

TERESA KRZYŚKO-LUPICKA, KATARZYNA GRATA

OCENA WRAŻLIWOŚCI WYBRANYCH GRZYBÓW ŚRODOWISKOWYCH NA FOSFORAN MOCZNIKA

THE ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL FUNGI SENSITIVITY ON UREA PHOSPHATE

Katedra Biologii Molekularnej i Eksperymentalnej
Uniwersytet Opolski
45-035 Opole, ul. Kard. Kominka 4
Kierownik Katedry: prof. dr hab. A. Latała
e-mail: teresak@uni.opole.pl

*W pracy przedstawiono efekt działania różnych stężeń fosforanu mocznika na 6 szczepów grzybów środowiskowych różniących się intensywnością wzrostu, sposobem zarodnikowania i typem tworzonych zarodników (*Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium resinae*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus nigricans*). Fosforan mocznika już w stężeniu 3% w sposób statystycznie istotny ograniczał wzrost masy grzybni wszystkich testowanych grzybów.*

WSTĘP

Poszukiwania skutecznie działających wobec bakterii i grzybów, a równocześnie bezpiecznych środków dezynfekcyjnych prowadzone są na całym świecie. Jedną ze skutecznych i szybkich metod niszczenia patogenów jest stosowanie środków chemicznych. Powinna je cechować wysoka skuteczność i niska toksyczność w stosunku do organizmów stałocieplnych i roślin. Takie warunki spełnia fosforan mocznika $\text{CO}(\text{NH}_2)_2 \times \text{H}_3\text{PO}_4$, otrzymany w formie krystalicznej w wyniku reakcji kompleksowania kwasu fosforanowego i mocznika, do celów paszowych [5]. Zastosowanie go jako składnika ekologicznych nawozów mineralno-organicznych wskazało na jego właściwości dezynfekcyjne objawiające się redukcją liczebności zarówno bakterii wynoszącą od 99,4% do 99,9% jak i grzybów od 41,1% do 58,6% [9]. Jednak po 4 tygodniach, w wyniku adaptacji czy też degradacji fosforanu mocznika następował ponowny wzrost populacji grzybów.

W badaniach laboratoryjnych wykazano zróżnicowaną wrażliwość 11 szczepów bakterii saprofitycznych i potencjalnie chorobotwórczych na 1%-12% stężenie fosforanu mocznika. Najwyższą wrażliwość bakterie wykazywały na stężenie 6%-12%, z wyjątkiem szczepów *E. coli*, *Streptococcus faecalis* i *Sarcina sp.* [6].

Z higienicznego punktu widzenia grzyby strzępkowe zanieczyszczające środowisko (gleba, woda, ścieki, naturalne nawozy organiczne, powietrze, pomieszczenia mieszkalne i magazynowe oraz produkty spożywcze i pasze) są szczególnie niebezpieczne bo często stanowią czynniki alergizujące, a tworzone przez nie mikotoksyny należą do jednych

z najgroźniejszych związków rakotwórczych [11]. Okoliczności zanieczyszczenia mogą być rozmaite, a intensywność ich rozwoju zależna jest od czynników abiotycznych i sposobu odżywiania grzybni. Przeżywalność ich w środowiskach bogatych w substancje organiczne jak i mechanizm działania w tych warunkach preparatów dezynfekcyjnych nie jest dostatecznie poznany. W literaturze brak jest danych na temat grzybobójczych czy grzybobójczych czy grzybostatycznych właściwości fosforanu mocznika.

Celem badań była ocena wpływu różnych dawek fosforanu mocznika na wzrost wybranych grzybów środowiskowych różniących się intensywnością rozwoju i typem tworzonych zarodników.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły wybrane szczepy grzybów strzępkowych warunkowo chorobotwórczych wyizolowanych z: pasz – *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus nigricans* gnojowicy – *Penicillium italicum* oraz gleby traktowanej Roundupem, zdolne do biodegradacji związków fosforoorganicznych – *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* i *Cladosporium resinae* [7, 8]. Ich przynależność gatunkową oznaczono na podstawie cech morfologicznych wg kluczy diagnostycznych [1, 4].

W badaniach użyto fosforan mocznika w stężeniach: 1%, 3%, 6%, 9% i 12%.

Działanie różnych dawek fosforanu mocznika na testowane grzyby oceniano w płynnych hodowlach statycznych. Hodowle testowanych grzybów prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 ml w płynnym podłożu mineralnym Czapek do, którego wprowadzano fosforan mocznika w ilości dającej końcowe stężenie odpowiednio: 1%, 3%, 6%, 9% i 12%. Podłoża szczepiono wystandaryzowanym inokulum o tej samej gęstości dla wszystkich szczepów i inkubowano przez 10 dni w temperaturze 25°C. Następnie oznaczano suchą masę grzybni w temperaturze 105°C. Wyniki podano w gramach suchej masy/1dm³ hodowli. Kontrolę stanowił wzrost ww. grzybów w mineralnym podłożu *Czapek* (bez fosforanu mocznika).

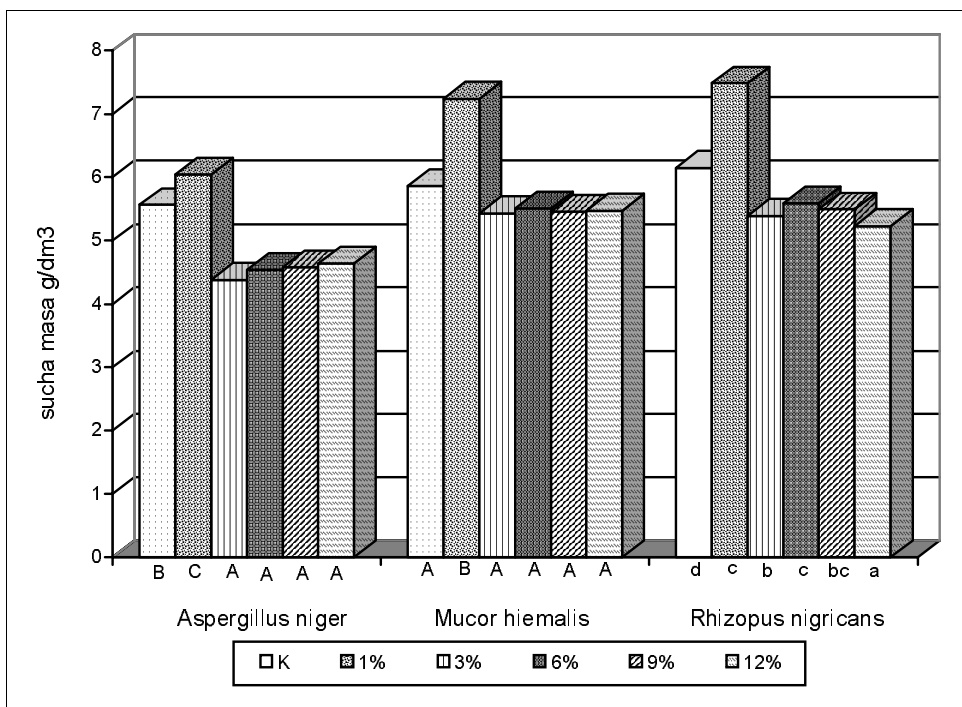
Oznaczenia wykonano w 5. powtórzeniach dla każdego szczepu. Wpływ różnych stężeń fosforanu mocznika na wzrost badanych grzybów opracowano statystycznie metodą wariancji jednoczynnikowej z zastosowaniem wielokrotnego testu rozstępu *Duncana*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badane szczepy grzybów wyraźnie różniły się intensywnością wzrostu w optymalnych warunkach hodowlanych:

- szczepy z podgromady *Zygomycotina* (*Mucor* i *Rhizopus*) oraz *Aspergillus niger* cechowała duża szybkość wzrostu grzybni,
- pozostałe szczepy z podgromady *Deuteromycotina* (*Aspergillus*, *Penicillium*) – cechował ograniczony wzrost grzybni, ale obficie wytwarzały zarodniki przez co szybko kolonizowały środowisko, a szczep *Cladosporium* wytwarzał zarodniki o zgrubiałej błonie, lepiej przystosowane do zachowania żywotności w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

Testowane szczepy grzybów strzępkowych w stosunku do kontroli wykazały zróżnicowaną wrażliwość na zastosowane dawki fosforanu mocznika, ale żadne z zastosowanych stężeń preparatu nie doprowadziło do całkowitego zahamowania ich wzrostu. Zastosowanie fosforanu mocznika w najniższym stężeniu (1%) pozwoliło wydzielić dwie grupy grzybów: w pierwszej obserwowano istotne ($P < 0,05$) hamowaniem przyrostu suchej masy grzybni (5-18%) szczepów *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium italicum* i wysokoistotnym



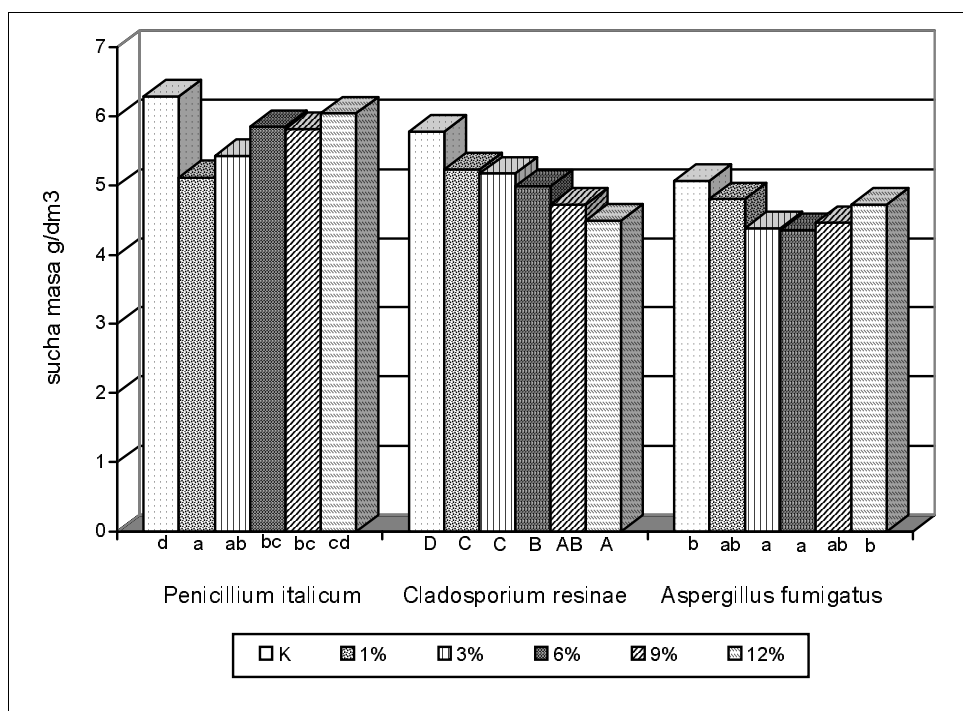
małe litery – różnice istotne ($p < 0,05$); small letters - significant at ($p < 0,05$)

duże litery – różnice wysoko istotne ($p < 0,01$); capital letters - highly significant difference at ($p < 0,01$)

Ryc. 1. Efekt zahamowania wzrostu grzybów *Penicillium italicum*, *Cladosporium resinae* i *Aspergillus fumigatus* w obecności różnych stężeń fosforanu mocznika (FM) wyrażony w gramach suchej masy (g s.m./1dm^3).

Effect of inhibition growth fungal *Penicillium italicum*, *Cladosporium resinae* and *Aspergillus fumigatus* by various doses of urea phosphate (FM) in gram dry mass (g.d.m./1dm^3).

($P < 0,01$) *Cladosporium resinae* (9,4%) w porównaniu z kontrolą (Ryc. 1) oraz grupę drugą (Ryc. 2) w której wystąpił statystycznie istotny przyrost masy grzybni w porównaniu do kontroli wynoszący 8,7%-23% dla *Aspergillus niger*, *Rhizopus nigricans* i *Mucor hiemalis*. Niskie dawki wykazały działanie stymulujące na grzyby cechujące się dużą szybkością wzrostu. W stężeniach wyższych (3-12%) obserwowano natomiast istotne hamowanie wzrostu testowanych grzybów niezależne od ich właściwości fizjologicznych (tempa wzrostu czy typu tworzonych zarodników). Jedynie *Mucor hiemalis* (Ryc. 2) nie wykazał wrażliwości na wyższe stężenia preparatu dając przyrosty masy identyczne jak w kontroli ($p < 0,01$). Niemal identycznie preparat ten oddziaływał ($P < 0,01$) w obrębie szczepu *Aspergillus niger*; natomiast wzrost *Rhizopus nigricans* był najsilniej ($P < 0,05$) hamowany przez testowany związek w stężeniu 12%, powodując 15% obniżenie przyrostu suchej masy grzybni. Niewiele niższy, bo 12,3% spadek masy odnotowano pod wpływem 3% stężenia preparatu (Ryc. 1). Druga grupa grzybów *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus* i *Cladosporium resinae* była hamowana przez wszystkie zastosowane stężenia związku dezynfekcyjnego przy czym najsilniejsze statystycznie istotne lub wysokoistotne hamowanie przyrostu



małe litery – różnice istotne ($p < 0,05$); small letters - significant at ($p < 0,05$)

duże litery – różnice wysoko istotne ($p < 0,01$); capital letters - highly significant difference at ($p < 0,01$)

Ryc. 2. Efekt zahamowania wzrostu grzybów *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* i *Rhizopus nigricans* w obecności różnych stężeń fosforanu mocznika (FM) wyrażony w gramach suchej masy (g s.m./1dm³).

Effect of inhibition growth fungal *Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* and *Rhizopus nigricans* by various doses of urea phosphate (FM) in gram dry mass (g.d.m./1dm³).

masy grzybni odnotowano pod wpływem 1% stężenia fosforanu mocznika na szczep *P. italicum* (wynoszące 19% i nieznacznie niższe 14% ograniczenie przyrostu grzybni w obecności 3%), identyczne działanie wykazał 3 i 6% fosforan mocznika na *A. fumigatus*, a 12% fosforan mocznika na *Cl. resinae* (22% obniżenie masy grzybni, natomiast tylko 10% hamowanie występowało przy 3% stężeniu preparatu) (Ryc. 2). Fosforan mocznika już w stężeniu 3% istotnie ograniczał przyrost masy grzybni wszystkich testowanych szczepów w przedziale od 7,3% (*M. hiemalis*) do 21,2% (*A. niger*), ale rozwój *Cl. resinae* i *R. nigricans* najsilniej ograniczał w stężeniu 12%.

DYSKUSJA

Działanie środków grzybobójczych zależy od składu preparatu, dawki i czasu jego działania oraz od fizjologii komórki grzyba [10]. Preparaty chemiczne najczęściej zakłócają procesy energetyczne, biosyntezę lub podziały mitotyczne grzybów strzępkowych prowa-

dząc do odwracalnego zahamowania czynności życiowych (fungistasis) lub nieodwracalnego zakłócenia funkcji energetycznych komórki lub zniszczenia jej struktury (działanie grzybobójcze).

Różne gatunki grzybów cechuje różna wrażliwość na działanie środków grzybobójczych. Największą wrażliwość na chemiczne środki dezynfekcyjne wykazuje wegetatywna grzybnia natomiast ciała owocowe czy chlamydospory ze względu na niską aktywność wodną i wzrost nienasyconych kwasów tłuszczowych, są bardziej odporne [3]. W badaniach własnych poza efektem hamowania rozwoju struktur wegetatywnych zaobserwowano istotny przyrost masy grzybni w obecności 1% fosforanu mocznika (w porównaniu do kontroli) szczepów *Rhizopus nigricans*, *Mucor hiemalis* i *Aspergillus niger* co mogło być wynikiem wykorzystania go jako źródła składników pokarmowych, najprawdopodobniej jako źródła fosforu. Wskazywać na to mogą wcześniejsze badania, w których wykazano, że zarówno *Mucor hiemalis* jak i *Aspergillus niger* oraz *Cladosporium resinae* są zdolne do wykorzystywania związków fosforoorganicznych albo nabywają na nie oporności [2, 7, 8] co obserwowano w przypadku *Mucor hiemalis*.

Wzrost *Cladosporium resinae* był jednak wyraźnie hamowany przez wszystkie dawki stosowanego preparatu, pomimo, że tworzone zarodniki o zgrubiałej błonie są lepiej przystosowane do zachowania żywotności w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

Wskazuje to wyraźnie, że dezynfekcyjne działanie preparatu w wyższych stężeniach zależy od właściwości szczepów grzybów i nie ma bezpośredniego związku z tempem wzrostu grzybni i typem tworzonych zarodników. Jednak grzyby cechowała większa niż bakterie wrażliwość na zastosowane dawki fosforanu mocznika [6].

WNIOSKI

1. Fosforan mocznika zastosowany w stężeniu 3% istotnie ograniczał rozwój struktur wegetatywnych wszystkich testowanych grzybów środowiskowych – *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium resinae*, *Mucor hiemalis* i *Rhizopus nigricans*.

2. Wrażliwość grzybów na stosowany preparat dezynfekujący w najniższym stężeniu (1%) zależała od intensywności ich rozwoju – obserwowano stymulację wzrostu szczepów cechujących się dużą szybkością wzrostu grzybni (*Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* i *Rhizopus nigricans*).

T. Krzyśko-Łupicka, K. Grata

THE ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL FUNGI SENSITIVITY ON UREA PHOSPHATE

Summary

In this paper the authors presented the influence of various urea phosphate doses, 1-12%, on the environmental fungi growth depending on its intensity and the type of created spore e.g. (*Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium resinae*, *Mucor hiemalis* i *Rhizopus nigricans*).

The result of urea phosphate effect on fungi was estimated by static culture method using dry mass increase change [g. dry mass/ldm³]. The control was created by the growth of the above men-

tioned fungi on the basis of urea phosphate free soil. The obtained results were worked out by a statistic method using *Duncan's* test.

The tested fungi showed different sensitivity to the various urea phosphate doses. In the presence of 1% urea phosphate the fungi sensitivity depended on their growth intensity (*Aspergillus niger*, *Mucor hiemalis* i *Rhizopus nigricans*). Additionally, the stimulation of fungi growth with rapid vegetative structure progress was observed. Independently of their physiological properties, significant inhibition of dry mass increase in the range of 3-12% concentration urea phosphate was observed. The result of the use of 3% urea phosphate was the reduction of dry mass growth of all tested fungi.

PIŚMIENNICTWO

1. Barnett H.L., Hunter B.B.: Illustrated genera of Imperfect Fungi. APS Pres The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota, Wydanie IV, 1999.
2. Bujacz B., Wieczorek P., Krzyśko-Łupicka T., Gołqb Z., Lejczak B., Kafarski P.: Organophosphate utilization by the wild-type strain of *Penicillium notatum*. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61, 2905-2910.
3. Bundgaard-Nielsen K., Nielsen P.V.: Fungicidal effect of desinsectans against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. J. Food Prot. 1995, 59, 268-275.
4. Fassativa O.: Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Wydanie I, Warszawa 1983 .
5. Górecki H., Hoffman J., Kuzko A., Schroeder J.: Próbną produkcją paszowego fosforanu mocznika. Przemysł Chemiczny 1982, 01, 7, 185-187.
6. Krzyśko-Łupicka T., Latała A., Zydroń K., Namysło P.: Badanie wpływu fosforanu mocznika na wybrane szczepy bakterii. Prace Nauk. Instytutu Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych Politechniki Wrocławskiej, Seria Konferencje 1996, 45, 26, 340-345.
7. Krzyśko-Łupicka T., Orlik A.: The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection soil-borne fungal strains capable to degrade this herbicide. Chemosphere 1997, 34, 12, 2601-2605.
8. Krzyśko-Łupicka T., Strof W., Skorupa M., Wieczorek P., Lejczak B., Kafarski P.: The ability of soil fungi to degrade organophosphate carbon-to phosphorus bond. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997, 48, 459-552.
9. Latała A., Zydroń K., Krzyśko-Łupicka T., Namysło P.: Badanie wpływu wybranych preparatów chemicznych na mikroflorę kurzeńca. Prace Nauk. Instytutu Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych Politechniki Wrocławskiej, Seria Konferencje, 1996, 45, 26, 346-349.
10. Müller E., Loeffler W.: Zarys mikologii dla przyrodników i lekarzy, PWRiL 1987.
11. Seńczuk W.: Toksykologia, PZWL 1989.

Otrzymano: 2004.01.08