

Streszczenie

Polska należy do czołowych producentów owoców w Unii Europejskiej, odgrywając szczególnie istotną rolę w uprawie truskawek oraz innych owoców miękkich. Ze względu na wysokie walory smakowe, bogactwo składników odżywczych oraz szerokie zastosowanie w przetwórstwie, owoce te stanowią kluczowy element krajowego sektora rolno-spożywczego. Jednocześnie ich znaczna podatność na zakażenia mikrobiologiczne stanowi poważne wyzwanie i zagrożenie zarówno dla producentów, jak i konsumentów. Szczególne ryzyko w tym kontekście stwarzają grzyby z rodzaju *Neosartorya*, charakteryzujące się wyjątkową odpornością na niekorzystne czynniki środowiskowe, w tym wysoką temperaturę oraz obecność środków konserwujących. Gatunki tego rodzaju, będące formami teleomorficznymi grzybów z rodzaju *Aspergillus*, są zdolne do przetrwania procesów pasteryzacji, co może prowadzić do wtórnego skażenia produktów spożywczych, skutkując zarówno stratami ekonomicznymi, jak i zagrożeniem dla zdrowia konsumentów z powodu wytwarzania niebezpiecznych mykotoksyn.

Badania zawarte w niniejszej rozprawie podejmują temat charakterystyki właściwości morfologicznych, metabolicznych i genetycznych grzybów *Neosartorya* spp., które wpływają na mechanizmy przetrwania, aktywności oraz wrażliwości na substancje przeciwdrobnoustrojowe. W pracy istotna była także ocena wpływu tych substancji na mikrobiom i potencjał metaboliczny truskawek sztucznie zakażonych tymi grzybami w rzeczywistych warunkach przechowywania produktów roślinnych. W ramach badań w pierwszej kolejności oceniono skuteczność zarówno naturalnych ekstraktów roślinnych, jak i syntetycznych środków konserwujących wobec 20 izolatów, wykorzystując testy inhibicji wzrostu metodą dyfuzyjno-krażkową. Następnie dla

10 izolatów, wybranych w ramach pierwszego etapu badań, dokonano oceny wrażliwości z użyciem mikropłytek MT2 systemu Biolog™. Uzyskane wyniki potwierdziły zróżnicowaną skuteczność badanych substancji oraz wykazały różnice wrażliwości testowanych izolatów grzybów, wskazując na wyodrębnienie 5 grup izolatów o rosnącej podatności na substancje o właściwościach antymikrobiologicznych, pomimo ich bliskiego pokrewieństwa. Wszystkie testowane ekstrakty naturalne wykazywały działanie hamujące wzrost *Neosartorya* spp., choć to ekstrakty z lawendy, drzewa herbacianego i nagietka wykazały najsilniejsze działanie przeciwgrzybicze. Pirosiarczyn sodu, sorbinian potasu, wodorosiarczyn sodu oraz kwas sorbowy również wykazały działanie hamujące wzrost grzybów, przy czym najbardziej skuteczny okazał się pirosiarczyn sodu.

W ramach badania wrażliwości chemicznej *Neosartorya* spp., przeanalizowano reakcje metaboliczne na 120 związków chemicznych dostępnych w mikropłytkach PM 21–25 z wykorzystaniem systemu Biolog™. Wykazano, że większość testowanych związków stymulowała wzrost grzybów, przy czym po 96-godzinnej inkubacji wszystkie izolaty wykazały zdolność adaptacji do warunków stresowych. Faza równowagi wzrostu została osiągnięta po około 144 godzinach, co wskazuje na efektywną aklimatyzację do obecności związków toksycznych. Największy przyrost biomasy odnotowano w obecności antybiotyków, anionów oraz związków modyfikujących funkcjonowanie błon komórkowych. Z kolei wyraźne właściwości hamujące wykazały m.in. cyjanian sodu, dwuwodny chlorek miedzi (II) i cis-platyna. Uzyskane dane potwierdzają znaczący potencjał adaptacyjny *Neosartorya* spp. do 6 zróżnicowanych stresorów chemicznych. Zdolność ta może stanowić czynnik umożliwiający kolonizację środowisk o wysokim stopniu przetworzenia i obecności substancji konserwujących, co ma istotne implikacje dla kontroli mikrobiologicznej w przemyśle.

W kolejnych etapach badań scharakteryzowano potencjał metaboliczny wybranych izolatów *Neosartorya* spp. w warunkach optymalnego wzrostu oraz po ekspozycji na wybrane ekstrakty roślinne i konserwanty żywności, wykorzystując test mikromacierzy fenotypowych z wykorzystaniem mikropłatek Biolog™ FF. Uzyskane profile metaboliczne wykazały wysoką plastyczność metaboliczną badanych izolatów oraz zdolność do wykorzystania różnorodnych źródeł węgla, w tym związków charakterystycznych dla substratów owocowych. Reakcja grzybów na stres w obecności ekstraktu z nagietka charakteryzowała się zmniejszonym zużyciem aminokwasów i węglowodanów oraz zwiększonym wykorzystaniem kwasów karboksylowych na płytkach FF. Po ekspozycji grzybów na konserwanty spożywcze, w porównaniu do kontroli, odnotowano istotne obniżenie wykorzystania wszystkich badanych grup związków organicznych. W badaniu 10 izolatów zaobserwowano również różnice w ich odporności, co pozwoliło wyróżnić trzy wyraźne grupy wrażliwości grzybów, w tym izolaty charakteryzujące się wysoką, średnią i niską wrażliwością na testowane ekstrakty i konserwanty.

Badania mikroskopowe, przeprowadzone z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM – Scanning Electron Microscopy) oraz konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej, wykazały, że zarówno kontakt z konserwantem, jak i z ekstraktem roślinnym powodował deformacje powierzchni strzępek. Obserwowane zmiany były zróżnicowane w zależności od izolatu, co wskazuje na istotną rolę cech fenotypowych w determinowaniu odporności grzybów na czynniki stresowe. Uzupełniając, przeprowadzono niecelowaną analizę metabolomiczną metodą LC-QTOF MS w celu charakterystyki profili metabolicznych wybranych izolatów grzybów pod wpływem działania substancji o właściwościach antymikrobiologicznych. Dodatek do podłoża hodowlanego ekstraktu z nagietka lub pirosiarczyny sodu spowodował

wyraźne zmiany metabolomiczne i podział widm metabolitów w zależności od warunków wzrostu. Każdy z izolatów posiadał unikalny metaboliczny „odcisk palca” i różnił się swoim profilem od pozostałych próbek, wskazując, że izolaty grzybów o różnej wrażliwości na ekstrakty roślinne i konserwanty posiadały odmienny profil metabolomiczny.

Analizy genomowe wybranych izolatów *Neosartorya* spp. przeprowadzono metodą sekwencjonowania całogenomowego (WGS – Whole Genome Sequencing). Uzyskane dane umożliwiły identyfikację genów potencjalnie związanych z termotolerancją, detoksykacją związków chemicznych oraz syntezą metabolitów wtórnych. Obecność licznych genów kodujących m.in. białka szoku cieplnego oraz enzymy antyoksydacyjne sugeruje złożone mechanizmy adaptacyjne tych grzybów o stresu środowiskowego i chemicznego.

Końcowy etap badań obejmował eksperyment z wykorzystaniem owoców truskawki kontaminowanych wybranymi izolatami *Neosartorya* spp. Owoce poddano działaniu konserwantu lub ekstraktu roślinnego, a następnie analizowano zmiany w składzie mikrobiomu metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS – Next Generation Sequencing) oraz aktywności metabolicznej przy użyciu mikroplatek EcoPlates (Biolog™). Sekwencjonowanie ampikonów wykazało, że rodzaj *Pseudomonas* był dominujący wśród zbiorowisk bakteryjnych, a rząd Burkholderiales ulegał wzbogaceniu pod wpływem naturalnego ekstraktu, podczas gdy Microbacteriaceae redukcji w obecności środka konserwującego. W zbiorowiskach grzybowych, w próbach kontrolnych dobrze reprezentowane były zarówno Ascomycota, jak i Basidiomycota. Ekstrakt naturalny sprzyjał rozwojowi Basidiomycota, z kolei środek konserwujący utrzymywał wyższy udział Ascomycota, w tym rodzajów *Aspergillus* i *Botrytis*, które są związane z procesami psucia owoców. Oba stosowane zabiegi przeciwgrzybicze, obejmujące traktowanie owoców ekstraktem roślinnym lub konserwantem, istotnie wpływały na profil metaboliczny mikroorganizmów zasiedlających owoce, jednak efekty te były zróżnicowane w czasie i zależne od zastosowanego zabiegu.

Uzyskane wyniki wskazują na znaczne zróżnicowanie odpowiedzi izolatów *Neosartorya* spp. na substancje o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych oraz potwierdzają ich zdolność do przetrwania w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Zgromadzone dane wskazują na istotną rolę właściwości metabolicznych, morfologicznych i genetycznych grzybów *Neosartorya* spp. w kształtowaniu ich odporności na związki konserwujące, chemiczne oraz naturalne ekstrakty roślinne i mogą stanowić podstawę do opracowania skutecznych strategii ograniczania obecności tych grzybów w łańcuchu produkcji żywności oraz wspierać rozwój bardziej zrównoważonych i selektywnych metod utrwalania owoców miękkich.

Słowa kluczowe: grzyby termooporne, konserwanty, ekstrakty roślinne, aktywność metaboliczna, mikromacierze fenotypowe, mikroskopia elektronowa, sekwencjonowanie całogenomowe, mikrobiom.