

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

8(1) 2009



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Opracowanie redakcyjne i korekta:
Janina Szydłowska
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie
Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644–065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2009

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax 71 328–12–77
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 2,43. Ark. druk. 2,25
Druk i oprawa: EXPOL s.c. Drukarnia Piotr Rybiński
ul. Brzeska 4, 87–800 Włocławek

WPLYW GRZYBÓW RODZAJU *TRICHODERMA* NA WZROST PATOGENNYCH GRZYBÓW STRZĘPKOWYCH W TESTACH BIOTYCZNYCH NA NIETYPOWYCH ŹRÓDŁACH WĘGLA

Michał Piegza, Justyna Stolaś, Anna Kancelista, Danuta Witkowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W pracy przedstawiono wyniki badań wzajemnych interakcji pomiędzy trzema szczepami grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* a dziewięcioma szczepami patogennych grzybów strzępkowych. Testy biotyczne dwuorganizmowe przeprowadzono w podłożach imitujących środowisko naturalne (zmielone ziarna czterech najpopularniejszych zbóż), co jest modyfikacją standardowo wykonywanych testów. Poszczególne mikroorganizmy testowane i testowe wykorzystywały w różnym stopniu zboża jako źródła składników odżywczych, co przejawiało się niejednakowym tempem wzrostu oraz różnicami we wzajemnych oddziaływaniach. Najsilniejsze zdolności antagonistyczne wykazywał szczep *Trichoderma harzianum* T33, w wielu przypadkach powodując całkowitą inhibicję wzrostu szczepów testowych. Żaden z badanych fitopatogenów nie wpłynął negatywnie na wzrost szczepu T33, co zaobserwowano w interakcjach z pozostałymi szczepami testowanymi.

Słowa kluczowe: biokontrola, *Trichoderma*, fitopatogen, hodowle dwuorganizmowe

WSTĘP

Metody biologiczne oraz zabiegi mechaniczne są dotychczas powszechnie wykorzystywane w ochronie środowiska do niszczenia chorych i mniej ekonomicznych roślin oraz usuwania pasożytów [Gerhardson 2002, Mańka 2005, Fiedorow i in. 1999]. Jednakże gwałtowny rozwój rolnictwa sprawił, że metody te są niewystarczające w efektywnej ochronie roślin. Z kolei stosowanie pestycydów jako środków ochronnych budzi coraz więcej kontrowersji, ponieważ działają one niewybiórczo, toksycznie w stosunku do wszystkich organizmów żywych, a głównym problemem jest ich biodegradacja [Jaworska 2005, Spadaro i Gullino 2004]. Powyższe czynniki sprawiają, że celem jest poszukiwanie alternatywnych metod ochrony roślin, w tym polegających na interakcjach pomiędzy patogenami a mikroorganizmami mogącymi sprawować nad nimi kontrolę.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Michał Piegza, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: Michal.Piegza@wnoz.up.wroc.pl

Pojęcie „biokontroli” po raz pierwszy zdefiniował w 1970 r. Garrett, podając, że „biologiczna kontrola jest to praktyka lub proces, dzięki którym zostają zredukowane niepożądane efekty organizmu, poprzez działalność innego organizmu, który nie jest rośliną – gospodarzem, szkodnikiem, patogenem lub człowiekiem”. Intensywny rozwój metod biologicznej kontroli roślin jest możliwy dzięki obserwacjom interakcji występujących naturalnie w przyrodzie. Zauważono, że grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma* posiadają zdolność do kolonizowania i wzrostu w połączeniu z korzeniami roślinnymi („ryzosfero-kompetentność”). Dłuższe zasiedlanie powierzchni korzenia prowadzi do penetracji epidermy przez strzępki grzyba – czego rezultatem może być rozwinięcie przez roślinę tzw. ogólnoustrojowej indukowanej odporności pozwalającej na obronę przed fitopatogenami [Howell 2003, Harman i in. 2004]. W latach siedemdziesiątych po raz pierwszy wykorzystano *Trichoderma* w warunkach polowych do kontroli fitopatogennych grzybów *Sclerotium rolfsii*, a obecnie wykorzystuje się je w biokontroli także innych patogenów roślinnych, m.in.: *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* [Spiegel i Chet 1998].

Powszechne zainteresowanie oraz wykorzystanie grzybów strzępkowych *Trichoderma* wynika przede wszystkim z cech predysponujących je do biologicznej kontroli szkodników roślinnych, takich jak tempo wzrostu, wysokie zdolności reprodukcyjne oraz efektywne mechanizmy antagonistyczne [Schoeman i in. 1999]. Najistotniejszą rolę w interakcjach odgrywają wzajemne oddziaływania, wśród których wyróżniamy: konkurencję o składniki pokarmowe i przestrzeń, antybiozę, tj. produkcję inhibujących substancji, np. antybiotyków [Pięta 1997, Schoeman i in. 1999, Howell 2003, Spadaro i Gullino 2004, Mańka 2005] oraz mykoparazytyzm, czyli bezpośrednią interakcję między patogenem a *Trichoderma* spp. [Pięta 1997, Markovich i Kononova 2003, Harman i in. 2004].

Szybko postępujący rozwój rolnictwa oraz pojawiające się zaostżenia prawne w ochronie środowiska skłaniają do prowadzenia badań nad doskonaleniem biologicznych metod ochrony roślin, które opierają się na zjawiskach naturalnie występujących w przyrodzie. Niniejsze badania miały na celu potwierdzić możliwość zastosowania szczepów *Trichoderma* w procesach biokontroli przeciwko powszechnym fitopatogenom z rodzajów *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis* oraz *Absidia*.

MATERIAŁ BADAWCZY I METODY

Mikroorganizmy. Materiał badawczy stanowiły szczepy grzybów strzępkowych, w tym 9 szczepów testowych oraz 3 szczepy testowane. Szczepy testowe (*Absidia glanca* 148, *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. 23, *F. avenaceum* 1, *F. poae* KF617) oraz testowane (*Trichoderma hamatum* T2, *T. hamatum* C1, *T. harzianum* T33) pochodziły z kolekcji czystych kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Pozostałe szczepy testowe (*Botrytis cinerea*, *B. cinerea* 409, *B. cinerea* 617, *F. oxysporum* 544(26)) pochodziły z kolekcji Katedry Ochrony Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Metody analityczne. Badanie wzajemnych oddziaływań pomiędzy szczepami testowymi i testowanymi przeprowadzono na czterech podłożach zawierających 3% zmielnego ziarna jednego ze zbóż (kukurydza, jęczmień, pszenica, żyto) stanowiącym jedyne

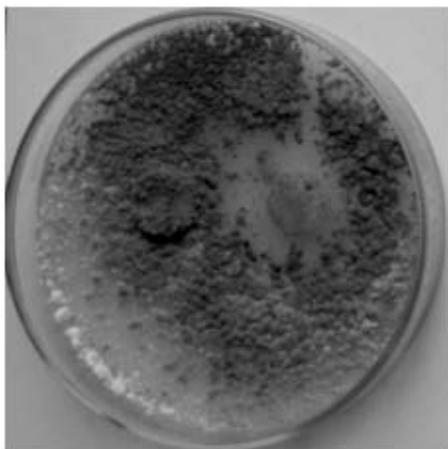
źródło składników odżywczych. Początkowo wykonano zmyw biomasy szczepów testowych i testowanych sterylnym roztworem Tweenu 80 (0,1%) i posiano powierzchniowo na podłoże PDA (Difco). Po 7 dobach inkubacji w temp. 25°C wycięto sterylnym korkoborem słupki o średnicy 10 mm i przeniesiono je na badane podłoża, tak aby odległość pomiędzy nimi wyniosła 20 mm. Tak otrzymane hodowle dwuorganizmowe inkubowano 7 dni w temp. 25°C, a następnie oceniono efekt oddziaływań wg skali Mańki [Mańka 1974]. Kontrole stanowiły hodowle jednoorganizmowe wykonane w analogiczny sposób. Wszystkie testy wykonano w dwóch powtórzeniach. Ponadto, dla zobrazowania zachodzących interakcji, wykonano dokumentację fotograficzną.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Dziewięć szczepów grzybów testowych poddano testom biotycznym, w których zastosowano podłoża zawierające zmielone ziarna (3%) jednego z czterech zbóż: kukurydzy, jęczmienia, żyta lub pszenicy. Modyfikacja ta, odbiegająca od klasycznie wykonywanych testów na podłożu PDA, miała na celu zbadanie wzajemnych interakcji między patogenami a grzybami testowanymi, w warunkach imitujących środowisko naturalne. Wyniki przeprowadzonych testów biotycznych przedstawiono w 8-punktowej skali zaproponowanej przez Mańkę [1974].

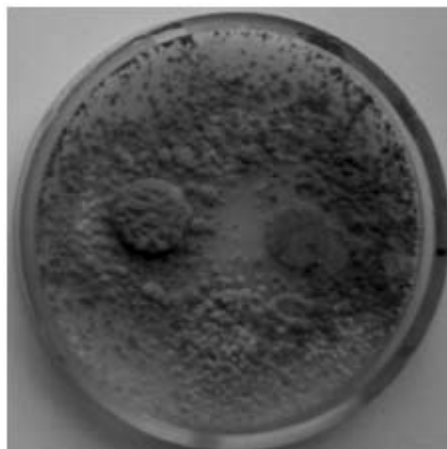
Podłoże z ziarnem kukurydzy

Pierwsze testy przeprowadzono na podłożu zawierającym zmielone ziarno kukurydzy (3%). *T. harzianum* T33 we wszystkich przebadanych interakcjach był organizmem dominującym, aż w sześciu kokulturach całkowicie zahamował wzrost patogenów – uzyskując maksymalną ilość punktów, tj. +8 (fot. 1, 2, tab. 1). Szczep T33 w mniejszym stopniu ograniczył rozwój *B. cinerea* 617, otaczając mniej niż 2/3 kolonii szczepu testowego (+3 punkty) oraz *Fusarium* sp. 23 (+4 punkty). Zdolności antagonistyczne szczepu *T. hamatum* C1 w hodowli na opisywanym podłożu były słabe, zaobserwowano wręcz zahamowanie wzrostu grzyba testowanego, który uzyskał odpowiednio -1, -1 oraz -2 punkty w kokulturach ze szczepami testowanymi *B. cinerea* 409, *B. cinerea* 617 oraz *Fusarium* sp. 23. Szczep *T. hamatum* T2 cechowały znikome zdolności antagonistyczne, tylko w dwóch kokulturach (z *F. avenaceum* 1 oraz *B. cinerea*) ograniczył on wzrost patogenów (+ 1 punkt) (tab. 1). W przypadku hodowli szczepu T2 z *F. oxysporum* 544(26) oraz *Alternaria* sp. oba szczepy spotkały się wzdłuż linii prostej, co świadczy o braku interakcji pomiędzy nimi. W pozostałych kombinacjach patogeny ograniczyły wzrost grzyba testowanego, uzyskując od +1 do +3 punktów (tab. 1).



Fot. 1. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. harzianum* T33 (z prawej) i *B. cinerea* (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem kukurydzy (25°C)

Phot. 1. Interaction between *T. harzianum* T33 (right) and *B. cinerea* (left) after 7 days of dual culture on corn medium



Fot. 2. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. harzianum* T33 (z prawej) i *F. oxysporum* 544(26) (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem kukurydzy (25°C)

Phot. 2. Interaction between *T. harzianum* T33 (right) and *F. oxysporum* 544(26) (left) after 7 days of dual culture on corn medium

Tabela 1. Wyniki testu biotycznego wg Mańki w hodowlach dwuorganizmowych prowadzonych na podłożu z ziarnem kukurydzy

Table 1. Results of biotic test according to Mańka in dual cultures carried out on corn medium

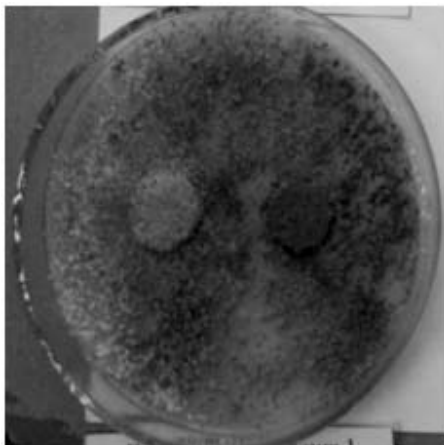
Szczep Strain	<i>T. hamatum</i> C1	<i>T. harzianum</i> T33	<i>T. hamatum</i> T2	Suma Total
<i>Botrytis cinerea</i> 409	-1	+8	-2	-5
<i>Botrytis cinerea</i> 617	-1	+3	-1	-1
<i>Botrytis cinerea</i>	+7	+8	+1	-16
<i>Fusarium</i> sp. 23	-2	+4	-1	-1
<i>Absidia glanca</i> 148	+8	+8	-1	-15
<i>Fusarium oxysporum</i> 544(26)	+6	+8	0	-14
<i>Fusarium poae</i> KF617	+7	+6	-3	-10
<i>Alternaria</i> sp.	+7	+8	0	-15
<i>Fusarium avenaceum</i> 1	+7	+8	+1	-16

Podłoże z ziarnem jęczmienia

Kolejne testy biotyczne przeprowadzono na podłożu ze zmielonym ziarnem jęczmienia (3%). Najsilniejszym antagonistą był szczep *T. harzianum* T33, w kokulturach z czterema szczepami fitopatogenicznymi zaobserwowano całkowite zahamowanie ich rozwoju (fot. 3, tab. 2). W mniejszym stopniu został ograniczony wzrost szczepów *B. cinerea* 409 (+5 punktów), *Fusarium* sp. 23 (+4 punkty) oraz *B. cinerea* 617 (+3 punkty), a pomiędzy szczepami T33 i *Alternaria* sp. nie zaobserwowano żadnych interakcji (0 punktów) (tab. 2).

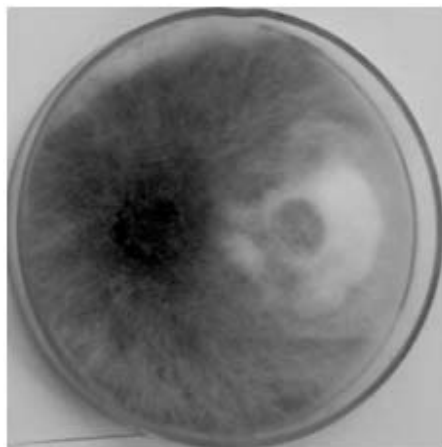
Szczep *T. hamatum* C1 na podłożu z ziarnem jęczmienia wykazywał wyższe uzdolnienia antagonistyczne niż na podłożu z ziarnem kukurydzy. W żadnej z przeprowadzonych hodowli nie nastąpiło zahamowanie wzrostu grzyba testowanego, a w kokulturze z *A. glauca* 148 nie zaobserwowano żadnych interakcji (0 punktów). Omawiany grzyb testowany ograniczał w różnym stopniu wzrost patogenów, najslabiej hamował rozwój szczepów *B. cinerea*, *B. cinerea* 409 (+2 punkty), *B. cinerea* 617 oraz *Fusarium* sp. 23 (+1 punkt), natomiast wzrost pozostałych czterech szczepów został ograniczony w znacznym stopniu (od +6 do +7 punktów) (tab. 2).

W przeprowadzonym teście biotycznym z udziałem *T. hamatum* T2 nie zaobserwowano żadnych właściwości antagonistycznych badanego szczepu. Hodowle ze szczepami *A. glauca* 148, *F. oxysporum* 544(26), *F. poae* KF617, *Alternaria* sp., *F. avenaceum* 1 przebiegały wzdłuż linii prostej – nie wystąpiły żadne oddziaływania pomiędzy badanymi drobnoustrojami (tab. 2). W przypadku pozostałych czterech kokultur doszło do znacznego ograniczenia wzrostu testowanego przez fitopatogeny (fot. 4).



Fot. 3. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. harzianum* T33 (z prawej) i *F. avenaceum* 1 (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem jęczmienia (25°C)

Phot. 3. Interaction between *T. harzianum* T33 (right) and *F. avenaceum* 1 (left) after 7 days of dual culture on barley medium



Fot. 4. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. hamatum* T2 (z prawej) i *Fusarium* sp. 23 (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem jęczmienia (25°C)

Phot. 4. Interaction between *T. hamatum* T2 (right) and *Fusarium* sp. 23 (left) after 7 days of dual culture on barley medium

Tabela 2. Wyniki testu biotycznego wg Mańki w hodowlach dwuorganizmowych prowadzonych na podłożu z ziarnem jęczmienia

Table 2. Results of biotic test according to Mańka in dual cultures carried out on barley medium

Szczep Strain	<i>T. hamatum</i> C1	<i>T. harzianum</i> T33	<i>T. hamatum</i> T2	Suma Total
<i>Botrytis cinerea</i> 409	+2	+5	-4	-3
<i>Botrytis cinerea</i> 617	+1	+3	-4	0
<i>Botrytis cinerea</i>	+2	+7	-5	-4
<i>Fusarium</i> sp. 23	+1	+4	-3	-2
<i>Absidia glanca</i> 148	0	+8	0	-8
<i>Fusarium oxysporum</i> 544(26)	+6	+8	0	-14
<i>Fusarium poae</i> KF617	+7	+8	0	-15
<i>Alternaria</i> sp.	+6	0	0	-6
<i>Fusarium avenaceum</i> 1	+6	+8	0	-14

Podłoże z ziarnem żyta

Podobnie jak w przypadku omówionych powyżej testów biotycznych szczep T33 wykazał najwyższe zdolności antagonistyczne. W przeprowadzonych hodowlach grzyb testowany ograniczył całkowicie wzrost trzech patogenów (tab. 3), uzyskując maksymalną liczbę punktów (+8 pkt.). Mniej efektywne oddziaływanie zaobserwowano w kokulturach z *B. cinerea* 409, *B. cinerea*, *A. glanca* 148, *Alternaria* sp., *B. cinerea* 617, natomiast w kokulturze z *Fusarium* sp. 23 szczep T33 (fot. 6) uzyskał tylko 2 punkty (tab. 3).

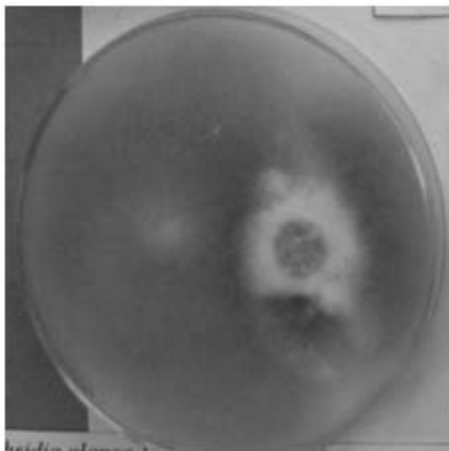
Tabela 3. Wyniki testu biotycznego wg Mańki w hodowlach dwuorganizmowych prowadzonych na podłożu z ziarnem żyta

Table 3. Results of biotic test according to Mańka in dual cultures carried out on rye medium

Szczep Strain	<i>T. hamatum</i> C1	<i>T. harzianum</i> T33	<i>T. hamatum</i> T2	Suma Total
<i>Botrytis cinerea</i> 409	+3	+7	-4	-6
<i>Botrytis cinerea</i> 617	+1	+6	-3	-4
<i>Botrytis cinerea</i>	+2	+7	-2	-7
<i>Fusarium</i> sp. 23	-4	+2	-2	+4
<i>Absidia glanca</i> 148	+6	+7	-6	-7
<i>Fusarium oxysporum</i> 544 (26)	+6	+8	0	-14
<i>Fusarium poae</i> KF617	+6	+8	0	-14
<i>Alternaria</i> sp.	+7	+7	+6	-20
<i>Fusarium avenaceum</i> 1	+7	+8	+6	-21

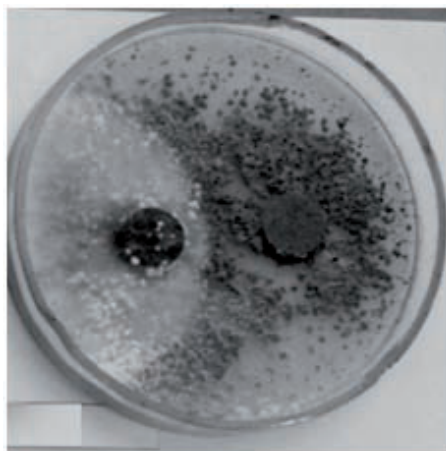
Szczep *T. hamatum* C1 ograniczył wzrost ośmiu z dziewięciu badanych fitopatogenów (+1 – +8 pkt), natomiast tylko szczep *Fusarium* sp. 23 zahamował wzrost grzyba testowanego, otaczając ponad 2/3 kolonii (tab. 3).

Grzyb *T. hamatum* T2 w testach biotycznych prowadzonych na podłożu z ziarnem żyta w dwóch przypadkach wykazał się wysokimi zdolnościami antagonistycznymi, praktycznie całkowicie ograniczając wzrost szczepów *Alternaria* sp. oraz *F. avenaceum* 1 (+6 pkt). W kokulturze z *F. poae* KF617 oraz *F. oxysporum* 544(26) nie doszło do żadnych interakcji (0 pkt), natomiast w pozostałych hodowlach rozwój szczepu T2 został zahamowany przez fitopatogen (od -2 pkt do -6 pkt) (fot. 5, tab. 3).



Fot. 5. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. hamatum* T2 (z prawej) i *A. glauca* 148 (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem żyta (25°C)

Phot. 5. Interaction between *T. hamatum* T2 (right) and *A. glauca* 148 (left) after 7 days of dual culture on rye medium



Fot. 6. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. harzianum* T33 (z prawej) i *Fusarium* sp. 23 (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem żyta (25°C)

Phot. 6. Interaction between *T. harzianum* T33 (right) and *Fusarium* sp. 23 (left) after 7 days of dual culture on rye medium

Podłoże z ziarnem pszenicy

Ostatnie testy wykonano na podłożu z dodatkiem zmielonego ziarna pszenicy (3%). Najefektywniejszym antagonistą był szczep *T. harzianum* T33, który we wszystkich przebadanych interakcjach powodował bardzo silne ograniczenie wzrostu patogenów, a w trzech przypadkach (z *F. poae* KF617, *Alternaria* sp., *F. avenaceum* 1) (fot. 7) zahamował całkowicie wzrost grzybów testowych, uzyskując tym samym +8 punktów (tab. 4). Najśłabszy efekt biotyczny zaobserwowano w hodowli z *B. cinerea* 617 – szczep T33 otrzymał +4 punkty.

Szczep *T. hamatum* C1 wykazywał również wysoki stopień antagonizmu w stosunku do badanych fitopatogenów, nie był on jednak tak znaczący jak u szczepu T33. W hodowli z *Fusarium* sp. 23 nastąpiło zahamowanie wzrostu grzyba testowanego, ograniczenie było jednak niewielkie – grzyb testowy otoczył mniej niż 1/3 kolonii *T. hamatum* C1 (+1 punkt). W pozostałych kokulturach dominował grzyb testowany,

uzyskując od +2 do +7 punktów, w najmniejszym stopniu hamując wzrost *B. cinerea* 617 (tab. 4). Podobnie jak w opisanych powyżej testach szczep *T. hamatum* T2 charakteryzowały niewielkie zdolności antagonistyczne, które zaobserwowano w hodowlach z *F. oxysporum* 544(26), *Alternaria* sp. oraz *F. avenaceum* 1 (szczep T2 uzyskał +6 punktów). We wszystkich pozostałych interakcjach nastąpiło zahamowanie wzrostu szczepu T2 przez patogeny (fot. 8, tab. 4).

Tabela 4. Wyniki testu biotycznego wg Mańki w hodowlach dwuorganizmowych prowadzonych na podłożu z ziarnem pszenicy

Table 4. Results of biotic test according to Mańka in dual cultures carried out on wheat medium

Szczep Strain	<i>T. hamatum</i> C1	<i>T. harzianum</i> T33	<i>T. hamatum</i> T2	Suma Total
<i>Botrytis cinerea</i> 409	–	–	–	–
<i>Botrytis cinerea</i> 617	+2	+4	-2	-4
<i>Botrytis cinerea</i>	+5	+6	-2	-9
<i>Fusarium</i> sp. 23	-1	+6	-3	-2
<i>Absidia glanca</i> 148	+5	+7	-1	-11
<i>Fusarium oxysporum</i> 544(26)	+5	+7	+4	-16
<i>Fusarium poae</i> KF617	+6	+8	-1	-13
<i>Alternaria</i> sp.	+7	+8	+5	-20
<i>Fusarium avenaceum</i> 1	+7	+8	+6	-21



Fot. 7. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. harzianum* T33 (z prawej) i *Alternaria* sp. (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem pszenicy (25°C)

Phot. 7. Interaction between *T. harzianum* T33 (right) and *Alternaria* sp. (left) after 7 days of dual culture on wheat medium



Fot. 8. Efekt wzajemnego oddziaływania na siebie grzybów *T. hamatum* T2 (z prawej) i *B. cinerea* (z lewej) po 7-dniowym okresie wspólnego wzrostu na podłożu z ziarnem pszenicy (25°C)

Phot. 8. Interaction between *T. hamatum* T2 (right) and *B. cinerea* (left) after 7 days of dual culture on wheat medium

DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania prowadzone z udziałem grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* mają na celu wyselekcjonowanie szczepów o bardzo wysokich zdolnościach antagonistycznych w stosunku do fitopatogenów. Bardzo intensywnie badane są związki o aktywności antygrzybowej syntetyzowane przez *Trichoderma* sp., do których należą zarówno substancje lotne, jak i nielotne o działaniu antybiotycznym, a także enzymy hydrolityczne uczestniczące w zjawisku mykoparazytyzmu. Dokładne poznanie mechanizmów kontroli pozwalających *Trichoderma* sp. zwalczać szeroką gamę fitopatogenów umożliwia tworzenie bardzo aktywnych biopestycydów, charakteryzujących się wysoką specyficnością i selektywnością działania.

Dwuorganizmowe testy biotyczne wykonane w prezentowanej pracy umożliwiły równoczesny wzrost szczepów testowych i testowanych w tych samych warunkach – równocześnie wskazując na zróżnicowanie wyników w zależności od zastosowanego podłoża. Efekt wzajemnego oddziaływania zestawionych grzybów był różny, co wynikało z ich odmiennych właściwości biotycznych. Na wszystkich przebadanych podłożach najsilniejsze zdolności antagonistyczne wykazywał szczep *T. harzianum* T33, w wielu przypadkach powodując całkowite zahamowanie wzrostu grzybów testowych, tylko w nielicznych hodowlach inhibicja nie przekroczyła +5 punktów (tab. 1–4). Nieco słabszy antagonizm cechował szczep *T. hamatum* C1, który powodował zahamowanie rozwoju niektórych patogenów, jednak stopień inhibicji nie był już tak wysoki, jak w przypadku *T. harzianum* T33. Wynika to prawdopodobnie ze słabszych zdolności konkurencyjnych *T. hamatum* C1 – wolniejszy wzrost oraz mniej obfite zarodnikowanie powodują, że grzyb ten nie może całkowicie zdominować przestrzeni, w której się rozwija. Można także przypuszczać, że szczep C1 produkuje mniejszą ilość związków (antybiotyków, enzymów litycznych) inhibujących wzrost niepożądanych mikroorganizmów. Szczep T2 w minimalnym stopniu spowodował zahamowanie rozwoju fitopatogenów, zwykle to jego wzrost był ograniczany (tab. 1–4).

Wyniki uzyskane w testach wskazują na możliwość wykorzystania grzybów rodzaju *Trichoderma* jako czynników biokontrolnych (BCAs – biocontrol agents), czego potwierdzeniem są liczne doniesienia literaturowe. Kucuk i Kivanc [2003] zbadali jak wpływa zastosowanie filtratów po hodowli *Trichoderma* spp. na inhibicję patogenów roślinnych. Najlepsze wyniki osiągnięto dla szczepu *T. harzianum* T19, który powodował hamowanie wzrostu największej ilości fitopatogennych grzybów. Autorzy udowodnili inhibicyjny wpływ lotnych i nielotnych metabolitów na wzrost i rozwój patogenów, zwracając równocześnie uwagę na większą efektywność działania tych drugich. Jednoznacznie wskazywali oni możliwość wykorzystania określonych izolatów *T. harzianum* jako czynników biokontrolnych.

Podobne wnioski wynikają z badań Witkowskiej i Maj [2002], gdzie autorki analizowały oddziaływania w hodowlach skojarzonych, wykorzystując szczepy *T. hamatum* C1, *T. harzianum* T33 oraz *T. reesei* 7-1 (mutant UV) przeciwko grzybom *B. cinerea*, *F. oxysporum* oraz *F. culmorum*. Po 5-dobowym okresie inkubacji we wszystkich hodowlach stwierdzono znaczną inhibicję wzrostu grzybów fitopatogenicznych. Wyraźne ograniczenie wzrostu patogenów wykazano także w testach dyfuzyjnych, a największą inhibicję wywołały szczepy *T. hamatum* C1 i *T. reesei* 7-1. W przeciwieństwie do wyników otrzymanych w niniejszej pracy szczep *T. harzianum* T33 w badaniach Witkowskiej i Maj

[2002] nie był najefektywniejszym czynnikiem biokontroli, w testach dyfuzyjnych nie spowodował znacznego ograniczenia wzrostu.

Podobne oddziaływania pomiędzy patogenem *Cladosporium herbarum* a różnymi gatunkami *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. polysporum*, *T. viride*, *T. koningii*) były przedmiotem badań Barbosa i in. [2001]. Przeprowadzone eksperymenty udowodniły, że badane grzyby z rodzaju *Trichoderma* (z wyjątkiem *T. koningii*) posiadają silne zdolności antagonistyczne. Wykazano znaczne różnice w tempie wzrostu patogenu oraz grzybów testowanych. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* spp. rozwijały się znacznie szybciej, niezależnie od tego czy hodowla była jednoorganizmowa, czy skojarzona. Duża dynamika wzrostu powoduje, że grzyby testowane w szybkim tempie mogą opanować niszę, w której się rozwijają oraz wyczerpać obecne w podłożu składniki pokarmowe, uniemożliwiając rozwój patogenom. Badania Barbosa i in. [2001] udowodniły również inhibicję wzrostu oraz sporulacji *C. herbarum* w wyniku działania nietlotnych metabolitów obecnych w podłożu, wytwarzanych przez *Trichoderma* spp.

Perello i in. [2003] dowiedli antagonistycznych zdolności *Trichoderma* spp. w badaniach nad *Pyrenophora tritici-repentis*, szeroko rozpowszechnionym patogenem pszenicy. Przebadałi oni 15 szczepów *Trichoderma* w kierunku ich zdolności do hamowania rozwoju patogenu w warunkach laboratoryjnych i szklarniowych. Analizy *in vitro* wskazały na znaczne różnice w inhibicji rozwoju grzyba testowego w zależności od wykorzystanego izolatu *Trichoderma* (od ~ 50 do ~ 75%). Autorzy dowodzą, że występujący antagonizm może być następstwem działania różnych mechanizmów, np. konkurencji o przestrzeń i składniki pokarmowe (szczepy *Trichoderma* spp. bardzo szybko kolonizowały płytki testowe), mykoparazytyzmu czy antybiozy (obserwacje mikroskopowe wykazały zmiany morfologiczne patogenu – penetracja strzępek, liza grzybni, granulacja cytoplazmy). Autorzy potwierdzają także, że *Trichoderma* spp. stanowią ważny czynnik biokontrolny.

Golam i Ilag [1999] przebadali 15 izolatów *Trichoderma* w celu poznania ich antagonistycznych zdolności w stosunku do *Lasiodiplodia theobromae*. Wzrost patogenu w hodowlach dwuorganizmowych najsilniej hamowany był przez *T. harzianum* oraz *T. viride*. Obserwacje mikroskopowe pozwoliły zauważyć występowanie mykoparazytyzmu, który doprowadził do wyraźnych zmian morfologicznych zaatakowanego mikroorganizmu (w wyniku działania licznych metabolitów komórki ulegały deformacjom, puchnięciu, skróceniu, nastąpiła także granulacja cytoplazmy oraz dezintegracja ściany komórkowej). Stwierdzono również inhibicję kiełkowania spor i wydłużania form germ-tube *L. theobromae*.

Opierając się na doniesieniach literaturowych, jak i na przedstawionych w niniejszej pracy zależnościach pomiędzy grzybami *Trichoderma* a grzybami patogennymi, alternatywną metodą do chemicznej ochrony roślin jest jej zastąpienie przez naturalne, a tym samym przyjazne dla środowiska biopreparaty.

WNIOSKI

1. Zarówno szczepy testowe, jak i testowane wykorzystywały w różnym stopniu zboża jako jedyne źródło węgla, co przejawiało się zmiennym tempem wzrostu oraz rodzajem zachodzących oddziaływań.

2. Szczep *Trichoderma harzianum* T33 wykazał najsilniejsze właściwości antagonizacyjne na wszystkich badanych podłożach, powodując w większości przypadków całkowite zahamowanie wzrostu fitopatogenów.

3. Szczepy *Trichoderma hamatum* C1 i *Trichoderma hamatum* T2 charakteryzowały się wolniejszym tempem wzrostu oraz mniej obfitym zarodnikowaniem, co miało bezpośredni wpływ na ich słabsze zdolności antagonizacyjne.

4. Dokładniejsze poznanie mechanizmów biokontroli badanych szczepów *Trichoderma*, zwłaszcza *T. harzianum* T33, pozwoli na określenie ich przydatności jako składników aktywnych biopestycydów.

PIŚMIENNICTWO

- Barbosa M.A.G., Rehn K.G., Menezes M., Mariano R.R., 2001. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 98–104.
- Fiedorow Z., Gołębiak B., Weber Z., 1999. *Fitopatologia ogólna*. Wydawnictwo AR im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.
- Gerhardson B., 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 20, 8, 338–343.
- Golam Mortuza M., Ilag L.L., 1999. Potential for Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. in Banana Fruits by *Trichoderma* Species. *Biological Control*, 15, 3, 235–240.
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43–56.
- Howell C.R., 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87, 1, 4–10.
- Jaworska M., 2005. Wymagania stawiane ochronie roślin w aspekcie ochrony środowiska. 2, 3 czerwca, VII Ogólnopolska Sesja Popularnonaukowa „Środowisko a zdrowie”, Częstochowa.
- Kucuk C., Kivanc M., 2003. Isolation of *Trichoderma* Spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. *Turkish Journal of Biology*, 27, 247–253.
- Mańka K., 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 160, 9–21.
- Mańka K., 2005. *Fitopatologia leśna*. Wydanie VI, PWRiL, Warszawa.
- Markovich N.A., Kononova G.L., 2003. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 39, 4, 389–400.
- Perello A., Monaco C., Simon M.R., Sisterna M., Dal Bello G., 2003. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. *Crop Protection*, 22, 9, 1099–1106.
- Pięta D., 1997. Wybrane zagadnienia z fitopatologii: dla studentów kierunku ochrona środowiska. Wyd. Akademii Rolniczej Lublin.
- Schoeman M.W., Webber J.F., Dickinson D.J., 1999. The development of ideas in biological control applied to forest products. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43, 3, 109–123.
- Spadaro D., Gullino M.L., 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 2, 185–194.
- Spiegel Y., Chet I., 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews*, 3, 3, 169–175.
- Witkowska D., Maj A., 2002. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* spp. and their effect on the growth of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiologica*, 47, 3, 279–282.

INFLUENCE OF *TRICHODERMA* STRAINS ON THE GROWTH OF PATHOGENIC MOULDS IN BIOTIC TEST ON UNTYPICAL CARBON SOURCES

Abstract. In the present paper the research was focused on mutual interaction between three strains of *Trichoderma* and nine phytopathogenic moulds. Dual biotic test was made in media imitating natural environmental conditions (milled grain of four typical cereals), which was a modification of a standard procedure. Every tested and test-strain exploited cereals as the source of nutritive compounds to a different extent, which was exhibited by various growth speed and changes in interactions. The highest antagonistic ability was demonstrated for *Trichoderma harzianum* T33, which in many cases caused complete growth inhibition of tested moulds. Neither of the phytopathogenic strains had a negative influence on the T33 strain, in contrast to the rest of *Trichoderma* strains

Key words: biocontrol, *Trichoderma*, phytopathogenic, dual cultures

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.04.2009

Do cytowania – For citation: Piegza M., Stolaś J., Kancelista A., Witkowska D., 2009. Wpływ grzybów rodzaju *Trichoderma* na wzrost patogennych grzybów strzępkowych w testach biotycznych na nietypowych źródłach węgla. Acta Sci. Pol., Biotechnol. 8(1), 4–14.

WPLYW WYBRANYCH WARUNKÓW ŚRODOWISKOWYCH NA BIOSYNTEZĘ EGZOPOLIMERYCZNYCH SKŁADNIKÓW BIOFILMU PRZEZ BAKTERIE *BACILLUS CEREUS*

Justyna Sobolczyk, Anna Rodziewicz, Katarzyna Baranowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W pracy badano tworzenie egzopolimerycznych składników biofilmu (EPS) przez trzy szczepy bakterii z gatunku *Bacillus cereus*. Egzopolimery wydzielane przez poszczególne szczepy różniły się jakościowo i ilościowo. Wzajemne proporcje polisacharydów i białek EPS zależały w najwyższym stopniu od dostępności źródła węgla w środowisku oraz od obecności dodatkowych powierzchni przylegania bakterii. Biologiczne powierzchnie w postaci piór drobiowych stymulowały produkcję polisacharydów przez bakterie, natomiast abiotyczne w postaci płytek szklanych indukowały zwiększone wydzielanie białek. W białkowej części biofilmu elektroforetycznie wykazano obecność dodatkowych frakcji białkowych, nieobecnych w warunkach kontrolnych. Tworzenie egzopolimerycznej macierzy przez bakterie uwarunkowane jest genetycznie, ale również w wysokim stopniu zależało od dostępności składników odżywczych, a także od czasu trwania hodowli.

Słowa kluczowe: biofilm, *Bacillus cereus*, egzopolisacharydy, pozakomórkowe białka

WSTĘP

Bakterie w środowisku naturalnym tworzą biofilm, czyli skupiska komórek otoczone polimeryczną substancją, przylegających do powierzchni biologicznych lub abiotycznych, najczęściej porowatych [Borchardt i in. 2001]. Przykładem mogą być biofilmy utworzone przez bakterie infekujące endoprotezy, implanty i płytki nazębne, które stanowią istotny problem współczesnej medycyny [Yuehwei i Friedman 1997, Chandra i in. 2001, Oosthuizen i in. 2002, Dorocka-Bobkowska i Konopka 2003, Kunicki-Goldfinger 2005]. Także w przemyśle spożywczym biofilmy bakteryjne są częstą przyczyną skażenia i zepsucia żywności np. przez biofilmy bakterii *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* [Poulsen 1999]. Bakterie *B. cereus* są zdolne do adhezji i formowania biofilmów na różnych powierzchniach, np. na szkle czy czystej stali. Wytwarzane

Adres do korespondencji – Corresponding author: Justyna Sobolczyk, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail jsobolczyk@poczta.onet.pl.

przez nie biofilmy są chronicznym i trudnym do usunięcia źródłem mikrobiologicznego skażenia żywności. Bakterie te uważane są za producenta enterotoksyny chorobotwórczej dla ludzi, często obecnej w mleku i jego przetworach [Oosthuizen i in. 2002].

Adhezja bakterii do powierzchni może być też użytecznym zjawiskiem. Wykorzystuje się ją w procesach biotechnologicznych z udziałem bakterii fermentacji mlekowej, do degradacji substancji organicznych w bioreaktorach z biofilmem lub do rozkładu odpadowych biopolimerów, np. keratyn [Ichida i in. 2001]. Adhezja bakterii *Rhizobium* poprzedza ustalenie się symbiozy między bakteriami a roślinami motylkowymi [Czaczyk i Wojciechowska 2003].

Biofilm jest złożonym skupiskiem mikroorganizmów jedno- lub wielogatunkowych o różnych typach metabolizmu, które warunkują różnorodność procesów fizjologicznych i genetycznych [Fletcher i Decho 2001]. Większość bakterii kontroluje i modeluje swoją fizjologię w odpowiedzi na różne molekularne i hormonalnopodobne sygnały w procesie wyczuwania własnej gęstości, nazwanym quorum sensing. Funkcję autoinduktorów u bakterii Gram-ujemnych mogą pełnić N-acylowane laktony homoseryny (AHL), a u Gram-dodatnich niskie peptydy. Sygnały te są znaczące dla formowania biofilmów, ponieważ umożliwiają komunikowanie się komórek między sobą, a tym samym dają im przewagę w środowisku i stanowią odpowiedź adaptacyjną na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego [Dong i in. 2002, March i Bentley 2004]. Podczas tworzenia biofilmu zmienia się regulacja genetyczna. W odpowiedzi na kontakt komórek ze specyficznymi powierzchniami ekspresjonowane są odpowiednie geny, co przyczynia się do przylegania komórek, stawania się fenotypowo i metabolicznie różnymi od ich planktonicznych odpowiedników [Watnick i Kolter 2000].

Podstawowym składnikiem biofilmów są EPS (ang. extracellular polymeric substances), czyli egzopolimery, na które składają się: polisacharydy obojętne i kwaśne, białka, kwasy nukleinowe, lipopeptydy, fosfolipidy i inne związki organiczne produkowane przez komórki. **Polisacharydy zewnątrzkomórkowe** nadają integralność biofilmowi, jak również biorą udział w adhezji do powierzchni. Z tego powodu określa się je mianem „polisacharydów adhezyjnych”. **Białka** spełniają wiele funkcji, a między innymi uczestniczą w adhezji. W pierwszej fazie kumulowane są na powierzchni komórki, gdzie mogą pełnić funkcję receptorów lub ligandów, a następnie gdy zostaną uwolnione do roztworu, adsorbują się do innych powierzchni. W kolejnych etapach również bezpośrednio uczestniczą w adhezji, przez co zapewniają stabilne przyłączenie komórek do powierzchni [Perry i Hannum 1998].

Poznanie mechanizmów powstawania biofilmów oraz komunikowania się bakterii w obrębie biofilmu może być drogą w poszukiwaniu metod zapobiegania rozwojowi biofilmów, jak również podporządkowania tej cechy dla użytku człowieka.

Celem prezentowanej pracy było wykazanie wpływu wybranych warunków środowiskowych na wydzielanie polisacharydów i białek przez trzy szczepy bakterii z gatunku *B. cereus*, poprzez określenie różnic w składzie tworzonej egzopolimerycznej macierzy. Badano wpływ dostępności źródła węgla, obecności dodatkowej powierzchni przylegania oraz czasu trwania hodowli bakterii.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Materiał badawczy stanowiły trzy szczepy bakterii z gatunku *Bacillus cereus*: B3p, B5e/sz, B7e pochodzące z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badane szczepy bakterii są izolatami pochodzącymi ze składowiska odpadów keratynowych.

Hodowle bakterii. Prowadzono równolegle dwie pięciodobowe hodowle wstrząsane ($168 \text{ obr. min}^{-1}$) w temp. 28°C , w kolbach o pojemności 250 ml zawierających po 50 ml podłoża o składzie (%): glukoza 2 lub 0,5; YE 0,05; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,06; KH_2PO_4 0,31; K_2HPO_4 0,52; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03; CaCl_2 0,005; $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,00006; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,00002; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,00002; $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,00002 [Rättö i in. 2001]. Dodatkowym źródłem węgla i azotu, a zarazem powierzchnią adhezji dla bakterii były promienie piór strusich znajdujące się w podłożu w ilości trzy pióra na kolbę. W doświadczeniu kontrolnym stosowano podłoże syntetyczne z glukozą (2%) bez dodatku piór drobiowych. Przyleganie bakterii do powierzchni szklanych badano w podłożu syntetycznym z glukozą 0,5 i 2% w obecności szklanych płytek o grubości 2 mm (15 mmx15 mm) w ilości 2 na kolbę. Codziennie pobierane do badań płyny hodowlane odwirowywano w temp. 4°C przy $10000 \text{ obr. min}^{-1}$ przez 15 minut.

Izolacja białek i polisacharydów. Komórki separowano od EPS 0,9% NaCl, wstrząsając podłoże przez 20 min przy $168 \text{ obr. min}^{-1}$, następnie oddzielano je od płynu pochodowlanego w wirówce przy $5,500 \text{ obr. min}^{-1}$ przez 15 min w temp. $+4^\circ\text{C}$. **Polisacharydy** wytrącano z supernatantu 70% etanolem, a następnie próby pozostawiano przez 24 h w temp. $+4^\circ\text{C}$. Roztwór wirowano przy obrotach $5,500 \text{ obr. min}^{-1}$ przez 15 min w temp. $+4^\circ\text{C}$, osad polisacharydów zawieszano w wodzie destylowanej [Parker i Flint 2001]. **Białka** wytrącano z supernatantu płynu pochodowlanego przy użyciu 2% TCA, uzyskany osad dwukrotnie zawieszono w 70% etanolu, a następnie zawieszano w wodzie destylowanej [Oosthuizen i in. 2002]. Rozdział **elektroforetyczny** białek **SDS – PAGE** przeprowadzono wg Laemmli [1970]. Stosowano 12% żele akryloamidowe, na które nanoszono po 20 μl białka z SDS w zagłębienia płytek o wymiarach 7x 5 mm. Użyte standardy białek miały masę cząsteczkową 30–200 kDa. Elektroforezę prowadzono w buforze elektrodowym przez 90 min przy napięciu 120 Volt. Po zakończeniu elektroforezy żele barwiono 0,25% błękitem brylantowym Coomassie-CBB oraz odbarwiano 10% roztworem kwasu octowego. Zdjęcia żeli po elektroforezie wykonywane były za pomocą programu Bio Capt. Analizę porównawczą wykonano za pomocą programu komputerowego Bio Gene. W pracy przedstawiono zdjęcia elektroforezy obrazujące pasma, w których uzyskano największą ilość frakcji. Pozostałe frakcje omówiono i zestawiono w tabeli 1.

Badania mikroskopowe. Zdjęcia obrazujące adhezję bakterii do powierzchni płytek szklanych oraz piór strusich wykonano przy użyciu mikroskopu świetlnego po pierwszej i piątej dobie hodowli przy powiększeniu całkowitym 720x z wykorzystaniem kamery CCD CAMERA oraz techniką mikroskopii elektronowej LED 435VP przy powiększeniu 8 tysięcy.

Metody analityczne

Ilość białka oznaczano metodą Lowry'ego [Lowry i in. 1951]. Ogólną ilość uzyskanych polisacharydów oznaczono metodą Dubois [Dubois i in. 1956], natomiast ilość

kwasów uronowych metodą boranową [Bitter i Muir 1962]. Wykresy przedstawiają sumaryczną ilość składników EPS ze wszystkich dni hodowli dla każdego szczepu, wyrażoną w $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Tabela 1. Zestawienie mas cząsteczkowych białek nie występujących w podłożu kontrolnym
Table 1. Molecular weight of proteins absent in the control medium

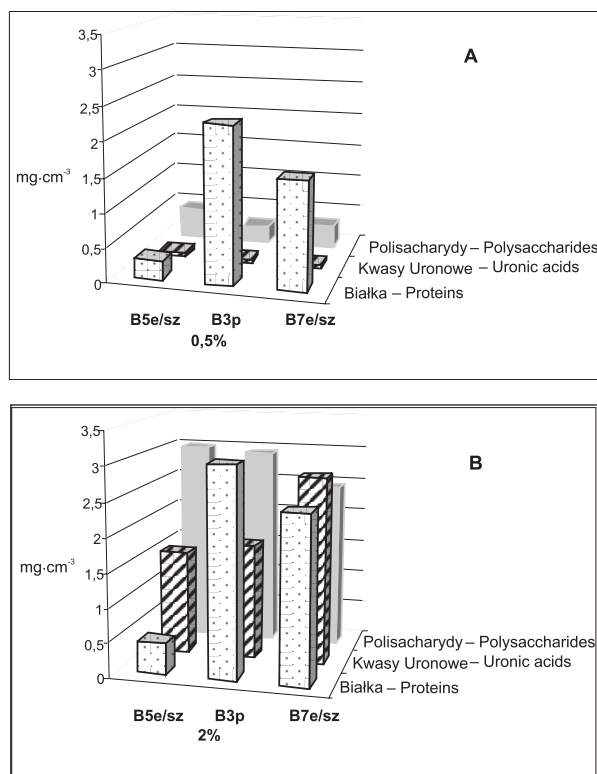
<i>Szczepy bakterii</i> <i>Bacterial strains</i> <i>Podłoża mineralne</i> <i>Minerals medium</i>	B5e/sz	B3p	B7e/sz
	<i>Masy cząsteczkowe białek – Molecular weight of protein [kDa]</i>		
20 g/l glukozy+plytki szklane/20g/l glucose + glass plates	53, 62 $\Sigma 2$	31, 34, 35, 36, 38, 43, 52, 53, 63, 64, 68, 72, 84, 86, 89, 92, 94, 104, 108 $\Sigma 19$	23, 27, 36, 37, 38, 44, 50, 52, 55, 59, 62, 65, 72, 83, 93, 106 $\Sigma 16$
20 g/l glukozy+pióra strusie glucose 20g/l+ ostrich feathers	27, 33, 44, 48, 55, 58, 64, 68, 85, 92, 95 $\Sigma 11$	27, 34, 53, 58, 70, 89, 92, 95 $\Sigma 8$	33, 43, 60, 63, 82, 90, 93, 101, 113 $\Sigma 9$
5 g/l glukozy+plytki szklane glucose 5g/l+ glass plates	25, 27, 31, 38, 42, 43, 46, 66 $\Sigma 8$	21, 26, 27, 30, 34, 36, 52, 53, 59, 62, 67, 74, 75, 76, 84, 88, 93, 109 $\Sigma 18$	23, 24, 28, 29, 31, 36, 39, 40, 46, 51, 58, 61, 62, 72, 79, 85, 88, 98, 99, 103, $\Sigma 20$

WYNIKI I DYSKUSJA

Zdolność tworzenia biofilmu posiada większość drobnoustrojów, co zwykle poprzedza ich adhezja do różnych powierzchni. Adhezja jest bardzo złożonym procesem i zależy od wielu różnych czynników, m.in. od hydrofobowości/hydrofilności, a także ładunku powierzchni komórki oraz kolonizowanej powierzchni. Uczestniczą w niej również wydzielane pozakomórkowo polisacharydy i białka [Czaczyk 2005]. Mechanizm tworzenia, struktura i skład egzopolimerycznej macierzy w dużym stopniu zależą od warunków środowiskowych. EPS zbudowane są najczęściej z polimerów cukrów obojętnych i kwaśnych takich jak: glukoza, galaktoza, fruktoza, aminocukry, alkohole (adonitol), kwasy uronowe, kwas sialowy. Wielocukry otoczkowe bakterii Gram-dodatnich są przeważnie heterologiczne oraz związane jonami Ca^{2+} lub Mg^{2+} . Mają one ogólny ładunek ujemny, pochodzący głównie z reszt fosforanowych i karboksylowych kwasu glukuronowego. Biofilm bakterii *B. subtilis* tworzą polipeptydy zbudowane z γ -D- i L- glutaminianu. Cechy fizykochemiczne, lepkość i hydrofilowość EPS są swoistą ochroną komórek przed wysychaniem, a także ułatwiają adhezję do powierzchni [Morrikawa 2005, Poulsen 1999].

W pracy badano wpływ ilości glukozy jako źródła węgla, czasu hodowli i obecności dodatkowych powierzchni w postaci płytek szklanych lub piór strusich na powstawanie biofilmu oraz skład EPS. W podłożu zawierającym 0,5% glukozy bakterie *B. cereus* B3p i B7e/sz wydzielały białka w ilości $1,5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, a szczep *B. cereus* B5e/sz tylko $0,25 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. Zwiększenie ilości glukozy w podłożu z 0,5 do 2% powodowało zwiększenie ilości białek macierzy do $2,4 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ przez szczepy *B. cereus* B3p i B7e/sz oraz do $0,43 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ dla szczepu bakterii *B. cereus* B5e/sz, który ogólnie wytwarzał znacznie mniejsze ilości białka w stosunku do pozostałych (rys. 1).

Badania Czaczky wykazały, że ilość źródła węgla i azotu w pożywce wpływa na hydrofobowość powierzchni komórek *B. cereus*. W warunkach niskiej dostępności źródła azotu w podłożu – obniża się hydrofobowość powierzchni komórek bakterii *B. cereus* jednocześnie ze wzrostem dostępności źródła węgla. Odwrotne zależności występują w optymalnych warunkach dostępności źródła azotu. Hydrofobowość wzrasta wtedy ze zwiększającą się dostępnością źródła węgla w środowisku. Wzrost hydrofobowości powierzchni komórek może zwiększać adhezję do powierzchni hydrofilowych takich jak szkło [Czaczky 2005].



Rys. 1. Wpływ stężenia glukozy na skład EPS wydzielanych przez trzy szczepy bakterii *B. cereus*: A – 0,5% glukozy, B – 2% glukozy

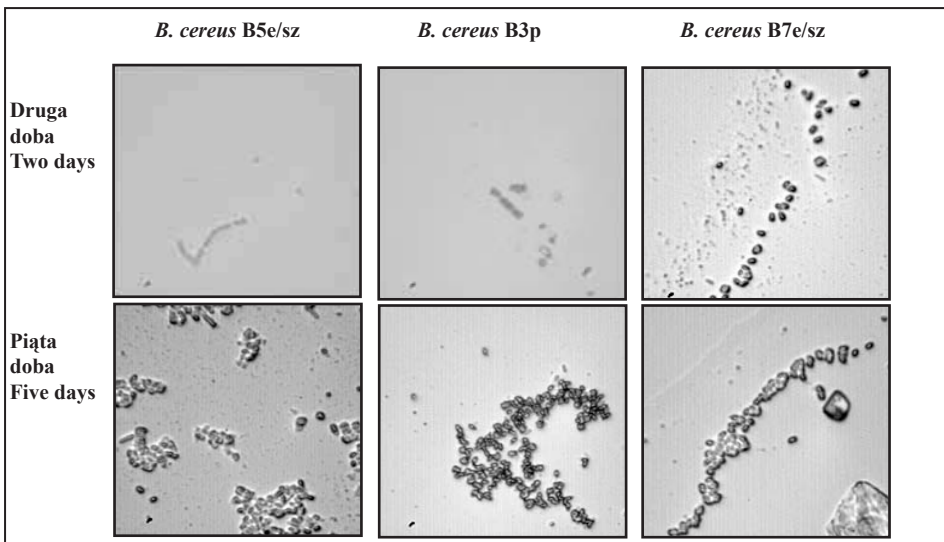
Fig. 1. Influence of glucose concentration on the composition of EPS released by three *B. cereus* strains: A – 0,5% glucose, B – 2% glucose

Trzy badane szczepy bakterii z gatunku *B. cereus* podczas hodowli w podłożu mineralnym zawierającym 2% glukozy w równym stopniu przylegały do powierzchni płytek szklanych. Czynnikiem różnicującym był czas prowadzenia hodowli. Proces ten postępował wraz z wydłużeniem czasu hodowli aż do piątej doby. Mikrokolonie utworzone w piątej dobie były znacznie większe niż w drugiej dobie hodowli (rys. 2). Podobnie zachowywały się bakterie *B. cereus* w badaniach Oosthuizen i Steyna, którzy oceniali ich przyleganie do waty szklanej. Większe mikrokolonie obserwowali oni w hodowli osiemnastogodzinnej niż w dwugodzinnej [Oosthuizen i Steyn 2002]. Prawdopodobnie jest to odpowiedź bakterii na stres głodowy wywołany zbyt małą ilością węgla w podłożu. W celu przetrwania okresu głodu gromadzą się one na powierzchni, tworząc biofilm [Poulsen 1999].

W badaniach własnych również podobne zachowanie bakterii odnotowano w podłożu zawierającym biologiczne powierzchnie w postaci piór drobiowych, tzn. po piątej dobie tworzone były większe mikrokolonie niż po drugiej dobie (rys. 3 i 4).

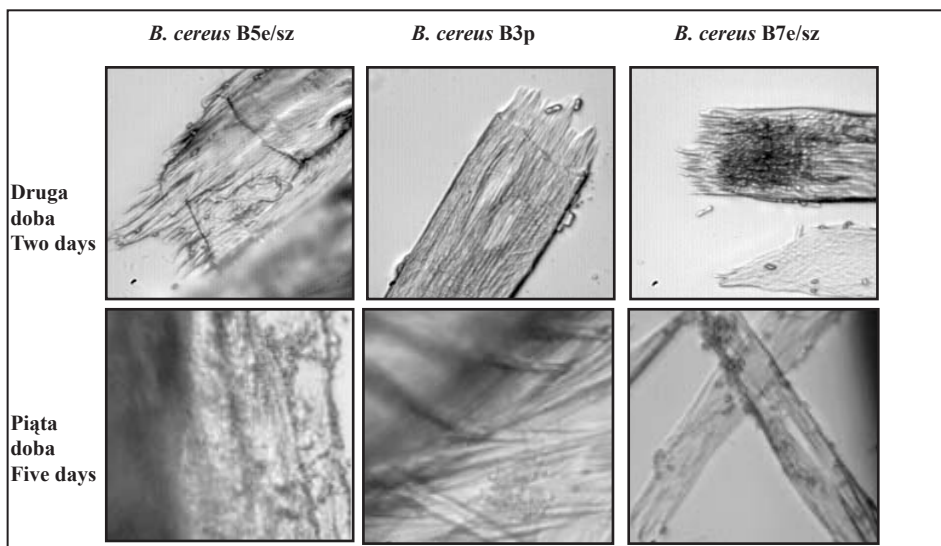
Osadzanie się komórek bakterii na powierzchni piór zapoczątkowało etap upłynniania keratyny piór strusich. Konsekwencją adhezji bakterii do białkowych powierzchni piór była indukcja biosyntezy enzymów proteolitycznych i keratynolitycznych, które uczestniczyły w degradacji keratyny oraz wykorzystywały ją jako źródło węgla w podłożu [Rodziewicz i in. 2006].

Ichida także sugeruje możliwość wykorzystania bakterii o uzdolnieniach keratynolitycznych do degradacji odpadów keratynowych [Ichida i in. 2001].



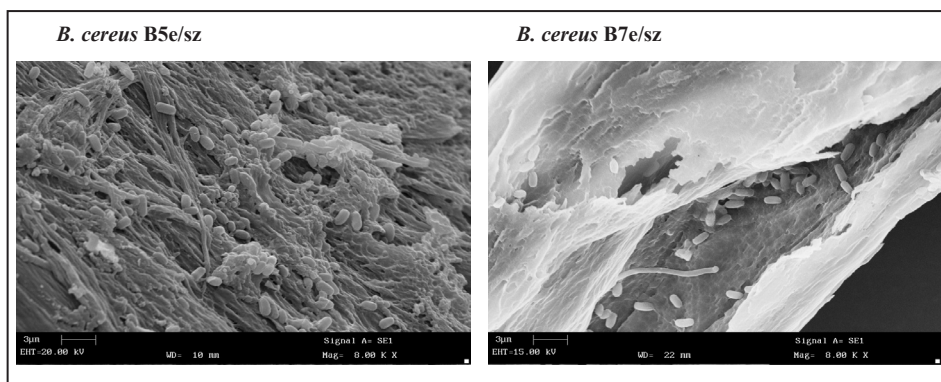
Rys. 2. Kolonizacja płytek szklanych przez bakterie *B. cereus* po drugiej i piątej dobie hodowli (mikroskop świetlny, powiększenie 720x)

Fig. 2. Colonization of glass plates by *B. cereus* strains after two and five-days of cultivation (light microscope, mag. 720 x)



Rys. 3. Kolonizacja promieni piór strusich przez bakterie *B. cereus* po drugiej i piątej dobie hodowli (mikroskop świetlny, powiększenie 720x)

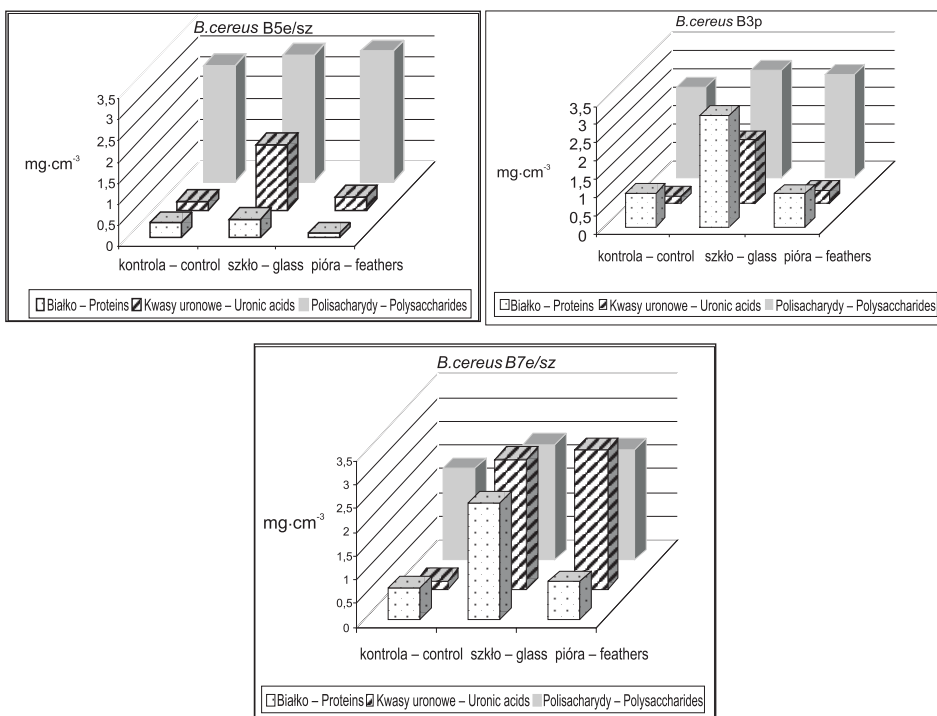
Fig. 3. Colonization of ostrich feathers (II) by *B. cereus* strains after two and five-days of cultivation (light microscope, mag. 720 x)



Rys. 4. Biofilm utworzony przez bakterie *B. cereus* na powierzchni piór widoczny w mikroskopie elektronowym po 5 dobach przy powiększeniu 8 tys. x

Fig. 4. Biofilm formed by *B. cereus* strains on the feather surface in scanning electron microscope, after five days, 8 thousand times magnitude

Badanie wpływu dodatkowej powierzchni abiotycznej i biologicznej na ilość i skład wytworzonej macierzy pozakomórkowej wykazało znaczną stymulację tego procesu (rys. 5). Obecność zarówno płytek szklanych, jak i piór strusich powodowała nadprodukcję składników EPS w stosunku do podłoża kontrolnego przez wszystkie badane szczepy bakterii z gatunku *B. cereus*. W hodowli szczepu *B. cereus* B5e/sz zaznacza się nadmiar wydzielania polisacharydów do białek w stosunku 4:1.



Rys. 5. Wpływ obecności dodatkowych powierzchni w postaci płytek szklanych oraz piór na skład EPS tworzony przez bakterie *B. cereus*: B5e/sz(A), B3p, (B) B7e/sz (C), (podłoże 2% glukozy)

Fig. 5. Influence of additional surfaces glass plates and feathers – on EPS composition formed by *B. cereus* bacteria: B5e/sz(A), B3p, (B) B7e/sz (C), (medium 2% glucose)

W obecności piór strusich ilość polisacharydów łącznie z kwasami uronowymi wynosiła $3,07 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, a białek tylko $0,121 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. Na podłożu z płytkami szklanymi ilości polisacharydów ogółem i białek wynosiły odpowiednio $2,97 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ oraz $0,462 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. W podłożu kontrolnym zanotowano $2,7 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ polisacharydów i $0,353 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ białek. Pozostałe dwa szczepy produkowały egzopolimery o większej zawartości białek, a szczególnie w obecności płytek szklanych, przy niedużych różnicach wydzielanych cukrów. Zawartości polisacharydów i białek dla obu szczepów były podobne i dochodziły do ok. $3,0 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$. Na podłożu z dodatkowym źródłem węgla i azotu w postaci piór strusich wartości te były nieco inne i wynosiły dla polisacharydów $2,8 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, a dla białek $0,9 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, co zarazem było dużym podobieństwem do wyników uzyskanych w hodowli kontrolnej – odpowiednio $2,4 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ i $0,9 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Kwasy uronowe jako ujemnie naładowana frakcja cukrowa wytwarzane były przez wszystkie szczepy, jednak w mniejszej ilości od pozostałych składników, oprócz szczepu *B. cereus* B7e/sz. Zwiększonemu wydzielaniu polisacharydów również towarzyszyło zwiększone wydzielanie kwasów uronowych, średnio, uwzględniając wszystkie eksperymenty, ilość tego składnika stanowiła 10% produkowanych polisacharydów.

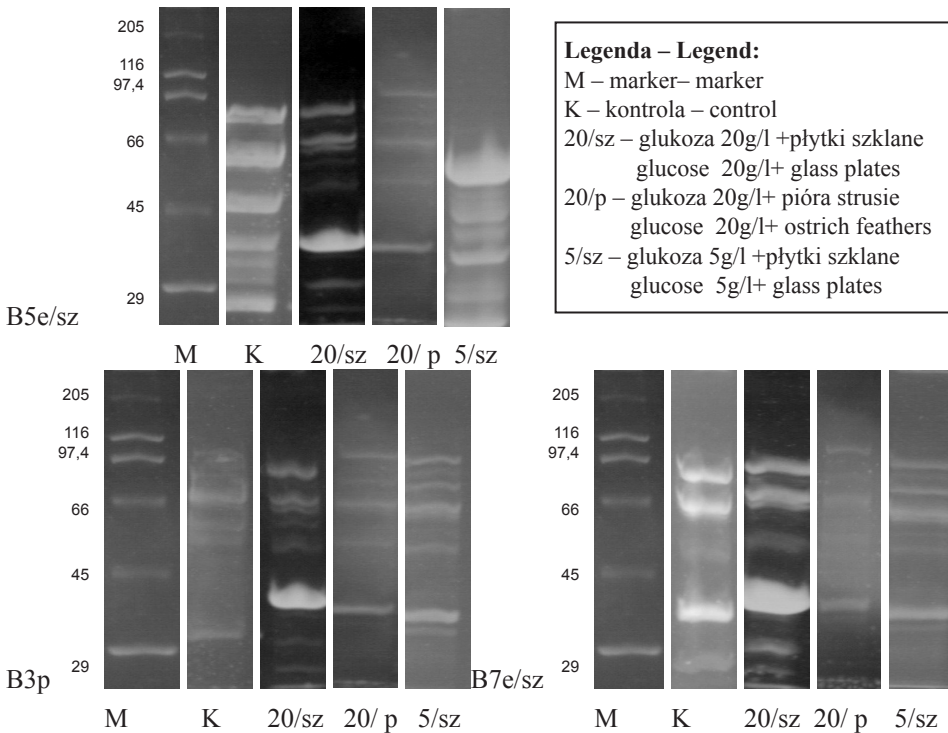
Rola składników pozakomórkowej macierzy nie jest do końca wyjaśniona. Według jednych badaczy polisacharydy odgrywają istotną rolę w tworzeniu warstwy kontaktowej, stwarzając korzystne warunki do adhezji oraz uczestniczą w tworzeniu trójwymiarowej struktury błony biologicznej. Badania innych dowodzą, że usunięcie tej warstwy nie skutkuje w obniżeniu zdolności adhezji. Potwierdzeniem tego są informacje spotykane w pracach badawczych Parkara i Flinta [2001]. Autorzy badający przyleganie termofilnych bakterii z rodzaju *Bacillus* do stali nierdzewnej nie zaobserwowali korelacji pomiędzy przyleganiem komórek a ilością tworzonych EPS. Zwrócili jednak uwagę na rolę białek zewnątrzkomórkowych zwłaszcza w początkowych etapach przylegania bakterii do podłoża. Prawdopodobnie białka pełnią większą rolę w oddziaływaniu z powierzchnią niż pozostałe składniki biofilmu. Praca badawcza Ahimou i in. [2000] wskazuje, że zawartość polisacharydów w biofilmie bakterii z gatunku *B. subtilis* jest 4,7 razy większa od zawartości białek, co bliskie jest wynikiem uzyskanym w badaniach własnych, zwłaszcza dla szczepu bakterii *B. cereus* B5e/sz.

Rozbieżności w ilości wydzielanych składników biofilmów wskazują na różny metabolizm poszczególnych szczepów nawet w obrębie gatunku oraz jego regulację genową [Watnick i Kolter 2000].

Frakcję białkową biofilmu w dalszych badaniach rozdzielano elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym. Analiza elektroforetyczna białek pozwoliła określić ilość subfrakcji białkowych i ich masy cząsteczkowe. Szczep *B. cereus* B5e/sz w odpowiedzi na obecność dodatkowej powierzchni, a zwłaszcza piór strusich, wytworzył 11 nowych frakcji białkowych, przy ogólnej niskiej zawartości białek w biofilmie. Można przypuszczać, że wśród nich są enzymy proteolityczne degradujące keratyny. W obecności płytek szklanych w zależności od ilości glukozy w podłożu (tab. 1, rys. 5 i 6) szczep ten wytworzył 2 lub 8 nowych frakcji białkowych w porównaniu z hodowlą kontrolną. Masy cząsteczkowe tych frakcji białkowych były w granicach od 25 do 95 kDa. Pozostałe dwa szczepy ogólnie wydzielały więcej białek, a szczególnie w obecności płytek szklanych, przy niedużym wpływie ilości glukozy w pożywce. Białka szczepu *B. cereus* 3p składały się z 18–19 dodatkowych frakcji, a *B. cereus* B7e/sz z 16–20 (tab. 1, rys. 5 i 6).

Przeprowadzone obserwacje wskazują na istotny wpływ dodatkowej powierzchni, zwłaszcza płytek szklanych, na indukcję wydzielania dodatkowych frakcji białek. Nieco mniejszy wpływ miało obniżenie ilości glukozy w podłożu z 2 do 0,5%.

Watnick i Kolter [2000] w swoich badaniach nad adhezją morskich gatunków *Vibrio* do chityny owadów wykazali, że struktura genów potrzebnych do przytwierdzenia się do tej biotycznej powierzchni różni się od tej potrzebnej do przytwierdzenia do abiotycznej powierzchni takiej jak szkło czy plastik. Bakterie te wykorzystują chitynę zbudowaną z N-acetyloglukozaminy jako źródło pożywienia i sposób na przeżycie, a więc wydzielają pozakomórkowe chitynazy. Podobnie Oosthuizen i Steyn [2002] wykorzystując elektroforezę dwukierunkową, dowiedli, że w obecności waty szklanej bakterie *B. cereus* wytwarzały 10 nowych białek w biofilmie, które nie były obecne w próbach kontrolnych, niezawierających dodatkowej powierzchni. Wyznaczone w badaniach własnych masy cząsteczkowe białek były w przewadze niskie i wynosiły średnio od 16 do 98 kDa. Można przypuszczać, że wśród niskocząsteczkowych białek mogą być substancje sygnałowe umożliwiające komunikowanie się bakterii między sobą, tym samym wpływają one na tworzenie wielokomórkowych struktur biofilmów [March i Bentley 2004].



Rys. 6. Elektroforeza SDS w żelu poliakrylamidowym białek macierzy *B. cereus*

Fig. 6. SDS-polyacrylamid gel electrophoresis of *B. cereus* matrix proteins

Wśród otrzymanych pasm białkowych mogą być także frakcje związane z białkami strukturalnymi np. rzęsek, otoczek, receptorowe i inne. Przykładem jest flagellina o masie cząsteczkowej od 36 do 68 kDa, która jest białkiem budującym rzęski. Niektórzy autorzy wskazują również na możliwość produkcji przez bakterie *B. subtilis* metabolitów takich jak bakteriocyny, dla których sygnałami molekularnymi są peptydy [Holden i Williams 2001, Sauer i in. 2002]. Na powierzchni komórek mikroorganizmów Gram-ujemnych mogą występować fimbrie (cienkie wypustki zbudowane z białka pilliny o masie cząsteczkowej 26 kDa), które zwiększają zdolność adhezyjną bakterii. Zjawisko adhezji pojawia się dzięki interakcji pomiędzy receptorami na powierzchni komórki bakteryjnej i powierzchnią, do której występuje adhezja. Cząsteczki powierzchniowe bakterii nazywane są adhezynami lub lektynami. Chemicznie adhezyny są białkami, rzadziej wielocukrami lub peptydoglikanami. Receptory rozpoznawane przez adhezyny to reszty węglowodanowe mniej lub bardziej złożonych glikoprotein albo glikolipidów. Duża część scharakteryzowanych adhezyn to białka osłon, które w interakcji z receptorem przypominają oddziaływanie typu antygen-przeciwciało [Watnick i Kolter 2000, Baranowska i Rodziejewicz 2008, Czaczyk i Wojciechowska 2003]. Nie bez znaczenia jest fakt, że bakterie *Bacillus* ssp., są znaczącymi producentami biosurfaktantów, którymi są lipopeptydy. W dużej mierze wpływają one na adhezję komórek do powierzchni poprzez zmianę jej hydrofobowości [Czaczyk 2005].

WNIOSKI

1. Badane w pracy trzy szczepy bakterii z gatunku *B. cereus* wykazywały trwałą adhezję do powierzchni szkła lub piór strusich, a następnie tworzyły biofilmy.
2. Obecność płytek szklanych albo piór strusich wpływała na skład egzopolimerycznej macierzy, a także na zwiększone wydzielanie składników EPS.
3. Skład tworzonej macierzy pozakomórkowej zależał od zastosowanego podłoża, jak również od predyspozycji szczepów bakterii. Szczep *B. cereus* B5e/sz wydzieliał 80% więcej polisacharydów w stosunku do białek, natomiast szczepy *B. cereus* B3p i *B. cereus* B7e wytwarzały składniki sacharydowe i białkowe EPS w stosunku 1:1.

PIŚMIENNICTWO

- Ahimou F., Jacques P., Deleu M., 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzym. Microb. Technol.*, 27, 749–754.
- Baranowska K., Rodziewicz A., 2008. Molekularne interakcje w biofilmach bakteryjnych. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 57, 1 278–279.
- Bitter T., Muir H.M., 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330–334.
- Borchardt S.A., Allain, E.J., Michels J.J., Stearns G.W., Kelly R.F., 2001. Reaction of Acylated Homoserine Lactone Bacterial Signaling Molecules with Oxidized Halogen Antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3174–3179.
- Chandra J., Kuhn D., Muckherjee P., Hoyer L., McCormick T., 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J. of Bacteriology*, 183(18), 5385–5394.
- Czaczyk K., Wojciechowska K., 2003. Tworzenie biofilmów bakteryjnych, istota zjawiska i mechanizmy oddziaływań. *Biotechnologia*, 3(62), 180–192.
- Czaczyk K., 2005. Wybrane czynniki środowiskowe warunkujące właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Bacillus cereus* i ich rola w procesie adhezji. *Rozpr. Nauk., Roczn. AR Pozn.*, z. 367.
- Dong Y.-H., Gusti A.R., Zhang Q., Xu J.-L., Zhang L.-H., 2002. Identification of Quorum – Quenching N-Acyl Homoserine Lactonases from *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1754–1759.
- Dorocka-Bobkowska B., Konopka K., 2003. Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych. *Dent. and Med. Probl.*, 40 (2) 405–410.
- Dubois M., Giles K.A., Hamilton J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350–356.
- Fletcher M., Decho A.W., 2001. Biofilms. *Encyclopedia of Life Sciences*, www.els.net.
- Holden M., Williams P., 2001. Quorum Sensing. *Encyclopedia of Life Sciences*, www.els.net.
- Ichida J., Krizova L., LeFevre A., Kenner H., Elwell D., Burt E., 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. of Microbiol. Methods*, 47, 199–208.
- Kłyszczko-Stefanowicz L., 2005. Ćwiczenia z biochemii. *Wyd. Nauk. PWN, Warszawa*, 191–198, 250.
- Kunicki-Goldfinger W., 2005. Życie bakterii. *Wyd. Nauk. PWN, Warszawa*, 76–83.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- March J.C., Bentley W.E., 2004. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Curent Opinion in Biotechnology*, 15, 495–502.
- Morrikawa M., 2005. Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *J. of Bioscience and Bioengineering*, vol. 101 (1), 1–8.
- Oosthuizen M., Steyn B., Theron J., Cosette P., Lindsay D., Holy A., Volker S. Brözel, 2002. Proteomic Analysis Reveals Differential Protein Expression by *Bacillus cereus* during Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (6), 2770–2780.
- Parkar S.G., Flint S.H., 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J. of Appl. Mikrobiol.*, 90, 901–908.
- Perry D.K., Hannum Y.A., 1998. The role of ceramide in cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, 1436, 233–243.
- Poulsen L.V., 1999. Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.*, 32, 321–326.
- Rättö M., Murstrata A., Sikka-aho M., 2001. Strains degrading polysaccharides produced by bacteria from paper machines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 182–185.
- Rodziewicz A., Sobczyk J., Baranowska K., Łaba W., 2006. Właściwości keratynolityczne oraz tworzenie biofilmu przez bakterie *Bacillus subtilis*. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia*, 5(1–2), 61–73.
- Sauer K., Champer A.K., Ehrlich G., Costerten W., Davies D., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as Biofilm. *J. of Bacteriology*, 1140–1154.
- Watnick P., Kolter R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *J. of Bacteriology*, 182(10), 2675–2679.
- Yuehwei H., Friedman R.J., 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J. of Microbiol. Methods*, 30 (2), 141–152.

INFLUENCE OF SELECTED ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON BIOSYNTHESIS OF EXOPOLYMERIC MATRIX BY *BACILLUS CEREUS* STRAINS

Abstract. In this research we investigated releasing of biofilm exopolymeric substance by three strains of *Bacillus cereus* species. We observed the difference in quality and quantity of produced exopolymers. The proportion between polysaccharides and proteins in EPS depended on the availability of carbon source in the culture environment and the presence of additional adhesion surface. Biological surfaces like poultry feathers stimulated releasing of polysaccharides by tested bacteria, however abiotic surfaces like glass plates induced protein's releasing. In the proteins of biofilm by SDS polyacrylamide gel electrophoresis revealed the presence of additional fraction of proteins absent in control conditions. Production of exopolymeric matrix by bacteria is regulated by genetic mechanisms but it also highly depends on nutrient level and cultivating time.

Key words: biofilm, *Bacillus cereus*, exopolysaccharides, exocellular proteins

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.04.2009

Do cytowania – For citation: Sobolczyk J., Rodziewicz A., Baranowska K., 2009. Wpływ wybranych warunków środowiskowych na biosyntezę egzopolimerycznych składników biofilmu przez bakterie *Bacillus cereus*. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.* 8(1), 15–26.

PORÓWNANIE WIĄZANIA MAGNEZU, WZROSTU I WŁAŚCIWOŚCI KWAŚĄCYCH *LACTOBACILLUS BREVIS* I *LACTOBACILLUS PLANTARUM* W ŚRODOWISKU O PODWYŻSZONYM STĘŻENIU MAGNEZU

Joanna Roman, Małgorzata Gniewosz, Joanna Mantorska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Badano dwa szczepy bakterii kwasu mlekowego *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080 w środowisku o podwyższonym stężeniu magnezu. Sprawdzano zdolność wiązania magnezu, wzrost i aktywność kwaszącą tych bakterii w podłożu MRS (kontrolnym) i MRS z dodatkiem 0,5; 1,25 i 1,5 g Mg dm⁻³ (w przeliczeniu na czysty pierwiastek) w postaci dwóch soli: siarczanu lub octanu magnezu. Więcej magnezu szczepy wiązały w podłożu zawierającym 1,5 g Mg dm⁻³ w postaci octanu magnezu. Po 24 h hodowli w tym podłożu w biomacie *Lb. brevis* stwierdzono 5,82 mg Mg g⁻¹ s.s., a *Lb. plantarum* ATCC 4080 3,29 mg Mg g⁻¹ s.s. W podłożach zawierających dodatek soli magnezowych odnotowano nieznacznie mniejszy wzrost szczepów w pierwszych godzinach hodowli oraz nie obserwowano spadku ich właściwości kwaszących w porównaniu z hodowlą kontrolną.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, wiązanie magnezu, właściwości kwaszące

WSTĘP

Magnez jest pierwiastkiem, który oddziałuje na wiele funkcji komórkowych, włączając w to transport jonów potasu i wapnia, metabolizm energii i procesy rozmnażania. Jako kofaktor ok. 300 reakcji enzymatycznych jest szczególnie ważny dla tych enzymów, które wymagają nukleotydów jako kofaktorów lub substratów w postaci magnezowego kompleksu. Ma to miejsce w przypadku takich enzymów, jak: fosfotransferazy i hydrolazy, np. ATP-azy, które mają zasadnicze znaczenie dla biochemicznych przemian komórki, szczególnie w metabolizmie energii. Ponadto pierwiastek ten jest niezbędny do syntezy

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Gniewosz, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159C, 02-766 Warszawa, e-mail: malgorzata_gniewosz@sggw.pl

białek i kwasów nukleinowych, przebiegu cyklu komórkowego, spójności cytoszkieletu i mitochondriów, a także w procesach wiązania substancji do błony cytoplazmatycznej [Romani i Scarpa 1992, Saris i in. 2000].

W połączeniach z fosfolipidami kationy magnezu tworzą istotne kompleksy strukturalne błon komórkowych, wpływając jednocześnie na ich stabilność i przepuszczalność. W jądrze komórkowym magnez pomaga zachować integralność spirali DNA oraz prawidłową strukturę i funkcjonowanie chromosomów. Kationy magnezowe odgrywają również rolę w procesie pobierania i wykorzystywania energii zgromadzonej w związkach wysokoenergetycznych [Pasternak 1999, Saris i in. 2000, Hartwig 2001].

Wprowadzanie magnezu do komórki przebiega głównie na drodze dyfuzji z nieznacznie wyższego stężenia formy wolnej w przestrzeni pozakomórkowej. Proces ten jest pobudzany przez potencjał błonowy, ujemny od strony cytozolu [Pasternak 1999, Saris i in. 2000, Hartwig 2001, Vormann 2003, Wolf i in. 2003]. Magnez nie jest zazwyczaj limitowany w laboratoryjnych warunkach wzrostu bakterii, ponieważ bakteryjne systemy transportu Mg^{2+} mają zdolność wychwytywania tego kationu nawet przy bardzo niskich poziomach jego zawartości w powszechnie stosowanych pożywkach [Moncrief i Maguire 1999]. Wykazano, że zdolność wiązania magnezu przez bakterie Gram-dodatnie jest uwarunkowana przede wszystkim zawartością kwasów teichojowych oraz peptydoglikanu w ich ścianie komórkowej [Lambert i in. 1975].

Bakterie kwasu mlekowego spełniają w żywności fermentowanej ważne funkcje. Na skutek swojej działalności kształtują cechy sensoryczne, przedłużają trwałość i poprawiają mikrobiologiczne bezpieczeństwo produktów żywnościowych, zwiększają wartość odżywczą [Neysens i De Vuyst 2005]. W skład najbardziej zaawansowanych, stosowanych przez przemysł piekarski szczepionek wchodzi wyselekcjonowane pojedyncze szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i drożdży [Hansen i Schieberle 2005]. Wspólną cechą bakterii z rodzaju *Lactobacillus* pochodzenia zakwasowego jest produkcja kwasu mlekowego. Powstające w wyniku fermentacji mlekowej kwasy organiczne, głównie mlekowy i octowy, przyczyniają się do uzyskania ciasta o prawidłowych technologicznie cechach [De Vuyst i Neysens 2005].

Magnez związany ze strukturami komórkowymi bakterii mlekowych może stanowić cenne źródło tego pierwiastka w codziennej diecie. Uwzględniając, że tylko ok. 30% dziennej podaży magnezu ulega wchłonięciu w organizmie człowieka [Vaskonen 2003], spożycie pierwiastka powinno być odpowiednio wyższe.

Celem niniejszej pracy było badanie zdolności wiązania magnezu przez wybrane bakterie kwasu mlekowego oraz wpływu dodatku magnezu w postaci dwóch soli magnezowych do podłoża hodowlanego na ważne technologiczne cechy tych mikroorganizmów, tj. liczebność komórek i właściwości kwaszące. Wybrane szczepy należały do gatunków: *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum*. *Lb. plantarum* jest najczęściej spotykany spośród pałeczek homofermentatywnych w czynnych zakwasach chlebowych [Damiani i in. 1996, Martinez-Anaya i in. 1990]. Natomiast *Lb. brevis* jest najczęściej występującym reprezentantem heterofermentatywnej mikroflory zakwasów [Dziowksz i Włodarczyk 2003].

MATERIAŁY I METODY

Material biologiczny

Przedmiotem badań były dwa szczepy bakterii mlekowych: *Lactobacillus brevis* z kolekcji kultur Biolacta-Textel (Olsztyn, Polska) i *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080.

Metody prowadzenia hodowli

Podłoże kontrolne: Do hodowli inokulum oraz hodowli kontrolnej wykorzystywano płynny bulion MRS (BTL, Polska) przygotowany na wodzie dejonizowanej.

Podłoża doświadczalne: Stosowano bulion MRS (BTL, Polska) przygotowany na wodzie dejonizowanej wzbogacony w jony magnezu pochodzące z soli: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ lub $Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$. Przyjęto trzy poziomy dodatki soli magnezu tak, aby zawartość magnezu w podłożach (w przeliczeniu na czysty pierwiastek) wynosiła: 0,5; 1,25; 1,5 g dm⁻³.

Kultury bakteryjne pobierano ze stanu zamrożenia w 25% (v/v) glicerolu (po 1 cm³) i przetrzymywano w temperaturze pokojowej do upłynnienia. Następnie przenoszono je do 10 cm³ płynnego podłoża bulion MRS i prowadzono hodowlę w temp. 28°C. Po 24 godz. przenoszono hodowlę w całości do 180 cm³ świeżego płynnego podłoża MRS i inkubowano przez 24 godz. w identycznych warunkach. Po 20 cm³ tak przygotowywanego inokulum przenoszono do płynnego podłoża kontrolnego i doświadczalnego w ilości 180 cm³ każdy, po czym prowadzono 24-godziną hodowlę w temp. 28°C. Wszystkie hodowle przebiegały w warunkach stacjonarnych bez napowietrzania.

Oznaczenia analityczne

W celu oznaczenia suchej substancji biomasy bakteryjnej pobierano 40 cm³ 24-godzinnych hodowli bakterii i odwirowywano biomasę bakteryjną w czasie 10 min przy 10 000 rpm. Biomasę dwukrotnie przepłukiwano wodą dejonizowaną i odwirowywano przez 5 min w identycznych warunkach. Następnie biomasę suszono w 105°C do ustalenia stałej masy.

Oznaczanie zawartości magnezu w suchej substancji bakterii metodą FAAS. Suchą substancję bakterii mineralizowano w mieszaninie kwasu nadchlorowego i azotowego (Digestion Unit K-435, Büchi, Niemcy). W tak przygotowanych próbkach zawartość magnezu oznaczano metodą absorpcyjnej spektroskopii atomowej (FAAS) (AAS, Schimadzu AA660, spectrophotometr, Japonia).

Liczbę komórek bakterii kwasu mlekowego określano metodą płytkową na podłożu bulion MRS. Badania wykonywano na początku doświadczenia (po wprowadzeniu inokulum do podłoża) oraz w 4, 8 i 24 godzinie hodowli. Płytki Petriego inkubowano w temp. 28°C przez 48–72 h. Wynik przeliczano na j.t.k. w 1 cm³ podłoża.

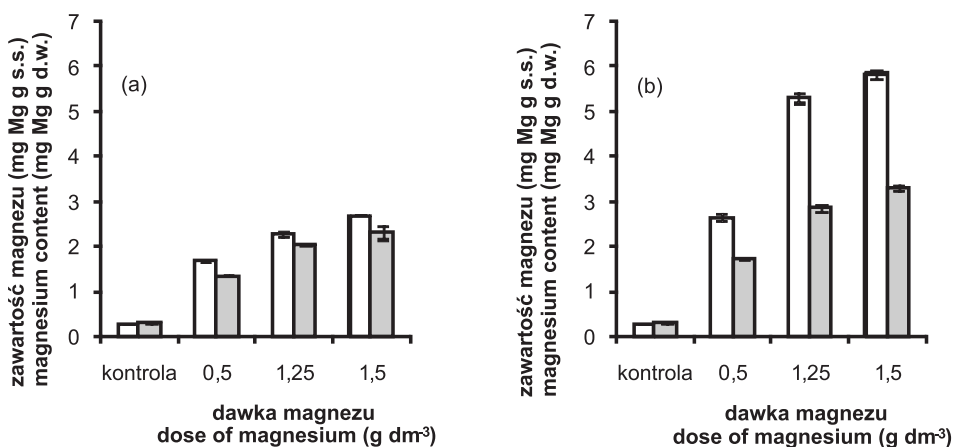
Właściwości kwaszące bakterii kwasu mlekowego określono przez oznaczenie kwasowości miareczkowej podłoża. Po odwirowaniu biomasy komórkowej 5 cm³ supernatantu miareczkowano 0.1 M NaOH. Wynik wyrażano w gramach kwasu mlekowego w 100 cm³ podłoża.

Wszystkie oznaczenia były wykonywane w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując program Statgraphics Plus wersja 4.1. Stosowano test statystyczny Tukey HSD.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badanie zawartości magnezu w biomase bakteryjnej *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* w zależności od źródła i dawki magnezu w podłożu

Możliwość naturalnego wiązania jonów magnezu przez szczepy bakterii mlekowych badano w modelowym podłożu bulion MRS, o stałym składzie z łatwo przyswajalnym źródłem węgla, który gwarantuje optymalny wzrost bakterii. Podłoże wzbogacono w jony magnezu, które wprowadzono do podłoża w postaci soli siarczanowej lub octanowej. Oznaczenie zawartości magnezu przeprowadzono po 24 h hodowli w próbkach biomasy bakterii, którą przed wysuszeniem dwukrotnie przemywano wodą dejonizowaną. W ten sposób usuwano tę część jonów magnezu, które znajdowały się w przestrzeniach międzykomórkowych biomasy oraz nie związały się trwale z komórkami bakterii, a jedynie zostały luźno zaabsorbowane na powierzchni ściany komórkowej. Zawartość magnezu w biomase komórkowej dwóch szczepów bakterii mlekowych w zależności od źródła i dawki magnezu przedstawiono na rys. 1.



Źródło magnezu: (a) MgSO₄·7H₂O i (b) Mg(CH₃COO)₂·4H₂O

The source of magnesium: (a) MgSO₄·7H₂O and (b) Mg(CH₃COO)₂·4H₂O

Rys. 1. Zawartość magnezu w suchej substancji komórkowej (mg Mg g⁻¹ s.s.) of *Lb. brevis* (□) and *Lb. plantarum* ATCC 4080 (■) w zależności od źródła i stężenia magnezu (g Mg dm⁻³)

Fig. 1. The magnesium content in dry weight of cells (mg Mg g⁻¹ d.w.) of *Lb. brevis* (□) and *Lb. plantarum* ATCC 4080 (■) depending on the source and concentrations of magnesium (g Mg dm⁻³)

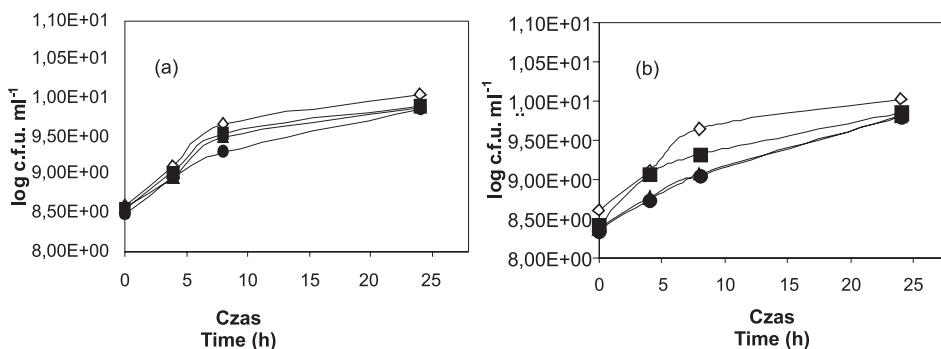
Po 24-godzinnej hodowli w podłożu kontrolnym MRS (bez dodatku magnezu) komórki badanych szczepów wiązały podobne ilości magnezu, wynoszące 0,28–0,32 mg Mg g⁻¹ s.s. Z kolei w biomase bakteryjnej *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* ATCC 4080 uzyskanych z podłoża doświadczalnych stwierdzono istotny wzrost zawartości magnezu w porównaniu do hodowli kontrolnych. Rodzaj źródła magnezu wpływał istotnie na zdolność wiązania tego pierwiastka przez biomasę badanych bakterii (rys. 1a i b). Oba szczepy

efektywniej wiązały magnez w przypadku zastosowania organicznego źródła pierwiastka, jakim był octan magnezu. W biomacie bakteryjnej *Lb. brevis* hodowanej w podłożu z dodatkiem tej soli stwierdzono 2,65–5,82 mg Mg g⁻¹s.s., podczas gdy w biomacie szczepu *Lb. plantarum* ATCC 4080 mniej, tj. od 1,73 do 3,28 mg Mg g⁻¹s.s. (rys. 1b). W przypadku zastosowania uwodnionego siarczanu magnezu jako źródła tego pierwiastka zawartość związanego magnezu przez biomasę była istotnie mniejsza zarówno dla *Lb. brevis*, jak i *Lb. plantarum* ATCC 4080 i wynosiła odpowiednio: 1,67–2,69 mg Mg g⁻¹s.s oraz 1,35–2,31 mg Mg g⁻¹s.s (rys. 1a).

Stwierdzono także, że biomasa bakteryjna wiązała tym więcej jonów magnezu, im większe było ich stężenie w podłożu. Tendencję tę obserwowano niezależnie od źródła magnezu występującego w podłożu. Najwięcej tego pierwiastka stwierdzono w biomacie bakteryjnej *Lb. brevis* otrzymanej z podłoża zawierającego 1,5 g Mg·dm⁻³ w postaci octanu magnezu, tj. 5,82 mg Mg g⁻¹ s.s. W biomacie *Lb. plantarum* ATCC 4080 zawartości związanego magnezu były w każdej hodowli doświadczalnej istotnie mniejsze niż w równoległych hodowlach *Lb. brevis*.

Badanie kinetyki wzrostu szczepów *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* ATCC 4080 w zależności od źródła i dawki magnezu w podłożu

Na rys. 2 i 3 przedstawiono kinetykę wzrostu bakterii *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* ATCC 4080 w ciągu 24 h w zależności od źródła i dawki magnezu w podłożu. Liczbę komórek badano w 4, 8 i 24 godzinie hodowli na podłożu kontrolnym i doświadczalnych.



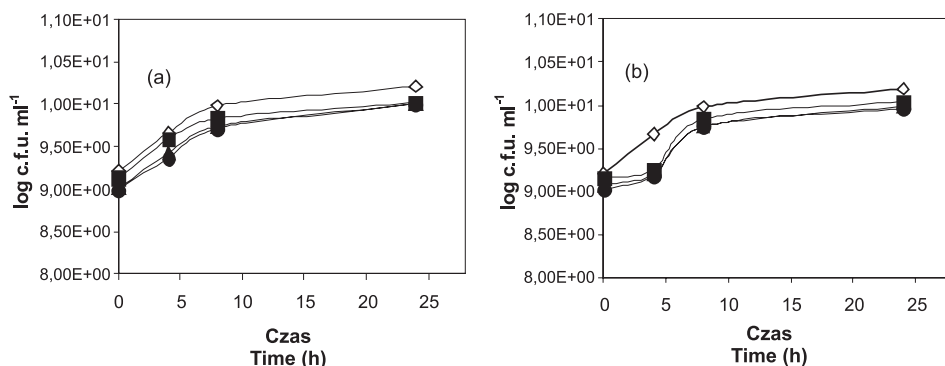
Rys. 2. Przebieg logarytmicznych krzywych wzrostu *Lb. brevis* w zależności od źródła i dawki magnezu. Źródło magnezu: (a) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i (b) $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. (\diamond) – kontrola, hodowla na podłożu bulion MRS, (\blacksquare) – hodowla na podłożu bulion MRS + 0,5 g Mg dm⁻³, (\blacktriangle) – hodowla na podłożu bulion MRS + 1,25 g Mg dm⁻³, (\bullet) – hodowla na podłożu bulion MRS + 1,5 g Mg dm⁻³

Fig. 2. The course of logarithmic growth curves of *Lb. brevis* depending on the source and dose of magnesium. (a) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and (b) $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. (\diamond) – control, culture on MRS broth medium, (\blacksquare) – culture on MRS broth medium + 0,5 g Mg dm⁻³, (\blacktriangle) – culture on MRS broth medium + 1,25 g Mg dm⁻³, (\bullet) – culture on MRS broth medium + 1,5 g Mg dm⁻³

W czasie 24-godzinnej hodowli kontrolnej *Lb. brevis* liczba komórek wzrosła o 2 rzędy logarytmiczne (od $4,1 \cdot 10^8$ do $1,1 \cdot 10^{10}$ j.t.k. cm⁻³). Natomiast w hodowlach doświadczalnych w tym samym czasie nastąpił wzrost liczby komórek tylko o 1 rząd logarytmiczny (od 10^8 do 10^9 j.t.k. cm⁻³) (rys. 2). W podłożu doświadczalnym z najmniejszą zawartością siarczanu magnezu liczba komórek wzrosła od początkowej $3,8 \cdot 10^8$ do

$8,0 \cdot 10^9$ j.t.k. cm^{-3} po 24-godzinach. Im większe było stężenie magnezu w podłożu, tym liczba komórek była mniejsza. Przy stężeniu $1,25 \text{ g Mg dm}^{-3}$ po dobie populacja liczyła $7,4 \cdot 10^9$ j.t.k. cm^{-3} , a przy $1,5 \text{ g Mg dm}^{-3}$ – $7,0 \cdot 10^9$ j.t.k. cm^{-3} . Te same tendencje obserwowano w hodowlach z dodatkiem octanu magnezu, szczególnie przy wyższych jego dawkach ($1,25$ i $1,5 \text{ g Mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). W tych hodowlach liczba populacji w pierwszych godzinach hodowli (do 4 h) była mniejsza o 1 rząd logarytmiczny w stosunku do hodowli kontrolnej. W kolejnych godzinach hodowli liczba komórek wzrosła do poziomu $6,5 \cdot 10^9$ j.t.k. cm^{-3} (rys. 2).

Liczba komórek *Lb. plantarum* ATCC 4080 podczas 24-godzinnej hodowli kontrolnej wzrosła od wartości $1,6 \cdot 10^9$ do $1,4 \cdot 10^{10}$ j.t.k. cm^{-3} . W podłożach z dodatkiem soli siarczanowej obserwowano małe różnice liczby komórek *Lb. plantarum* ATCC 4080 w stosunku do hodowli kontrolnej (rys. 3). Po 24 h hodowli liczba populacji wzrosła od $9,9 \cdot 10^9$ do $1,1 \cdot 10^{10}$ j.t.k. cm^{-3} w zależności od dawki magnezu. W podłożach z octanem magnezu obserwowano mniejszą liczbę populacji w stosunku do hodowli kontrolnej tylko w początkowym okresie hodowli (do 8 h). Po 24 h hodowli liczba komórek była tylko nieznacznie mniejsza od liczby z podłoża kontrolnego (od $1,1 \cdot 10^{10}$ do $9,1 \cdot 10^9$ j.t.k. cm^{-3}).



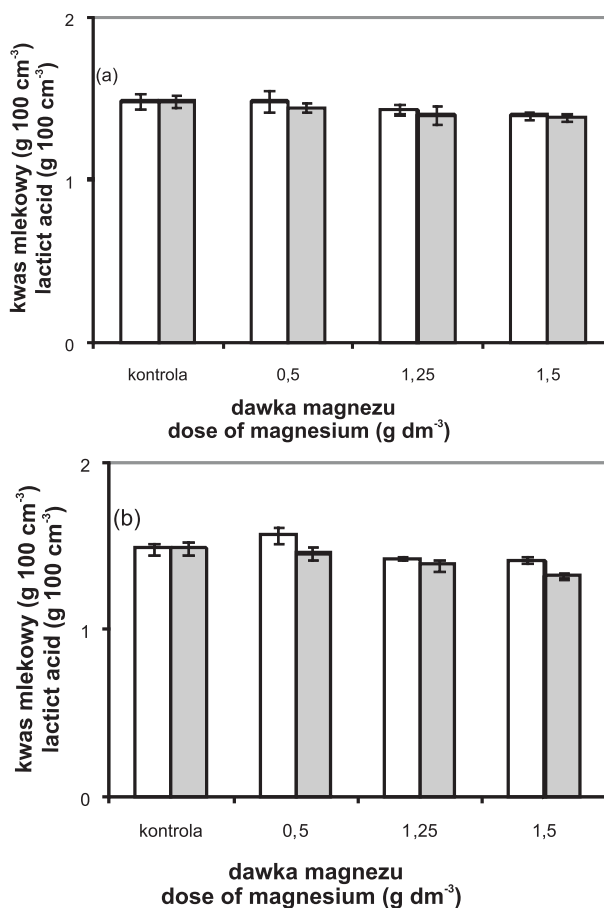
Rys. 3. Przebieg logarytmicznych krzywych wzrostu *Lb. plantarum* ATCC 4080 w zależności od źródła i dawki magnezu. Źródło magnezu: (a) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i (b) $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. (\diamond) kontrola, hodowla na podłożu bulion MRS, (\blacksquare) hodowla na podłożu bulion MRS + $0,5 \text{ g Mg dm}^{-3}$, (\blacktriangle) hodowla na podłożu bulion MRS + $1,25 \text{ g Mg dm}^{-3}$, (\bullet) hodowla na podłożu bulion MRS + $1,5 \text{ g Mg dm}^{-3}$

Fig. 3. The course of logarithmic growth curves of *Lb. plantarum* ATCC 4080 depending on the source and dose of magnesium. (a) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and (b) $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. (\diamond) control, culture on MRS broth medium, (\blacksquare) culture on MRS broth medium + $0,5 \text{ g Mg dm}^{-3}$, (\blacktriangle) culture on MRS broth medium + $1,25 \text{ g Mg dm}^{-3}$, (\bullet) culture on MRS broth medium + $1,5 \text{ g Mg dm}^{-3}$

Badanie właściwości kwaszących szczepów *Lb. brevis* i *Lb. plantarum* w zależności od źródła i dawki magnezu w podłożu

Na rys. 4 przedstawiono zależność wpływu dodatku jonów magnezu do podłoża na właściwości kwaszące bakterii mlekowych, które sprawdzano w 24 godzinie hodowli. Uzyskiwane wyniki wyrażano w gramach kwasu mlekowego wytworzonego przez

bakterie w 100 cm³ podłoża. Na podłożu kontrolnym MRS *Lb. brevis* wytworzył kwas w ilości 1,45 g 100 cm⁻³, podobnie jak *Lb. plantarum* ATCC 4080 (1,49 g 100 cm⁻³). W podłożach doświadczalnych stwierdzono nieznaczne zmniejszenie się właściwości kwaszących bakterii przy większych dawkach jonów magnezu, tj. 1,25 i 1,5 g dm⁻³. Kwasowość ogólna podłoża doświadczalnego *Lb. brevis* z solą siarczanową wynosiła 1,44 i 1,40 g 100 cm⁻³, a z solą octanową 1,43 i 1,40 g 100 cm⁻³ (rys. 4). Szczep *Lb. plantarum* ATCC 4080 wytwarzał podobne ilości kwasu w odniesieniu do próbki kontrolnej, tj. 1,39 i 1,33 g 100 cm⁻³. Obserwowane różnice nie były istotne w porównaniu z hodowlą kontrolną. W podłożach doświadczalnych z najniższą wprowadzoną do podłoża ilością jonów magnezu (0,5 g dm⁻³) w postaci soli octanowej obserwowano niewielką stymulację właściwości kwaszących *Lb. brevis* (wzrost kwasowości ogólnej do 1,57 g 100 cm⁻³).



Rys. 4. Aktywność kwasząca *Lb. brevis* (□) i *Lb. plantarum* ATCC 4080 (■) w zależności od źródła i stężenia magnezu (g kwasu mlekowego dm⁻³). Źródło magnezu: (a) MgSO₄·7H₂O i (b) Mg(CH₃COO)₂·4H₂O

Fig. 4. The acidifying activity of *Lb. brevis* (□) and *Lb. plantarum* ATCC 4080 (■) depending on the source and concentrations of magnesium (g Mg dm⁻³). The source of magnesium: (a) MgSO₄·7H₂O and (b) Mg(CH₃COO)₂·4H₂O

DYSKUSJA WYNIKÓW

Szczep *Lb. brevis* (Biolacta-Textel, Olsztyn, Polska) w porównaniu z badanym szczepem *Lb. plantarum* ATCC 4080 w większym stopniu wiązał magnez z podłożu doświadczalnych. Mogło to częściowo wynikać z większej ilości wolnych miejsc adsorpcji magnezu występujących w ścianie komórkowej tych bakterii, jeśli założymy, że liczba miejsc wiązania magnezu była zbliżona u obu szczepów. Różnice w zdolności wiązania kationów przez biomasę bakteryjną mogą wynikać również z odrębności gatunkowo-szczepowej, związanej m.in. z ich morfologią. Lambert i in. [1975] wykazali, że zdolność wiązania magnezu przez bakterie Gram-dodatnie jest uwarunkowana przede wszystkim zawartością kwasów tejchojowych występujących w ścianie komórkowej. W obu szczepach występują kwasy glicerolotejchojowe, ale tylko w ścianie komórkowej *Lb. plantarum* dodatkowo obecne są kwasy rybitolotejchojowe [Kandler i Weiss 1986]. Z kolei komórki *Lb. brevis* charakteryzują się mniejszymi rozmiarami od komórek *Lb. plantarum*. Średnia szerokość komórki mieści się w granicach 0,7–1,0 μm , a długość 2–4 μm , gdy tymczasem wymiary komórek *Lb. plantarum* wynoszą odpowiednio 0,9–1,2 \times 3–8 μm [Kandler i Weiss 1986]. Park i in. [2003] badali zdolność wiązania kationów kadmu przez biomasę dwóch szczepów drożdży *S. cerevisiae* różniących się wielkością komórek. Szczep o mniejszych rozmiarach komórek wiązał więcej kationów niż większe komórki drugiego szczepu przy tych samych gęstościach biosorbentów. Według autorów tendencja ta mogła być częściowo spowodowana większym polem powierzchni komórkowej w przypadku szczepu drożdży o mniejszych komórkach.

W podłożu kontrolnym liczba komórek badanych bakterii mlekowych była nieznacznie większa niż w podłożach doświadczalnych. Zauważono, że na wzrost kultur bakteryjnych większy wpływ miało stężenie jonów magnezu w podłożu niż rodzaj użytej soli. Im bardziej rosło stężenie soli magnezowych w podłożu, tym wzrost populacji był mniejszy, szczególnie w pierwszych 8 godzinach hodowli i przy zastosowaniu octanu magnezu jako źródła pierwiastka. Jednakże po 24 godzinach hodowli populacje z hodowli doświadczalnych nie różniły się statystycznie pod kątem liczebności od kultur z podłoża kontrolnego. Podobne wyniki uzyskali Raczyńska i in. [2004], którzy badali jeszcze szerszy zakres dodatku jonów magnezu do podłoża hodowlanego (0,25–10 g dm^{-3}) na wzrost pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*.

Badane szczepy charakteryzowały się bardzo podobnymi właściwościami kwaszującymi. Obserwowane niewielkie (nieistotne statystycznie) różnice tych właściwości w podłożach z dodatkiem jonów magnezu w porównaniu z hodowlą z podłoża kontrolnego mogły wynikać z mniejszej liczby aktywnych komórek bakterii w podłożach doświadczalnych.

WNIOSKI

1. *Lactobacillus brevis* (Biolacta-Textel, Polska) charakteryzował się większą zdolnością wiązania magnezu w porównaniu z *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080.

2. Jony magnezu były wiązane w większych ilościach ze źródła organicznego, jakim był octan magnezu. Im wyższe było stężenie jonów magnezu w środowisku, tym biomasa bakteryjna zawierała więcej magnezu.

3. Badane stężenia soli magnezowych w podłożu nie hamowały istotnie wzrostu i właściwości kwaszących badanych szczepów.

4. Można sugerować, że badane szczepy bakterii mlekowych wzbogacone w magnez mogą stanowić potencjalne źródło magnezu w diecie człowieka.

PIŚMIENNICTWO

- Damiani P., Gobbetti M., Cossignani L., Corsetti A., Simonetti M.S., Rossi J., 1996. The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeasts and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *Lebensm.-Wiss. U. -Technol.*, 29 (1–2), 63–70.
- De Vuyst L., Neysens P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, 43–56.
- Dziowksz A., Włodarczyk M., 2003. Piekarskie kultury starterowe: I. Dobór szczepów bakterii mlekowych do fermentacji zakwasów piekarskich. *Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 931 (67), 17–24.
- Hansen A., Schieberle P., 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, 85–94.
- Hartwig A., 2001. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation Research*, 475, 113–121.
- Kandler O., Weiss N., 1986. Regular, non-sporing Gram-positive rods, [w:] Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1208–1234.
- Lambert P.A., Hancock I.C., Baddiley J. 1975. The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *Biochem. J.*, 149, 519–524.
- Martinez-Anaya M.A., Pitarch B., Bayarri P., Barber de B.C., 1990. Microflora of the sourdoughs of wheat flour bread. X. Interactions between yeast and lactic acid bacteria in wheat doughs and their effects in bread quality. *Cereal Chem.*, 67, 85–91.
- Moncrief M.B.C., Maguire M.E., 1999. Magnesium transport in prokaryotes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4, 523–527.
- Neysens P., De Vuyst L., 2005. Kinetics and modeling of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol.*, 16, 95–103.
- Park J.K., Lee J.W., Jung J.Y., 2003. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Enzyme Microbial Technol.*, 33, 371–378.
- Pasternak K., 1999. Magnez w fizjologii człowieka. *Biuletyn Magnezologiczny*, 4(2), 480–485.
- Raczyńska-Cabaj A., Lipińska E., Sobczak E., Stosio A., 2004. Wpływ jonów magnezu na rozwój bakteryjnej mikroflory występującej w prasowanych drożdżach piekarskich. *Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria*, 3(2), 111–118.
- Romani A., Scarpa A., 1992. Regulation of cell magnesium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(1), 1–12.
- Romani A., Scarpa A., 2000. Regulation of cellular magnesium. *Front. Biosci.*, 1(5) D, 720–734.
- Saris N.-E.L., Mervaala E., Karppanen H., Khawaja J.A., Lewenstam A., 2000. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clinica Chimica Acta*, 294, 1–26.
- Vaskonen T., 2003. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 492–506.
- Vormann J., 2003. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol. Aspects Med.*, 24, 27–37.
- Wolf F. I., Torsello A., Fasanella S., Cittadini A., 2003. Cell physiology of magnesium. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 11–26.

COMPARISON OF MAGNESIUM BINDING, GROWTH, AND ACIDIFYING ACTIVITIES OF *LACTOBACILLUS BREVIS* AND *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN AN ENVIRONMENT CONTAINING HIGHER CONCENTRATION OF MAGNESIUM

Abstract. The *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum* ATCC 4080 strains exhibited the highest magnesium binding activities (approximately: 5,82 mg Mg g⁻¹ and 3,29 mg Mg g⁻¹, respectively) in a medium containing magnesium in the form of salts such as magnesium acetate, with a magnesium concentration of 1,5 g dm⁻³. *Lb. brevis* binded more magnesium than *Lb. plantarum* ATCC 4080 under the same culture conditions. The strains showed weaker growth during 24 h of culture in a medium to with 0,5–1,5 g Mg dm⁻³ was added, both in the form of sulfate and acetate of magnesium, in comparison with the control medium; however no decrease in their acidifying proprieties were observed.

Key words: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, magnesium binding, acidifying activity

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.04.2009

Do cytowania – For citation: Roman J., Gniewosz M., Mantorska J., 2009. Porównanie wiązania magnezu, wzrostu i właściwości kwaszących *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum* w środowisku o podwyższonym stężeniu magnezu. Acta Sci. Pol., Biotechnol. 8(1), 27–36.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Michał Piegza, Justyna Stolaś, Anna Kancelista, Danuta Witkowska

- Wpływ grzybów rodzaju *Trichoderma*
na wzrost patogennych grzybów strzępkowych
w testach biotycznych na nietypowych źródłach węgla..... 3
Influence of *Trichoderma* strains on the growth
of pathogenic moulds in biotic test
on untypical carbon sources

Justyna Sobolczyk, Anna Rodziewicz, Katarzyna Baranowska

- Wpływ wybranych warunków środowiskowych
na biosyntezę egzopolimerycznych składników biofilmu
przez bakterie *Bacillus cereus* 15
Influence of selected environmental conditions
on biosynthesis of exopolymeric matrix
by *Bacillus cereus* strains

Joanna Roman, Małgorzata Gniewosz, Joanna Mantorska

- Porównanie wiązania magnezu, wzrostu
i właściwości kwaszących *Lactobacillus brevis*
i *Lactobacillus plantarum* w środowisku
o podwyższonym stężeniu magnezu 27
Comparison of magnesium binding, growth
and acidifying activities of *Lactobacillus brevis*
and *Lactobacillus plantarum* in an environment containing
higher concentration of magnesium