stosowaniu mikroskopii konfokalnej była konieczność manualnego ustawienia parametrów wiązki świetlnej przy wykorzystaniu oranżu akrydyny. W tym wypadku nie udało się uzyskać satysfakcjonujących efektów różnicowania mikroobiektyw w porównaniu z klasyczną techniką epifluorescencyjną. Ogromną zaletą mikroskopii konfokalnej jest możliwość analizy wielopłaszczyznowej. Nakładanie obrazów poszczególnych warstw daje możliwość wyróżnienia istotnych elementów konsorcjów znajdujących się w różnych poziomach biofilmu (Rys. 8, 9, 10). Wizualizacja rozkładu komórek w biofilmie wymaga zastosowania specjalistycznego oprogramowania, które standardowo znajdują się na wyposażeniu mikroskopu konfokalnego. Tworzenie trójwymiarowych obrazów na podstawie zdjęć wykonanych w wielu płaszczyznach, jest jedną z podstawowych funkcji oprogramowania. Uzyskane obrazowanie pozwala na ustalenie całościowego rozkładu drobnoustrojów w układzie wertykalnym (Rys. 8).

Rysunek 8. Rozłożenie komórek badanych preparatów wewnątrz konsorcjów: A – barwienie DAPI, grubość preparatu 46  $\mu\text{m}$ ; B – barwienie Live/Dead, grubość preparatu 34  $\mu\text{m}$

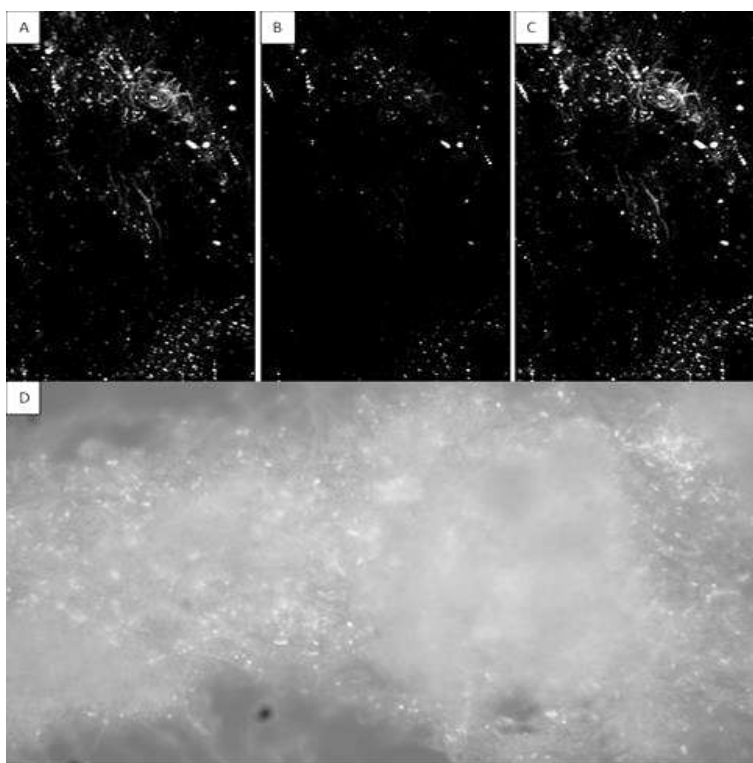


Źródło: Opracowanie własne.

Istotnym aspektem prowadzonych badań było ustalenie możliwości wykorzystania klasycznej mikroskopii epifluorescencyjnej w obrazowaniu biofilmów. W tym celu porównano różnorodne techniki barwienia oraz mikroskopowania. Analizy prowadzono w oparciu o preparaty maty mikrobialnej i biofilmu międzyzębowego. Obrazowanie w różnych warstwach preparatów wykazało występowanie istotnych ograniczeń, związanych z konwolucją wywołaną głębią ostrości stosowanych układów optycznych. Jednocześnie wykazano wysoką użyteczność poszczególnych form barwienia fluorowego w wizualizacji komórek drobnoustrojów w głębokich warstwach biofilmu (Rys. 11, 12).



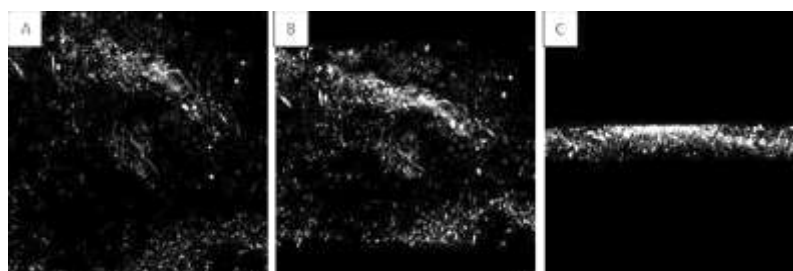
Rysunek 9. Barwienie oranżem akrydyny: A – mikroskop konfokalny, filtr emisyjny 1; B – mikroskopie konfokalny, filtr emisyjny 2; C – mikroskopie konfokalny, nałożone obrazy filtrów 1 i 2 przez oprogramowanie dołączone do mikroskopu; D – mikroskopie fluorescencyjny



Źródło: Opracowanie własne.

W kolejnym etapie badań wykorzystano specjalistyczne oprogramowanie umożliwiające przeprowadzanie dekonwolucji. Wykorzystując różne zakresy obrazowania wertykalnego od jednego do 3  $\mu\text{m}$  odległości między warstwami, ustalono optymalne warunki obrazowania biofilmu. Biorąc pod uwagę względy praktyczne, między innymi czas analizy, za optymalne uznano tworzenie zestawów zdjęć warstwowych z odstępem co 2  $\mu\text{m}$ . Porównanie różnych typów oprogramowania, wykazało pewne różnice. Najlepsze efekty uzyskano dla pakietów oprogramowania HF. Szczególnie szybkość działania algorytmów oraz efekt końcowy dekonwolucji oraz złożenie obrazu były w pełni satysfakcjonujące (Rys. 13, 14).

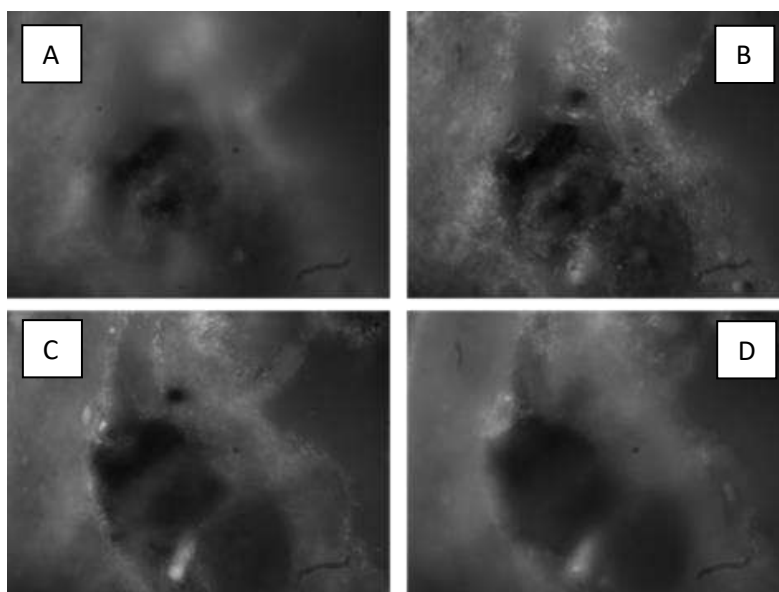
Rysunek 10. Pochylenie zdjęć względem osi preparatu: A – 0° pochylenia; B – 45° pochylenia; C – 90° pochylenia



Źródło: Opracowanie własne.

W badaniach podjęto również próbę analizy biofilmu bakteryjnego w preparatach natywnych, z wykorzystaniem mikroskopu wyposażonego w zestaw realizujący kontrast dyferencjalo-interferencyjny DIC (Rys. 15). Obrazowanie w tej technice mikroskopowej obarczone jest znacznym efektem konwolucyjnym, co ogranicza możliwość jego stosowania w analizach biofilmów bakteryjnych.

Rysunek 11. Mata mikrobialna, preparat barwiony zestawem Live/Dead. A - pierwszy punkt ostrości; B - 5  $\mu\text{m}$  w głąb preparatu; C - 10  $\mu\text{m}$  w głąb preparatu; D - 15  $\mu\text{m}$  w głąb preparatu

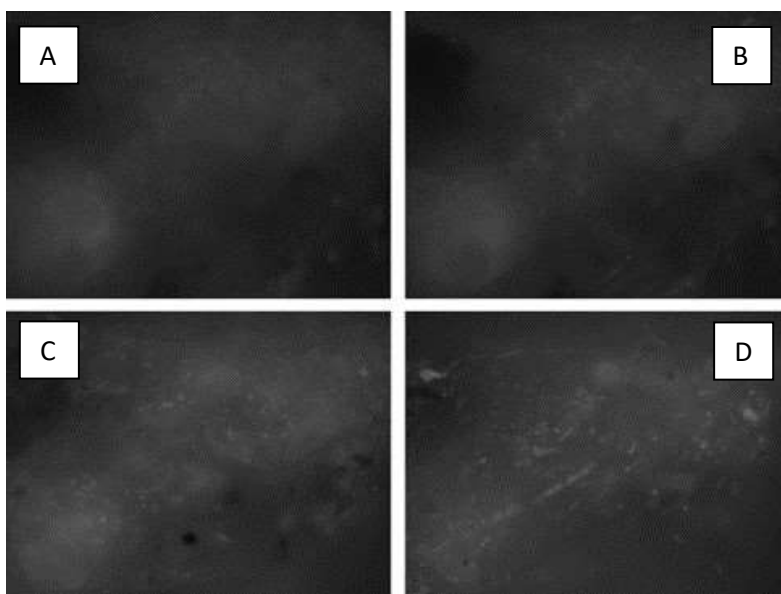


Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

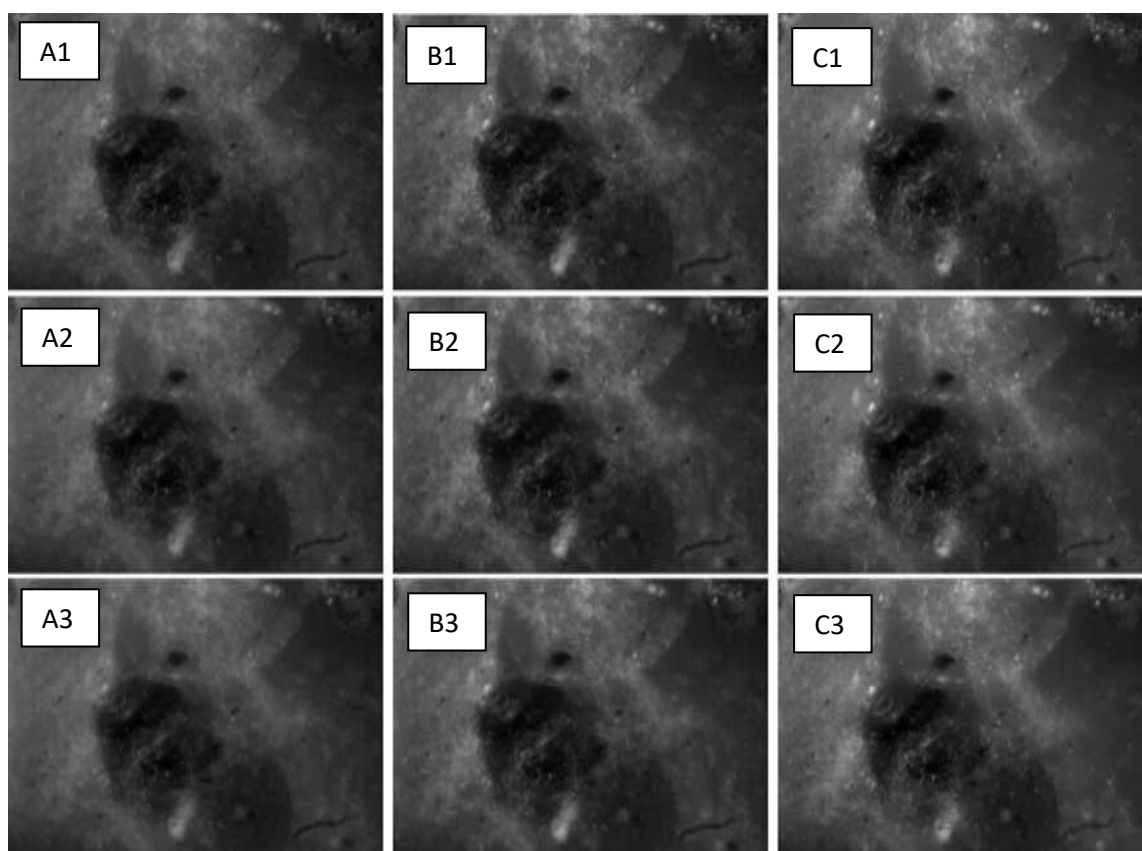
Biofilmy i konglomeraty mikroorganizmów stanowią przedmiot badań od wielu lat. Stosunkowo dobrze poznana została rola biofilmu w ekosystemach naturalnych. Wskazuje się, że konsorcja bakteryjne, umożliwiają realizację różnorodnych strategii życiowych (Klatt i in. 2016; Ley i in. 2006; Stal 2007). Szczególnie ważną jest rola biofilmu jako swoistego refugium, który ochrania kolonizujące go drobnoustroje (Seckbach i Oren 2010; Stal 2000). W środowiskach ekstremalnych, biofilm ogranicza działanie niekorzystnych warunków i sprzyja rozwojowi mikroorganizmów. Drobnoustroje, tworzące biofilmy w środowiskach naturalnych, zazwyczaj są heterogennymi konsorcjami, w których poszczególne zespoły odpowiedzialne są za istotne funkcje ekologiczne (Baumgartner i in. 2006; Falcón i in. 2007; Pearl i in. 2000). W toku badań własnych, potwierdzono istotną złożoność badanych konsorcjów bakteryjnych.

Rysunek. 12. Mata mikrobialna, preparat barwiony DAPI. A - pierwszy punkt ostrości; B - 5  $\mu\text{m}$  w głąb preparatu; C - 10  $\mu\text{m}$  w głąb preparatu; D - 15  $\mu\text{m}$  w głąb preparatu



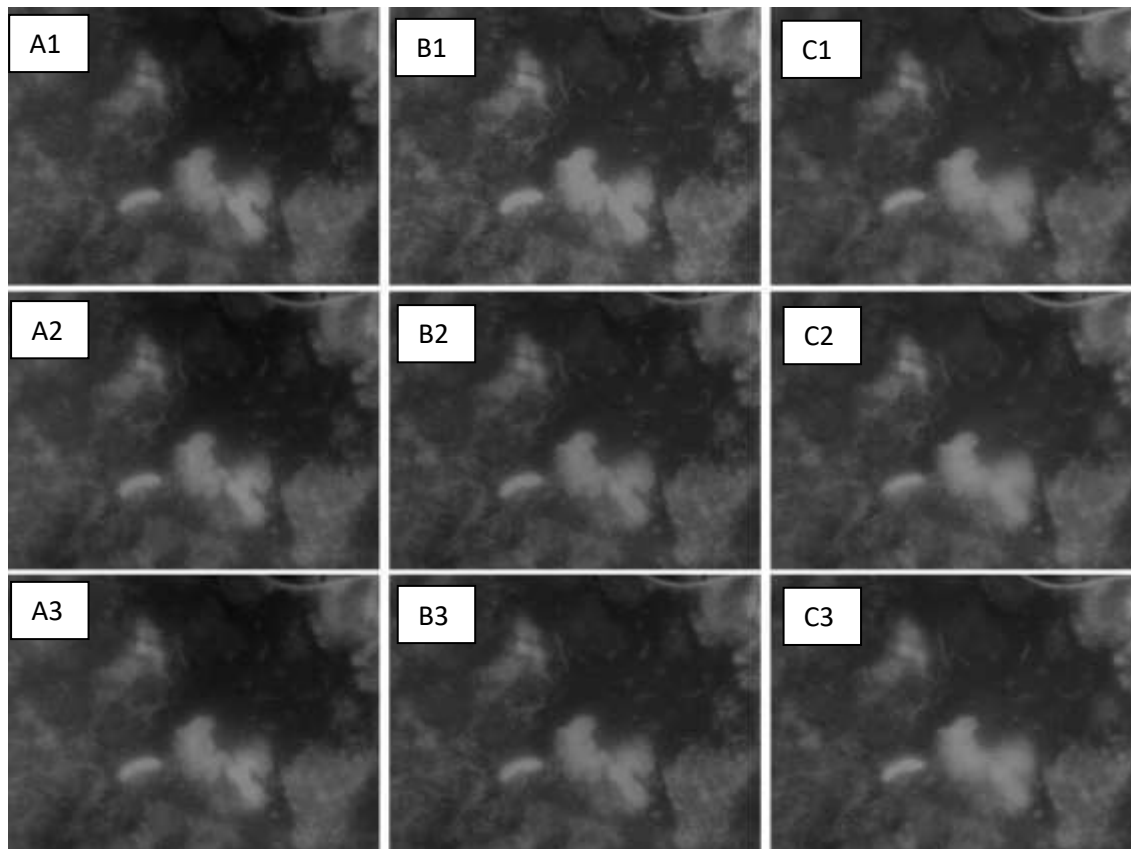
Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 13. Porównanie wyników złożenia zdjęć w różnych programach z wykorzystaniem zdjęć wykonywanych z różnym odstępem pomiędzy głębokościami preparatu, mata mikrobialna, barwienie OA. A – Z.S.; B- H.F.; C – A.P.; 1 – Zdjęcia składowe co 1  $\mu\text{m}$  głębokości; 2 – Zdjęcia składowe co 2  $\mu\text{m}$  głębokości; 3 – Zdjęcia składowe co 3  $\mu\text{m}$  głębokości



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 14. Porównanie wyników złożenia zdjęć w różnych programach z wykorzystaniem zdjęć wykonywanych z różnym odstępem pomiędzy głębokościami preparatu, biofilm przyzębowy, barwienie DAPI. A – Z.S.; B- H.F.; C – A.P.; 1 – Zdjęcia składowe co 1  $\mu\text{m}$  głębokości; 2 – Zdjęcia składowe co 2  $\mu\text{m}$  głębokości; 3 – Zdjęcia składowe co 3  $\mu\text{m}$  głębokości

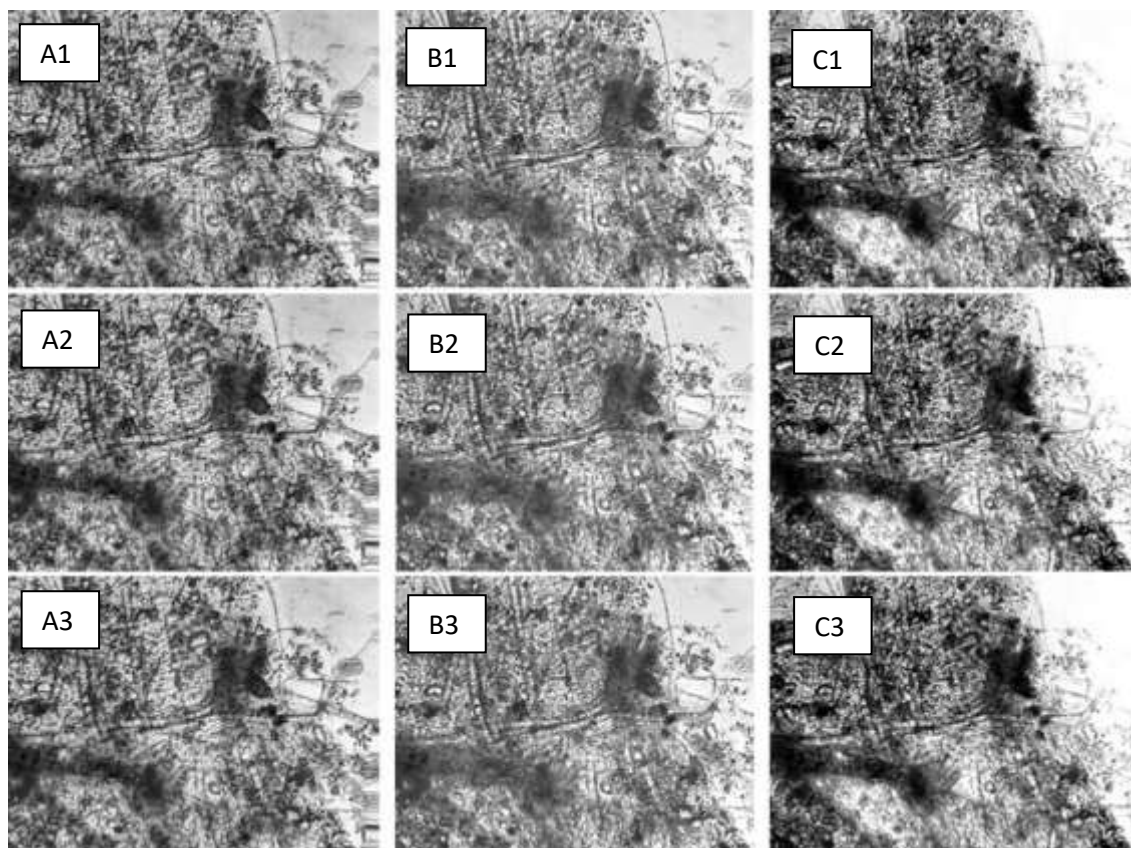


Źródło: Opracowanie własne.

Zastosowane metody mikroskopowe potwierdziły istotną rolę tych technik w ocenie struktury biofilmów i mat mikrobialnych. Mikroskopia fluorescencyjna jest jedną z najbardziej preferowanych współcześnie technik obrazowania (Jeux i Lebaron 2000; Renz 2013). Umożliwia prowadzenie różnorodnych analiz jakościowych i ilościowych. Jedną z najistotniejszych zalet jest możliwość różnicowania mikroobektów, przy wykorzystaniu różnorodnych barwników fluoroforowych (Meyer i Drawkin 2007). Analizy fluorescencyjne są szczególnie przydatne w badaniach heterogennych strukturalnie i funkcjonalnie układów mikrobiologicznych. Badania własne potwierdziły ogromne możliwości zastosowania tych technik w analizach konglomeratów bakteryjnych. Wykazano, że duży kontrast wizualny pomiędzy obiektami i tłem, umożliwia precyzyjną analizę struktury biofilmów. Najistotniejszym elementem technik fluorescencyjnych jest stosowanie odpowiednich metod barwienia. Współcześnie do dyspozycji badaczy są różnorodne fluoroforowe barwniki, których użycie pozwala obrazować badany materiał mikrobiologiczny (Giempanis i in. 2006). Zestaw

dostępnych barwników stale się powiększa, co umożliwia dobranie odpowiedniego markera do specyfiki badanych organizmów. W ostatnich latach powstało wiele zestawów barwiących, które umożliwiają oznaczanie aktywności i żywotności mikroorganizmów. Ciekawą propozycją jest stosowanie tak zwanych sond biochemicznych, w których fluorochromy skoniugowane są substratami pozwalającymi na efektywną detekcję aktywnych enzymatycznie komórek (Harstein i Schwille 2007). W toku badań własnych wykazano znaczną przydatność tego typu zestawów barwiących w ocenie heterogennych układów mikroorganizmów. Zaletę tego typu barwienia wykazano w ocenie biofilmu przyzębowego. Technika Live/Dead pozwoliła zróżnicować komórki żywe i martwe. W ocenie żywotności konsorcjów bakteryjnych zasiedlających tkanki tego typu, ocena ma istotne znaczenie diagnostyczne (Drunnen 2012).

Rysunek 15. Porównanie wyników złożenia zdjęć w różnych programach z wykorzystaniem zdjęć wykonywanych z różnym odstępem pomiędzy głębokościami preparatu, mata mikrobialna, kontrast Nomarskiego. A – Z.S.; B-H.F.; C – A.P.; 1 – Zdjęcia składowe co 1  $\mu\text{m}$  głębokości; 2 – Zdjęcia składowe co 2  $\mu\text{m}$  głębokości; 3 – Zdjęcia składowe co 3  $\mu\text{m}$  głębokości



Źródło: Opracowanie własne.

Techniki fluorescencyjne ulegają ciągłym modyfikacjom dotyczącym wykorzystywanego sprzętu i materiałów. W badaniach heterogennych układów

multiwarstwowych, ciekawą propozycją technologiczną jest mikroskopia konfokalna (Lawrence i in. 1991). Badania własne w pełni potwierdziły użyteczność tego typu technologii. Zautomatyzowana praca mikroskopu konfokalnego związana z pracą mechanizmów stolika, obsługą optyki i doбором źródeł światła, czyni pracę bardzo efektywną. W trakcie badań własnych wykazano jednak pewne ograniczenia związane z doбором parametrów wzbudzenia i emisji światła fluorescencyjnego, w przypadku użycia niestandardowych fluorochromów. Istotą pracy konfokalnego mikroskopu jest oprogramowanie - zarówno sterujący pracą mikroskopu, jak również analizą zebranych danych. Zasada działania tego typu mikroskopu, polegająca głównie na analizie wielu obrazów pobranych w osi wertykalnej, daje duże możliwości badawcze (Neu i in. 2010). Dobór odpowiednich parametrów związanych z obrazowaniem, m. in. poprzez określenie gęstości zbieranych warstw, ma decydujące znaczenie w efektach końcowych analizy. Atuty mikroskopu konfokalnego są trudne do przecenienia - wydają się idealnym narzędziem w badaniach heterogennych konsorcjów bakteryjnych. Potwierdzają to badania własne, w których udowodniono wszystkie te zalety. Mimo niekwestionowanych walorów, mikroskopia konfokalna ma swoje ograniczenia, do których zaliczyć można: cenę, skomplikowanie obsługi oraz małą dostępność (Cardinale 2014).

W badaniach własnych podjęto próbę opracowania protokołów metodycznych umożliwiających wielowarstwową analizę biofilmu bakteryjnego w mikroskopach fluorescencyjnych. Tego typu analizy są zdecydowanie prostsze w wykonaniu, a dostępność mikroskopów fluorescencyjnych jest znacznie większa. Uzyskane w toku badań porównawczych dane wskazują, że ten typ analiz obrazowych jest w pełni zasadny. Badania biofilmu klinicznego i mat mikrobialnych wykazały porównywalne obrazowanie materiałów wielowarstwowych w zastosowanych technikach. Szczególnie porównywalne efekty uzyskano w barwieniu oranżem akrydynowym. Poprzez wykorzystanie w badaniach różnego rodzaju oprogramowania specjalistycznego do analizy obrazów uzyskano odmienne wyniki, w zależności od danego programu. Wykazano istotne różnice w algorytmach dekonwolucyjnych, które odgrywają zasadniczą rolę w tego typu procedurach. Dobór techniki fluorescencyjnej oraz odpowiednie wsparcie informatyczne, ma decydujące znaczenie w analizach biofilmów i mat mikrobialnych.

## **Podsumowanie**

Przeprowadzone badania wykazały dużą przydatność technik fluoroforowych w analizach konsorcjów mikroorganizmów. W zależności od stosowanych metod barwienia, możliwa jest obserwacja różnych cech badanego konsorcjum.

Szczególnie wysoką przydatność techniki mikroskopii konfokalnej wykazano w badaniach złożonej, heterogennej maty mikrobialnej. Brak efektu rozmycia tła, umożliwia uzyskanie bardzo dobrego obrazowania w osi wertykalnej.

Wykorzystanie specjalistycznego oprogramowania wykazało możliwość jego zastosowania w badaniach biofilmów bakteryjnych z użyciem mikroskopów epifluorescencyjnych. Wykazano znaczne różnice w pracy testowanego oprogramowania, szczególnie w odniesieniu do niwelowania zjawiska konwolucji.

## Literatura

- Allen R.D., David G.B., Nomarski G. 1969. *The Zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted light microscopy*. Z. Wiss. Mikrosk. 69: 193-221.
- Baj J., Markiewicz Z. 2012. *Biologia molekularna bakterii*. PWN, Warszawa.
- Bartoszek N., Rosowski M. 2017. *Techniki mikroskopowe w badaniach biologicznych. Microscopic techniques in biological research*. Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski, 910: 12 – 21.
- Baumgartner L.K., Reid R.P., Dupraz C., Decho A.W., Buckley D.H., Spear J.R., Przekop K.M., Visscher P.T. 2006. *Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries*. Sediment Geol; 185: 131–145.
- Bayer A. 1871. *Uerein neue Klasse von Farbstoffen (On a new class of dyes)*. BER DTSCHEM GES, 4: 555 – 558.
- BD BBL Acridine Orange Stain (Barwnik oranż akrydyny). 2017. <http://www.bd.com/resource.aspx> (09.2018).
- Bjarnsholt T. 2013. *The role of bacterial biofilms in chronic infections*. APMIS, 121: 1 – 58.
- Brutkowski W. 2013. *Mikroskopia konfokalna a mikroskopia szerokiego pola – dwa podejścia do badań przyżyciowych*. KOSMOS, 62(2): 171-180.
- Cardinale M. 2014. *Scanning a microhabitat: plant-microbe interactions revealed by confocal laser microscopy*. Front. Microbiol., 5: 94.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. 1994. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 263 (5148): 802-805.
- Choong S., Whitfield H. 2000. *Biofilms and their role in infections in urology*. BJU INT, 86: 935 – 941.
- Drummen G.P.C. 2012. *Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques – Illuminating Biological and Biomedical Research*. Molecules 2012, 17: 14067 – 14090.
- Falcón L.I., Cerritos R., Eguiarte L.E., Souza V. 2007. *Nitrogen fixation in microbial mat and stromatolite communities from Cuatro Ciénegas México*. Microb Ecol; 54: 363–373.
- Gest H. 2004. *The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society*. Notes Rec R Soc Lond; 58(2): 187 – 201.
- Giepmans B.N., Adams S.R., Ellisman M.H., Tsien R.Y. 2006. *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. Science. 14(312) (5771): 217-224.

- Gilbert P., Allison D.G., Mcbain A.J. 2002. *Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?* J Appl Microbiol, 92: 98-110.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. 2009. *Evolving concepts in biofilm infections.* Cell Microbiol, 11: 1034-1043.
- Haustein E., Schwille P. 2007. *Trends in fluorescence imaging and related techniques to unravel biological information.* HFSP Journal, 1(3): 169-180.
- Houdt van R., Michiels C.W. 2010. *Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface.* J. Appl Microbiol, 109: 1117-1131.
- Joux F., Lebaron P. 2000. *Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level.* Microbes Infect. 2000; 2(12): 1523-1535.
- Kalicińska A., Tyski S. 2009. *Analiza wzrostu biofilmu Pseudomonas aeruginosa w zależności o warunków namnażania szczepów i barwienia biofilmów.* Med Dośw Mikrobiol, 61: 243-252.
- Klatt J.M., Meyer S., Hausler S., Macalady J.L., se Beer D., Polerecky L. 2016. *Structure and function of natural sulphide-oxidizing microbial mats under dynamic input of light and chemical energy.* ISME J; 10: 921-933.
- Koźwzan B. 2011. *Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania.* Ochr Środ, 33(4): 3-14.
- Kucia M. 2013. *Metody Badań Mikroświata.* Wszechświat, 114(10-12): 364- 372.
- Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., Caldwell D.E. 1991. *Optical sectioning of microbial biofilms.* J Bacteriol, 173: 6558-6567.
- Leewenhoek A. 1677. *Observation, communicated to the publisher by Mr. Antony van Leewenhoek, in a Dutch letter of the Octob. 1676 here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well-sea and snow water; as also in water wherein pepper had lain infused.* Phil. Trans. 12: 821-831.
- Ley R.E., Harris K., Wilcox J., Spear J.R., Miller S.R., Bebout B.M., Maresca J.A., Bryant D.A., Sogin M.L., Pace N.R. 2006. *Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat.* Appl Environ Microbiol; 72(5): 3685-3695.
- Madsen J.S., Murrølle M., Hansen L.H., Sørensen S.J. 2012. *The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer.* PATHOG DIS, 65: 183- 195.
- Masters B.R. 2009. *History of the Electron Microscope in Cell Biology.* [w:] *Encyclopedia of Life Sciences (ELS).* John Wiley & Sons, Ltd, Chester.
- Meyer P., Dworkin J. 2007. *Applications of fluorescence microscopy to single bacterial cells.* Res Microbiol. 58(3): 187-194.
- Nagar E., Schwarz R. 2015. *To be or not to be planktonic? Self-inhibition of biofilm development.* Environ Microbiol, 17: 1477-1486.
- Neu T.R., Manz B., Volke F., Dynes J.J., Hitchcock A.P., Lawrence J.R. 2010. *Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems.* FEMS Microbiol Ecol, 72(1): 1-21.
- Nomarski G. 1957. *From phase contrast to contrast by interference.* [Du contraste de phase au contraste par interferences.]. Revue d'Hématologie, 12(4): 439-442.



- Renz M. 2013. *Fluorescence Microscopy – A Historical and Technical Perspective*. CYTOM PART A83A: 767- 779.
- Sadekuzzaman M., Yang S., Mizan M.F.R., Ha S.D. 2015. *Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms*. Compr Rev Food Sci F, 14: 491- 509.
- Seckbach J., Oren A. (red.). 2010. *Microbial Mats: Modern and ancient microorganisms in stratified systems, cellular origin, life in extreme habitats and astrobiology*. Dordrecht: Springer.
- Stal L.J. 2000. *Cyanobacterial mats and stromatolites*. [w:] Whitton B.A. Potts M. (ed.) *The ecology of cyanobacteria*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands: 61-120.
- Stal L.J. 2007. Cyanobacteria, diversity and versatility, clues to life in extreme environments. W: J. Seckbach (ed.) *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, Vol. 11. Springer, Dordrecht, Netherlands: 659-680.
- Stal L.J., van Gemerden H., Krumbein W.E. 1985. *Structure and development of a benthic marine microbial mat*. FEMS MICROBIOL ECOL, 31: 111- 125.
- Tsien R.Y. 1998. *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem 67:509 – 44 van Gemerden H. 1993. *Microbial mats: A joint venture*. Mar Geol; 113: 3-25.
- Wimpenny J., Manz W., Szewczyk U. 2000. *Heterogeneity in biofilms*. FEMS Microbiol Rev, 24: 661- 667.
- Zernike F. 1942. *Phase contrast, a new method for observation of transparent objects*. Physica; 9, 7: 686-698.

## **Wymagania pokarmowe grzybów w kontekście zasad konstruowania podłoży diagnostycznych**

Nutritional requirements of fungi in the context of the constructionn diagnostic media

Tomasz Bałabański

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Studenckie Koło Naukowe Mykologów  
Opiekun: dr hab Anna Biedunkiewicz

### **Abstract**

One of the important stages in laboratory research is the set up and cultivate of fungal cultures on basic and specific diagnostic media. Full mycological analysis should therefore use both modern molecular techniques and elements of classical diagnostics.

The publication is a review of literature, supported by many years of work experience in a university laboratory with microfungi. The aim of the publication is to present issues related to culture media used in mycological diagnostics and rules of their construction using the information on the properties and nutritional requirements of fungi.

Proper selection of the substrate components for the nutritional requirements of fungi plays the main role in the successful implementation of the diagnostic process. The choice of ingredients for constructing the microbiological medium is also dictated by the purpose of the planned research and obtaining a specific ecological group of fungi in the microbiological culture.

**Keywords:** culture, diagnostic, medium, mycology, fungi

### **Wstęp**

Zgodnie z definicją stosowaną w medycynie i dziedzinach pokrewnych, diagnostyka to nauka o metodach rozpoznawania chorób (Kopaliński 1986). W kontekście mikrobiologicznym diagnostyka jest pojęciem szerszym, które należy rozumieć jako naukę o metodach rozpoznawania czynników mikrobiologicznych, tj. mikroorganizmów wywołujących określone zmiany, nie tylko u organizmów żywych.

Diagnostyka chorób wywołanych przez grzyby, wykorzystująca wyłącznie wywiad z pacjentem i analizę objawów klinicznych, jest niezwykle problematyczna, ze względu na niecharakterystyczne objawy infekcji grzybiczych (Bochenek i in. 2007). Pomocne w tym procesie stają się elementy diagnostyki klasycznej, obejmujące metody hodowlane, istotne dla skutecznej realizacji toku diagnostycznego. Hodowla wymaga określonych warunków, może

być prowadzona wyłącznie w przygotowanych i wyposażonych do tego laboratoriach, na odpowiednio zaprojektowanych podłożach (Zmysłowska 2003).

Obecnie można zauważyć tendencję do częstszego stosowania metod molekularnych ze względu na szybkość uzyskiwania wyników, która ma kluczowe znaczenie dla skutecznego przebiegu leczenia, jednak właściwy tok diagnostyczny powinien uwzględniać zarówno metody molekularne, jak i klasyczne (Bałabański 2016). Precyzyjna i odpowiednio wczesna diagnostyka mykologiczna, ma kluczowe znaczenie we wdrażaniu prawidłowego leczenia, a co za tym idzie, zmniejszaniu liczby powikłań i zejść śmiertelnych będących skutkiem infekcji grzybiczych (Bochenek i in. 2007).

Publikacja ma charakter przeglądowy, a jej celem jest omówienie zasad doboru składników i konstrukcji podłoży stosowanych w diagnostyce mykologicznej, z uwzględnieniem właściwości i wymagań pokarmowych grzybów.

### **Wymagania pokarmowe grzybów**

Grzyby to heterogenna, polifiletyczna grupa organizmów eukariotycznych, o heterotroficznym metabolizmie, odżywiająca się fagotroficznie (Protozoa) lub osmotroficznie (Chromista, Fungi) (Dynowska 2018). Osmotrofia polega na wydzielaniu przez grzyby egzoenzymów do podłoża, co prowadzi do częściowego lub całkowitego rozkładu związków organicznych, którego produkty pobierane są na drodze osmozy (Dynowska 2018, Dynowska 1995). Uwzględniając trofizm, grzyby mogą być saprotrofami, gdy wykorzystują martwą materię organiczną zawartą w podłożu (Dynowska 2018; Hawley i in. 2014; Zmysłowska 2003) lub pasożytami, gdy źródło pokarmu stanowi organizm żywiciela (Dynowska 2018, Zmysłowska 2003). Grzyby, podobnie jak inne organizmy żywe, wykazują zapotrzebowanie na szereg substancji o zróżnicowanym charakterze chemicznym, niezbędnych do prowadzenia podstawowych przemian fizjologicznych i biochemicznych. Do podstawowych związków chemicznych, niezbędnych do wzrostu grzybów, należy zaliczyć wodę, która umożliwia transport rozpuszczonych w niej substancji odżywczych (Nicklin i in. 2007; Shlegel 2005).

Rozbudowany i plastyczny aparat enzymatyczny umożliwia grzybom wykorzystanie źródeł biogenów o różnym poziomie złożoności. Pojawienie się niewielkiej ilości nowego substratu lub nawet zmiana proporcji składników odżywczych podłoża, stymulują ich aparat enzymatyczny do produkcji nowych enzymów (Dynowska 2018). Określone pierwiastki mogą występować w podłożu w formach nieprzyswajalnych dla grzybów, które najczęściej wykorzystują makro- i mikroelementy w formie związków chemicznych lub jonów, co nie jest jednak regułą (Lilly, Barnett 1959).

Istnieje możliwość określenia jakie pierwiastki są niezbędne grzybom do wzrostu, poprzez zastosowanie odpowiednich metod laboratoryjnych. Najbardziej podstawowa z nich polega na usunięciu danego pierwiastka z pożywki. Obecnie wiadomo, że grzyby wykazują zapotrzebowanie na około 17 pierwiastków (Lilly, Barnett 1959).

Dominująca część makroelementów, na które grzyby wykazują zapotrzebowanie, ma charakter niemetaliczny. Wśród nich wymienia się: tlen, węgiel, azot, wodór, siarkę i fosfor. Z kolei do niezbędnych grzybom mikroelementów zalicza się między innymi: żelazo, cynk, magnez, potas, gal, miedź, wanad, wapń, molibden, mangan i skand (Lilly, Barnett 1959). Większość wymienionych makro- i mikroelementów jest dostępna w środowisku w ilości wystarczającej. Jedyne pierwiastki, które występują w niedoborze, to fosfor i żelazo. Grzyby wykształciły jednak liczne mechanizmy umożliwiające pozyskiwanie tych substancji, na przykład: wytwarzanie sideroforów, kwasów chelatujących, czy fosfataz (Nicklin i in. 2007).

Jednym z kluczowych dla wzrostu grzybów pierwiastków jest tlen. Dotychczas nie odnotowano wśród grzybów bezwzględnych beztlenowców (Lilly, Barnett 1959). Zazwyczaj grzyby występują w środowisku tlenowym, niemniej istnieją grupy takie jak drożdże, zdolne do prowadzenia fermentacji i wzrastania w środowisku o niskiej zawartości tlenu (Nicklin i in. 2007).

Ze względu na tlenowy metabolizm węglowodanów i możliwość prowadzenia glikolizy, jako źródło węgla, grzyby mogą wykorzystywać polisacharydy, takie jak skrobia czy celuloza (Nicklin i in. 2007; Shlegel 2005). Przeciętna zawartość węgla w suchej masie grzybni wynosi 45%, co świadczy o tym, że pierwiastek ten stanowi, obok azotu i tlenu, najważniejszy biogen dla grzybów (Lilly, Barnett 1959).

Kolejnym istotnym pierwiastkiem jest azot. Grzyby pozyskują go z rozkładu peptydów, białek, peptonów, rzadziej wiążą azot atmosferyczny (Nicklin i in. 2007).

Grzyby wymagają do wzrostu dodatkowych czynników nazywanych również uzupełniającymi. Wśród nich wyróżnia się sterole, kwas foliowy i nikotynowy, ryboflawinę, tiaminę, biotynę i inne substancje chemiczne (Nicklin i in. 2007).

Wymienione pierwiastki niezbędne i czynniki uzupełniające stanowią jedno z podstawowych kryteriów branych pod uwagę przy konstrukcji podłoży hodowlanych, dedykowanych danej grupie grzybów. Odgrywają one kluczową rolę w kształtowaniu wielu procesów fizjologicznych, wśród których można wymienić syntezę witamin, barwników, czy wzrost, istotny z perspektywy właściwego rozwoju hodowli (Lilly, Barnett 1959).

## Podział podłoży diagnostycznych

Podłoże mikrobiologiczne to mieszanina substancji odżywczych i soli mineralnych, o określonym odczynie i ciśnieniu osmotycznym, służąca do hodowli mikroorganizmów. Podłoża stosowane w diagnostyce mykologicznej dzieli się na podstawie zróżnicowanych kryteriów (Tab. 1). Kluczowy w diagnostyce jest świadomy dobór konkretnego podłoża, warunkujący prawidłowy przebieg toku diagnostycznego (Zmysłowska 2003).

Tabela 1. Wybrane kryteria podziału podłoży

KRYTERIUM	PODŁOŻA
Konsystencja	Stałe Płynne Półpłynne
Skład	Minimalne Proste Wzbogacone
Przeznaczenie	Izolacyjne Wzrostowe Transportowe Transportowo-wzrostowe
Specyfika działania	Wybiórcze Wybiórczo-różnicujące
Hodowane mikroorganizmy	Do hodowli drożdży Do hodowli grzybów pleśniowych

Źródło: Bałabański 2016.

Hodowla na podłożach jest jednym z elementów toku diagnostycznego, umożliwiającą identyfikację drobnoustrojów z wykorzystaniem cech makro- i mikroskopowych (Marczewska, Mysłowska 2013). Aby proces hodowli i wstępnej identyfikacji przebiegał właściwie, konieczne jest uzyskanie kultur jednogatunkowych, nazywanych inaczej czystymi lub aksenicznymi, co nie jest procesem prostym lecz zależnym od wielu czynników. Istotne jest, aby prowadzić posiew w sposób zapobiegający zanieczyszczeniu podłoża niepożądaną mikrobiotą. W tym celu zakładanie hodowli prowadzi

się w odpowiednio czystych pomieszczeniach, z użyciem jałowych podłoży i narzędzi (Zmysłowska 2003).

Grzyby stanowią grupę organizmów o bardzo zróżnicowanych wymaganiach pokarmowych i środowiskowych. Podłoża dedykowane diagnostyce mykologicznej powstają z uwzględnieniem wymagań danego gatunku, a nawet szczepu (Bałabański 2016). Właściwy wybór podłoża i metody hodowlanej jest więc uzależniony od natury mikroorganizmu. Na przykład inne metody wykorzystuje się do hodowli pasożytów obligatoryjnych, a inne do pasożytów okolicznościowych. Nie ma uniwersalnego podłoża dla wszystkich drobnoustrojów (Mazurkiewicz-Zapałowicz 2011).

### **Zasady konstruowania podłoży diagnostycznych i parametry hodowli drobnoustrojów**

Związki organiczne i nieorganiczne, wchodzące w skład pożywek, warunkują rozwój ściśle określonych mikroorganizmów (Rys. 1). Podłoża spełniają różne zadania, w zależności od kierunku badań i celu, jaki stawia sobie diagnosta laboratoryjny (Tab. 1). Mogą być wykorzystywane między innymi do namnażania, hodowli i izolacji mikroorganizmów a w kolejnych etapach toku diagnostycznego, do identyfikacji drobnoustrojów. Na odpowiednio przygotowanych podłożach można badać dodatkowe właściwości grzybów o charakterze biochemicznym, ekologicznym i fizjologicznym (Zmysłowska 2003) (Rys. 1).

Zadaniem diagnosty, w początkowym etapie toku diagnostycznego, jest izolacja drobnoustrojów wywołujących określone zmiany środowiskowe lub chorobowe. W tym celu przeszczepia się mikroorganizmy z badanego materiału na podłoża diagnostyczne lub wtórnie, z jednych podłoży na inne (Kwiatkiewicz i in. 2014). Zakładanie hodowli mikrobiologicznych, jako jeden z elementów diagnostyki klasycznej, ma więc ogromne znaczenie dla prawidłowego przebiegu toku diagnostycznego. Analizowane cechy fizjologiczne i morfologiczne, takie jak: tempo wzrostu, właściwości enzymatyczne, czy morfologia kolonii, są pomocne w identyfikacji taksonomicznej grzybów, zwłaszcza na poziomie gatunku (Kurnatowska 2006).

Dobór składników i parametrów pożywki będzie uzależniony nie tylko od właściwości mikroorganizmów i ich wymagań pokarmowych, ale także od wybranego kierunku badań (Frederick i in. 1974) (Rys. 1). Na przykład dla obligatoryjnych anaerobów niezbędne będą takie składniki pożywki jak: azot, wodór i dwutlenek węgla. Znaczenie mają również parametry inkubacji, wśród których należy wymienić czas jej trwania, wilgotność i temperaturę (Drzewiecki 2007). Hodowle grzybów należy prowadzić w warunkach umożliwiających utrzymanie żywotności szczepów, zapobiegających zmianom cech morfologicznych

i fizjologicznych hodowanych grzybów oraz kontaminacji hodowli przez niepożądane grupy drobnoustrojów (Mazurkiewicz-Zapałowicz 2011).

Mimo szerokiego zróżnicowania podłoży, istnieje zespół cech uniwersalnych, które musi wykazywać każda pożywka. Do standardowych parametrów, które muszą spełniać podłoża wykorzystywane w diagnostyce mykologicznej, zaliczane są: sterylność, klarowność, minimalna zawartość wody na poziomie 30% (Nicklin i in. 2007). Wśród pozostałych cech pożywki wymienia się obecność źródeł węgla, azotu, energii, makro- i mikroelementów, a także określoną zawartość soli mineralnych (Zmysłowska 2003).

Dla grzybów pleśniowych i drożdżoidalnych istotne źródło węgla stanowią cukry takie jak: glukoza, fruktoza, maltoza, sacharoza, laktoza ale również bardziej złożone polisacharydy (Rys. 1). Podłoże musi charakteryzować odpowiednia zawartość cukru, niezbędna grzybom do wzrostu, która nie przekracza poziomu 2%. Grzyby są jednak w stanie pozyskiwać węgiel również z kwasów organicznych i alkoholi, które również mogą stanowić składnik pożywek.

Heterotrofizm grzybów względem azotu powoduje, że w składzie podłoża należy uwzględnić jego odpowiednie źródła. Grzyby najefektywniej przyswajają azot ze związków organicznych. Źródłem azotu są najczęściej: pepton, krew, żelatyna, surowica lub konkretne aminokwasy (Rys. 1). Zawartość związków azotu w podłożach mieści się w zakresie 0,5-2%. Poza organicznymi formami azotu, w pożywkach stosuje się również azot w postaci azotanów i soli amonowych (Zmysłowska 2003).

Istotnym składnikiem podłoży wykorzystywanych w laboratoriach mykologicznych są związki mineralne, będące źródłem makro- i mikroelementów oraz sole mineralne, które dodatkowo wykazują właściwości buforujące i stabilizują ciśnienie osmotyczne pożywki (Zmysłowska 2003) (Rys. 1).

W przypadku konstruowania podłoży wybiórczych i różnicujących w ich składzie, należy uwzględnić czynniki selektywne. Są to specyficzne substancje i związki chemiczne, syntetyczne lub pochodzenia naturalnego, których celem jest stymulacja wzrostu określonych drobnoustrojów lub ograniczenie namnażania i rozwoju innych, niepożądanych (Mazurkiewicz-Zapałowicz 2011) (Rys. 1).

Istnieje wiele substancji wybiórczych, wśród których najczęściej stosowaną grupę stanowią antybiotyki. Przykładem może być stałe podłoże Sabourauda bez czynników selektywnych oraz wybiórcze, z dodatkiem chloramfenikolu lub innych antybiotyków, które ograniczają namnażanie się bakterii (Stankiewicz 1973).

Innym czynnikiem selektywnym, stosowanym w podłożach mykologicznych, jest arbutyna. Niektóre drożdże mogą prowadzić rozkład arbutyny, którego produkty wchodzi

w reakcję z żelazem zawartym w podłożu, umożliwiając w ten sposób obserwację barwnej reakcji. Podłoża mogą być także wzbogacone krwią, która stanowi czynnik różnicujący *Histoplasma capsulatum* od innych grzybów (Kurnatowska 2006).

W celu stymulacji wzrostu grzybów o bardzo wysokich wymaganiach pokarmowych, stosuje się również tak zwane wyciągi, stanowiące bogate źródła substancji odżywczych. Przykładem mogą być: wyciąg ziemniaczany w podłożu glukozowo-ziemniaczanym (PDA), ryżowy w podłożu (RA), mózgowo-sercowy w podłożu (BHI) przeznaczonym do oznaczania *Cryptococcus neoformans* czy wyciąg drożdżowy w podłożu (LNA).

Grzyby charakteryzuje wiele specyficznych cech budowy, które ułatwiają ich identyfikację. Jedną z nich jest zarodnikowanie. Struktura, wielkość i ułożenie zarodników oraz ich liczba, nawet na poziomie szczepów, może stanowić cechę charakterystyczną (Bałabański 2016). Dzięki właściwej kontroli parametrów podłoża i jego składników oraz odpowiednim doborze warunków inkubacji, możliwa jest stymulacja zarodnikowania (Mazurkiewicz-Zapałowicz 2011). Do substancji indukujących sporulację zalicza się estry fosforanowe i niektóre metale, takie jak miedź, molibden, czy cynk. Na przykład *Aspergillus niger* nie jest zdolny do formowania konidiów bez śladowych ilości molibdenu w środowisku. Sporulacja może być również indukowana sztucznie: poprzez modyfikację warunków hodowli lub przeszczepianie grzybów z pożywek bogatych w substancje odżywcze na podłoża ubogie (Stevenson 1972).

Bardzo istotny czynnik, który należy wziąć pod uwagę przy konstruowaniu pożywek, stanowi ich pH. W przypadku grzybów właściwy będzie odczyn kwaśny, przy czym optymalne zakwaszenie będzie zmienne, w zależności od hodowanego gatunku. W przypadku większości gatunków, optymalne pH mieści się w zakresie 4-6 (Nicklin i in. 2007). Odczyn podłoża reguluje się wprowadzając do niego odpowiednie związki buforujące (Zmysłowska 2003) (Rys. 1).

Aby wzrost grzybów był możliwy, podłoże należy inkubować w odpowiedniej temperaturze. Większość grzybów ma charakter mezofilny i wzrasta w temperaturze 5-40°C. Istnieją również gatunki psychrofilne, dla których optymalna temperatura wzrostu nie przekracza 4°C (Nicklin i in. 2007).

Wzrost grzybów zależy również od intensywności światła. Na początku hodowlę prowadzi się zazwyczaj w warunkach ograniczonego dostępu światła. W dalszych etapach ilość docierającego światła może być modyfikowana (Mazurkiewicz-Zapałowicz 2011).

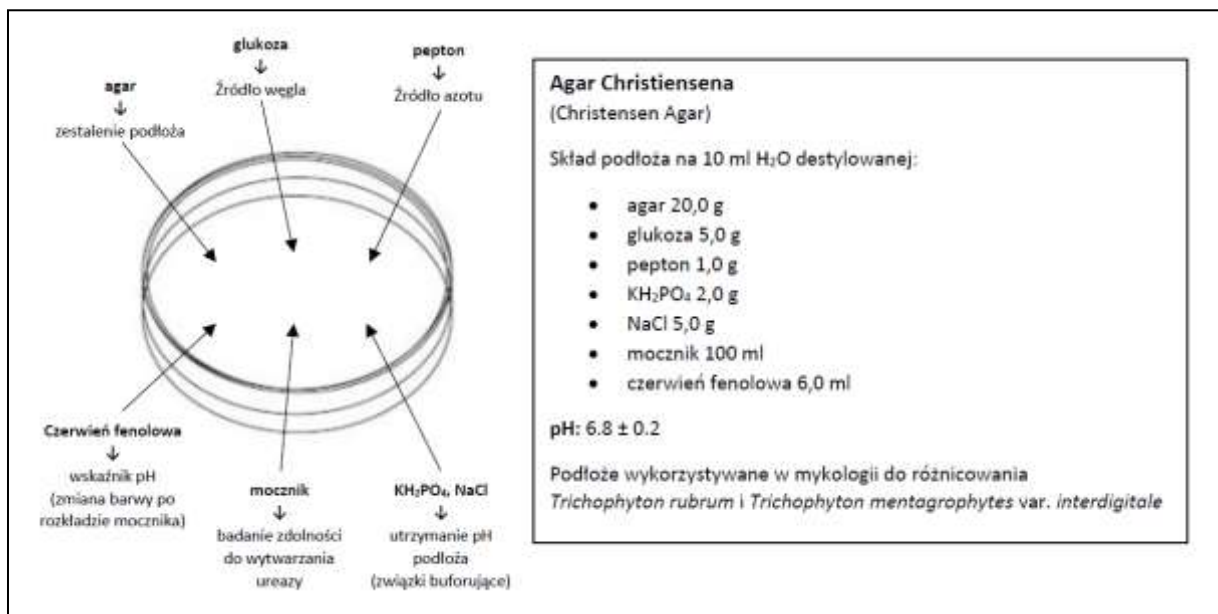
W zależności od stanu skupienia podłoża i jego przeznaczenia, stosuje się różne naczynia jako nośniki. W przypadku diagnostyki mykologicznej hodowle zakłada się na



szalkach Petriego, które umożliwiają analizę makroskopową grzybni, ocenę jej wzrostu oraz uzyskanie kultur jednozarodnikowych. Hodowla w probówkach, na tak zwanych skosach, umożliwia długotrwałe przechowywanie szczepów. W mykologii wykorzystuje się także pożywki płynne do namnażania komórek grzybów drożdżopodobnych, analizy właściwości biochemicznych i zdolności do wytwarzania określonych metabolitów (Mazurkiewicz-Zapałowicz 2011).

Niewłaściwy dobór składników podłoża może zmienić przebieg hodowli, a w konsekwencji prowadzić do błędnych interpretacji w toku diagnostycznym i mylnej diagnozy. Trudność w uzyskaniu wzrostu aksenicznej kolonii danego grzyba na podłożu diagnostycznym, może więc wskazywać na konieczność dodania lub eliminacji z pożywki konkretnego składnika (Rys. 1).

Rysunek 1. Rola poszczególnych składników pożywki na przykładzie wybranego podłoża



Źródło: Opracowanie własne.

## Podsumowanie

Grzyby ze względu na unikalne w świecie organizmów żywych właściwości i dużą plastyczność ekofizjologiczną, stanowią niezwykle zróżnicowaną grupę mikroorganizmów (Kowalski, Patuszka 2017; Krajewska-Kułak i in. 2010). Ze względu na szeroką tolerancję na czynniki środowiskowe i rozbudowany aparat enzymatyczny, występują we wszystkich ekosystemach Ziemi, również tych zmienionych przez człowieka (Buczyńska i in. 2007; Ejdsy i in. 2013).

Z uwagi na możliwość zasiedlania przez grzyby bardzo zróżnicowanych nisz ekologicznych, szeroko rozumiana diagnostyka mykologiczna dzieli się na wiele działów, a w każdym z nich metody klasyczne, spełniają niezwykle istotną rolę. Celem osób prowadzących tok diagnostyczny w laboratorium mykologicznym jest identyfikacja mikrogrzybów powodujących obserwowane zmiany tak szybko, jak to możliwe. Zadanie to wymaga rozległej wiedzy, która pozwala między innymi na właściwy dobór metod badawczych, odpowiednich podłoży diagnostycznych i parametrów hodowli. Rodzaj wykorzystywanego podłoża zależy od specyfiki drobnoustrojów i zadań, które stawia sobie diagnosta. W poszczególnych działach mykologii wykorzystuje się zróżnicowane podłoża, przeznaczone do hodowli konkretnych grup grzybów.

W tym kontekście najistotniejszy jest wybór właściwego podłoża do prowadzonego toku diagnostycznego, co w praktyce przyspiesza pełną diagnostykę i zapewnia wiarygodność uzyskanego wyniku.

## Literatura

- Bałaabański T. 2016. *Podłoża stosowane w mykologii laboratoryjnej i ocena ich przydatności*. Mskr. pracy licencjackiej. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn: 5-40.
- Bochenek M., Rup E., Macura A.B. 2007. *Porównanie wybranych odczynów serologicznych stosowanych w diagnostyce inwazyjnej kandydozy*. Mikol. Lek., 14 (3): 179-183.
- Buczyńska A., Cyprowski M., Piotrowska M., Szadkowska-Stańczyk I. 2007. *Grzyby pleśniowe w powietrzu pomieszczeń biurowych – wyniki interwencji środowiskowej*. Med. Pr., 58 (6): 521-525.
- Drzewiecki A. 2007. *Podstawy diagnostyki bakteriologicznej [w:] Mikrobiologia. Podręcznik dla pielęgniarek, położnych i ratowników medycznych*. PZWL, Warszawa, VIII: 88-90.
- Dynowska M. 1995. *Drożdże i grzyby drożdżopodobne jako czynniki patogenne oraz bioindykatory ekosystemów wodnych*. Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Olsztyn.
- Dynowska M. 2018. *Zmienność natury grzybów i jej znaczenie [w:] Mykologia medyczna*. Edra Urban & Partner, Wrocław: 17-25.
- Ejdys E., Dynowska M., Biedunkiewicz A., Sucharzewska E. 2013. *An Overview of the Species of Fungi Occurring in School Rooms*. Pol. J. Environ. Stud., 22 (6): 1691-1700.
- Neidhardt F., Bloch P., Smith D. 1974. *Culture Medium for Enterobacteria*. J. Bacteriol., 119(3): 736-747.
- Hawley L., Ziegler R. J., Clarke B. L. 2014. *Microbiology & Immunology*. Wolters Kluwers, Philadelphia.
- Kopaliński W. 1986. *Słownik wyrazów obcych i zwrotów obcojęzycznych*. Wiedza Powszechna, Warszawa.
- Kowalski M., Patuszka J. S. 2017. *Effect of ambient air temperature and solar radiation on changes in bacterial and fungal aerosols concentration in the urban environment*. Ann. Agric. Environ. Med., 25 (2): 259-261.

- Krajewska-Kułak E., Łukaszuk C., Gniadek A., Macura A. B., Van damme-Ostapowicz K., Lewko J., Rolka H., Rozwadowska E., Guzowski A. 2010. *Zanieczyszczenia powietrza w pomieszczeniach mieszkalnych, ze szczególnym uwzględnieniem roli grzybów*. *Med. Mycol.*, 17(3): 177-181.
- Kurnatowska A. 2006. *Badania diagnostyczne* [w:] *Mikologia medyczna*. PROMEDI, Łódź, III: 53-78.
- Kwiatek K., Kukier E., Goldsztejn M. 2014. *Normy metodyczne w badaniach mikrobiologicznych łańcucha żywnościowego*. *Życie Wet.*, 89(6): 519-523.
- Lilly V. G., Barnett H. L. 1959. *Fizjologia grzybów*. PWRiL, Warszawa.
- Marczewska J., Mysłowska K. 2013. *Nadzór nad materiałami stosowanymi w badaniach mikrobiologicznych. Cz. 1: Podłoża hodowlane*. LAB Laboratoria, 6: 38-44.
- Mazurkiewicz-Zapałowicz K. 2011. *Makro- i mikroskopowa diagnostyka grzybowych chorób roślin (fitomykoz)* [w:] *Mikologia laboratoryjna. Przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka*. Wyd. UWM, Olsztyn, I: 13-27.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Killington R. 2007. *Grzyby i grupy pokrewne* [w:] *Krótkie wykłady mikrobiologia*. PWN, Warszawa, XIII: 219-239.
- Schlegel H. G. 2005. *Wzrost mikroorganizmów* [w:] *Mikrobiologia ogólna*. PWN, Warszawa: 225-240.
- Stevenson G. 1972. *The biology of fungi, bacteria and viruses*. Edward Arnold, Londyn.
- Zmysłowska I. 2003. *Mikrobiologia ogólna i środowiskowa*. Wyd. UWM, Olsztyn.

## Częstość występowania mikrogrzybów w wybranych częściach ciała myszy laboratoryjnych

The frequency of isolating microfungi from selected ontocenoses of laboratory mice

Sylwia Machcińska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Studenckie Koło Naukowe Mykologów  
Opiekun: dr hab. Anna Biedunkiewicz

### Abstract

Easy adaptation of fungi to changing environmental conditions, as well as low demand for nutrients, make it possible for fungi to settle new ecological niches under favourable conditions. One of them may be laboratory animals, especially since the sterile conditions of animal husbandry do not constitute an obstacle to the development of micro fungi. This is important in the case of research on model organisms, the results of which are used in broadly understood clinical trials. Therefore, the aim of the study was to check the presence of microfungi in natural ontocenoses - the mouth and anus as well as in places of skin breakage - wounds.

The research material were microfungi taken in the form of smears from three ontocenoses, from two types of laboratory mice, i.e. Nude mice characterized by impaired immunity and control strain - Balb. microfungi cultures were carried out in accordance with accepted methods used in mycological laboratories.

The analyzes allowed to state a high percentage of positive trials and showed a large generic diversity of fungi from the groups: mold fungi, yeasts and yeast-like fungi present in the studied ontocenoses. The obtained results prove that fungi are a component of every ecosystem, even maintained in conditions of high microbiological purity, which may pose a threat to the health of model animals.

**Keywords:** microfungi, isolation, ontocenoses, nude, balb, mice

### Wstęp

Gryzonie, a w szczególności myszy, są najbardziej popularnymi zwierzętami modelowymi wykorzystywanymi w nauce. Wśród wielu przyczyn tej uprzywilejowanej pozycji jest ich genetyczna bliskość do ludzi, możliwości genetycznej manipulacji ich genomami i dostępność wielu narzędzi oraz mutantów i szczepów wsobnych (Vanhooren i Libert 2013). To wszystko pozwala na umiejętne zaprojektowanie doświadczenia z uzyskaniem wyników, mogących wpłynąć na rozwój nauki (w tym na leczenie wielu chorób) (Perlman 2016). Dobrym przykładem są myszy szczepu Nude a dokładniej CBy.Cg-Foxn1/cmdb; nagie. Gryzonie te nazywane są często atymicznymi z powodu braku komórek T

układu immunologicznego (Stutman 1974), dlatego też stanowią świetny model do analiz zaburzeń układu odpornościowego, a tym samym możliwości zidentyfikowania mikroorganizmów bytujących w organizmie nie objętym ochroną. Aby móc uzyskać zadowalające wyniki, jako szczepy kontrolne stosuje się genetycznie zaprojektowane odpowiedniki jak np. Balb/c/cmdb, które stanowią bazę porównawczą podczas doświadczenia. Jednak należy pamiętać o tym, że zachowanie odpowiednich warunków hodowlano-bytowych stanowi element warunkujący uzyskanie wiarygodnych wyników badań. Nie przestrzeganie reguł przypisanych do hodowli, może prowadzić do uzyskania fałszywie pozytywnych wyników badań.

Utrzymanie odpowiednich warunków w laboratoriach wydaje się nie stanowić problemu. Jednak nie tylko odpowiednia dieta, dostęp do wody i optymalne warunki bytowe mogą stanowić czynnik zaburzający funkcjonowanie zwierząt laboratoryjnych. Do negatywnych bodźców należy chociażby obecność niektórych urządzeń, które z jednej strony służą do optymalizacji pomieszczenia, a z drugiej strony są źródłem drgań i niepotrzebnego hałasu (Pfaff 1974). Powoduje powstawanie zespołów stresowych i zaburzeń komunikacji między gryzoniami. Również nieumiejętne dobranie ściółki, która stanowi część siedliska zwierząt, może powodować zaburzenia organizmu (w szczególności u myszy z defektami układu odpornościowego) (Stutman 1974). Jeśli dojdzie do skażenia pomieszczenia hodowlanego, u zwierząt tego typu bardzo łatwo może dojść do infekcji mikroorganizmami potencjalnie chorobotwórczymi (a zwłaszcza grzybami). Wiele mikrogrzybów posiada zdolności do wytwarzania biofilmów, które pozwalają na solidne przyleganie do niektórych powierzchni m.in. uszczelek, blatów czy innych sprzętów (Kuhn i in. 2002) a nawet do szkła (Ejdys 2008). Mogą także przetrwać na materiałach silikonowych czy poliakrylamidowych (Lugauskas i in. 2003). Mikroorganizmy te, dzięki obecności przetrwalników, bardzo łatwo adaptują się do ekstremalnych warunków i są w stanie przeżyć nieprawidłowo dobrane procedury higienizacyjne (Ejdys 2009).

Celem pracy było zbadanie obecności mikrogrzybów w wybranych ontocenozach u dwóch szczepów myszy: Nude i Balb.

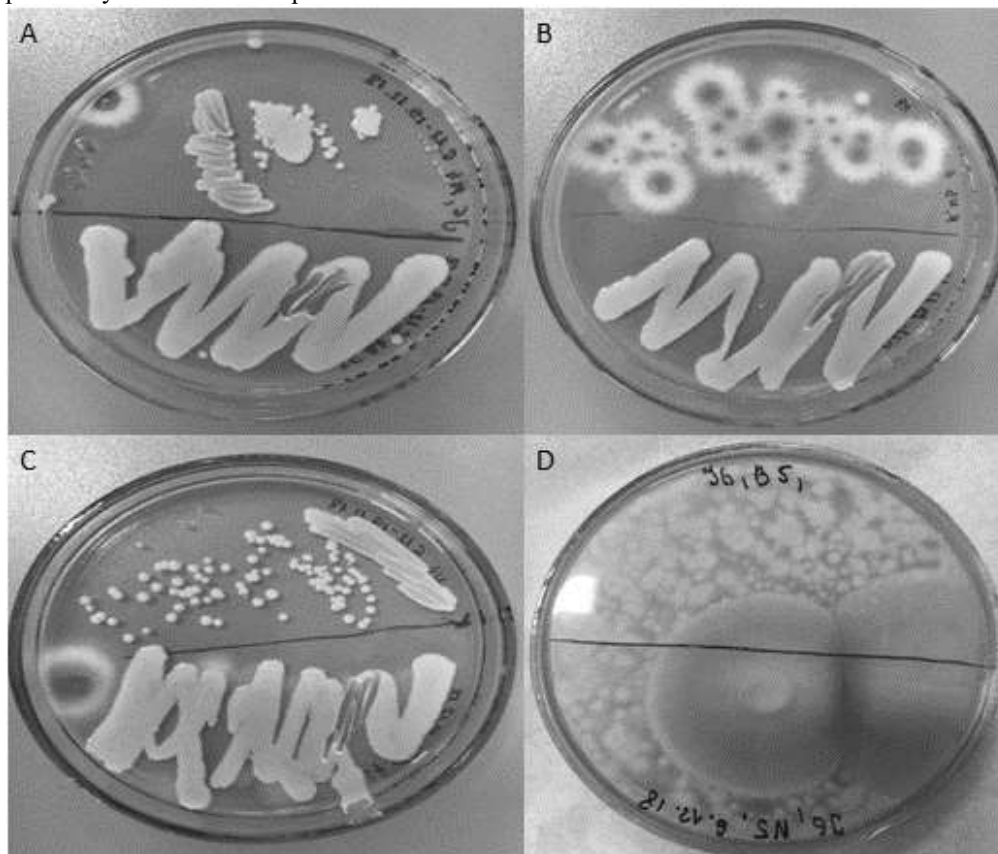
## **Materiał i metody**

Do badania wykorzystano dwadzieścia cztery samice myszy szczepu Nude (CBy.Cg-Foxn1/cmdb) i genetycznie dopasowane szczepy kontrolne Balb/c/cmdb. Wszystkie zwierzęta użyte w tym doświadczeniu były w wieku od 4 do 6 miesięcy. Obydwa szczepy utrzymywano w sterylnych warunkach (bariera hodowlana i eksperymentalna), zgodnie z procedurami

przyjętymi w Centrum Medycyny Doświadczalnej (CMD) Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Do analiz mykologicznych pobrano wymazy z jamy gębowej, ze skóry (rana na karku) oraz odbytu myszy nagich (n=12) i kontrolnych (n=12). Wykorzystano do tego sterylne wymazówki, które umieszczono w bulionie Sabourauda a następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez okres od 24 do 48 h. Materiał wstępnie namnożony przenoszono na szalki Petriego z podłożem Sabourauda z dodatkiem antybiotyku (chloramfenikol). Założone hodowle inkubowano w temperaturze 37°C od 24 do 72 h. Po kolejnych dobach dokonywano obserwacji. Do analizy wzięto pod uwagę tylko wyniki po 24 godzinnej inkubacji, dłuższa hodowla wyodrębniła zbyt dużo niepoliczalnych kolonii grzybowych (Rys. 1).

Rysunek 1. Wzrost mikrogrzybów na podłożu Sabourauda po 72h w temperaturze 37°C. Od lewej: wzrost grzybów drożdżoidalnych: A) jama gębowa nude/balb, B) rana-nude/balb, C) odbyt- nude/balb, D) jama gębowa- wzrost grzybów pleśniowych–nude/balb. Opracowanie własne.



Źródło: Opracowanie własne.

## Wyniki

Ogółem od badanych szczepów myszy Balb i Nude uzyskano 97 izolatów grzybów (tab.1.). Z przebadanych 24 myszy, 21 było zainfekowanych grzybami. Od 11 osobników

szczepu Balb uzyskano 18 prób dodatnich, a u szczepu Nude 19 prób od 10 myszy. Najczęściej zasiedlaną strefą zarówno u szczepu Balb jak i Nude, była jama gębowa (tab.1), dwukrotnie rzadziej grzyby izolowano z rany, natomiast najmniej grzybów można było zaobserwować z prób z odbytu, gdzie wartości u obu szczepów były takie same (tab.1). Wśród 24 analizowanych osobników, uzyskano tylko jeden izolat drożdży (rana u osobnika Balb), z pozostałych prób uzyskano grzyby pleśniowe. Suma izolatów zarówno u szczepu Nude, jak i Balb, utrzymała się na zbliżonym poziomie - odpowiednio 50 i 47.

Ogółem jama gębowa 10 myszy obu szczepów (4 myszy Balb i 6 myszy Nude) była wolna od grzybów, podobnie odbył 14 osobników oraz rany u 11 osobników nie były zasiedlane przez mikrogrzyby.

Tabela 1. Liczba izolatów grzybów (po 24h inkubacji) uzyskanych z badanych ontocenoz myszy Nude i Balb

Lp.	Osobnik/szczep	Osobnik ogółem (A+B+C)	Jama gębowa (A)	Rana (B)	Odbyt (C)
1	1 Balb	10	10 <sup>P</sup>	0	0
2	2 Balb	7	6 <sup>P</sup>	0	1 <sup>P</sup>
3	3 Balb	4	4 <sup>P</sup>	1 <sup>D</sup>	0
4	4 Balb	2	0	2 <sup>P</sup>	0
5	5 Balb	8	5 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>	3 <sup>P</sup>
6	6 Balb	4	0	4 <sup>P</sup>	0
7	7 Balb	1	1 <sup>P</sup>	0	0
8	8 Balb	0	0	0	0
9	9 Balb	10	3 <sup>P</sup>	5 <sup>P</sup>	2 <sup>P</sup>
10	10 Balb	1	1 <sup>P</sup>	0	0
11	11 Balb	2	0	1 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>
12	12 Balb	1	1 <sup>P</sup>	0	0
13	<b>Suma 12 osob.</b>	<b>50</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>7</b>
14	1 Nude	11	10 <sup>P</sup>	0	1 <sup>P</sup>
15	2 Nude	5	3 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>
16	3 Nude	2	1 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>	0
17	4 Nude	4	0	4 <sup>P</sup>	0
18	5 Nude	2	0	0	2 <sup>P</sup>
19	6 Nude	5	0	4 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>
20	7 Nude	0	0	0	0
21	8 Nude	0	0	0	0
22	9 Nude	11	6 <sup>P</sup>	5 <sup>P</sup>	0
23	10 Nude	3	2 <sup>P</sup>	0	1 <sup>P</sup>
24	11 Nude	1	0	1 <sup>P</sup>	0
25	12 Nude	3	1 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>	1 <sup>P</sup>
26	<b>Suma 12 osob.</b>	<b>47</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>7</b>
27	<b>Ogółem</b>	<b>97</b>	<b>54</b>	<b>31</b>	<b>14</b>

Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

Mikrogrzyby charakteryzują się szerokim spektrum występowania, posiadają zdolności kolonizowania oraz przylegania (adhezji) nie tylko do powierzchni użytkowych, ale przede wszystkim do błon śluzowych żywych organizmów (Ejdys 2008). Mikroorganizmy, w tym mikrogrzyby, bardzo szybko adaptują się do zmieniających się warunków środowiska. Są odporne na czynniki niekorzystne, np. wysoką temperaturę lub detergenty (Lugauskas i in. 2003), które pomagają utrzymać czystość pomieszczeń laboratoryjnych i klatek hodowlanych. Pomimo utrzymywania wysokiej sterylności w pomieszczeniach służących do hodowli zwierząt, w niniejszym badaniu stwierdzono obecność mikrogrzybów (zarówno grzybów pleśniowych, jak i drożdżopodobnych) w częściach ciała myszy laboratoryjnych. O ile u myszy z grupy Nude, pozbawionych grasicy, a tym samym komórek T układu immunologicznego nie dziwi wyizolowanie grzybów, to niepokojący jest fakt izolacji grzybów u myszy szczepu Balb, ogólnie zdrowych, stanowiących grupę kontrolną. Otrzymane wyniki są tym bardziej zaskakujące, że liczba izolatów u obu badanych grup była zbliżona. Miejsca posiadające tak wysoką sterylność, nie powinny być miejscem rozwoju grzybów. Być może zastosowane procedury nie zapewniły pełnej kontroli nad jałowością otoczenia zwierząt. Zwierzęta były utrzymywane w barierze hodowlanej o pełnej sterylności do momentu doświadczenia, a następnie na czas poboru wymazów, zostały przetransportowane przez okienko podawcze do strefy eksperymentalnej, w której nie panowały już tak wysokie warunki sterylności. Niemniej jednak, istnieje wiele innych możliwości wnikania patogenów do organizmów. Potrafią one dostać się do organizmu również m.in. poprzez jamę gębową. Mają wtedy możliwość kolonizacji w całym układzie pokarmowym i kolejno przez krew rozprzestrzeniają się we wszystkich układach (Dynowska i in. 2004). Dlatego też największą liczbę izolatów stwierdzono w jamie gębowej myszy laboratoryjnych. Komórki grzybowe przemieszczają się do przetyku, żołądka, dwunastnicy i jelit a w skrajnym przypadku, mogą być pasażowane do odbytu (Kurnatowska i in. 2006), stąd wysoki odsetek wyników dodatnich jednocześnie w jamie gębowej i odbycie u badanych zwierząt. Grzyby drożdżowe mogą też kolonizować błony śluzowe różnych narządów (Dynowska i in. 2006), dlatego też utrzymywanie homeostazy i pełnej sprawności immunologicznej, stanowi kluczowy element obrony przed patogenem. Myszy atymiczne, nieposiadające sprawnego układu odpornościowego, stanowią łatwy cel do kolonizacji, zwłaszcza wszelkich uszkodzeń i naruszenia ciągłości tkanek, choćby obserwowane infekcje grzybowe ran na grzbiecie zwierząt. Podobne spostrzeżenia zostały poczynione w przypadku pacjentów z obniżoną odpornością, często spowodowaną długą



hospitalizacją. U tego typu pacjentów najczęściej odnotowywano infekcje mikrogrzybami chorobotwórczymi. W szczególności zakażenia dotyczyły stanów pooperacyjnych, odleżyn i ran (Dynowska i in. 2006).

Przerwanie ciągłości skóry, już w pierwszych etapach powoduje napływ czynników kaskadowych krzepnięcia krwi, a także komórek układu odpornościowego. W przypadku myszy z zaburzonym układem immunologicznym, powstanie rany wiąże się dodatkowo z szybką drogą inwazji i rozsiewu mikroorganizmów przez krew i naczynia krwionośne (Marra i in. 2007). Różnego typu urazy czy skaleczenia, szczególnie typu otwartego, stanowią wrota zakażenia bakteriami, grzybami czy pasożytami (Reuter i in. 2005). W niniejszych badaniach z rany grzbietowej wyizolowano kolonie drożdży, które najprawdopodobniej przedostały się do organizmu w wyniku rozdrapania rany bądź kontaktu świeżo zranionej skóry ze ściółką.

## Podsumowanie

Z przeprowadzonych badań może zatem wynikać, iż pomimo wysokich standardów w laboratoriach, nie jest możliwe wyeliminowanie mikrogrzybów ze środowiska i nawet krótkoterminowa zmiana warunków hodowli, może wpłynąć znacząco na możliwości kolonizacji mikrogrzybami zwierząt hodowlanych. Utrzymywanie sterylności stanowi jedynie ograniczenie ekspansji mikroorganizmów a nie ich całkowitą eliminację.

## Literatura

- Baran E., Zabawski J. 1998. *Charakterystyka częściej występujących grzybów chorobotwórczych i grzybów oportunistycznych z podgromad: Zygomycotina, Ascomycotina i Deuteromycotina*. [w:] Baran E. (red.) *Zarys mikologii lekarskiej*. Wrocław: 98.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. 2000. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press.
- Biedunkiewicz A., Schulz Ł. 2012. *Fungi of the genus Exophiala in tap water- potential etiological factors of phaeohyphomycoses*. Mikol. Lek. 19(1): 23-26.
- Buczyska A., Cyprowski M., Piotrowska M., Szadkowska-Stańczyk I. 2007. *Grzyby pleśniowe w powietrzu pomieszczeń biurowych — wyniki interwencji środowiskowej*, Med. Prac. 58(6): 521–525.
- Dynowska M., Ejdyś E., Kisicka I. 2004. *Susceptibility to antifungal agents of yeast-like fungi and yeast isolated from people with multifocal infections*. Mik. Lek 1: 15-19.
- Dynowska M., Roslan M., Góralska K. M. 2006. *Saccharomyces cerevisiae Meyen ex Hansen in the respiratory, digestive system and skin in humans*. Act. Mycol. 41: 85-90.

- Ejdys E. 2008. *Zasady biobezpieczeństwa i higieny pracy w laboratorium badawczym a przeżywalność grzybów potencjalnie chorobotwórczych* [w:] *Diagnozowanie stanu środowiska metody badawcze- prognozy*. Red. J. Garbacz. BTN.
- Ejdys E. 2009. *Przeżywalność grzybów z rodzaju Candida a bezpieczeństwo na stanowisku pracy w mikologicznym laboratorium uniwersyteckim*. Med. Prac., 60(1): 1-5.
- Gerhardt E., 2006, *Grzyby. Wielki ilustrowany przewodnik*. Bauer-Weltbild Media Sp. z o.o., Sp. k., Warszawa.
- Ikehara S, Pahwa N.R, Fernandes G., Hansen T.C, Good A.R.1984.*Functional T cells in athymic nude mice*. PANAS: 886–888.
- Kleszcz J.2014. *Wpływ zwierząt na formę współczesnych przestrzeni miejskich*. ISSN 2299-7806: 67–82.
- Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. 2002. *Comparison of biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on biochemistry surfaces*. Inf. and Immun., 70: 878-888.
- Kurnatowska A., Kurnatowski P. 2006. *Mikologia medyczna*. Promedi.
- Lugauskas A., Levinskaite L., Peciulyte D. 2003. *Micromycetes as deterioration agents of polymeric materials*. Int. Bioterioration Biodegrad., 52: 233-242.
- Marra A.R., Opilla M., Edmond M.B., Kirby D.F. 2007. *Epidemiology of bloodstream infections in patients receiving long-team total parametral neutration*. *Journal of Clinic. Gastroentero*. 41: 19-28.
- Perlman L.R. 2016. *Mouse models of human disease*. Department of Pediatrics, Evol. Med. Public Health.: 170–176.
- Pfaff J. 1974. *Noise as an environmental problem in the animal house*. Laboratory Animals in Germany: 347-354.
- Reuter C.W.M., Morgan M.A., Barge F.C., Gunzer F., Eder M., Hertenstein B., Ganser A. 2005. *Candida kefyr as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients*. *Clic. Infect. Dise*. 41: 1365-1366.
- Stutman O. 1974. *Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice*. American Associ.for the Advanc. of Science.: 534-536.
- Vanhooren V, Libert C.2013. *The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities*. Ageing Research Reviews. Elsevier. 12(1): 8-21.

# Charakterystyka genomu mitochondrialnego gatunku *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. 1886

Characteristics of mitochondrial genome of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., 1886 species

Karol G. Makowczenko

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Koło Naukowe Bioinformatyków  
Opiekun koła: dr Jan Paweł Jastrzębski

## Abstract

*Fusarium avenaceum* is a species of microscopic fungi, considered to be a dangerous parasite of plants, causing mainly cereal diseases and reducing crop yield. The infected seeds may contain dangerous to human mycotoxins. Despite the significant impact on the agricultural economy, its mitochondrial genome remains poorly understood.

In this study, the full mitochondrial genome of *F. avenaceum* was described, using high-throughput sequencing methods – DNA-Seq and Velvet, MFannot and MAFFT bioinformatics tools. A structural annotation followed by a functional annotation was performed on the resulting 49 kbp circular molecule, providing detailed information on biological functions performed by 43 identified genes.

Analysis of the mitochondrial genome of *F. avenaceum* can be the basis for further molecular research of this organism. Obtained results in the future can be used while searching for methods, that allow easier identification of the presented parasite infecting crops and enable its effective control.

**Keywords:** mitochondrial genome, *Fusarium* sp., DNA sequencing.

## Wstęp

*Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. 1886, stadium doskonale *Gibberella avenacea* R.J. Cook, jest gatunkiem grzybów z rodziny guzełkowatych – Nectriaceae (Wolny-Koładka 2014). Tworzy grzybnie najczęściej o barwie białej, rzadziej brzoskwiniowej. Gatunek występuje najczęściej na obszarze o klimacie umiarkowanym oraz tropikalnym. W trakcie konidiogenezy wytwarza jeden rodzaj zarodników – makrokonidia o kształcie wrzecionowatym z lekko podwiniętymi końcami (Booth 1971). Zbudowane są one 0-10 sept, które w trakcie dojrzewania przybierają barwę pomarańczową. Sporodochia umożliwiają pobieżną identyfikację gatunkową za pomocą mikroskopu. Jednakże ze względu na duże podobieństwo zarodników *F. avenaceum* do konidiów innych przedstawicieli rodzaju *Fusarium*, w celu dokładnego oznaczenia gatunku, niezbędne jest zastosowanie metod biologii molekularnej.

Przedstawiciele tego gatunku są saprotrofami i pasożytami przystosowanymi do porażania roślin należących do ponad 160 gatunków z 26 rodzin, a także zdolnych do bytowania na owadach (Sharma, Marques 2018). W Polsce *F. avenaceum* zakaża przede wszystkim organy zbóż, łodygi i kolby kukurydzy (fuzaryjna zgorzel), ziemniaka (sucha zgnilizna bulw), rośliny motylkowate (fuzaryjne więdnienie) a także rośliny ozdobne, warzywne, drzewa i krzewy (Lemańczyk 2018). Uznawany jest za słaby patogen, w porównaniu do innych przedstawicieli rodzaju *Fusarium*, jednak dominuje w środowisku ze względu na szeroki zakres temperatur (5-25°C) sprzyjający rozwojowi i atakowaniu roślin. Organizm ten może wpływać na zmniejszenie upraw, w sposób istotny oddziałując na gospodarkę rolną w sezonach o wysokiej wilgotności.

*F. avenaceum* może produkować szeroką gamę potencjalnie niebezpiecznych dla zdrowia człowieka lub zwierząt gospodarskich metabolitów wtórnych – mykotoksyn, przykładowo moniliforminę, bowerycynę, eniatyny A i B oraz ich pochodne (Tonshin i in. 2010). Substancje te mają różne działanie toksyczne, między innymi mutagenne, teratogenne i estrogenne. Ze względu na wysoką termostabilność, wydzielane do skażonych produktów rolnych, stanowią bezpośrednie zagrożenie nawet po przetworzeniu żywności lub pasz (Rychlik 2012).

Mimo ukończonego projektu sekwencjonowania genomu *F. avenaceum* (Lysøe i in. 2014), w trakcie którego złożono sekwencje genomowe trzech izolatów o numerach akcesyjnych GenBank: JQGD00000000, JQGE00000000, JPYM00000000 oraz mimo szczegółowego odnotowania ostatniego z nich, mitochondrion omawianego gatunku pozostaje nieopisany. W momencie przeprowadzania niżej opisanych analiz w bazie danych GenBank NCBI, dostępne są 2 rekordy zawierające sekwencje mitochondrialne: JQGE01000002 i JPYM01000083, które jednak różnią się w sposób istotny sekwencją nukleotydową oraz zawierają szczątkowe informacje dotyczące funkcjonalnych elementów genomu, takich jak geny kodujące białka, rybosomalne RNA, transportujące RNA, i tak dalej. Ponadto, spośród wszystkich 1.921 rekordów powiązanych z organizmem *F. avenaceum*, w bazach danych dostępny jest tylko jeden rekord zawierający pojedynczy gen mitochondrialny o pełnej sekwencji kodującej – JPYM01000083 (zastosowana kwerenda: „txid40199[Organism:noexp] NOT partial”, data dostępu: 4.03.2019). Pozwala to wnioskować, że mimo dość dobrego poznania genomu jądrowego *F. avenaceum*, genom mitochondrialny w praktyce pozostaje nieznan.

Celem niniejszej pracy było zsekwencjonowanie metodami wysokoprzepustowymi oraz złożenie pełnej cząsteczki DNA mitochondrialnego *F. avenaceum*, a w dalszej kolejności identyfikacja i adnotacja genów na niej zlokalizowanych.

### **Materiał i metody badań**

Do badań wykorzystano trzy izolaty grzybów pleśniowych pozyskane ze środowiskowego materiału roślinnego. Komórki namnożono na podłożu PDB (A&A Biotechnology, Polska), w warunkach zmiennego nasświetlenia UV i w temperaturze około 22°C. Po pojawieniu się stadium konidialnego, oznaczono gatunki grzybów metodą mikroskopową, na podstawie prac Booth (1971), Nelson i in. (1983) oraz Samuels i in. (2001).

Całkowite DNA wyizolowano z 50 mg 1-2 dniowych wyselekcjonowanych kultur gatunku *F. avenaceum*. Materiał biologiczny ucierano w ciekłym azocie, w sterylnym moździerzu, do którego dodawano bufor ekstrakcyjny CTAB, Proteinazę K (Promega, USA) oraz RNA-azę A (Promega, USA). Tak przygotowany materiał przeniesiono do sterylnych probówek Eppendorf i inkubowano w ThermoMixer C (Eppendorf, Niemcy), w temperaturze 70°C przez 30 minut. Następnie próbki wirowano w wirówce Eppendorf. Zebrany nasącz, o objętości 200 µl, przeniesiono do dedykowanych kartridżów (Maxwell® 16LEV Plant DNA Kit, Promega, USA) i kontynuowano izolację w automacie Maxwell® 16 (Promega, USA). Ilość i czystość DNA oceniono przy użyciu spektrofotometru Nanodrop ND 2000C (ThermoFisher Scientific, USA) oraz fluorymetru Qubit (ThermoFisher Scientific, USA).

Biblioteki do sekwencjonowania przygotowano za pomocą zestawu odczynników TruSeq DNA PCR-free (Illumina Inc., USA), typ przygotowanych bibliotek to Illumina-Shotgun. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie przeprowadzono na platformie MiSeq (Illumina Inc., USA), typ sekwencjonowania Pair-End, przy zakładanym 20% pokryciu ścieżki w komorze przepływowej przez każdą z równolegle sekwencjonowanych próbek.

Jakość surowych odczytów sprawdzono za pomocą narzędzia FastQC wer. 0.11.4 (Andrews 2010). Następnie sekwencje adapterów oraz regiony odczytów o niskiej jakości wycięto za pomocą narzędzia Trimmomatic wer. 0.36 (Bolger i in. 2014), przy następujących parametrach działania: jakość początkowych i końcowych odcinków odczytów > 20 i średnia jakość odczytów > 30. Jakość przetworzonych odczytów potwierdzono ponownie za pomocą narzędzia FastQC.

Proces asemblacji *de novo* przeprowadzono korzystając z programu Velvet wer. 1.2.10 (Zerbino, Birney 2008), przy następujących parametrach działania: długość *k*-merów – 31; włączone śledzenie odczytów; długość insertu – 350 pz; przewidywane pokrycie – 10

odczytów; minimalna długość kontigu – 1000 pz; włączone tworzenie scaffoldów. Kontig, zawierający sekwencję mitochondrialną, wybrano na podstawie przyrównania do sekwencji genomu mitochondrialnego *F. graminearum* (NC\_009493). Prawidłowość złożenia badanej sekwencji zweryfikowano poprzez zmapowanie względem niej wcześniej przetworzonych odczytów, przy użyciu narzędzia Geneious Mapper, będącego częścią programu Geneious wer. 8.1.9 (Kearse i in. 2012), przy następujących parametrach działania: minimalna długość nakładania się odczytów – 40 pz oraz minimalna identyczność nakładających się odczytów – 96%.

Adnotację strukturalną i funkcjonalną przeprowadzono korzystając ze zmodyfikowanej procedury opisanej przez Brankovics i in. (2018). Wstępne informacje, dotyczące położenia genów na badanym genomie mitochondrialnym, uzyskano za pomocą narzędzia MFannot (Gautheret, Lambert 2001). Adnotacje genów kodujących tRNA zostały ręcznie poprawione za pomocą programu tRNAscan-SE (Lowe, Chan 2016). Adnotację funkcjonalną genów kodujących białka, przeprowadzono z użyciem programu InterProScan (Jones i in. 2014). Budowę genów kodujących białka, rRNA i sekwencji ORF o nieznanej funkcji zweryfikowano za pomocą narzędzi BLASTn i BLASTp (Benson i in. 2018), przeszukujących bazy danych NCBI Nucleotide i Protein. Złożoną sekwencję, wraz z adnotacjami, przyrównano względem referencyjnych sekwencji mitochondrialnych *F. avenaceum* JPYM01000083 i JQGE01000002 udostępnionych w bazie danych GenBank NCBI za pomocą narzędzia MAFFT wer 7.017 (Katoh, Standley 2013) przy domyślnych parametrach działania.

Wyniki przyrównań zwizualizowano przy użyciu programu Geneious wer. 8.1.9. Kolistą cząsteczkę mitochondrialnego DNA, wraz z adnotacjami, zwizualizowano za pomocą narzędzia OrganelGenomeDraw (Lohse i in. 2013).

## Wyniki badań

W wyniku sekwencjonowania wysokoprzepustowego trzech badanych próbek, przy użyciu sekwenatora MiSeq oraz wycięcia sekwencji adaptorowych i regionów o niskiej jakości, uzyskano kolejno 4,36 mln, 2,79 mln i 3,59 mln odczytów. Szczegółowe parametry przetworzonych odczytów zestawiono w Tabeli 1.

Efektem asemblacji *de novo* na podstawie wszystkich uzyskanych odczytów było uzyskanie zestawu długich sekwencji – kontogów, z których wybrano sekwencję pełnej cząsteczki mtDNA o całkowitej długości 49.396 pz oraz średniej zawartości par GC na poziomie 33,1%. Szczegółowe zestawienie frekwencji nukleotydów zaprezentowano na rysunku 1. W wyniku mapowania weryfikacyjnego, do analizowanej sekwencji, dopasowano

121.808 odczytów ze średnim pokryciem 195,1 i przy odchyleniu standardowym 133,2. Odczyty przyłączone na końcach liniowej sekwencji umożliwiły zamknięcie analizowanej cząsteczki w koło.

Tabela 1. Zestawienie parametrów uzyskanych odczytów

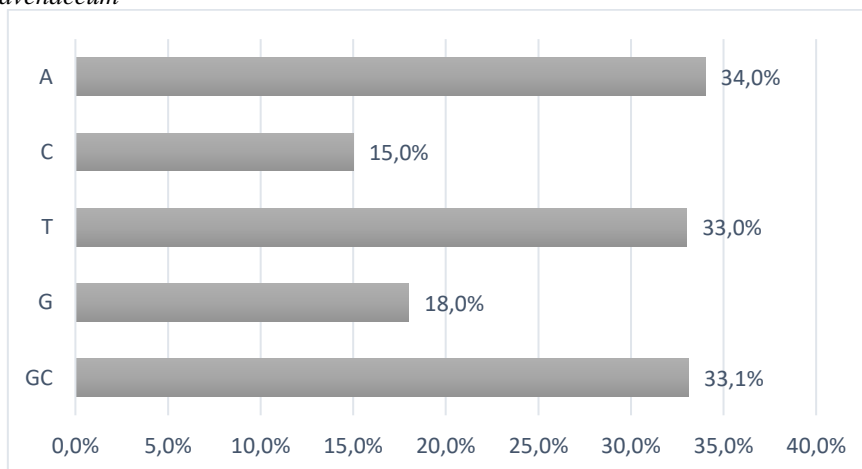
Próbka	I	II	III
Liczba odczytów	4.357.450	2.787.932	3.587.494
Maksymalna długość odczytów	80	80	80
Średnia długość odczytów	79,5	79,6	79,6
Odchylenie standardowe	4,0	3,7	3,5
Zawartość par GC	48,4%	48,2%	52,4%
Q30	97,0%	96,5%	97,3%

Źródło: Opracowanie własne.

W badanej cząsteczce zidentyfikowano w sumie 43 geny, w tym 15 genów kodujących białka, 2 geny kodujące rRNA (rybosomalne RNA) i 26 genów kodujących tRNA (transportujące RNA). Zidentyfikowane geny kodowane są w tym samym kierunku. Zaadnotowane geny kodujące tRNA odpowiadają za transport wszystkich 20 podstawowych aminokwasów budujących białka, w tym 3 geny tRNA transportujące metioninę (M), 3 transportujące argininę (R), 2 transportujące serynę (S) oraz 2 transportujące treoninę (T). Odnaleziono także 9 otwartych ramek odczytu (ang. open reading frame, ORF) o niepoznanej funkcji. ORF nazwany *orf1952* ma długość 5.858 pz i jest charakterystyczny dla genomów mitochondrialnych rodzaju *Fusarium*. Ponadto zidentyfikowano dwa krótkie regiony powtórzeniowe o długości 80 pz, zawierające identyczną sekwencję nukleotydową. Oba regiony znajdują się w częściach międzygenowych genomu mitochondrialnego, w odległości 4.085 pz od siebie.

Trzy ze zidentyfikowanych genów kodujących białka, zawierają introny. W każdym z intronów znajdują się sekwencje ORF, które kontynuują ramki kodowania rozpoczęte w poprzedzających je egzonach. Gen *cox1* zawiera cztery sekwencje intronowe, natomiast geny *cox2* oraz *cob* zawierają po jednym intronie. Ponadto gen kodujący wielką podjednostkę rRNA (*rnl*) zawiera intron, wewnątrz którego w całości zawarty jest gen *rps3*, kodujący białko rybosomalne S3.

Rysunek 1. Frekwencja procentowa nukleotydów oraz par GC w badanym genomie mitochondrialnym *F. avenaceum*



Źródło: Opracowanie własne.

Tabela 2. Zestawienie genów zidentyfikowanych na genomie *F. avenaceum*

Kategoria	Grupa genów	Symbole genów
Łańcuch oddechowy	Kompleks I, dehydrogenaza NADH	<i>nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6</i>
	Kompleks III, reduktaza cytochromu c	<i>cob</i>
	Kompleks IV, oksydaza cytochromu c	<i>cox1, cox2, cox3</i>
	Synteza ATP	<i>atp6, atp8, atp9</i>
Synteza białek	Rybosomalne RNA	<i>rns, rnl</i>
	Białka małej podjednostki rybosomów	<i>rps3</i>
	Transportujące RNA	<i>trnA(ugc), trnC(gca), trnD(guc), trnE(uuc), trnF(gaa), trnG(ucc), trnH(gug), trnI(gau), trnK(uuu), trnL(uaa), trnM(cau) (x3), trnN(guu), trnP(ugg), trnQ(uug), trnR(acg), trnR(ucg), trnR(ucu), trnS(gcu), trnS(uga), trnT(uag), trnT(ugu), trnV(uac), trnW(uca), trnY(gua)</i>
Inne geny	ORF o niepoznanej funkcji	<i>orf119, orf162, orf269, orf288, orf294, orf327, orf342, orf429, orf1952</i>

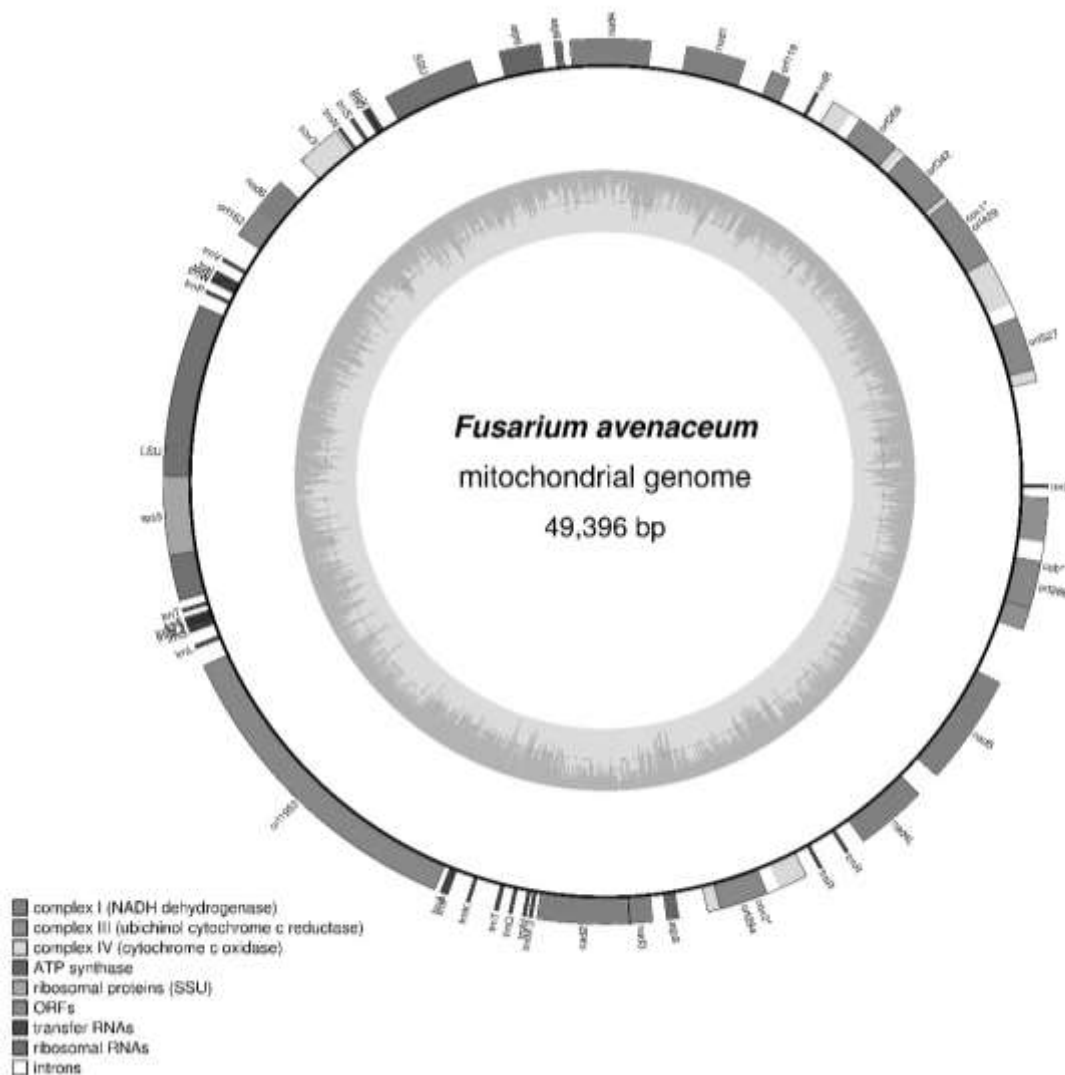
Źródło: Opracowanie własne.



Identyfikacja funkcjonalna umożliwiła przypisanie wszystkich genów do trzech głównych kategorii: geny biorące udział w łańcuchu oddechowym, geny mające udział w syntezie białek oraz sekwencje pełniące inne funkcje. Każdą ze wspomnianych kategorii funkcjonalnych podzielono na podkategorie, szczegółowo wskazujące funkcje pełnione przez poszczególne geny w procesach zachodzących w mitochondrium (Tab. 2).

Kolistą cząsteczkę mtDNA *F. avenaceum* wraz z adnotacjami zidentyfikowanych genów i ich podziałem funkcjonalnym, zwizualizowano na rysunku 2.

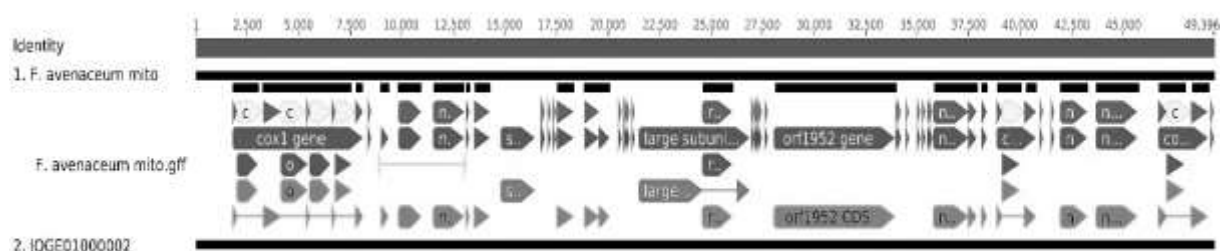
Rysunek 2. Mapa genów genomu mitochondrialnego *Fusarium avenaceum*. Czarna ciągła linia symbolizuje kolistą cząsteczkę mtDNA. Umieszczenie poszczególnych genów zostało oznaczone bločkami. Grupy genów pełniące odmienne funkcje oznaczono różnymi kolorami, opisanymi w legendzie. Nazwy genów zawierających introny zostały oznaczone znakiem „\*”. Wszystkie geny ulegają transkrypcji w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara. Lokalna zawartość par GC w sekwencji nukleotydowej została zaprezentowana na wewnętrznym okręgu za pomocą barwy ciemnoszarej



Źródło: Opracowanie własne.



Rysunek 4. Wynik przyrównania uzyskanej sekwencji mtDNA *F. avenaceum* i kontigu JQGE01000002. Znaczenie poszczególnych elementów przyrównania scharakteryzowano w opisie do Rysunku 2. Opracowanie własne.



Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja i wnioski

W wyniku analiz bioinformatycznych oraz identyfikacji funkcjonalnej, opisano pełny genom mitochondrialny *F. avenaceum*. Stwierdzono prawidłową budowę analizowanej cząsteczki mtDNA, charakterystyczną dla organizmów rodzaju *Fusarium*. Zawartość par GC dla całej cząsteczki jest bliska 30%. Zidentyfikowano charakterystyczną długą otwartą ramkę odczytu o niepoznanej funkcji (Al-Reedy i in. 2012). Gen kodujący wielką podjednostkę rRNA zawiera intron, w którym znajduje się gen *rps3*. Ponadto zidentyfikowano wszystkie geny kodujące białka, biorące udział w łańcuchu oddechowym, geny kodujące obie podjednostki rRNA oraz geny kodujące cząsteczki tRNA dla każdego z podstawowych aminokwasów wykorzystywanych do budowy białek (Pantou i in. 2008).

Tabela 3. Porównanie parametrów sekwencji badanej oraz sekwencji referencyjnych (opisanych w tekście)

Parametry sekwencji	Analizowana sekwencja mtDNA	Kontig JPYM01000083	Kontig JQGE01000002
Długość całkowita [pz]	49.396	51.782	49.396
Frekwencja par GC [%]	33,1	33,2	33,1
Całkowita liczba adnotacji	132	6	0
Liczba adnotacji opisujących geny kodujące białka	15	1	0
Liczba adnotacji opisujących rRNA	2	0	0
Liczba adnotacji opisujących tRNA	26	0	0
Liczba adnotacji opisujących ORFy o niepoznanej funkcji	9	1	0

Źródło: Opracowanie własne.

Porównując uzyskaną sekwencję do 2 rekordów dostępnych w bazie danych GenBank NCBI stwierdzono 100% identyczność względem jednego z nich, co pozwala wnioskować o prawidłowym przeprowadzeniu asemblacji *de novo*. Drugi z rekordów różni się w sposób istotny od uzyskanej cząsteczki. W przyrównaniu zauważyć można 4 długie przerwy, każda o długości ponad 1.000 pz oraz szereg punktowych niedopasowań. Pozwala to przypuszczać, że sekwencja drugiego z rekordów została złożona w błędny sposób (przykładowo poprzez nieodpowiednią obróbkę odczytów uzyskanych w wyniku sekwencjonowania lub nieodpowiednie dobranie parametrów działania programu składającego kontigi). Możliwa była także kontaminacja próbki badanej lub nieodpowiednie oznaczenie gatunku.

Uzyskane wyniki w obecnej formie mogą zostać zastosowane do przygotowania testu umożliwiającego szybką identyfikację *F. avenaceum* metodami molekularnymi. Na przykład poprzez opracowanie gatunkowo-specyficznych starterów do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).

Genom mitochondrialny *F. avenaceum* jest obecnie jedenastym w pełni opisanym mitochondrionem spośród 927 gatunków zaliczanych do rodzaju *Fusarium* [MB#8284] zgodnie z bazą Mycobank (Crous et al. 2004). Niniejsze badania mogą przyczynić się do lepszego poznania genetyki oraz procesów metabolicznych, zachodzących wewnątrz komórek nie tylko organizmów należących do wspomnianego rodzaju, ale też innych grzybów pasożytujących na roślinach. Poznanie dokładnej budowy genomu jądrowego i mitochondrialnego grzybów mikroskopijnych w przyszłości może znacznie przyspieszyć proces identyfikacji poszczególnych gatunków, a nawet szczepów, poprzez wykorzystanie technik molekularnych. W efekcie pozwoli to na szybką analizę pasożytów atakujących uprawy roślinne oraz skuteczniejsze dobieranie technik zabezpieczających przed ponowną infekcją i stratami w uzyskiwanej ilości plonów. W dalekiej perspektywie może to w istotny sposób wpłynąć na polepszenie jakości pasz oraz żywności pochodzenia roślinnego.

## Literatura

- Al-Reedy R.M., Malireddy R., Dillman C.B., Kennell J.C. 2012. *Comparative analysis of Fusarium mitochondrial genomes reveals a highly variable region that encodes an exceptionally large open reading frame*. Fungal Genetics and Biology 49: 2-14.
- Andrews S. 2010. *FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data*. Babraham Bioinformatics, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Ostell J., Pruitt K.D., Sayers E.W. 2018. *GenBank*. Nucleic Acids Research 46: 41-47.

- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. *Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data*. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- Booth C. 1971. *The genus Fusarium.*, Kew, UK, Commonwealth Mycological Institute.
- Brankovics B., Kulik T., Sawicki J., Bilska K., Zhang H., de Hoog G.S., van der Lee T.A., Waalwijk C., van Diepeningen A.D. 2018. *First steps towards mitochondrial pan-genomics: detailed analysis of Fusarium graminearum mitogenomes*. *PeerJ* 6: e5963.
- Crous P.W., Gams W., Stalpers J.A., Robert V., Stegehuis G. 2004. *Mycobank: an online initiative to launch mycology into the 21st century*. *Studies in Mycology* 50: 19-22.
- Gautheret D., Lambert A. 2001. *Direct RNA motif definition and identification from multiple sequence alignments using secondary structure profiles*. *Journal of Molecular Biology* 313: 1003-1011.
- Jones P., Binns D., Chang H.-Y., Fraser M., Li W., Mcanulla C., McWilliam H., Maslen J., Mitchell A., Nuka G., Pesseat S., Quinn A.F., Sangrador-Vegas A., Scheremetjew M., Yong S.-Y., Lopez R., Hunter S., Valencia A. 2014. *InterProScan 5: genome-scale protein function classification*. *Bioinformatics* 30: 1236-1240.
- Katoh K., Standley D.M. 2013. *MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability*. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. 2012. *Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Lemańczyk G. 2018. *Fusarium niejedno ma imię - Ochrona roślin*. *Farmer* 6.
- Lohse M., Drechsel O., Kahlau S., Bock R. 2013. *OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets*. *Nucleic acids research* 41: 578-581.
- Lowe T.M., Chan P.P. 2016. *tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes*. *Web Server issue Published online* 44: 54-57.
- Lysøe E., Harris L.J., Walkowiak S., Subramaniam R., Divon H.H., Riiser E.S., Llorens C., Gabaldón T., Kistler H.C., Jonkers W., Kolseth A.-K., Nielsen K.F., Thrane U., Frandsen R.J.N. 2014. *The Genome of the Generalist Plant Pathogen Fusarium avenaceum Is Enriched with Genes Involved in Redox, Signaling and Secondary Metabolism*. *PLoS ONE* 9: e112703.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. The Pennsylvania State University Press.
- Pantou M.P., Kouvelis V.N., Typas M.A. 2008. *The complete mitochondrial genome of Fusarium oxysporum: Insights into fungal mitochondrial evolution*. *Gene* 419: 7-15.
- Rychlik M. 2012. *Mycotoxins in foods*. S. 320-341 [w:] *Chemical Contaminants and Residues in Food*, Elsevier.
- Samuels G.J., Nirenberg H.I., Seifert K.A. 2001. *Perithecial species of Gibberella*: 1-14.
- Sharma L. i Marques G. 2018. *Fusarium, an Entomopathogen—A Myth or Reality?* *Pathogens* 7: 93.

- Tonshin A.A., Teplova V. V., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M.S. 2010. *The Fusarium mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis.* Toxicology 276: 49-57.
- Wolny-Koładka K. 2014. *Grzyby z rodzaju Fusarium — występowanie, charakterystyka i znaczenie w środowisku.* Kosmos 63: 623-633.
- Zerbino D.R., Birney E. 2008. *Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs.* Genome Research 18: 821-829.

## **Rozdział V**

### **Wpływ mikroorganizmów na zdrowie człowieka**





## **Zearalenon – wpływ mykotoksyny na zdrowie oraz życie człowieka i zwierząt**

### Zearalenon - the influence of mycotoxin on health and the life of human and animals

Martyna Buczkowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Studenckie Koło Naukowe Mykologów  
Opiekun: dr hab. Anna Biedunkiewicz

#### **Abstract**

Zearalenone is a mycotoxin produced by mold fungi of the genus *Fusarium*. Toxin is the most common in maize and cereals, but also in maize products and in stored food, especially under inadequate conditions. The most vulnerable to the harmful effects of mycotoxins are breeding animals that have been fed with a zearalenone contaminated feed. The *Fusarium* fungi produce zearalenone, which chemically forms a compound called  $\beta$ -resorcinol-lactone, which has an extremely steroidal effect, despite the non-steroidal structure. In addition, the body reacts with the receptors faster than real steroid hormones. Zearalenone has been best investigated for sows in which has been shown disorders of the sexual cycle, premature births, short ovulations, smaller litter or sick and dead pigs, and swollen external genitalia. In adult women - menstrual cycle disorders, problems with getting pregnant are indicated, and even miscarriages. In addition to estrogen activity, the influence of toxin on the deformation of the ovaries, uterus, mammary glands as well as the prostate and testes has been demonstrated.

**Keywords:** zearalenone, mycotoxin, fungi, food, estrogen, disorders.

#### **Wstęp**

Mykotoksyny to wtórne metabolity grzybów strzępkowych, wytwarzane przez drobnoustroje, które zakończyły swój wzrost (Chełkowski 2010). Nazwa mykotoksyny pochodzi od greckiego słowa *mycos*, co tłumaczone jest jako słowo grzyb, z łacińskiego zaś - *toxicum* czyli inaczej trucizna. Metabolity wtórne grzybów mikroskopowych zasadniczo nie są niezbędne dla grzybów, które je wytwarzają. Poznano ponad 400 związków, które zdefiniowano jako mykotoksyny (Piotrowska 2012; Wróbel 2014). Mykotoksyny są produkowane w grzybach dojrzałych, które wytwarzają metabolity wtórne w odpowiedzi na różnorodne warunki środowiska, np. obniżone lub zbyt wysokie wartości pH, brak odpowiedniego poziomu natlenienia czy wilgotności powietrza lub jako odpowiedź na presję konkurencyjną ze strony innych gatunków grzybów (Chełkowski 2010; Wróbel 2014). W badaniach nad metabolitami wtórnymi grzybów pleśniowych wskazuje się na ich

szkodliwość w organizmie człowieka i zwierząt. Przeważnie, wraz z obecnością zanieczyszczeń grzybnią grzybów pleśniowych, występują również skażenia metabolitami wtórnymi – zwłaszcza w przypadku żywności. Ich obecność stwierdzono głównie w produktach pochodzenia roślinnego, które mogły ulec zakażeniu w trakcie wzrostu, na etapie magazynowania bądź w czasie trwania procesu produkcji. Bardzo często do zatrucia dochodzi w wyniku spożycia zanieczyszczonych grzybem produktów suchych, zbóż, nasion a nawet w artykułów spożywczych, które przeznaczone są dla dzieci (Wróbel 2014).

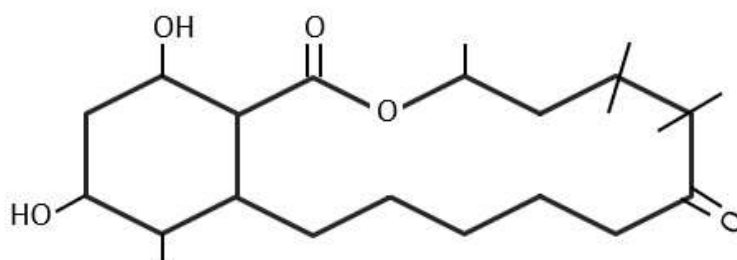
Mykotoksyny produkują grzyby rodzajów *Claviceps*, *Aspergillus*, *Fusarium*. Grzyby rodzaju *Fusarium* są niebezpieczne dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt, nie tylko ze względu na swoją patogeniczność, lecz mykotoksyny przez nie produkowane, zaliczają się do wszystkich grup toksyn jakie dotychczas poznano tj. hepatotoksyny – uszkodzające wątrobę; nefrotoksyny – uszkodzające nerki; kardiotoxyny – powodujące choroby serca i układu krwionośnego; dermatotoksyny – prowadzące do uszkodzeń skóry i błon śluzowych; neurotoksyny – wywołujące uszkodzenia centralnego układu nerwowego; pulmotoksyny - powodujące obrzęki płuc. Jako oddzielne grupy wydzielono dodatkowo: mykohormony – działające na regulację hormonalną, w których mieści się zearalenon oraz jego pochodne; immunotoksyny – wpływające negatywnie na odporność organizmu; kancerogeny – przyczyniające się do powstawania nowotworów (Fink-Gremmels 1999; Chełkowski 2010). Jedną z najczęściej występujących mykotoksyn, a zarazem jedną z najbardziej niebezpiecznych, jest zearalenon. Przeważnie występuje w surowcach takich jak: kukurydza, pszenica, jęczmień, sorgo, ryż oraz w produktach żywnościowych wykonywanych na ich bazie (Polak-Śliwińska i in. 2014). Ze względu na zdolność do kumulowania się mykotoksyn w tkankach oraz narządach, źródłami zatrucia zearalenonem są również produkty mięsne, a także jaja czy mleko. Zagrożenie związane z tym konkretnym metabolitem wtórnym, wiąże się z faktem iż nie tylko wpływa on na wzrost zachorowań na nowotwory oraz występowanie mutacji, lecz wpływa bezpośrednio na zaburzenia gospodarki hormonalnej zarówno u zwierząt, jak i u człowieka (Fink-Gremmels 1999). Celem pracy jest przedstawienie informacji dotyczącej toksycznego wpływu metabolitu wtórnego, jakim jest zearalenon na organizm człowieka oraz zwierząt.

### **Charakterystyka i budowa zearalenonu**

Zearalenon jest nietypową mykotoksyną, ponieważ pod kątem biochemicznym jest laktonem kwasu rezorcynowego, przez co posiada charakter fitoestrogenu. Pełna nazwa

zearalenonu pod kątem chemicznym to  $\beta$ -rezorcyno-lakton. Zawiera on w swojej budowie cząsteczkowej pierścień rezorcynowy oraz makrocykliczny pierścień laktonowy, który jest bardzo trwały oraz nie ulega hydrolizie i redukcji. Dodatkowo zearalenon posiada układ przestrzenny zbliżony do układu hormonów steroidowych - stąd wynika jego niezwykle wysoka homologia do estrogenu. Dzięki tej właściwości wykazuje działanie estrogenne w organizmach człowieka i zwierząt, zaburzając m.in. regulację hormonalną (Chełkowski 2010; Polak-Śliwińska i in. 2014).

Rysunek 1. Budowa  $\beta$ -rezorcyno-laktonu



Źródło: Opracowanie własne na podstawie <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/Mikotoksyny/>

Mykotoksyna jest absorbowana przez układ pokarmowy i następnie ulega przemianom metabolicznym zarówno w jelitach, jak i wątrobie. Uważa się, że przemiana zearalenonu w organizmie zachodzi poprzez 2 główne mechanizmy:

- hydroksylację do  $\alpha$ -zearalenonu i  $\beta$ -zearalenonu przy udziale dehydrogenazy 3- $\alpha$ - i 3- $\beta$ -hydroksysteroidowej,
- sprzężenie z kwasem glukuronowym, katalizowane przez urydynodifosforan glukuronylotransferazy.

W wyniku rozkładu powstaje  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenol oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenal, które są związkami wysoce stabilnymi. Dlatego też, nawet obróbka termiczna żywności, nie jest w stanie zapewnić bezpieczeństwa jej spożywania, gdyż wysoka temperatura nie jest w stanie zdegradować mykotoksyny – podobnie jest w przypadku przerabiania mechanicznego oraz chemicznego żywności. Zearalenon, podobnie jak inne metabolity wtórne, jest nierozpuszczalny w wodzie, lecz doskonale ulega rozpuszczeniu w benzynie, olejach, eterze czy chloroformie (Polak-Śliwińska i in. 2014 za Sherma 2000).

Zearalenon jest mykotoksyną produkowaną przez grzyby rodzaju *Fusarium*, głównie przez gatunki *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* i *F. equiseti* (Chełkowski 2010; Solarska i in. 2012). Grzyby te powodują roczne znaczące straty w rolnictwie. Dodatkowo są silnymi patogenami roślin zbożowych i bobowatych. Wywołują zgorzel wczesnych i późnych wschodów siewek, zgorzel podstawy źdźbła i łodyg, fuzariozę kłosów i kolb, nazywaną często zgnilizną czerwoną i różową (Chełkowski 2010).

Kumulacja zearalenonu jest najwyższa w żywności przechowywanej magazynowo, zwłaszcza w nieodpowiednich warunkach. Jednakże do skażenia żywności może dojść już na etapie zbiorów, co zwykle przekłada się na obniżoną jakość powstających z plonów półproduktów (Dec i Obidziński 2014). Żywność pochodzenia roślinnego wiąże się z bezpośrednim zagrożeniem oraz skażeniem organizmów człowieka i zwierząt. W przypadku skarmiania bydła oraz trzody chlewnej skażoną paszą, dochodzi do kumulacji zearalenonu w mięśniach oraz narządach. W organizmach zwierzęcych mykotoksyna ta jest modyfikowana chemicznie i przenika do tkanki mięśniowej (a nawet jaj, czy mleka). Oprócz zmian wywoływanych na skutek mutagennego, teratogenego i rakotwórczego wpływu metabolitu wtórnego w organizmach zwierząt, mogą one stać się nośnikiem mykotoksyn, pośrednicząc w intoksykacji człowieka. Spożywanie mięsa, jaj czy mleka od zwierząt, które miały kontakt z zearalenonem, powoduje kumulację mykotoksyny w organizmie człowieka. W ten sposób bardzo często dochodzi do wzrostu poziomu stężenia toksyny. W efekcie rozpoczyna ona destrukcyjne oddziaływanie, zaburzając homeostazę i przyczyniając się bezpośrednio do wielu mutacji (Zinedine i in. 2007; Solarska i in. 2012). Należy jednak podkreślić, że zawartość zearalenonu w żywności pochodzącej od skażonych zwierząt, zazwyczaj jest znacznie mniejsza, w porównaniu do zawartości w paszy, podawanej bezpośrednio zwierzętom. Dlatego też spożywanie mięsa, mleka czy jaj, z obecnym w nich zearalenonem, zwykle nie objawia się zatruciem o ostrym charakterze (Wróbel 2014).

### **Wpływ zearalenonu na organizmy człowieka oraz zwierząt**

Działanie zearalenonu, jako silnego estrogenu, badano w czasie doświadczeń, podczas których poddawano stymulacji mykotoksyną niedojrzałe płciowo samice myszy i szczurów. W stężeniach bezpiecznych wykazano szybsze dojrzewanie oraz wzrost masy macicy u wszystkich samic (Sheehan i in. 1984; Takemura i in. 2007). Podobny schemat działania wykryto u zwierząt hodowlanych, skarmianych wcześniej wadliwej jakości paszą. Po spożyciu żywności skażonej zearalenonem, rozpoczyna się szereg procesów, które mogą prowadzić do

opisanych i znanych powszechnie zmian związanych z negatywnym działaniem toksyny. Naturalne, strukturalne podobieństwo mykotoksyny do estrogenu czy estrioli, warunkuje jej szkodliwość i spośród wszystkich właściwości, oddziaływanie estrogenne wywiera najbardziej negatywny wpływ na organizmy żywe. Poprzez zaburzenia cyklu płciowego dochodzi do szeregu innych zmian, przyczyniających się do znacznego pogorszenia stanu zdrowia zwierząt a nawet stających się bezpośrednią przyczyną utraty życia (Chełkowski 2010; Solarska i in. 2012).

Proces zaburzenia hormonalnego polega na interakcji  $\beta$ -rezorcyno-laktonu z receptorami estrogenowymi, przez co zearalenon konkuruje z estrogenem o miejsce aktywne i działa jak inhibitor kompetencyjny dla estrogenów. Dodatkowo, posiada kilkukrotnie wyższe powinowactwo do receptorów niż prawdziwy hormon, mimo iż nie posiada typowej budowy steroidowej. Głównym, negatywnym skutkiem zatrucia zearalenonem jest tzw. syndrom estrogeniczny, występujący przeważnie u zwierząt. Dzienną dawką infekcyjną w przypadku trzody chlewnej jest zakres od 1,5 do 3,0 mg/kg masy ciała zwierzęcia. Zearalenon jest niebezpieczny, szczególnie dla zwierząt młodych, zwłaszcza cieląt z niewykształconymi jeszcze przedłożkami (Wróbel 2014). U jałówek mogą wystąpić problemy z płodnością. Podobną dawkę toksyczną podaje się w przypadku ludzi, jednakże jest ona bardzo zmienna i zależy od wcześniejszego stanu zdrowia człowieka oraz kondycji wątroby, nerek i przewodu pokarmowego u kręgowców. Generalnie schemat oddziaływania syndromu estrogenowego jest zbliżony wśród różnych gatunków. Zarówno u bydła, trzody chlewnej, drobiu, jak i człowieka, dochodzi do hiperestrogenizmu, co z kolei przekłada się na zaburzenia cyklu rujowego i cyklu owulacyjnego (Solarska i in. 2012). Obserwuje się również przesunięcia w cyklu miesięczkowym, zaburzenia w powstawaniu luteiny i ciała żółtego oraz problemy z implantacją zarodka. Oprócz objawów wewnętrznych związanych z rozrodem, dochodzi do hipergonadyzmu, przerostu gruczołów mlekowych, warg sromowych i obrzmienia pochwy. Wszystkie te objawy prowadzą głównie do obniżenia rozrodczości i zdolności do reprodukcji zwierząt, a u kobiet są pośrednią przyczyną bezpłodności. Ponadto, bardzo często dochodzi do zaburzenia działania przysadki i tarczycy, co dodatkowo wpływa na wzmaganie zaburzeń gospodarki hormonalnej. Ważne jest podkreślenie, że nie dochodzi jedynie do upośledzenia działania hormonów steroidowych, lecz również peptydowych. Organizm, w którym dochodzi do tylu destrukcyjnych zmian, staje się osłabiony, a to przekłada się na żywotność samych zwierząt (Chełkowski 2010).

Według badań przeprowadzonych przez Zinedine i in. (2007) wykazano, że wskaźniki płodności osobników spadały nawet 30%. Dodatkowo, dochodziło do zmian, polegających na ze zmniejszeniu masy gonad, zaburzonym dojrzewaniem pęcherzyków, zaburzeniami w cyklu pochwowym i niewłaściwą płodnością ich potomstwa. Podczas badań laboratoryjnych zaobserwowano także zmienioną wagę gruczołów nadnerczy, tarczycy i przysadki oraz zmiany w poziomie progesteronu i estradiolu w surowicy krwi. W przypadku myszy, szczurów, świnek morskich i królików nie wykazano wpływu teratogennego zearalenonu na zarodki (Chełkowski 2010). Obniżona reprodukcja powstaje na skutek wad cyklu płciowego. Stwierdzono, iż wysokie stężenia ZEA (50-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) w diecie świń, mają niekorzystny wpływ na rozmnażanie. Jeśli w takim stanie zdrowia samicy doszło do zapłodnienia, to w przypadku świń obserwowano przedwczesne porody, zmniejszenie liczby miotu oraz wagi prosiąt, a także liczne choroby i deformacje. Zawartość 100 mg zearalenonu w kilogramie paszy powoduje natychmiastową i całkowitą bezpłodność macior. W badaniach kontrolowanych, zmiany wywołane obecnością zearalenonu zaobserwowano już przy 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  masy ciała na dzień u świń, zaś u szczurów przy 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  masy ciała (Chełkowski 2010). W przypadku ciężarnych kobiet dochodziło najczęściej do poronień, przedwczesnego porodu, zmian teratogennych płodu oraz licznych mutacji, deformacji i chorób noworodków. Często niemowlęta posiadały głębokie wady rozwojowe, spowodowane mutacjami w obrębie materiału genetycznego (Purwin i in. 2006). W przypadku bydła zmiany te mają identyczny charakter jak u loch. Dodatkowo jednak, dochodzi do obniżenia mleczności krów poprzez bezpłodność, bądź obniżoną znacznie reprodukcje. Interesującym jest fakt, iż w przypadku krów odnotowuje się również stopniowy spadek stężenia zearalenonu w organizmie ze względu na obecność mikroorganizmów w układzie pokarmowym przeżuwaczy, które posiadają zdolność do rozkładu tej mykotoksyny (Seeling i in. 2005; Solarska i in. 2012). W przypadku drobiu, najbardziej niewrażliwe na obecność zearalenonu są gęsi, kaczęta reagowały na zawartość ok. 10 mg/kg paszy zmniejszeniem przyrostów, zaś około 40 mg ZEA/kg paszy, obniżało wydajność składania jaj przez kury. Większość objawów dotyczy samic ze względu na charakterystyczny cykl płciowy oraz budowę gonad. U samców objawy zakażenia mykotoksyną na tle hormonalno-płciowym nie są tak częste i popularne, jednakże jeśli występują to zwykle dochodzi najczęściej do zmian feminizacyjnych, co objawia się powiększeniem gruczołów sutkowych, atrofią jąder i zaburzoną spermatogenezą, które prędzej czy później, prowadzą, do bezpłodności (Chełkowski 2010).

Efekt, jaki wywołuje zearalenon u zwierząt, zależy od poziomu zanieczyszczenia pasz, wieku, płci oraz stanu ogólnego zwierząt. Zaburzenie rozrodu mogą mieć inne podłoże, dlatego przeprowadzenie szczegółowego wywiadu i prześledzenie historii stada jest kluczowe, aby rozważyć zatrucie mykotoksyną fuzaryjną. Zwierzęta hodowlane są najbardziej zagrożoną grupą docelową w przypadku której odnotowano wiele zmian wywołanych zakażeniem mykotoksynami grzybów rodzaju *Fusarium* (Chełkowski 2010; Solarska i in. 2012). Pośród zwierząt domowych również można mówić o zatruciach, jednakże występują one rzadziej i są związane ze skrajnymi przypadkami zanieczyszczeń suchej karmy czy pożywiania się zwierząt przypadkowo znaną żywnością. U samic kotów i psów zaobserwowano zmiany wynikające między innymi z estrogenizacji wywołanej zawartymi w karmie mykotoksynami fuzaryjnymi (Chełkowski 2010). Objawami hiperestrogenizmu, które można zaobserwować u tych zwierząt to m.in. obrzęk warg sromowych, łysienie plackowate, nierównomierna pigmentacja skóry krocza, wtórnie pojawiający się łojotok, upławy oraz czasami zapalenia ucha zewnętrznego. Zmiany chorobowe, wykrywane podczas badań klinicznych można podzielić na zaburzenia cyklu płciowego, zaburzenia przebiegu ciąży i porodu oraz zmiany histopatologiczne w obrębie narządów rodnych czy gruczołu mlekowego. Bardzo często u kotek oraz suczek psa wykrywa się zmiany torbielowe jajnika, nowotwory gonad oraz silne zapalenia powięzi jajników. Zearalenon wykazuje także pośrednie działanie kancerogenne poprzez hiperestrogenizm i wpływa na powstawanie nowotworów jajników, macicy i pochwy (Chełkowski 2010).

Oprócz zmian wpływających na rozród, obserwuje się także bezpośrednie oddziaływanie zearalenonu z narządami i tkankami. Mimo iż rzadko odnotowuje się stany ostre wynikające ze zatrucia mykotoksyną, to najczęściej takie przypadki dotyczą zapalenia wątroby i nerek, czyli miejsca w którym metabolizowane są metabolity wtórne. Dodatkowo odnotowano liczne przypadki, w których zearalenon przyczynił się do powstawania nowotworów przysadki, tarczycy, jajnika, szyjki macicy, gruczołu mlekowego, wątroby, nerek, jelita jak również prostaty i jąder. Nowotwory te mają zwykle tendencje do szybkiego rozwoju i przechodzenia do zaawansowanego stadium. Charakteryzują się złośliwością, lecz mogą powstawać także stosunkowo niegroźne gruczolaki czy tłuszczaki. Zearalenon wykazuje się także działaniem teratogennym, które powoduje tzw. „potworkowość”, bądź „potworotworzenie” płodów i mutagenne zmiany w obrębie ciała czy narządów. Mogą występować liczne deformacje, a nawet ciężkie wady rozwojowe (Wróbel 2014). Innym, równie groźnym skutkiem zakażenia toksyną fuzaryjną, jest oddziaływanie immunosupresyjne, polegające na hamowaniu

prolifracji limfocytów T oraz wzrost poziomu interleukin, co może mieć również związek z powstawaniem chorób o charakterze nadwrażliwości układu odpornościowego. Zwykle jednak zearalenon przyczynia się do zmniejszenia odporności na choroby infekcyjne (Solarska i in. 2012; D'Mello i in. 1999). Przy dłuższym trwającym karmieniu zwierząt paszą, zawierającą mniejsze od śmiertelnych ilości mykotoksyn dochodzi do zmniejszenia przyrostów masy, gorsze wykorzystanie paszy, zmniejszenie odporności na choroby, uszkodzenie wątroby i nerek. Na skutek pogorszenia stanu zdrowia zwierząt, dochodzi do strat ekonomicznych oraz spadku jakości produkowanej żywności (Chełkowski 2010). Najczęściej kontaminacje żywności gatunkami rodzaju *Fusarium* występują w krajach o najwyższej, rocznej produkcji kukurydzy i zbóż. Znaczące zawartości zearalenonu stwierdzono w ziarnach pszenicy i jęczmienia w USA, Kanadzie, Szwecji, Anglii i Finlandii. Jednak zdecydowanie najwyższe zawartości zearalenonu zawierała kukurydza, gdzie odnotowano obecność mykotoksyn nawet w ziarnach, a nawet kiszonkach produkowanych z kolb kukurydzy. Ziarna w momencie zbioru zawierają zwykle około 30% wody w całej masie i często nie zostają poddane odpowiednio szybkiemu suszeniu, co w efekcie skutkuje rozwojem grzybów, które mają w ziarnach kukurydzy idealne warunki do rozwoju (Bottalico 1998). W Polsce nie występuje bardzo wysoki odsetek zachorowań zwierząt na nowotwory i syndromy estrogenowe, lecz problem ten budzi zbyt małe zainteresowanie opinii publicznej (Solarska i in. 2012).

## Podsumowanie

Zearalenon jest mykotoksyną niezwykle szkodliwą. Jego negatywne właściwości są najbardziej destrukcyjne dla zwierząt hodowlanych: trzody chlewnej, bydła czy drobiu. Najbardziej narażone są młode, dojrzewające płciowo samice. Zagrożenie dotyczy również zwierząt domowych, którymi najczęściej są psy oraz koty. W przypadku ludzi nie występuje już tak silne narażenie na zatrucia zearalenonem, ze względu na wzrost jakości produktów żywnościowych oraz metod badania i sprawdzania ich bezpieczeństwa oraz higieny produkcji. Zwierzęta jednak bardzo często są skarmiane paszami, które nie podlegały wnikliwej analizie. Należy podkreślić istotność przechowywania żywności dla zwierząt. Nieprawidłowo magazynowane pasze i surowce, są narażone na zakażenia grzybami pleśniowymi, zwłaszcza w miejscach o wysokiej wilgoci, bez dostępu do wymiany powietrza. Należy zwrócić uwagę, iż mykotoksyny są substancjami trudnymi do usunięcia z produktów. Ich detoksykacja jest trudna oraz bardzo droga, dlatego w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności, należy dopilnować wszelkich parametrów przechowywania i produkcji żywności oraz pasz, by jak



najskuteczniej zapobiegać powstawaniu skażeń grzybami. Jeśli jednak istnieje możliwość mechanicznego usunięcia mykotoksyn z produktów, to taka dekontaminacja jest dopuszczalna zazwyczaj tylko w przypadku pasz. Nie wolno stosować takich rozwiązań odnośnie żywności oraz surowców przeznaczonych do ich produkcji oraz gotowej już żywności. Warto podkreślić w tym miejscu, że w przypadku zwierząt dochodzi nie tylko do zmniejszenia komfortu życia i zdrowia stada, lecz także do strat materialnych rolników i znacznego obniżenia produkcji żywności. Dzięki odpowiednim zabezpieczeniom, jesteśmy w stanie względnie kontrolować i minimalizować ryzyko strat w postaci spadku zdrowotności zwierząt oraz wzrostu śmiertelności wśród zwierząt przeznaczonych do produkcji żywności. Profilaktyka dodatkowo pozwala zachować i podnieść bezpieczeństwo żywności przeznaczonej dla ludzi, w tym również niemowląt. Dlatego też należy dbać o poszerzanie wiedzy na temat rozwoju grzybów pleśniowych i produktów ich metabolizmu, które stanowią zagrożenie zdrowia i życia zarówno człowieka jak zwierząt.

## Literatura

- Chełkowski J. 2010. *Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy*. Wersja online dostępna na stronie: [www.cropnet.pl/download](http://www.cropnet.pl/download).
- D'Mello J.P.F., Placinta C.M., MacDonald A.M.C. 1999. *Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity*. Anim. Feed Sci. Tech., 80: 183-205.
- Dec D., Obidziński S. 2014. *Ocena mikotoksyn w mąkach dostępnych na rynku województwa podlaskiego*. Episteme. 25: 7-13.
- Fink-Gremmels J. 1999. *Mycotoxins: their implications for human and animal health*. Vet Q., 21(4): 115-120.
- Piotrowska M. 2012. *Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz*. Post. Mikrobiol., 51(2): 109-119.
- Polak-Śliwińska M., Kubiak M.S., Borejszo Z. 2014. *Metody oznaczania wybranych mikotoksyn w żywności i paszach*. Post. Tech. Przetw. Spoż., 2: 120-124.
- Purwin C., Łaniewska-Trokenheim Ł., Warmińska-Radyko I., Tywończuk J. 2006. *Jakość kiszzonek – aspekty mikrobiologiczne, zdrowotne i produkcyjne*. Med. Wet., 62(8): 865-869.
- Seeling K., Dänicke S., Ueberschär K.H., Lebzien P., Flachowsky G. 2005. *On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows*. Food Add. Contam., 22(9): 847-855.
- Sheehan D.M., Branham W.S., Medlock K.L., Shanmugasundaram E.R. 1984. *Estrogenic activity of zearalenone and zearalanol in the neonatal rat uterus*, Teratolo., 29: 383-392.
- Sherma J. 2000. *Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis*. J. Chromat., 880: 129-147.

- Solarska E., Kuzdraliński A., Potocka E. 2012. *Mikotoksyny w zbożach z upraw ekologicznych*. J. Res. Appl. Agri. Eng., 57(4): 100-102.
- Takemura H., Shim J.Y., Sayma K., Tsubura A., Zhu B.T., Shimoi K. 2007. *Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 103: 170-177.
- Wróbel B. 2014. *Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zawartych w paszach i żywności*. Water Environ. Rural Area, 14, 3(47): 159-176.
- Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2007. *Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin*. Food Chem. Toxicol., 45(1): 1-18.

## Antybiotykooporność i bakteriocynogenność bakterii izolowanych z jamy ustnej człowieka

Antibiotics resistance mechanisms or bacteriocin production isolated from oral ontocenosis

Jakub Hubeny

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Nauk o Środowisku  
Naukowe Koło Mikrobiologów Molekularnych „COCCUS”  
Opiekun: dr hab. inż. Monika Harnisz, prof. UWM

### Abstract

According to ontocenoses, the structure of human microbiote could be very diverse. Composition of every biological niche are shaped by occurring environmental factors. The human microbiote can be divide into autochthonous and allochthonous. Microorganisms that formed the human microbiote may have important specific features, such as antibiotics resistance mechanisms or bacteriocin production.

The aim of the study was to assess the extent of the occurrence of antibiotic resistance and the production of factors interacting antagonistically in strains isolated from five selected oral ontocenosis. Samples were collected from studied group of 10 people and then it was cultured on BHI medium. Collecting samples and creating strains collection was made by used standard methods. The antibiotic resistance test were performed by disc-diffusion method relative to 12 antibiotics, however the growth inhibition test were performer by well-diffusion method relative to 6 reference strains. Results of the following study are pointing a more frequent occurrence the antibiotic resistance in strains isolated from two ontocenoses (around the teeth and bottom surface of tongue). Among all strains isolated from oral cavity, were selected group with ability to growth inhibition of other microorganisms. This group turn out to be particularly effective in relations to two reference strains (*Staphylococcus epidermidis* and *Lactobacillus* sp.). Weaker growth inhibition occurred in relations to Gram negative bacteria and also to *Staphylococcus aureus*. The results and literature as well, confirm opinion of how important the growth inhibitory features produced by commensal microbiote may be for the human body, particularly in inhibition of potentially pathogens bacteria. However, the presence of commensal resistance genes in bacteria can be a problem in therapy in the case of infection caused by a decrease in the activity of immune system.

**Keywords:** antibiotic resistance, bacteriocin production, microbiote, oral cavity

### Wstęp

Mikrobiota człowieka stanowi zbiór drobnoustrojów zasiedlających ludzki organizm (Kunicki-Goldfinger 2007). Ze względu na stopień stabilności mikrobioty w ludzkim organizmie, można wśród drobnoustrojów wyróżnić stałych rezydentów, towarzyszących

człowiekowi przez całe jego życie z ewentualnymi małymi przerwami oraz rezydentów zmiennych, okresowo napływających ze środowiska zewnętrznego czy innych organizmów (Binek 2012). Do dominujących grup należą *Firmicutes* spp., *Bacteroides* spp., *Proteobacteria* spp. oraz *Acinetobacteria* spp. (Eckburg i in. 2005; Johnson i Versalovic 2012). Drobnoustroje sukcesywnie kolonizują organizm gospodarza. W czasie porodu pierwszym habitatem mający kontakt ze światem zewnętrznym, jest skóra (Rautava i in. 2012). Kolejnymi miejscami kolonizacji mikroorganizmów jest przewód pokarmowy; jama ustna, gardło, przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito cienkie, kończąc na jelicie grubym. Największa ilość mikroorganizmów występujących w organizmie człowieka, znajduje się w układzie pokarmowym (Salminen i Isolauri 2006). Jama ustna jako pierwszy odcinek układu oraz przełyk charakteryzuje się dominującym występowaniem bakterie rodzajów: *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Prevotella* sp., czy też *Actinomyces* sp. (Salyers i Whitt 2003; Costalonga i Herzberg 2014; Yamanaka i in. 2009; Pei i in. 2004).

Zgodnie z definicją antybiotykooporność jest to niewrażliwość drobnoustrojów na leki z grupy antybiotyków. Powstaje głównie pod wpływem długotrwałego działania zbyt małych dawek tych leków, poprzez stosowanie niecelowanej terapii oraz przekazywanie genów oporności między drobnoustrojami, co przyczynia się do powstawania szczepów wielolekoopornych (Ventola 2015). Dysproporcja pomiędzy tempem powstawania i rozpowszechniania się mechanizmów oporności a wprowadzaniem nowych leków przeciwbakteryjnych, stała się na tyle zauważalna, że opcje terapeutyczne licznych zakażeń bakteryjnych, zaczęły ulegać wyczerpaniu (Mathur i Singh 2005). Antybiotykooporność stała się jednym z podstawowych niebezpieczeństw dla zdrowia publicznego na całym świecie (McCullough i in. 2016). Na całym świecie antybiotyki są wykorzystywane jak suplementy żywieniowe dla zwierząt hodowlanych. 80% produkowanych antybiotyków jest wykorzystywanych w hodowlach zwierząt w celu poprawienia ich wzrostu i zapobiegania zapadania na choroby (Spellberg i Gilbert 2014). Poprzez podawanie w nadmiernych ilościach antybiotyków dla zwierząt, sukcesywnie zwiększa się liczba bakterii opornych. W kolejnych etapach może to powodować negatywne efekty zdrowotne u człowieka (Ventola 2015). Taki sam problem dotyczy nie tylko zwierząt hodowlanych ale również upraw roślinnych, poprzez rozpylanie antybiotyków w charakterze pestycydów (Golkar i in. 2014).

Bakteriocyny to bakteryjne związki białkowe, które aktywnie reagują z innymi bakteriami, działając bakteriobójczo lub bakteriostatycznie. Organizm produkujący bakteriocyny, posiada swoiste mechanizmy odpornościowe na wytwarzane. (Dobson i in.

2012). Klasyfikacja bakteriocyn bazuje na zróżnicowaniu ich struktury chemicznej, mechanizmie działania czy wrażliwości na działania enzymów. W grupie bakteriocyn produkowanych przez bakterie gramdodatnie, rozróżnia się cztery klasy, natomiast u bakterii gramujemnych dwie grupy (Gwiazdowska i Trojanowska 2005).

Typy interakcji pomiędzy mikrobiotą komensalną a bakteriami patogennymi są różnorodne, jednak zazwyczaj najczęstszym czynnikiem limitującym rozwój patogenów jest konkurencja pokarmowa o związki odżywcze oraz o miejsce w niszy ekologicznej. Bakterie autochtoniczne wytwarzają również bakteriocyny, które specyficznie mogą oddziaływać na allochtoniczne drobnoustroje, uniemożliwiając im kolonizację i zapoczątkowanie stanu zapalnego (Kamada i in. 2013). Dobrym przykładem oddziaływania antagonistycznego jest gatunek *Staphylococcus epidermidis* wchodzący w skład naturalnej mikrobioty skóry wytwarzający epidermicynę. Badania potwierdzają, że aktywnie hamuje wzrost bakterii gramdodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus*, które mogą powodować infekcje skórne (Sandiford i Upton 2012).

### **Cel i metoda badawcza**

Cel pracy stanowiła ocena stopnia występowania zjawiska antybiotykooporności oraz wytwarzania czynników oddziałujących antagonistycznie u szczepów wyizolowanych z jamy ustnej.

Materiał do badań stanowiły bakterie wyizolowane z jamy ustnej. Do tego celu wykonano wymaz jałowym narzędziem w grupie 10 wolontariuszy, osób dorosłych, nie wykazujących oznak chorób, z jamy ustnej. Wyróżniono 5 miejsc: okolice dziąseł, policzki, podniebienie twarde, górna powierzchnia języka, dolna powierzchnia języka, z których pobrano wymaz. Pobrany materiał bezpośrednio wysiewano na podłoże agarowe z wyciągiem mózgowo-sercowym (Brain Heart Infusion). Wstępnej selekcji szczepów dokonano na podstawie właściwości morfologicznych kolonii. Pobrano od 10 do 19 szczepów z wybranych ontocenoz, które przesiano na to samo podłoże hodowlane metodą izolacyjną w celu uzyskania jak największej liczby czystych kolonii, różniących się morfologicznie. Uzyskane czyste kolonie przesiano na skosy hodowlane z podłożem BHI w celu stworzenia ciągłym linii hodowlanej wyizolowanych szczepów. Materiał inkubowano w 37°C przez 24-48h. Do dalszych analiz szczepy przechowywano w temp. 10°C.

Ocenę morfologiczną wyizolowanych szczepów wykorzystywanych do dalszych badań przeprowadzono na podstawie standardowego barwienia metodą Grama. W celu utrzymania wyizolowanych czystych szczepów bakteryjnych do dalszych analiz, kultury bakteryjne namnożono w płynnej pożywce bulionu odżywczego. Następnie namnożone bakterie przeniesiono do probówek typu Eppendorf z bulionem odżywczym z dodatkiem 10% glicerolu. Tak przygotowane próbówki inkubowano 30 min w 37°C a następnie zamrożono w -80°C w ultrazamrażarce.

Tabela 1. Wykorzystane antybiotyki do przeprowadzenia testu wrażliwości na leki

Antybiotyk	Skrót	Grupa	Stężenie w krążku	Producent
Linkomycyna	<i>LN</i>	Linkozamidy	75 µg	Oxoid
Doripenem	<i>DOR</i>	β-laktamowe	10 µg	Oxoid
Cefuroksym	<i>CXM</i>	β-laktamowe	30 µg	BioMérieux
Ceftazydym	<i>CAZ</i>	β-laktamowe	30 µg	BioMérieux
Cefamandol	<i>MA</i>	β-laktamowe	30 µg	BioMérieux
Penicylina G	<i>P</i>	β-laktamowe	10 µg	BioMérieux
Cefotaksym	<i>CTX</i>	β-laktamowe	30 µg	BioMérieux
Norfloksacyna	<i>NOR</i>	Fluorochinolony	10 µg	BioMérieux
Perfloksacyna	<i>PEF</i>	Fluorochinolony	5 µg	BioMérieux
Netylmycyna	<i>NET</i>	Aminoglikozydy	30 µg	BioMérieux
Kwas pipemidowy	<i>Pi</i>	Chinolony	20 µg	BioMérieux
Bacytracyna	<i>B</i>	Antybiotyk polipeptydowy	10 µg	BioMérieux

Źródło: Opracowanie własne.

Do oznaczenia antybiotykooporności wykorzystano metodę krążkowo-dyfuzyjną. Z wyizolowanych szczepów wykonano inokula o gęstości odpowiadającej 0,5 w skali McFarlanda. Następnie za pomocą sterylnych wymazówek, rozprowadzono materiał na podłożu Mueller-Hinton (MH), w celu uzyskania równomiernego wzrostu. Na płytce naniesiono krążki bibułowe zawierające określoną ilość antybiotyku. Do wykonania antybiogramów wykorzystano antybiotyki przedstawione w tabeli 1. Po nałożeniu krążków na

płytki Petriego prowadzono inkubację w temperaturze 37°C przez 48h. Po tym czasie inkubacji, mierzono strefy zahamowania wzrostu dla poszczególnych antybiotyków (Kwiatkowski i Markiewicz 2006).

Do oznaczenia właściwości antagonistycznych, hamujących wzrost szczepów referencyjnych przez szczepy wyizolowane, użyto metody dyfuzyjnej. Na płytkach z agarowym podłożem BHI wycięto studzienki za pomocą metalowej sztancy. Na podłoża wysiano za pomocą wymazówki szczepy referencyjne: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Lactobacillus* sp., techniką równomiernego pokrycia powierzchni płytki. Pipetą automatyczną pobrano 0,05 cm<sup>3</sup> badanych szczepów hodowanych w bulionie odżywczym i umieszczoną w oznaczonych studzienkach. Płytki inkubowano w 37°C przez 24-48h, po tym czasie mierzono strefy zahamowania wokół studzienek z badanymi szczepami.

## Wyniki

Przeprowadzone badania szczepów bakterii wyizolowanych z jamy ustnej wykazały znaczne zróżnicowanie zarówno w zakresie oporności na antybiotyki, jak również zdolności do wytwarzania substancji antybiotycznych.

Tabela 2. Wyizolowane szczepy z pogrupowaniem na miejsca izolacji

Lp.	Miejsce izolacji	Liczba izolatów	Formy morfologiczne
1.	Zęby	8	6 x Formy ziarniakowe G(+)
			2 x Formy otoczkujące
2.	Język (górną stroną)	8	8 x Formy ziarniakowe G(+)
3.	Język (dolną stroną)	9	4 x Formy ziarniakowe G(+)
			5 x Formy przetrwalnikujące G(+)
4.	Podniebienie	5	3 x Formy ziarniakowe G(+)
			2 x Formy ziarniakowe G(-)
5.	Policzki	16	13 x Formy ziarniakowe G(+)
			2 x Formy ziarniakowe G(-)
			1 x Formy przetrwalnikujące G(+)

G(+) – drobnoustroje gram-dodatnie

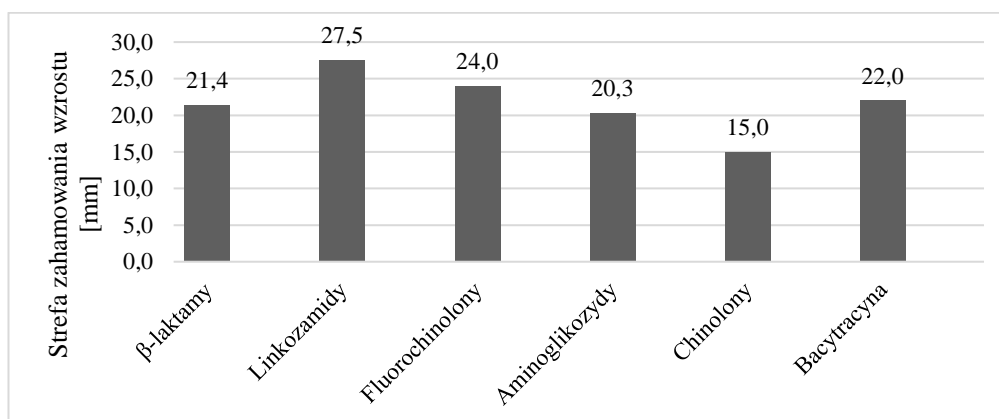
G(-) – drobnoustroje gram-ujemne

Źródło: Opracowanie własne.

Z grupy badanej, składającej się z 10 osób, wyizolowano 46 szczepów z 5 ontohabitatów jamy ustnej. Zdecydowaną większość wyizolowanych szczepów stanowiły bakterie gramdodatnie (40 szczepów). Dodatkowo z wymazu pobranego z okolicy zębów uzyskano szczepy otoczkujące. Dominującą formą morfologiczną okazały się formy kuliste, stanowiące 80% szczepów. Formy przetrwalnikujące stanowiły 13% izolatów (Tab. 2). Niszą, z której wyizolowano najwięcej szczepów okazały się policzki jamy ustnej (35% wszystkich szczepów).

Największą strefą zahamowania wzrostu w grupie szczepów wyizolowanych z górnej powierzchni języka, wykazywał antybiotyk należący do grupy linkozamidów, ze średnicą strefy wynoszącą 27,5 mm. Grupą antybiotyków wykazującą najmniejszą strefę zahamowania wzrostu były chinolony, które charakteryzowały się średnicą strefy 15 mm. Pozostałe grupy antybiotyków:  $\beta$ -laktamy, fluorochinolony, aminoglikozydy oraz antybiotyk bacytracyna wykazywały średnio 21,9 mm średnicy strefy zahamowania (Rys. 1).

Rysunek 1. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu szczepów wyizolowanych z górnej powierzchni języka powodowana przez wybrane grupy antybiotyków

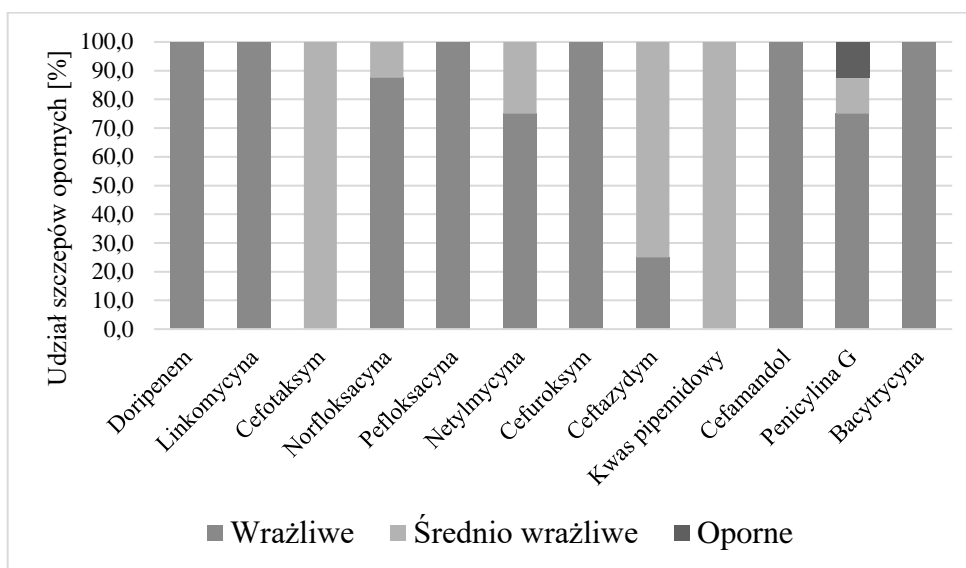


Źródło: Opracowanie własne.

Wśród szczepów wyizolowanych z górnej powierzchni języka, 12,5% szczepów wykazało oporność w stosunku tylko do penicyliny G. Szczepy wykazywały 100% wrażliwość w stosunku do następujących antybiotyków: doripenem, linkomycynę, perfloksacyne, cefuroksymu, cefamandol oraz bacytracyny. W stosunku do norfloksacyny oraz netylmycynę, 76% szczepów charakteryzowało się średnią wrażliwością. Szczepy wykazywały największą średnią wrażliwość w stosunku na cefotaksym, ceftazydym oraz kwas pipemidowy (Rys. 2).



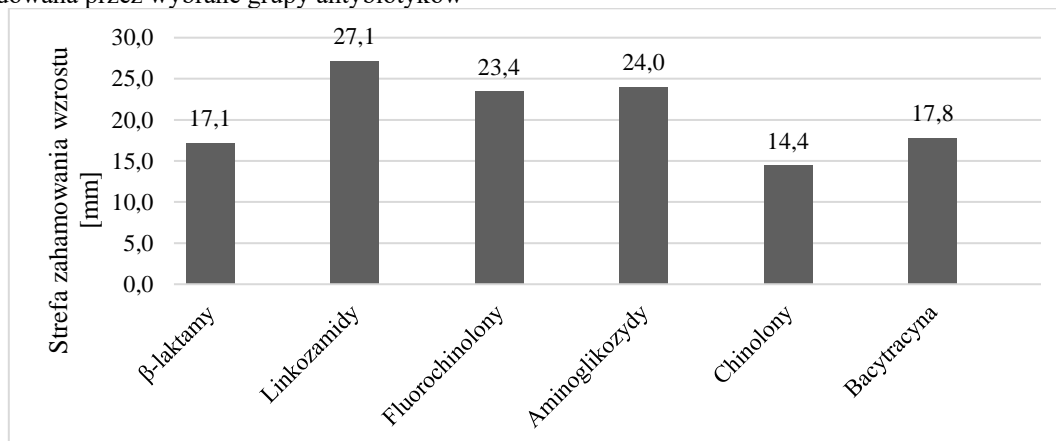
Rysunek 2. Podział procentowy szczepów wyizolowanych z górnej powierzchni języka ze względu na wrażliwość



Źródło: Opracowanie własne.

W grupie szczepów wyizolowanych z dolnej powierzchni języka, największą strefą zahamowania wzrostu wykazywała grupa linkozamidów, ze średnicą strefy wynoszącą 27,1 mm. Grupą antybiotyków wykazującą najmniejszą strefę zahamowania wzrostu były chinolony, które charakteryzowały się średnicą strefy 14,4 mm. Antybiotyki z grupy fluorochinolonów oraz aminoglikozydów charakteryzowały się średnicą strefy zahamowania wzrostu ok. 24 mm. Grupa antybiotyków  $\beta$ -laktamowych oraz bacytracyna wykazywały średnio ok. 17,5 mm średnicy strefy zahamowania wzrostu (Rys. 3).

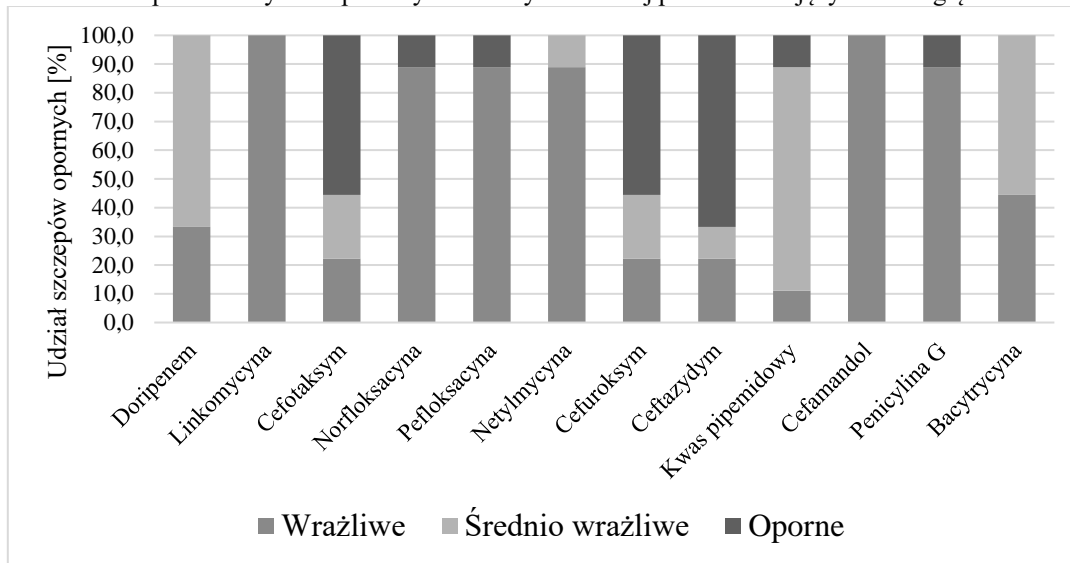
Rysunek 3. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu szczepów wyizolowanych z dolnej powierzchni języka powodowana przez wybrane grupy antybiotyków



Źródło: Opracowanie własne.

Wśród szczepów wyizolowanych z dolnej powierzchni języka wykazano wysoką oporność w stosunku do ceftazydymu (66,7%), cefotaksymu oraz cefuroksymu (55,6%). Najniższą oporność wykazano w stosunku do norfloksacynej, perfloksacynej, kwasu pipemidowego oraz penicyliny G (11%) (Rys. 4).

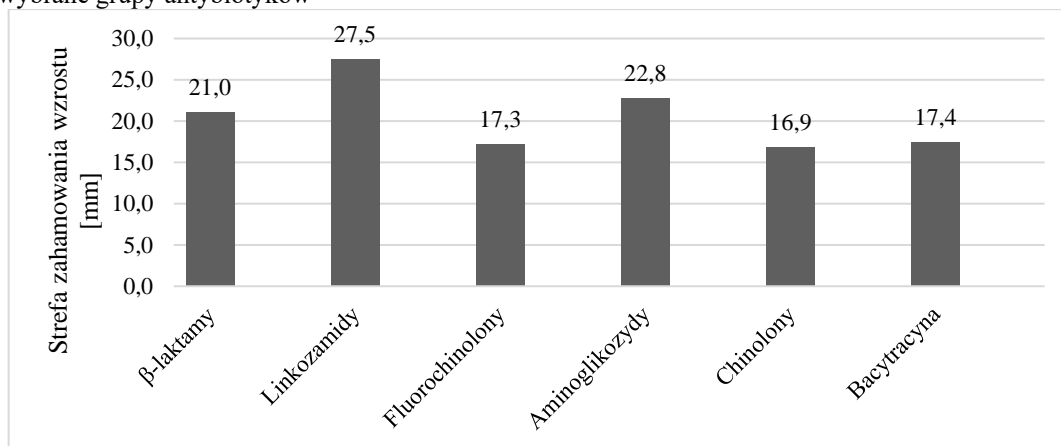
Rysunek 4. Podział procentowy szczepów wyizolowanych z dolnej powierzchni języka ze względu na wrażliwość



Źródło: Opracowanie własne.

W grupie szczepów wyizolowanych z okolic zębów, największą strefę zahamowania wzrostu wykazywały antybiotyki z grup linkozamidów (27,5 mm), aminoglikozydów (22,8 mm) oraz  $\beta$ -laktamy (21,0 mm). Pozostałe antybiotyki wykazywały średnią strefę zahamowania wzrostu 17,2 mm (Rys. 5).

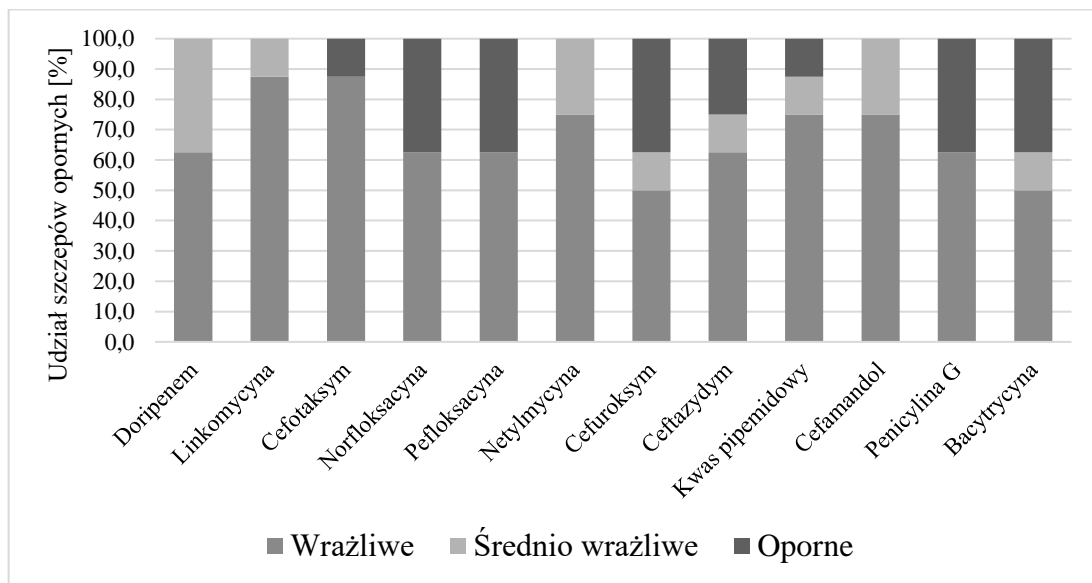
Rysunek 5. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu szczepów wyizolowanych z okolic zębów powodowana przez wybrane grupy antybiotyków



Źródło: Opracowanie własne.

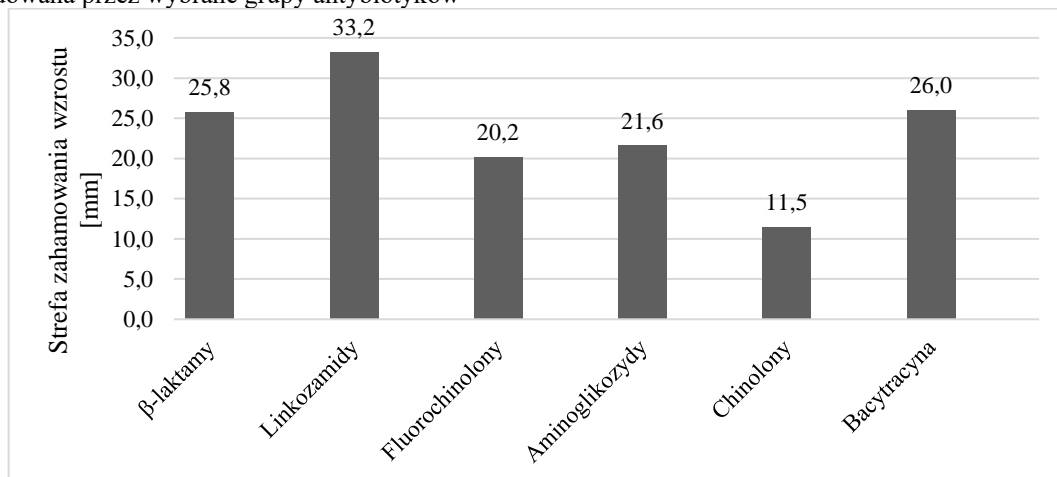
Wśród szczepów wyizolowanych z okolic zębów wykazano umiarkowaną oporność w stosunku do norfloksacyny (37,5%), perfloksacyny (37,5%), cefuroksymu (37,5%), penicyliny G (37,5%), bacytracyny (37,5%), cefotaksym (12,5%), ceftazydym (25%) oraz kwasy pipemidowego (12,5%). Wysoką wrażliwość wykazano w stosunku do wszystkich użytych antybiotyków, średnio 72% szczepów (Rys. 6).

Rysunek 6. Podział procentowy szczepów wyizolowanych z okolic zębów ze względu na wrażliwość



Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 7. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu szczepów wyizolowanych z podniebienia twardego powodowana przez wybrane grupy antybiotyków

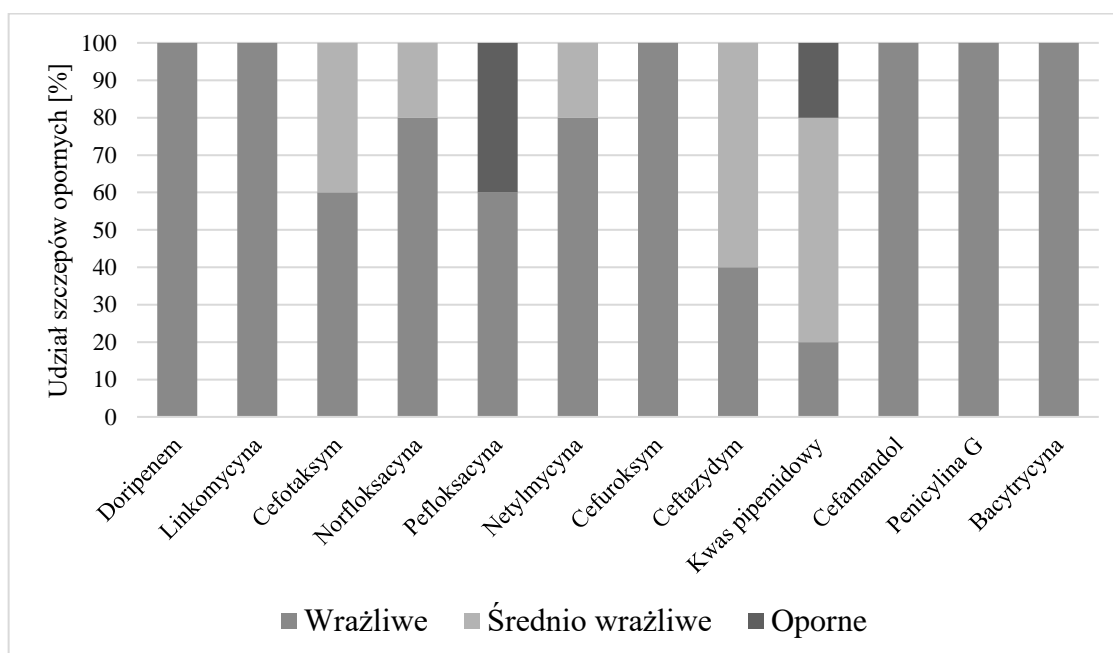


Źródło: Opracowanie własne.

W grupie szczepów wyizolowanych z okolic podniebienia twardego, największymi wartościami strefy zahamowania wzrostu, charakteryzowały się linkozamidy (33,2 mm), bacytracyna (26,0 mm) oraz  $\beta$ -laktamy (25,8 mm). Najmniejszą aktywność wykazywała grupa chinolonów (11,5 mm). Fluorochinolony oraz aminoglikozydy charakteryzowały się średnią strefą zahamowania wzrostu wynoszącą 21,0 mm (Rys. 7).

Wśród szczepów wyizolowanych z podniebienia twardego wykazano umiarkowaną oporność w stosunku na perfloksacynę (40%) i kwas pipemidowy (20%). Szczepy wykazywały 100% wrażliwość w stosunku do bacytracyny, penicyliny G, cefamandolu, cefuroksymu, linkomycynę oraz doripenemu (Rys. 8).

Rysunek 8. Podział procentowy szczepów wyizolowanych z podniebienia twardego ze względu na wrażliwość



Źródło: Opracowanie własne.

Przeprowadzone badania wykazały umiarkowaną bakteriocynogenność wśród hodowanych szczepów. Wykazano, że 10 szczepów z 46 wykazało właściwości hamujące wzrost szczepów referencyjnych (Tabela 3.).

Wśród szczepów wyizolowanych ze wszystkich ontocenozy jamy ustnej, najwięcej oddziałujących antagonistycznie na szczep referencyjny *Staphylococcus aureus* pochodziło z dolnej powierzchni języka (10,9%). Nieliczne bakterie wyizolowane z policzków jamy ustnej (2,2%) również oddziaływały hamująco na wzrost szczepu referencyjnego. Z pozostałych

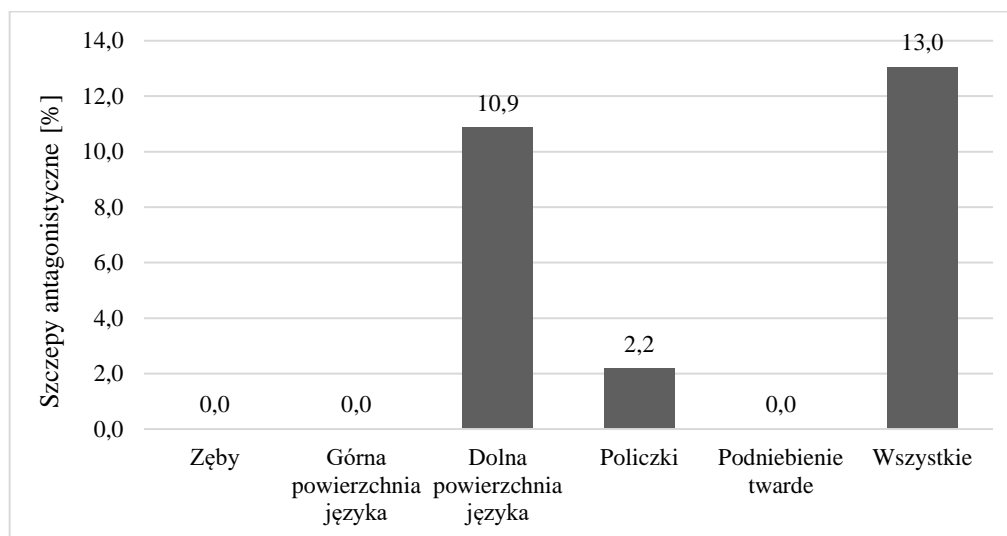
ontocenozy nie wyizolowano szczepów o cechach hamujących wzrost szczepu *Staphylococcus aureus* (Rys. 9).

Tabela 3. Szczepy wykazujące aktywność antagonistyczną

Lp.	Numer szczepu	Miejsce izolacji	Forma morfologiczna
1.	27.	Dolna powierzchnia języka	Formy przetrwalnikujące G(+)
2.	7.	Dolna powierzchnia języka	Formy przetrwalnikujące G(+)
3.	19.	Dolna powierzchnia języka	Formy przetrwalnikujące G(+)
4.	24.	Dolna powierzchnia języka	Formy przetrwalnikujące G(+)
5.	33.	Dolna powierzchnia języka	Formy przetrwalnikujące G(+)
6.	35.	Dolna powierzchnia języka	Formy ziarniakowe G(+)
7.	16.	Górna powierzchnia języka	Formy ziarniakowe G(+)
8.	22.	Górna powierzchnia języka	Formy ziarniakowe G(+)
9.	18.	Policzki	Formy ziarniakowe G(+)
10.	30.	Zęby	Formy otoczkujące

Źródło: Opracowanie własne.

Rysunek 9. Szczepy wykazujące aktywność antagonistyczną w stosunku do *Staphylococcus aureus*

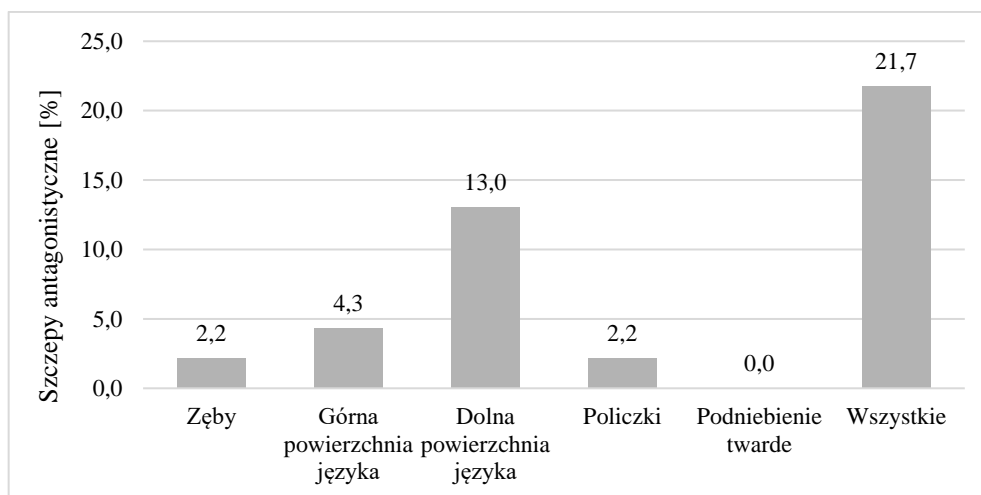


Źródło: Opracowanie własne.

Wśród szczepów wyizolowanych ze wszystkich ontocenozy jamy ustnej, najwięcej oddziałujących antagonistycznie na szczep referencyjny *Staphylococcus epidermidis*, pochodziło z dolnej powierzchni języka (13%). Dodatkowo, wyizolowano o takich samych

cechach szczepy z okolic zębów (2,2%), policzków (2,2%) oraz górnej powierzchni języka (4,4%). Z podniebienia twardego nie wyizolowano szczepu zahamowującego wzrost szczepu referencyjnego (Rys. 10).

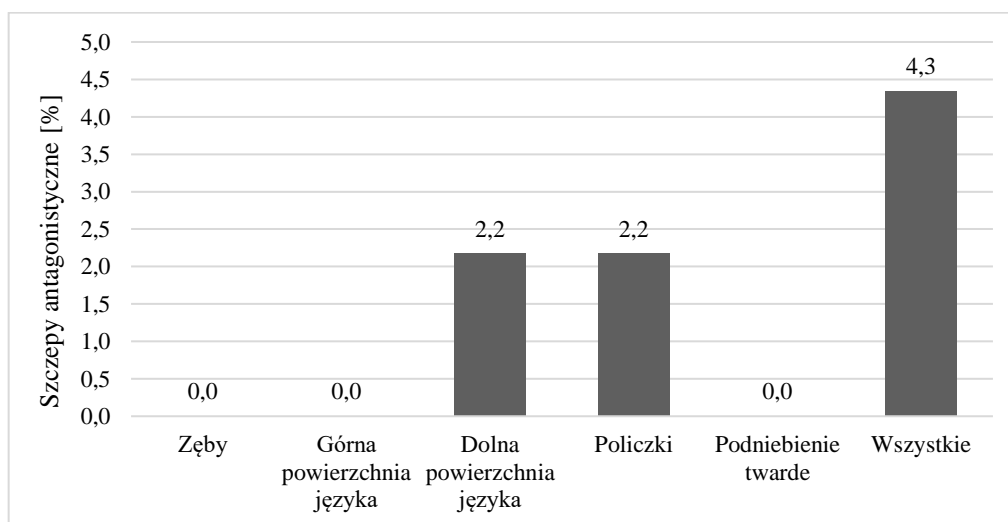
Rysunek 10. Szczepy wykazujące aktywność antagonistyczną w stosunku do *Staphylococcus epidermidis*



Źródło: Opracowanie własne.

Wśród szczepów wyizolowanych ze wszystkich ontocenozy jamy ustnej, najczęściej oddziałujących antagonistycznie na szczep referencyjny *Bacillus* sp. pochodziło z dolnej powierzchni języka oraz policzków. Liczba wyizolowanych bakterii w każdej niszy stanowiła ok. 2% z wszystkich szczepów. Z pozostałych ontocenoz nie wyizolowano szczepów o cechach hamujących wzrost szczepu referencyjnego (Rys. 11).

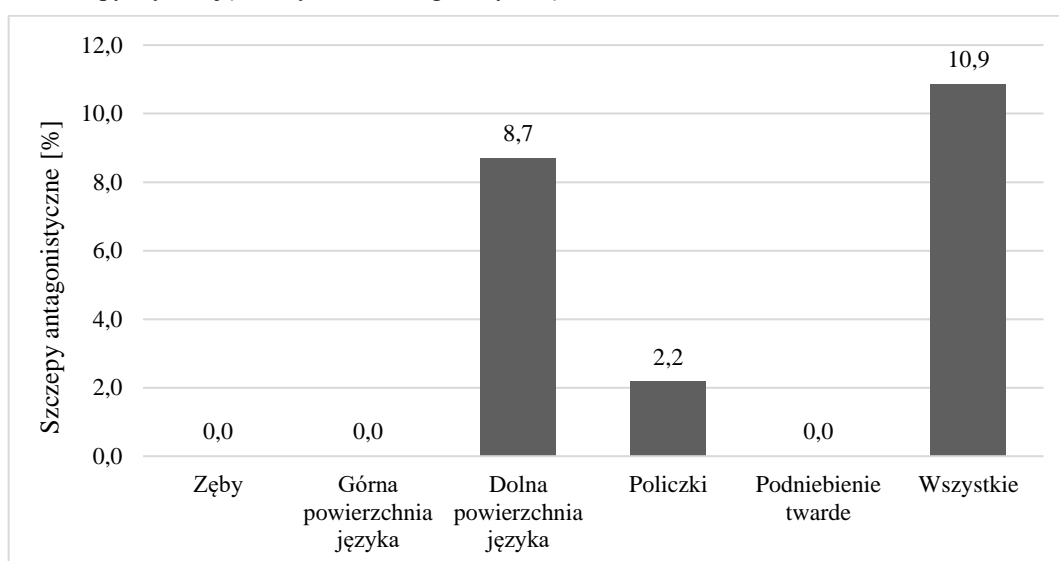
Rysunek 11. Szczepy wykazujące aktywność antagonistyczną w stosunku do *Bacillus* sp.



Źródło: Opracowanie własne.

Wśród szczepów wyizolowanych ze wszystkich ontocenozy jamy ustnej, najwięcej oddziałujących antagonisticznie na szczep referencyjny *Escherichia coli* pochodziło z dolnej powierzchni języka (8,7%). Dodatkowo wyizolowano bakterie o takich samych cechach z policzków jamy ustnej, których liczba wynosiła 2,2% wszystkich szczepów wyizolowanych. Z pozostałych ontocenoz nie wyizolowano szczepów o cechach hamujących wzrost szczepu referencyjnego (Rys.12).

Rysunek 12. Szczepy wykazujące aktywność antagonisticzną w stosunku do *Escherichia coli*



Źródło: Opracowanie własne.

## Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach uzyskano bazę szczepów, składającą się w większości z ziarenkowców gramdodatnich oraz form przetrwalnikowych, co jest zgodne z literaturą opisującą skład gatunkowy mikrobioty jamy ustnej z różnych ontocenoz (Salyers i Whitt 2003).

W toku badań własnych wykazano największą aktywnością biobójczą linkomycyny, uwarunkowane jest to faktem, iż jest to linkozamid nowej generacji, wykazujący skuteczną aktywność wobec bakterii gramdodatnich. Biorąc pod uwagę, że większość szczepów izolowanych stanowiły ziarniaki gramdodatnie, wynik największej wrażliwości jest potwierdzeniem jego skuteczności (Fines i Leclercq 2000). Najmniejszą aktywność wykazywał kwas pipemidowy, związek z grupy chinolonów. Jest to spowodowane tym, że spektrum jego działania obejmuje bakterie gramujemne, których wyizolowana liczba była nieznaczna

(Popiołek i in. 2017). Badania wykazały, że doripenem charakteryzował się wysoką aktywnością. Według literatury, antybiotyk ten cechuje się aktywnością wobec bakterii gramdodatnich, paciorkowców z grupy „viridans” oraz gronkowców, które często stanowią skład mikrobioty jamy ustnej (Li i in. 2015). Najliczniejszą grupę badanych antybiotyków stanowiły antybiotyki  $\beta$ -laktamowe. Wyniki wskazują na ich umiarkowaną aktywność, co może być spowodowane podobnym zakresem oddziaływań skierowanym na strukturę ściany komórkowej w stosunku do bakterii Gram-dodatnich (Abd 2018).

Przeprowadzone badania własne potwierdziły występowanie szczepów wykazujących oddziaływania antagonistyczne. Według bazy danych Human Oral Microbiome Database (HOMD), można założyć, że izolowane szczepy należały do rodzajów *Streptococcus* oraz *Bacillus*. Najczęściej produkowanymi, przez szczepy *Bacillus* sp. bakteriocynami są cereina, mersacydyna i subtilina (Chatterjee i in. 1992), natomiast przez szczepy *Streptococcus* sp. to saliwarycyna, mutacyna i nizyna (Santiagati i in. 2012). Wyniki badań wskazują na najsilniejsze działanie antagonistyczne w stosunku do szczepów referencyjnych *Staphylococcus epidermidis* i *Lactobacillus* sp., przeciwko którym najbardziej oddziałują wcześniej wymienione bakteriocyny (Hsu i in. 2003). Niskie oddziaływanie w stosunku do szczepu referencyjnego *Bacillus* sp., można tłumaczyć działaniem na ten szczep bakteriocyn pochodzących w większości od szczepów z tego samego rodzaju.

## Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazywały bardzo zróżnicowany zakres antybiotykooporności wśród szczepów izolowanych z jamy ustnej, w stosunku do poszczególnych grup antybiotyków. Nie wykazano znaczących różnic pomiędzy antybiotykoopornością szczepów izolowanych z poszczególnych rejonów jamy ustnej, co sugeruje występowanie mechanizmów homogenizacji mikrobioty jamy ustnej. Analiza wrażliwości na antybiotyki wskazuje na najwyższą efektywność działania biobójczego linkozamidów, antybiotyków wprowadzonych do rutynowej terapii stosunkowo niedawno. Wykonana w toku badań własnych aktywność bakteriocynogenna izolowanych szczepów, potwierdza tezę o znaczeniu oddziaływań antybiotycznych bakterii w kształtowaniu mikrobiocenozy jamy ustnej.



## Literatura

- Abd L.S. 2018. *Historical review of the penicillin and related compounds ( $\beta$ -lactams)*. Al-Mustansiriyah J. Pharm. Sci, 18(1): 109-127.
- Costalonga M., Herzberg M.C. 2014. *The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries*. Immunology letters, 162(2): 22-38.
- Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C. 2012. *Bacteriocin production: a probiotic trait?*. Appl. Environ. Microbiol, 78(1): 1-6.
- Fines M., Laclercq R. 2000. *Activity of linezolid against Gram-positive cocci possessing genes conferring resistance to protein synthesis inhibitors*. J. Antimicrob. Chemother. 45(6): 797-802.
- Golkar Z., Bagazra O., Pace D.G. 2014. *Bacteriophages therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis*. J Infect Dev Ctries, 8(2): 129-136.
- Johnson, C. L., Versalovic, J. 2012. *The human microbiome and its potential importance to pediatrics*. Pediatrics, 129(5): 950-960.
- Kamada N., Chen G.Y., Inohara N. 2013. *Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota*. Nature Immunology, 14(7): 685-690.
- Mathur S., Singh R. 2005. *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review*. Int J Food Microbiol, 105(3): 281-295.
- McCullough A.R., Parekh S., Rathbone J., Del Mar C.B., Hoffmann T.C. 2016. *A systematic review of the public's knowledge and beliefs about antibiotic resistance*. J Antimicrob Chemother, 71: 27-33.
- Popiołek Ł., Biernasiuk A., Paruch K., Malm A., Wujec M. 2017. *Synthesis and in vitro antimicrobial activity screening of new pipemidic acid derivatives*. Arch. Pharm. Res.: 1-13.
- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S., & Isolauri, E. 2012. *Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease*. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol, 9(10): 565.
- Salminen S., Isolauri E.. 2006. *Intestinal colonization, microbiota, and probiotics*. J Pediatr, 149: 115-120.
- Salyers A.A., Whitt D.D. 2012. *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*. PWN, Warszawa.
- Sapatnekar N.M., Sucheta N.P., Aglave B.A. 2010. *Extraction of bacteriocin and study of its antagonistic assay*. Int. J. Biotech. Bioch., 6(6): 865-871.
- Ventola L.C. 2015. *The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats*. Pharmacy and Therapeutics, 40(4): 277.
- Yamanaka T., Furukawa T., Matsumoto-Mashimo Ch., Yamane K., Sugimori Ch., Nambu T., Mori N., Nishikawa H., Walker C. B., Leung K.P., Fukushima H.. 2009. *Gene expression profile and pathogenicity of biofilm Prevotella intermedia strain 17*. BMC Microbiol.: 9:11.