

PRZEGLĄD WYBRANYCH METOD SKRININGOWYCH DO OZNACZANIA WŁAŚCIWOŚCI FUNGIŚTATYCZNYCH POTENCJALNYCH ŚRODKÓW OCHRONY DREWNA

Patrycja W. Kwaśniewska, Grzegorz Cofia

Streszczenie: Ochrona surowca drzewnego przed czynnikami biodegradacji zaczyna się już w lesie i ma charakter zapobiegawczy. Obecność grzybów oraz pleśni stanowi główną przyczynę obniżenia trwałości drewna, powodując spadek jego wartości jako materiału. W celu ochrony drewna przed destrukcyjnym działaniem mikrogrzybów oraz grzybów rozkładających drewno, stosuje się odpowiednie środki zabezpieczające. Do wstępnego oznaczenia aktywności biologicznej wybranych substancji chemicznych, stosuje się tzw. testy skriningowe, pozwalające na szybkie zidentyfikowanie ich właściwości fungistatycznych, takie jak bioautografia, metody dyfuzyjne i metody rozcieńczeniowe.

Słowa kluczowe: skrining, fungicyd, ochrona drewna, bioautografia

1. Wstęp

Główną przyczyną ograniczenia trwałości drewna stanowią czynniki biotyczne, powodujące jego degradację. Patogeny, takie jak grzyby i bakterie oraz owady, obniżają przydatność materiału jakim jest drewno, prowadząc do zmian w jego strukturze, właściwościach fizycznych, a także właściwościach chemicznych. Właściwe działania profilaktyczne pozwalają na chronienie drewna w warunkach stałego zawilgocenia z dostępem powietrza, kiedy jest ono najbardziej narażone na wyżej wymienione czynniki, zapobiegając jego szybkiemu rozkładowi. W skali światowej najczęstszym i najgroźniejszym zagrożeniem dla drewna w budownictwie, a także w architekturze zabytków, stanowią właśnie grzyby [Schmidt, Huckfeldt 2011].

Obiekty drewniane najczęściej atakowane są przez grzyby typu podstawczaki (*Basidiomycetes*) oraz mikrogrzyby, zwane potocznie pleśniami [Krajewski, Witomski 2005]. Ich obecność nie tylko ingeruje w ich konstrukcję, ale także może mieć ogromny wpływ na zdrowie człowieka [Adan, Samson 2011]. Produkują one bowiem szkodliwe mikotoksyny, a wydzielane przez strzępki grzybni - zarodniki, bezwładnie unoszące się w powietrzu, mogą wywoływać wiele przewlekłych chorób, m.in. reakcje alergiczne. Stosowanie odpowiednich środków zabezpieczających materiał drzewny, uchroniłoby nas przed działaniem wspomnianych mikotoksyn, ale przede wszystkim wpłynęłoby na zahamowanie szkód w gospodarce, wyrządzonych przez te drobnoustroje.

2. Opis zagadnienia

W celu ochrony drewna przed mikroorganizmami powodującymi jego degradację, stosuje się środki konserwujące, oczekując od nich najczęściej długotrwałego działania. O skuteczności i trwałości preparatów do ochrony drewna, decydują głównie substancje czynne, pełniące rolę biocydów. Do wstępnego określenia aktywności biologicznej potencjalnych biocydów, stosuje się szybkie testy laboratoryjne. Klasyczne testy mikrobiologiczne opierają się na metodach oznaczania zmiany barwy indykatora (metody rozcieńczeniowe) lub na pomiarze hamowania wzrostu komórek drobnoustrojów na podłożu stałym, bądź płynnym pod wpływem wzrastających stężeń badanych biocydów (metody dyfuzyjne). Zaletą wyżej wymienionych metod mikrobiologicznych jest ich prostota, niski koszt i możliwość przygotowania wielu próbek do analizy. Jednakże mają one też swoje wady. Na wyniki badań czeka się o wiele dłużej, a wykonane testy nie charakteryzują się wysoką czułością i selektywnością. Istnieje wiele sposobów oznaczania wpływu środków chemicznych na rozwój grzybów i mikrogrzybów, natomiast jednym z najprostszych i najszybszych jest metoda bioautografia [Choma, Grzelak 2011].

Bioautografia należy do mikrobiologicznych badań skriningowych, powszechnie stosowanych do rozpoznania związków przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybiczych. Łączy detekcję mikrobiologiczną z chromatografią cienkowarstwową. Jako podłoża, używa się bibuły chromatograficznej lub płytek TLC. Analizowany związek наносzony jest w prosty sposób na np. płytkę TLC, którą następnie umieszcza się na podłożu agarowym. Wysuszoną płytkę pokrywa się pożywką agarową wraz z zarodnikami stosowanego w badaniu gatunku mikrogrzyba testowego, aby umożliwić dyfuzję związku do pożywki agarowej. W następnej kolejności próbki inkubuje się przez określony czas w warunkach optymalnych dla rozwoju mikrogrzybów testowych (temperatura 28°C, wilgotność powietrza powyżej 95%) [Kwaśniewska i in. 2013]. Wykonywany skrining metodą bioautografii jest bardziej czuły niż inne metody do określania właściwości biobójczych, a do tego jest prosty, tani i oszczędza czas [Choma, 2005]. Wykorzystanie płytek do chromatografii cienkowarstwowej umożliwia analizę właściwości biobójczych minimalnej ilości preparatów. Metoda bioautografii to prosty pomiar aktywności biologicznej zapewniający odpowiedź tak lub nie [Munoz-Olivas, 2004].

Metody dyfuzyjne są często stosowane w badaniach przeciwbakteryjnych. W takim badaniu wykorzystuje się zjawisko dyfuzji substancji chemicznej do agaru, hamując przy tym wzrost odpowiednio wrażliwego szczepu drobnoustroju, tworząc strefy zahamowania wzrostu bakterii lub grzybów na podłożu stałym. Na tej podstawie wykonuje się ilościowy pomiar aktywności biologicznej danej substancji. W metodach dyfuzyjnych nasycy się potencjalnym biocydem, krążki bibuły, które następnie umieszcza się na zainfekowanym podłożu agarowym i inkubuje się w warunkach optymalnej wilgotności i temperatury [Kelly i in. 1999]. Po zakończeniu inkubacji,

krążki oczyszcza się z grzybki i waży w celu ustalenia ubytku masy. Za pozytywny wynik testu przyjmuje się ilość substancji aktywnej, przy której ubytek masy był mniejszy niż 2%.

Kolejną popularną metodą zaliczaną do testów skriningowych jest metoda klockowo-agarowa, należąca do metod seryjnych rozcieńczeń na podłożu stałym [Woźniak 1973]. Pozwala ona na oznaczenie właściwości substancji chemicznych względem grzybów typu podstawczaki (*Basidiomycetes*) powodujących rozkład brunatny i biały drewna. Próbki drewna impregnowane są roztworami o różnych stężeniach i wystawiane na działanie grzybów testowych w celu oznaczenia ich ubytku masy. Preparat jest skuteczny, gdy ubytek masy jest mniejszy niż 3%. Metoda ta jest efektywna, natomiast nie nadaje się do szybkiej identyfikacji właściwości danej substancji chemicznej. Ponadto wymaga większej ilości preparatów chemicznych, a czas trwania badania to 4 tygodnie.

Oznaczenia przy pomocy metody rozcieńczeń na podłożu płynnym wykonuje się głównie używając 96-dółkowych płytek (PC PCR). Przygotowaną serię preparatów o różnych stężeniach umieszcza się w oddzielnych dółkach, do których dodaje się taką samą ilość zawiesiny z zarodnikami np. mikrogrzyba testowego. Najniższe stężenie biocydu, przy którym niewidoczny jest wzrost strzępek grzybni i podłoże jest przejrzyste, wyznacza wartość MIC. Czas trwania testu nie przekracza okresu 7 dni, dlatego jest to równie szybka i prosta metoda w oznaczaniu właściwości grzybobójczych potencjalnych biocydów.



Rys 1. Bioautografia-TLC

3. Podsumowanie

Jednym z podstawowych problemów w analityce jest właściwy wybór metody oznaczania. Istnieje wiele sposobów określania wpływu środków chemicznych na rozwój grzybów i mikrogrzybów. Testy skriningowe są niezbędnym krokiem w kierunku szybkiej identyfikacji właściwości grzybobójczych wybranych substancji chemicznych. Nowoczesne metody analityczne umożliwiają analizę znacznej ilości związków, czas badań jest skrócony, a koszty o wiele niższe. Do tego typu badań zaliczamy bioautografię, dzięki której możemy przeanalizować właściwości fungistatyczne złożonych mieszanin i czystych związków chemicznych. Metoda ta posłuży do wytypowania związków o aktywności biologicznej, które mogą znaleźć zastosowanie jako środki ochrony drewna.

4. Podziękowania

Badania nad potencjalnymi środkami ochrony drewna finansowane są ze środków funduszy norweskich, w ramach programu Polsko-Norweska Współpraca Badawcza realizowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr Pol-Nor/203119/32).

5. Literatura

Choma I.M. 2005. LC–GC. 18, 482

Choma I.M., Grzelak E.M. 2011. Journal of Chromatography A. 1218, 2684

Corney D.G., Durley R.C. 1994. Strategies for database dereplication of natural products, J. Nat. Prod. 57, 1484-1490

Kelly L., Jacobs M.R., Appelbaum P.C. 1999. J. Clin. Microbiol. 37,

Krajewski A., Witomski P. 2005. Ochrona drewna surowca i materiału, Warszawa, 12-110

Munoz-Olivas R. 2004. Trends Anal. Chem. 23, 203

Schmidt O., Huckfeldt T. 2011. Characteristics and identification of indoor wood-decaying basidiomycetes w: Adan O.C.G., Samson R.A. 2011. Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living, Wageningen Academic

Woźniak W. 1973. Mikrobiologiczne metody badania leków i materiałów biologicznych, PZWL, Warszawa, 110-153

Nazwa instytucji: Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Technologii Drewna, Instytut Chemicznej Technologii Drewna

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Grzegorz Cofta

Adres do korespondencji: kwasniewskapatrycja@gmail.com