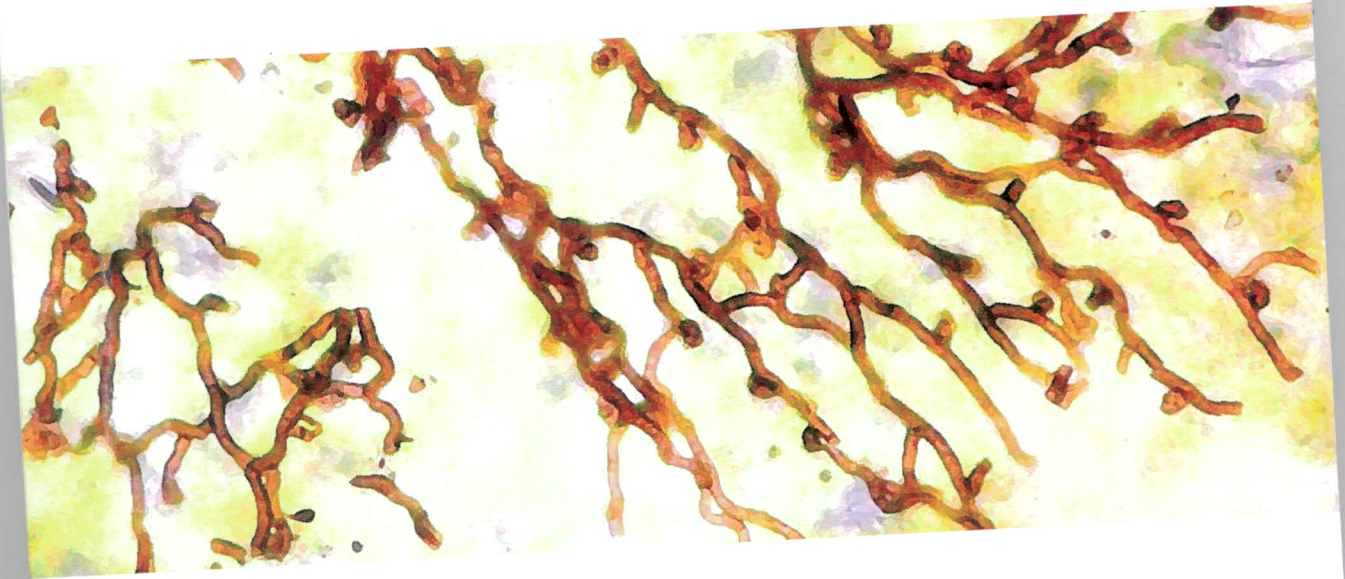


Warsztaty

Polskiego Towarzystwa Mykologicznego



Grzyby – organizmy kluczowe dla życia na Ziemi
Fungi – key players in ecosystem functions



**POLSKIE TOWARZYSTWO
MYKOLOGICZNE**

changes in enzyme activity were observed for the mycelium exposed to nickel. In contrast, zinc was a metal which caused the weakest induction of the antioxidant enzyme activity of the tested strain.

Conclusions. Examined heavy metals induce ROS formation in the tested strain. Furthermore, the results obtained from the measurement of antioxidant enzymes indicate active response of the *P. marquandii* antioxidant system to toxic substances, which may be important for high tolerance of *P. marquandii* to toxic metals.

This study was supported by the National Centre for Science in Cracow, Poland (Project No. UMO-2011/01/B/NZ9/02898).

Wykorzystanie źródeł fosforu i siarki przez szczep *Trichoderma* wyizolowany z osadu ścieków mleczarskich, przy użyciu mikromacierzy fenotypowych (PM)

Karolina Oszust*, Magdalena Frąc**, Agata Gryta, Nina Bilińska
Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27
tel.: 81 744 50 61, *koszust@ipan.lublin.pl, **m.frac@ipan.lublin.pl

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są jednym z głównych źródeł przemysłowej celulozy i hemicelulozy, enzymów wykorzystywanych do hydrolizy złożonych związków do cukrów prostych, które mogą być następnie przekształcone w inne związki chemiczne. Wiadomo, że pewne substancje obecne w podłożu hodowlanym mogą działać jak silne induktory bądź inhibitory aktywności. W związku z tym wykorzystano mikromacierze fenotypowe (PM), w celu wskazania potencjalnych źródeł fosforu i siarki, które mogą odgrywać kluczową rolę w optymalizacji warunków hodowli, optymalizacji sporulacji i kiełkowania lub nawet w optymalizacji produkcji drugorzędowych metabolitów przez grzyby czy poszukiwaniu nowych substancji czynnych, takich jak np. enzymy.

System mikromacierzy fenotypowych charakteryzuje aktywność fizjologiczną mikroorganizmów. W prezentowanych badaniach wykorzystano płytkę PM4 do pozyskania informacji na temat wykorzystania związków fosforu (59 różnych źródeł) i siarki (35 różnych źródeł) przez szczep *Trichoderma* G79/11.

Szczep G79/11 wyizolowano z osadu ścieków mleczarskich w Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej, IA PAN. Na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu dużej podjednostki rybosomalnej G79/11 zidentyfikowano go jako *Trichoderma atroviride*. Szczep ten hodowano na pożywce z celulozą przez 14 dni w temperaturze 27°C. Następnie zgodnie z procedurą PM Biolog dla grzybów nitkowatych przygotowano homogeniczną zawiesinę zarodników (62% T) w sterylnym płynie inokulacyjnym – FF z dodatkiem D-glukozy. Po 100 µl zawiesiny wprowadzono do każdego dołka płytki PM4, a następnie płytkę inkubowano w temperaturze 27°C w systemie OmniLog.

Badania wykazały, że najchętniej wykorzystywane przez G79/11 źródła

fosforu, znajdujące się na PM4 to: 2',3'- monocykliczny fosforan adenozy, w stosunku do którego zanotowano o 12,7% większą aktywność badanego szczepu, w porównaniu do kontroli; fosfoenolopirogronian (wzrost aktywności o 3,6%) i fosfotyrozyna (wzrost aktywności o 15,8%). Z drugiej strony obecność związków, takich jak azotan (V) mocznika, D-seryna, D-glukozamina spowodowała całkowite zahamowanie aktywności G79/11. Pozostałe związki fosforu nie wykazały wpływu na aktywność szczepu G79/11. Jeśli chodzi o źródła siarki, to żaden związek całkowicie nie zahamował aktywności G79/11. Jedynie tiosiarczan, tetratian, tiofosforan, tauryna i jej pochodne. D,L-lipoamid oraz pochodne sulfonu hamowały aktywność szczepu G79/11 maksymalnie w 50%. Obecność substratów, takich jak: pochodne metioniny, glutation, lantionina czy cystationina spowodowały 35% wzrost aktywności badanego szczepu.

Phosphorus and sulphur sources utilization by *Trichoderma* strain isolated from dairy sewage sludge, using phenotype microarray (PM)

Karolina Oszust*, Magdalena Frąc**, Agata Gryta, Nina Bilińska

Institute of Agrophysics of Polish Academy of Sciences

4 Doświadczalna St., PL-20-290 Lublin 27

phone: 81 744 50 61, *koszust@ipan.lublin.pl **m.frac@ipan.lublin.pl

Fungi belonging to the genus *Trichoderma* are one of the main source of industrial cellulases and hemicellulases harnessed for the hydrolysis of complex compounds to simple sugars, which can then be converted to other chemicals. It is known that nutrient profiling can reveal potent inducers. Therefore we used the phenotype microarray system (PM), to indicate sources that may potentially play a key role in optimization of culture its conditions, optimization of the sporulation and germination, or even optimization of the production of secondary metabolites those filamentous fungi, search for new active substances, such as enzymes.

The phenotype microarray system describes the total physiological activity of microorganisms. PM4 plate was used to collect information about global phosphorus (59 different sources) and sulphuric compounds (35 different sources) utilization profiles of G79/11 strain.

G79/11 strain was isolated in Laboratory of Molecular and Environmental Microbiology, IA PAS from dairy sewage sludge and identified as *Trichoderma atroviride* upon large subunit ribosomal RNA gene partial sequence. *T. atroviride* strain was cultured on medium with cellulose for 14 days at 27°C. Subsequently 100 µl of mechanically homogenized spore suspension (62% T) in sterile FF-inoculating fluid with supplement added, (D-glucose) was inoculated into (PM4) (prepared according to Biolog® PM procedure for filamentous fungi) and incubated at 27°C in OmniLog System. The Phenotype MicroArray (PM) software was used to analyzed the PM results.

The most consumed phosphorus sources, located on PM4, were as follows: Adenisine 2',3'-Cyclic Monophosphate, which was utilized at 12.7% higher

level, Phosphoenol Pyruvate (activity greater of 3.6%) and O-Phospho-D-Tyrosine (15.8%). On the other hand presence of Nitrate Biuret, D-Serine, D-Glucosamine caused total inhibition of G79/11 activity. The rest of substrates did not reveal any differences in G79/11 activity comparing to the control well. As far as sulphuric sources, none of them caused complete inhibition of G79/11 activity. However, among others Sulfate, Thiosulphate, Tetrathionate, Thiophosphate, Taurine and Taurine-related substances, D,L Lipoamide, Sulphone-related substances caused even 50% of activity inhibition. On the contrary, presence of Methionine-related substrates, Glutathione, Lanthionine, and Cystathionine revealed up to 35% greater activity.

Oznaczenie markerów stresu oksydacyjnego u *Metarhizium robertsii* w obecności nonylofenolu

Anna Pawlak¹, Sandra Frączak¹, Sylwia Różalska², Jerzy Długoński²

¹Studenckie Koło Naukowe Biotechnologiczno-Mikrobiologiczne
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

²Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i
Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Wstęp. Nonylofenole (NPs) są to ksenobiotyki zbudowane z pierścienia fenolowego, do którego w pozycji *para* przyłączony jest dziewięciowęglowy łańcuch alkilowy. Związki te pochodzą z rozpadu niejonowych surfaktantów – etoksylatów nonylofenoli, które przedostają się głównie do wód powierzchniowych i gleby. Zarówno NPs, jak i ich etoksylaty, produkowane są na szeroką skalę i powszechnie stosowane jako detergenty, emulgatory oraz środki dyspersyjne. Są one zaliczane do modulatorów hormonalnych i mogą wiązać się z receptorami endogennych hormonów i imitować ich działanie, stymulując rozwój nowotworów hormonozależnych. NPs mogą być degradowane przez grzyby strzępkowe, ale jak do tej pory nie poznano mechanizmów obronnych tych organizmów w odpowiedzi na stres spowodowany obecnością tych związków.

Cel pracy. Oznaczenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych w komórkach *M. robertsii*, inkubowanych z dodatkiem technicznego nonylofenolu (tNP).

Materiały i metody. Hodowle grzybów strzępkowych *M. robertsii* z tNP w stężeniu 25 i 50 mg/L oraz kontrolę biotyczną inkubowano przez 1 i 3 h w temperaturze 28°C. Następnie hodowle sączono, a otrzymaną biomasę ucierano z dodatkiem 0,05 M buforu fosforanowego pH = 7. Zawiesinę wirowano, a uzyskany supernatant umieszczono w łaźni lodowej. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach grzybów w obecności i nieobecności tNP oznaczano spektrofotometrycznie, dodając do supernatantu 0,05 M bufor fosforanowy pH = 7 i 1% nadtlenek wodoru (oznaczanie aktywności katalazy, CAT), 0,05 M buforu fosforanowego pH=7.8, zawierającego metioninę, NBT i EDTA, oraz ryboflawinę (oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, SOD), 0,05 M buforu octanowego pH = 5.6, 5,4 mM gwajakolu i 1 % nadtlenek wodoru (oznaczanie aktywności

peroksy
Wyniki
3 a 11 p
łożu, n:
Zaobser
mywała
μmol/1h
aktywno
szczepu
wzrostu
mmol/1
ści kser
na była
wynosił
IM 651
zymu.
Wniosl
nych er
wysoką
miast w
oraz IM
prowadz

An
¹Biotech
Inc
²Dep
Biolog

Introdu
phenol 1
These co
– nonylp
their eth
emulsific
and can
stimulati
degradec
response
recogniz
Study of
cells of
(tNP).