Nauki Przyrodnicze
numer 2(4)/2014

FUSARIUM

grzyb toksynotwórczy

Charakterystyka grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz nowoczesne metody ich identyfikacji

ISSN 2353-13-71

REDAKCJA:

REDAKTOR NACZELNY: *Mateusz Gortat*

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO: *Małgorzata Sęczkowska*

REDAKTOR TECHNICZNY: *Kamil Korzeniowski*

RADA NAUKOWA:

- *prof. dr hab. Bogusław Makarski (UP Lublin)*
- *dr hab. inż. Marek Stankevič (UMCS Lublin)*
- *dr Sylwester Kowalik (UP Lublin)*
- *dr Anna Stępniowska (UP Lublin)*
- *mgr inż. Dariusz Wolski (UP Lublin)*
- *mgr Mateusz Gortat (UP Lublin)*
- *mgr Małgorzata Sęczkowska (UMCS Lublin)*
- *lek. med. Łukasz Pastuszak (Centralny Szpital Kliniczny MSWiA Warszawa)*

PROJEKT OKŁADKI:

Robert Giza

REDAKCJA I OPRACOWANIE GRAFICZNE:

Kamil Korzeniowski

WYDAWCA:

Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin

ADRES DO KORESPONDENCJI:

Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
ssnp@poczta.pl

SPIS TREŚCI

CHARAKTERYSTYKA GRZYBÓW Z RODZAJU FUSARIUM ORAZ NOWOCZESNE METODY ICH IDENTYFIKACJI – ADAM KUZDRALIŃSKI, ALEKSANDRA PATEREK, NATALIA GIERASIMIUK....4

SPOSOBY OGRANICZANIA AGROFAGÓW W ROLNICTWIE EKOLOGICZNYM – MARCELINA OLSZAK, IZABELA PODGÓRSKA.....19

ZAFAŁSZOWANIA ŻYWNOŚCI I SKAŻENIA PATOGENAMI ORAZ SPOSOBY ICH WYKRYWANIA TECHNIKAMI MOLEKULARNYMI – MICHAŁ PAŁYS 31

WIRULENCJA ORAZ CYKL ŻYCIOWY WIRUSA HIV. CHARAKTERYSTYKA ZESPOŁU NABYTEGO UPOŚLEDZENIA ODPORNOŚCI ORAZ TERAPII ANTYRETROWIRUSOWEJ – KATARZYNA SZEWCZUK-KARPISZ 38

WŁAŚCIWOŚCI PROZDROWOTNE WYBRANYCH GATUNKÓW GRZYBÓW Z RODZAJU PLEUROTUS ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH – MACIEJ FRANT, MATEUSZ PIĘT, ADRIAN ZAJĄC, MICHAŁ CHOJNACKI 46

ZASADY PRZYJMOWANIA PRAC DO DRUKU 56

TABLE OF CONTENTS

CHARACTERISTICS OF FUNGI OF THE GENUS FUSARIUM AND MODERN METHODS OF THEIR IDENTIFICATION – ADAM KUZDRALIŃSKI, ALEKSANDRA PATEREK, NATALIA GIERASIMIUK..4

THE REDUCING METHODS OF PESTS IN ORGANIC FARMING – MARCELINA OLSZAK, IZABELA PODGÓRSKA 19

FOOD ADULTERATION AND CONTAMINATION OF PATHOGENS AND METHODS FOR THEIR DETECTION BY MOLECULAR TECHNIQUES – MICHAŁ PAŁYS 31

VIRULENCE AND LIFE CYCLE OF HIV VIRUS. CHARACTERISTICS OF ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME AND ANTIRETROVIRAL THERAPY – KATARZYNA SZEWCZUK-KARPISZ 38

PRO-HEALTH PROPERTIES OF SELECTED PLEUROTUS GENUS FUNGI WITH PARTICULAR REGARD TO ANTICANCER PROPERTIES – MACIEJ FRANT, MATEUSZ PIĘT, ADRIAN ZAJĄC, MICHAŁ CHOJNACKI 46

ACCEPTANCE RULES OF ARTICLE TO PUBLISH 56

Odpowiedzialność za treść i materiały graficzne ponoszą autorzy.

NaukiPrzyrodnicze

Numer 2 (4) 2014
Strony 4-18

ADAM KUZDRALIŃSKI

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności
i Biotechnologii
Katedra Biotechnologii, Żywienia
Człowieka i Towaroznawstwa Żywności
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin
E-mail: adamkuzdralinski@gmail.com

NATALIA GIERASIMIUK

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności
i Biotechnologii
Katedra Biotechnologii, Żywienia
Człowieka i Towaroznawstwa Żywności
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

ALEKSANDRA PATEREK

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności
i Biotechnologii
Katedra Biotechnologii, Żywienia
Człowieka i Towaroznawstwa Żywności
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

CHARAKTERYSTYKA GRZYBÓW Z RODZAJU *FUSARIUM* ORAZ NOWOCZESNE METODY ICH IDENTYFIKACJI

STRESZCZENIE

Grzyby z rodzaju *Fusarium* należą do jednych z groźniejszych patogenów zbóż, obejmując swym występowaniem różne strefy klimatyczne. Wiele badań wskazuje na ich negatywny wpływ zarówno na rośliny, zwierzęta, jak i na ludzi. Grzyby z rodzaju *Fusarium,* poprzez produkcję mykotoksyn, powodują obniżenie plonu roślin oraz jego parametrów jakościowych. U zwierząt i ludzi natomiast mogą wywoływać choroby układu pokarmowego, rozrodczego i odpornościowego, ponadto mogą wykazywać silne działanie rakotwórcze. W kontekście ww. informacji niezwykle ważna staje się jednoznaczna identyfikacja tych patogennych organizmów. Coraz większego znaczenia nabierają metody oparte o analizy molekularne. Występowanie w genomie, m.in. genów warunkujących biosyntezę zearalenonu PKS13 i PKS4 oraz trichotecenów Tri7 i Tri5, odgrywa istotną rolę w procesie identyfikacji molekularnej. Nie bez znaczenia pozostaje również prawidłowa izolacja materiału genetycznego, którą można wykonać za

pomocą różnych metod, m.in. tradycyjnych metod biochemicznych (np. z zastosowaniem CTAB), metod komercyjnych z użyciem kolumienek krzemionkowych, jak również metod niekonwencjonalnych: zastosowanie mikrofal, głębokiego mrożenia, lizy alkalicznej oraz lizy termicznej.

Słowa kluczowe: Fusarium, izolacja genomowego DNA, mykotoksyny, PCR, identyfikacja molekularna.

CHARACTERISTICS OF FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* AND MODERN METHODS OF THEIR IDENTIFICATION

SUMMARY

Fungi of the genus *Fusarium* are one of more dangerous cereal pathogens, occurring in different climatic zones. Many studies have shown their negative impact on plants, animals and humans. Fungi of the genus *Fusarium,* by producing mycotoxins, cause the reduction of yields and its quality parameters. Fungi of the genus *Fusarium* in animals and humans, can cause diseases of the digestive, reproductive and immune systems, also they can be a strong carcinogen. In the context of the above information Fan unequivocal identification of these pathogenic organisms is extremely important. Methods based on molecular analysis are becoming more important. The presence in the genome of genes involved in the biosynthesis of zearalenone PKS13 and PKS4 and trichothecenes Tri5 and Tri7, plays an important role in the molecular identification. Not without significance is also proper isolation of genetic material, which can be done using traditional biochemical methods (for example using CTAB), commercial methods using silica membranes mini columns, as well as non-conventional methods: applicability of microwave, deep freeze, alkaline and thermal lysis.

Keywords: Fusarium, isolation of genomic DNA, mycotoxins, PCR, molecular identification.

WSTĘP

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są bardzo zróżnicowaną grupą mikroorganizmów powszechnie występujących w przyrodzie. Zasiedlają przede wszystkim glebę, ale można je również spotkać na nadziemnych i podziemnych organach drzew, krzewów i roślin zielonych (KWAŚNA I WSPÓŁAUT., 1991; PLĄSKOWSKA, 2010). Większość z nich to gatunki patogenne, stanowiące poważne zagrożenie dla roślin uprawnych na całym świecie, zwłaszcza zbóż. Powodują szereg chorób, z których najpowszechniejszymi są: fuzarioza kłosów, fuzarioza nasion oraz brązowa zgnilizna korzeni. Te z kolei wpływają na obniżenie plonu oraz pogorszenie jakości ziarna. Spośród 5 znanych klas mykotoksyn: aflatoksyny, ochratoksyny, zearalenon, fumonizyny i trichotoceny (typ A i B), *Fusarium* spp. są w stanie wytwarzać metabolity należące do ostatnich przedstawionych 3 grup (PACKA, 2005). Toksyczne metabolity wtórne mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na zdrowie ludzi i zwierząt. Pośrednio, dostając się do łańcucha pokarmo-

wego, poprzez spożywanie mięsa i mleka zwierząt skarmianych produktami skażonymi oraz bezpośrednio, przez porażone patogenami produkty pochodzenia roślinnego (EDWARDS I WSPÓŁAUT., 2002). Droga pokarmowa nie jest jedyną, przez którą mykotoksyny dostają sie do organizmu. Możliwy jest również kontakt ze skórą oraz inhalacja (ZAIN, 2011). Mykotoksyny produkowane przez Fusarium wykazują działanie nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, immunotoksyczne, mutagenne, teratogenne oraz kancerogenne (BENNET I WSPAUT., 2003; ZAIN, 2011).

Do metod wykorzystywanych przy identyfikacji mikrogrzybów można zaliczyć techniki tradycyjne oparte na obserwacjach mikro- i makroskopowych grzybów, biochemiczne techniki diagnostyczne oraz metody biologii molekularnej (AWAD I WSPLAUT., 2011; FRĄC, 2012). Tradycyjne metody diagnostyki oparte są o cechy fenotypowe tych organizmów. Polegają na obserwacjach podczas makrohodowli: ocenie intensywności wzrostu, morfologii kolonii i innych cech makroskopowych; mikrohodowli: ocena kształtu, wielkości i typu zarodnikowania. Dzięki temu możliwe jest określenie fazy rozwojowej grzyba oraz liczbę i rodzaj struktur morfologicznych, które pozwalają na wstępne zaklasyfikowania grzyba do jednostki taksonomicznej (WATANABE, 2010; FRĄC, 2012). Przy identyfikacji grzybów strzępkowych stosuje się również metody oparte o reakcje biochemiczne, w ramach których przeprowadza się testy pozwalające na ocenę efektywności biochemicznej, tj. fermentacji, asymilacji oraz aktywności enzymatycznej. W trakcie analizy identyfikacyjnej stosuje się także podłoża różnicujące zawierające m.in. azotan potasu, siarczan amonu, mocznik, pepton i asparaginę. Pozwalają one na ocenę asymilacji azotu przez grzyby. Dodatkowo wykorzystuje się również zdolność do asymilowania węgla z podstawowych cukrów: glukozy, galaktozy, laktozy, maltozy i sacharozy (DYNOWSKA I WSPAUT., 2011; FRĄC, 2012)

Jednakże zastosowanie konwencjonalnych metod wymaga dużej wiedzy oraz doświadczenia w pracy z grzybami z rodzaju *Fusarium*, dlatego identyfikacja ta jest niezwykle trudna i wiąże się z częstymi błędami popełnianymi w trakcie prowadzenia oznaczeń (BRUNS I WSPÓŁAUT., 1991; O'DONNELL I WSPÓŁAUT., 2008). Stosowanie technik molekularnych, w porównaniu z konwencjonalnymi, jest natomiast o wiele dokładniejszą, tańszą i mniej pracochłonną metodą, która w sposób jednoznaczny określa przynależność do gatunku (MCCARTNEY I WSPÓŁAUT., 2003).

TAKSONOMIA, CHARAKTERYSTYKA MORFOLOGICZNA ORAZ WYSTĘPOWANIE GRZYBÓW Z RODZAJU *FUSARIUM*

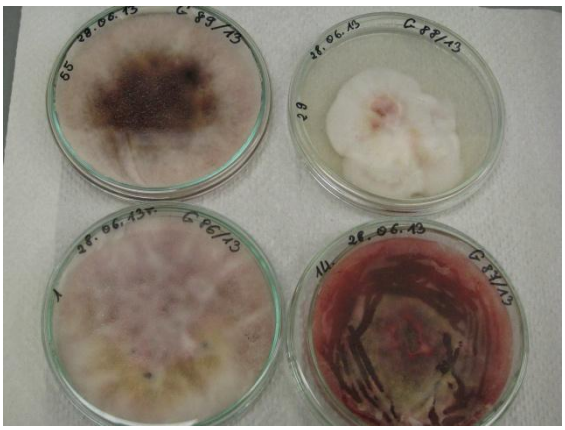
Rodzaj *Fusarium,* jako jednostka taksonomiczna, utworzony został przez Link'a w 1809 roku. Charakterystyczne cechy zarodników konidialnych: kajakowate i bananowate kształty były podstawowym kryterium odróżniającym grzyby z rodzaju *Fusarium* od innych rodzajów grzybów (SUCHORZYŃSKA I WSPÓŁAUT., 2009). Ze względu na to, iż nie były znane ich stadia doskonałe (płciowe), dawniej klasyfikowane były do gromady grzybów niedoskonałych (*Deuteromycetes*) (PLĄSKOWSKA, 2010).

Jak wskazuje najnowsza systematyka [*Index Fungorum* (www. indexfungorum.org)] grzyby z rodzaju *Fusarium* klasyfikuje się jako:

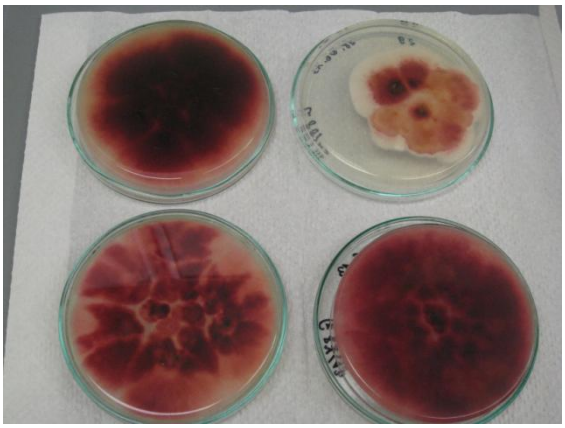
Królestwo: *Fungi*
Gromada: *Ascomycota*
Podgromada: *Pezizomycotina*
Klasa: *Sordariomycetes*

Podklasa: *Hypocreomycetidae*
Rząd: *Hypocreales*
Rodzina: *Nectriaceae*

Fusarium spp. tworzą rozległą, watowatą grzybnię powietrzną (rys.1a). Przy podłożu często przybierają odcienie różu, fioletu lub żółci (rys.1b) (BARNETT I WSPÓŁAUT., 2006).



Rys. 1a. Fusarium sporotrichioides- awers kolonii.



Rys. 1b. Fusarium sporotrichioides- rewers kolonii.

Grzyby te posiadają formy teleomorficzne - stadia płciowe. Wytwarzają nitkowatą, wielokomórkową plechę komórkową w postaci strzępek. Konidia, nieruchliwe zarodniki bezpłciowe, tworzą się na drodze podziałów mitotycznych na wyspecjalizowanych komórkach strzępek grzybni - konidioforach. Trzonki konidialne hialinowe są proste, krótkie lub wydłużone, nierozgałęzione lub rozgałęzione, nieregularnie lub regularnie ułożone. Mogą występować pojedynczo lub w sporodochiach (MARCINKOWSKA, 2012).

Wyróżnia się komórki konidiotwórcze krótkie, smoczkowate lub wydłużone. Posiadają zwykle wyraźny kołnierzyk oraz jeden punkt konidiotwórczy. Tylko nieliczne gatunki tworzą więcej punktów konidiotwórczych. W stadium bezpłciowym mogą tworzyć 4 typy zarodników:

a) makrokonidia- najczęściej tworzą się w sporodochiach - są sierpowate, wrzecionowate, 3 - 5 przegrodowe; posiadają zaostrzoną komórkę szczytową oraz komórkę w formie "stopki" przy podstawie
b) mikrokonidia- powstają z fialid mikronematycznych trzonków konidialnych pojedynczo wyrastających z grzybni, zebrane są w główki lub łańcuszki- owalne, jajowate do gruszkowatych, jedno - lub dwukomórkowe
c) chlamydospory- przetrwalnikowe, wegetatywne; powstają z komórek starszych konidiów oraz strzępek grzybni
d) mezokonidia- suche, cylindryczne, lancetowate, nie sierpowate i bez stopki; wytwarzane na mikronematycznych trzonkach w grzybni powietrznej tylko przez niektóre gatunki, w tym *Fusarium sporotrichioides* (MARCINKOWSKA, 2012).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są szeroko rozpowszechnionymi mikroorganizmami występującymi w glebie. Szczególnie upodobały sobie ziemie żyzne, urodzajne, rzadko zaś środowiska leśne (SUCHORZYŃSKA I WSPÓŁAUT., 2009). Występują również na roślinach, zarówno częściach podziemnych jak i nadziemnych, szczątkach roślinnych oraz innych substratach organicznych. Najkorzystniejsze warunki rozwoju grzybów z rodzaju *Fusarium* występują w klimacie umiarkowanym, jednak można je spotkać również w regionach tropikalnych, pustynnych oraz arktycznych (NELSON I WSPÓŁAUT., 1994).

CHOROBY ZBÓŻ POWODOWANE PRZEZ GRZYBY Z RODZAJU *FUSARIUM*

Grzyby z rodzaju *Fusarium* stanowią liczną grupę patogenów zbóż, warzyw, roślin bobowatych, ozdobnych i leśnych. Wiele gatunków grzybów należących do rodzaju *Fusarium* to polifagi, porażające wiele gatunków roślin, które mogą należeć do różnych grup taksonomicznych. Co więcej, grzyby te mogą atakować każdą część rośliny we wszystkich fazach rozwojowych (CHAMPEIL I WSPÓŁAUT., 2004).

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są najczęstszą przyczyną chorób zbóż, które określa się mianem „fuzariozy zbóż" (KWAŚNA I WSPÓŁAUT., 1991). Do chorób tego typu zaliczyć można m.in. zgorzel siewek przed- i powschodową, zgniliznę korzeni, zgorzel podstawy źdźbła lub łodyg, fuzariozę liści, fuzariozę kłosów zbóż i kolb kukurydzy oraz fuzaryjne więdnięcie (MAŃKA, 1989; BOTTALICO I WSPÓŁAUT., 2002). Nasilenie fuzariozy zależy w głównej mierze od warunków pogodowych panujących w okresie kwitnienia pszenicy i na początku mlecznej dojrzałości ziarna, gdyż wtedy najczęściej następuje infekcja (LENC I WSPÓŁAUT., 2011). Czynnikami sprzyjającymi są: wysoka wilgotność powietrza (powyżej 85-90%), wiatr, częste opady deszczu, temperatura (ok. 20°C) oraz uprawiane odmiany (CHAMPEIL I WSPÓŁAUT., 2004). Grzyby z rodzaju *Fusarium* występują w dużym nasileniu w latach ciepłych i wilgotnych, o wysokich sumach opadów. Najczęściej rozprzestrzeniają się za pomocą zarodników konidialnych (makrokonidiów), które produkowane są na resztkach pożniwnych oraz na obumarłych dolnych liściach i wraz z kroplami deszczu przenoszone są z części dolnych rośliny na górne (min. kłosy). Mogą też tworzyć perytecja, z których po opadach deszczu wydostają się askospory trafiające bezpośrednio na kłosy przy pomocy wiatru (WIWART, 2001; BOTTALICO I WSPÓŁAUT., 2002; ROSSI, 2002). Fuzarioza ma zasięg ogólnoświatowy, ale jej nasilenie zależne jest od regionu. Wyższe ryzyko epidemicznego nasilenia występuje w klimacie kontynentalnym, szczególnie przy dużym udziale kukurydzy w płodozmianie i siewie bezpośrednim, połączonym ze zminimalizowaną uprawą (SADOWSKI I WSPÓŁAUT., 2010).

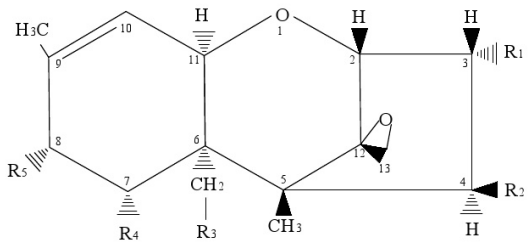
Coraz większego znaczenia nabiera ostatnio fuzarioza kłosów (FHB, ang. *fusarium head blight*), gdyż jest to groźna i coraz powszechniej występująca choroba zbóż. Fuzarioza kłosów zbóż powoduje nie tylko obniżenie plonu, ale także pogorszenie jakości ziarna, które przeznaczone może być zarówno na materiał siewny, jak i na konsumpcję. Efektem tej choroby może być pomarszczenie ziarniaków, obniżenie ich masy oraz zmniejszenie siły kiełkowania. W zainfekowanych ziarniakach następuje niszczenie ziaren skrobi i białek zapasowych oraz pogorszenie się ich wartości wypiekowej (CHAMPEIL I WSPÓŁAUT., 2004; SADOWSKI I WSPÓŁAUT., 2010). Fuzarioza kłosów zbóż powodowana jest przez grzyby rodzaju *Fusarium* produkujące mykotoksyny- głównie deoksyniwalenol (DON) oraz diacetoksyscirpenol (DAS). Zanieczyszczone nimi ziarno jest szkodliwe dla ludzi i zwierząt (TOMCZAK I WSPÓŁAUT., 2000).

Mykotoksyny to zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne, wykazujące silne działanie fitotoksyczne, zootoksyczne oraz antybiotyczne (KWAŚNA I WSPÓŁAUT., 1991). Toksyny te zaliczane są do grupy toksyn niespecyficznych, czyli wykazujących szerokie spektrum działania w stosunku do różnych gatunków roślin, zwierząt, grzybów i mikroorganizmów. Ich rolą jest uszkadzanie tkanek gospodarza, co umożliwia udostępnienie substancji odżywczych. W konsekwencji dochodzi do śmierci komórek gospodarza, co powoduje przerwanie odpowiedzi obronnej komórek organi-

zmu, a to pozwala na łatwe rozprzestrzenianie się patogenu (PACKA, 2005).

Do metabolitów wytwarzanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp., wykazujących działanie fitotoksyczne zaliczamy m.in.: barwniki naftazarynowe; kwasy: furiozowy, dehydrofuzariowy i pikolinowy; enniatyny; fuzariny; kulmoriny; moniliformina, trichoteceny oraz fumonizyny (DESJARDINS I WSPÓŁAUT., 2007).

Najlepiej poznanymi mykotoksynami fuzaryjnymi są trichoteceny. Stanowią one rodzinę blisko spokrewnionych seskwiterpenoidów. Podstawą strukturalną jest 15-węglowy pierścień zawierający podwójne wiązanie między węglami C-9 i C-10 oraz grupę epoksydową między węglami C-12 i C-13 (rys. 2). Synteza trichotecenów ma miejsce w szlaku biochemicznym, który rozpoczyna się od związku o nazwie trichodien i charakteryzuje się duża liczbą etapów, wśród których należy wymienić: utlenianie, cyklizację oraz estryfikację (MORETTI I SUSCA, 2010). Wiele genów związanych z produkcją trichotecenów zostało zidentyfikowanych w fragmencie DNA o długości 26-kpz, który określono mianem klastra *Tri*. Do najważniejszych genów zlokalizowanych w tym klastrze zaliczamy: *Tri5, Tri7, Tri3, Tri13* (SUCHORZYŃSKA I WSPÓŁAUT., 2009).



Rys. 2. Podstawowa struktura chemiczna trichotecenów.

Gen *Tri5* koduje enzym syntezę trichodienu, która katalizuje cyklizację i izomeryzację fosforanu furanylu do trichodienu. Jest to pierwszy gen biorący udział w biosyntezie trichotecenów, dlatego bez niego niemożliwa jest synteza tych metabolitów. Produkt genu Tri7 bierze udział w acylacji niwalenolu (NIV) i jego przemianie do 4-acetyloniwalenolu (4-ANIV). Grzyby pozbawione tego genu nie są w stanie syntetyzować NIV i 4-ANIV. Enzym kodowany przez gen Tri13 przeprowadza konwersję deoksyniwalenonu (DON) w NIV. Razem z genem Tri7 kontrolują typ powstającej mykotoksyny. Natomiast gen Tri3 odpowiada za tworzenie pochodnych DON (NICHOLSON I WSPÓŁAUT., 2004; DESJARDIN I WSPÓLAUT., 2007; MORETTI I WSPÓŁAUT., 2010).

Trichoteceny podzielono ze względu na ich budowę chemiczną na cztery grupy:
1) grupa A- metabolity posiadające łańcuch boczny lub inną grupę niż ketonowa w pozycji C-8. Zaliczamy do nich: toksynę T-2 i HT-2, diacetoksyscirpenol (DAS), monoacetoksyscirpenol (MAS), neosolaniol (NEO),
2) grupa B- metabolity posiadające grupę ketonową w pozycji C-8. Należą do nich: niwalenol (NIV), deoksyniwalenol (DON), 3-acetylodeoksyniwalenol (3-AcDON), 15-acetylodeoksyniwalenol (15-AcDON), fuzarenon-X (FUS-X),
3) grupa C- metabolity posiadające dodatkową grupę epoksydową między C-7 i C-8 lub C-9 i C-10, np. krotocyna,
4) grupa D- metabolity posiadające makrocykliczny pierścień między C-4 i C-15 np. werukaryny, rorydyny, satratoksyny. *Fusarium* spp. wytwarzają trichoteceny z grup A i B (PACKA, 2005; MONTVILLE I WSPÓŁAUT., 2008).

Największą toksyczność spośród trichotecenów wykazują związki zaliczane do grupy A. Bezpośredni kontakt z przedstawicielami tej grupy powoduje zapalenia skóry, natomiast spożycie żywności lub pasz zanieczyszczonych tymi toksynami objawia się wymiotami, nudnościami i biegunką (BENNET I WSPÓŁAUT., 2003).

Stopień patogeniczności względem roślin oraz spektrum produkowanych mykotoksyn wybranych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* przedstawia tabela 1.

GATUNEK	CHARAKTERYSTYKA	MIKTOKSYNY
Fusarium graminearum	silna patogeniczność silna toksynotwórczość	deoksyniwalenol, niwalenol, 3-acetylodeoksyniwalenol, 15-acetylodeoksyniwalenol, fuzarenon-X
Fusarium culmorum	silna patogeniczność silna toksynotwórczość	deoksyniwalenol, 3-acetylodeoksyniwalenol, 15-acetylodeoksyniwalenol, niwalenol
Fusarium poae	słaba patogeniczność silna toksynotwórczość	niwalenol, diacetoksyscirpenol, monoacetoksyscirpenol, fuzarenon-X
Fusarium sporotrichioides	słaba patogeniczność silna toksynotwórczość	toksyna T-2, toksyna HT-2, T-2 triol, neosolaniol, monoacetoksyscirpenol, diacetoksyscirpenol

Tab. 1. Wybrane toksynotwórcze gatunki Fusarium, siła patogeniczności i toksynotwórczości oraz produkowane przez nie mykotoksyny (BOTTALICO I WSPÓŁAUT., 2002).

Inną dobrze poznaną mykotoksyną fuzaryjną jest zearalenon. Związek ten powstaje w szlaku octanowo- polimalonianowym z udziałem genów kodujących enzymy określane jako syntazy poliketydowe (PKSs). Wśród PKSs najważniejszymi są PKS4 i PKS13 (DESJARDINS I WSPÓŁAUT., 2007).

Obecność genu PKS4 świadczy o zdolności do syntezy zearalenonu przez izolaty *Fusarium* spp. Gen ten koduje enzym, który reguluje ekspresję innego genu, tj. PKS13 niezbędnego w syntezie zearalenonu. Z kolei białko kodowane przez PKS13 bierze udział w końcowym etapie formowania zearalenonu (DESJARDINS I WSPÓŁAUT., 2007). Mykotoksyna ta zawiera pierścień rezorcynowy oraz makrocykliczny pierścień laktonowy. Swoim układem przypomina hormony sterydowe, dlatego bywa klasyfikowany, jako niesteroidowy mykoestrogen (CHEŁKOWSKI, 2010; KOTOWICZ, 2014). Poprzez podobieństwo do 17-estradiolu, żeńskiego hormonu wytwarzanego przez jajniki, wywołuje tzw. syndrom estrogeniczny (BENNET I WSPÓŁAUT., 2003). Stwierdzono, że u świń objawia się poronieniami oraz przedwczesnymi porodami, u innych zwierząt problemami reprodukcyjnymi (ROZE I WSPÓŁAUT., 2013).

W świetle badań właściwie zaplanowane zabiegi agrotechniczne uznawane są za najważniejszy czynnik zapobiegający rozwojowi grzybowych patogenów. Dobór odmian mniej podatnych na zakażenia przez patogeny odgrywa kluczową rolę w uprawach ekologicznych (LENC I WSPÓŁAUT., 2011). Niemniej istotna jest też chemiczna ochrona roślin, która polega m.in. na stosowaniu fungicydów bezpośrednio zwalczających patogeny oraz herbicydów, które pośrednio mogą wpływać na ograniczenie rozwoju chorób grzybowych. Zastosowanie fungicydów zmniejsza porażenie kłosów przez *Fusarium* spp., lecz nie zawsze redukuje w

znaczący sposób zawartości mykotoksyn w ziarnie (LENC I WSPÓŁAUT., 2011). Najbardziej widoczne efekty obserwowane są, gdy zabiegi mają miejsce w okresie kwitnienia (czyli krótko po infekcji) (PARRY I WSPÓŁAUT., 1995).

METODY IDENTYFIKACJI GRZYBÓW Z RODZAJU *FUSARIUM*

Identyfikację grzybów z rodzaju *Fusarium* przeprowadza się najczęściej za pomocą metody konwencjonalnej polegającej na obserwacji makroskopowej i mikroskopowej (PLĄSKOWSKA, 2010).

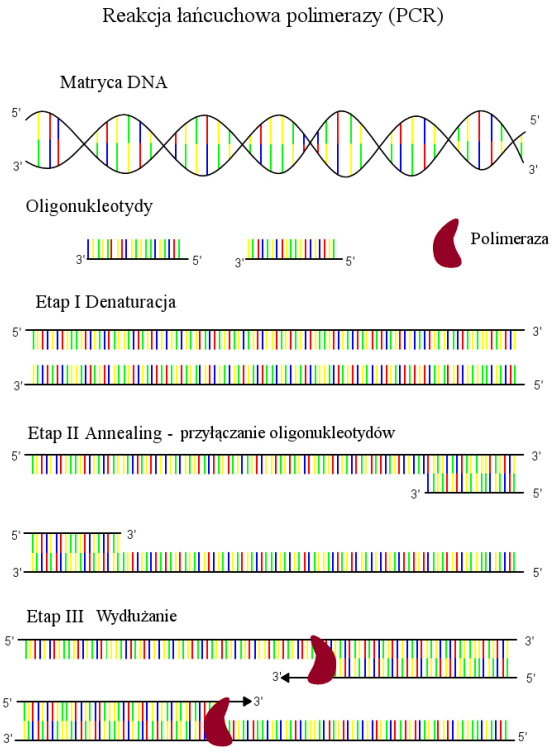
Podczas identyfikacji do gatunku największe znaczenie mają następujące elementy morfologiczne:
- grzybnia - głównie występowanie i kolor grzybni powietrznej, tempo wzrostu po 10 dniach, kolor kolonii od spodu i kolor sporodochiów w masie;
- makrokonidia - rozmiar, kształt, liczba przegród, kształt komórki podstawowej i szczytowej;
- mikrokonidia - obecność lub brak, kształt, sposób tworzenia (w łańcuszkach lub fałszywych główkach);
- chlamydospory- czy są obecne czy nie, ich ułożenie i struktura powierzchni;
- konidiofory (trzonki) z monofialidami lub z polifialidami;
- sporodochia- kolor, zwykle są różowobrunatne lub czerwonobrunatne, mogą być też niebieskozielone (*F. solani*) i kremowe (*F. oxysporum* i *F. solani*). Na sztucznych podłożach tworzą się przeważnie pionnoty – śluzowate lub galaretowate sporodochia;
- sklerocja- kremowe, ciemne (*F. oxysporum*) (BOOTH, 1971; KWAŚNA I WSPÓŁAUT., 1991; SCHILLING I WSPÓŁAUT., 1996; MARCINKOWSKA, 2012).

Molekularne metody identyfikacji grzybów coraz częściej zastępują metody klasyczne. Nowoczesne metody identyfikacji, funkcjonujące w oparciu o amplifikację DNA, charakteryzuje szybkość wykonywania oznaczeń, wysoka niezawodność w porównaniu z metodami klasycznymi, niski koszt oraz wysoka czułość (SCHILLING I WSPÓŁAUT., 1996; PAVELEY I WSPÓŁAUT., 1997).

Większość metod molekularnych funkcjonuje w oparciu o identyfikację unikalnej sekwencji DNA lub RNA. Każdy organizm żywy posiada charakterystyczne dla siebie sekwencje DNA, których identyfikacja umożliwia oznaczenie do gatunku (MORETTI I WSPÓŁAUT., 2010).

Do molekularnych metod identyfikacji zaliczamy łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction,* PCR). Podstawowym atutem stosowania tej techniki jest szybkie i sprawne wykrywanie m.in. w próbkach żywności tych gatunków grzybów, które charakteryzują się powolnym wzrostem (MORETTI I WSPÓŁAUT., 2010). Rozwój tej techniki nastąpił dzięki zastosowaniu polimerazy *Taq*. Enzym ten uzyskano w wyniku ekstrakcji z bakterii *Thermus aquaticus*. Charakterystyczną jego cechą jest stabilność w wysokich temperaturach (SUCHORZYŃSKA I WSPÓŁAUT., 2009).

Mechanizm reakcji PCR polega na specyficznym powielaniu *in vitro* sekwencji określonych odcinków DNA oraz RNA przepisanego na cDNA (MORETTI I WSPÓŁAUT., 2010). Amplifikacja zachodzi dzięki zastosowaniu dwóch oligonukleotydów komplementarnych do docelowej sekwencji. Reakcja PCR obejmuje powtarzające się cyklicznie etapy: denaturacji, wiązania starterów oraz elongacji (rys. 3). W każdym cyklu dochodzi do podwojenia wyjściowej ilości matrycy (SŁOMSKI, 2004).



Rys. 3. Schemat reakcji PCR.

W chwili obecnej istnieje wiele odmian techniki PCR. Do identyfikacji gatunków z rodzaju *Fusarium* często stosuje się technikę Real-Time PCR, dzięki której możliwy jest pomiar ilości produktów w czasie rzeczywistym, po każdym cyklu reakcji np. dzięki zastosowaniu wyznakowanych sond DNA. Metoda ta jest uważana za najlepszą do detekcji grzybów syntetyzujących mykotoksyny, ale jest to metoda kosztowna (SUCHORZYŃSKA I WSPÓŁAUT., 2009).

Do identyfikacji gatunków grzybów mykotoksynotwórczych stosuje się również metodę PCR z użyciem starterów zaprojektowanych na podstawie odcinka DNA odpowiadającego za biosyntezę mykotoksyn (głównie DON i NIV, 3A- DON i 15A-DON) (STENGLEIN, 2009).

Inną, stosowaną do identyfikacji metodą jest RT-PCR (ang. *Reverse-Transcription - PCR*). W metodzie tej wykorzystuje się enzym odwrotną transkryptazę do przepisania sekwencji RNA na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Technika ta pozwala dodatkowo stwierdzić czy dany izolat grzyba wykazuje aktywność mykotoksynotwórczą - jeśli geny biosyntezy mykotoksyn ulegają transkrypcji, wówczas z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że dany metabolit jest produkowany (EDWARDS I WSPÓŁAUT., 2002; SUCHORZYŃSKA I WSPÓŁAUT., 2009).

Inną technologią wykorzystywaną do identyfikacji grzybów są mikromacierze. Obecnie technika ta bazuje na sekwencji EF-1α, co pozwala na szybką i skuteczną identyfikację gatunków *Fusarium* produkujących moniliforminę i trichoteceny (STENGLEIN, 2009).

Do identyfikacji grzybów z rodzaju *Fusarium* stosowane są również metody RAPD PCR, southern blott i hybrydyzacja. RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*) to technika, którą możemy stosować bez obaw do odróżniania nawet blisko spokrewnionych i bardzo podobnych do siebie gatunków (NICHOLSON I WSPÓŁAUT., 1998).

METODY EKSTRAKCJI DNA

Izolacja kolumienkowa

Do izolacji DNA z grzybów najczęściej stosowane są komercyjne zestawy (rys. 4), w skład których wchodzą minikolumny krzemionkowe. Zgodnie z zapewnieniami producentów pozwalają one na szybką izolację całkowitego komórkowego DNA- genomowego, mitochondrialnego oraz chloroplastowego.

Kolumienkowe zestawy do izolacji (np. zestaw GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit firmy EU-Rx) dostarczane są wraz z procedurą izolacji DNA. Pierwszym etapem izolacji

jest dokładne rozdrobnienie próbki, a następnie rozpuszczenie pozostałości struktur tkankowych i komórkowych w buforze zapewniającym integralność i ilościowy odzysk DNA. Kolejnym etapem jest zastosowanie proteinazy K. Celem tego etapu jest całkowita degradacja białka komórkowego, w tym nukleaz i białka wiążącego DNA. W dalszej kolejności za pomocą buforu oraz etanolu przeprowadzane jest selektywne wiązanie DNA do złoża. Po krótkim wirowaniu prowadzi się wymywanie zanieczyszczeń z kolumny. Kolejne dwa etapy płukania skutecznie usuwają śladowe ilości zanieczyszczeń pozostających na złożu. Ostatnim etapem jest zastosowanie buforu nisko solnego, np. zawierającego Tris-HCl, TE lub wodę destylowaną. W tym etapie celem jest elucja oczyszczonego DNA. Uzyskany w ten sposób DNA nadaje się do bezpośredniego użytku. Producenci zapewniają, iż wyizolowany kwas nukleinowy nie zawiera zanieczyszczeń m.in. takich jak: RNA, białka, lipidy, barwniki, detergenty, organiczne inhibitory enzymów, związki buforowe, sole, kationy dwuwartościowe (ANONIMUS 1, 2008).

Izolacja z użyciem rozpuszczalników organicznych

Najpopularniejszą metodą izolacji DNA z grzybów z użyciem rozpuszczalników organicznych jest metoda z wykorzystaniem bromku haksadecylotrimetyloamoniowego (CTAB). Metoda ta została opracowana przez Murray'a i Thompsona w 1980 r. Obecnie istnieje wiele odmian tej metody, wśród których na uwagę zasługuje metoda Möller'a (MÖLLER I WSPÓŁAUT., 1992).

Procedura ekstrakcji DNA zgodnie z wytycznymi Möller'a (1992) rozpoczyna się od homogenizacji grzybni w moździerzu z użyciem ciekłego azotu bądź piasku. Etap ten ma na celu fizyczne zniszczenie struktury tkankowej i komórkowej badanego materiału biologicznego. Kolejnym etapem jest zastosowanie proteinazy K oraz inkubacja w temperaturze 55-65ºC. Celem tego etapu jest degradacja białek (komórkowych oraz nukleaz) z próbki. Następny etap polega na zastosowaniu buforu CTAB. W dalszej kolejności, dzięki zastosowaniu mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego (w stosunku 24:1) ekstrahowany jest DNA. Końcowym etapem jest dwukrotne przemycie osadu 70% etanolem (MÖLLER I WSPÓŁAUT., 1992, KARHIKEYAN I WSPÓŁAUT., 2010). Metoda ta może być wykorzystywana do oczyszczania DNA z materiału roślinnego i jest przydatna szczególnie do usuwania polisacharydów i zanieczyszczeń polifenolowych. Wymieniona procedura jest szeroko wykorzystywana w technikach biologii molekularnej (SŁOMSKI, 2004).

Inne metody izolacji DNA

Coraz większym zainteresowaniem cieszą się pozostałe metody izolacji DNA, których główną cechą jest szybkość oraz prostota wykonania. O ich rosnącej popularności świadczą coraz liczniej ukazujące się publikacje. Głównym powodem badań prowadzonych w tym kierunku są wysokie koszty używania komercyjnych zestawów do izolacji materiału genetycznego (KULIK I WSPÓŁAUT., 2005).

Przykładem nowej metody izolacji DNA z grzybów z rodzaju *Fusarium* jest izolacja z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego. Izolację tego typu można przeprowadzić z grzybni (KULIK I WSPÓŁAUT.,., 2005), jak również z zarodników (FERREIRA I WSPÓŁAUT., 1996).

Procedura izolacji DNA z grzybni rozpoczyna się od zebrania grzybni za pomocą skalpela do probówek Eppendorf i jej wysuszenia. Pierwszym etapem izolacji jest poddanie grzybni napromieniowaniu o mocy 1000W w kuchence mikrofalowej przez 10 minut. Następnym etapem jest dodanie do materiału 100 µl buforu TE. W następnej kolejności całość należy wymieszać na worteksie oraz zwirować przez 5 minut w 14000 r.p.m. Ostatnim etapem jest przeniesienie su-

pernatantu do sterylnej probówki (KULIK I WSPÓŁAUT., 2005).

Procedura metody izolacji DNA z zarodników wymaga zebrania zarodników do probówek Eppendorf (500µl) i wysuszenia. Pierwszym etapem izolacji jest poddanie zarodników promieniowaniu o mocy 700W w kuchence mikrofalowej przez 5 minut. Następnie do każdej probówki należy dodać 30µl buforu TE. Kolejnym etapem jest worteksowanie oraz wirowanie przez 1-5minut w 14000 r.p.m. Ostatni etap polega na przeniesieniu uzyskanego supernatantu do nowej, sterylnej probówki (FERREIRA I WSPÓŁAUT., 1996).

Tą metodę izolacji DNA wykorzystywano w badaniach grzybów z rodzaju *Fusarium* (KULIK I WSPÓŁAUT., 2005) oraz *Neurospora crassa* (FERREIRA I WSPÓŁAUT., 1996), jak również bakterii *Pseudomonas syringae* (SCHAAD I WSPÓŁAUT., 1997).

Kolejnym sposobem izolacji DNA jest izolacja z wydłużeniem etapu wstępnej denaturacji. Zastosowanie tej metody wiąże się z zebraniem zarodników grzybów oraz dodaniem ich bezpośrednio do mieszaniny PCR. W reakcji PCR ważnym punktem jest wydłużenie etapu wstępnej denaturacji do 15minut w 94°C (NIELSEN, 2007).

Innym przykładem jest metoda izolacji DNA z użyciem NaOH. Materiał biologiczny umieszcza się w 1,5ml probówce Eppendorf oraz dodaje 300µl NaOH (50mM). Kolejnym etapem jest worteksowanie przez 10 sekund. Następnie probówki umieszcza się w termomikserze na czas 5 minut w 95°C. Po tym etapie należy dodać 30µl Tris-HCl (1M, pH=8). W dalszej kolejności następuje wirowanie przez 2 minuty w 13000 r.p.m. Ostatnim etapem jest przeniesienie supernatantu do nowej probówki (CHENG I WSPÓŁAUT., 2010).

Kolejnym sposobem izolacji DNA jest wykorzystanie głębokiego mrożenia. Procedura izolacji wiąże się z zebraniem zarodników poprzez dodanie 3ml sterylnej wody do probówki z izolatem i delikatne zeskrobanie zarodników, a następnie przeniesienie ich do probówki z sterylną wodą. Tak przygotowane zarodniki należy zamrozić w ciekłym azocie lub poddać mrożeniu przez 10 minut w 80°C. Metodę tą wykorzystywano do ekstrakcji DNA z *Magnaporthe grisea, Neurospora crassa, Fusarium moniliforme, Aspergillus nidulans* (XU I WSPÓŁAUT., 1995).

Porównanie metod izolacji DNA ze względu na ekonomikę, stopień trudności, efektywność przedstawia tabela 2. Dodatkowo w tabeli przedstawiono stosowane urządzenia, listę odczynników oraz ich potencjalną toksyczność.

METODA IZOLACJI	CZAS WYKONANIA	KOSZT IZOLACJI 1 PRÓBKI	STOPIEŃ TRUDNOŚCI	EFEKTYWNOŚĆ	LISTA STOSOWANYCH ODCZYNNIKÓW, STOSOWANIE ODCZYNNIKÓW SZKODLIWYCH	STOSOWANE URZĄDZENIA	ŹRÓDŁO
Kolumienkowa (Bead-Bead Micro Gravity)	40min-2h	5,5zł-25zł	trudna	wysoka	LSU, K1, W1G, W2, bufor E, proteinaza K, r-r T Szkodliwe - tak	urządzenie Beadbeater, mikrowirówka, inkubator, worteks	A*

METODA IZOLACJI (C.D.)	CZAS WYKONANIA (C.D.)	KOSZT IZOLACJI 1 PRÓBKI (C.D.)	STOPIEŃ TRUDNOŚCI (C.D.)	EFEKTYWNOŚĆ (C.D.)	LISTA STOSOWANYCH ODCZYNNIKÓW, STOSOWANIE ODCZYNNIKÓW SZKODLIWYCH (C.D.)	STOSOWANE URZĄDZENIA (C.D.)	ŹRÓDŁO (C.D.)
Biochemiczna (np. CTAB)	1h- 3h	ok. 80gr	trudna	średnia	CTAB, 2-merkaptoetanol, chloroform, oktanol, etanol, bufor TE Szkodliwe - tak	młynek, wirówka, inkubator	STĘPIEŃ I WSPÓŁAUT., 2008
Metody z wykorzystaniem mikrofal	10-12min	5-17gr	łatwa	niska	Bufor TE Szkodliwe- nie	kuchenka mikrofalowa, wirówka, worteks	KULIK I WSPÓŁAUT., 2005
Metoda z wykorzystaniem głębokiego mrożenia	6min	30gr	łatwa	niska	Ciekły azot Szkodliwe- nie	-	B*
Metoda biochemiczna z zastosowaniem szklanych kulek	140min	ok.50 gr	trudna	wysoka	NaCl, Tris-HCl, SDS, fenol, chloroform, alkohol izoamylowy, etanol. RNaza odczynniki Szkodliwe - tak	worteks, wirówka, inkubator	PŁAZA I WSPÓŁAUT., 2004
Metoda zarodnikowa z zastosowaniem wydłużonego czasu wstępnej denaturacji	15min + 100min (reakcja PCR)	15gr	łatwa	niska	sterylna woda Szkodliwe - nie	termomikser	C*
Metoda z zastosowaniem lizy alkalicznej	20min	ok.10 gr	łatwa	wysoka	NaOH, Tris-HCl Szkodliwe - nie	termomikser, wirówka	CHENG I WSPÓŁAUT., 2010

A*- http://aabiot.home.pl/aabiop/PDF/Bead-Beat%20Micro%20Gravity_PL.pdf
B*- http://www.fgsc.net/fgn42/xu.html
C*- http://www.fgsc.net/aspergillus/spore-pcr2.pdf

Tab. 2. Zestawienie metod izolacji DNA z grzybów.

PODSUMOWANIE

Grzyby należą do organizmów o bardzo wysokim znaczeniu ekologicznym. Ich systematyka jest jednak nadal bardzo problematyczna, a prawidłowe określenie przynależności rodzajowej i gatunkowej jest często bardzo utrudnione. Z pomocą, obok tradycyjnych metod hodowlanych oraz biochemicznych, idą metody oparte o badania na poziomie molekularnym. Izolacja DNA jest niezbędnym etapem poprzedzającym proces identyfikacji molekularnej organizmów. Niezwykle ważne jest, dlatego uzyskanie materiału o odpowiedniej czystości, jakości i ilości pozwalającej na precyzyjną i jednoznaczną analizę. Spośród przedstawionych metod w powyższym artykule, szczególna uwagę zwracają procedury izolacji DNA, takie jak izolacja z wykorzystaniem mikrofal oraz głębokiego mrożenia. Ich podstawowym wyróżnikiem jest szybkość i prostota wykonania. Metody te umożliwiają izolację materiału genetycznego z wielu próbek jednocześnie. Izolacja nie wymaga stosowania środków szkodliwych, dzięki czemu jest ona bezpieczna dla użytkowników. Koszty przeprowadzenia izolacji są bardzo niskie. Wiąże się to z brakiem konieczności zakupu specjalistycznego sprzętu laboratoryjnego oraz trudno dostępnych i kosztownych odczynników. Ponadto procedura ekstrakcji nie wymaga przeprowadzenia czasochłonnych etapów jak inkubacja czy wirowanie, w związku, z czym czas przeprowadzenia izolacji jest stosunkowo krótki.

LITERATURA

ANONIMUS 1. 2008. *GeneMATRIX Plant and Fungi DNA Purification Kit*. EURx.

AWAD M.F., KRAUME M. 2011. *Mycoflora of activated sludge with MBRs in Berlin, Germany*. World Acad. Sci. Eng. Technol. 78, 566-570.

BARNETT H.L., HUNTER B.B. 2006. *Illustrated genera of imperfect fungi*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

BENNET J.W., KLICH M. 2003. *Mycotoxins*. Clin. Microbiol.Rev. 16, 497-516.

BOOTH C. 1971. *The Genus Fusarium*. Comm. Myc. Inst., Kew, Surr., England.

BOTTALICO A., PERRONE G. 2002. *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe*. European Journal of Plant Pathology 108, 611-624.

BRUNS T.D., WHITE T.J., TAYLOR J.W. 1991. *Fungal molecular systematics*. Ann. Rev. Ecol. Syst. 22, 525-564.

CHAMPEIL A., DORÉ T., FOURBET J.F. 2004. *Fusarium head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by Fusarium in wheat grains.* Plant Sci. 166, 1389-1415.

CHEŁKOWSKI J. 2010. *Skrypt. Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze, mikotoksykozy*. IGR PAN, Poznań.

CHENG TH., CHEN SP., LU TC., CHEN WC., SHER JS., SHIEN YS. 2010. *Optimal DNA Extraction from Bucal Swab Samples.* J. Med. Sci. 30(4), 149-154.

DESJARDINS A.E., PROCTOR R.H. 2007. *Molecular biology of Fusarium mycotoxins*. International Journal of Food Microbiology 119, 47–50.

DYNOWSKA M., EJDYS E. 2011. *Mikologia lekarska. Przygotowanie materiału badawczego I diagnostyka*. Wydawnictwo UWM, Olsztyn.

EDWARDS S.G., O' CALLAGHAN J., DOBSON D.W. 2002. *PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic*

fungi-review. Mycol. Res. 106, 1005-1025.

FERREIRA A.V.B, GLASS N.L. 1996. *PCR from fungal spores after microwave treatment.* Fungal Genetics Newsletter 43, 25- 26.

FRĄC M. 2012. *Ocena mikologiczna osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich oraz jego wpływ na różnorodność funkcjonalną mikroorganizmów glebowych*. Acta Agrophysica Monographiae 1, 1-142.

KARHIKEYAN V., PATHARAJAN S., PALANI P., SPADARO D., GULLINO M.L., GARIBALDI A. 2010. *Modified Simple for Efficient Fungal DNA Extraction Higly Suitable for PCR Based Molecular Methods.* Global Journal of Molecular Sciences 5(1), 37-42.

KOTOWICZ N.K., FRĄC M., LIPIEC *J. 2014. The Importance of Fusarium Fungi in Wheat Cultivation – Pathogenicity and Mycotoxins Production: A Review*. J. Animal &Plant Sciences 21(2), 3326-3343.

KULIK T., FORDOŃSKI G., PSZCZÓŁKOWSKA A., PŁODZIEŃ K., OLSZEWSKI J. 2005. *Identyfikacja wybranych gatunków grzybów z rodzaju Fusarium z nasion niektórych gatunków roślin uprawnych metodą tradycyjną i BIO-PCR*. Acta Agrobotanica Vol. 58, z. 2 – 2005 s. 33–54.

KWAŚNA H., CHEŁKOWSKI J., ZAJKOWSKI P. 1991. *Grzyby*. Tom XXII. Polska Akademia Nauk. Warszawa – Kraków.

LENC L., KUŚ J., SADOWSKI C. 2011. *Fusarium spp. on ears and kernels of winter wheat in different cropping systems*. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering 56(4). http://www.pimr.poznan.pl/biul/2011_4_LK.pdf

MAŃKA M. 1989. *Patogeniczność wybranych gatunków z rodzaju Fusarium dla siewek zbóż*. Rocz. AR w Poznaniu, Rozp. Nauk. 201.

MARCINKOWSKA J. 2012. *Oznaczanie rodzajów grzybów sensu lato ważnych w patologii.* Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.

MCCARTNEY H. A., FOSTER S.J., FRAAIJE B. A., WARD E. 2003. *Molecular diagnostics for fungal plant pathogens.* Pest Manag Sci. 59(2), 129-42.

MONTVILLE T.J., MATTHEWS K.R. 2008. *Food Microbiology: An Introduction*, 316-319.

MORETTI A., SUSCA A. 2010. *Fusarium [w:] Molecular detection of food borne pathogens.* Eds Dongiou Liu. Taylor & Francis Group, New York, USA, 577-588.

MÖLLER E.M, BAHNWEG G., SANDERMANN H., GEIGER H.H. 1992. *A simple and efficient protocol for isolation of hight molecular weight DANN from filamentous fungi bodies and infected plant tissue*. Nucleic. Acid. Res. 20, 6114-6116.

NELSON P.E., DIGNAMI M.C., ANAISSIE J. 1994. *Taxonomy, biology and clinical aspects of Fusarium species.* Clin. Microbiol. Rev. 7, 479-504.

NICHOLSON P., SIMPSON D.R., WESTON G, REZANOOR H.N., LEES A.K., PARRY D.W., JOYCE D. 1998. *Detection and quantification of Fusarium culmorum and Fusarium graminearum in cereals using PCR assays.* Physiological and Molecular Plant Pathology, 53(1), 17-37.

NICHOLSON P., SIMPSON D.R., WILSON A.H., CHANDLER E., THOMSETT M. 2004. *Detection and differentiation of trichothecene and enniatin-producing Fusarium species on small-grain cereals. Europ*. J. Plant Pathol. 110, 503–514.

NIELSEN J.B. 2007. *Spore-PCR on Aspergillus conidia.* http://www.fgsc.net/Aspergillus/spore-PCR2.pdf

O'DONNELL K., CIGELNIK E., CASPER H.H. 2008. *Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentificationof the Quornmycoprotein*

fungus as Fusarium venenatum. Fungal Genetics and Biology 22, 57-67.

PACKA D. 2005. *Fitotoksyczna aktywność patogenów nekrotroficznych z rodzaju Fusarium.* Disseratations and monographs 106. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego, 9-22.

PARRY D.W., JENKINSON P., MCLEOD L.1995. *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals: a review.* Plant Pathology 44(2), 207-238.

PAVELEY N.D., RENNIE W.J., REEVES J.C., WRAY M.W., SLAWSON D.D., CLARK W.S., COCKERELL V., MITCHELL A.G. 1997. *Cereal Seeds Health Strategies in the UK*. Seed Health Testing, 95-106.

PLĄSKOWSKA E. 2010. *Charakterystyka i taksonomia grzybów z rodzaju Fusarium.* Mikologia Lekarska 17(3), 172-176.

PŁAZA G.A., UPCHURCH R., BRIGMON R.L., WHITMAN W.B., ULFIG K. 2004. *Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification.* Polish Journal of Enviromental Studies 13(3), 315-318.

ROSSI V., PATTORI E., RAVANETTI A., GIOSUÈ, S. 2002. *Effect of constant and fluctuating temperature regimes on sporulation of four fungi causing head blight of wheat*. Journal of Plant Pathology 84(2), 95-105.

ROZE L.V., LINZ J.E. 2013. *Mycotoxins: Biosynthesis and Health Impacts* [w:] Encyclopedia of Biotechnology and in Agriculture and Food.

SADOWSKI CZ., LENC L.,KUŚ J. 2010. *Fusarium head blight and Fusarium spp. on grain of winter wheat, a mixture of cultivars and spelt grown in organic system*. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 55(4).http://www.pimr.poznan.pl/biul/2010_4_SLK.pdf

SCHAAD N.W., BONDE M.R., HATZILOUKAS E. 1997. *BIO-PCR: a highly sensitive technique for detecting seedborne fungi and bacteria*. Seed Health Testing, 159-164.

SCHILLING A.G., MÖLLER E.M., GEIGER H. H. 1996. *Polymerase Chain Reaction – Based, Assays for Species – Specific Detection of Fusarium culmorum, graminearum, and F. avenaceum*. Phytopathology 86(5), 515–523.

SŁOMSKI R. 2004. *Przykłady analiz DNA.* Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu 21, 79-90.

STENGLEIN S.A. 2009. *Fusarium poae: a pathogen that needs more attention.* Journal of Plant Pathology 91(1), 25-36.

STĘPIEŃ Ł., POPIEL D., KOCZYK G., CHEŁKOWSKI J. 2008. *Wheat-infecting Fusarium in Poland- their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay*. J. Appl. Genet. 49(4), 433-441.

SUCHORZYŃSKA M., MISIEWICZ A. 2009. *Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju Fusarium i ich wykrywanie technikami PCR.* Post. Mikrobiol. 48(3), 221-230.

TOMCZAK, M.; CHEŁKOWSKI, J.; KOSTECKI, M.; WIŚNIEWSKA, H.; GOLIŃSKI, P. 2000. *Fusarium head blight and its influence on quality of kernels used in food production.* Biuletyn Naukowy 8, 35-42.

WIWART M. 2001. *Analiza wartości hodowlanej mieszańców międzyodmianowych pszenżyta jarego ze szczególnym uwzględnieniem odporności na Fusarium spp*. Disseratations and monographs 38. Wyd. Uniwersytetu Warmińsko- Mazurskiego, 14-19.

WATANABE T. 2010. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species.* Third Edition, CRC Press Taylor & Francis Group.

XU, J.R., AND HAMER, J.E. 1995. *Assessment of Magnaporthe grisea mating type by spore-PCR.* Fungal Genet. Newsl. 40, 80.

ZAIN M.E. 2011. *Impact of mycotoxins on humas and animals*. Journal of Saudi Chemical Society. 15(2), 129-144.

NaukiPrzyrodnicze

Numer 2 (4) 2014
Strony 19-30

MARCELINA OLSZAK

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności
i Biotechnologii
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin
E-mail: marcela171@poczta.onet.pl

IZABELA PODGÓRSKA

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności
i Biotechnologii
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

SPOSOBY OGRANICZANIA AGROFAGÓW W ROLNICTWIE EKOLOGICZNYM

STRESZCZENIE

Ochrona roślin przed agrofagami jest bardzo ważnym elementem uprawy w rolnictwie ekologicznym. Dużą rolę przywiązuje się tu do działań profilaktycznych. Ich celem jest zapewnienie optymalnych warunków dla właściwego wzrostu i rozwoju roślin. W przypadku bezpośredniego zagrożenia dla plonów podejmowane są także działania interwencyjne. Powszechnie stosuje się metody agrotechniczne, mechaniczne i fizyczne, ale w ostatnich latach dużo uwagi poświęca się również biologicznej ochronie roślin. Wykorzystuje ona naturalnych wrogów i antagonistów szkodników i naśladuje mechanizmy zachodzące w środowisku. Na rynku pojawiło się wiele preparatów biologicznych zawierających zarówno mikroorganizmy (bakterie, wirusy, grzyby), jak i makroorganizmy (nicienie, owady). Do przeprowadzenia tych zabiegów wymagana jest duża wiedza o zależnościach występujących pomiędzy organizmami w ekosystemie. Jednak są to metody bezpieczne dla ludzi i środowiska, a odpowiednie ich przeprowadzenie daje dobre efekty.

Słowa kluczowe: rolnictwo ekologiczne, biologiczna ochrona roślin, biopreparaty, pożyteczne organizmy.

THE REDUCING METHODS OF PESTS IN ORGANIC FARMING

SUMMARY

Protecting plants from pests is a very important element of organic farming. Preventive measures play here an important role. Their aim is to provide optimal conditions for proper growth and development of cultivated plants. There are also taken interventions in the case of direct threat on crops. Commonly there are used agro-technical, mechanical and physical methods of crop protection, but recently many attention has been paid on the biological plant protection. Biological methods are using natural enemies and antagonists of pests mimicking the natural environmental mechanisms. There are many biological preparations on the market containing both the micro-organisms (bacteria, viruses, fungi) and macro-organisms (nematodes, insects). Performing these procedures requires high knowledge of relationships existing between organisms in the ecosystem. Despite the need for knowledge about the crop pests and their natural enemies, these methods are safe for humans and the environment, and their proper use gives a good results.

Keywords: organic farming, biological control, biopreparations, beneficial organisms.

WSTĘP

Rolnictwo ekologiczne jest systemem gospodarowania o zrównoważonej produkcji zwierzęcej oraz roślinnej w obrębie gospodarstwa. Proces produkcji opiera się na nieprzetworzonych technologicznie środkach pochodzenia biologicznego i mineralnego, odrzuca natomiast środki chemii rolnej, spożywczej oraz weterynaryjnej (ANONIM, 2011). Równorzędnie stosowane są synonimiczne nazwy: rolnictwo biologiczne i rolnictwo organiczne. W krajach członkowskich Unii Europejskiej przyjęto, że w każdym państwie wybierane jest jedno z określeń, które używa się zarówno w aktach prawnych, pracach naukowych, jak i w języku potocznym. W Polsce dla określenia tego sposobu gospodarowania wybrana została nazwa rolnictwo ekologiczne (SZYMONA, 2013).

Podstawowymi aktami prawnymi regulującymi produkcję ekologiczną w krajach Unii Europejskiej są: rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z 28 czerwca 2007r. ustanawiające ogólne cele i zasady produkcji ekologicznej i rozporządzenie Komisji (WE)nr 889/2008 z 5 września 2008r. określające szczegółowe zasady produkcji rolniczej. W Polsce system organizacyjny rolnictwa ekologicznego regulowany jest przez ustawę z dnia 25 czerwca 2009 r. o rolnictwie ekologicznym (Dz. U. nr 116 poz. 975) (ANONIM, 2011).

Zgodnie z definicją podstawowym celem rolnictwa ekologicznego jest wytwarzanie żywności o wysokich walorach odżywczych. Odbywa się to równolegle z poszanowaniem mechanizmów biologicznych, podtrzymywaniem i wzmacnianiem naturalnych cykli biologicznych

oraz utrzymaniem różnorodności biologicznej zarówno w obrębie gospodarstwa, jak i jego otoczeniu. Dla rolników prowadzących gospodarstwa ekologiczne ważne jest również podwyższanie żyzności gleby, zapewnienie dobrostanu zwierząt gospodarskich, wykorzystywanie zasobów odnawialnych oraz unikanie wszelkich form zanieczyszczenia środowiska naturalnego (DUDA-KRYNICKA I WSPÓŁAUT., 2010).

Przepisy regulujące rolnictwo ekologiczne wyróżniają cztery zasady, na których opiera się produkcja ekologiczna: odpowiednie zaprojektowanie i zarządzanie procesami biologicznymi – produkcja opiera się na wykorzystaniu wyłącznie zasobów naturalnych, wykluczone jest stosowanie organizmów genetycznie modyfikowanych i ich produktów; ograniczenie używania środków pochodzenia zewnętrznego przy produkcji – dozwolone są jedynie środki pochodzące z produkcji ekologicznej oraz substancje naturalne; ścisłe ograniczenie zastosowania środków pochodzących z syntezy chemicznej; dostosowywanie zasad produkcji ekologicznej do stanu sanitarnego, warunków klimatycznych i lokalnych oraz stopnia rozwoju zgodnie z obowiązującymi przepisami (ANONIM, 2011).

W produkcji roślinnej zabronione jest używanie nawozów sztucznych oraz pestycydów. Ochrona upraw przed szkodnikami opiera się głównie na wykorzystaniu mechanizmów naturalnie występujących w środowisku oraz poprzez zastosowanie określonych działań profilaktycznych (SZYMONA, 2013).

Celem pracy jest przedstawienie podstawowych metod ochrony roślin przed agrofagami stosowanych w rolnictwie ekologicznym, ze szczególnym uwzględnieniem metod biologicznych, które obecnie znalazły najszersze zastosowanie w tej dziedzinie.

METODY OCHRONY ROŚLIN W GOSPODARSTWIE EKOLOGICZNYM

W gospodarstwie ekologicznym przyjmuje się, że zagrożenie roślin ze strony czynników chorobotwórczych i szkodników jest niewielkie, jeśli uprawa odbywa się w zrównoważonych warunkach środowiska. Zakłada się, że właściwe siedlisko roślin uprawnych oraz jego wysoka bioróżnorodność ogranicza rozwój populacji organizmów szkodliwych do minimum. Powszechnie wiadomo jednak, że istnieje wiele czynników zmieniających warunki środowiskowe na korzystniejsze dla wzrostu i rozwoju szkodników. W celu ochrony upraw bardzo dużą rolę przywiązuje się do działań przygotowawczych oraz profilaktycznych. Zapewniają one odpowiednie warunki dla prawidłowego wzrostu roślin, po to aby czynniki chorobotwórcze i szkodniki nie rozwijały się w uprawach lub miały minimalny wpływ na plonowanie. Działania interwencyjne natomiast podejmowane są w ostateczności, kiedy występuje istotne i bezpośrednie zagrożenie dla plonów. Należy jednak pamiętać, że stosowane metody i środki muszą być zgodne z zasadami rolnictwa ekologicznego oraz przepisami prawnymi regulującymi dopuszczanie środków ochrony roślin do obrotu i stosowania (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2004).

W ograniczaniu występowania agrofagów w gospodarstwach ekologicznych wykorzystuje się: metody agrotechniczne, fizyczne, mechaniczne, biologiczne (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010).

METODY AGROTECHNICZNE

Metody agrotechniczne polegają na wykonywaniu zabiegów agrotechnicznych i higienicznych, które mają na celu poprawę stanu roślin uprawnych. Prawidłowe i terminowe ich stosowanie wpływa na poprawę warunków środowiskowych, a tym samym sprzyja wzrostowi i rozwojowi uprawianych roślin.

Metody te są stosunkowo bezpieczne dla środowiska, a także ludzi i zwierząt. Są najprostszymi i najtańszymi działaniami stosowanymi w ochronie roślin. Zgodnie z ich założeniem zapewnienie optymalnych warunków do wzrostu roślin uprawnych ograniczy występowanie niepożądanych organizmów (agrofagów) (ROSADA I WSPÓŁAUT., 2010; LOIVEKE I WSPÓŁAUT., 2009).

Najważniejszym elementem metod agrotechnicznych jest płodozmian. Polega on na odpowiednim doborze i następstwie roślin uprawianych na danym polu w określonym czasie. Właściwe prowadzenie płodozmianu gwarantuje podnoszenie żyzności gleby, a tym samym lepsze plony oraz ogranicza występowanie chwastów. W gospodarstwach ekologicznych zalecany jest co najmniej czteroletni płodozmian (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2004). Poprzez odpowiedni dobór roślin uwzględniający wzajemne relacje przedplonu i plonu następczego stwarza się lepsze warunki dla wzrostu i rozwoju roślin uprawnych, które są mniej narażone na patogeny, szkodniki oraz chwasty. Dzięki dobremu zaznajomieniu się z wymaganiami wilgotnościowymi i pokarmowymi uprawianych po sobie roślin, poznaniu najczęściej występujących chorób i szkodników charakterystycznych dla tych gatunków rolnik może przewidzieć wcześniej jakie szkodniki pojawią się w jego uprawie i opracować metody ich skutecznego zwalczania. Płodozmian ma również duże znaczenie w zwalczaniu szkodników glebowych. Poprzez wprowadzenie do upraw roślin niebędących żywicielami lub odmian odpornych pozbyć się można np. pasożytniczych nicieni roślin (PRUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2009).

Istotną rolę wykazuje wprowadzenie do upraw roślin odstraszających lub zwabiających szkodniki. Wykorzystywane są tu różne właściwości wprowadzanych roślin. Niektóre z nich odciągają szkodniki przez większą atrakcyjność w porównaniu z rośliną główną, są to tzw. rośliny pułapkowe. Inne wydzielają substancje chemiczne odstraszające lub osłabiające rozwój szkodników, nazywane jest to biochemiczną supresją szkodników. Inną metodą jest wysiew równocześnie z uprawą główną roślin zwabiających pożyteczne owady. Stwarzają one optymalne środowisko dla pożytecznych owadów, co skutkuje rozszerzeniem ich działalności również na rośliny główne (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2004). Ponadto na uprawę główną wpływ mają również sąsiadujące z nią miedze i stanowiska dzikiej roślinności. Stwierdzono, że ich obecność zwiększa ilość powiązań troficznych wśród pożytecznej entomofauny, co zwiększa jej liczebność i skład gatunkowy. Oprócz tego zastosowanie upraw współrzędnych często zmniejsza liczebność agrofagów poprzez: dezorientację zapachową i wizualną, tworzenie bariery fizycznej dla wędrujących owadów i zwabianie organizmów pożytecznych (WIECH I WSPÓŁAUT., 2009).

Zdrowie roślin uprawnych i ich ochrona przed szkodnikami w dużej mierze zależy od jakości materiału siewnego. Materiał zdrowy, wolny od czynników chorobotwórczych i zanieczyszczeń gwarantuje dobre wschody roślin i pomyślny przebieg ich dalszej wegetacji. Rośliny odpowiednio wykształcone i zdrowe są bardziej tolerancyjne wobec szkodników, chorób i wykazują większą konkurencyjność w stosunku do chwastów. W związku z tym, że wiele agrofagów przenoszone jest z materiałem siewnym, ważna

jest jego kontrola i ewentualna wymiana. Istotne jest, aby materiał nie był uszkodzony mechanicznie, gdyż sprzyja to wnikaniu szkodników i wtórnych czynników chorobotwórczych, a to stwarza ryzyko zawleczenia na pole nowych agrofagów (PRUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2009).

Termin oraz odpowiednie wykonanie siewu sprzyja osiągnięciu przez roślinę krytycznej fazy rozwojowej przed bądź po czasie zwiększonego pojawiania się niektórych patogenów i szkodników. Dużą rolę w ochronie roślin ma też żyzność gleby i prawidłowe jej nawożenie. Dla prawidłowego wzrostu i rozwoju rośliny zapewnić należy zrównoważone nawożenie zachowujące właściwe proporcje N : P : K oraz mikroelementów (ROSADA I WSPÓŁAUT., 2010).

Ponadto wykorzystywane jest wiele preparatów pochodzenia roślinnego, należą do nich: azadirachtyna – działa jako regulator wzrostu, zakłóca rozwój owadów będących w stadiach preimaginalnych; wosk pszczeli – stosowany do ochrony ran i cięć powstałych podczas przycinania roślin, żelatyna – insektycyd; hydrolizaty białkowe – posiadają działanie wabiące wobec niepożądanych owadów, lecytyna – blokuje kiełkowanie konidiów; oleje roślinne (np.: sosnowy, kminkowy, miętowy) – mają wpływ na fizjologię stosunków patogen-roślina; pyretrum *Chrysanthemum cinerariaefolium* – insektycyd; kwasyna *Quassia amara* – oddziałuje na układ nerwowy owadów; rotenon – selektywny insektycyd (CISIELSKA I WSPÓŁAUT., 2011).

METODY FIZYCZNE I MECHANICZNE

Metody mechaniczne oraz fizyczne wymagają nakładu pracy, ale również są wykorzystywane przy walce ze szkodnikami w gospodarstwach ekologicznych. Stosuje się je często na małych powierzchniach.

Jako przykłady metod mechanicznych chroniących rośliny uprawne przed szkodnikami podać można: ręczne zbieranie i niszczenie szkodników - jest to najprostsza metoda, wykorzystano ją w początkowych latach inwazji stonki ziemniaczanej w Polsce. Zalecane jest również usuwanie oraz niszczenie części lub całych porażonych roślin. Podczas przycinania drzew oraz krzewów owocowych na wiosnę zbierane są i usuwane złoża jaj, jak również tzw. „gniazda zimowe" szkodników (PRUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2012); przykrywanie roślin osłonami podczas okresu nasilonego pojawiania się szkodników – istotne jest tu, aby osłona zapewniała rozwijającym się roślinom utrzymanie odpowiedniej wilgotności, temperatury, ochrony przed wiatrem oraz światła. W gospodarstwie ekologicznym zastosowanie włókniny lub siatek o małych oczkach chroni młode rośliny między innymi przed: śmietką kapuścianką, bielinkiem kapustnikiem, śmietką cebulanka oraz połyśnicą marchwianką; stosowanie barier, pułapek oraz emitorów impulsów świetlnych lub elektrycznych – pułapki w ochronie roślin stosuje się zarówno do bezpośredniego zwalczania szkodników, jak również do monitorowania ich pojawienia. Ich skuteczność podnosi dobra znajomość życia oraz zwyczajów pojawiających się w uprawach szkodników. Najczęściej wykorzystuje się pułapki lepowe, np.: tablice barwne pokryte klejem unieruchamiającym zwabione owady, a także opaski zakładane na pniu drzew. Innym przekładem są przynęty pułapkowe polegające na wyłożeniu ulubionego pokarmu szkodnika oraz pułapki kołnierzowe na pniach drzew atrakcyjne dla

owadów ze względu na dobrą kryjówkę do zimowania (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2004).

Do metod fizycznych zalicza się: parowanie gleby – do dezynfekcji gleby wykorzystywana jest para wodna. Posiada ona właściwości odkażające, kiedy zostanie ogrzana do temperatur, w których następuje dezaktywacja enzymów i denaturacja białek. Obecnie w celu zmniejszenia liczby patogenów wystarczy ogrzanie gleby do temperatury 70 °C przez co najmniej 30 minut. Opracowane zostało kilka metod zależnych od rodzaju uprawy roślin. Jest to między innymi parowanie wgłębne, w którym para wodna wydostaje się przez perforowane rury oraz parowanie powierzchniowe, podczas którego glebę przykrywa się termoodporną folią, pod którą wprowadza się parę wodną (ŚLUSARSKI I WSPÓŁAUT., 2012); solaryzację – uprawy na kilka tygodni przykrywane są przezroczystą folią. Pod wpływem światła słonecznego w przykrytej glebie panuje wysoka temperatura, która niszczy chwasty, czynniki chorobotwórcze i szkodniki. Powszechnie stosuje się to w krajach południowych. W naszym klimacie wykorzystywana jest modyfikacja tej metody. W miesiącach letnich na 6-8 tygodni pokrywa się wilgotną i uprawioną glebę przezroczystą folią, aby pobudzić nasiona chwastów do kiełkowania. Po wschodzie folia jest zdejmowana, a chwasty niszczone termicznie lub płytką uprawką; zwalczanie termiczne – w sposób bezpośredni polega na działaniu otwartego płomienia na glebę (wypalarka płomieniowa), a pośrednio na wykorzystaniu promieniowania podczerwonego powstałego przez nagrzewanie płomieniem elementów grzejnych jak np.: siatka stalowa i płyta ceramiczna. Główną zaletą tej metody jest nie wzruszanie gleby, co utrudnia ponowne pojawianie się chwastów. Ponadto chwasty zwalczać można również wtedy, gdy ziemia jest wilgotna i ciężko jest usunąć je w sposób mechaniczny. Zwalczanie termiczne ma też kilka wad. Należą do nich: krótkotrwały efekt działania, zużywanie nieodnawialnych zasobów energii, emisja dwutlenku węgla do atmosfery oraz energochłonność; inne metody – miedzy innymi wydmuchiwanie chwastów z gleby sprężonym powietrzem, niszczenie chwastów za pomocą fal elektromagnetycznych, promieniowania mikrofalowego, prądu elektrycznego oraz przez wymrażanie (DOBRZAŃSKI I WSPÓŁAUT., 2008).

METODY BIOLOGICZNE

Biologiczne metody ochrony roślin są uważane za jedne z najstarszych, a jednocześnie najbezpieczniejszych metod walki ze szkodnikami. W ograniczaniu liczebności organizmów szkodliwych wykorzystują one ich naturalnych wrogów lub antagonistów (PRUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2012; PALL I WSPÓŁAUT., 2006). W metodzie tej ważne jest poznanie i zrozumienie roli pełnionej przez wiele gatunków pożytecznych organizmów naturalnie bytujących w środowisku. Zakłada się, że przez zachowanie wysokiej bioróżnorodności w ekosystemach możliwa będzie skuteczniejsza i naturalna ochrona przed szkodnikami. Za stosowaniem metod biologicznych przemawia wiele zalet, między innymi wysoka skuteczność w niektórych uprawach oraz selektywność. Poza tym możliwe jest przedłużenie działania czynników biologicznych w środowisku, dzięki zjawisku samoreprodukcji. Istnieje także wiele dowodów na ogromny potencjał rodzimych populacji organizmów pożytecznych, które naturalnie występują w środowisku rolniczym (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2011).

Do zwalczania szkodników wykorzystywane są zarówno żywe organizmy, jak i ich produkty. Ze względu na pochodzenie dzieli się je na naturalnie występujące w środowisku oraz pochodzące z innych terenów, które wprowadzone zostały do danego środowiska. Można do nich zaliczyć mikroorganizmy patogeniczne i konkurencyjne (grzyby, bakterie, pierwotniaki), wirusy oraz makroorganizmy (pasożytnicze owady, drapieżne owady i roztocza) (TOMALAK, 2010). W szerokim znaczeniu, do biologicznej ochrony roślin zalicza się także semiozwiązki (kairomony, allomony, feromony) modyfikujące aktywność niektórych szkodników oraz substancje pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, które odstraszają, zabijają lub zniechęcają szkodniki do żerowania, jak również uniemożliwiają ich rozwój (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010).

Jakość i bezpieczeństwo środka biologicznego na bazie mikroorganizmów stosowanego do ochrony roślin zależy od procedury jego wytwarzania. Priorytetem jest jak najwyższa czystość produktu końcowego. Pierwszym etapem w procesie produkcyjnym jest otrzymanie i przygotowanie czystej „kultury matecznej". W kolejnych etapach następuje jej rozmnożenie przez przenoszenie mikroorganizmów do kolejnych urządzeń hodowlanych zawierających coraz większe ilości sterylnej pożywki. Liczba etapów zależy od skali produkcji. Do hodowli i rozmnażania mikroorganizmów najczęściej używa się fermentorów, które zapewniają optymalne warunki środowiskowe, jałowość i możliwość kontrolowania procesu. Rozmnażanie w fermentorach trwa zazwyczaj kilka dni, w zależności od potrzeb hodowanego mikroorganizmu i kończy się, kiedy gęstość hodowli osiągnie pożądany poziom. W celu otrzymania preparatu wysokiej jakości niezbędne jest kontrolowanie czystości organizmu na każdym etapie przenoszenia i zwiększania objętości hodowli. W zależności od technologii wytwarzania biopreparatu otrzymaną w fermentorze biomasę mikroorganizmów odseparowuje się od płynu pohodowlanego lub całą hodowlę wykorzystuje się w dalszych etapach produkcji, czyli wymieszaniu zawiesiny bakteryjnej z jałowym nośnikiem. Dobór nośnika jest bardzo istotny, gdyż decyduje on o przeżywalności mikroorganizmów w preparacie handlowym oraz zapewnia efektywny sposób jego aplikacji. Przykładem nośnika może być pył węgla brunatnego lub torfu, talk oraz minerały ilaste. Zdecydowana większość biologicznych środków ochrony roślin produkowana jest w postaci preparatów stałych, liofilizowanych (suchych) i wilgotnych, tylko nieliczne mają postać płynną (MARTYNIUK, 2011).

Ograniczanie populacji szkodników w gospodarstwach ekologicznych może przebiegać na dwa sposoby: naturalne biologiczne zwalczanie – jest to wynik działania rodzimych gatunków organizmów pożytecznych na szkodniki zachodzący w środowisku naturalnym całkowicie bez udziału człowieka. Sukces tej metody w dużej mierze zależny jest od warunków środowiska (temperatura, wilgotność), które regulują dynamikę populacji organizmów pożytecznych. Przykładami organizmów naturalnie regulujących populacje szkodników są złotooki, biedronki oraz chrząszcze biegaczowate; stosowane biologiczne zwalczanie – przebiega z udziałem człowieka i obejmuje trzy strategie (klasyczne biologiczne zwalczanie – to import i uwolnienie do środowiska obcych wrogów naturalnych zwalczających obecne agrofagi. Głównym celem tego podejścia jest, aby wprowadzany czynnik biologiczny zadomowił się na nowym obszarze i stale utrzymywał populację szkodnika na niskim poziomie. Przykładem jest wprowadzenie ośca korówkowego w sadach jabłoniowych w Polsce zwalczającego bawełnicę korówkę; uzupełnianie – jest obecnie najczęściej stosowaną metodą. Jej istota polega na masowej hodowli i uwolnieniu do uprawy czynników biologicznych, które naturalnie występują w danym obszarze bądź są łatwo dostępne

w obrocie handlowym. Metoda ta ma działanie jedynie doraźne, organizm nie zadomawia się na chronionym obszarze. Duży sukces tej metody osiągnięto w ochronie upraw szklarniowych wykorzystując grzyby, bakterie i nicienie owadobójcze oraz entomofagi; konserwacyjne biologiczne zwalczanie – podejście to ma na celu ochronę rodzimych populacji wrogów naturalnych przez modyfikację środowiska rolniczego. Metoda konserwatywna nakazuje stworzenie odpowiednich warunków bytowych dla organizmów pożytecznych poprzez unikanie radykalnych metod uprawy, pasowe koszenie oraz prowadzenie upraw współrzędnych) (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2011).

Według innych kryteriów metody stosowania czynników biologicznych dzielą się na: metodę inokulacyjną – do środowiska wprowadzana jest niewielka ilość organizmów pożytecznych przy jednoczesnym założeniu, że rozmnożą się one na danym obszarze i będą w zadowalający sposób ograniczały populację argofaga przez długi okres (co najmniej kilku miesięcy); metodę zalewową – na dany obszar wprowadzana jest duża ilość organizmów pożytecznych, której celem jest natychmiastowe ograniczenie populacji szkodnika, a zadomowienie się w środowisku jest nieważne lub nawet niepożądane (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010).

ORGANIZMY WYKORZYSTYWANE W BIOLOGICZNEJ OCHRONIE ROŚLIN

Punktem wyjścia dla działania biopreparatów, zawierających żywe organizmy jest naturalne zjawisko drapieżnictwa i pasożytnictwa u niektórych gatunków owadów, nicieni i roztoczy oraz patogenicznych gatunków wirusów, grzybów i bakterii. Daje to wysoką selektywność preparatów zazwyczaj na jeden rodzaj patogena (ZYDLIK, 2008). Początkowo do biologicznej ochrony roślin wykorzystywane były pojedyncze gatunki. Obecnie asortyment środków biologicznych znacznie się rozszerzył. W 2000 roku w Europie do produkcji biopreparatów wykorzystywano ponad 120 gatunków (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010).

Przegląd grup organizmów stosowanych w biologicznej ochronie do walki ze szkodnikami roślin przedstawia się następująco: bakterie – ponad 90 gatunków bakterii wykazuje biologiczną aktywność przeciwko owadom. Głównie pochodzą one z rodzin Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae oraz Streptococcaceae. Jako pierwsza do produkcji biopreparatu wykorzystana była owadobójcza bakteria *Bacillus thuringiensis*. Gatunek ten jest powszechny w przyrodzie, szczególnie w glebie, na roślinach i w żywych oraz martwych owadach. W warunkach niesprzyjających wytwarza przetrwalniki jako formę spoczynkową. Jest stosowany w biologicznej ochronie ze względu na wytwarzanie białkowych parasporalnych kryształów w trakcie procesu tworzenia form przetrwalnikowych. Kryształy te po spożyciu przez owada rozpuszczają się i są modyfikowane do delta-endotoksyn. Toksyny odpowiedzialne są za powstawanie porów w błonie nabłonka jelita środkowego oraz dezorganizują komórkową równowagę jonową. Efektem tych przemian jest paraliż oraz zamieranie owada. Preparaty zawierające w swoim składzie *Bacillus thuringiensis* są wysoce selektywne i obecnie zawierają jedną lub kilka szczepów tej bakterii, co zwiększa zakres aktywności w stosunku do owadów docelowych. Poznano wiele organizmów wrażliwych na różne szczepy *Bacillus thuringiensis,* między innymi są to gąsiennice motyli, larwy chrząszczy, komarów i meszek, a także nicienie, płazińce, mszyce i pierwotniaki (SOBICZEWSKI, 2010; ZYDLIK, 2008, TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010). Kolejnymi przykładami bakterii są *Paenibacillus popilliae* oraz *Serratia entomophilia.* Pierwsza z

nich jest patogenem obligatoryjnym i w środowisku naturalnym towarzyszy larwom owadów z podrodzin Rutleinae, Melolonthinae oraz Dynastinae. W preparatach biologicznych stosowana jest do zwalczania chrząszczy z rodziny *Scarabaeidae.* Druga bakteria ogranicza populację chrząszcza *Costelytra zealandica* wywołując u niego tzw. chorobę bursztynową. *Serratia entomophilia* kolonizuje przewód pokarmowy owada, który w ciągu kilku dni przestaje żerować. Nazwa choroby pochodzi od wyglądu zewnętrznego porażonych owadów (SOBICZEWSKI, 2010; TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010); grzyby owadobójcze – największe znaczenie praktyczne w biologicznym zwalczaniu szkodników mają grzyby z rzędu *Hypocreales* należące do workowców oraz *Entomophthorales* należące do sprzężniaków. Warunkiem przetrwania obu tych grup jest infekowanie i uśmiercanie ich żywicieli. Do infekcji dochodzi, kiedy zarodnik grzyba znajdzie się w bezpośrednim kontakcie z ciałem żywiciela. Grzyby wykształciły szereg przystosowań w celu skutecznego atakowania owadów. Między innymi kontakt zarodników z powierzchnią kutikuli żywiciela jest łatwiejszy, dzięki warstwie śluzu powlekającego zarodniki, zbudowanego z substancji białkowych i cukrów. Proces kiełkowania ułatwia przylga (tzw. appresorium), która przytwierdza zarodnik do kutikuli. Na skutek mechanicznej i enzymatycznej aktywności kiełkującego zarodnika dochodzi do perforacji kutikuli owada i przenikania grzyba do wnętrza ciała żywiciela za pomocą strzępki infekcyjnej, przekształcającej się następnie w tzw. blastospory. Do śmierci owada dochodzi na skutek rozrastającej się wewnątrz ciała grzybni (tzw. mumifikacja) oraz działania toksyn grzybowych (AUGUSTYNIUK-KRAM, 2010). Bardzo często wykorzystywanym grzybem przy produkcji preparatów biologicznych jest *Beuveria bassiana.*, która w naturze poraża wiele gatunków owadów. Obecnie dostępne w handlu są szczepy grzyba zwalczające wszystkie stadia rozwojowe owadów. Działa na wciornastki, muchówki, przędziorka owocowca, chrząszcze, skoczki i niektóre gatunki mszyc (CIESIELSKA I WSPÓŁAUT., 2011). Inne przykłady pożytecznych grzybów to *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria brongiartii*, *Isaria fumosorosea*, *Pochonia chlamydosporia*, *Pythium oligandrum*, *Myrothecium verrucaria*, a także gatunki z rodzaju *Trichoderma*: *harzianum*, *asperellum*, *gamsii* (TOMALAK I WSPÓŁAUT., 2010; KURZAWIŃSKA I WSPÓŁAUT., 2007; CIESIELSKA I WSPÓŁAUT., 2011); drożdże – w zakresie biologicznej ochrony przebadano wiele przedstawicieli z różnych rodzajów, między innymi: *Rhodotorula*, *Pichia*, *Candida*, *Sporothrix*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*. Wyróżniono cztery podstawowe mechanizmy ograniczające populację szkodnika. Pierwszym z nich jest konkurowanie o przestrzeń i składniki pokarmowe. Odbywa się to poprzez zajęcie miejsca infekcji i wykorzystanie składników pokarmowych, aby zapobiec kiełkowaniu i infekcji grzybów fitopatogennych. Jako przykład służyć może *P. guilliermondii* oraz *C. oleophila* ograniczające rozprzestrzenianie się szarej pleśni na jabłoniach. Ponadto drożdże produkują substancje antybiotyczne o zbadanym już działaniu przeciwgrzybowym. Za przykłady posłużyć mogą: *P. fusiformata* wytwarzający kwas ustilaginowy aktywny na wiele gatunków drożdży i grzybów strzępkowych oraz *Sporothrix flocculosa* produkujący kwasy heptadekanoinowy oraz metyloheptadekanoinowy skutecznie redukujące kiełkowanie zarodników *B. cinerea* i *F. oxysporum.* Trzecim mechanizmem drożdży wykorzystywanym w ochronie biologicznej jest produkcja enzymów litycznych. Produkcję ß-1,3-glukanazy stwierdzono u *C. laurentii*, *Pichia. anomale* i *P. membranefaciens*, *R. glutinis*, *A. pullulans*, *Candida oleophila* i *C. guilliermondii,* jak również u *Tilletiopsis albescens* i *T. pallescens*. Chitynazę wytwarzają: *A. pullulans, T. albescens, T pallescens, Candida oleophila, C. guilliermondii* oraz *C. saitoana.* Drożdże zdolne są również do indukcji odporności roślin. Takie

właściwości odkryto np. u *Candida oleophila* oraz *A. pullulans.* Ponadto obserwacje po traktowaniu jabłek drożdżami *C. saitoama* wskazują na pojawianie się struktur obronnych w miejscach zranionej tkanki, co uzasadniono produkcją enzymów litycznych przez ten mikroorganizm (KORDOWSKA-WIATER, 2011; PALL I WSPÓŁAUT., 2006); wirusy – w rolnictwie ekologicznym jedynie wirusy z rodziny Baculoviridae mają zastosowanie w biologicznym zwalczaniu szkodników. Do rodziny tej należy jeden rodzaj – Baculovirus podzielony na: podgrupę A (wirusy poliedrozy jądrowej NP), B (wirusy granulozy GV) oraz C (wirusy pozbawione ciał okluzyjnych NOBV). Replikacja tych wirusów zachodzi wyłącznie w jądrze komórek gospodarza. Wirusy z rodziny Baculoviridae są pasożytami obligatoryjnymi owadów, nie mogą być więc hodowane na pożywkach, lecz jedynie w warunkach in vivo. Przykładem wykorzystywanym do produkcji biopreparatów jest CpGV – wirus granulozy *Cydia pomonella* oraz AoGV – granulowirus *Adoxophyes orana.* Pierwszy z nich wyizolowano z gąsienic owocówki jabłkóweczki, wytwarzany jest in vivo przez infekowanie, a następnie wytrząsanie martwych gąsienic. Drugi natomiast wyizolowany został z gąsienic zwójki siatkóweczki, a preparat uzyskiwany jest w wyniku zarażenia traktowanych hormonami młodych larw gospodarzy (CIESIELSKA I WSPÓŁAUT., 2011); nicienie – w uprawie ekologicznej zastosowanie mają pasożytnicze nicienie owadobójcze z rodziny Heterorhabditidae i Steinernematidae. W ich cyklu rozwojowym występują tzw. larwy inwazyjno-przetrwalnikowe, które w swoim przewodzie pokarmowym posiadają symbiotyczne bakterie *Photorhabdus* lub *Xenorhabdus*. Larwy inwazyjne w zależności od strategii wyczekują na żywiciela, jak jest w przypadku nicieni *Steinernema carpocapsae* i *S. scapterisci* lub aktywnie poszukują go w środowisku, np. *S. glaseri* i *Heterorhabditis bacteriophora.* Do wnętrza ciała owada dostają się przez naturalne otwory (odbyt, otwór gębowy, przetchlinki) lub przez rany powstałe na skutek mechanicznego uszkodzenia oskórka. W ciele gospodarza nicienie uwalniają symbiotyczne bakterie, które intensywnie się namnażają, a przez wydzielanie toksyn, egzoenzymów i lipopolisacharydów paraliżują system obronny owada. Gospodarz ginie w ciągu 1-2 dób. Opisywane nicienie mają szeroki zakres żywicieli, największą wrażliwość na infekcje wykazują gąsiennice motyli, larwy błonkówek roślinożernych i chrząszczy oraz niektóre muchówki (DZIĘGIELEWSKA I WSPÓŁAUT., 2010; DZIĘGIELEWSKA, 2008); owady pożyteczne – ze względu na sposób działania dzielą się one na dwie podstawowe grupy: naturalni wrogowie szkodników oraz owady zapylające. Pierwsza grupa obejmuje pasożyty oraz owady drapieżne. Pasożyty żywią się kosztem gospodarza, żyją na lub w ciele owada przez dłuższy okres czasu, nie powodują więc jego natychmiastowej śmierci. Przykładem jest osiec korówkowy rozwijający się w mszycy – bawełnicy korówce, szkodniku jabłoni. Owady drapieżne aktywnie szukają i zabijają swoje ofiary. Duże zastosowanie znalazły tu biedronkowate, biegaczowate i złotooki. Ważne jest, aby pasożyty i drapieżniki sprawnie poszukiwały swojego żywiciela i rozmnażały się w odpowiednim tempie w stosunku do zwalczanych szkodników. W rolnictwie ekologicznym dużą rolę odgrywają również owady zapylające. Podnoszą one plon i wpływają korzystnie na jego jakość. Ich przedstawicielami są głównie pszczoły (PRUSZYŃSKI, 2007; FIEDLER I WSPÓŁAUT., 2007).

Pomimo wielu zalet preparatów biologicznych ich udział w ogólnej ilości środków ochrony roślin jest stosunkowo niewielki. Między innymi wynika to z wysokiej selektywności biopreparatów, co wiąże się z koniecznością przeprowadzenia kilku zabiegów, czasem dosyć kosztownych. Preparaty biologiczne mają także duże wymagania, co do warunków ich stosowania, a efekt ich działania jest niejednokrotnie wolniejszy niż w

przypadku środków chemicznych. Ponadto, na skuteczność zwalczania szkodnika wpływa znajomość biologii organizmów wchodzących w skład preparatu, jak i zasady funkcjonowania ekosystemu w środowisku naturalnym (ZYDLIK, 2008).

PODSUMOWANIE

Metody wykorzystywane w rolnictwie ekologicznym są alternatywą dla metod chemicznych stosowanych w gospodarstwach konwencjonalnych. W przeciwieństwie do nich są całkowicie bezpieczne dla człowieka i dla środowiska, a skuteczność ich działania przy przemyślanym zastosowaniu jest porównywalna ze środkami chemicznymi. Szerokie zastosowanie ma biologiczna ochrona roślin. Przeprowadzane jest wiele badań nad biologią i wzajemnymi zależnościami organizmów naturalnie występujących w środowisku, dzięki czemu na rynku pojawia się coraz więcej skutecznych biopreparatów. Zawierają one w swoim składzie głównie makroorganizmy, ponieważ postęp w dziedzinie środków mikrobiologicznych hamują restrykcyjne przepisy rejestracyjne. Stosowanie metod biologicznych nie jest proste. Relacje pomiędzy środowiskiem a organizmami w nim występującymi są bardzo złożone i wprowadzenie biopreparatu wymaga przemyślanej strategii. Ważna jest, więc edukacja i ciągłe poszerzanie wiedzy przez rolników.

LITERATURA

ANONIM. 2011. *Plan Działań dla Żywności i Rolnictwa Ekologicznego w Polsce na lata 2011-2014.* Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Warszawa.

AUGUSTYNIUK-KRAM A. 2010. *Organizmy pożyteczne w strategiach biologicznego zwalczania – grzyby owadobójcze.* Studia Ecologiae et Bioethicae 8, 1, 45-54.

CIESIELSKA J., MALUSA E., SAS PASZT L. 2011. *Środki ochrony roślin stosowane w rolnictwie ekologicznym. Egzemplarz bezpłatny współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.* Kontrakt N. UDA-POIG. 01.03.01-10-109/08-00. Skierniewice.

DOBRZAŃSKI A., ADAMCZEWSKI K. 2008. *Niechemiczne metody zwalczania chwastów stan obecny i perspektywy.* Ekspertyza. AgEngPol 3-24.

DUDA-KRYNICKA M., JASKÓLECKI H. 2010. *Historia i perspektywy rozwoju rolnictwa ekologicznego w Polsce.* Problemy Ekologii 14, 2, 85-91.

DZIĘGIELEWSKA M. 2008. *Nicienie owadobójcze (Steinernematidae, Heterorhabditidae) jako naturalny czynnik oporu środowiska w warunkach miejskich.* Proceedings of ECOpole 2, 2, 433-437.

DZIĘGIELEWSKA M., ERLICHOWSKI T. 2010. *Wykorzystanie nicieni owadobójczych do biologicznego zwalczania szkodników glebowych w uprawach rolniczych.* Ziemniak Polski 4, 31-34.

FIEDLER A., TUELL J., ISAACS R., LANDIS D. 2007. *Attracting Beneficial Insects with Native Flowering Plants.* Extension Bulletin E-2973, 1-5.

KORDOWSKA-WIATER M. 2011. *Drożdże jako czynniki ochrony biologicznej roślin.* POST. Mikrobiol. 50, 2, 107-119.

KURZAWIŃSKA H., MAZUR S. 2007. *Przydatność Pythium oligandrum w ochronie*

ziemniaka przed niektórymi chorobami. Postępy w Ochronie Roślin 47, 4, 185-188.

LOIVEKE H., SEPP K. 2009. *Effect of agrotechnical methods on occurrence of diseases and productiveness of cereals in organic agriculture.* Agronomy Research 7 (Special issue I), 387-393.

MARTYNIUK S. 2011. *Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny.* POST. MIKROBIOL. 50, 4, 321-328.

PALL K. K., MCSPADDEN GARDENER B. 2006. *Biological Control of Plant Pathogens.* The Plant Health Instructor. 10.1094/PHI-A, 1117-02.

PRUSZYŃSKI G. 2007. *Ochrona entomofauny pożytecznej w integrowanych technologiach produkcji roślinnej.* Postępy w Ochronie Roślin 47,1, 103-107.

PRUSZYŃSKI S., BARTKOWSKI J., PRUSZYŃSKI G. 2012. *Integrowana ochrona roślin w zarysie.* CDR w Brwiowie, Poznań.

PRUSZYŃSKI S., WOLNY S. 2009. *Przewodnik Dobrej Praktyki Ochrony Roślin.* Inst. Ochr. Roślin-PIB, Poznań 90ss.

ROSADA J., DUBAS A., BUBNIEWICZ B. 2010. *Perspektywy agrotechnicznych metod ochrony roślin.* Postępy w Ochronie Roślin 50, 3, 1181-1187.

SOBICZEWSKI P. 2010. *Bakterie w ochronie roślin przed agrofagami – znaczenie gospodarcze i biotechnologia.* Postępy w Ochronie Roślin 50, 3, 1064-1073.

SZYMONA J. 2013. *Szanse i zagrożenia polskiego rolnictwa ekologicznego w perspektywie lat 2014-2020.* Kancelaria Senatu.

ŚLUSARSKI C., CISIELSKA J., MALUSA E., MESZKA B., SOBICZEWSKI P., 2012. *Odkażanie gleby parą wodną.* Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice. 1-10.

TOMALAK M. 2010. *Rynek biologicznych środków ochrony roślin i przepisy legislacyjne.* Postępy w Ochronie Roślin 50, 3, 1053-1063.

TOMALAK M., LIPA J. J., KRAWCZYK R., KORBAS M. 2004. *Uwarunkowania stosowania środków ochrony roślin w rolnictwie ekologicznym.* Wyd. Krajowe Centrum Rolnictwa Ekologicznego, Radom. 33.

TOMALAK M., SOSNOWSKA D., LIPA J.J. 2010. *Tendencje rozwoju metod biologicznych w ochronie roślin.* Postępy w Ochronie Roślin 50, 4, 1650-1660.

TOMALAK M., SOSNOWSKA D., LIPA J.J. 2011. *Czynniki biologiczne w integrowanej ochronie roślin.* Postępy w Ochronie Roślin 51, 4, 1776-1786.

WIECH K.,WNUK A., WOJCIECHOWICZ-ŻYTKO E., JANKOWSKA B., 2009. *Wpływ infrastruktury ekologicznej na agrofagi i organizmy pożyteczne w uprawach warzyw.* Postępy w Ochronie Roślin, 49, 3, 1124-1132.

ZYDLIK P. 2008. *Wykorzystanie preparatów pochodzenia naturalnego w zwalczaniu niektórych chorób roślin sadowniczych.* Nauka, Przyroda, Technologie 2, 1, 1-6.

NaukiPrzyrodnicze

Numer 2 (4) 2014
Strony 31-37

MICHAŁ PAŁYS

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności
Ul. Skromna 8, 20-704 Lublin
E-mail: michal.palys@gmail.com

ZAFAŁSZOWANIA ŻYWNOŚCI I SKAŻENIA PATOGENAMI ORAZ SPOSOBY ICH WYKRYWANIA TECHNIKAMI MOLEKULARNYMI

STRESZCZENIE

Żywność jest ważnym czynnikiem wpływającym na zdrowie człowieka. O jakości żywności decyduje jej skład chemiczny. Produkty żywnościowe spożywane przez człowieka nie powinny zawierać składników toksycznych, zanieczyszczeń środowiskowych oraz drobnoustrojów chorobotwórczych i pasożytów. Żywność nie powinna być też celowo fałszowana przez producentów. Fałszowanie produktów żywnościowych spowodowane jest chęcią obniżenia kosztów produkcji i uzyskania wyższych zysków. W artykule przedstawiono historię zafałszowań żywności i skażeń patogenami oraz wybrane techniki molekularne analizy produktów spożywczych.

Słowa kluczowe: zafałszowanie żywności, patogeny żywności, analiza żywności.

FOOD ADULTERATION AND CONTAMINATION OF PATHOGENS AND METHODS FOR THEIR DETECTION BY MOLECULAR TECHNIQUES

SUMMARY

Food is an important factor influencing human's health. Chemical composition of food determines its quality. Food products consumed by humans should not contain toxic components, environmental contami- nants, pathogenic microorganisms and parasites. Food should not be deliberately falsified by the manufacturers either. Adulteration of food products occurs due to the

desire to reduce manufacturing costs and achieve higher profits. The article presents the history of food adulteration and contamination by pathogens and selected molecular techniques for the analysis of food products.

Keywords: food adulteration, food pathogens, food analysis.

WSTĘP

Fałszowanie żywności polega m.in. na dodawaniu niedozwolonych substancji przedłużających trwałość lub zmieniających skład produktów konsumpcyjnych i obniżających ich wartość odżywczą. Fałszerstwem jest wyeliminowanie składnika lub zmniejszenie jednego albo kilku elementów decydujących o wartości odżywczej czy innej właściwości produktów spożywczych (GASPARSKA, 2009; SAWICKI, 2009 B). Fałszowaniem jest też dokonywanie zabiegów technologicznych bądź reklamowych ukrywających rzeczywisty skład artykułów spożywczych albo nadających im wygląd produktów właściwej jakości. Spotyka się również podawanie niezgodnych z rzeczywistością nazw, zawartości składników, terminów przydatności do spożycia (PRZETACZEK-RÓŻNOWSKA I WSPÓŁAUT., 2011). Zafałszowania dotyczą w większości produktów przemysłu spożywczego. Najczęściej zafałszowania występują w przetworach owocowych, mięsnych, rybnych, mlecznych, mącznych oraz w napojach alkoholowych, olejach i miodach (SAWICKI, 2009 B; TUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2008).

Niezależnie od zafałszowań przez producentów, żywność może być skażona różnymi chorobotwórczymi patogenami, takimi jak: *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria* sp., *Listeria monocytogenes, Enterobacter sakazaki, Staphylococcus aureus, Campylobacter* sp., *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Yersinia enterocolitica* (PALKA, 2007; STACHOWIAK, 2011, WALCZAK I WSPÓŁAUT., 2009).

Celem pracy jest zwrócenie szczególnie uwagi na różne możliwości fałszowania produktów żywnościowych z jednoczesnym wskazaniem sposobów wykrywania niektórych zafałszowań i identyfikacji patogenów w żywności.

CO NALEŻY ROZUMIEĆ POD POJĘCIEM BEZPIECZNEJ ŻYWNOŚCI?

Żywność o wysokich parametrach zdrowotnych, wywodzi się przeważnie z gospodarstw ekologicznych. Produkty pochodzące z upraw ekologicznych muszą spełniać wiele wymagań jakościowych i uzyskać przewidywany certyfikat. Certyfikowana żywność pochodzi z obszarów o małym skażeniu środowiska, z zastosowaniem nawozów organicznych, bez stosowania niedozwolonych środków ochrony roślin. Ponadto przygotowanie żywności ekologicznej powinno odbywać się przy doborze odpowiednich technologii oraz regularnej i ścisłej kontroli. Żywność pochodząca z gospodarstw ekologicznych powinna być zdrowsza niż konwencjonalna i charakteryzować się wyższą zawartością substancji odżywczych takich jak witaminy, cukry, aminokwasy, kwasy fenolowe (SZCZUCKA, 2009).

Zdrowa żywność to ważny element dla zdrowia ludzkiego. Powinna być naturalna, jak najmniej przetworzona i zawierać w swym składzie dużo witamin i mikroelementów. W naszej diecie duży udział powinny stanowić owoce i warzywa. To co jemy ma ogromy wpływ na nasze zdrowie i funkcjonowanie orga-

nizmu. Prawidłowe i racjonalne żywienie należą do najważniejszych czynników środowiskowych człowieka determinujących jego prawidłowy rozwój fizyczny i dobre samopoczucie psychiczne. Zdrowa żywność wpływa też na właściwą wydajność w pracy fizycznej i umysłowej. Nieprawidłowe żywienie wywołuje dużo poważnych schorzeń, np. niedokrwistość, przewlekłe zaparcia i inne (FIEDUREK, 2007).

HISTORIA ZAFAŁSZOWAŃ ŻYWNOŚCI

Pogląd i przekonanie, że dawniej żywność była naturalna i zdrowsza niż obecnie nie jest prawdą. Od początków istnienia handlu, zawsze spotykano się z fałszowaniem żywności. Żywność fałszowano różnymi sposobami w celu uzyskania większych dochodów pieniężnych kosztem gorszej jakości produktów (TUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2008). Podrabiano różnego rodzaju żywność na każdym etapie produkcji i zbytu. Fałszowania żywności dokonywali wytwórcy w trakcie produkcji albo sprzedawcy na straganie, którzy przerabiali produkty przed sprzedażą konsumentowi (SAWICKI, 2009 B).

W Indiach w 2000 r. p.n.e. drogie tłuszcze roślinne, takie jak oliwa z oliwek, doprawiano innymi tańszymi tłuszczami roślinnymi. W starożytnej Grecji i Rzymie masowo fałszowano wino poprzez rozwadniane lub dodawanie wina gorszej jakości. Ponadto wina słabej jakości farbowano i aromatyzowano celem polepszenia smaku i wyglądu. Wodą rozcieńczano również mleko i inne napoje pitne. Fałszowanie żywności notowano też w pierwszych wiekach naszej ery. Dodawano kredę i paszę bydlęcą do mąki przeznaczonej do wypieku chleba, zaś do pieprzu jagody jałowca oraz podrabiano inne cenne azjatyckie przyprawy kuchenne i zioła. Rozwadniano wina i inne alkohole (SAWICKI, 2009 B).

W średniowieczu pojawiały się nowe sposoby fałszowania produktów żywnościowych. Dodawano różne wypełniacze, aby zwiększyć objętość i masę produktu. Brytyjczycy do kawy dodawali cykorię, zaś do herbaty suszone liście ziół. Zioła mieszano z orzeszkami ziemnymi, muszlami i zbożem. Mąkę wypiekową łączono z grochem, fasolą i innymi odpadami roślinnymi a nawet chwastami. Wina i inne alkohole rozcieńczano wodą. W piwie często chmiel zastępowano gorzkimi ziołami, zaś jęczmień tańszym owsem lub żytem (SAWICKI, 2009 B; TUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2008).

Fałszerstwa w żywności przybrały jeszcze większy rozmiar w czasach nowożytnych. Rozwój nauk chemicznych zrodził nowe pomysły na podrabianie żywności. Do produktów dodawano wiele szkodliwych i trujących dodatków chemicznych w celu zaostrzenia aromatu i smaku. Do żywności zaczęto stosować toksyczne dodatki, takie jak farby, aby uzyskać kolor oraz wyrazisty smak. W celu uwydatnienia koloru, herbatę barwiono siarczanem żelaza, do serów dodawano tlenek ołowiu, a korniszony doprawiano związkami miedzi. Do papryki i tabaki dodawano sole ołowiu. Ocet mieszano z kwasem siarkowym, zaś kawę naturalną z grochem, fasolą i żużlem (SAWICKI, 2009 B). Do cukru dodawano węglan ołowiu i miedzi zaś do piwa ekstrakt z trującej rośliny *Anamirta paniculata* (służącej do otępiania ryb), wzmacniający jego moc, co umożliwiało dalsze dodawanie wody do piwa. W celu zapobiegania szybkiemu ukwaszaniu mleka dodawano sodę, w skrajnych przypadkach małe ilości proszku do prania, zaś śmietanę zagęszczano mąką i kredą. Dużym problemem było wykrywanie tych szkodliwych i trujących dodatków do żywności (TUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2008).

W wieku XX, wraz z bardzo gwałtownym rozwojem przemysłu i rolnictwa, pojawiły się nowe masowe pomysły na

fałszowanie żywności. Zafałszowania podyktowane były przede wszystkim chęcią zysku. Na dużą skalę zafałszowania można spotkać w produktach zbożowych, mlecznych, mięsnych i rybnych. Mąkę pszenną dobrej jakości miesza się z inną mąką o niższej jakości. Mleko rozcieńcza się wodą zaś do mleka koziego lub owczego dolewa się mleka krowiego. Do żółtych serów dodaje się chlorek wapnia. W wyrobach mięsnych notowane są przypadki zastępowania określonych gatunków mięsa innymi gatunkami (np. do wyrobów z dziczyzny dodaje się wieprzowinę, wołowinę, koninę) czy zastępowanie w produktach białka zwierzęcego białkiem roślinnym. Do przetworów rybnych dobrej jakości dodaje się surowce o gorszej jakości. Podrabiane są również oleje oraz inne tłuszcze roślinne i alkohole (SAWICKI, 2009 B; TUSZYŃSKI I WSPÓŁAUT., 2008). Chleb o nazwie „naturalny ciemny żytni" fałszuje się poprzez dodanie mąki jasnej pszenno-żytniej i barwi karmelem. Pierniki miodowe zamiast miodu mogą zawierać cukier i esencję miodową. Czekolada może posiadać w swym składzie inne, nie kakaowe tłuszcze roślinne. Większość produktów spożywczych barwiona jest sztucznymi barwnikami, wzmacniaczami i esencjami smaku. Na wielu etykietach drobnym drukiem jest podane co dany produkt zawiera, ale główna nazwa wyrobu napisana dużymi kolorowymi literami jest jednak często myląca (GASPARSKA, 2009).

W XX wieku rozpoznano szkodliwe oddziaływanie wielu dodatków chemicznych lub patogenów chorobotwórczych w produktach i wprowadzono kontrolę jakości żywności.

WYKRYWANIE ZAFAŁSZOWAŃ ŻYWNOŚCI I OBECNOŚCI PATOGENÓW CHOROBOTWÓRCZYCH

Instytucje badawcze i służby sanitarne biorąc pod uwagę aspekt zdrowotny człowieka starają się wykrywać zafałszowania celowo dokonywane przez człowieka, bądź obecność drobnoustrojów w produktach żywnościowych. Tradycyjne analizy fizykochemiczne są czasochłonne, pozwalają określić jedynie podstawowe parametry produktów, takie jak: gęstość, kwasowość, białko, tłuszcze, węglowodany, popiół i nie zawsze umożliwiają wykrycie zafałszowań produktów (PRZETACZEK-RÓŻNOWSKA I WSPÓŁAUT., 2011). Wykrycie drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności metodami klasycznymi jest pracochłonne, długotrwałe i kosztowne. Bezpieczeństwo zdrowotne człowieka wymaga konieczności wprowadzenia szybkich, tanich i czułych metod określenia składu żywności lub obecności mikroorganizmów poprzez badanie ich materiału genetycznego (WALCZAK I WSPÓŁAUT., 2009). Każdy organizm żywy posiada kod genetyczny, a w nim zapisane przynależne cechy i właściwości. Poprzez analizy molekularne materiału genetycznego można określić właściwy skład żywności (SAWICKI, 2009 A).

Postęp w rozwoju biologii molekularnej zapoczątkowany w XX wieku wprowadził metody i techniki molekularne pozwalające na diagnostykę wszelkich zafałszowań i identyfikację chorobotwórczych mikroorganizmów w żywności. Ostatnio bardzo rozpowszechniły się genetyczne metody identyfikacji mikroorganizmów. Metody diagnostyczne oparte są na analizie genotypowej informacji zapisanej w postaci kwasów nukleinowych DNA i RNA. Informacja zawarta w DNA jest bogata i pozwala na uzyskanie wielu przydatnych informacji (PALKA, 2007).

Jedną z najczęściej stosowanych metod do oceny materiału genetycznego w badanej próbce jest PCR. Ma ona na

celu zidentyfikowanie fragmentów DNA roślin lub produktów zwierzęcych wykorzystywanych w żywności. Każdy materiał organiczny (roślinny, zwierzęcy) lub patogen posiada swoje DNA. Pierwszym krokiem oceny badanej próbki żywności zanieczyszczonej patogenami jest namnażanie poszukiwanych drobnoustrojów w odpowiednich pożywkach w celu zwiększenia liczby komórek i wyeliminowania obecności komórek martwych, które mogą powodować błędne wyniki. Następnie przeprowadza się lizę (rozkład) komórek w celu wyodrębnienia DNA, które służy do dalszych analiz molekularnych (WALCZAK I WSPÓŁAUT., 2009).

Konwencjonalna metoda PCR przebiega w 3 etapach. Pierwszy etap to denaturacja DNA w temperaturze 93°-95°C, w wyniku której powstają jednoniciowe cząsteczki DNA, stanowiące matrycę. Drugi etap hybrydyzacji polega na przyłączeniu starterów do nici matrycowej DNA w miejscach komplementarnych. Temperatura przyłączenia zależy od długości starterów oraz ich składu nukleotydowego i wynosi od 37° do 68°C. Trzeci etap, tzw. elongacji polega na syntezie nowych nici DNA na zasadzie komplementarności, w temperaturze wynoszącej 72° C z udziałem polimerazy (PALKA, 2007; SAWICKI, 2009 A; SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2010). Metoda PCR znajduje zastosowanie m.in. w badaniach jakości żywności. Wykrywa i identyfikuje obecność patogenów, takich jak bakterie, wirusy i pasożyty w produktach żywnościowych (PALKA, 2007; WALCZAK I WSPÓŁAUT., 2009).

Do innych technik wykorzystywanych w analizie produktów spożywczych opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) należą m.in. Multtiplex-PCR, PCR-RFLP, RAPD, AFLP, PCR-SSCP, PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR), system analizy mikrobiologicznej Bax®Q7 i mikromacierze.

Multiplex-PCR polega na jednoczesnej amplifikacji kilku fragmentów DNA z użyciem wielu par starterów w czasie jednej reakcji. Służy ona do badań żywności, a w szczególności do identyfikowania gatunku mięsa w wyrobach masarskich. Wykrywa obecność mleka krowiego w serach wyprodukowanych z mleka innych zwierząt (koza, owca). Służy do oznaczania zawartości mączki kostnej w paszy. Technika ta pozwala też na wykrywanie organizmów genetycznie modyfikowanych (SAWICKI, 2009 A).

Tecnika PCR-RFLP, czyli analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych powielonego wcześniej produktu. Służy do analizy zafałszowań przetworzonych surowców rybnych, takich jak filety mrożone, panierowane (paluszki). Ponadto identyfikuje różne rodzaje ryb, np. dorszowate, łososiowate, makrelowate, okoniowate oraz węgorze i owoce morza (SAWICKI, 2009 A; SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2009; SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2010).

Technika RAPD oparta jest na losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA. Służy do rozpoznawania spokrewnionych gatunków zwierzęcych i roślinnych. Identyfikuje gatunki ryb, ssaki wodne, owoce morza i ich przetwory. RAPD-PCR jest stosunkowo tanią techniką analizy produktów rybnych (SAWICKI, 2009 A; SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2009).

Technika AFLP - łączy elementy RFLP i RAPD. Wykorzystywana jest do badania ryb, takich jak: zębacz, ostryga, okoń, tuńczyk, pstrąg i łosoś oraz ich produktów. Stosowanie techniki AFLP do analizy wiąże się jednak z wysokimi kosztami (SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2010).

PCR-SSCP bada polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA. Służy do identyfikacji produktów i rodzajów rybnych, m.in. łososiowatych, makrelowatych, jesiotrowatych, węgorzy

i mięczaków (SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2010).

Analiza obecności produktu metodą Real-time PCR przebiega równocześnie z amplifikacją w każdym cyklu reakcji przez pomiar fluorescencji kompleksu DNA z interkalującymi barwnikami fluorescencyjnymi lub sondami molekularnymi (PALKA, 2007). Główną różnicą pomiędzy reakcją PCR a Real-Time PCR jest możliwość oceny ilości powstającego produktu reakcji w trakcie jej trwania, co nie jest możliwe przy zastosowaniu konwencjonalnego PCR. Real-time PCR ma zastosowanie do wykrywania patogenów chorobotwórczych w produktach żywnościowych oraz do identyfikacji składników mięsnych w żywności pochodzenia zwierzęcego i składników rybnych pochodzenia wodnego, a także wykrywania zafałszowań w produktach mleczarskich (SAWICKI, 2009 A; SAWICKI I WSPÓŁAUT., 2010).

Bax®Q7 to automatyczny system do molekularnej detekcji patogenów w żywności oraz próbkach środowiskowych oparty na reakcji PCR oraz detekcji temperatury topnienia i zmian fluorescencji powielonych w reakcji PCR genów. Metodą tą prowadzi się oznaczenia na obecność mikroorganizmów takich jak *Salmonella sp., Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Enterobacter sakazaki, Campylobacter coli/jejuni/lari, Staphylococus ureus oraz* pleśni i drożdży w żywności (STACHOWIAK, 2011). Olbrzymią zaletą systemu Bax®Q7 jest możliwość zastosowania tabletki, która zawiera niezbędne składniki konieczne do przeprowadzenia reakcji PCR (WALCZAK I WSPÓŁAUT., 2009).

Inną metodą do oceny materiału genetycznego w analizowanej próbie są mikromacierze tzw. chipy genowe (ZIARNO, 2007). Umożliwiają jednocześnie wyznaczyć poziom ekspresji wielu genów, a nawet tysięcy badanego organizmu. Na płytkach mikromacierzy są naniesione sondy charakterystyczne dla określonego genu w DNA, które łączą się selektywnie z genami badanej próbki (MACIEJEWSKI I WSPÓŁAUT., 2005). Podstawą działania mikromacierzy jest komplementarna hybrydyzacja badanego materiału do sond cDNA lub oligonukleotydowych znajdujących się na płytce i odczyt z zastosowaniem fluorescencyjnych znaczników oraz skanowania światłem lasera. Mikromacierze są narzędziem diagnostyki mikrobiologicznej w żywności (ZIARNO, 2007) oraz służą do oceny zafałszowań w produktach przemysłu rybnego. Z uwagi na wysokie koszty analizy nie są metodą zbyt rozpowszechnioną (Sawicki i współaut., 2010).

PODSUMOWANIE

Kupowanie produktów zafałszowanych, czyli niepełnowartościowych naraża konsumenta nie tylko na duże straty finansowe, ale również na nieprzewidziane konsekwencje zdrowotne, tj. utratę zdrowia. Żywność zanieczyszczona drobnoustrojami może powodować schorzenia przewodu pokarmowego, chociażby zatrucia i alergie. Występowanie bakterii chorobotwórczych w żywności prowadzi do poważnych chorób, takich jak: ptasia grypa, choroby odzwierzęce i inne. W skrajnych przypadkach może doprowadzić nawet do śmierci. Często słyszy się o wycofywaniu z handlu całych partii różnych wyrobów spożywczych.

W obecnych uwarunkowaniach ekonomiczno-prawnych nie prowadzi się częstych badań identyfikacji fałszowanej żywności technikami molekularnymi. Wynika to z wysokich kosztów analizy produktów większością metod. Postępujący rozwój biologii molekularnej w perspektywie czasowej prawdopodobnie pozwoli ośrodkom naukowym na opraco-

wanie tańszych, prostszych i szybszych sposobów diagnostycznych wykrywania zafałszowań i patogenów chorobotwórczych produktów żywnościowych.

LITERATURA

FIEDUREK J. 2007. *Racjonalne odżywianie. [W:] Rola żywności i żywienia w profilaktyce i terapii chorób człowieka.* Fiedurek J. (red.). Wyd. Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej, Lublin, 109-114.

GASPARSKA R. 2009. *Zafałszowania artykułów spożywczych.* Przegl. Piekarski i Cukierniczy 1, 22-23.

MACIEJEWSKI H., KONARSKI Ł., JASIŃSKA A. 2005. *Analiza danych z mikromacierzy DNA.* Metody, Narzędzia. BioAlgorithms and Med-Systems 1(1/2), 129-132.

PALKA R. 2007. *Zastosowanie osiągnięć biologii molekularnej w mikrobiologii żywności.* Przem. Spożywczy 61(2), 6-8.

PRZETACZEK-RÓŻNOWSKA I., ROSIAK M. 2011. *Wykrywanie zafałszowań żywności.* Przem. Spożywczy 65(2), 20-24.

SAWICKI W. 2009 a. *Identyfikacja zafałszowań żywności z zastosowaniem PCR.* Przem. Spożywczy 63(4), 28-31.

SAWICKI W. 2009 b. *Fałszowanie żywności od czasów starożytnych do dziś.* Przem. Spożywczy 63(12), 2-6

SAWICKI W., DĄBROWSKI W., BOGUSŁAWSKA-WĄS E., DACZKOWSKA-KOZON E., KWIATKOWSKA B., SZYNKOWSKA A. 2009. *Identyfying Alaskan pollock fish products by PCR-RFLP technique.* Med. Weter. 65(2), 124-126

SAWICKI W., DACZKOWSKA-KOZON E., KWIATKOWSKA B., DĄBROWSKI W., HERLING H. 2010. *Identification of various species of ocean fish and invertebrates through molecular biological techniques.* Med. Weter. 66(3), 182-187.

SZCZUCKA B. 2009. *Żywność ekologiczna kontra konwencjonalna.* Przem. Spożywczy 4, 23.

STACHOWIAK M. 2011. *System Bax®Q7 – nowa metoda oznaczania obecności Salmonella spp. i Listeria monocytogenes.* Przem. Spożywczy 65(2), 38-40.

TUSZYŃSKI T, CZERNICKA M. 2008. *Zafałszowanie żywności i napojów oraz metody ich wykrywania.* Laboratorium 7-8, 38-43.

WALCZAK P., OŁTUSZAK-WALCZAK E., MERLAK D. 2009. *Zastosowanie metody PCR do wykrywania patogenów w żywności.* Przem. Spożywczy 63(12), 12-15.

ZIARNO M. 2007. *Osiągnięcia technologii molekularnych stosowane w analizie żywności.* Przem. Spożywczy 11, 33-35.

NaukiPrzyrodnicze

Numer 2 (4) 2014
Strony 38-45

KATARZYNA SZEWCZUK – KARPISZ

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Chemii
Zakład Radiochemii i Chemii Koloidów
Pl. M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin
E-mail: k.szewczuk-karpisz@wp.pl

WIRULENCJA ORAZ CYKL ŻYCIOWY WIRUSA HIV. CHARAKTERYSTYKA ZESPOŁU NABYTEGO UPOŚLEDZENIA ODPORNOŚCI ORAZ TERAPII ANTYRETROWIRUSOWEJ

STRESZCZENIE

W pracy opisano pochodzenie, budowę i cykl życiowy wirusa HIV, a także scharakteryzowano zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS) oraz terapię antyretrowirusową. Wirus HIV należy do wirusów z rodziny *Retroviridae*, a jego materiał genetyczny stanowi jednoniciowe RNA (ssRNA). Do jego replikacji niezbędny jest enzym odwrotna transkryptaza, który uczestniczy w procesie przepisywania informacji genetycznej z RNA na DNA. Głównym celem wirusa HIV są komórki układu odpornościowego, przez co unika on odpowiedzi immunologicznej organizmu, do którego wniknął. Istnieje kilka rodzajów leków antyretrowirusowych, m.in. nukleozydowe i nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy, inhibitory proteazy, inhibitory fuzji. Są one szansą dla nosicieli wirusa HIV na opóźnienie rozwoju zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS).

Słowa kluczowe: HIV, AIDS, retrowirus, terapia antyretrowirusowa.

VIRULENCE AND LIFE CYCLE OF HIV VIRUS. CHARACTERISTICS OF ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME AND ANTIRETROVIRAL THERAPY

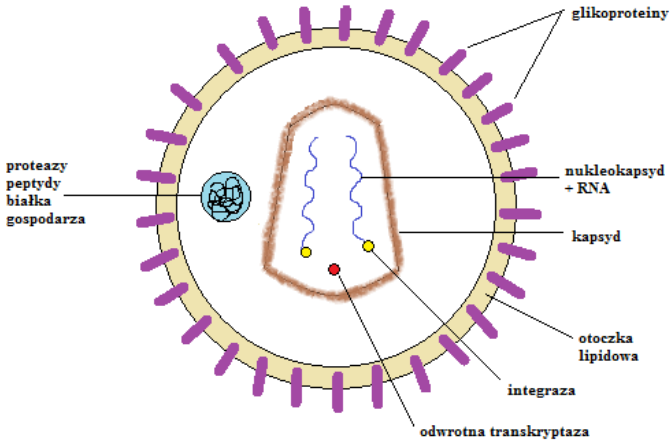
SUMMARY

The paper describes the origin, structure as well as life cycle of HIV virus and characterizes acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and antiretroviral therapy. HIV belongs to the *Retroviridae* family and its genetic material is a single stranded RNA (ssRNA). Reverse transcriptase is the enzyme necessary for its replication. It is involved in the process of rewriting the genetic information from RNA to DNA. Immune cells are the main HIV aim, thereby the virus avoids the immune response of infected person. There are several types of antiretroviral drugs, i.e. nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, protease inhibitors, fusion inhibitors. They are an opportunity for HIV positive to delay the progression of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

Keywords: HIV, AIDS, retrovirus, antiretroviral therapy.

WSTĘP

Wirus HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) to ludzki wirus nabytego upośledzenia odporności należący do rodziny *Retroviridae*. Jego wiriony o kulistym kształcie posiadają otoczkę lipidową zawierającą liczne białka – glikoproteiny. Pod osłonką znajduje się płaszcz białkowy (kapsyd) kryjący materiał genetyczny wirusa, tj. jednoniciowe RNA (ssRNA) składające się z ok. 10 000 nukleotydów, oraz enzymy – odwrotną transkryptazę i integrazę. Średnica wirionów HIV wynosi ok. 100 nm. Dotychczas poznano dwa typy wirusa HIV, tj. HIV-1 oraz HIV-2. Wiriony HIV-1 w swojej otoczce zawierają glikoproteiny gp120 i gp41, natomiast wiriony HIV-2 – gp120 i gp36 (VIRELLA, 2000; COLLIER, 2001). Budowę wirusa HIV przedstawiono schematycznie na rysunku 1.



Rys. 1. Budowa wirusa HIV.

Zespół nabytego upośledzenia odporności (AIDS) został po raz pierwszy opisany u homoseksualnych mężczyzn w 1981 roku. Z kolei, w 1983 roku zespół Luca Montagniera w Instytucie Pasteura jako pierwszy wyizolował wirusa HIV. Tego samego dokonał również zespół Roberta Gallo w USA w 1984 roku, po czym nadano nazwę wirusowi (FAUCI, 2008). W 2008 roku Lucowi Mantagnierowi i Françoise Barré-Sinoussi przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za wyizolowanie wirusa HIV. Na podstawie analizy filogenetycznej wirusów izolowanych w różnych stronach świata wyodrębniono trzy grupy HIV-1. Są to: grupa M (od ang. *major*, obejmująca większość szczepów HIV-1 na świecie), grupa O (od ang. *outgroup*, wykazująca 50% podobieństwa do grupy M w obrębie genu *env* kodującego glikoproteiny otoczki) oraz grupa N (nie-M i nie-O, znaleziona w nielicznych przypadkach) (ROBERTSON I WSPÓŁAUT., 2000).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie pochodzenia, cyklu życiowego, wirulencji wirusa HIV, a także scharakteryzowanie zespołu nabytego upośledzenia odporności (AIDS) oraz terapii antyretrowirusowej.

POCHODZENIE WIRUSA HIV

Dyskusja na temat pochodzenia wirusa HIV trwa od początku epidemii AIDS. Na podstawie badań przeprowadzonych na przełomie wieków stwierdzono, że epidemia zakażeń HIV-1 jest wynikiem przejścia małpiego wirusa upośledzenia odporności szympansów SIV (ang. *Simian Immunodeficiency Virus*) z małp naczelnych *Pan troglodytes troglodytes* na człowieka, co miało miejsce w zachodniej Afryce równikowej (CORBET I WSPÓŁAUT., 2000; GAO i WSPÓŁAUT., 1999; HAHN I WSPÓŁAUT., 2000). Na podstawie analiz sekwencji genetycznych wirusów pochodzących z różnych okresów, występowanie ostatniego wspólnego przodka dla wszystkich podtypów HIV grupy M datowano na 1931 rok (KORBER I WSPÓŁAUT., 2000). Jednakże, w 2002 roku pojawiły się wątpliwości. Wirus SIV znajdowano dotąd wyłącznie u szympansów pozostających w niewoli, a wśród małp żyjących na wolności obecność wirusa wykazano tylko u jednej spośród 58 małp człekokształtnych. Szympans ten należał do gatunku *Pan troglodytes schweinfurthii*, a sekwencja genów wyizolowanego od niego wirusa różniła się od szczepu HIV-1 grup M, N i O (SANTIAGO I WSPÓŁAUT., 2002). Wydarzenie to ponownie poddało wątpliwości umiejscowienie endemicznych ognisk infekcji SIV wśród szympansów. W 2006 roku naukowcy z Ameryki wykryli obecność przeciwciał przeciwko SIV u małp żyjących na wolności w południowym Kamerunie, a częstość ich występowania w skupiskach tych zwierząt wynosiła od 29 do 35%. Analiza sekwencji szczepów małpiego wirusa pozwoliła na potwierdzenie, ze pandemiczne szczepy HIV-1 należące do grupy M i niepandemiczne należące do grupy N wywodzą się z geograficznie izolowanych skupisk szympansów. Otrzymane wyniki ostatecznie potwierdziły, że naturalnym rezerwuarem HIV-1 są szympansy *Pan troglodytes tryglodytes* (KEELE I WSPÓŁAUT., 2006).

CYKL ŻYCIOWY WIRUSA HIV

Wirus nabytego upośledzenia odporności wykazuje tropizm w stosunku do komórek posiadających na swojej powierzchni antygeny CD4, tj. do limfocytów T_h (pomocniczych), makrofagów, komórek dendrytycznych oraz komórek mózgu. Przy zakażeniu drogą płciową infekcji ulegają najpierw makrofagi, natomiast przy zakażeniu poprzez krew infekcji ulegają jako pierwsze limfocyty T_h. Infekcja limfocytów pomocniczych skutkuje ostrzejszym przebiegiem choroby (BRYNTESSON, 2009) Wirus HIV dostaje się do komórki poprzez fuzję lipidów osłonki wirusa z lipidami błony plazmatycznej komórki. Po tym procesie kwas nukleinowy wirusa zostaje uwolniony do wnętrza komórki. Do adsorpcji HIV niezbędny jest koreceptor – CXCR4, CCR5. U niektórych osób w związku z zaburzeniami genetycznymi występuje niedostateczna produkcja wyżej wymienionych struktur, co skutkuje całkowitą odpornością na wirusa HIV lub obniżeniem poziomu jego replikacji. Po wprowadzeniu materiału genetycznego wirusa do wnętrza komórki gospodarza enzym odwrotna transkryptaza syntetyzuje podwójną nić DNA, przepisując informację zawartą w ssRNA wirusa. Następnie RNA wirusowe zostaje strawione, a nowo powstałe dsDNA, tzw. prowirus, przemieszcza się do jądra komórkowego przez pory jądrowe, gdzie integruje się z genomem gospodarza. W procesie łączenia DNA ludzkiego z DNA wirusowym bierze udział enzym wirusowy określany jako integraza. W dalszym etapie cyklu życiowego HIV dochodzi do replikacji, transkrypcji i translacji wirusowego materiału genetycznego, w wyniku czego powstają nowe cząsteczki wirusowego RNA, a także białka wirusowe niezbędne do budowy wirionów. Dalsze przemiany wirusowych białek katalizowane przez proteazę zachodzą wewnątrz wirionu nawet po opuszczeniu komórki (COLLIER, 2001).

DROGI ZAKAŻENIA WIRUSEM HIV

Wirusem HIV można się przede wszystkim zarazić przez kontakt z krwią lub płynami ustrojowymi osoby zakażonej. A zatem, bardzo ryzykowne jest używanie zakażonych igieł (narkomania), a także odbywanie stosunku płciowego z osobą zakażoną bez odpowiedniego zabezpieczenia. Wirusem HIV można się również zarazić podczas transfuzji krwi. Jednakże w Polsce jest to wyjątkowo mało prawdopodobne, ponieważ wszyscy dawcy krwi są badani na okoliczność zakażenia wirusem HIV. Inną możliwą drogą zakażenia HIV jest zarażenie dziecka przed lub w czasie porodu oraz podczas karmienia piersią przez matkę nosicielkę. Warto zauważyć, że wirusem tym nie można zakazić się poprzez ukąszenie komarów, drogę kropelkową, ślinę, łzy, od psów, kotów lub innych zwierząt domowych (YEUNG I WSPÓŁAUT., 1993; GODDARD, 1997)

Objawy zakażenia wirusem HIV pojawiają się po kilku tygodniach od jego wtargnięcia do organizmu. Objawy te są grypopodobne, należą do nich m.in.: powiększenie węzłów chłonnych w obrębie szyi, pod pachami i w pachwinach, utrata apetytu i/lub kilku kilogramów masy ciała w ciągu niespełna dwóch miesięcy, osłabienie mięśni nóg odczuwane zwłaszcza przy wchodzeniu w górę po schodach, obfite poty przez kilka kolejnych nocy, podwyższona temperatura utrzymująca się dłużej niż tydzień, a także przewlekła, długotrwała biegunka. Ponadto, mogą pojawić się: suchy kaszel nie związany z paleniem papierosów, przeziębieniem czy grypą, grzybica jamy ustnej z charakterystycznym białym nalotem lub nadżerkami oraz wysypka na ciele.

Zakażenie HIV można również przechodzić bezobjawowo, co dotyczy większości zakażonych osób. Najczęściej osoba pozytywna, u której nie wystąpiły objawy grypopodobne, odczuwa skutki zakażenia wirusem w momencie rozwoju choroby AIDS. Następuje to po kilku miesiącach, a nawet latach (GŁADYSZ I WSPÓŁAUT., 2009; COLLIER, 2001).

ZESPÓŁ NABYTEGO UPOŚLEDZENIA ODPORNOŚCI (AIDS)

Zespół nabytego upośledzenia odporności AIDS (ang. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) rozwija się w organizmie, gdy „przygrywa" on walkę z zakażeniem. Dochodzi wówczas do znacznego spadku ilości limfocytów, czego konsekwencją jest poważny stan immunosupresji. Warto zauważyć, że znaczna ilość wirusa jest neutralizowana przez układ immunologiczny, jednakże proces niszczenia komórek tego układu przez HIV jest intensywniejszy. Wirus HIV powodując destrukcję komórek układu immunologicznego w znacznym stopniu, doprowadza do zmniejszenia odpowiedzi mechanizmów obronnych ustroju. To sprawia, że opracowanie skutecznych metod leczenia i szczepionki przeciwdziałającej zakażeniu jest niezwykle trudne. Ponadto, wirus ulega wielu modyfikacjom i szybko uodparnia się na leki, a to dodatkowo utrudnia z nim walkę (NAJERA I WSPÓŁAUT., 2002).

Rozwój AIDS obejmuje kilka faz. Po etapie wniknięcia wirusa do krwiobiegu następuje okres inkubacji trwający od 4 do 6 tygodni. Następnie rozpoczyna się okres ostrych objawów zakażenia, odnotowywany u 40 - 80% pacjentów (WHO). W tym czasie mogą wystąpić mało specyficzne objawy grypopodobne, które zanikają samoistnie. Może również pojawić się wysypka oraz zmiany na śluzówce jamy ustnej. Kolejnym etapem zakażenia wirusem HIV jest faza utajenia trwająca od kilku miesięcy do kilku lat, po której rozwija się etap bardziej specyficznych objawów klinicznych. Wówczas u chorych pojawiają się: powiększenie węzłów chłonnych, permanentne osłabienie, nocne poty. Mogą również występować choroby, które dotykają również ludzi niezakażonych, ale trudniej i dłużej przebiegają. Ostatnią fazą zakażenia jest pełnoobjawowa choroba, w czasie której następują kolejne nadkażenia, które w organizmie z uszkodzonym przez wirusa HIV układem immunologicznym mają bardzo ciężki przebieg i zagrażają życiu. Pojawiają się nawracające zapalenia płuc, ciężkie zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, nowotwory i demencja. Ponadto, u chorych często występują zakażenia, które nie rozwijają się przy sprawnym układzie immunologicznym (tzw. oportunistyczne), tj. kryptokokoza, salmonelloza, histoplazmoza i gruźlica (GŁADYSZ I WSPÓŁAUT., 2009).

W Polsce od 1985 roku prowadzone są badania epidemiologiczne przez Państwowy Zakład Higieny w zakresie problemu związanego z wirusem. Na koniec roku 2012 zanotowano 16314 osób zakażonych wirusem HIV. W 2013 roku stwierdzono 1258 nowych zakażeń (ROSIŃSKA I WSPÓŁAUT., 2013).

DIAGNOSTYKA WIRUSA HIV

Badanie w kierunku HIV-1 rozpoczyna się wstępnym badaniem przesiewowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA). Metoda ta pozwala na wykrycie przeciwciał anty-HIV-1. Do badań przeznacza się najczęściej krew obwodową. Próbki z brakiem reakcji we wstępnym teście ELISA są uważane za HIV-negatywne, natomiast próbki, w których test ELISA wyszedł pozytywnie, są

sprawdzane podwójnie. Jeśli wynik obu testów jest dodatni, to próbka zostaje określona jako powtarzalnie dodatnia i zostaje poddana badaniom potwierdzającym z użyciem bardziej swoistych testów uzupełniających (np. Western blot oraz rzadziej test immunofluorescencji (IFA)). Tylko próbki, które powtarzalnie dają reakcję w teście ELISA i wychodzą pozytywnie w IFA lub dają reakcję w Western blocie, są uważane za HIV-pozytywne i wskazują na zakażenie tym wirusem. U osób nie zakażonych wirusem HIV poziom limfocytów CD4 we krwi jest zwykle powyżej 400 komórek na mikrolitr. Z kolei, u osób zakażonych wirusem HIV liczba komórek CD4 wynosi mniej niż 200 w 1 µl krwi (GŁADYSZ I WSPÓLAUT., 2009).

TERAPIA ANTYRETROWIRUSOWA

Wyróżnia się kilka rodzajów leków antyretrowirusowych, tj. nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NRTI), nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTI), inhibitory proteazy (PI), inhibitory fuzji, inhibitory koreceptora CCR5 oraz inhibitory integrazy.

Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy to najwcześniej zastosowane leki w terapii osób zakażonych HIV. Ich działanie opiera się na hamowaniu aktywności odwrotnej transkryptazy, przez co nie dopuszczają do przepisania materiału genetycznego wirusa RNA na DNA gospodarza. W następstwie leki te uniemożliwiają produkcję kolejnych cząsteczek wirusa, zakażających wrażliwe komórki organizmu. Obecnie najczęściej stosuje się ziaren, retrovir, emtriva oraz viread. W ostatnich latach coraz częściej stosuje się połączenia dwóch lub trzech leków antywirusowych w jednej tabletce, co ułatwia ich przyjmowanie. Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy posiadają odmienną budowę chemiczną niż NRTI, jednakże ich mechanizm działania jest podobny. Ich przykładami są stocrin oraz viramune.

Pojawienie się inhibitorów proteazy na przełomie 1995/1996 roku zrewolucjonizowało leczenie osób z HIV/AIDS. Dołączenie do dwóch NRTI (nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy) inhibitora proteazy okazało się bardziej skuteczne w obniżaniu poziomu wiremii, a co za tym idzie w zachowaniu funkcji układu immunologicznego oraz zmniejszeniu zachorowań związanych z zakażeniem HIV. Początkowo inhibitory proteazy wymagały częstego przyjmowania w ciągu doby, ścisłego przestrzegania zaleceń związanych z ich wchłanianiem (połykanie „na pusty żołądek" lub z posiłkiem). Jednakże, późniejsze badania i doświadczenia kliniczne pokazały, że dodanie niewielkiej dawki ritonawiru może znacznie zmniejszyć liczbę przyjmowanych tabletek, a także pozwala na przyjmowanie ich niezależnie od posiłków. Co więcej, dodatek ten wzmacnia działanie inhibitorów proteazy. Przykładami inhibitorów proteazy są crixivan oraz norvir.

Inhibitory fuzji zapobiegają połączeniu się wirusa z komórką wrażliwą i jego wniknięciu. Są to leki podawane w postaci podskórnych iniekcji, które pacjenci mogą podawać sobie sami, dwa razy dziennie. Nie są one stosowane na początku terapii antyretrowirusowej u osób, które nie były wcześniej leczone. Leki te przeznaczone są jedynie dla osób, u których dotychczasowe sposoby leczenia okazały się nieskuteczne, a także u których trudno jest dobrać właściwe leczenie z różnych względów.

Wirus HIV, aby wniknąć do wrażliwej komórki poza receptorem CD4 wymaga też koreceptorów, przede wszystkim CCR5 i CXCR4. Zablokowanie CCR5 utrudnia wnikanie wirusa do wrażliwych na zakażenie komórek. W

sierpniu 2007 roku zarejestrowano w USA pierwszy lek z grupy blokerów koreceptora CCR5, tj. celsentri (GŁADYSZ I WSPÓŁAUT., 2009).

HAART (ang. *highly active antiretroviral therapy*) to terapia antyretrowirusowa oparta na podawaniu zakażonym mieszanki co najmniej trzech leków przeciwretrowirusowych w określonej kombinacji (dwa nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy z jednym nienukleozydowym inhibitorem odwrotnej transkryptazy lub dwa nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy z jednym inhibitorem proteazy). Zastosowanie powyżej kombinacji pozwala na zmniejszenie prawdopodobieństwa nabycia oporności przez wirusa HIV na trzy stosowane leki (SZCZEKLIK, 2005).

W Polsce leki antyretrowirusowe są dostępne bezpłatnie w Poradniach Nabytych Niedoborów Immunologicznych. Terapia jest refundowana zarówno w naszym kraju jak i innych państwach Unii Europejskiej.

PODSUMOWANIE

Reasumując, wirus HIV jest wyjątkowo groźnym patogenem, niszczącym układ immunologiczny zakażonej osoby. Zdolność wirusa do unikania mechanizmów obronnych układu odpornościowego, a także jego liczne modyfikacje sprawiają, że walka z nim jest wyjątkowo trudna. Pomimo tych wszystkich trudności, opracowano szereg leków antyretrowirusowych ograniczających tempo namnażania wirusa w organizmie. Najbardziej skuteczna wydaje się terapia HAART, w której stosuje się mieszankę co najmniej trzech leków antyretrowirusowych.

LITERATURA

BRYNTESSON F. 2009. *The life cycle of the human immuno-deficiency virus*. The new philosophy January-June 761-790.

COLLIER L. 2001. *Wirusologia.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.

CORBET S., MÜLLER-TRUTWIN M.C., VERMISSE P. 2000. *Env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those in human immunodeficiency virus group N in the same geographic area*. J. Virol. 74, 529-34.

FAUCI A.S. 2008. *25 years of HIV*. Nature 453, 289-290.

GAO F., BAILES E., ROBERTSON D.L. 1999. *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes.* Nature 397, 436-41.

GŁADYSZ A., KNYSZ B. 2009. *Diagnostyka, profilaktyka, klinika i terapia zakażeń HIV/AIDS – współczesne możliwości i problemy.* Wydawnictwo Continuo, Wrocław.

GODDARD J. 1997. *Why mosquitoes cannot transmit the AIDS virus*. Infect. Med. 14, 353-54.

HAHN B.H., SHAW G.M., DE COOK K.M., SHARP P.M. 2000. *AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications.* Science 287, 607-14.

KEELE B.F., VAN HEUVERSWYN F., LI Y., BAILES E. 2006. *Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1*. Science, opublikowane online 25 maja.

KORBER B., MULDOON M., THEILER J. 2000. *Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strain*. Science 288, 1789-96.

NAJERA R., DELGADO E., PEREZ-ALVAREZ L., THOMSON M.M. 2002. *Genetic recom-*

bination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. AIDS 16, 3-16.

ROBERTSON D.L., ANDERSON J.P., BRADA J.A. 2000. *HIV-w1 nomenclature proposal*. Science 288, 55-56.

ROSIŃSKA M., NIEDŹWIECKA M. 2013. *Zakażenia HIV i zachorowania na AIDS w Polsce w 2012 roku*. Państwowy Zakład Higieny.

SANTIAGO M.L., RODENBURG C.M., KAMENYA S. 2002. *SIVcpz in wild chimpanzees*. Science 295, 465.

SZCZEKILIK A. 2005. *Choroby wewnętrzne t. II*. Medycyna Praktyczna, Kraków.

VIRELLA G. 2000. *Mikrobiologia i choroby zakaźne*. Urban & Partner, Wrocław.

YEUNG S.C.H., KAZAZI F., RANDLE C.G.M. 1993. *Patients infected with human immunodeficiency virus type 1 have low levels of virus in saliva even in the presence of peridontal disease*. J. Infect. Dis. 167, 803-809.

NaukiPrzyrodnicze

Numer 2 (4) 2014
Strony 46-55

MACIEJ FRANT

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Zakład Wirusologii i Immunologii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: maciej.frant@gmail.com

ADRIAN ZAJĄC

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Studenckie Koło Naukowe
Biotechnologów „Mikron"
Zakład Biochemii
Instytut Biologii i Biochemii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: adr25@poczta.onet.pl

MATEUSZ PIĘT

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Studenckie Koło Naukowe
Biotechnologów „Mikron"
Zakład Biochemii
Instytut Biologii i Biochemii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: piet.mateusz@gmail.com

MICHAŁ CHOJNACKI

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Biologii i Biotechnologii
Studenckie Koło Naukowe
Biotechnologów „Mikron"
Zakład Biochemii
Instytut Biologii i Biochemii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: mkpcho@gmail.com

WŁAŚCIWOŚCI PROZDROWOTNE WYBRANYCH GATUNKÓW GRZYBÓW Z RODZAJU *PLEUROTUS* ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWYCH

STRESZCZENIE

Boczniaki (*Pleurotus*) to grzyby szeroko rozpowszechnione na całym świecie. Są konsumowane przez ludzi od stuleci i wykazują szereg różnorakich aktywności prozdrowotnych.

Do najważniejszych przedstawicieli rodzaju *Pleurotus*, cechujących się wysoką aktywnością leczniczą, potwierdzoną w wielu publikacjach, zaliczane są: *Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonarius, Pleurotus nebrodensis* czy *Pleurotus eryngii*. Gatunki te wykazują wielorakie pożądane w lecznictwie właściwości, m.in. przeciwzapalne, antyoksydacyjne, antyproliferacyjne czy indukujące apoptozę komórek nowotworowych. Prowadzone nad nimi badania

uwzględniały zarówno ekstrakty grzybowe, jak i pochodzące z nich biopolimery.

Celem autorów jest przedstawienie prozdrowotnych właściwości wyżej wymienionych grzybów, ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności przeciwnowotworowej.

Słowa kluczowe: boczniak, grzyb jadalny, nowotwór.

PRO-HEALTH PROPERTIES OF SELECTED *PLEUROTUS* GENUS FUNGI WITH PARTICULAR REGARD TO ANTICANCER PROPERTIES

SUMMARY

Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are worldwide widespread fungi. They have been consumed by people for centuries. Those mushrooms are known for their various pro-heath activities.

The most important representatives of genus *Pleurotus* are: *Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonarius, Pleurotus nebrodensis* and*Pleurotus eryngii*. Those species have many properties desirable in medicine, such as: anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-proliferating or apoptose-inducing. Research conducted on the fungi include both extracts and biopolimers, which derive from the mushrooms.

The main purpose of the article is to introduce pro-health properties of mentioned fungi with particular regard to their anticancer activity.

Keywords: oyster mushroom, edible mushroom, cancer.

WSTĘP

Pleurotus (pol. boczniak) - jest to rodzaj grzybów z rodziny boczniakowatych należący do grupy pasożytów żyjących na drewnie. Słowo *Pleurotus* pochodzi z greckiego - πλευρήὠτός (pleurēōtos) co w dosłownym przekładzie oznacza „ucho boczne". Stąd też jego polska nazwa – boczniak. Nazwę tą zawdzięcza głównie swojej budowie, jako że posiada on, w zależności od gatunku, różnej wielkości kapelusz wraz z krótkim, często szerokim trzonem, przyrośniętym w płaszczyźnie bocznej do drzewa lub drewna. Barwa kapelusza jest zazwyczaj specyficzna dla danego gatunku. Pod kapeluszem znajdują się blaszki, które przeważnie zachodzą na trzon (u nielicznych gatunków trzon może nie być pokryty blaszkami). Rodzaj ten występuje powszechnie na świecie, poszczególne gatunki są bowiem spotykane praktycznie we wszystkich szerokościach geograficznych (GERHARDT, 2006). Grzyby te są saprotrofami – jest to grupa organizmów cudzożywnych, pozyskujących energię z rozkładu związków organicznych pochodzących ze szczątków martwych organizmów wyższych. Typowym dla grzybów saprotroficznych sposobem odżywiania się jest trawienie zewnętrzne, a następnie wchłanianie rozłożonej w ten sposób, płynnej materii (zjawisko to nazywane jest osmotrofizmem). Boczniaki, dzięki zdolności roz-

kładania celulozy i ligniny, powodują białą zgniliznę drewna. Większość grzybów z rodzaju *Pleurotus* jest jadalna, a niektóre gatunki ze względu na swoje walory smakowe i odżywcze są uprawiane i trafiają do powszechnej sprzedaży (np. w Polsce masowo produkowanym grzybem jest, obok pieczarki, boczniak ostrygowaty *Pleurotus ostreatus*). Pomimo wielu wymagań niezbędnych w produkcji towarowej, grzyby te dają się łatwo uprawiać w warunkach domowych. Dawniej ludzie wykorzystywali różne grzyby (w tym również boczniaki), przede wszystkim do zwiększania walorów smakowych potraw, ponieważ ich susz był bardzo aromatyczny i podkreślał smak i zapach przyrządzanych posiłków. Jednak drugim zastosowaniem było także tzw. etnomykologia, zajmująca się między innymi stosowaniem sproszkowanych suszy grzybowych w leczeniu różnych schorzeń. Uważano bowiem, że grzyby mają bardzo dobre właściwości lecznicze. Badania z ostatnich kilku dekad potwierdzają, że grzyby mogą produkować duże ilości substancji wpływających pozytywnie na zdrowie człowieka (PAWLIK I WSPÓŁAUT., 2012). Grzyby z rodziny boczniakowatych są źródłem wielu aminokwasów egzogennych, potrzebnych człowiekowi (przykładowo *P. ostreatus* jest źródłem trypsyny, histaminy, argininy, fenyloalaniny, leucyny, metioniny czy waliny w łatwo przyswajalnej przez organizm postaci), witamin z grupy B, soli mineralnych, kwasu foliowego oraz związków wykazujących działanie antynowotworowe (KALBARCZYK I WSPÓŁAUT., 2009).

Badania prowadzone w różnych ośrodkach badawczych na kilku gatunkach z rodziny boczniakowatych, tj. *P. ostreatus, P. eryngii, P. nebrodensis, P. pulmonarius* wykazały, że wytwarzają one stosunkowo duże ilości (w przeliczeniu na suchą masę) polisacharydów o charakterze przeciwnowotworowym oraz immunostymulacyjnym (np. lentinan, czy inne β-D glukanany), związków antyoksydacyjnych, obniżających poziom cholesterolu i ogólnie pozytywnie pobudzających organizm człowieka. Wyżej wymienione gatunki z rodzaju *Pleurotus* oraz ich właściwości prozdrowotne są głównym przedmiotem tej pracy (BOBEK, 1998).

Pleurotus ostreatus (pol. boczniak ostrygowaty) to gatunek grzyba nadrzewnego (porastającego drzewa liściaste oraz martwe drewno), powszechnie występującego, rosnącego w kępach (często osobniki wyrastają jeden na drugim). Stąd też jego nazwa – skupiska tego grzyba wyglądem przypominają ławicę ostryg. Posiadają duże kapelusze (mogą osiągać wielkość nawet do 30 cm) kształtu wachlarzowatego lub lejkowatego i grzybnię o kolorze brązowym lub siwo-brązowym. Gatunek ten charakteryzuje się dużą odpornością na mróz. Grzyb ten jest jadalny. Ma kwaskowy smak i bardzo przyjemny zapach (GERHARDT, 2006). Grzybnia zawiera dużo substancji odżywczych, tj.: kwas foliowy, łatwo przyswajalne białka i aminokwasy, witaminy i sole mineralne, a przede wszystkim związki przeciwnowotworowe, jak również zmniejszające poziom cholesterolu we krwi (MATTILA, 2001; LAYI I WSPÓŁAUT., 2006).

Pleurotus nebrodensis (brak polskiej nazwy) jest gatunkiem występującym w Chinach, północnej Europie oraz centralnej Azji. Jego budowa różni się nieco od opisanego powyżej *P. ostreatus*. Posiada on wysoki i szeroki trzon o jasnym zabarwieniu, z którego wyrasta kapelusz barwy jasno lub ciemnobrązowej. Gatunek ten jest bardzo dobrym źródłem błonnika oraz składników odżywczych. Badania prowadzone na tym gatunku wykazują, że wytwarza on wiele substancji biologicznie czynnych, charakteryzujących się działaniem terapeutycznym, takimi jak modulacja systemu immunologicznego czy hamowanie proliferacji komórek nowotworowych (MOORE I WSPÓŁAUT., 2011).

Pleurotus pulmonarius (pol. boczniak łyżkowaty), podobnie jak *P. ostreatus*, porasta drzewa (głównie buki i dęby). Występuje najczęściej w Ameryce Północnej. Posiada on niewielki kapelusz (osiągający wielkość od 5 do 12 cm) o jasnej barwie, najczęściej bladobrązowej, oraz wyraźny trzon, którym przyrasta do drzewa. Zapach wydzielany przez grzyba jest niewyraźny i przypomina anyż, zaś jego smak jest lekko słodkawy. Jest to gatunek uprawiany równie powszechnie jak *P. ostreatus*, szczególnie w Europie, Ameryce Północnej oraz Nowej Zelandii. Oba te grzyby są uprawiane podobny sposób i powszechne w sprzedaży. Niektóre badania naukowe sugerują, że gatunek ten może mieć szerokie zastosowanie lecznicze (BAGIO I WSPÓŁAUT., 2010).

Pleurotus erygii (pol. boczniak mikołajkowy) wyglądem przypomina wcześniej opisanego *P. nebrodensis*; posiada długi, gruby, mięsisty trzon oraz mały kapelusz, lekko lejkowaty, o barwie brązowej. Jest to gatunek jadalny i bardzo smaczny (MOORE I WSPÓŁAUT., 2011). Występuje w strefie śródziemnomorskiej w Europie, na Bliskim Wschodzie, Południowej Afryce, a także w wielu częściach Azji. W przeciwieństwie do innych gatunków z rodzaju *Pleurotus,* które powodują rozkład drewna, grzyb ten jest słabym pasożytem korzeni roślin zielonych, jednakże obserwuje się również jego wzrost na różnego rodzaju odpadach organicznych (ZERVAKIS I WSPÓŁAUT., 2001).

PLEUROTUS OSTREATUS

Pleurotus ostreatus (Boczniak ostrygowaty) jest powszechnie występującym, jadalnym grzybem. Na przestrzeni lat został on dość dobrze poznany, a duża liczba badań potwierdziła jego korzystny wpływ na organizm człowieka (WASSER, 2002). Grzyb ten cieszy się dużym uznaniem wśród naukowców dzięki jego szczególnym właściwościom, wśród których wyróżnić należy działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe oraz immunomodulacyjne (JEDINAK I WSPÓŁAUT., 2011). Zanotowano, że wodny ekstrakt z owocnika i grzybni odgrywa znaczącą rolę w zwiększeniu produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) przez neutrofile oraz wpływa stymulująco na komórki immunokompetentne (SHAMTSYAN I WSPÓŁAUT., 2004).

Badania naukowców z Indianapolis (2011) wykazały dużą aktywność wodnego koncentratu boczniaka na hamowanie wytwarzania cytokin prozapalnych. Badania *in vitro* przeprowadzone na mysich makrofagach (RAW264.7) indukowanych lipopolisacharydem (składnikiem ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych) wykazały znaczące zmniejszenie wydzielania cytokin prozapalnych takich jak TNF-α (ang. Tumor Necrosis Factor, czynnik martwicy guza), interleukiny-6 (IL-6) oraz interleukiny-12 (IL-12). Dodatkowo przeprowadzono badania na myszach, gdzie także zaobserwowano pozytywne działanie koncentratu grzybowego. Zanotowano również brak cytotoksyczności koncentratu grzybowego względem makrofagów (JEDINAK I WSPÓŁAUT., 2011).

Boczniak ostrygowaty posiada również silne właściwości antyoksydacyjne. Badania Alama i współpracowników (2010) wykazały, iż zarówno ekstrakt wodny, jak i ekstrakt acetonowy przygotowane z owocnika *P. ostreatus* w znaczącym stopniu wpłynął na efektywność zmiatania wolnych rodników mierzoną metodą DPPH. Wzrost całkowitej zdolności antyoksydacyjnej notuje się wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu (ALAM I WSPÓŁAUT., 2008). Natomiast badania zespołu Jayakumara (2011) wy-

kazały pozytywny wpływ etanolowych ekstraktów grzybowych na inhibicję procesu peroksydacji lipidowej (LPO) (JAYAKUMAR I WSPÓŁAUT., 2011).

W kontekście aktywności przeciwnowotworowej grzyby z gatunku boczniak ostygowaty cieszą się dużym zainteresowaniem wśród badaczy dając pozytywne wyniki w testach *in vitro.* Szczególnie ważną rolę odgrywają polisacharydy (SILVA I WSPÓŁAUT., 2011). Silva (2011) w swoich badaniach wykazała znaczący wpływ zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych polisacharydów na wzrost komórek nowotworu jelita grubego oraz raka endometrium. W stężeniu 200 µg/ml zahamowanie wzrostu linii komórkowej RL95 wynosiło ok. 55% (SILVA I WSPÓŁAUT., 2011). Wodny ekstrakt zawierający polisacharyd grzybowy POPS-1 wykazał aktywność antyproliferacyjną i proapoptotyczną dla komórek raka szyjki macicy (HeLa) oraz dużą skuteczność działania wraz z 5-fluorouracylem (PATEL I WSPÓŁAUT., 2012). Pozytywny wpływ *Pleurotus ostreatus* na regres wzrostu komórek nowotworowych wykazano w przypadku badań nad mięsakiem. Wyniki pokazały, że proteoglikany z grzybni boczniaka mają działanie antyproliferacyjne na linie Sarcoma-180 (SARANGI I WSPÓŁAUT., 2006). Interesującej analizy dokonali naukowcy z Tajwanu. Zbadali oni wpływ białek wyizolowanych z *Pleurotus ostreatus* na dwie linie komórkowe (SW480 i THP-1). Wykazali oni w teście MTT, że białkowy ekstrakt o stężeniu 10 mg/ml powoduje 60% spadek żywotności komórek nowotworowych. Wykazali również uszkodzenia w DNA komórek nieprawidłowych, co pozwoliło potwierdzić właściwości proapoptotyczne (WU I WSPÓŁAUT., 2011).

Przeprowadzone na przestrzeni lat badania pozwalają postawić tezę, że boczniak ostrygowaty może być wykorzystany do produkcji leków przeciw zapalnych oraz w terapiach przeciwnowotworowych.

PLEUROTUS PULMONARIUS

Pleurotus pulmonarius (boczniak łyżkowaty) jest jadalnym grzybem występującym w Ameryce Północnej (TRUDELL I WSPÓŁAUT., 2009). Szereg badań prowadzonych w różnych ośrodkach badawczych na całym świecie wskazuje na potencjalne zastosowanie tego grzyba oraz związków z niego pochodzących w różnych gałęziach medycyny (AKANNI I WSPÓŁAUT., 2010). Udokumentowane wyniki wskazują m.in. na inhibicję odwrotnej transkryptazy HIV-1 przez wodny ekstrakt z *Pleurotus pulmonarius*, silne działanie przeciwhiperglikemiczne w połączeniu z glibenklamidem (u myszy samo doustne podanie ekstraktu obniżało poziom cukru we krwi) czy obniżenie odpowiedzi przy ostrym i przewlekłym zapaleniu (PATEL I WSPÓŁAUT., 2012).

Grzyby tego gatunku wykazują silną aktywność przeciwnowotworową. W ich owocnikach istnieje niespodziewanie wysoka ilość frakcji związków o pożądanych właściwościach,. 16 polisacharydów występujących w tym grzybie cechuje się różnym poziomem aktywności przeciwnowotworowej (m.in. ksyloglukan, mannogalaktoglukan, mannogalaktan, glukoksylan). Najsilniejszą aktywnością przeciwnowotworową z frakcji rozpuszczalnych w wodzie cechują się białka Fio-a (zawierające ksyloglukan), FA-2 (zawierające mannogalaktan), natomiast z frakcji nierozpuszczalnych białka FII-1 (zawierające ksylan), FIII-1a (zawierające glukoksylan), FIII-2a (zawierające ksyloglukan) (WASSER, 2002).

Różne badania potwierdziły antyoksydacyjne oraz antynowotworowe właściwości *P. pulmonarius* (JOSE I WSPÓŁAUT., 2002; AJITH I WSPÓŁAUT., 2007). Badania zespołu Jose (2002) wykazały, że metanolowy ekstrakt z boczniaka łyżkowatego cechował się istotną zdolnością do zmiatania rodników hydroksylowych oraz hamowania aktywności peroksydacji lipidów (aktywność antyoksydacyjna). Dodatkowo wykazali oni, że ekstrakt ten powodował cofnięcie się litego guza (250, 500, i 1000 mg/kg masy ciała) oraz zmniejszenie obrzęku zapalnego wywołanego karageniną i formaliną w stężeniu od 500 do 1000 mg/kg masy ciała (JOSE I WSPÓŁAUT., 2002).

Pleurotus pulmonarius wykazuje pozytywną aktywność w walce z rakiem wątroby oraz z białaczką. Badania zespołu Xu (2012) nad białkami wyizolowanymi z tego boczniaka, wniosły nową wiedzę na temat mechanizmu hamowania kancerogenezy nowotworu wątroby. Badania przeprowadzili oni na dwóch liniach komórkowych pochodzących z wątroby: Huh7 oraz Hep3B i po raz pierwszy wykazali, że ekstrakt z boczniaka łyżkowego inaktywował szlak PI3K/AKT poprzez hamowanie ekspresji czynnika VEGF (ang. Vascular Endothelial Growth Factor, czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego), zarówno w warunkach *in vitro*, jak również *in vivo* (myszy), powodując supresję rozwoju komórek ludzkiego raka wątroby (XU I WSPÓŁAUT., 2012). Badacze z Nigerii z kolei przeprowadzili badania aktywności przeciwbiałaczkowej wodnego ekstraktu z boczniaka łyżkowatego na szczurach, u których zaindukowali powstanie białaczki (dodawano co 2 dni przez 3 tygodnie 0,2 ml roztworu benzenu). Roztwór grzybowy podawali oni szczurom przed, w trakcie i po indukcji wymienionej choroby (0,2 ml doustnie roztworu o stężeniu 20 mg/ml). Metabolity grzybowe badane przez afrykański zespół wykazywały terapeutyczny potencjał oraz zdolność do tłumienia białaczki u zwierząt po podaniu doustnym w różnych grupach doświadczalnych. Bioaktywne związki z boczniaka ujawniły głęboką aktywność immunoterapeutyczną w wyciszaniu białaczek (OLUFEMI I WSPÓŁAUT., 2012). Wyniki różnych badaczy sugerują możliwość wykorzystania boczniaka łyżkowatego jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego, antyoksydacyjnego i przeciwzapalnego.

PLEUROTUS NEBRODENSIS

Pleurotus nebrodensis, grzyb występujący w Chinach, Środkowej Azji i Południowej Europie, badany był głównie przez naukowców z Chin i Japonii. Wykazano obecność różnych związków mających pozytywne działanie na ludzki organizm. Do najważniejszych z nich należą nebrodeolizyna (hemolizyna) i polisacharyd PN50G (MIYAZAWA I WSPÓŁAUT., 2008; LV I WSPÓŁAUT., 2009; RUPACHANDRA I WSPÓŁAUT., 2014).

Nebrodeolizyna to monomeryczne białko o masie około 27 kDa. Wykazano, iż cząsteczka ta posiada właściwości hemolityczne wobec króliczych erytrocytów. Powoduje także wypływ jonów potasu z czerwonych krwinek. Ponadto badania wykazały, że białko to posiada aktywność przeciwwirusową anty-HIV-1 (LV I WSPÓŁAUT., 2009). Nebrodeolizyna okazała się także czynnikiem antynowotworowym. Wykazano, że białko to posiada zdolność indukcji apoptozy w komórkach linii HeLa (komórki raka szyjki macicy) i L929 (fibroblasty mysie) (LV I WSPÓŁAUT., 2009; RUPACHANDRA I WSPÓŁAUT., 2014). Badania ujawniły także silne właściwości cytotoksyczne tej hemolizyny wobec komórek linii: Lu-04 (komórki raka płuca), Bre-04 (komórki raka piersi), HepG2 (komórki raka wą-

troby), L929 oraz HeLa (LV I WSPÓŁAUT., 2009).

Kolejną cząsteczką wartą uwagi pochodzącą z *P. nebrodensis* jest polisacharyd PN50G. Badania wykazały nietoksyczność tej substancji dla komórek prawidłowych (WANG I WSPÓŁAUT., 2014). Kolejne eksperymenty wykonano pod względem właściwości antynowotworowych tego biopolimeru. Badano wpływ jego wodnego roztworu na komórki raka płuca linii A549. Wykazano, iż polisacharyd ma działanie cytotoksyczne względem komórek nowotworowych, hamuje ich proliferację, powoduje powstanie uszkodzeń w DNA oraz indukuje apoptozę (poprzez szlak kaspaz 3 i 9). Ważnym jest, iż PN50G nie wykazuje takich właściwości względem komórek prawidłowych (linia MRC-5 – płodowe komórki płuca) (CUI I WSPÓŁAUT., 2014).

Badania nad substancjami pochodzącymi z *P. nebrodensis* są stosunkowe nowe, jednakże wyniki są bardzo obiecujące. Ekstrakty tego grzyba lub biopolimery z niego pochodzące mogą stanowić na skuteczny lek w walce z nowotworami.

PLEUROTUS ERYNGII

Boczniak mikołajkowy (*Pleurotus eryngii*), grzyb powszechny szczególnie w Chinach, posiada całą gamę substancji o pozytywnym wpływie na ludzki organizm. Należą do nich enzymy, polisacharydy, czy inne biopolimery, jak np. glikosfingolipidy czy kompleksy typu polisacharyd-białko lub polisacharyd-peptyd. Sam ekstrakt grzybowy również wykazuje właściwości prozdrowotne (JEONG I WSPÓŁAUT., 2008; JEDINAK I WSPÓŁAUT., 2011; DENG I WSPÓŁAUT., 2012; IKE I WSPÓŁAUT., 2012). Grzyb ten wykazuje właściwości immunomodulacyjne. Glikosfingolipid z niego wyizolowany indukuje wydzielanie IFN-γ (interferon gamma) i hamuje sekrecję IL-4 (interleukina 4) przez limfocyty T. Właściwości te są szczególne ważne w modulacji stanu zapalnego, znaczące są jednak również przy modulacji odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji czy rozwoju nowotworów (JEDINAK I WSPÓŁAUT., 2011). Badania nad polisacharydem PEPS wykazały jego zdolność obniżania cholesterolu (DENG I WSPÓŁAUT., 2012). Ekstrakt *P. eryngii* wywołuje liczne pozytywne efekty na organizm. Tak jak substancje z niego pochodzące, podwyższa poziom IFN-γ i obniża IL-4. Działa także immunostymulacyjnie, podwyższając poziom przeciwciał IgG1, dzięki czemu stosowany może byś jako adiuwant w szczepionkach. Badania wykazały także jego właściwości antyalergiczne i immunosupresyjne (LINDEQUIST I WSPÓŁAUT., 2005).

Liczne badania ujawniły także działanie antynowotworowe samego grzyba, jak i substancji z niego izolowanych. Ekstrakt z boczniaka mikołajkowego stymuluje komórki do produkcji TNF-α (czynnik martwicy nowotworu), co może zahamować rozwój guza, a nawet spowodować jego regresję (JEDINAK I WSPÓŁAUT., 2011). Wykazano także, iż ekstrakt indukuje produkcję limfocytów pomocniczych Th1 (IKE I WSPÓŁAUT., 2012). Działanie przeciwnowotworowe wykazuje także wspomniany już glikosfingolipid. Szczególnie obiecująco predysponuje jednak polisacharyd PEPS, który wykazuje silne działanie antyoksydacyjne i antyproliferacyjne (DENG I WSPÓŁAUT., 2012; LI I WSPÓŁAUT., 2012; ZHANG I WSPÓŁAUT., 2014).

PODSUMOWANIE

Szereg publikacji dowodzących aktywności leczniczych grzybów z rodziny *Pleurotus*, takich jak: immunomodulacyjne, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, antyhiperglikemiczne, wskazują na potencjalne zastosowanie tych grzybów w medycynie. Grzyby te wykorzystywane są w kuchniach całego świata jako przyprawa, czy też dodatek do posiłków poprawiający smak i zapach. Okazuje się jednak, iż mają one ogromny potencjał leczniczy. Oprócz wykorzystywania kulinarnego mogą one pomóc w zwalczaniu najgroźniejszych chorób, w tym chorób nowotworowych. W najbliższej przyszłości mogą przyczynić się do rozwoju tzw. żywności funkcjonalnej, czyli takiej, która oprócz swych walorów organoleptycznych, posiada także dodatkowe właściwości, na przykład lecznicze. Dzięki temu drogie i szkodliwe dla zdrowia terapie mogły by zostać zastąpione przez odpowiednio przygotowany posiłek. Tezę tę zdaje się potwierdzać mniejsza zachorowalność na choroby cywilizacyjne w krajach Azji, gdzie powszechna jest medycyna ludowa i gdzie spożywa się głównie potrawy przygotowane z naturalnych składników, a w szczególności grzybów.

LITERATURA

AJITH A., JANARDHANAN K. 2007. *Indian medicinal mushrooms as a source of antioxidant and antitumoragents*. Journal of ClinicalBiochemistry and Nutrition 40(3), 157-162.

AKANNI E., OLOKE J., MABAYOJE V., SAKA G. 2010. *Clastogenicity potential screening of pleurotus pulmonarius and pleurotus ostreatus metabolites as potential anticancer and antileukaemic agents using micronucleus assay*. british journal of pharmacology and toxicology 1(2), 56-61.

ALAM N., AMIN R., KHAN A., ARA I., SHIM M. J., LEE M.W, LEE T. S. 2008 *Nutritional Analysis of Cultivated Mushrooms in Bangladesh -Pleurotus ostreatus, Pleurotus sajor-caju, Pleurotus florida and Calocybe indica.* Mycobiology 36(4), 228-232

BAGIO C., FREITAS C., MARTINS D., MAZZARDO L., SMIDERLE F., SASSAKI G., IACOMINI M., MARQUES M., SANTOS A. 2010. *Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked β-Glucan Isolated From Pleurotus pulmonarius in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways*. The Journal of Pain 11, 965–971.

BOBEK P. 1998. *Dose-and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (Pleurotusostreatus) in rats.* Nutrition 14, 3.

CUI H., WANG C, WANG Y., LI Z., ZHANG Y., CHEN M., LI F. 2014. *Pleurotus nebrodensis polysaccharide induces apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells.* Carbohydrate Polymers 104, 246-252.

DENG W.W., CAO X., WANG M., QU R., SU W.Y., YANG Y., WEI Y.W., XU X.M., YU J.N. 2012. *Delivery of a transforming growth factor β-1 plasmid to mesenchymal stem cells via cationized Pleurotus eryngii polysaccharide nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine 7, 1297-1311.

GERHARDT E. 2006 *Grzyby. Wielki ilustrowany przewodnik,* Warszawa.

IKE K., KAMEYAMA N., ITO A., IMAI S. 2012. *Induction of a t-helper 1 (th1) immune response in mice by an extract from the pleurotus eryngii (eringi) mushroom*. Journal of Medicinal Food 15(12), 1124-1128.

JAYAKUMAR T., THOMAS P.A., SHEU J.R. GERALDINE P. 2011. *In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mush-*

room Pleurotus ostreatus. Food Research International, 851–861.

JEDINAK A., DUDHGAONKAR S., WU Q-L, SIMON J., SLIVA D. 2011. *Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-κB and AP-1 signaling*. Nutrition Journal 10, 52-62.

JEONG Y-T, YANG B-K, LI CH-R, SONG CH-H. 2008. *Anti-tumor Effects of Exo- and Endo-biopolymers Produced from Submerged Cultures of Three Different Mushrooms*. Mycobiology 36(2), 106-109.

JOSE N., AJITH T., JANANRDHANAN K. 2002. *Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoractivities of culinary-medicinal mushroom Pleurotus pulmonarius Quel*. International Journal of Medicinal Mushrooms 4(4), 329-335.

KALBARCZYK J., RADZKI W. 2009. *Uprawiane grzyby wyższe jako cenny składnik diety oraz źródło substancji aktywnych biologicznie*. Herba Polonica 55, 4.

LAYI I., FRIESEM D., GERESH S., HADAR Y., SCHWARTZ B. 2006. *An aqueos polysaccharide extract from the edible mushroom Pleurotus ostreatus induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells*. Cancer Letters 244, 61-70.

LI X., WANG Z., WANG L., WALID E., ZHANG H. 2012. *In vitro antioxidant and anti-proliferation activities of polysaccharides from various extracts of different mushrooms*. International Journal of Molecular Sciences 13, 5801-5811.

LINDEQUIST U., NIEDERMEYER T.H.J, JULICH W-D. 2005. *The pharmacological potential of mushrooms*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 2(3), 285-299.

LV H., KONG Y., YAO Q., ZHANG B., LENG F-W, BIAN H-J, BALZARINI J., VAN DAMME E., BAO J-K. 2009. *Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom Pleurotus nebrodensis with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects*. Phytomedicine 16, 198-205.

MATTILA P. 2001. *Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2343-2348.

MIYAZAWA N., OKAZAKI M., OHGA S. 2008. *Antihypertensive effect of pleurotus nebrodensis in spontaneusly hypertensive rats*. Journal of Oleo Science 57(12). 675-681.

MOORE D., ROBSON G.D., TRINCI A.P.J. 2011. *21st century guidebook to fungi (1st ed.)*. Cambridge University Press.

OLUFEMI A., TERRY A., KOLA O. 2012. *Anti-leukemic and immunomodulatory effects of fungal metabolites of Pleurotus pulmonarius and Pleurotus ostreatus on benzene-induced leukemia in Wisterrats*. The Korean Journal of Hematology 47(1), 67-73.

PATEL S., GOYAL A. 2012. *Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics*. 3 Biotech 2, 1-15.

PATEL Y., NARAIAN R., SINGH V. 2012. *Medicinal properties of pleurotus species (oyster mushroom): a review*. World Journal of Fungal and Plant Biology 3(1), 01-12.

PAWLIK A., JANUSZ G., KOSZERNY J., MAŁEK W., ROGLASKI J. 2012. *Genetic diversity of the edible mushrooms pleurotus sp. by amplified fragment length polymorphism*. Current Microbiology 65, 438-445.

RUPACHANDRA S., SARADA D.V.L. 2014. *Induction of apoptotic effects of antiproliferative protein from the seeds of borreria hispida on lung cancer (a549) and cervical cancer (HeLa) cell lines*. BioMed Research International, 1-8.

SARANGI I., GHOSH D., BHUITA S.K, MALLICK S.K, MAITI T.K. 2006. *Anti-tumor and immunomodulating effects of Pleurotus ostreatusmycelia-derived proteoglycans.* International Immunopharmacology 6, 1287-1297.

SHAMTSYAN M.M., KONUSOVA V.G., GOLOSHCHEV A.M., MAKSIMOVA Y.O.,

PANCHENKO A.V., PETRISHCHEV N.N, 2004. *Immunomodulating and anti-tumor effects of basidiomycetes Pleurotus ostreatus.* Journal of Biotechnology 113, 77-83.

SILVA S., MARTINS S., KARMALI A., ROSAB E., 2012. *Production, purification and characterisationof polysaccharides from Pleurotus ostreatus with antitumour activity.* Journal of the Science of Food and Agriculture 92, 1826–1832.

TRUDELL S., AMMIRATI J. 2009. *Mushrooms of the pacific northwest*. Timber Press Field Guides, Londyn.

WANG C., CUI H., WANG Y., WANG Z., LI Z., CHEN M., LI F. 2014. *Bidirectional immunomodulatory activities of polysaccharides purified from pleurotus nebrodensis.* Inflammation 37, 83-93.

WASSER S. P. 2002. *Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides.* Applied Microbiology and Biotechnology 60, 258-274.

WU J.I., CHEN C.H.. CHANG W.H., CHUNG K.T., LIU Y.W., LU F.J., CHEN C.H. 2011 *Anti-cancer effects of protein extracts from Calvatia lilacina, Pleurotus ostreatus and Volvariella volvacea*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

XU W., HUANG J., CHEUNG P. 2012. *Extract of pleurotus pulmonarius suppresses liver cancer development and progression through inhibition of VEGF-induced PI3K/AKT signaling pathway*. PLOS ONE 7(3), 1-13.

ZERVAKIS I., VENTURELLA G., PAPADOPOULOU K. 2001. *Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the Pleurotus eryngii species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters*. Microbiology 147, 3183–3194.

ZHANG A., LI X., XING C., YANG J., SUN P. 2014. *Antioxidant activity of polysaccharide extracted from Pleurotus eryngii using response surface methodology.* International Journal of Biological Macromolecules 65, 28-32.

NaukiPrzyrodnicze

Numer 2 (4) 2014
Strony 56-57

ZASADY PRZYJMOWANIA PRAC DO DRUKU
ACCEPTANCE RULES OF ARTICLE TO PUBLISH

1. Czasopismo działa w systemie *Open Acces*.
2. Redakcja szczególnie jest zainteresowana artykułami z następujących dziedzin nauk przyrodniczych: biologia, ogrodnictwo, chemia, toksykologia, biochemia, zootechnika, ekologia, ochrona środowiska, zoologia, agrobioinżynieria, biotechnologia, żywienie człowieka, technologia przetwórstwa żywności, medycyna, farmacja i inne.
3. Tekst musi zwierać następujące informacje: tytuł pracy, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), nazwę i adres zakładu pracy (w przypadku uczelni: nazwę uczelni, wydział, katedrę/zakład/instytut, adres), adres poczty elektronicznej (e-mail).
4. Do pracy należy dołączyć krótkie (nieprzekraczające 300 wyrazów) streszczenie w jęz. angielskim (wraz z tytułem) i polskim, informujące o zasadniczej jej treści. Dodatkowo w obu językach należy podać maksymalnie 5 słów kluczowych.
5. Tekst:
   - musi zawierać wstęp/wprowadzenie, podsumowanie/wnioski i literaturę oraz podział tekstu właściwego na nagłówki
   - maksymalnie 25 stron łącznie ze spisem literatury, tabelami i ilustracjami
   - czcionka Times New Roman
   - odstępy między wierszami: 1
   - bez używania wyróżnień (np. podkreślenia), z wyjątkiem kursywy
   - wyraźne odznaczenie tytułów i nagłówków bez ich centrowania
   - zaznaczenie akapitów
   - wszystkie śródtytuły bez numeracji, czcionką tej samej wielkości
   - cytowane w tekście prace zaznaczamy przez podanie nazwiska autora(ów) (pisanych kapitalizowanymi literami) i roku publikacji w nawiasie półokrągłym, np. (BORKOWSKI, 2013), (FORNALIK I WSPÓŁAUT., 2011)
   - cytowaną literaturę należy zestawić na końcu maszynopisu bez numeracji, w alfabetycznej kolejności, według nazwisk autorów, w następujących formatach:

- artykuł:
TAMASKI J. S., ZOMBAN M. 1999. *Jak pisać artykuł.* Nauki Przyrodnicze 1, 11-15.

- rozdział:
GORTAT M. 2012. *Fityniany - substancje antyodżywcze w żywieniu ludzi i zwierząt.*[W:] *Toksyczne substancje chemiczne.* LIPIŃSKI W. (red.). Instytut Naukowo-Wydawniczy SPATUM., Radom, 107-127.

- książka:
SEIDENSTICKER J. 1992. *Wielkie koty, królewskie stworzenia dzikiego świata.* Elipsa, Warszawa.

6. Rysunki, schematy i fotografie:

   - mają być wykonane w jednym z formatów: *.cdr, *.eps, *.tif, *.psd i dostarczone jako osobne pliki wraz ze zbiorem tekstowym. Redakcja nie przyjmuje figur w formacie .doc czy .rtf
   - opisy na rysunkach powinny być wykonane czcionką odpowiedniej wielkości, nie mniejszą niż 12 punktów
   - podpisy pod rycinami powinny być zamieszczone na końcu artykułu na osobnej stronie
   - redakcja zaznacza sobie prawo odmówienia przyjęcia artykułu z uwagi na nieczytelny rysunek
   - Autor artykułu oświadcza, że ma prawa autorskie do publikowanej grafiki
   - w przypadku, gdy Autorzy zamierzają włączyć do swego artykułu ilustracje publikowane przez autorów cytowanych prac oryginalnych, należy uzyskać z wydawnictwa zgodę na przedruk

7. Do pracy należy dołączyć list przewodni, podpisany przez wszystkich autorów, zawierający następujące informacje: (I) oświadczenie o oryginalności artykułu i nieskładaniu analogicznej pracy do druku w innym czasopiśmie, (II) określenie wkładu poszczególnych autorów w powstanie tekstu, (III) informacje o źródłach finansowania (np. grant) w przypadku prac oryginalnych (podpisanie zgody na opublikowanie artykułu).
8. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i zwrotu poprawionego tekstu wiadomością e-mail do Redakcji w ciągu 4 dni od chwili otrzymania.
9. Przyjęcie pracy do druku jest równoznaczne z przeniesieniem przez Autora (Autorów) praw autorskich na rzecz Wydawcy.
10. Recenzja artykułu:

    - Do każdej oceny powołuje się co najmniej dwóch niezależnych recenzentów
    - rekomendowanym rozwiązaniem jest model, w którym autor(zy) i recenzenci nie znają swoich tożsamości (tzw. "double-blind review proces")
    - ma mieć formę pisemną i kończyć się jednoznacznym wnioskiem co do dopuszczenia artykułu do publikacji lub jego odrzuceniu

11. Kontakt z Redakcją:

    Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych
    ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
    e-mail: ssnp@poczta.pl
    Redaktor główny: Mateusz Gortat, tel. 661 657 875

12. Artykuły prosimy nadsyłać na adres e-mail: *ssnp@poczta.pl*

Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych

Stowarzyszenie Studentów Nauk Przyrodniczych
ul. Akademicka 13
20-950 Lublin
ssnp@poczta.pl