

Magdalena KRĘCIDŁO¹ i Teresa KRZYŚKO-ŁUPICKA¹

WPLYW ŚRODKA DEZYNFEKCYJNEGO DIVOSAN FORTE NA PRZYROST BIOMASY ŚRODOWISKOWEGO SZCZEPU *Trichoderma viride*

INFLUENCE OF DIVOSAN FORTE ON BIOMASS GROWTH OF *A Trichoderma viride* ENVIRONMENTAL STRAIN

Abstrakt: Środki dezynfekcyjne w dzisiejszych czasach są niezbędnym elementem w medycynie, przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Mikroorganizmy odporne lub posiadające zdolność degradacji dezynfektantów stanowią zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowia człowieka, ale mogą też zostać wykorzystane w procesach unieczynnienia środków dezynfekcyjnych. Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu środka dezynfekcyjnego na bazie kwasu nadoctowego na przyrost biomasy środowiskowego izolatu *Trichoderma viride*. Materiałem badawczym były izolat *T. viride* 56 pochodzący z hali technologicznej zakładu produkcyjnego branży spożywczej, odporny na preparat dezynfekcyjny Divosan Forte (DF). Użyty preparat zawiera: kwas nadoctowy, kwas octowy oraz nadtlenek wodoru w stosunku 1:1:1. Hodowle prowadzono w podłożu pełnym mineralnym CYA i podłożach zmodyfikowanych. Modyfikacja polegała na dodaniu preparatu (0,15; 0,30, 0,60% v/v) lub kwasu octowego (0,15; 0,30% v/v), lub nadtlenu wodoru (0,30% v/v). Równolegle prowadzono hodowlę w podłożach mineralnych z alternatywnymi źródłami węgla w formie preparatu lub kwasu octowego. Kontrolę negatywną stanowiło podłoże mineralne bez źródła węgla. Układy inokulowano wystandaryzowaną zawiesiną zarodników grzyba i inkubowano przez 21 dni. W 7, 14 i 21 dniu wyznaczano suchą masę grzybni każdego z układów. Wyniki przedstawiono w [g s.m.dm⁻³]. Nie stwierdzono istotnych różnic w przyroście biomasy szczepu *T. viride* 56 w układach z alternatywnym źródłem węgla w porównaniu do kontroli negatywnej. W obecności komercyjnego preparatu i obecności łatwo przyswajalnego źródła węgla obserwowano większy przyrost biomasy niż w pełnym podłożu mineralnym.

Słowa kluczowe: *Trichoderma viride*, kwas nadoctowy, przemysł spożywczy, Divosan Forte

Wprowadzenie

Jednym z istotnych problemów branży spożywczej są zanieczyszczenia mikrobiologiczne podczas procesu produkcji. Mogą one wpływać na obniżenie jakości produktu finalnego i przynosić straty ekonomiczne. Przeprowadzone wstępne analizy wykazały, iż w specyficznym środowisku, jakim są hale produkcyjne, występuje różnicowanie mikrobiota [1].

Grzyby strzępkowe stanowią istotne zagrożenie na wszystkich etapach produkcji żywności, a wytwarzane przez nie mykotoksyny mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia pracowników i konsumentów. Ich zarodniki występujące w powietrzu z łatwością rozprzestrzeniają się w przestrzeni produkcyjnej, co sprzyja kontaminacji produktu finalnego. Dlatego w celu ograniczenia spadku jakości oraz strat ekonomicznych wysoce istotne jest dobranie odpowiednich technik oraz preparatów dezynfekcyjnych zmniejszających ryzyko rozwoju mikroorganizmów w trakcie produkcji [1, 2]. W zależności od branży, specyfikacji oraz technologii produkcji należy dobrać odpowiedni preparat dezynfekcyjny. Podczas wyboru dezynfektanta należy zwrócić uwagę na strukturę

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6, 45-092 Opole, email: teresak@uni.opole.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 16, Zakopane, 5-8.10.2016

występującej mikrobioty, gdyż coraz częściej odnotowuje się oporność mikroorganizmów na wybrane preparaty dezynfekcyjne oraz ich stężenia. Dlatego w celu optymalizacji procesu dezynfekcji należy przeprowadzać testy skuteczności działań sanitacyjnych [3, 4].

W branży spożywczej stosowane są głównie preparaty dezynfekcyjne na bazie sody lub kwasów nieorganicznych, jednak coraz częściej wykorzystuje się mniej obciążające środowisko preparaty na bazie kwasu nadoctowego. Dezynfektanty zawierające kwas nadoctowy wykorzystywane są głównie w takich branżach, jak produkcja napojów i soków owocowych, mleczarstwo i browarnictwo, gdzie dezynfekcja prowadzona jest w obiegu zamkniętym (CIP) [5]. Jednym z najczęściej stosowanych preparatów dezynfekcyjnych na bazie kwasu nadoctowego podczas produkcji żywności jest Divosan Forte. Preparat ten zawiera w swoim składzie kwas nadoctowy, kwas octowy oraz nadtlenuk wodoru w stosunku 1:1:1. Zgodnie z danymi podanymi przez producenta, Divosan Forte należy stosować w stężeniu objętościowym (v/v) 0,1% [6].

Przedstawiciele rodzaju *Trichoderma* występują powszechnie w glebie, bioaerozolu atmosferycznym i wewnątrz budynku. Najczęściej opisywanym przez naukowców gatunkiem jest *Trichoderma viride* [7, 8]. Gatunek ten ze względu na rozbudowany kompleks enzymatyczny wykorzystywany jest w różnych kontekstach badawczych dotyczących: biodegradacji ksenobiotyków, biologicznej ochrony roślin, stymulacji kiełkowania roślin, stymulacji absorpcji fosforu przez rośliny, produkcji enzymów lipolitycznych oraz biodegradacji odpadów poprzemysłowych [9-17]. Dotychczas wyizolowano 373 metabolity *T. viride* wykorzystywane w medycynie lub agrotechnice [18]. Gatunek ten uznawany jest za nieszkodliwy dla człowieka. Jednak w przypadku dominacji w wodzie pitnej nasila występowanie astmy u dzieci [19]. Izolaty *T. viride* wykazują oporność na działanie środków dezynfekcyjnych wykorzystywanych podczas produkcji żywności [20]. Sugeruje to, że grzyby te mogły nabyć zdolności do biodegradacji substancji czynnych dezynfektantów, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia skuteczności procesu dezynfekcji.

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu środka dezynfekcyjnego na bazie kwasu nadoctowego na przyrost biomasy środowiskowego izolatu *Trichoderma viride*.

Materiał i metody

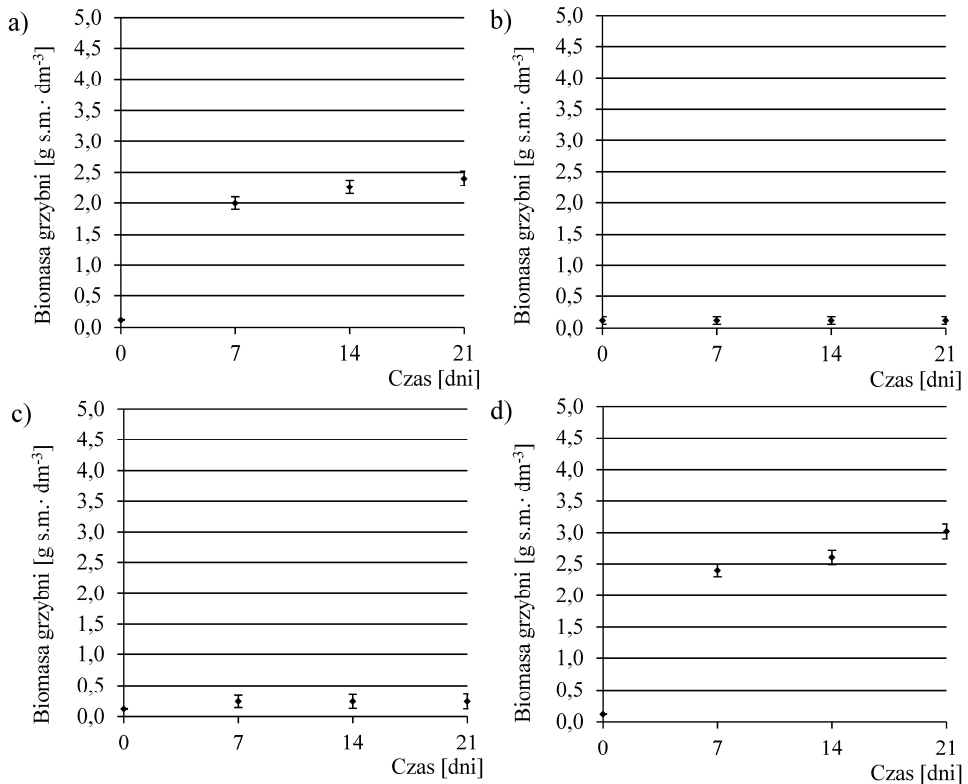
Materiał badawczy stanowił izolat *Trichoderma viride* 56 pochodzący z hali technologicznej zakładu produkcyjnego branży spożywczej, oporny na preparat dezynfekcyjny Divosan Forte (DF), oparty na bazie kwasu nadoctowego [20]. Izolację z powierzchni produkcyjnych przeprowadzono metodą wymazów w podłożu selekcyjnym zawierającym Divosan Forte (DF) w ilości odpowiadającej 0,1% (v/v) stężeniu kwasu nadoctowego.

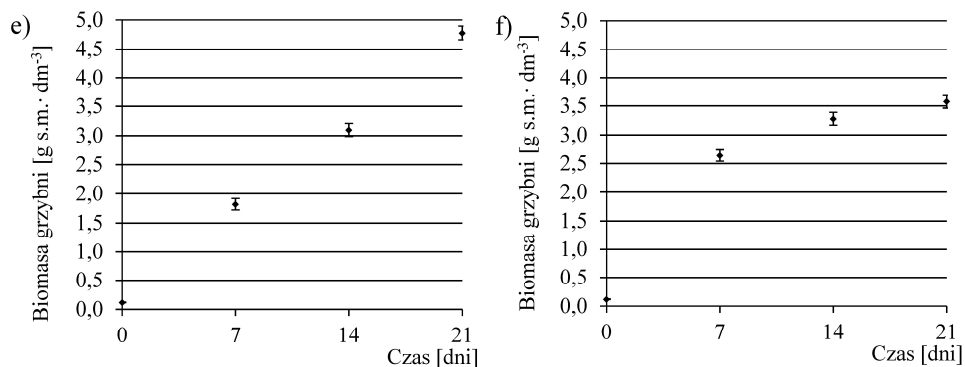
Badania prowadzono w płynnym podłożu mineralnym CYA i podłożach zmodyfikowanych. Modyfikacja polegała na wprowadzeniu do podłoża DF w stężeniach - 0,15, 0,30, 0,60% v/v lub kwasu octowego w stężeniach - 0,15, 0,30% v/v, lub nadtlenuku wodoru w stężeniu 0,30% v/v. Równolegle prowadzono hodowlę w podłożach mineralnych z alternatywnymi źródłami węgla w formie DF lub kwasu octowego. Kontrolę negatywną stanowiło podłoże mineralne bez źródła węgla.

Ocenę wpływu DF na przyrost biomasy *T. viride* 56 prowadzono w dziesięciu układach badawczych w trzech powtórzeniach. Izolat namnażano na skosach z Czapek Dox Agar (BTL Polska), zmywu dokonano wodą z Tweenem (0,05%). Układy inokulowano wystandaryzowaną zawiesiną zarodników *T. viride* 56. Szczepionkę o gęstości $2 \cdot 10^6$ jtk \cdot cm^{-3} wprowadzano w ilości 10% do każdego z układów. Inkubacje układów prowadzono w warunkach tlenowych w temperaturze 22°C przez 3 tygodnie [16]. Ocenę przyrostu biomasy dla każdego z układów badawczych wykonano po 7, 14 i 21 dniach. Wyniki przedstawiono w postaci przyrostu suchej masy grzybni [g s.m. \cdot dm^{-3}].

Wyniki badań

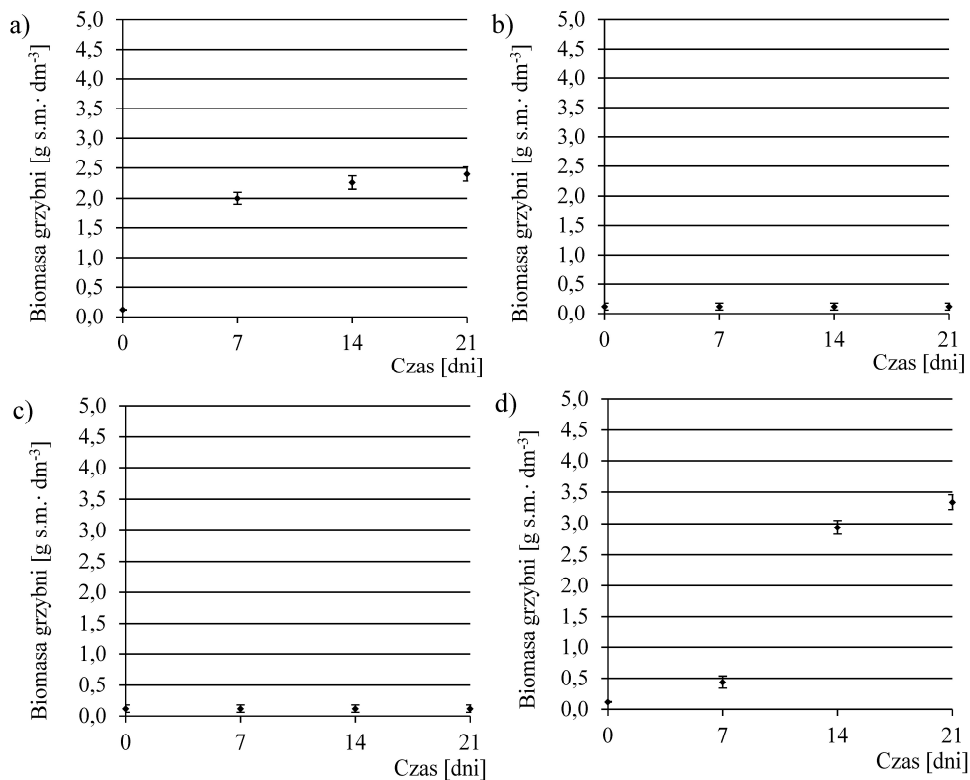
Przyrost biomasy izolatu *T. viride* 56 w stosunku do kontroli zaobserwowano w układach zawierających podłoże modyfikowane z DF. Dodatek DF do podłoża mineralnego w alkalizowanych stężeniach wpływał stymulująco na przyrost biomasy grzybni. W przypadku zastosowania 0,30% stężenia preparatu dezynfekcyjnego odnotowano najwyższy przyrost biomasy. Po zastosowaniu DF jako jedynego źródła węgla nie stwierdzono istotnych różnic w przyroście biomasy izolatu *T. viride* 56, w porównaniu do kontroli negatywnej (rys. 1).

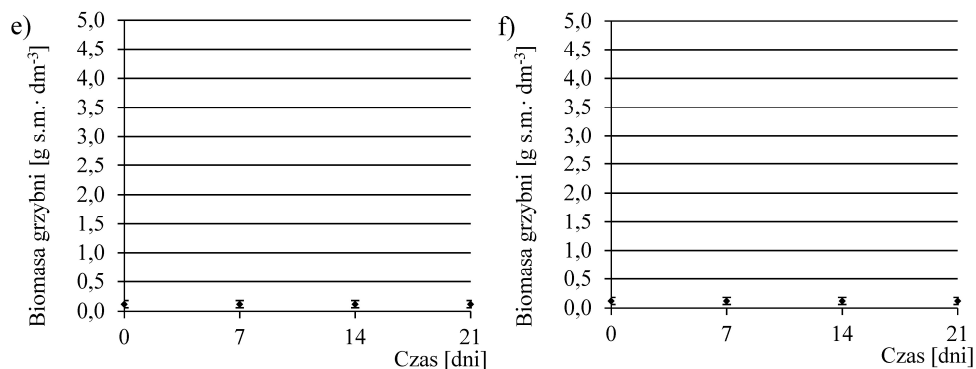




Rys. 1. Przyrost biomasy \pm odchylenie standardowe szczepu *Trichoderma viride* 56 w trakcie 21-dniowego okresu badawczego: a) próba kontrolna, b) podłoże bez źródła węgla, c) DF jako jedyne źródło węgla, d) DF w stężeniu 0,15%, e) DF w stężeniu 0,30% i f) DF w stężeniu 0,60%

Fig. 1. Growth of biomass \pm standard deviation *Trichoderma viride* 56 in duration of 21 days research period: a) control sample, b) medium without source of carbon, c) DF as only source of carbon, d) DF in concentration of 0.15%, e) DF in concentration of 0.30% and f) DF in concentration of 0.60%





Rys. 2. Przyrost biomasy \pm odchylenie standardowe szczepu *Trichoderma viride* 56 w trakcie 21-dniowego okresu badawczego: a) próba kontrolna, b) podłoże bez źródła węgla, c) kwas octowy jako jedyne źródło węgla, d) kwas octowy w stężeniu 0,15%, e) kwas octowy w stężeniu 0,30% i f) nadtlenek wodoru w stężeniu 0,30%

Fig. 2. Growth of biomass \pm standard deviation *Trichoderma viride* 56 in duration of 21 days research period: a) control sample, b) medium without source of carbon, c) acetic acid as only source of carbon, d) acetic acid in concentration of 0.15%, e) acetic acid in concentration of 0.30% and f) hydrogen peroxide in concentration of 0.30%

Przeprowadzona analiza wpływu substancji składowych DF na przyrost biomasy szczepu *Trichoderma viride* 56 wykazała, iż jedynie w przypadku układu zawierającego pełne podłoże mineralne z dodatkiem kwasu octowego w stężeniu 0,15% obserwowano przyrost grzybni. W porównaniu do kontroli powyższy układ po 14 i 21 dniach badań wpływał stymulująco na przyrost biomasy grzybni. W przypadku pozostałych układów zawierających kwas octowy oraz nadtlenek wodoru nie spowodowało to istotnych różnic w przyroście biomasy izolatu *T. viridae* 56 w porównaniu do kontroli negatywnej (rys. 2).

Podsumowanie i wnioski

Preparat dezynfekcyjny stosowany w zakładzie branży spożywczej w stężeniu zalecanym przez producenta nie ograniczał rozwoju izolatu *T. viride* 56. Wręcz przeciwnie, w układach zawierających łatwo dostępne źródło węgla wykazywał działanie stymulujące przyrost biomasy grzybni w porównaniu do pełnego podłoża mineralnego. Wyższą skutecznością od dezynfektanta wykazywały substancje wymienione przez producenta w jego składzie, mianowicie kwas octowy oraz nadtlenek wodoru. Kwas octowy jedynie w stężeniu 0,15% wykazywał właściwości stymulujące. Natomiast nie stwierdzono istotnych różnic w przyroście biomasy szczepu *T. viride* 56 w układach z alternatywnym źródłem węgla a kontrolą negatywną. Mikroorganizmy odporne na działanie środków dezynfekcyjnych izolowane z powierzchni produkcyjnych mogą być wykorzystywane jako wskaźniki skuteczności działania dezynfektantów i jakości produktu końcowego w branży spożywczej. Dlatego wprowadzenie takiego wskaźnika wydaje się być zasadne.

Literatura

- [1] Koszałkowska M, Kręcidło Ł, Krzyško-Łupicka T. Microbiological analysis of bioaerosol in food industry. *Proc ECOpole*. 2014;8(1):43-47. DOI: 10.2429/proc.2014.8(1)005.
- [2] Garijo P, Santamaria P, López R, Sanz S, Olarte C, Gutierrez AR. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int J Food Microbiol*. 2008;125(2):141-145. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.014.
- [3] Bonetta S, Mosso S, Sampò S, Carraro E. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. *Environ Monit Assess*. 2010;161:473-483. DOI: 10.1007/s10661-009-0761-8.
- [4] Kręcidło Ł, Krzyško-Łupicka T. Sensitivity of molds isolated from warehouses of food production facility on selected essential oils. *Inż Ekol*. 2015;43:100-108. DOI: 10.12912/23920629/58910.
- [5] Pakulska D, Czerniak S. Kwas nadoctowy. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podst Met Oceny Środ Przynr*. 2014;1(79):25-54.
- [6] http://www.pesan.pl/karty/CHEMIA%20MYJACA/Divosan_Forte_leaflet_pol.pdf (dostęp w dniu 20.06.2017).
- [7] Jaklitsch WM, Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Druzhinina IS. *Hypocrea rufa* / *Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud Mycol*. 2006;56:135-177. DOI: 10.3114/sim.2006.56.04.
- [8] Neethu K, Rubeena M, Sajith S, Sreedevi S, Priji P, Unni KN, et al. A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. *Advances Bioscience Biotechnology (ABB)*. 2012;3:1160-1166. DOI: 10.4236/abb.2012.38142.
- [9] Baig MM, Baig MLB, Baig MIA, Yasmeeen M. Saccharification of banana agrowaste by cellulolytic enzymes. *Afr J Biotechnol*. 2004;3(9):447-450. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/download/14995/59085>.
- [10] Nobe R, Sakakibara Y, Ogawa K, Suiko M. Cloning and expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase AI gene (lamAI). *Bioscience Biotech Biochem*. 2004;68:211-219. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1271/bbb.68.2111>.
- [11] Celar F, Valic N. Effects of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 2005;112:343-350. DOI: 10.1271/bbb.68.2111.
- [12] Mishra SK, Singh RP. Prospects for the bio-management of *Trichoderma viride* - an organism harmful to button mushroom. *Journal Appl Hort*. 2005;7(1):38-42.
- [13] Chitale A, Jadhav DV, Waghmare SR, Sahoo AK, Ranveer RC. Production and characterization of brown coloured pigment from *Trichoderma viride*. *J Agric Food Chem*. 2012;11(5):529-537.
- [14] Li X-H, Yang H-J, Roy B, Park EY, Li J, Wang D, et al. Enhanced cellulase production of the *Trichoderma viride* mutated by microwave and ultraviolet. *Microbiol Res*. 2010;165(3):190-198. DOI: 10.1016/j.micres.2009.04.001.
- [15] Elakkiya P, Muralikrishnan V. Physical and chemical mutation of cellulase producing fungi *Trichoderma viride*. *Int J Adv Res Biol Sci*. 2014;1(6):1-6.
- [16] Huang X, Fan J, Yang Q, Chen X, Liu Z, Wang Y, et al. Cloning, expression, and characterization of endoglucanase gene eg IV from *Trichoderma viride* AS 3.3711. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;322(3):390-399. DOI: 10.4014/jmb.1107.06064.
- [17] Jiang X, Geng A, He N, Li Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *J Biosci Bioeng*. 2011;111:121-127. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.09.004.
- [18] Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Can J Microbiol*. 2005;51:217-222. DOI: 10.1139/w04-127.
- [19] Hageskal G, Lima N, Skaar I. The study of fungi in drinking water. *Mycol Res*. 2009;113:165-172. DOI: 10.1016/j.mycres.2008.10.002.
- [20] Kręcidło M, Krzyško-Łupicka T. Wrażliwość izolatów *Trichoderma viride* ze strefy produkcji zakładu spożywczego na Divosan Forte. *Proc ECOpole*. 2016;10(1):193-200. DOI: 10.2429/proc.2016.10(1)022.

INFLUENCE OF DIVOSAN FORTE ON BIOMASS GROWTH OF A *Trichoderma viride* ENVIRONMENTAL STRAIN

Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

Abstract: Nowadays disinfectants are necessary in medicine, food and pharmaceutical industry. Microorganisms that are resistant to disinfectants or are able to degrade them, threaten human health, but these species may be used to inactivate disinfectant solutions Divosan Forte (DF). The aim of the study was to evaluate the effect of disinfectant based on peracetic acid on the growth of environmental biomass of *Trichoderma viride* strain. The research material was a disinfectant-resistant *T. viride* 56 strain, which came from the technological area of food processing facility. Applied preparation contained: peracetic acid, acetic acid and hydrogen peroxide in the ratio of 1:1:1. Cultures were carried out in the full mineral medium CYA with and without the modifications. Medium modifications consist of an addition of the following substances: a disinfectant (0.15; 0.30, 0.60% v/v) or an acetic acid (0.15; 0.30% v/v), or a hydrogen peroxide (0.30% v/v). Simultaneously, cases of cultures in the mineral medium with a sole carbon source, as well as a disinfectant solution or an acetic acid. The negative control was the medium without any carbon source. All cases were inoculated with a standard solution of fungal spores and were incubated for 21 days. On the 7th, 14th and 21st day of experiment, in all cases, the dry mass of fungal mycelium was estimated. The results are shown in the [g s.m.·dm⁻³]. No significant differences in the biomass growth of *T. viride* 56 strains in the cases with alternative carbon source and negative control. In the presence of commercial preparation and an easily degradable carbon source, a higher growth of mycelium biomass was estimated than in a full mineral medium.

Keywords: *Trichoderma viride*, peracetic acid, food industry, Divosan Forte