

### WSTĘP

- Rodzaj *Neosartorya* (rodzina *Trichocomaceae*) jako teleomorficzne (plciowe) stadium rozwojowe grzybów, zdolny jest do wytwarzania zarodników opornych na wysokie temperatury (de Sá et al., 2022).
- Grzyby odporne na ciepło mogą przetrwać procesy pasteryzacji, a następnie rozwijać się i powodować psucie się produktów spożywczych, prowadząc do znacznych strat ekonomicznych dla przemysłu spożywczego (Frąc et al., 2015; Chen et al., 2022).
- Około 25% globalnej podaży żywności jest marnowane lub tracone z powodu zepsucia powodowanego zakażeniami drobnoustrojowymi po zbiorach (Snyder & Worobo, 2018).
- Grzyby są jednymi z najbardziej odpornych mikroorganizmów powodujących psucie się żywności i są w stanie przezwyciężyć strategie kontroli stosowane przez przemysł spożywczy. Różne rodzaje, w tym *Neosartorya* spp., są szybko przenoszone przez kontakt z glebą, wodą i powietrzem i mogą przeżyć w ekstremalnych warunkach otoczenia.
- Rodzaj *Neosartorya* jest określany mianem „imponującego” pod względem różnorodności chemicznej produkowanych metabolitów (de Sá et al., 2022). Istnieją zatem podstawy by prowadzić badania obejmujące panele wrażliwości *Neosartorya* spp. w celu określenia ich odpowiedzi na rozmaite substancje chemiczne, w tym związki azotowe.
- Główna hipoteza badawcza zakładała, że izolaty wykazą się odmienną wrażliwością na związki azotowe, a także iż badane substancje będą charakteryzowały się właściwościami antymikrobiologicznymi.

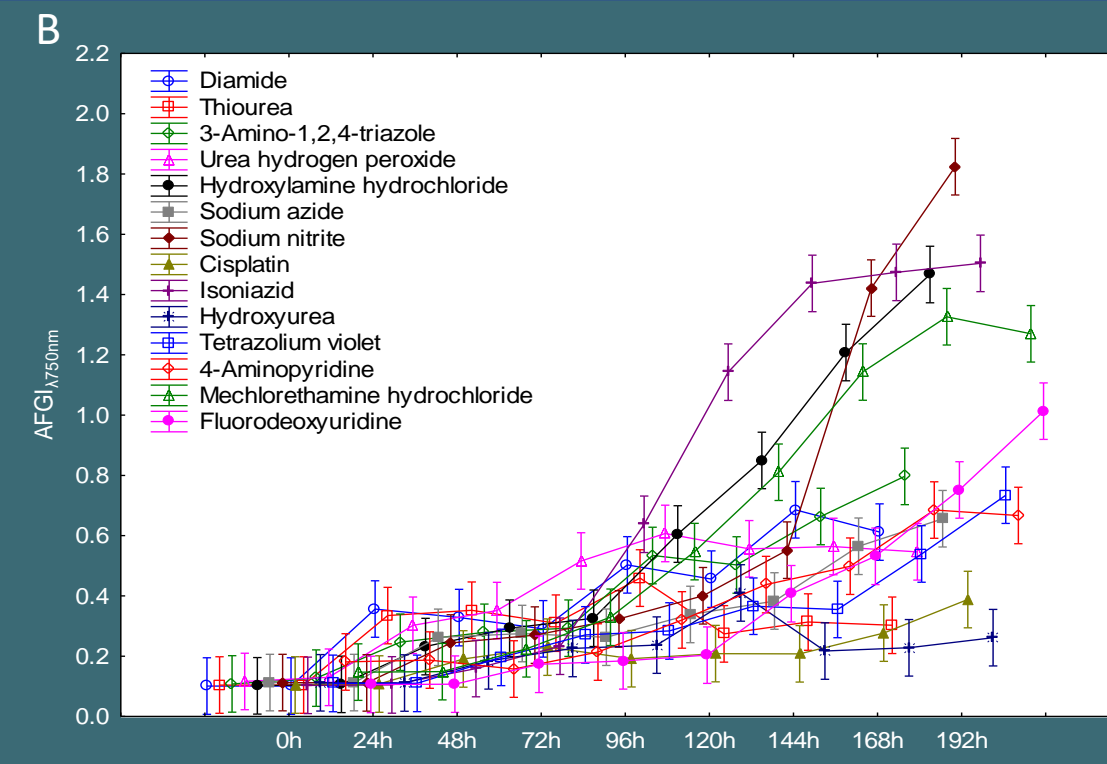
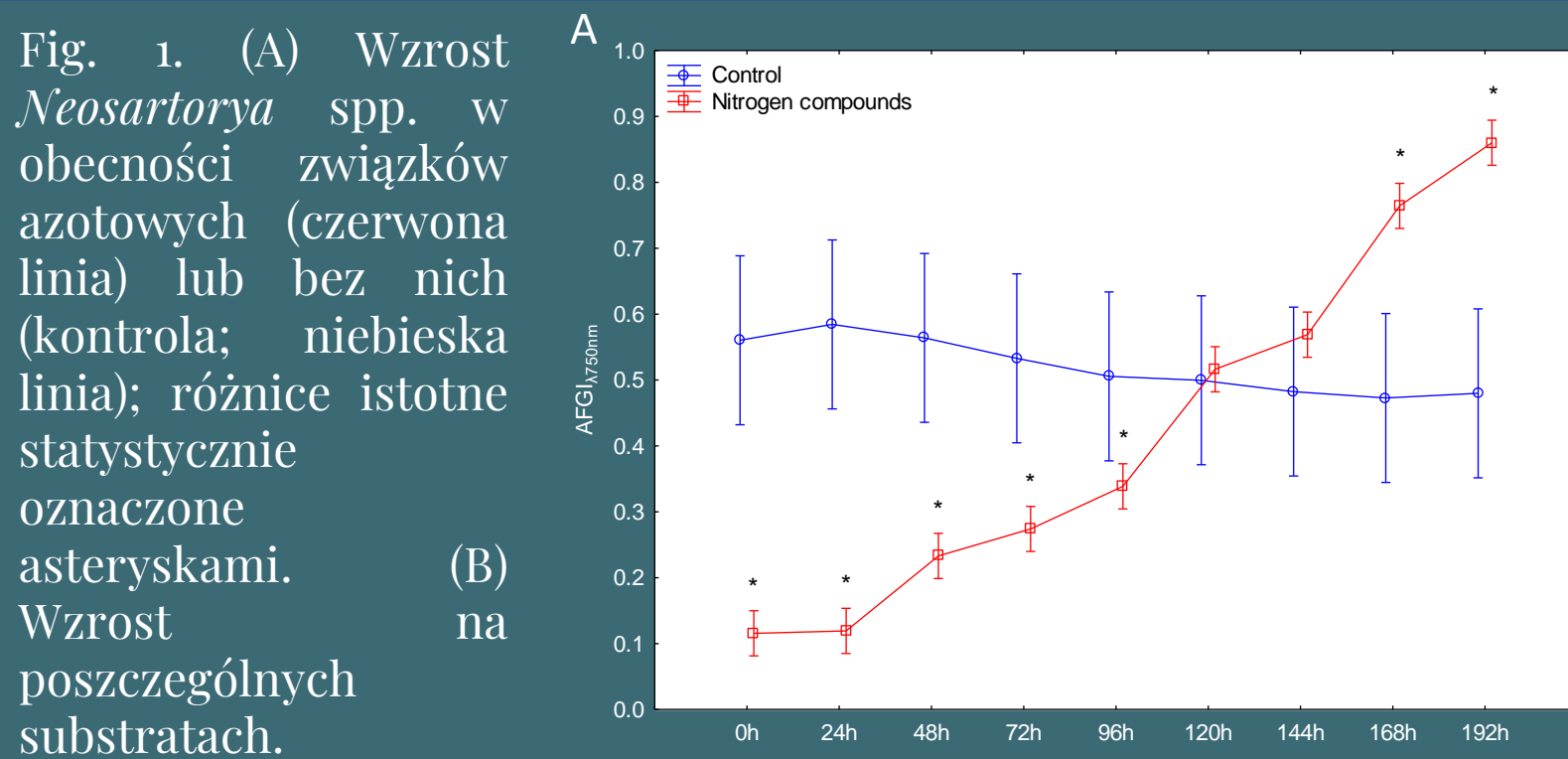
### MATERIAŁY I METODY

W celu oznaczenia profili metabolicznych izolatów *Neosartorya* spp. wykorzystano mikropłytki PM21-25 systemu Biolog™, które znajdują zastosowanie w przesiewowych badaniach fenotypowych takich organizmów jak *Neosartorya fischeri* (Panek et al., 2016), *Cerrena unicolor* (Pawlik et al., 2019), *Pseudogymnoascus destructans* (Beekman et al., 2018), *Candida albicans* (Brandt et al., 2022) czy *Raffaelea lauricola* (Joseph et al., 2021).

W ramach badań przeprowadzono hodowlę 10 izolatów charakteryzujących się stopniowo zwiększającą się wrażliwością na wcześniej badane związki (ekstrakty naturalne, konserwanty, inne substancje chemiczne). Grzyby zaszczerpiono na stałym podłożu PDA i kultywowano przez 10 dni w temperaturze 30°C. Po tym czasie zebrano grzybnie każdego z izolatów i stworzono zawiesiny o 62% transmittancji, wzbogacone D-glukozą i bazą drożdżowo-azotową. Do dołek mikropłyt PM21-25 Biolog™ наносono 100 µl inokulum, a następnie inkubowano je przez 9 dni. Wykorzystując czytnik MicroStation (Biolog™, Hayward, CA, USA), co 24 godziny dokonywano pomiarów zdolności respiracyjnych (AFRI; Average Fungal Respiration Intensity) oraz produkcji biomasy (AFGI; Average Fungal Growth Intensity) przy długościach fali kolejno: 490 i 750 nm.

Doświadczenie obejmowało 6 powtórzeń dla każdego obiektu badawczego, z 2 powtórzeniami biologicznymi i trzema technicznymi. Do opracowania statystycznego wyników posłużono się programem Statistica (TIBCO Software Inc. V13.3).

### WYNIKI



Pomiędzy o a 96 godziną, obecność związków azotowych powodowała znaczącą inhibicję wzrostu *Neosartorya* spp. (Fig. 1). W okresie od 120 do 144 godzin nie zaobserwowano istotnych różnic w porównaniu do kontroli. Natomiast w przedziale od 168 do 192 godzin, związki azotowe wykazywały stymulujący wpływ na wzrost *Neosartorya* spp. Obserwowana zmiana z inhibicji do stymulacji może zostać uzasadniona na dwa sposoby: grzyby mogą dostosowywać szlaki metaboliczne, aby z czasem lepiej wykorzystywać związki azotu lub niższe stężenia związków azotu mogą stać się korzystne w miarę postępu inkubacji (Beattie et al., 2017; Garzon & Flores, 2013).

Inkubacja przez 144 godziny wraz ze związkami azotowymi generowała 3 wzorce odpowiedzi mycelium: inhibicję, stymulację oraz brak zmian w gęstości optycznej w porównaniu do kontroli (Fig. 2).

Większość związków azotowych (diamidyna, 3-amino-1,2,4-triazol, nadtlenek mocznika, azydek sodu, azotyn sodu, fiole tetrazolowy, 4-aminopirydyna, fluorodeoksyurydyna [znana też jako floksurydyna]) nie wywierała istotnego wpływu na wzrost *Neosartorya* spp. Substancje na bazie azotu, które zmniejszały zdolność izolatów do rozwoju, to tiomocznik, cisplatyna i hydroksymocznik, natomiast chlorowoderek hydroksyloaminy, izoniazyd i chlorowoderek mechloretaminy wykazywały efekt stymulujący.

Jednym z możliwych wyjaśnień zjawiska hamowania wzrostu *Neosartorya* spp. przez związki azotu jest to, że te substancje mogą zaburzać przyswajanie składników odżywczych lub metabolizm grzybów (Davis & Wond, 2010). Wysokie stężenie związków azotu może stworzyć niekorzystne środowisko dla wzrostu mikroorganizmów (Jeon, 2019).

Warto zauważyć, że choć z przebadanych tu inhibitorów, tiomocznik i hydroksymocznik posiadają udokumentowane właściwości antymikrobiologiczne (Rodríguez-Fernandez et al., 2005; Singh et al., 2017), na ten czas tylko tiomocznik znajduje zastosowanie w rolnictwie i produkcji żywności w postaci nawozów dolistnych, zapraw materiałów siewnych czy dodatków do podłoża (Wahid et al., 2017).

Fig. 2. Średnia intensywność wzrostu grzybów na poszczególnych związkach azotowych. Wartości uzyskane po 144 godzinach inkubacji. Bazowa wartość kontrolna oznaczona jest czarną linią. Asteryski oznaczają istotne różnice statystyczne między OD kontroli i próbek pod wpływem związku.

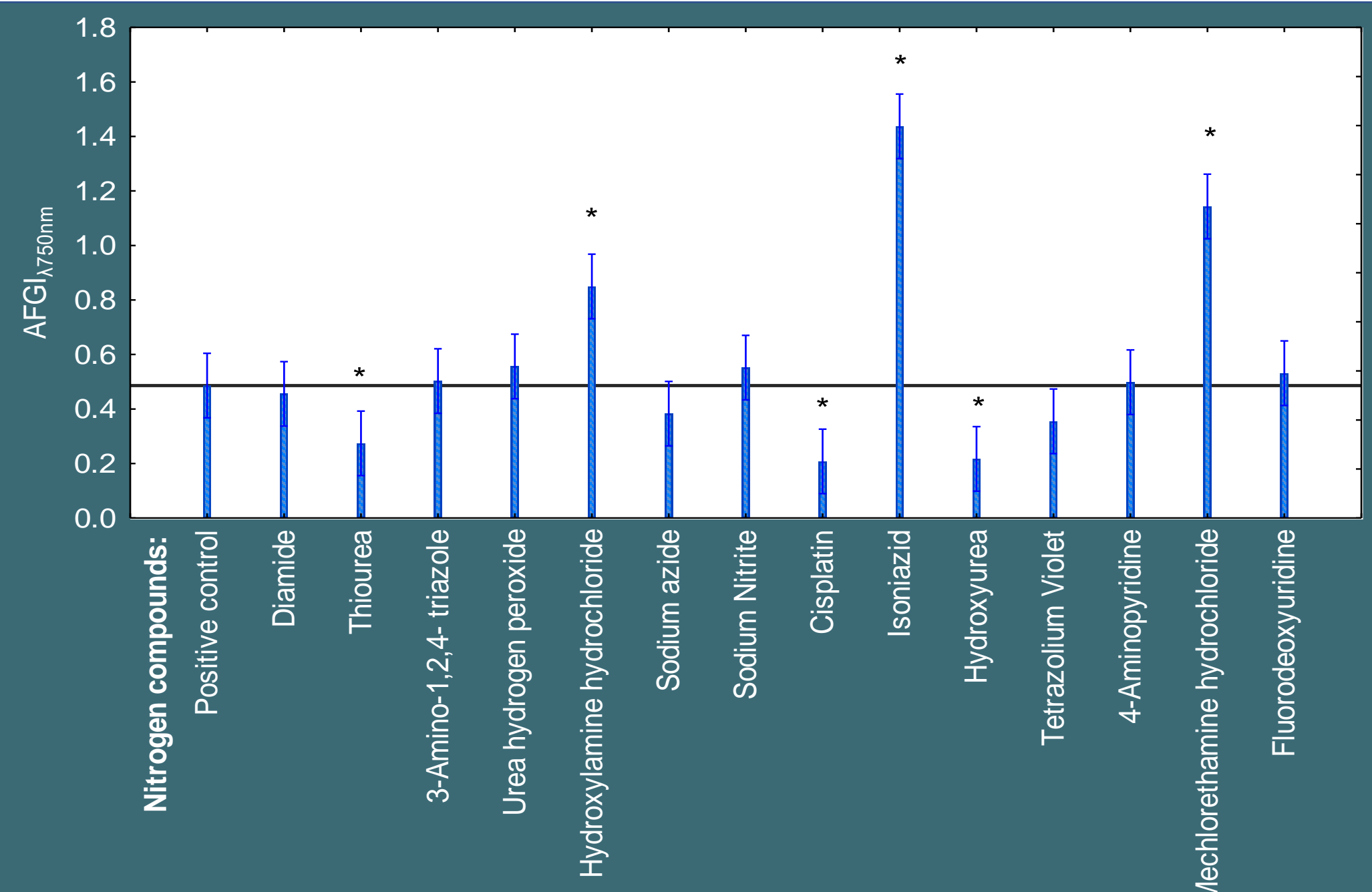
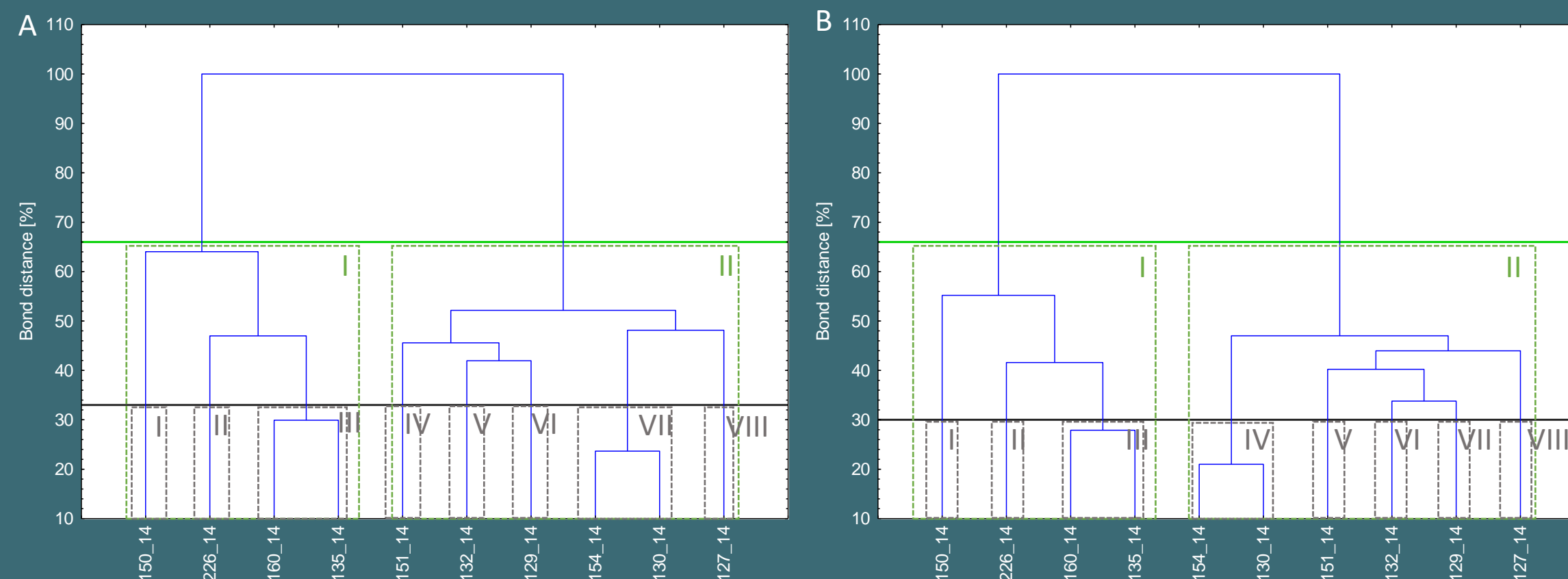


Fig. 3. Grupowanie profili metabolicznych izolatów *Neosartorya* spp. pod wpływem związków azotowych. (A) 490 nm (AFRI) i (B) 750 nm (AFGI) z kryteriami Sneath'a oznaczonymi zieloną (66%) i czarną (33%) linią. Numeracja rzymska oznacza obserwowalne grupy.



Przy 66% odległości wiązania, czyli mniej rygorystycznym kryterium Sneath'a, widoczne są tylko dwa skupiska izolatów, jedno składające się z G150/14, G226/14, G160/14 i G135/14, a drugie z G154/14, G130/14, G151/14, G132/14, G129/14 i G127/14. Aby uchwycić dokładniejsze grupowanie izolatów, posłużono się także bardziej restrykcyjnym kryterium na poziomie 33%. Wówczas zaobserwowano rozdział na 8 skupisk, z czego tylko dwa posiadały po więcej niż 1 izolacie – G160/14 i G135/14, oraz G154/14 i G130/14. Zwiększenie rygoru kryteriów grupowania wyraźnie ujawnia bardziej zróżnicowane wzorce metaboliczne izolatów.

### WNIOSKI

Mikropłytki PM21-25 systemu Biolog™ pozwoliły na efektywną ocenę właściwości szeregu związków azotowych na izolaty *Neosartorya* spp. Ich tendencja do prezentowania odmiennych wrażliwości na substancje o charakterze antymikrobiologicznym utrzymała się, co pozwoliło na obserwację dwóch głównych grup wrażliwości. Choć toksyczność cisplatyny prawdopodobnie nie pozwoli na jej wykorzystanie w produkcji i ochronie żywności, inhibicja wywołana przez tiomocznik i hydroksymocznik stanowi obiecujący wynik, który może posłużyć w opracowaniu nowych formuł fungicydów. Wymagane są jednak dalsze badania, ze szczególnym ukierunkowaniem na ocenę ich bezpieczeństwa w stosunku do zdrowia konsumentów.

### BIBLIOGRAFIA

- de Sá, J. D. M., Kumla, T., Dethou, T., & Kijou, A. (2022). Bioactive compounds from terrestrial and marine-derived fungi of the genus *Neosartorya*. *Molecules*, 27(7), 2351.
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018). Fungal spoilage in food processing. *Journal of Food Protection*, 81(6), 1035-1040.
- Chen, S., Fan, L., Song, J., Zhang, H., Doucette, C., Hughes, T., & Campbell, L. (2022). Quantitative proteomic analysis of *Neosartorya pseudofischeri* ascospores subjected to heat treatment. *Journal of Proteomics*, 252, 104446.
- Panek, J., Frąc, M., & Bilińska-Wielgos, N. (2016). Comparison of chemical sensitivity of fresh and long-stored heat resistant *Neosartorya fischeri* environmental isolates using BIOLOG Phenotype MicroArray system. *PLoS One*, 11(1), e0147605.
- Pawlik, A., Ruminowicz-Stefaniak, M., Frąc, M., Mazur, A., Wielbo, J., & Janusz, G. (2019). The wood decay fungus *Cerrena unicolor* adjusts its metabolism to grow on various types of wood and light conditions. *PLoS One*, 14(2), e021744.
- Beekman, C. N., Meckler, L., Kim, E., & Bennett, R. J. (2018). *Galleria mellonella* as an insect model for *P. destructans*, the cause of white-nose syndrome in bats. *PLoS One*, 13(9), e0210915.
- Brandt, P., Gervien, F., Wagner, L., Krüger, T., Ramirez-Zavala, B., Mirhakkak, M. H., Schäuble, S., Kniemeyer, O., Panagiotou, G., Brakhage, A. A., Morschhäuser, J., & Vylkova, S. (2022). *Candida albicans* SR-like protein kinases regulate different cellular processes: Skyr is involved in control of ion homeostasis, while Sk2 is important for dipeptide utilization. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.
- Joseph, R., Lasa, M., Zhou, Y., & Keyhani, N. O. (2021). Unique attributes of the laurel wilt fungal pathogen, *Raffaelea lauricola*, as revealed by metabolic profiling. *Pathogens*, 10(5), 528.
- Davis, M. A., & Wong, K. H. (2010). Nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*, 325-338.
- Jeon, J. (2019). Phytochrome as a potential factor in nitrogen-induced susceptibility to the rice blast disease. *Research in Plant Disease*, 25(3), 103-107.
- Frąc, M., Jezierska-Tys, S., Yaguchi, T., Occurrence, Detection, and Molecular and Metabolic Characterization of Heat-Resistant Fungi in Soils and Plants and Their Risk to Human Health. *Advances in Agronomy*, 13, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.agron.2015.02.003>
- Beattie, S.R., Mark, K.M., Thammarong, A., Ries, L.N., Dhingra, S., Caffrey-Carr, A.K., et al. (2017) Filamentous fungal carbon catabolite repression supports metabolic plasticity and stress responses essential for disease progression. *PLoS Pathog* 13(4): e1005340.
- Garzon, C. D., & Flores, F. J. (2013). Hormesis: Biphasic dose-responses to fungicides in plant pathogens and their potential threat to agriculture. *Fungicides—showcases of integrated plant disease management from around the world*, 311-328.
- Wahid, A., Basra, S., & Farooq, M. (2017). Thiourea: A Molecule with Immense Biological Significance for Plants. *International Journal of Agriculture and Biology*, 19(4).
- Rodríguez-Fernández, E., Manzano, J. L., Benito, J. J., Hermosa, R., Montle, E., & Criado, J. J. (2005). Thiourea, triazole and thiazidine compounds and their metal complexes as antifungal agents. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(8), 1758-1772.
- Singh, A., Agarwal, A., & Xu, Y. J. (2017). Novel cell-killing mechanisms of hydroxyurea and the implication toward combination therapy for the treatment of fungal infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(11), 10-1128.