

**Badania i Rozwój
Młodych Naukowców w Polsce**

Nauki przyrodnicze
Tom I Część II



www.MlodziNaukowcy.com

Redakcja naukowa

dr inż. Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny

Korekta, skład i łamanie, projekt okładki

dr inż. Jędrzej Nyćkowiak

mgr Marta Nyćkowiak

Wydawca

Młodzi Naukowcy

dr Jędrzej Nyćkowiak

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość) 978-83-942083-1-8

ISBN 978-83-65362-03-2

Ilość znaków w książce:

364tys. (bez ilustracji)

Ilość znaków w książce:

504tys. (bez ilustracji)

Nakład całości 380 egz.

Prace zostały wydrukowane zgodnie z przesłanym tekstem,
na odpowiedzialność ich autorów.

5. Profilowanie metaboliczne grzybów z rodzaju *Neosartorya* i *Aspergillus* wyizolowanych z truskawek

Gryta Agata ⁽¹⁾, Frąc Magdalena ⁽¹⁾, Oszust Karolina ⁽¹⁾, Bilińska-Wielgus Nina ⁽¹⁾, Piotrowska Małgorzata ⁽²⁾

⁽¹⁾Institut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

⁽²⁾Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

Opiekun naukowy: dr hab. Magdalena Frąc, m.frac@ipan.lublin.pl

Słowa kluczowe: Biolog FF Plates, pleśnie termooporne, metaboliczny odcisk palca grzybów

Praca Naukowa finansowana przez Narodowe Centrum Nauki, projekt: SONATA 4,

grant: DEC-2012/07/D/NZ9/03357.  **SONATA 4**

Streszczenie

Obecność grzybów termoopornych w surowcach rolniczych jest potencjalnym zagrożeniem ze względu na ich dużą odporność na czynniki zewnętrzne. Grzyby z rodzaju *Neosartorya* i *Aspergillus* powszechnie występują w glebie i mogą zakażać surowce rolnicze np. owoce. Zanieczyszczone owoce są niebezpieczne dla przetwórstwa, ponieważ mogą prowadzić do skażeń produktów spożywczych. Charakterystyka metaboliczna grzybów, przy użyciu płytek Biolog FF może być pomocna w opracowaniu nowych, bezpiecznych metod zapobiegających rozwojowi tych mikroorganizmów.

1. Wstęp

Grzyby tworzą dużą i zróżnicowaną grupę organizmów. Są to eukariotyczne organizmy heterotroficzne, ich wzrost jest uwarunkowany dostępnością materii organicznej, energii oraz składników pokarmowych w środowisku. Wykazują się dużym zróżnicowaniem pod względem sposobu pozyskiwania składników pokarmowych, mogą wykorzystywać resztki organiczne obecne w środowisku (saprotrofy), a także poprzez symbiozę lub pasożytnictwo mogą pozyskiwać składniki odżywcze z tkanek innych organizmów żywych. Biorąc pod uwagę praktyczne wykorzystanie, grzyby można podzielić na tzw. grzyby strzępkowe, drożdże oraz grzyby wyższe. Są to organizmy, które można znaleźć we wszystkich środowiskach: wodzie, glebie, powietrzu, odpadach i wielu innych ekosystemach. Gleba, ze względu na bogatą i zróżnicowaną zawartość składników odżywczych, jest siedliskiem życia bardzo wielu mikroorganizmów, tj. wirusy, bakterie, grzyby, pierwotniaki będąc rezerwuarem różnorodności biologicznej. Ze względu na obecność w glebie różnych mikroorganizmów może być ona również źródłem wielu zanieczyszczeń mikrobiologicznych stanowiąc zagrożenie dla surowców rolniczych. Dla przetwórców jakość surowców rolniczych ma bardzo szeroki aspekt, bo poza cechami sensorycznymi o jakości gotowego produktu oraz opłacalności i wydajności produkcji decyduje również skład chemiczny surowców, głównie zawartość suchej masy (w przypadku warzyw) lub ekstraktu (w przypadku owoców), kwasowość oraz obecność innych składników na przykład o działaniu prozdrowotnym (polifenole, witaminy, karotenoidy, błonnik, minerały). Bardzo ważne jest również bezpieczeństwo surowców i otrzymywanych z nich produktów. Zgodnie z rozporządzeniami unijnymi za bezpieczeństwo produktów odpowiadają producenci i w przypadku stwierdzenia skażenia żywności producent musi usunąć z rynku produkt stanowiący zagrożenie dla konsumentów. Do zanieczyszczeń związanych z surowcem zalicza się: mikroorganizmy, w tym patogenne (chorobotwórcze), mykotoksyny wytwarzane przez grzyby strzępkowe, skażenia chemiczne (azotany (III) i (V), metale ciężkie, substancje promieniotwórcze, dioksyny, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz pozostałości środków ochrony roślin).

jest grup
na proc
Ponadto
W war
mykoto
Poprzez
i in. 20
produkc
gatunk
flavus.
(owoce
zakażeń
owoców
zaniecz
zarodni
zakażaj
grzybn
przeży
86°C)
skażon
technik
powsze
grzybó
wiele z
zdrowi
wzrast
powod
związk
zabezp
grzyba
nowyc
o właś
charak
metabo
się do

system
się u
różni
Zarów
wykor
grzybó
dany s
opiera
identy
i in. 2
umies
wykor
a naw
zabary
barwy

Jedną z bardziej niebezpiecznych grup grzybów strzępkowych występujących w glebie jest grupa grzybów termoopornych. Grzyby termooporne charakteryzują się wysoką odpornością na procesy pasteryzacji, są zdolne przeżyć nawet 30 minutowe ogrzewanie w temperaturze 75°C. Ponadto są mikroaerofilami tzn. mogą rozwijać się przy ograniczonym dostępie tlenu. W warunkach stresu (odżywczego, osmotycznego, temperaturowego) mogą wytwarzać mykotoksyny, będące szkodliwymi dla zdrowia człowieka metabolitami wtórnymi grzybów. Poprzez kontakt owoców z zanieczyszczoną glebą, może dochodzić do ich kontaminacji (Frąc i in. 2015). Takie zanieczyszczone owoce mogą powodować skażenie dżemu, soku lub innych produktów owocowych. Jednymi z najbardziej niebezpiecznych i często występujących gatunków grzybów strzępkowych są *Neosartorya fischeri*, *Byssoschlamys fulva* i *Talaromyces flavus*. Sortowanie oraz eliminacja z procesu przetwórczego owoców z widocznymi zmianami (owoce uszkodzone, z widoczną pleśnią) w dużej mierze pozwala chronić produkt końcowy przed zakażeniem, co nie oznacza jednak całkowitej ochrony przed rozwojem grzybów. Zakażenie owoców grzybami strzępkowymi następuje podczas kontaktu owocu z glebą. Owoce mogą być zanieczyszczone nie tylko fragmentami grzybni, konidiami, ale również askosporami, czyli zarodnikami stadium doskonałego, powstającymi w workach. Askospory mogą być czynnikiem zakażającym, i jeśli znajdą warunki odpowiednie do wzrostu mogą rozwinąć się i wytworzyć grzybnie. Są odporne na wiele czynników zewnętrznych takich jak: zakwaszenie (mogą przeżywać nawet przy niskich wartościach pH), niska zawartość tlenu, wysokie temperatury (70-86°C) (Gumus i in. 2010). Właściwości te sprawiają, że grzyby te trudno wyeliminować ze skażonych surowców. Zakłady przetwórstwa owocowego i warzywnego stosują bardzo różne techniki ochrony żywności lub wydłużenia ich przydatności do spożycia. Najbardziej powszechne jest stosowanie związków chemicznych, które mają na celu ograniczanie rozwoju grzybów w przechowywanych surowcach. Jednakże stosowanie tego typu ochrony niesie ze sobą wiele zagrożeń związanych z niebezpiecznym i toksycznym oddziaływaniem tych związków na zdrowie człowieka (działanie rakotwórcze, zaburzenia hormonalne) i środowisko. Ponadto wzrastająca świadomość konsumentów na temat ochrony zdrowia oraz bezpiecznej żywności powoduje większe zainteresowanie produktami naturalnymi bez dodatku syntetycznych związków chemicznych. Dlatego też wszelkie techniki alternatywne mające na celu zabezpieczanie przed zakażeniami mikrobiologicznymi w tym zakażeniami termoopornymi grzybami strzępkowymi zyskują w ostatnich latach coraz większą popularność. Poszukuje się nowych, bezpiecznych i naturalnych związków na przykład pochodzenia roślinnego, o właściwościach antymikrobiologicznych. Ponadto bardzo ważnym etapem jest dokonanie charakterystyki metabolicznej tych patogenów co pozwoli na określenie ich profilu metabolicznego. Uzyskanie informacji na temat metabolizmu grzybów niewątpliwie przyczyni się do skuteczniejszej prewencji przed zakażeniami.

Jedną z nowoczesnych metod określania profilu metabolicznego mikroorganizmów jest system Biolog (Stefanowicz 2006). Poszczególne gatunki grzybów strzępkowych charakteryzują się unikalnym biochemicznym odciskiem palca, w wyniku zdolności do rozkładu zróżnicowanych prostych oraz złożonych związków, niezbędnych do produkcji metabolitów. Zarówno morfologiczny, jak i biochemiczny profil tych mikroorganizmów może być wykorzystywany do identyfikacji (Shugeng i in. 2009). Ponadto ocena profilu metabolicznego grzybów może być przydatna w określeniu związku lub grupy związków, które oddziałują na dany szczep niekorzystnie np. poprzez zahamowanie wzrostu. System Biolog FF MicroPlate opiera się na ocenie „metabolicznego odcisku palca”, wykorzystywanego zarówno do szybkiej identyfikacji grzybów, jak i w skringingu i charakterystyce profilu metabolicznego (Druzhinina i in. 2006). Wykorzystywane w tej metodzie 96 dołkowe płytki FF zawierają 95, oddzielnie umieszczonych substratów, które podczas inkubacji zaszczerpionej grzybnia płytki są wykorzystywane do wzrostu grzybni oraz wodę jako kontrolę negatywną. Każdy rodzaj, gatunek, a nawet szczep grzyba tworzy unikalny dla siebie wzór metaboliczny, określony przez zmianę zabarwienia jaka zachodzi podczas utleniania związku obecnego w dołku. Poza odczytem zmiany barwy (490 nm) system Biolog FF analizuje również wzrost grzybni poprzez pomiar gęstości

optycznej (OD) przy długości fali 750 nm. Substraty umieszczone na płytce Biolog FF można zaklasyfikować do następujących grup związków (Preston-Mafham i in. 2002):

- węglowodany (N-acetylo-D-galaktozamina – A3, N-acetylo-D-glukozaamina – A4, N-acetylo-D-mannozaamina – A5, Adonitol – A6, D-arabinoza – A8, L-arabinoza – A9, D-arabitol – A10, Arbutyna – A11, D-celobioza – A12, Erytritol – B4, D-fruktoza – B5, L-fukoza – B6, D-galaktoza – B7, Gencjobjoza – B9, α -D-glukoza – B12, m-inozytol – C6, α -D-laktoza – C8, Laktuloza – C9, Maltitol – C10, Maltoza – C11, Maltotrioza – C12, D-mannitol – D1, D-mannoza – D2, D-melezytoza – D3, D-melibioza – D4, α -metylo-D-galaktozyd – D5, β -metylo-D-galaktozyd – D6, α -metylo-D-glukozyd – D7, β -metylo-D-glukozyd – D8, Palatynoza – D9, D-psikoza – D10, D-rafinoza – D11, L-ramnoza – D12, D-ryboza – E1, Sedoheptulozan – E3, D-sorbitol – E4, L-sorboza – E5, Stachioza – E6, Sacharoza – E7, D-tagatoza – E8, D-trehaloza – E9, Turanoza – E10, Ksylitol – E11, D-ksyloza – E12),
- aminy i amidy (D-glukozaamina – B11, Glukuronamid – C2, Alaninamid – G7, 2-aminoetanol – H8, Putrescyna – H9),
- aminokwasy (Kwas γ -aminomasłowy, L-alanina – G8, L-asparagina – G10, Kwas L-asparaginowy – G11, Kwas L-glutaminowy – G12, Kwas glicylo-L-glutaminowy – H1, L-ornityna – H2, L-fenylalanina – H3, L-prolina – H4, Kwas L-piroglutaminowy – H5, L-seryna – H6, L-treonina – H7),
- kwasy karboksylowe i ketonowe (Kwas D-galakturonowy – B8, Kwas D-glukonowy – B10, Kwas D-glukuronowy – C3, Kwas 2-okso-D-glukonowy – C7, Kwas fumarowy – F3, Kwas β -hydroksymasłowy – F4, Kwas γ -hydroksymasłowy – F5, Kwas p-hydroksyfenylooctowy – F6, Kwas α -oksoglutarynowy – F7, Kwas L-mlekowy – F9, Kwas D-jabłkowy – F10, Kwas L-jabłkowy – F11, Kwas chinowy – F12, Kwas D-glukarowy – G1, Kwas sebacynowy – G2, Kwas bursztynowy – G4, Kwas N-acetylo L-glutaminowy – G6),
- polimery (Tween 80 – A2, α -cyklodekstryna – B1, β -cyklodekstryna – B2, Dekstryna – B3, Glikogen – C5),
- pozostałe (Amygdalina – A7, Fosforan 1-glukozy – C1, Glicerol – C4, Salicyna – E2, Kwas bromobursztynowy – F2, D-mleczan metylu – F8, Bursztynian monometylu – G5, Adenozyna – H10, Urydyna – H11, Monofosforan 5'-adonozyny – H12).

Na podstawie wykonanych pomiarów i uzyskanych wyników oblicza się wskaźniki aktywności biologicznej do których należą:

- AWCD (ang. *Average Well Colour Development*) średnia absorbancja wyliczona na podstawie absorbancji 95 substratów, pomniejszona o wartość absorbancji dla wody (kontrola negatywna)

$$AWCD = \frac{\sum OD_i}{95}$$

gdzie: OD_i jest wartością absorbancji z każdego dołka pomniejszoną o wartość próby kontrolnej (z wodą) dla każdej płytki oddzielnie.

Wyliczona wartość AWCD jest miarą aktywności badanego szczepu grzyba.

- Wskaźnik R (różnorodności, ang. *Richness*), obliczony na podstawie liczby zużytych substratów węglowych, przyjmując jako dodatnią odpowiedź mikroorganizmów dla poszczególnych substratów absorbancję na poziomie >0,25.

Celem podjętych badań była charakterystyka metaboliczna środowiskowych szczepów z rodzaju *Neosartorya* i *Aspergillus* wyizolowanych z truskawek. Badania miały na celu ustalenie różnic w wykorzystaniu poszczególnych grup substratów węglowych w trakcie 216 godzin hodowli.

2. Materiały i metody

W doświadczeniu wykorzystano szczepy grzybów wyizolowanych ze środowiska metodą wysiewu płytkowego na stałe podłoże agarowe glukozowo-ziemniaczane (PDA). Szczepy zostały wyizolowane z truskawek zebranych z plantacji zlokalizowanych na Lubelszczyźnie.

Observacje makroskopowe kolonii prowadzono, zwracając uwagę na zabarwienie i strukturę kolonii, obecność wydzieliny, pigmentów oraz widocznych gołym okiem struktur. Ponadto prowadzono obserwacje mikroskopowe w preparatach bezpośrednich (mikroskop OLYMPUS CX 21). Na podstawie cech makro- i mikroskopowych korzystając z kluczy diagnostycznych prowadzono identyfikację rodzajową (Fassatiowa 1983; Samson i in. 1996).

Oceny profilu metabolicznego wybranych grzybów z rodzaju *Neosartorya* i *Aspergillus* dokonano przy użyciu Systemu Biolog FF Microplate (Biolog™, USA). Hodowle prowadzono na stałym podłożu agarowym glukozowo-ziemniaczanym (PDA) w 3 powtórzeniach przez 10 dni w temperaturze 30°C. W celu uzyskania profilu metabolicznych poszczególnych wybranych szczepów *Neosartorya* i *Aspergillus*, po 10 dniowej hodowli na płytkach Petriego, za pomocą sterylnego bawełnianego inokulatora pobierano fragmenty grzybni i wprowadzano do sterylnych worków zawierających 5 cm³ płynu inokulacyjnego FF-IF. Zawiesinę homogenizowano przy użyciu homogenizatora łopatkowego przez 40 sekund. Następnie pobierano uzyskaną zawiesinę do próbówki zawierającej płyn inokulacyjny aż do uzyskania gęstości o 75% przepuszczalności (T), dokonując pomiaru za pomocą turbidymetru (Biolog). Tak przygotowane inokulum wprowadzano do każdego dołka mikropłytki po 100 mm³. Hodowle prowadzono przez 216 godzin w temperaturze 30°C w ciemności. W 24-godzinnych odstępach czasowych dokonywano pomiarów (przy długości fali 750 nm) zmiany gęstości optycznej (OD). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono wskaźniki charakteryzujące profil metaboliczny: AWCD, R oraz określono procentowe wykorzystanie poszczególnych grup substratów węglowych. Dokonano również analizy statystycznej, przy zastosowaniu analizy skupień (algorytmu aglomeracji), odnosząc się do podobieństw i różnic pomiędzy analizowanymi szczepami grzybów w ich uzdolnieniach katabolicznych. W analizie skupień zastosowano metodę Warda/1-r Pearsona. Analizy dokonano przy użyciu programu Statistica v.10 (StatSoft).

3: Wyniki i dyskusja

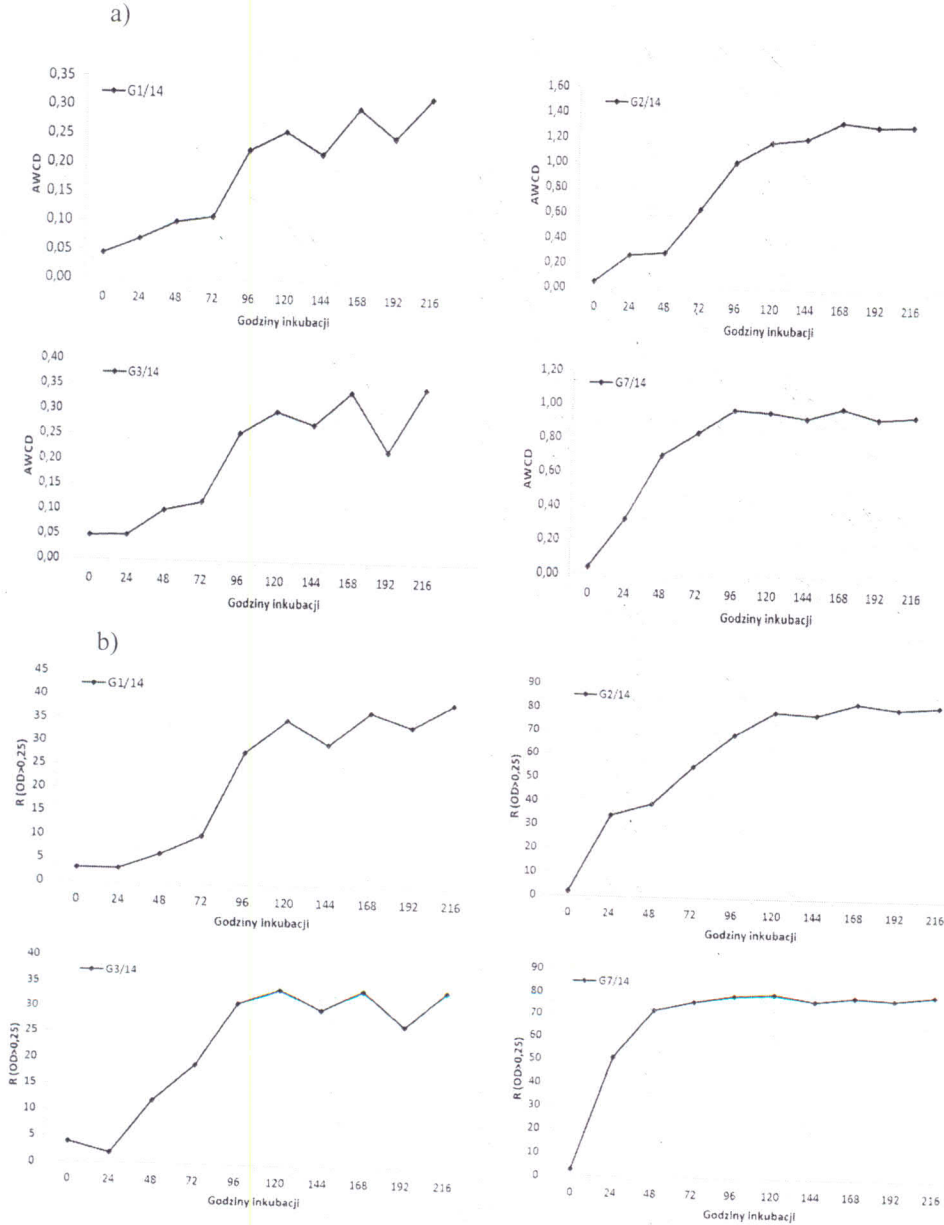
Na podstawie dokonanej identyfikacji wyizolowane ze środowiska szczepy grzybów G1/14, G2/14, G3/14 oraz G7/14 zaklasyfikowano odpowiednio do rodzaju *Neosartorya* oraz *Aspergillus*.

Ogólny trend zmian AWCD badanych grzybów termoopornych w trakcie 216 godzinnej hodowli został przedstawiony na Rys.1a. Dla wszystkich grzybów zaobserwowano typową krzywą AWCD. Przy czym wartość w 120 h hodowli została wybrana do analizy statystycznej. Grzyby G2/14 oraz G7/14 wykazały się dużo wyższą aktywnością w tym czasie (wartość AWCD wynosiła odpowiednio 1,2 oraz 1,0) niż szczepy G1/14 i G3/14 (AWCD odpowiednio 0,25 i 0,30). Dla wszystkich badanych grzybów odnotowano charakterystyczny powolny wzrost w początkowym etapie hodowli (do 72 godzin), intensywny i dynamiczny wzrost grzybni rozpoczął się pomiędzy 72-96 godziną inkubacji.

Na podstawie wskaźnika R (Rys.1b) można stwierdzić, że szczepy G1/14, G3/14 charakteryzowały się podobną liczbą utylizowanych substratów, 40-35 substratów z różnych kategorii. W przypadku szczepów G2/14 i G7/14 zaobserwowano zdolność kataboliczną w stosunku do 80-82 substratów.

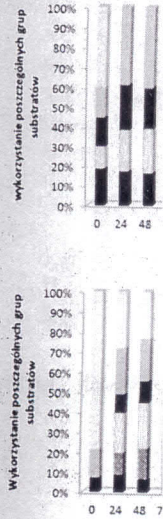
Uzyskane profile metabolicznego fingerprintingu, wskazały na uzdolnienia kataboliczne wszystkich badanych szczepów w stosunku do substratów ze wszystkich kategorii: polimerów, kwasów karboksylowych, węglowodanów, aminokwasów, amin/amidów oraz pozostałych substratów węglowych. Ogólnie można stwierdzić, że najintensywniej przebiegał katabolizm węglowodanów i aminokwasów. Porównując procent wykorzystania węglowodanów stwierdzono, że największe uzdolnienia kataboliczne w stosunku do tej grupy związków wykazały szczepy: G1/14, G2/14, G7/14. Szczep G3/14 również wykorzystywał węglowodany, ale w stosunku do pozostałych badanych szczepów, w mniejszym stopniu. Ponadto dla grzybów G3/14 i G7/14 stwierdzono dość dużą zdolność kataboliczną substratów z grupy aminokwasów. Natomiast aminy i amidy w trakcie 216 godzinnej hodowli były wykorzystywane w bardzo niewielkim stopniu (w zakresie od 0 do 20%) przez wszystkie badane szczepy (Rys.2).

Na Rys.3 przedstawiono wyniki analizy skupień zmiennych w zakresie uzdolnień katabolicznych w stosunku do pojedynczych substratów węglowych z poszczególnych kategorii. Szczep G2/14 bardzo intensywnie wykorzystywał większość węglowodanów, jedynie substraty zlokalizowane w dołkach o następujących oznaczeniach : A3, D7, A4, A5, E3, B6, D6, C8, C9 były słabo katabolizowane. Te same substraty były intensywnie katabolizowane przez szczep G7/14. Szczepy G1/14 oraz G3/14 posiadały niewielką zdolność do katabolizmu węglowodanów. W stosunku do substratów z grupy pozostałe największą aktywnością charakteryzował się szczep G7/14 i miał zdolność wykorzystania wszystkich substratów należących do tej grupy. Szczep G1/14 wykorzystywał jedynie amygdalinę (A7), podczas gdy G3/14 tylko fosforan l-glukozy (C1).

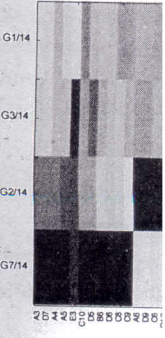


Rys.1 Profil metaboliczny grzybów G1/14, G2/14, G3/14, G7/14 określony przy pomocy wskaźników a) AWCD, b) R.

Subs
wykorzysta
katabolizowa
Z do
dotyczących
wskazują na
środowisk: gl
szerokie zast
(Lakhesar i
zaprojektowa
strzępkowych
odpowiedni d
gęstości grzyb

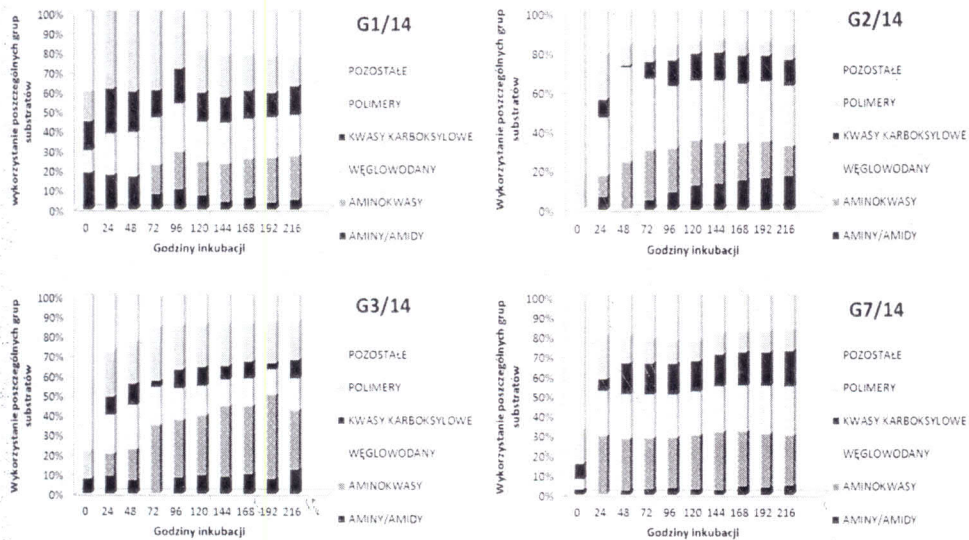


Rys.2 Procent

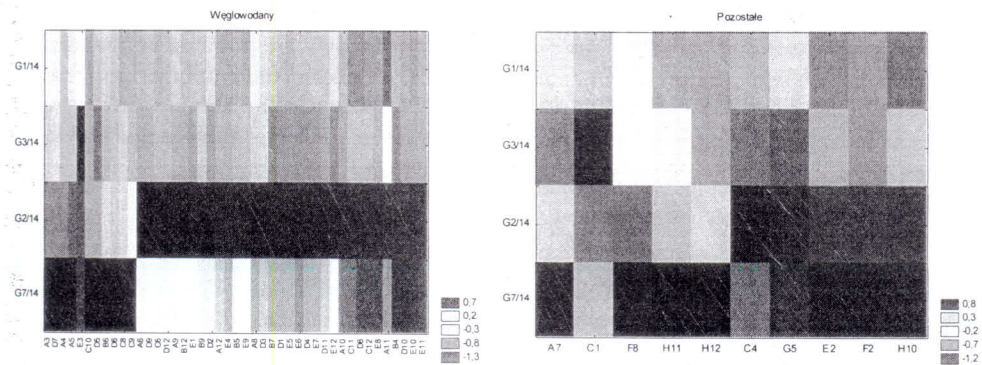


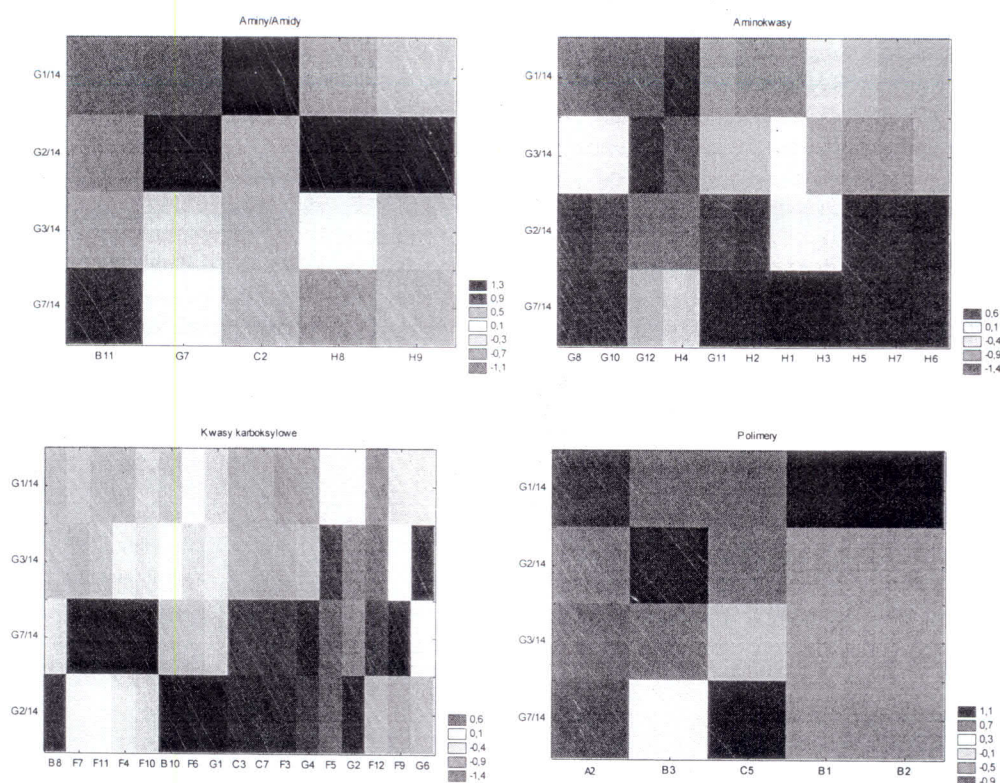
Substraty z grupy kwasów karboksylowych: C3, C7, F3, G4, G2, F12 były intensywnie wykorzystywane przez szczepy G7/14, G2/14. Uwagę zwracają również substraty: F5, G6, F12 katabolizowane przez G3/14 i G1/14.

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że do tej pory prowadzono niewiele badań dotyczących profilowania metabolicznego grzybów termoopornych, niemniej jednak dane wskazują na duże zainteresowanie profilem metabolicznym grzybów wyodrębnionych z różnych środowisk: gleba, odpady (Frąc 2012). Badania z wykorzystaniem płytek Biolog FF znalazły szerokie zastosowanie w określaniu dostępności czynników biologicznej ochrony roślin (Lakhesar i in. 2010). System profilowania metabolicznego Biolog został pierwotnie zaprojektowany dla organizmów prokariotycznych, następnie został zaadaptowany do grzybów strzępkowych poprzez wybór specyficznych źródeł węgla, których stopień utylizacji jest odpowiedni do zróżnicowania fenotypów grzybowych (Bochner i in 2001), poprzez pomiar gęstości grzybni (OD₇₅₀) (Atanasova i Druzhinina, 2010).



Rys.2 Procent wykorzystania grup substratów węglowych dla badanych szczepów.





Rys.3 Analiza skupień wykorzystania substratów węglowych z poszczególnych grup. Objasnienia: A1-H12 w tekście

4. Wnioski

Przeprowadzone badania wskazują na zróżnicowanie profilu metabolicznego grzybów. Wykazano, że najwyższą aktywnością metaboliczną charakteryzował się szczep G2/14. Wysoki poziom kataboliczny w stosunku do wszystkich analizowanych związków utrzymywał się do 216 godziny hodowli. Substraty należące do grup: węglowodanów, aminokwasów, polimerów, kwasów karboksylowych i ketonowych, pozostałych były ogólnie dość dobrze utylizowane. Jedynie substraty należące do amin i amidów były wykorzystywane w bardzo niewielkim stopniu przez wszystkie szczepy. Ta grupa związków stanowi więc potencjał do wykorzystania ich w celu hamowania rozwoju grzybów termoopornych.

5. Literatura

- Atanasova L, Druzhinina IS (2010) Global nutrient profiling by PhenotypeMicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidialfungi. *Journal of Zhejiang University Science* 11:151-168.
- Bochner BR, Gadzinski P, Panomitros E (2001) Phenotype MicroArrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research* 11:1246-1255.
- Druzhinina IS, Schmoll M, Seiboth B et al. (2006) Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant and transformant strain *Hypocrea jecorina*. *Applied Environmental Microbiology* 72:2126-2133.
- Fassatiowa O (1983) *Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej*. WNT.

- Frąc M (2012) Ocena mikologiczna osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich oraz jego wpływ na różnorodność funkcjonalną mikroorganizmów glebowych. Acta Agrophysica Monographie 1:1-140.
- Frąc M, Jezierska-Tys S, Yaguchi T (2015) Occurrence, detection and molecular and metabolic characterization of heat-resistant fungi in soils and plants and their risk to human health. 132:161-204.
- Gumus T, Demirci AS, Sagdic O et al. (2010) Inhibition of heat resistant molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* by some plant essential oils. Food Science and Biotechnology 19:1241-1244.
- Lakhesar DP, Backhouse D, Kristiansen P (2010) Nutritional constraints on displacement of *Fusarium pseudograminearum* from cereal straw by antagonists. Biology Control 55:241-247.
- Preston-Mafham J, Boddy L, Randerson PF (2002). Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon utilization profiles- a critique. FEMS Microbiology Ecology 42:1-14.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC et al. (1996) Introduction to food-borne fungi. CBS Baarn, The Netherlands.
- Shungeng F, Hongxun Z, Yanfen W et al. (2009) Analysis of fungal community structure in the soil of Zoige Alpine Wetland. Acta Ecologica Sinica 29:260-266.
- Stefanowicz A (2006) The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. Polish Journal of Environmental Studies 5:669-676.

■ 0.6
■ 0.1
■ 0.4
■ 0.9
■ 1.4

■ 1.1
■ 0.7
■ 0.3
■ 0.1
■ 0.5
■ 0.9

n grup.

rzybów.
Wysoki
do 216
merów,
owane.
stopniu
ia ich

a tool
ejiang

ghput

t-type,
nology