

Raport Serii PREPRINTY Nr 12

POSZUKIWANIE CZYNNIKÓW ZAANGAŻOWANYCH  
W PROCES INFЕКCJI I INTOKSYKACJI  
ORGANIZMU OWADA PRZEZ GRZYBY  
ENTOPATOGENICZNE Z RODZAJU  
ZOOPTHORA I PAECILOMYCES

Beata GREB-MARKIEWICZ

Praca doktorska

Słowa kluczowe:

grzyby entopatogeniczne,  
mykotoksyna,  
lipid neutralny,  
biotransformacja ksenobio-  
tyków,  
aktywność biologiczna,  
aktywność enzymatyczna

W r o c ł a w 1 9 9 9

**POLITECHNIKA WROCŁAWSKA**

**POSZUKIWANIE CZYNNIKÓW ZAANGAŻOWANYCH  
W PROCES INFЕКCJI I INTOKSYKACJI ORGANIZMU  
OWADA PRZEZ GRZYBY ENTOMOPATOGENICZNE  
Z RODZAJU *ZOOPHTHORA* I *PAECILOMYCES***

**mgr inż. Beata Greb-Markiewicz**

**PRACA DOKTORSKA**

**WYKONANA W LABORATORIUM CHEMII EKOLOGICZNEJ  
INSTYTUTU CHEMII ORGANICZNEJ, BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII**

**promotor - prof. dr hab. Andrzej Zabża**

**WROCŁAW 1999**

Serdecznie Dziękuję  
Panu **prof. dr hab. A. Zabzy** za  
zapropnowanie mi bardzo  
interesującego tematu badawczego  
oraz pomoc i opiekę w trakcie  
realizacji mojej pracy.

Panu **prof. dr hab. S. Bałazemu** dziękuję  
za umożliwienie mi skorzystania z Jego bogatej  
kolekcji grzybów entomopatogenicznych  
i za okresową kontrolę ich prawidłowego rozwoju,  
oraz za zapoznanie mnie z podstawowymi  
wiadomościami na temat tych mikroorganizmów.

Pani **prof. dr hab. I. Majchrowicz** dziękuję za  
otrzymane szczepy *Zoophthora neoaphidis* i  
cenne rady na temat ich hodowli.



Panu **prof. dr hab. J. Szafrankowi** i Jego  
współpracownikom dziękuję za pomoc w  
analizie neutralnych lipidów grzyba  
*Zoophthora phyllobii*.

Panu **prof. dr hab. Z. Szewczukowi** dziękuję  
za wykonanie analiz ESI MS.

Panu **dr J. Piątkowskiemu** dziękuję za pomoc  
i zainteresowanie moją pracą.

mojemu Mężowi,

Mamie i Babci

# SPIS TREŚCI

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. WSTĘP</b>                                                                                                                                                                                  | 1  |
| 1.1. Wprowadzenie                                                                                                                                                                                | 1  |
| 1.2. "Zintegrowany System Zwalczania Szkodników" (IPM) a grzyby<br>patogeniczne owadów                                                                                                           | 4  |
| 1.3. Podział i taksonomia grzybów entomopatogenicznych                                                                                                                                           | 7  |
| 1.4. Cykl życiowy grzybów patogenicznych owadów                                                                                                                                                  | 9  |
| 1.5. Mykotoksyny produkowane przez grzyby patogeniczne owadów                                                                                                                                    | 11 |
| 1.5.1. Mykotoksyny niskocząsteczkowe                                                                                                                                                             | 12 |
| 1.5.2. Mykotoksyny wielkocząsteczkowe                                                                                                                                                            | 16 |
| 1.6. Regulacja wydzielania metabolitów drugorzędowych u grzybów                                                                                                                                  | 17 |
| <b>2. CELE BADAWCZE</b>                                                                                                                                                                          | 19 |
| <b>3. BADANIA WŁASNE</b>                                                                                                                                                                         | 20 |
| 3.1. Neutralne lipidy izolowane z grzybni <i>Zoophthora phyllobii</i>                                                                                                                            | 20 |
| 3.1.1. Węglowodory                                                                                                                                                                               | 22 |
| 3.1.2. Steroidy                                                                                                                                                                                  | 23 |
| 3.1.3. Triacyloglicerole                                                                                                                                                                         | 24 |
| 3.1.4. Diacyloglicerole                                                                                                                                                                          | 26 |
| 3.1.5. Wolne kwasy tłuszczowe                                                                                                                                                                    | 28 |
| 3.1.6. Monoacyloglicerole                                                                                                                                                                        | 29 |
| 3.2. Poszukiwanie metabolitów mogących uczestniczyć w procesie intoksykacji<br>organizmu owada przez grzyby <i>Paecilomyces sp.</i> nr kat. 2428d oraz<br><i>Paecilomyces sp.</i> nr kat. 2430a1 | 31 |
| 3.2.1. Próba izolacji peptydu peptaibolowego z płynu po hodowli grzyba<br><i>Paecilomyces sp.</i> nr kat. 2428d                                                                                  | 52 |
| 3.3. Aktywność biologiczna i enzymatyczna grzyba <i>Zoophthora neoaphidis</i>                                                                                                                    | 53 |
| 3.4. Biotransformacje przy użyciu grzybów entomopatogenicznych<br>należących do rodzajów <i>Zoophthora</i> i <i>Paecilomyces</i>                                                                 | 59 |
| 3.4.1. Badania stereochemii biotransformacji                                                                                                                                                     | 59 |
| 3.4.1.1. Biotransformacje z wykorzystaniem szczepu <i>Zoophthora</i><br><i>phyllobii</i>                                                                                                         | 60 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.1.2. Biotransformacja ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego przy<br>użyciu szczepu <i>Paecilomyces sp.</i> nr kat. 2430a1.....    | 64 |
| 3.4.2. Biotransformacja analogów hormonów juvenilnych<br>owadów przez szczep <i>Paecilomyces sp.</i> nr kat. 2428d.....                | 65 |
| 3.4.2.1. Biotransformacja (RS)-4-metylo-1-(3,7-dimetylo-6-<br>oktenyloksy)-benzenu ( <b>MDOB</b> ).....                                | 66 |
| 3.4.2.2. Biotransformacja (2E)-(R)-(+)-benzylo-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-<br>cyklopentylo)-butenolanu-2 ( <b>BCB</b> ).....             | 68 |
| 3.4.2.3. Biotransformacja eteru p-nitrofenylo-3-metylo-4-(2',2',3'-<br>trimetylo-3'-cyklopentylo)-buten-2-yloвого ( <b>TNBB</b> )..... | 69 |
| 3.4.3. Biotransformacja wybranych związków aromatycznych<br>przez szczep <i>Paecilomyces sp.</i> nr kat. 2428d .....                   | 70 |
| 3.4.3.1. Biotransformacja aldehydu 4-chlorobenzoesowego.....                                                                           | 73 |
| 3.4.3.2. Biotransformacja chlorku 4-nitrobenzylu.....                                                                                  | 73 |
| 4. PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....                                                                                                           | 75 |
| 5. MATERIAŁY.....                                                                                                                      | 77 |
| 5.1. Drobnoustroje.....                                                                                                                | 77 |
| 5.2. Podłoża.....                                                                                                                      | 78 |
| 5.3. Aparatura.....                                                                                                                    | 79 |
| 5.3.1. Izolacja i identyfikacja neutralnych lipidów grzyba<br><i>Zoophthora phyllobii</i> .....                                        | 79 |
| 5.3.2. Biotransformacje.....                                                                                                           | 80 |
| 5.3.3. Poszukiwanie metabolitów zaangażowanych w proces<br>infekcji organizmu owada.....                                               | 82 |
| 6. METODY.....                                                                                                                         | 83 |
| 6.1. Hodowle głębinowe.....                                                                                                            | 83 |
| 6.2. Neutralne lipidy grzyba <i>Zoophthora phyllobii</i> .....                                                                         | 83 |
| 6.2.1. Otrzymywanie pochodnych.....                                                                                                    | 84 |
| 6.3. Biotransformacje.....                                                                                                             | 85 |
| 6.3.1. Biotransformacja związków alkilo- $\alpha$ -kamfolenowych przez szczep<br><i>Zoophthora phyllobii</i> .....                     | 85 |

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.3.2. Biotransformacja ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego przez<br>szczep <i>Paecilomyces</i> sp. nr kat. 2430a1.....                                       | 88 |
| 6.3.3. Biotransformacja analogów hormonów juvenilnych owadów<br>oraz wybranych związków aromatycznych przez<br>szczep <i>Paecilomyces</i> sp. nr kat. 2428d..... | 89 |
| 6.3.3.1. Wpływ ksenobiotyków na wzrost grzyba<br><i>Paecilomyces</i> sp. nr kat. 2428d.....                                                                      | 91 |
| 6.4. Analiza metabolitów.....                                                                                                                                    | 91 |
| 6.4.1. Testy biologiczne.....                                                                                                                                    | 91 |
| 6.4.2. Analizy HPLC.....                                                                                                                                         | 92 |
| 6.4.3. Testy enzymatyczne.....                                                                                                                                   | 92 |
| 6.4.4. Próba izolacji peptydu peptaibolowego z płynu<br>po hodowli szczepu <i>Paecilomyces</i> sp. nr kat. 2428d.....                                            | 94 |
| 7. LITERATURA.....                                                                                                                                               | 95 |

# 1. WSTĘP

## 1. 1. Wprowadzenie

Intensywny rozwój przemysłu i rolnictwa w ostatnich dziesięcioleciach wywarł negatywny wpływ na środowisko naturalne. Główną, choć nie jedyną tego przyczyną jest olbrzymie zapotrzebowanie ludzkości na energię. Następną w kolejności jest chemizacja środowiska naturalnego, która w dużej mierze jest powodowana dążeniem do uzyskania coraz wyższych plonów w rolnictwie. W gospodarce rolnej, ogrodniczej i leśnej powszechnie stosuje się chemiczne środki ochrony roślin, które są truciznami nie znikającymi zaraz po spełnieniu swego zadania, lecz kumulującymi się w glebie i roślinach. Uruchomione w łańcuchu pokarmowym docierają do zwierząt i organizmu ludzkiego. Zdarza się, że dopiero po wielu latach okazuje się iż niewystarczająco poznano działanie uboczne takiego związku. Przykładem może być DDT (dwuchlorodwuetylotrójchloroetan) - pierwszy chloroorganiczny pestycyd, wykazujący silne działanie owadobójcze. Korzyści, jakie uzyskano dzięki stosowaniu tego preparatu wydawały się olbrzymie. Dopiero po kilku latach jego używania okazało się, że jest związkiem bardzo trwałym i w formie niezmienionej utrzymuje się w glebie przez okres od 3 do 15 lat. Kumuluje się w tkankach roślin i zwierząt, a także w tkance tłuszczowej człowieka, co stwarza ryzyko powstania zatruc lub innych negatywnych efektów odległych w czasie. Po przeprowadzeniu dodatkowych badań, zdecydowano o wycofaniu tego preparatu. Odrębnym zagadnieniem jest problem niewielkiej toksycznej selektywności pestycydów, w związku z czym działają one nie tylko na gatunki szkodliwe dla człowieka. Na skutek działania omawianego już DDT, wyniszczeniu uległo wiele gatunków zwierząt, w tym ptactwa dziko żyjącego, podczas gdy same szkodliwe owady uodporniły się na jego działanie i konieczne stało się stosowanie coraz większych dawek tego pestycydu [Pawlaczyk-Szpilowa, 1997]. Problem krótkotrwałej skuteczności chemicznych insektycydów jest znany i wynika z ogromnej reproduktywności oraz zdolności ewolucyjnych szkodników, co pozwala im na rozwinięcie w stosunkowo krótkim czasie mechanizmu odpornościowego [Metcalf, 1980].

Nie można negować faktu, że chemiczne pestycydy są cennym narzędziem do walki ze szkodnikami roślin. Jednak muszą być one wykorzystane w sposób przemyślany, to

znaczy wtedy, kiedy jest to niezbędne i w połączeniu z innymi bardziej ekologicznymi i selektywnymi metodami kontroli owadów. W tym celu opracowano metodę „Zintegrowanego Systemu Zwalczania Szkodników”, w skrócie IPM (‘Integrated Pest Management’) [Allen, 1980]. Polega ona na obserwacji zmian w wielkości populacji owadów w określonym ekosystemie, i ingerowaniu w miarę potrzeby, poprzez wykorzystanie najodpowiedniejszych środków w celu utrzymania ilości szkodników na poziomie korzystnym z ekonomicznego punktu widzenia [Allen, 1980; Hoy i Herzog, 1985]. W IPM czynnikami kontroli mającymi duże znaczenie są naturalni wrogowie szkodliwych owadów (bakterie, wirusy, grzyby). Mikroorganizmy te znane są z wywoływania szerokorozprzestrzenionych epizooty w naturze, dziesiątkujących populacje owadów będących ich żywicielami. Przedmiotem większości prowadzonych do tej pory badań była izolacja i namnożenie wybranych patogenów w warunkach laboratoryjnych, w celu opracowania sposobów ich użycia oraz przechowywania. Obecnie wiadomo jednak, że brak znajomości często złożonych oddziaływań, zachodzących pomiędzy patogenem a jego żywicielem jest przyczyną niezadowalających wyników stosowania tych mikroorganizmów w warunkach polowych [Fuxa, 1987]. Poznanie ogólne, a następnie bardziej szczegółowe tych zależności umożliwi pełniejsze wykorzystanie mikroorganizmów patogenicznych do celów IPM.

Grzyby patogeniczne owadów są szczególnie interesującą grupą, z powodu złożonego mechanizmu ich oddziaływania na organizm owada. Ten wielokierunkowy mechanizm, włączający zarówno oddziaływanie enzymów jak i niskocząsteczkowych metabolitów w znacznym stopniu przeciwdziała rozwinięciu się odporności u owadów [Nielsen, 1998]. Wiele z tych mikroorganizmów charakteryzuje się ponadto dużym stopniem wyspecjalizowania, co gwarantuje bezpieczeństwo owadom pożytecznym, takim jak biedronki czy pszczoły. Zainteresowanie grzybami jako czynnikiem kontroli owadów rozwinęło się już pod koniec ubiegłego stulecia [Zimmermann, 1992], jednak dopiero w ciągu ostatnich 20 lat opracowano kilka programów zakończonych sukcesem. Wprawdzie w chwili obecnej do biologicznej kontroli owadów używa się niezbyt wielu gatunków tych grzybów z powodu zbyt małego stopnia ich poznania, lecz zainteresowani tą dziedziną badacze wierzą, iż w najbliższej przyszłości będą one odgrywać w niej kluczową rolę.

Jako przedmiot badań pracy doktorskiej wybrano entomopatogeniczne grzyby z rodzaju *Zoophthora* i *Paecilomyces*. Wyboru tego dokonano z następujących powodów:

- grzyby te występują na terenie Polski;
- niektóre szczepy należące do tych rodzajów są lub w niedługim czasie zapewne będą stosowane w rolnictwie bądź ogrodnictwie;
- wybrane przeze mnie szczepy nie były systematycznie badane w celu znalezienia biologicznie aktywnych substancji, mogących odgrywać ważną rolę w procesie infekcji i intoksykacji organizmu owada.

Przed opisem badań własnych uznano za celowe przedstawienie szerszych informacji o sposobach wykorzystania grzybów patogenicznych owadów w „Zintegrowanym Systemie Zwalczania Szkodników”, cyklu życiowym grzybów entomopatogenicznych oraz o aktualnym stanie wiedzy na temat metabolitów wtórnych wydzielanych przez te grzyby.



## **1.2. „Zintegrowany System Zwalczania Szkodników” (IPM) a grzyby patogeniczne owadów**

W „Zintegrowanym Systemie Zwalczania Szkodników” używa się zwykle wielu metod równocześnie, co znacznie zmniejsza ryzyko przystosowania się owadów do którejs z nich. Metody te obejmują:

- wprowadzanie roślin odpornych na szkodniki lub je tolerujących;
- kontrolę upraw poprzez rotację zbóż, odpowiedni dobór miejsc na uprawy, zasiewanie pewnych terenów mało ważnymi ekonomicznie roślinami, co zmniejsza napływ szkodników na cenne pola i ułatwia ich zwalczanie;
- kontrolę fizyczną i mechaniczną obejmującą utrudnianie dostępu owadom poprzez tworzenie różnego typu barier, zbieranie ręczne szkodników lub łapanie ich w pułapki;
- stosowanie chemicznych insektycydów, w przypadkach kiedy wszystkie pozostałe metody nie są w stanie utrzymać populacji szkodników na korzystnym ekonomicznie poziomie, (Należy mieć świadomość, że naturalni wrogowie szkodników są zwykle bardziej podatni na te środki niż owady docelowe);
- kontrolę biologiczną definiowaną jako zmniejszanie populacji szkodników przez ich naturalnych wrogów przy aktywnym udziale człowieka (w odróżnieniu od kontroli naturalnej, która zachodzi w przyrodzie bez udziału człowieka).

Biologiczne czynniki kontroli można podzielić na:

- drapieżniki zjadające dużą ilość owadów w ciągu swojego życia ;
- pasożyty, których niedojrzałe stadia rozwijają się na pojedynczym żywicielu ostatecznie go zabijając;
- patogeny (wirusy, bakterie, grzyby) wyspecjalizowane w porażaniu określonych grup owadów, powodujące choroby prowadzące do osłabienia lub śmierci gospodarza [Hoffmann i Frodsham, 1993].

Spośród patogenów owadów znaczącą rolę odgrywają grzyby znane z wywoływania epizooecji o dużym zasięgu. Z tego powodu stały się one poważnymi

kandydatami do zastosowania jako bioinsektycydy. Wymaga to jednak szczegółowego opracowania sposobów ich użycia oraz sprawdzenia bezpieczeństwa ich stosowania.

Bezpieczeństwo użycia jakiegokolwiek mikrobiologicznego czynnika jest bezpośrednio związane z zakresem jego żywicieli. Grzyby wyspecjalizowane (np. *Pandora neoaphidis* atakujący tylko mszyce) stanowią mniejsze ryzyko dla organizmów nie będących celem ataku niż grzyby o szerokim zakresie żywicieli (np. *Beauveria bassiana* infekujący ponad 700 gatunków owadów). Z tego powodu zanim jakikolwiek gatunek grzyba stanie się uznanym bioinsektycydem, konieczne jest przeprowadzenie testów laboratoryjnych odnośnie zakresu jego infekcyjności. W przypadku fakultatywnych patogenów atakujących różnorodne gatunki, wyniki tych testów często diametralnie różnią się od wyników uzyskanych w warunkach polowych. Spowodowane jest to niemożliwością odwzorowania w laboratorium tak złożonych oddziaływań, jakie mają miejsce w przyrodzie. Z tego powodu większą uwagę zaczyna się poświęcać grzybom będącym obligatoryjnymi patogenami należącymi do rzędu *Entomophthorales* (na przykład rodzaj *Zoophthora*). Wprawdzie są one trudniejsze do hodowli laboratoryjnej niż *B. bassiana* czy *Metarhizium anisopliae*, lecz wykazują się wysokim stopniem infekcyjności oraz wyspecjalizowania. W ich przypadku weryfikacja selektywności poprzez testy laboratoryjne daje dobre wyniki.

Jedną ze strategii opracowanych w celu zwiększenia efektywności działania grzybów entomopatogenicznych polega na sprowadzeniu nowego gatunku bądź szczepu o wysokim stopniu porażania danego szkodnika z naturalnego miejsca jego występowania na inne. Sukcesem zakończyło się sprowadzenie *Zoophthora radicans* do Australii w celu kontroli mszycy lucerno-koniczynowej, *Therioaphis maculata* [Milner *et al.*, 1982]. Interesującym przykładem może być także grzyb *Entomophaga maimaiga*, obecnie szeroko rozprzestrzeniony w Północnej Ameryce i powodujący silne epizoocje brudnicy nieparki *Lymantria dispar* na północnym wschodzie stanów Zjednoczonych od 1989 roku. Grzyb ten pochodzi z Japonii i został sprowadzony do Północnej Ameryki blisko 80 lat temu [Soper *et al.*, 1984].

W celu zwalczania owadów żyjących w ziemi stosuje się zmasowane wprowadzenie grzybów entomopatogenicznych do środowiska. Owady należące do rodzin *Curculionidae* i *Scarabeidae* są poważnymi szkodnikami w wielu częściach świata. Ich larwy zwykle żyją w

ziemi, żywiąc się korzeniami wielu uprawnych roślin, natomiast dorosłe osobniki zjadają ich części zielone. Prowadzono próby zwalczania ich takimi grzybami, jak *Beauveria brongniartii* i *Metharizium anisopliae* na dwa sposoby. Populację larw kontrolowano poprzez wprowadzenie do ziemi konidiów, blastospor, fragmentów grzybni. Osobniki dorosłe zwalczano przez rozpylenie w powietrzu konidiów, blastospor bądź przez wprowadzenie grzyba do ziemi poprzez znoszące jaja samice. We Francji do wprowadzenia zarodników do ziemi używano specjalnych maszyn do drenowania [Ferron, 1978].

Opracowano także specjalne sposoby przygotowania preparatów z grzybni: suszenie rozdrobnionych fragmentów mycelium [Pereira i Roberts, 1990, 1991, Krueger *et al.*, 1992] oraz wytwarzanie granulek grzybni [Reinecke *et al.*, 1990]. Infekujące konidia w tych przypadkach są produkowane dopiero po wprowadzeniu grzybni do ziemi. Przykładem takiego zastosowania może być użycie granulek grzybni *M. anisopliae* do kontroli opuchłaka truskawkowca, *Otiorhynchus sulcatus*. Produkt o nazwie BIO 1021 otrzymano za pomocą specjalnej technologii fermentacji i suszenia. Używany był on w szklarniach i szkółkach drzew w postaci mieszanki z glebą do celów profilaktycznych [Zimmermann, 1994].

Niektóre szkodniki żyją w trudno dostępnych miejscach. W takich przypadkach użycie grzybów w wyżej opisany sposób jest praktycznie niemożliwe. Problem ten rozwiązano poprzez równoczesne użycie grzybów i pułapek feromonowych. We wstępnych badaniach zastosowano *Zoophthora radicans* łącznie z pułapką zawierającą feromon seksualny będący atraktantem dla samców tantnisia krzyżowiaczka - *Plutella xylostella* [Pell *et al.*, 1993]. Przeprowadzane eksperymenty wykazały, że samce tego owada mające kontakt z grzybem przenosiły go na larwy, co inicjowało bądź przyspieszało epizoocję.

Niska wilgotność względna jest poważnym problemem w użyciu grzybów entomopatogenicznych. Opracowanie preparatów wykorzystujących oleje lub olejowo-wodne emulsje wydaje się w tym przypadku bardzo obiecującą strategią [Prior *et al.*, 1988; Lomer *et al.*, 1993]. Obserwacje wskazują, że oleje zapewniają kontakt pomiędzy hydrofobowymi konidiami większości tych patogenów z równie hydrofobową kutikulą owada oraz zapobiegają wysuszeniu grzyba. Ponadto wykazują lekko toksyczny wpływ na niektóre owady, co wspomaga infekcje grzybowe. Niestety, znane są wypadki powodowania

przez mineralne bądź roślinne oleje reakcji fitotoksycznych. Konieczne jest z tego powodu przeprowadzanie badań z konkretnymi roślinami [Zimmermann, 1994]. Preparat na bazie *B. bassiana*, zwany Naturalis-L w postaci częściowo zemulsyfikowanego oleju z powodzeniem stosowano w USA celem kontroli kwiecika bawełnowca, *Anthonomus grandis* [Wright 1993].

Nie zawsze wyniki osiągnięte w laboratorium uzyskują potwierdzenie w warunkach polowych. Głównym powodem są tu odmienne i trudne do jednoznacznego zdefiniowania warunki środowiskowe. W takich przypadkach lepsze rezultaty może przynieść zastosowanie grzybów entomopatogenicznych równocześnie z subletalnymi dawkami chemicznych pestycydów bądź innymi entomopatogenami, po uprzednim sprawdzeniu wpływu tych czynników na siebie [Zimmermann, 1994]. Taki korzystny efekt obserwowano w przypadku użycia *Metharhizium spp.* razem z teflubenzuronem (insektycydem opartym na moczniku benzoilofenylowym) w stosunku do *Schistocerca gregaria* -pustynnej szarańczy, natomiast łączne stosowanie *B. brongiarthii* z różnymi pestycydami powodowało wysoką śmiertelność *Melolontha melolontha* L. ale tylko w laboratorium - próby polowe wypadały negatywnie [Zimmermann, 1992]. W warunkach laboratoryjnych przeprowadzono próby użycia kilku gatunków grzybów entomopatogenicznych: *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumoso-roseus* oraz dwóch gatunków entomopatogenicznych nicieni: *Steinernema carpocapsae* i *Heterorhabditis bacteriophora* w stosunku do oprzędzika pręgowanego *Sitona lineatus* L. W tym celu stosowano równocześnie dwa czynniki w różnych kombinacjach. Za każdym razem łączne zastosowanie tych czynników dawało zdecydowanie lepsze efekty niż oddzielne [Jaworska i Ropek, 1998].

### 1.3. Podział i taksonomia grzybów entomopatogenicznych

Grzyby entomopatogeniczne można podzielić na trzy grupy [Boczek, 1992]:

**1. Pasożyty bezwzględne** - odbywają cały cykl rozwojowy na wyższych organizmach i uszkadzają ich tkanki, często doprowadzając do śmierci żywiciela. Głównie należą one do rzędu *Entomophthorales* (owadomorki);

**2. Pasożyty względne** - fazę wegetatywną odbywają na żywych organizmach, a zarodnikują na osobnikach obumarłych, na których rozwijają się saprofitycznie (np. rodzaje: *Paecilomyces*, *Metharhizium*, *Hirsutella*);

**3. Pasożyty warunkowe** - prowadzą saprofityczny tryb życia, a tylko w pewnych okolicznościach przechodzą w formę pasożytniczą. Często atakują osobniki wygłodzone, ranne, doprowadzając je do śmierci ( np. rodzaje: *Beauveria*, *Verticillium*).

Grzyby entomopatogeniczne nie zajmują zdefiniowanego pod względem systematycznym miejsca lecz należą do różnych klas taksonomicznych. Jest to przyczyną ich ogromnego zróżnicowania w sposobie działania i doborze gospodarza. Patogeny te powodują mykozy w wielu różnych taksonach stawonogów i w prawie każdym rzędzie należącym do Owadów. Znanych jest około 750 gatunków grzybów entomopatogenicznych należących do 85 rodzajów. Większość gatunków zaklasyfikowana jest w trzech klasach: *Hyphomycetes*, *Zygomycetes* (rząd *Entomophthorales*) i *Ascomycetes* (w szczególności rodzaje *Cordyceps* i *Torubiella*) [Bell, 1974].

**Systematyka grzybów *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d i 2430a1** [Müller i Loeffler, 1987]:

*PHYCOMYCETES* (grzyby niższe)

|         |                                                           |
|---------|-----------------------------------------------------------|
| KLASA   | <i>Ascomycetes</i>                                        |
| RZĄD    | <i>Eurotiales</i>                                         |
| RODZINA | <i>Gymnoscaceae</i>                                       |
| RODZAJ  | <i>Paecilomyces</i> (anamorfa rodz. <i>Byssochlamys</i> ) |
| GATUNEK | <i>Paecilomyces</i> sp.                                   |

**Systematyka grzyba *Zoophthora phyllobii*** [Bałazy, 1993]:

*PHYCOMYCETES* (grzyby niższe)

|       |                                        |
|-------|----------------------------------------|
| KLASA | <i>Zygomycetes</i>                     |
| RZĄD  | <i>Entomophthorales</i> (owadomorkowe) |

|           |                                          |
|-----------|------------------------------------------|
| RODZINA   | <i>Entomophthoraceae</i> (owadomorki)    |
| RODZAJ    | <i>Zoophthora</i>                        |
| PODRODZAJ | <i>Neopandora</i>                        |
| GATUNEK   | <i>Zoophthora (Neopandora) phyllobii</i> |

**Systematyka grzyba *Zoophthora neoaphidis* [Bałazy, 1993]:**

*PHYCOMYCETES* (grzyby niższe)

|         |                                        |
|---------|----------------------------------------|
| KLASA   | <i>Zygomycetes</i>                     |
| RZĄD    | <i>Entomophthorales</i> (owadomorkowe) |
| RODZINA | <i>Entomophthoraceae</i> (owadomorki)  |

Dalsza systematyka tego gatunku jest przykładem problemów związanych z systematyką grzybów entomopatogenicznych. W różnych opracowaniach ten sam gatunek pojawia się pod różnymi nazwami rodzajowymi:

1. *Zoophthora neoaphidis* (Remaudiere et Hennebert) Bałazy
2. *Erynia neoaphidis* Remaudiere et Hennebert
3. *Erynia (Neopandora) neoaphidis* Remaudiere et Hennebert ex Benze'ev et Kenneth
4. *Pandora neoaphidis* (Remaudiere et Hennebert) Humber

#### **1.4. Cykl życiowy grzybów patogenicznych owadów**

Pomimo taksonomicznej różnorodności grzybów entomopatogenicznych można wyróżnić kilka faz rozwoju wspólnych dla większości z nich:

1. Adhezja zarodników do kutikuli owada następuje w wyniku ich kontaktu, który zależnie od gatunku następuje w sposób bierny lub poprzez chemotaksję. Decydujące znaczenie ma tu rozpoznanie właściwego żywiciela [Al-Aidroos i Roberts, 1978]. Procesy przylegania nie były szczegółowo badane dla grzybów entomopatogenicznych. Uważa się, że istotne są oddziaływania zarówno fizyczne jak i chemiczne [Fargues, 1984].



2. Kiełkowanie spor w warunkach *in vitro* wymaga ponad 90% wilgotności względnej. Taki wilgotny mikroklimat może istnieć w pobliżu liści roślin [Humber, 1984]. Sądzi się, że przypadku niskiej wilgotności środowiska odpowiedni mikroklimat do kiełkowania istnieje na zewnętrznej powierzchni kutikuli owada w następstwie jego oddychania poprzez przetchlinki. Za stymulację bądź inhibicję procesu kiełkowania odpowiedzialne są także związki i mikroflora występujące na kutikuli [Fargues, 1984].

3. Penetracja kutikuli następuje na skutek procesów mechanicznych jak i enzymatycznych, co potwierdzają badania aktywności enzymatycznych w warunkach laboratoryjnych, przy czym produkcja enzymów wydaje się być uzależniona od źródła kutikuli. Sugeruje to pewien ich udział w specyficzności mikoz [Gupta *et al.*, 1991, 1992, 1993];

4. Wzrost w hemolimfie - większość grzybów entomopatogenicznych prowadzi w hemolimfie owada wzrost wegetatywny [Roberts i Humber, 1981] w postaci mało widocznych drożdżopodobnych struktur lub ciał strzępkowych. Ta forma wzrostu umożliwia grzybowi szybkie rozprzestrzenienie się i kolonizację systemu krążenia, poza tym zwiększa powierzchnię kontaktu z pożywką. Niektóre gatunki z rzędu *Entomophthorales* aby nie zostać wykrytymi przez system immunologiczny gospodarza, produkują wegetatywne protoplasty [Tyrrel i MacLeod, 1972].

5. Śmierć żywiciela następuje poprzez wykorzystanie wszystkich składników odżywczych zawartych w hemolimfie, jak robi to większość grzybów należących do *Entomophthorales*, lub poprzez rozkład jego tkanek i organów zastępowanych szybko strzępkami grzybni. Niektóre grzyby produkują toksyny doprowadzające do stosunkowo szybkiej śmierci gospodarza. Późne stadia mykoz wykazują fizjologiczne symptomy w postaci konwulsji i braku koordynacji ruchu. Niektóre grzyby należące do *Cordicepiales* i *Entomophthorales* powodują zmiany w zachowaniu się owadów mające na celu łatwiejsze rozprzestrzenianie się infekcji [MacLeod, 1963]. Takim znanym przykładem jest zmiana w zachowaniu zakażonych grzybem *Zoophthora radicans* gąsienic bielinka kapustnika (*Pieris brassicae* L.). Zdrowe gąsienice żerując przemieszczają się z górnych liści ku dolnym, natomiast zakażone w godzinach bezpośrednio poprzedzających śmierć przerywają żerowanie i kierują się ku górze, gdzie zostają przytwierdzone do liścia chwytnikami grzyba.

Dzięki temu wytworzone konidia opadając w dół mogą łatwo osiadać na zdrowych larwach znajdujących się na niższych liściach [Batko, 1974].

6. Krótco po śmierci owada, grzybnia przerasta kutikulę na zewnątrz i zostają utworzone sporofory (najczęściej konidiofory) które produkują zarodniki (zwykle konidia) rozpoczynające kolejny cykl poprzez infekcję następnych osobników. U wielu gatunków grzybów proces ten ściśle zależy od stopnia wilgotności [Millstein *et al.*, 1983; Wilding, 1973]. W przypadku niesprzyjających warunków lub braku żywiciela, grzyby produkują zarodniki spoczynkowe lub inne przetrwalnikowe struktury, albo przeżywają w postaci uśpionej grzybni w wysuszonych mumiach owadów [Kenneth *et al.*, 1972; Wilding, 1969]. Większość gatunków *Entomophthorales* wytwarza cienkościenne zarodniki spoczynkowe [MacLeod, 1963]. Do tej pory nie są w pełni poznane warunki przerywania uśpienia struktur przetrwalnikowych, jednak duże znaczenie wydaje się odgrywać temperatura, wilgotność oraz fotoperiod [Perry i Latge, 1982; Wallace *et al.*, 1976].

W zależności od gatunku występują pewne różnice w tym podstawowym cyklu. Taką wyjątkową cechą rzędu *Entomophthorales* jest na przykład aktywne odrzucanie infekcyjnych konidiów oraz ich zdolność do produkcji kolejnych generacji konidiów w oczekiwaniu na odpowiedniego żywiciela [King i Humber, 1981]. Pierwszorzędowe konidia *Zoophthora radicans* mogą produkować drugorzędowe, które z kolei wytwarzają trzeciorzędowe i tak dalej aż do wyczerpania protoplastowych zapasów zarodnika.

## 1.5. Mykotoksyny produkowane przez grzyby patogeniczne owadów

W procesie patogenezy uczestniczy wiele czynników: związki wspomagające proces adhezji, enzymy degradujące kutikulę, inhibitory systemu obrony owada umożliwiające rozwój grzyba w hemolimfie, mykotoksyny. Pełne poznanie tych związków umożliwiłoby zrozumienie procesu patogenezy [Vey i Riba, 1988]. Pomimo tego, stosunkowo niewiele laboratoriów podejmuje badania w tym zakresie, a jeśli już, to ograniczają się one do toksyn i enzymów wydzielanych przez kilka dobrze znanych gatunków. Wiedza na temat nisko- i wysokocząsteczkowych mykotoksyn może być bardzo pomocna w selekcji szczepów

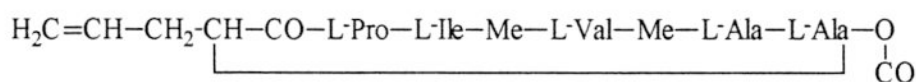


używanych jako bioinsektycydy. Do kontroli można byłoby wybierać hiperwirulentne szczepy produkujące i wydzielające duże ilości tych patogennych czynników. Gdyby jednak się okazało, że metabolity jakiegoś szczepu byłyby trwałe w środowisku i szkodliwe dla organizmów nie będących celem ataku - taki szczep nie byłby wykorzystywany.

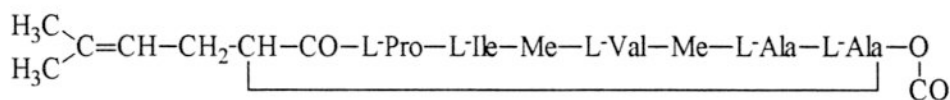
### 1.5.1. Mykotoksyny niskocząsteczkowe

Związki te są zwykle metabolitami wtórnymi otrzymywanymi z podstawowych związków metabolizmu pierwszorzędowego (octany, aminokwasy). Ich produkcja rozpoczyna się zwykle w późniejszych stadiach rozwoju grzyba. Znane są różnego rodzaju mykotoksyny: małe peptydy, barwniki, kwasy organiczne i inne, jak np. pochodne laktonów. Spośród tych związków, szczególne znaczenie w ochronie roślin mogą mieć cykliczne peptydy. Przy Unii Europejskiej powstał nawet projekt pod tytułem „Cykliczne peptydy grzybów jako nowe bioinsektycydy”.

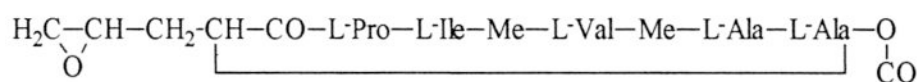
Bardzo dobrze poznaną grupą toksyn jest rodzina **destruksyn**, cyklicznych heksapeptydów produkowanych między innymi przez *Metarhizium anisopliae* [Aldridge *et al.*, 1969; Vey, 1998]. Uważa się, że związki do niej należące mogą stać się obiecującymi insektycydami. Jednak pomimo selektywności działania destruksyn w stosunku do stawonogów, stwierdzono w kilku przypadkach pewien toksyczny wpływ na ssaki [Fargues i Robert, 1987]. Z tego powodu potrzebne są pełne toksykologiczne badania wpływu na zdrowie człowieka oraz dzikie i domowe zwierzęta.



**Destruksyna A**

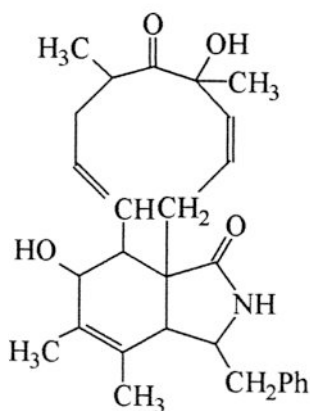


**Destruksyna B**

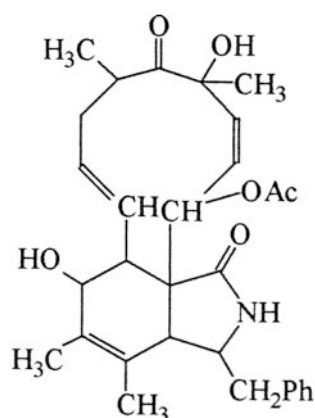


**Destruksyna E**

*Metarhizium anisopliae* produkuje także **cytochalazyny C i D** - związki o nieco bardziej skomplikowanej budowie [Aldridge *et al.*, 1969]:



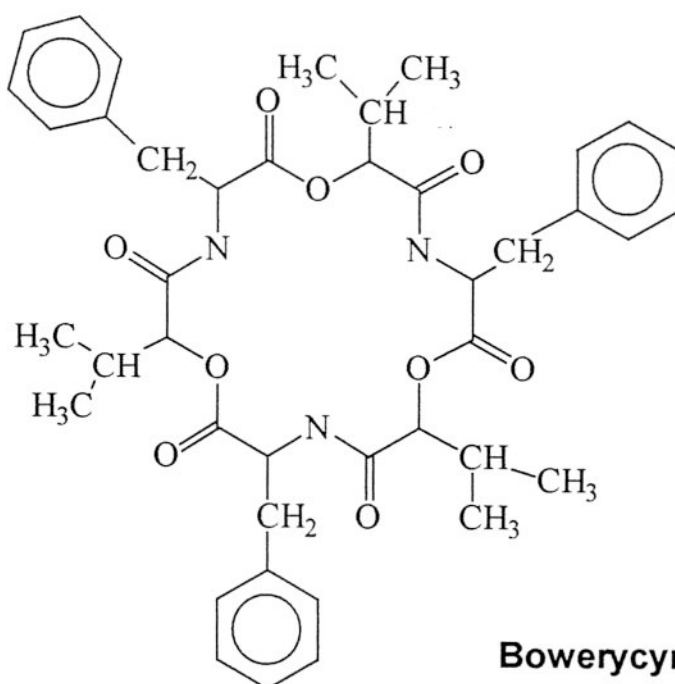
**Cytochalazyna C**



**Cytochalazyna D**

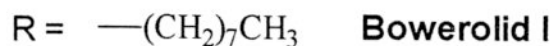
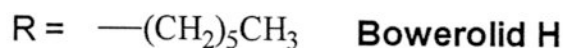
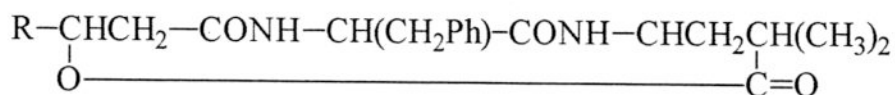
Obok *Metarhizium anisopliae* najczęstszym obiektem badań są grzyby *Beauveria bassiana* oraz *Beauveria brongniartii*. Zidentyfikowano już kilka cyklicznych peptydów wydzielanych przez te szczepy. Są to:

**Bowerycyna** o jeszcze nie w pełni zdefiniowanej toksyczności [Hamill *et al.*, 1969]:

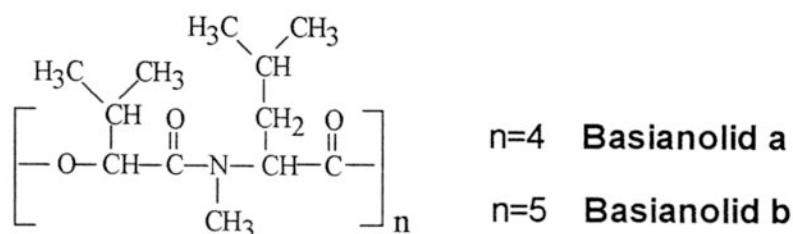


**Bowerycyna**

**Bowerolidy** [Suzuki *et al.*, 1977]:



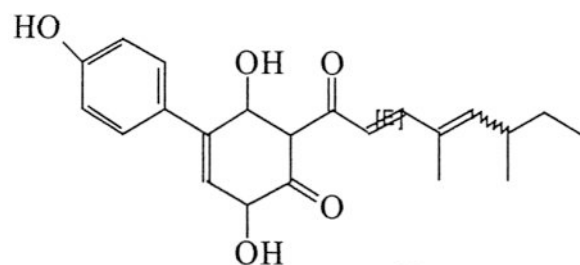
Zdecydowanie wyższą toksycznością charakteryzują się **Basianolidy** wydzielane również przez *B. bassiana* oraz inny bardzo znany patogen owadzi - *Verticillium lecanii*:



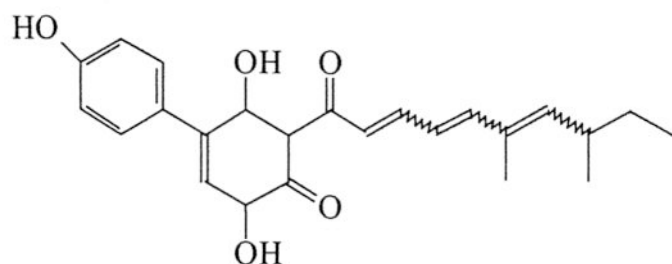
Zarówno destruksyny jak i inne cykliczne peptydy wykazują się dużą stabilnością nawet w układzie trawiennym owada. Obserwowany efekt insektycydowy poprzez iniekcję oraz podanie doustne zależy od gatunku żywiciela. Efektywność tych związków zależy również od innych czynników: stadium rozwoju, wieku, płci, sposobu odżywiania się żywiciela oraz czystości źródła mykotoksyn. W najbliższym czasie nie jest możliwe zastosowanie badań molekularnych i inżynierii genetycznej w stosunku do peptydów. Spowodowane jest to tym, że peptydowe toksyny wydzielane przez grzyby nie są rezultatem syntezy rybosomalnej. Są one produktem aktywności wielkich multienzymatycznych kompleksów - syntetaz. Do tej pory sklonowano i częściowo zsekwencjonowano tylko jeden gen podejrzewany o udział w kodowaniu syntetazy Dtx [Vey, 1998]. Z tego powodu nie przewiduje się w najbliższym czasie roślin transgeniczných produkujących tego typu mykotoksyny grzyba.

Spośród niskocząsteczkowych toksyn o niepeptydowym charakterze poznane są :

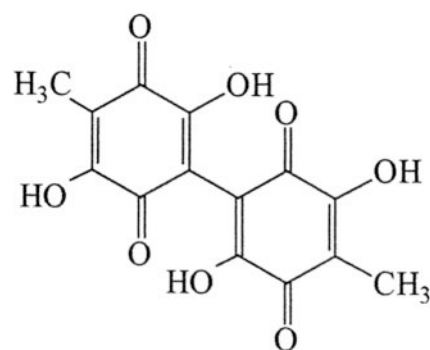
Produkowane przez *B. brongniartii* [Strasser *et al.*, 1998] – **Basianina**, **Tenellina** i **Oosporeina**:



**Tenellina**

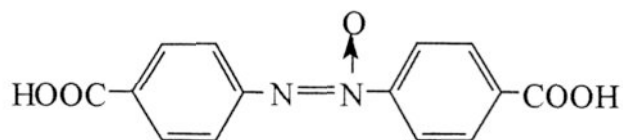


**Basianina**

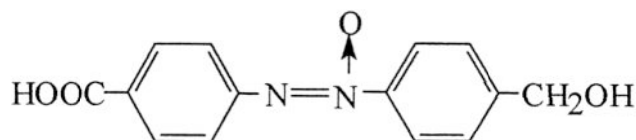


**Oosporeina**

oraz wydzielane przez *Entomophthora virulenta* [Claydon , 1978; Claydon i Grove, 1978] dwa związki innego typu:



**kwas 4,4'-azoksybenzeno dikarboksylowy**



**kwas 4,4'-hydroksymetylo azoksybenzeno karboksylowy**

### 1.5.2. Mykotoksyny wielkocząsteczkowe

Mykotoksyny wielkocząsteczkowe zostały zbadane tylko w niewielkim zakresie. Zwykle są one białkami lub glikoproteidami. Kilka zidentyfikowano w hemolimfie żywiciela, lecz nie zostały one do końca oczyszczone [Mazet *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 1994] i z tego powodu nie opisano dokładnie ich struktur oraz efektów biologicznych. W hodowlach na podłożach sztucznych stwierdzono obecność związków, zwykle o charakterze proteolitycznym, wykazujących silnie toksyczny wpływ na owady. Tylko jeden z nich został całkowicie oczyszczony - **Hirsutellina A** produkowana przez grzyb atakujący stawonogi - *Hirsutella thompsonii* [Mazet, 1992; Mazet i Vey, 1995]. Obecnie wiadomo, że jest to 15 kDa białko, o pHI=10.5, nieglikozylowane. Znana jest także sekwencja 34 aminokwasów od końca NH i pewnych fragmentów peptydowych uzyskanych poprzez trawienie proteolityczne [Vey, 1998].

Ogólnie uważa się, że do biologicznej kontroli owadów trudno stosować wielkocząsteczkowe toksyny grzybów z powodu trudności w zachowaniu ich złożonej przestrzennej struktury oraz aktywności w naturalnym środowisku i przewodzie pokarmowym stawonogów. Jednak różnorodność białek produkowanych przez mikroorganizmy pozwala przypuszczać, że możliwe jest uzyskanie białka wystarczająco stabilnego i wysoce toksycznego *per os*.

Długoterminowe i atrakcyjne perspektywy zastosowań mogą być oczekiwane od badań nad genami białek i glikoprotein. Proponuje się dwa główne zastosowania:

- wyselekcjonowane geny mogłyby być wszczepiane grzybom w celu zwiększenia ich wirulencji, lub wirusom (szczególnie bakulowirusom) czy bakteriom;
- transformacja uprawianych roślin przez geny grzybów, w celu uzyskania nowych roślin transgenicznych chronionych przed najczęściej występującymi szkodnikami upraw. Takie zastosowanie jest możliwe tylko wtedy, gdy związek wykazuje silną toksyczność po jego spożyciu, i nie stwarza problemu bezpieczeństwa dla środowiska [Vey, 1998].

## 1.6. Regulacja wydzielania metabolitów drugorzędowych u grzybów

Metabolity wtórne (idiolity) są związkami produkowanymi zwykle podczas fazy (idiofazy) następującej po fazie szybkiego wzrostu grzyba (tiofofазie). Zwykle w pożywkach bogatych, gwarantujących szybki wzrost tych mikroorganizmów fazy te są oddzielone, natomiast w przypadku pożywek ubogich mogą się na siebie nakładać. Określenie metabolity drugorzędowe nie wynika z czasu ich produkcji, lecz z faktu, że związki te nie są niezbędne dla wegetatywnego wzrostu mikroorganizmu. Zdolność ich wytwarzania posiadają jedynie pojedyncze gatunki z całych rodzajów. Zawierają one nietypowe chemiczne połączenia, jak  $\beta$ -laktamowe pierścienie, cykliczne peptydy zbudowane z typowych bądź modyfikowanych aminokwasów, nienasycone wiązania poliacetylenów i polienów oraz duże pierścienie makrolidowe. Związkami tego typu są: mykotoksyny, antybiotyki, barwniki i feromony. Idiolity produkowane są zwykle nie jako pojedyncze związki, lecz jako kilka należących do określonej rodziny chemicznej - jest to spowodowane niską specyficznością niektórych enzymów uczestniczących w metabolizmie wtórnym. Na poszczególne szlaki biosyntetyczne często wpływa mechanizm regulacyjny polegający m. in. na zależności od źródła węgla, azotu, fosforanów czy też indukcji enzymu. Innymi czynnikami wpływającymi na wydzielanie metabolitów drugorzędowych są: zawartość metali w pożywce, poziom tlenu, światło i temperatura. Zwykle najlepszym źródłem węgla dla wzrostu jest glukoza, lecz opóźnia ona wydzielanie wielu metabolitów drugorzędowych przynajmniej do momentu jej zużycia. Do produkcji idiolitów lepszymi źródłami węgla okazują się być trudniej przyswajalne polisacharydy, oligosacharydy oraz oleje. Najbardziej znanym przykładem represji tego typu może być produkcja penicyliny G przez *Penicillium chrysogenum*. Glukoza hamuje powstawanie tripeptydu z kwasu L- $\alpha$ -aminodipinowego, L-waliny i L-cysteiny. Z kolei wytwarzanie aflatoksyn przez mikroorganizmy (np. *Aspergillus parasiticus*) jest proporcjonalne do ilości glukozy w pożywce, gdyż produkcja tych mykotoksyn jest indukowana przez produkt metabolizmu tego składnika. Jony  $\text{NH}_4^+$  mają negatywny wpływ na produkcję idiolitów, na przykład produkcja octanów fenoli przez *Aspergillus fumigatus* zachodzi dopiero po pełnym zużyciu tych jonów. Podobny wpływ na *Gibberella fujikuroi* ma inne źródło azotu - glicyna.

Grzyb ten wytwarza bikawerynę dopiero po wyczerpaniu się glicyny. Wydzielanie tego metabolitu inhibują także wyższe stężenia nieorganicznych fosforanów. W wielu hodowlach mają one duże znaczenie. Stosowane w zakresie stężeń 0.3 - 300 mM zwykle przyspieszają rozwój mikroorganizmów, lecz już stężenie 10mM zaczyna hamować produkcję wielu metabolitów wtórnych. W niektórych przypadkach dla produkcji określonego metabolitu ważna jest stymulacja enzymów uczestniczących w jego biosyntezie. Takim przykładem była wymieniona powyżej stymulacja produkcji aflatoksyn przez glukozę. W przypadku produkcji benzodiazepanowych alkaloidów przez *Penicillium cyclopium* stymulatorem procesu jest fenyloalanina. Innymi czynnikami uczestniczącymi w regulacji wytwarzania idiolitów są metale. Cynk w stężeniu większym niż jest to wymagane dla wzrostu grzyba nasila produkcję aflatoksyn, z kolei nadmiar manganu jest konieczny dla biosyntezy patuliny. Wysoki poziom tlenu w pewnych przypadkach może działać hamująco np. na produkcję aflatoksyn. Światło powoduje różne efekty - uważa się że ma negatywny wpływ na wydzielanie aflatoksyn natomiast stymuluje tworzenie enniatyn przez *Fusarium sambucinum*. Korzystny wpływ może mieć obniżenie temperatury poniżej poziomu gwarantującego optymalny wzrost mikroorganizmu. Przykładem na to ponownie jest produkcja enniatyn i aflatoksyn. Proces biosyntezy metabolitów wtórnych zostaje przerwany także na skutek nieodwracalnego zaniku jednego lub większej ilości enzymów szlaku biosyntetycznego i efektu sprzężenia zwrotnego akumulowanego produktu [Demain, 1986].

## 2. CELE BADAWCZE

1. Poszukiwanie czynników, które mogą uczestniczyć w procesie infekcji i toksykacji organizmu owada postanowiono dokonać poprzez:

a) szczegółową analizę frakcji neutralnych lipidów zawartych w grzybnii entomopatogena - *Zoophthora (Neopandora) phyllobii* oraz sprawdzenie, czy w jej składzie nie występują mykotoksyny;

b) przeprowadzenie analizy (HPLC) metabolitów wydzielanych do podłoża przez wybrane szczepy z rodzaju *Zoophthora* i *Paecilomyces*, w zależności od wieku hodowli;

c) wykonanie testów na aktywność biologiczną metabolitów zawartych w płynie pohodowlanym badanych szczepów, w stosunku do larw *Galleria mellonella*, w zależności od dnia hodowli tych grzybów;

d) poszukiwanie korelacji pomiędzy obrazem HPLC (wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa) metabolitów zawartych w płynie pohodowlanym, a jego oddziaływaniem na larwy *G. mellonella*;

e) porównanie aktywności biologicznej względem larw *G. mellonella* surowego płynu po hodowli *Z. neoaphidis*, oraz jego poszczególnych frakcji uzyskanych po ultrafiltracji;

f) Oznaczenie aktywności proteolitycznej, lipolitycznej, chitynolitycznej oraz amylolitycznej filtratu po hodowli *Z. neoaphidis* w zależności od czasu trwania hodowli tego grzyba.

2. Próby izolacji metabolitów wydzielanych przez szczepy *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1 i *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d.

3. Przeprowadzenie procesu biotransformacji wybranych związków modelowych w celu określenia właściwości enzymatycznych typu utlenienia - redukcji badanych szczepów, oraz sprawdzenia, czy grzyby te można stosować wraz z innymi związkami wykorzystywanymi do ochrony roślin bez powodowania degradacji tych związków.



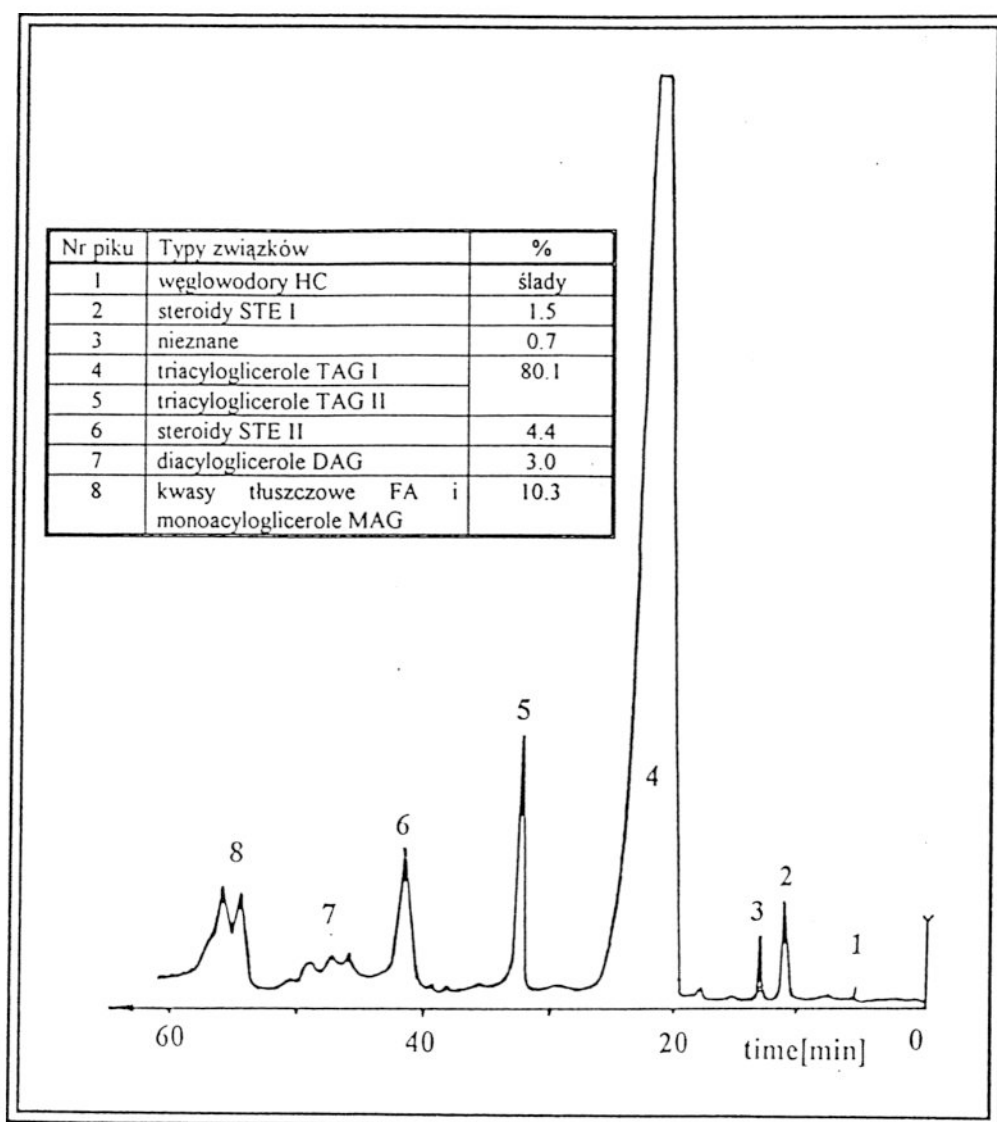
### 3. BADANIA WŁASNE

#### 3.1. Neutralne lipidy izolowane z grzybni *Zoophthora phyllobii*

Grzyby należące do rodzaju *Zoophthora* odgrywają znaczącą rolę w regulacji populacji owadów w naturze, dlatego mogą stać się obiecującymi bioinsektycydami [Wraight *et al.*, 1993, Fau i Li 1994, Wilding 1983]. Pomimo tego, ilość informacji o ich metabolitach jest raczej niewielka. Chemiczna charakterystyka tych produktów jest niezbędna w badaniach mechanizmu infekcji organizmu owada a dodatkowo może dostarczyć cennych informacji dla chemo-taksonomii rodzaju *Zoophthora*. Ułatwia to bardziej precyzyjną klasyfikację mikroorganizmów w grupie entomopatogenów. Celem badań podejmowanych w naszym laboratorium jest poszukiwanie związków, które mogłyby być biologicznie aktywne w stosunku do organizmu owadów. We wcześniejszych publikacjach [Urbańczyk *et al.*, 1992; Zabza *et al.*, 1995] prezentowane były główne składniki frakcji neutralnych lipidów ekstrahowanych z grzybni 8 dnia wzrostu *Z. (Erynia) ovispora* i *Z. (Erynia) neoaphidis*. Wprawdzie wzrost grzybni dla tych szczepów był największy 6 i 7 dnia hodowli, jednakże 8 dnia masa frakcji neutralnych lipidów była większa a skład najbardziej zróżnicowany. W ramach pracy magisterskiej przeprowadzono analizę ilościowych i jakościowych zmian w biosyntezie neutralnych metabolitów przez szczep *Z. phyllobii* w zależności od dnia hodowli tego grzyba oraz scharakteryzowano frakcje wolnych kwasów tłuszczowych ekstrahowanych z grzybni i przesączu pohodowlanego 4 dnia hodowli. Przeważającym składnikiem ekstraktów były triacyloglicerole (TAG). Największa ilość tych związków występowała 4 dnia hodowli. Ilość „niezwiązanych” kwasów tłuszczowych nie zmieniała się znacząco, natomiast lokalne maksimum diacylogliceroli (DAG) wystąpiło 10 dnia wzrostu. Zawartość steroli prawie niezmienna do 8 dnia osiągnęła swoją największą wartość dopiero 16-tego dnia hodowli.

W obecnej pracy, w celu porównania składu lipidów badanego szczepu ze składem analogicznych frakcji, produkowanych przez innych przedstawicieli rodzaju *Zoophthora* - *Z. ovispora* [Urbańczyk *et al.*, 1992] oraz *Z. neoaphidis* [Zabza *et al.*, 1995] dokładnej charakterystyce poddano frakcję ekstrahowaną z grzybni 8 dnia hodowli. Na rysunku 1 przedstawiono chromatogram HPLC tej frakcji.

Charakterystyka neutralnych lipidów została dokonana dzięki pomocy prof. Szafranka i jego współpracowników z Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, którzy opracowali metody identyfikacji poszczególnych typów związków i dysponowali odpowiednią aparaturą i wzorcami. Analizy NMR zostały przeprowadzone przez prof. G. Cimino z Istituto per la Chimica di Molecole di Interesse Biologico del C.N.R. w Arco Felice (Neapol) [Greb-Markiewicz *et al.*, 1998]. Zastosowanie koiniekcji oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową pozwoliło na wydzielenie następujących grup związków:

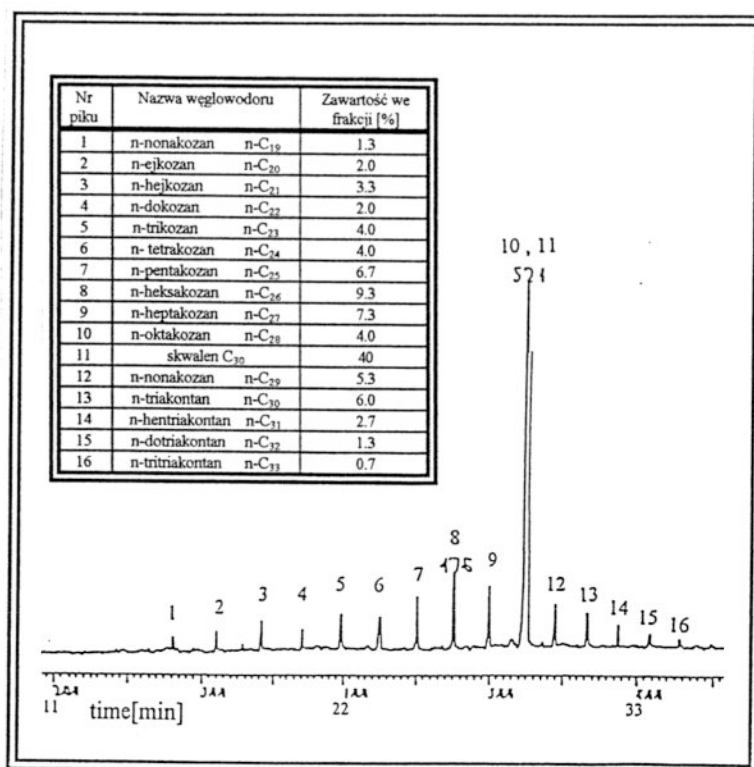


Rys. 1. Chromatogram HPLC ekstraktu z 8 dnia hodowli *Z. phyllobii*

### 3.1.1. Węglowodory (HC)

Zawartość procentowa powyższej frakcji w całym ekstrakcie była bardzo niska. Podobnie do wyników prezentowanych przez innych autorów [Weete, 1976], jej składnikami są homologiczne serie n-alkanów zawierających od 10 do 33 atomów węgla. Potwierdzone zatem zostały wcześniejsze obserwacje, że analogicznie do innych prymitywnych organizmów, grzyby produkują podobne ilości nieparzystych i parzystych serii węglowodorów [Lösel, 1988]. Nie stwierdzono obecności izo- oraz anteizo- pojedynczo rozgałęzionych alkanów.

Charakterystyczna dla tej frakcji była obecność na chromatogramie silnego sygnału pochodzącego od skwalenu. Jego widmo masowe było identyczne z przedstawionym przez Weete'go [1976]. Związek ten jest rzadko izolowany z grzybów. Tworzenie skwalenu w hodowli wytrząsanej grzyba *Rhizopus arrizus* tłumaczy się niedostatkim tlenu w zanurzonej grzybni [Weete *et al.*, 1970]. Występowanie tego związku stwierdzono także we frakcji węglowodorowej membran cytoplazmatycznych *Candida utilis* [Fabre-Joneau *et al.*, 1969].

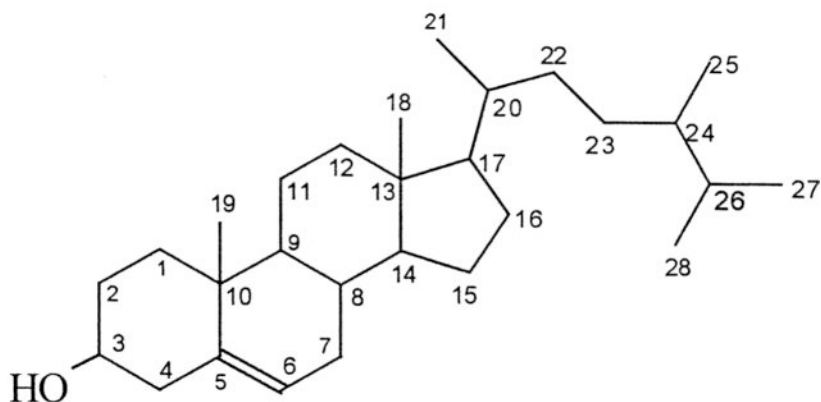


Rys. 2. Chromatogram gazowy frakcji węglowodorów

### 3.1.2. Steroidy

Grzyby mogą produkować szeroką gamę steroli, przy czym większość gatunków kumuluje tylko jeden lub dwa główne połączenia z tej grupy. W przypadku *Z. phyllobii* takim podstawowym składnikiem frakcji steroidowej jest kampesterol lub jego epimer 22-dihydrobrassicasterol (STE II na Rys.1). Struktury te udowadnia widmo masowe trimetylosilylowej pochodnej sterolu, nie pozwala ono jednakże na jednoznaczne przypisanie jednej z nich [Brooks *et al.*, 1968]. Porównawczy indeks retencji (octan cholesterolu RRI=1) acetylowych pochodnych mierzony na kolumnie kapilarnej DB-1 w 260°C wynosił 1.28 i był bliski otrzymanemu dla octanu kampesterolu lub 22-dihydrobrassicasterolu (1.29) [Itoh *et al.*, 1982]. Przeprowadzenie koiniekcji ze standardem (kampesterol/22-dihydrobrassicasterol) potwierdziło zgodność z tymi związkami, lecz bez rozróżnienia z którym. Obecność tych samych związków (jednego lub dwóch) stwierdzono wcześniej dla *Z. (Erynia) neoaphidis* [Zabza *et al.*, 1995].

Z frakcji STE I wyizolowano główny składnik - kampesterol zestryfikowany kwasem tłuszczowym. Jego struktura została zidentyfikowana na podstawie widma NMR, na którym obecne były sygnały czterech grup metylowych przy  $\delta = 0.79, 0.80, 0.85$  i  $0.91$  ppm, charakterystyczne dla łańcucha bocznego kampesterolu. Singlety przy  $\delta = 0.68$  i  $1.03$  ppm, oraz obraz pozostałych sygnałów na widmie, jednoznacznie udowodniały obecność steroidowego szkieletu. Częściową strukturę kwasu tłuszczowego ukazują triplety:  $\text{CH}_2\text{-CO}$  przy  $\delta = 2.31$  oraz  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  przy  $\delta = 0.88$ . Złożony układ sygnałów przy  $\delta \approx 5.35$  ppm może pochodzić od protonów H-3 oraz H-6.

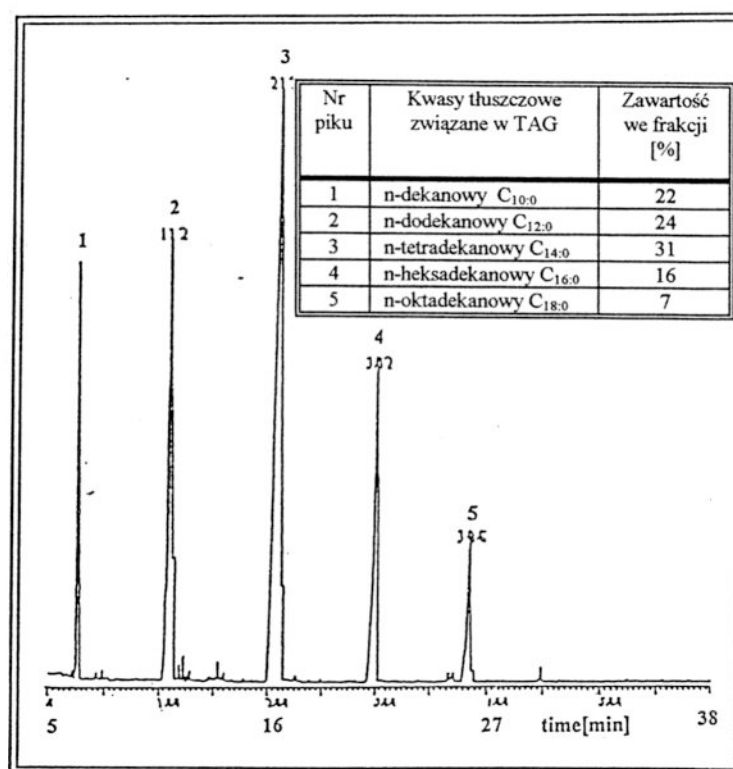


Rys. 3. Kampesterol/ 22-dihydrobrassicasterol

### 3.1.3. Triacyloglicerole (TAG)

Skład frakcji TAG został określony przez spektrometrię masową FD MS (desorpcja polem). W tabeli 1 przedstawiono widmo masowe FD oraz prawdopodobną zawartość kwasów tłuszczowych triacylogliceroli, wydedukowaną na podstawie analizy GC/MS ich estrów trójmetylosilylowych. Zawierają one jony o  $m/e$  odpowiadających triacyloglicerolom o ogólnej liczbie atomów węgla 37, 39, 41, 45, 47, 49, 51, 53 oraz 55. Gazowy chromatogram (GC/MS) kwasów tłuszczowych w postaci estrów silylowych został przedstawiony na rys. 3. Stwierdzono na nim obecność tylko nasyconych kwasów tłuszczowych od C-10 do C-18.

Przypadek elucji podwójnych pików triacylogliceroli (frakcja TAG I oraz TAG II na rys. 1) podczas chromatografii gazowej na kolumnie Si-60 stwierdzony został także przez innych badaczy [Christie, 1985].



Rys. 4. Chromatogram gazowy silylowych estrów kwasów tłuszczowych związanych w triacyloglicerolach

Tabela 1. Sygnały widoczne na widmie FD MS oraz prawdopodobny skład triacylogliceroli

| m/e | Intensywność<br>względna [%] | Skład triacylogliceroli |       |       |
|-----|------------------------------|-------------------------|-------|-------|
| 610 | 37                           | C10:0                   | C10:0 | C14:0 |
|     |                              | C10:0                   | C12:0 | C12:0 |
| 638 | 100                          | C10:0                   | C10:0 | C16:0 |
|     |                              | C10:0                   | C12:0 | C14:0 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C12:0 |
| 666 | 50                           | C10:0                   | C10:0 | C18:0 |
|     |                              | C10:0                   | C12:0 | C16:0 |
|     |                              | C10:0                   | C14:0 | C14:0 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C14:0 |
| 694 | 95                           | C10:0                   | C18:0 | C16:0 |
|     |                              | C10:0                   | C12:0 | C18:0 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C16:0 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C14:0 |
| 718 | 15                           | C10:0                   | C10:0 | C22:2 |
|     |                              | C10:0                   | C12:0 | C20:2 |
|     |                              | C10:0                   | C14:0 | C18:2 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C18:2 |
| 722 | 42                           | C10:0                   | C16:0 | C16:0 |
|     |                              | C10:0                   | C14:0 | C18:0 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C16:0 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C18:0 |
|     |                              | C14:0                   | C14:0 | C14:0 |
| 746 | 30                           | C10:0                   | C10:0 | C24:2 |
|     |                              | C10:0                   | C12:0 | C22:2 |
|     |                              | C10:0                   | C14:0 | C20:2 |
|     |                              | C10:0                   | C16:0 | C18:2 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C20:2 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C18:2 |
| 750 | 62                           | C10:0                   | C16:0 | C18:0 |
|     |                              | C12:0                   | C16:0 | C16:0 |
|     |                              | C14:0                   | C14:0 | C16:0 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C18:0 |
| 802 | 52                           | C10:0                   | C14:0 | C24:2 |
|     |                              | C10:0                   | C16:0 | C22:2 |
|     |                              | C12:0                   | C12:0 | C24:2 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C22:2 |
|     |                              | C14:0                   | C14:0 | C20:2 |
|     |                              | C14:0                   | C16:0 | C18:2 |
| 806 | 70                           | C10:0                   | C16:0 | C18:0 |
|     |                              | C12:0                   | C16:0 | C16:0 |
|     |                              | C14:0                   | C14:0 | C16:0 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C18:0 |
| 830 | 35                           | C10:0                   | C16:0 | C24:2 |
|     |                              | C12:0                   | C14:0 | C24:2 |
|     |                              | C12:0                   | C16:0 | C22:2 |
|     |                              | C12:0                   | C18:0 | C20:2 |
|     |                              | C14:0                   | C14:0 | C22:2 |
|     |                              | C16:0                   | C16:0 | C18:2 |
| 834 | 72                           | C14:0                   | C18:0 | C18:0 |
|     |                              | C16:0                   | C16:0 | C18:0 |

### 3.1.4. Diacyloglicerole (DAG)

Diacyloglicerole są związkami towarzyszącymi triacyloglicerolom u grzybów. Są one diestrami glicerolu, występującymi w dwóch izomerycznych formach: strukturach 1,2- oraz 1,3-diacylo. W celu przeprowadzenia analizy GC przeprowadzono je w stabilne etery silylowe. Uzyskano dobry rozdział w zależności od łańcuchów kwasów tłuszczowych. Dodatkowo widma masowe metylowych pochodnych eterów diacylogliceroli pozwalały na identyfikację składu kwasów tłuszczowych i izomerycznych 1,2- lub 1,3- struktur.

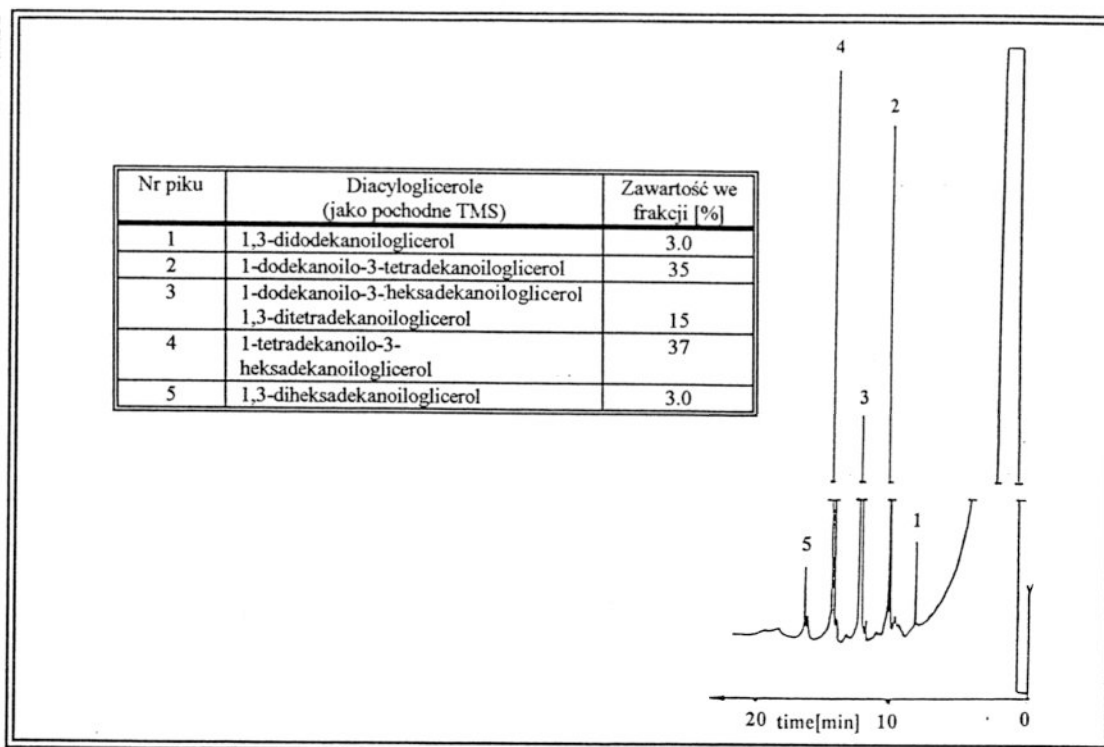
Na chromatogramie gazowym pochodnych TMS frakcji diacylogliceroli widocznych jest pięć związków (Rys. 4). Odpowiadające im jony zawarte są w tabeli 2. Jon  $(M-RCOOCH_2)^+$  może służyć zarówno do identyfikacji kwasów jak i rozróżnienia pomiędzy izomerami 1,2- i 1,3-. Dla 1,3-diacylowych pochodnych podstawionych dwoma identycznymi grupami występował jeden intensywny sygnał, a dla podstawionych dwoma różnymi acylami - dwa sygnały (Tab. 2). Jon  $(M-RCOOCH_2)^+$  na widmach 1,2 -pochodnych jest niewidoczny [Curstedt, 1974], stąd można było stwierdzić, że badany grzyb nie produkuje tych połączeń.

Dalsze potwierdzenia izomerycznej struktury wynikały z porównania intensywności jonów  $RCO^+$  i  $(R-COO=Si(CH_3)_2)^+$  [Myher *et al.*, 1978]. Natężenie jonów  $(R-COO=Si(CH_3)_2)^+$  dla izomerów 1,2- (z jednym lub dwoma różnymi acylami) powinno być zdecydowanie większe od natężenia jonów  $RCO^+$ . Na tej podstawie można było jednoznacznie stwierdzić, że w przeciwieństwie do *Z. ovispora* [Urbańczyk *et al.*, 1992] i *Z. neoaphidis* [Zabża *et al.*, 1995], w przypadku *Z. phyllobii* nie stwierdzono obecności 1,2-dwupodstawionych diacylogliceroli. Natomiast diacyloglicerole występujące u *Z. phyllobii*, obecne były także w przypadku *Z. ovispora* lecz w znacznie mniejszych ilościach.

Tabela 2. Charakterystyczne jony diacylogliceroli (w postaci pochodnych TMS) wykstrahowanych z grzybni *Zoophthora phyllobii* 8 dnia hodowli

| Nr piklu na chromatogramie GC | m/e                          |                                       |                            | Diacyloglicerole                                                       |
|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|                               | M-RCOOCH <sub>2</sub> +      | RCOOSi(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | RCO+                       |                                                                        |
| 1                             | 315(100)*                    | 257(30)                               | 183(55)                    | 1,3-didodekanoiloglicerol                                              |
| 2                             | 315(95); 343(90)             | 257(20); 285(18)                      | 183(40); 211(35)           | 1-dodekanoilo-3-tetradekanoiloglicerol                                 |
| 3                             | 315(25); 371(20)<br>343(100) | 257(5); 313(3)<br>285(17)             | 183(10); 239(8)<br>211(35) | 1-dodekanoilo-3-heksadekanoiloglicerol<br>1,3-ditetradekanoiloglicerol |
| 4                             | 343(70); 371(68)             | 284(13); 313(11)                      | 211(35); 239(25)           | 1-tetradekanoilo-3-heksadekanoiloglicerol                              |

\*intensywności względne



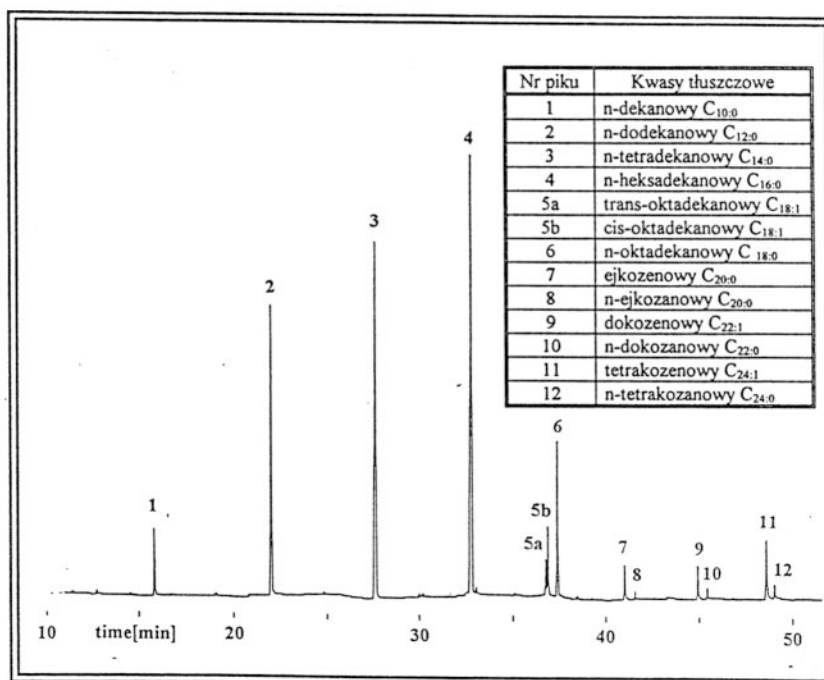
Rys. 4. Chromatogram gazowy pochodnych TMS diacylogliceroli



### 3.1.5. Wolne kwasy tłuszczowe (FA)

Wolne kwasy tłuszczowe są znaczącym składnikiem frakcji lipidowej grzybów. Najczęściej spotykanymi są homologiczne serie n-nasyconych bądź n-nienasyconych monokarboksylowych kwasów różniących się o jeden atom węgla w zakresie od C10 do C26. Rozdzielone za pomocą HPLC kwasy, poddawane były analizie GC/MC w postaci metylowych estrów (Rys. 5). Frakcja składa się z dwóch homologicznych serii kwasów tłuszczowych: nasyconych od C10 do C24 oraz nienasyconych od C18 do C24. Widoczne są także ślady kwasów z nieparzystą liczbą atomów węgla w zakresie pomiędzy C15 i C25. Przed metylowym estrem kwasu oktadekanowego zostały wymyte dwa geometryczne izomery metylowych estrów kwasu C18:1 o identycznych widmach masowych. Prawdopodobnie są to geometryczne izomery kwasu C18:1, przy czym na niepolarnej fazie CP SIL 5CB izomer trans został wymyty przed izomerem cis.

W czasie wzrostu grzyba następowały zmiany składu frakcji FA. Najbardziej charakterystyczny był wzrost zawartości kwasu tetrakozenowego aż do 16 dnia hodowli, kiedy to stawał się głównym składnikiem frakcji, podczas gdy malała zawartość kwasu heksadekanowego.



Rys. 5. Chromatogram gazowy metylowych estrów wolnych kwasów tłuszczowych

Tabela 3. Skład wolnych kwasów tłuszczowych u *Z. phyllobii* w porównaniu z innymi przedstawicielami rodzaju *Zoophthora*

| Kwasy tłuszczowe |       | <i>Z. phyllobii</i><br>(4 dzień)<br>[%] | <i>Z. phyllobii</i><br>(8 dzień)<br>[%] | <i>Z. ovispora</i> *<br>(8 dzień)<br>[%] | <i>Z. neoaphidis</i> #<br>(8 dzień)<br>[%] |
|------------------|-------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| dekanowy         | C10:0 | 1.5                                     | 4.1                                     | -                                        | 84.0                                       |
| dodekanowy       | C12:0 | 25.3                                    | 15.0                                    | 5.8                                      | 1.2                                        |
| tetradekanowy    | C14:0 | 21.0                                    | 28.8                                    | 12.5                                     | 1.2                                        |
| pentakozanowy    | C15:0 | -                                       | -                                       | 0.1                                      | -                                          |
| heksadekanowy    | C16:0 | 18.0                                    | 31.0                                    | 16.8                                     | 8.5                                        |
| heksadekenowy    | C16:1 | -                                       | -                                       | 0.3                                      | -                                          |
| heptadekanowy    | C17:0 | -                                       | -                                       | 0.1                                      | -                                          |
| oktadekanowy     | C18:0 | 14.0                                    | 6.5                                     | 44.7                                     | 3.9                                        |
| oktadekenowy     | C18:1 | 6.2                                     | -                                       | 8.2                                      | 0.2                                        |
| oktadienowy      | C18:2 | -                                       | trans 1.8<br>cis 2.3                    | 1.7                                      | -                                          |
| oktatrienowy     | C18:3 | -                                       |                                         | 0.3                                      | -                                          |
| ejkozanowy       | C20:0 | 0.5                                     | 0.1                                     | -                                        | -                                          |
| ejkozenowy       | C20:1 | 5.0                                     | -                                       | 0.8                                      | -                                          |
| ejkozedienowy    | C20:2 | -                                       | 1.9                                     | 0.8                                      | -                                          |
| unkozenowy       | C21:1 | -                                       | -                                       | 0.6                                      | -                                          |
| dokozanowy       | C22:0 | 1.0                                     | 0.2                                     | 2.7                                      | 0.3                                        |
| dokozenowy       | C22:1 | 3.3                                     | -                                       | 0.3                                      | -                                          |
| dokozadienowy    | C22:2 | -                                       | 2.3                                     | -                                        | -                                          |
| tetrakozanowy    | C24:0 | 1.0                                     | 1.2                                     | 4.1                                      | 0.3                                        |
| tetrakozenowy    | C24:1 | 3.2                                     | -                                       | -                                        | 0.4                                        |
| tetrakozadienowy | C24:2 | -                                       | 4.9                                     | -                                        | -                                          |
| heksakozanowy    | C26:0 | -                                       | -                                       | -                                        | -                                          |
| heksakozenowy    | C26:1 | -                                       | -                                       | -                                        | -                                          |

\*[Urbańczyk et al., 1993]

# [Zabża et al., 1995]

### 3.1.6. Monoacyloglicerole (MAG)

Rozdzielona za pomocą HPLC frakcja nr 8 (Rys. 1) została zanalizowana przy pomocy GC/MS w postaci trójmetylosilylowych pochodnych. W porównywalnych ilościach występowały w niej trzy monoacyloglicerole: dodekanoiloglicerol, tetradekanoiloglicerol

oraz heksadekanoiloglicerol. Sumaryczna zawartość tych związków wynosiła około 10% frakcji wolnych kwasów tłuszczowych w trakcie pierwszych dziesięciu dni , po czym spadała do ilości śladowych w 21 dniu hodowli.

Prawie wszystkie zidentyfikowane składniki frakcji lipidowej były obecne w ekstraktach innych reprezentantów rodzaju *Zoophthora*, lecz w różnych ilościach. Dla wszystkich tych grzybów stwierdzono dużą zawartość kwasu heksadekanowego, co wydaje się najbardziej charakterystyczne dla tego rodzaju [Urbańczyk *et al.*, 1992, Zabża *et al.*, 1995]. W przypadku *Z. (Neopandora)* we frakcjach TAG oraz DAG przeważał kwas tetradekanowy, a kwas heksadekanowy dominował we frakcji wolnych kwasów tłuszczowych. Z kolei u *Z. (Erynia) ovispora* we frakcji TAG (41.5%) oraz DAG (38.8%) dominował kwas dodekanowy, a we frakcji FA kwas oktadekanowy (44.7%). Kwas dodekanowy był także głównym składnikiem frakcji TAG (62.8%) i FA (84.0%) szczepu *Z. neoaphidis*. Jeśli chodzi o frakcję steroidową STE grzybnia *Z. ovispora* zawierała duże ilości cholesterolu i ergosterolu, podczas gdy *Z. neoaphidis* i *Z. phyllobii* tylko kampesterol i/lub 22-dihydrobrassicasterol. Interesujące natomiast było stwierdzenie obecności skwalenu we frakcji węglowodorowej. Żaden z opisanych składników nie może być uważany za aktywny czynnik biorący udział w procesie intoksykacji organizmu owada, jednakże stosunkowo wysokie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (szczególnie u *Z. neoaphidis*) może wywierać negatywny wpływ na ten organizm.

### 3.2. Poszukiwanie metabolitów mogących uczestniczyć w procesie intoksykacji organizmu owada przez grzyby *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d oraz *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1

Za wyjątkiem aflatoksyn, dostępnych jest niewiele informacji o strukturze i wpływie metabolitów grzybów na owady, zwłaszcza jeśli nie są one skutecznymi antybiotykami lub znanymi toksynami w stosunku do ssaków [Wright *et al.*, 1982]. Tylko nieliczne metabolity, produkowane przez entomopatogeniczne grzyby, były izolowane i ustalono ich struktury. Prowadzone na ten temat badania ograniczają się w zasadzie do kilku gatunków grzybów, które są łatwe w hodowli laboratoryjnej i produkują większe ilości połączeń, z reguły o strukturze peptydowej. Rodzaj *Paecilomyces* obejmuje różnorodne gatunki. Znajdują się pomiędzy nimi zarówno gatunki szkodliwe dla człowieka, jak np. *P. lilanus* jak i grzyby będące patogenami owadów, jak *P. farinosus* czy *P. fumoso-roseus*. *P. lilanus* produkuje peptydowe toksyny - leucynostatyny oddziałujące na komórki wątroby u ssaków [Mikami *et al.*, 1984]. Nieopisane bliżej szczepy wytwarzają lipoheksynę będącą inhibitorem prolilowej endopeptydazy [Heinze *et al.*, 1997]. Pojedyncze gatunki wykazują zdolność produkcji antybiotyków peptaibolowych [Brückner *et al.* 1991].

Badane szczepy są nieopisanymi jeszcze dokładnie mikroorganizmami, świeżo przeniesionymi z ich naturalnego środowiska w Bawarii, gdzie znaleziono je na larwach chrząszczy. Już w pierwszych płynnych hodowlach na pożywce „pełnej” (rozdz. 5.1) uzyskano ich szybki rozwój, co ilustrują przedstawione poniżej krzywe wzrostu tych szczepów (Rys. 7, 8; Tab. 4, 5). W trakcie dalszych badań stwierdzono, że rosną one w stopniu zadowalającym na pożywce „nieorganicznej” z dodatkiem glukozy (rozdz. 5.1.). Dokładniejsze badania kinetyki wzrostu na tej pożywce oraz aktywności enzymatyczne i wstępne próby zbadania metabolitów wielkocząsteczkowych były tematem pracy magisterskiej wykonanej w naszym laboratorium [M. Celejowski i D. Ziółko, 1997].

Zadaniem obecnej pracy było wyszukanie tych metabolitów, które odgrywają znaczącą rolę w procesie patogenezy owada. W tym celu, podczas hodowli grzybów na pożywce płynnej pobierano próbki, które następnie poddawano analizie HPLC i wstrzykiwano larwom *Galleria mellonella*.

Tabela 4. Krzywa wzrostu szczepu *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d na pożywce „pełnej”

| Dzień hodowli | pH  | masa wilgotnej grzybni [g/l] |
|---------------|-----|------------------------------|
| 1             | 6.4 | 12.7                         |
| 2             | 6.6 | 21.5                         |
| 3             | 7.4 | 24.9                         |
| 4             | 7.8 | 51.8                         |
| 5             | 8.0 | 45.9                         |
| 6             | 8.0 | 42.7                         |
| 7             | 8.0 | 44.5                         |
| 9             | 8.0 | 44.8                         |
| 14            | 8.0 | 50.0                         |
| 22            | 7.9 | 55.2                         |

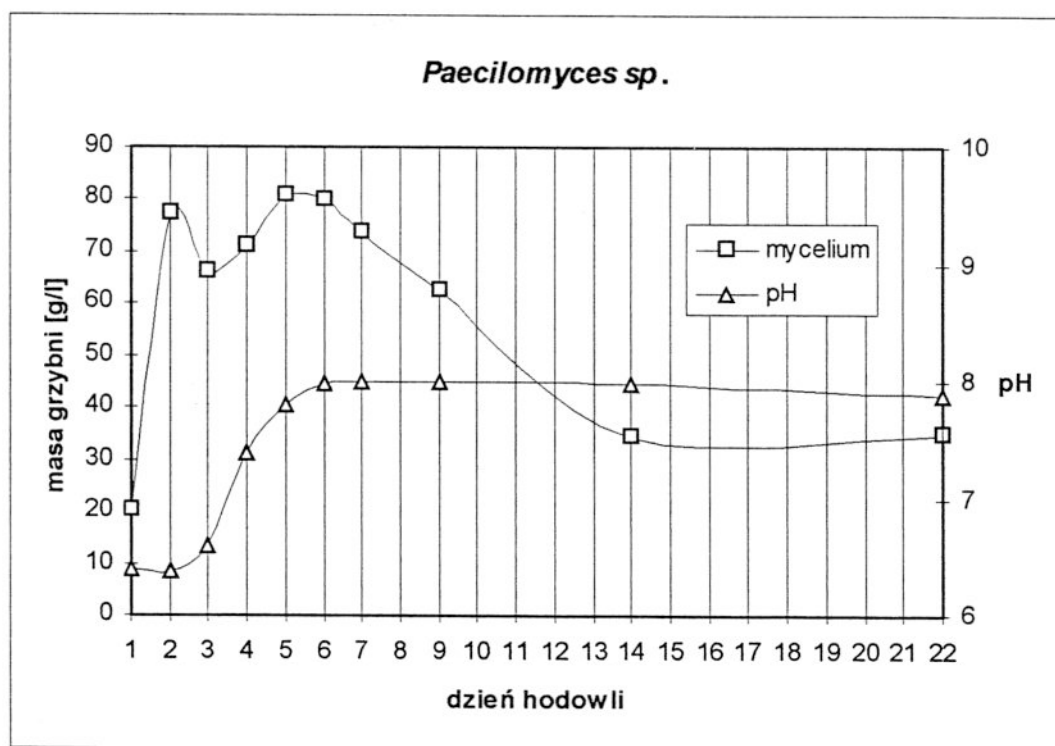
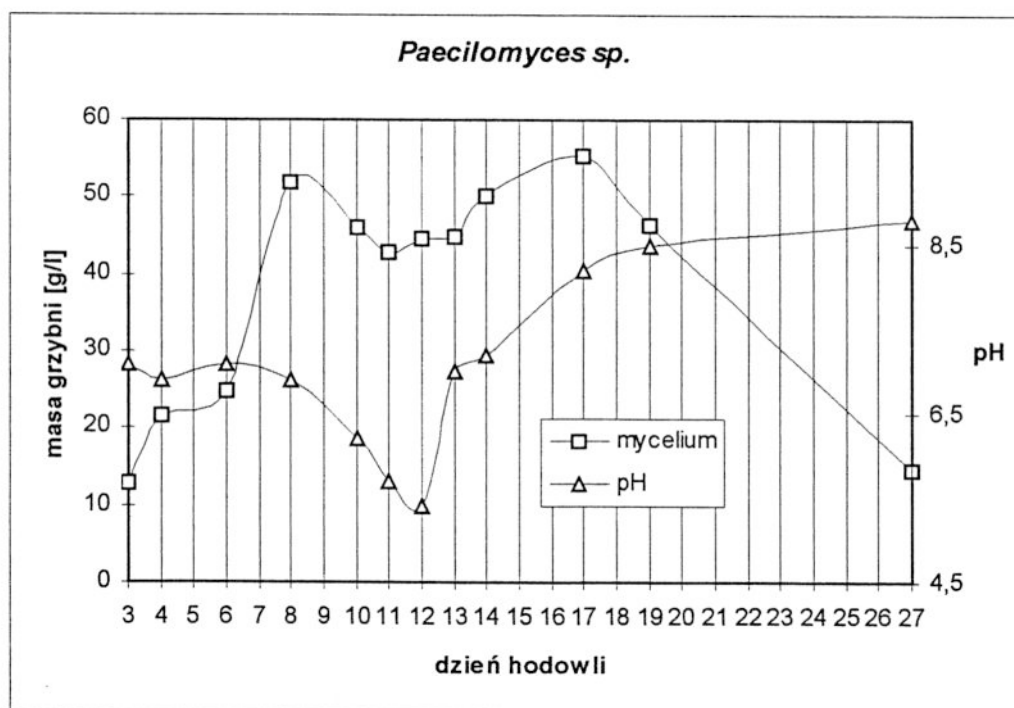
Rys. 7. Krzywa wzrostu szczepu *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428 na pożywce „pełnej”

Tabela 5. Krzywa wzrostu szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1 na pożywce „pełnej”

| Dzień hodowli | pH  | masa wilgotnej grzybni [g/l] |
|---------------|-----|------------------------------|
| 3             | 7.1 | 12.7                         |
| 4             | 6.9 | 21.5                         |
| 6             | 7.1 | 24.9                         |
| 8             | 6.9 | 51.8                         |
| 10            | 6.2 | 45.9                         |
| 11            | 5.7 | 42.7                         |
| 12            | 5.4 | 44.5                         |
| 13            | 7.0 | 44.8                         |
| 14            | 7.2 | 50.0                         |
| 17            | 8.2 | 55.2                         |
| 19            | 8.5 | 46.4                         |
| 27            | 8.8 | 14.7                         |

Rys. 8. Krzywa wzrostu szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1 na pożywce „pełnej”

Aby określić fazę rozwoju grzybów wyrzykowo mierzono wartość pH płynu oraz ważono masę grzybni. Ponieważ do analiz pobierano jednakowe ilości płynu pochodowlanego, to intensywności sygnałów na chromatogramach HPLC można było wykorzystać do porównywania względnych ilości rejestrowanych substancji.

Dobór warunków rozdziału wymagał wielu prób i poszukiwań literaturowych. Struktury wtórnych metabolitów są bardzo zróżnicowane, stąd dobranie uniwersalnych parametrów dobrego rozdziału dla wszystkich typów strukturalnych jest trudnym zadaniem. Wstępne badania spektroskopowe ( $^1\text{H-NMR}$  i ESI MS) wybranych frakcji sugerowały peptydowy charakter biosyntezowanych związków. Najlepszą rozdzielczość chromatogramów uzyskano przy rosnącym gradiencie acetonitrylu w wodzie przy 0.1% zawartości TFA, eluencie często stosowanym dla rozdzielów chromatograficznych peptydów a także białek [Tempst *et al.*, 1987]. Eluentu o podobnym składzie używał też Frisvad [Frisvad, 1987; Frisvad *et al.*, 1989] i uważał go za gwarantujący rozdziel wszystkich znanych mykotoksyn i wtórnych metabolitów. Spośród testowanych długości fal (220, 254, 345nm),  $\lambda = 220$  nm dawała najpełniejszy obraz metabolitów. Aby sprawdzić stosowane parametry HPLC przeprowadzono analizę standardowych preparatów peptydów i bowerycyny uzyskując ich bardzo dobry rozdziel. Stwierdzono też, że w powyższych warunkach standardowe preparaty białek nie eluowały. Analizowane związki praktycznie rozpuszczały się tylko w wodzie i częściowo w metanolu, natomiast były nierozpuszczalne w chlorku metylenu, co może sugerować przewagę aminokwasów hydrofilowych i nie tworzenie form cyklicznych.

Szczególne trudności występowały w przypadku prowadzonych badań nad metabolitami grzyba *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d. Chromatogramy HPLC przedstawiające metabolity zawarte w płynie pochodowlanym w poszczególnych dniach w czasie wzrostu grzyba zmieniały się dla każdej powtórzonej hodowli pomimo zachowania powtarzalności warunków. Metabolity produkowane w wybranych dniach wzrostu podczas jednej z hodowli przedstawiają chromatogramy na Rys. 9. Bardziej charakterystyczne piki są widoczne przy  $RT \approx 6.8$  i 23 min. Sygnały te pojawiają się na niemal wszystkich chromatogramach pochodzących z tej hodowli. Sygnały od innych metabolitów pojawiają się z różnymi intensywnościami przy  $RT \approx 19$  i 16 min, głównie pomiędzy 3 a 20 dniem



hodowli. Rezultaty testów biologicznych (Rys. 9A) nie wykazują zależności od pojawiających się na chromatogramach związków, przez co trudno przyporządkować toksyczny efekt konkretnym metabolitom. Związki wydzielane piątego dnia hodowli wykazywały najszybsze działanie - larwy były zabijane już po upływie 24 godzin. Silną aktywność obserwowano także w przypadku płynów pohodowlanych pochodzących z 2, 3, 7, 8, 16, 29, i 39 dnia, kiedy to larwy zabijane były po upływie około 48 godzin. Pozostałe próbki zabijały larwy po kolejnych 24 godzinach.

Zdecydowanie odmienne były metabolity tworzone podczas kolejnej hodowli, prowadzonej jedynie 2 tygodnie później (chromatogramy HPLC na Rys. 10). Na tych chromatogramach niewidoczne są piki charakterystyczne dla poprzedniej hodowli. Związek o  $RT = 32$  min, przeważał zdecydowanie w pierwszych dniach wzrostu grzyba (3 i 4 dzień), potem prawie zupełnie zanikł. Różnorodność biosyntetyzowanych metabolitów jest duża, lecz żaden z nich nie dominuje. Podobnie jak w poprzednim przypadku, metabolity tworzone na początku hodowli wykazują stosunkowo wysoką aktywność w stosunku do larw *G. mellonella* (Rys. 10A), jednakże występuje ona przy różnych związkach na chromatogramach. Wydaje się, że metabolity występujące we wstrzykiwanych próbkach pochodzących z innych dni wzrostu były mniej toksyczne (lub występowały w mniejszych stężeniach), gdyż wiele larw przeżyło.

Odmienne obraz tworzonych metabolitów przyniosła następna hodowla (chromatogramy HPLC na Rys. 11). Dwa związki charakteryzujące się  $RT \approx 5.6$  i 33-34 min produkowane były niemal w ciągu całego cyklu życiowego badanych owadomorków, tylko w różnych ilościach. W 9 i 11 dniu można zauważyć kilka dodatkowych sygnałów. Także w tym przypadku stosunkowo największą aktywność biologiczną zaobserwowano dla metabolitów produkowanych w początkowych dniach hodowli, kiedy to wszystkie larwy zostały zabite w ciągu 48 godzin (Rys. 11A). Porównując przebieg zmian aktywności biologicznej i związków występujących na chromatogramach niełatwo jest przypisać któremuś z nich efekt letalny.

W celu indukcji wydzielania toksycznych dla owadów metabolitów przeprowadziliśmy jedną z hodowli na pożywce z dodatkiem limfy otrzymanej z larw *G. mellonella* (100  $\mu$ l limfy na 1 kolbę). Podczas pierwszych dni na chromatogramach pojawiły



się trzy bardziej interesujące sygnały o  $RT \approx 21, 31$  i  $36$  minut (Rys. 12). Biologiczne testy przeprowadzone z mieszaniną metabolitów produkowanych w tych właśnie dniach wykazały stosunkowo wysoką aktywność (Rys. 12A). Niestety ilości analizowanych związków były zbyt małe do określenia ich struktury. Jak widać na chromatogramach otrzymanych dla innych dni hodowli, stężenia metabolitów były bardzo niskie, natomiast aktywność biologiczna nie zmniejszyła się aż w tak znaczącym stopniu. Larwy były zabijane po upływie 48 godzin od iniekcji.

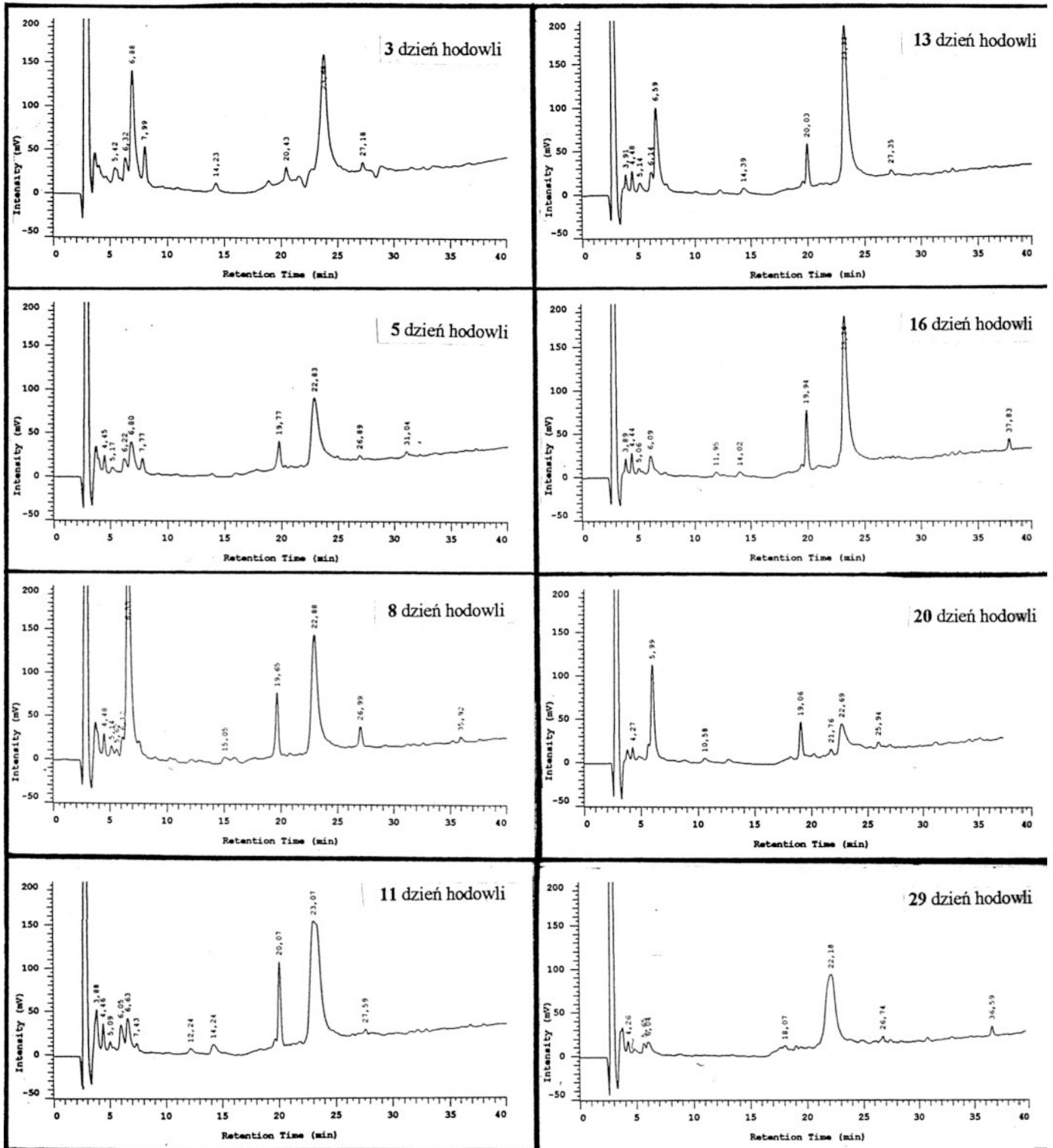
Jeszcze inny obraz metabolitów otrzymano z hodowli, która była szczepiona bezpośrednio ze skosów (chromatogramy HPLC na Rys. 13). W tym przypadku dominują dwa inne sygnały. Jeden o  $RT \approx 5.6$  pojawił się 3, 7, i 11 dnia, natomiast późniejszy o  $RT \approx 21.3$  widoczny był 7, 11, 17, 17 a nawet 24 dnia hodowli. Toksyczność tych związków nie wydaje się zbyt duża, gdyż przeprowadzone na tych frakcjach testy biologiczne nie dały interesujących rezultatów - wiele larw przeżyło iniekcję (Rys. 13A).

W przeciwieństwie do *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d, inny szczep należący do tego rodzaju - *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1 dawał bardziej powtarzalne wyniki (Rys 14 i 15). Na chromatogramach obu hodowli tego grzyba dominował sygnał o  $RT \approx 21-22$ . Pojawiał się on na początku hodowli i był widoczny do 22 dnia wzrostu. Inny sygnał, także charakterystyczny dla obu hodowli, lecz występujący z nieco mniejszą intensywnością występował przy  $RT \approx 30$ . W przeciwieństwie do poprzedniego szczepu pojawił się także sygnał o dłuższym czasie retencji  $RT \approx 50-51$ . W tym zakresie, przy zastosowanych parametrach rozdzielania mogą pojawiać się cykliczne peptydy. Biorąc pod uwagę intensywność sygnałów (skala intensywności w mV) *Paecilomyces* sp. 2430 produkuje większe ilości metabolitów. Można więc było wyizolować pewną ilość substancji odpowiadającej sygnałowi o  $RT \approx 21$  i poddać ją analizom ESI MS i NMR. Na podstawie przeprowadzonej spektrometrii masowej określono masę cząsteczkową tego związku - wynosiła ona 300 Da. Preparat nie był jeszcze dostatecznie czysty, ale widmo NMR jednoznacznie wskazało na peptydowy charakter tego metabolitu. Widoczne były na nim liczne sygnały protonów odsłanianych przez ugrupowanie peptydowe (zakres  $\delta = 2.5-4$  ppm), przy znacznym udziale protonów leżących w rejonie protonów aromatycznych i mniejszym w zakresie wyższych pól ( $\delta = 1-2.5$  ppm). Nie prowadzono dokładniejszych

badan strukturalnych, gdyż z testów biologicznych nie wynikało, że związek ten odgrywa znaczącą rolę w infekcji owada przez grzyb. Pomimo podobieństw chromatogramów, aktywność biologiczna dla obu tych hodowli różniła się zdecydowanie (Rys. 14A i 15A). Podczas gdy niemal wszystkie frakcje jednej hodowli wykazywały efekt toksyczny nawet już po 24 godzinach, analogiczne frakcje z kolejnej hodowli nie dawały podobnych rezultatów. Jedynie frakcja z 10 dnia wzrostu zabiła larwy po 24 godzinach. Warty podkreślenia jest przy tym fakt, iż frakcje z 11 i 12 dnia hodowli dawały identyczny obraz na chromatogramie HPLC a nieporównywalnie słabiej działały na larwy.

Obok efektu letalnego obserwowano także inne, jak np. zmniejszony apetyt larw po wstrzyknięciu płynu, przy niezmienionym po wstrzyknięciu samej pożywki, zmniejszenie intensywności "snucia" nici kokonu. Niektóre jeszcze żywe larwy zmieniały zabarwienie - stawały się "cętkowane" lub całe czerniały. Nieżywe larwy były mocno wysuszone i w krótkim czasie pozostawała sama zewnętrzna powłoka owada. Nie stwierdzono jednak związku pomiędzy tymi obserwacjami a pochodzeniem próbki - larwy w różny sposób reagowały na tę samą próbkę. Tę zmienność biosyntezy metabolitów przez grzyby entomopatogeniczne zauważył Strasser [1998]. W swojej pracy stwierdził on, iż w niektórych przypadkach stężenia mykotoksyn produkowanych przez *Beauveria brongniartii* są tak niskie, że praktycznie niemożliwe staje się wykrycie ich obecności, a jest to grzyb o którym ogólnie wiadomo, że je produkuje.

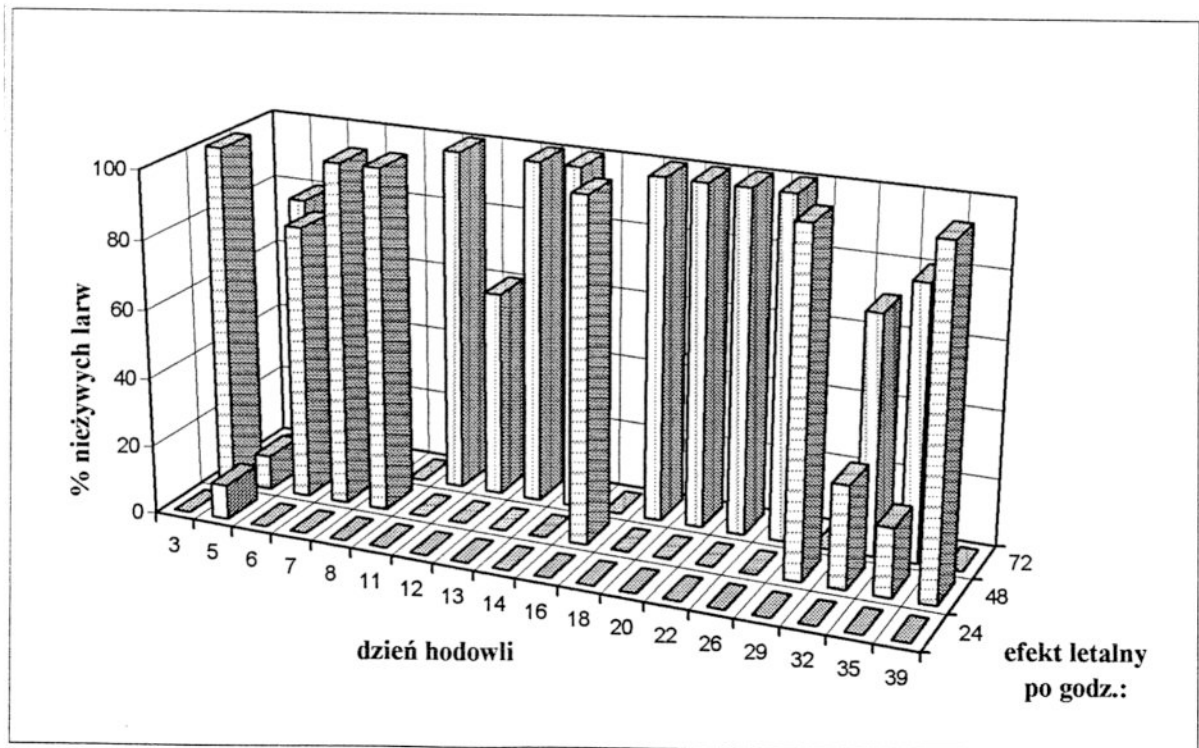
Z pewnością można stwierdzić, że w przypadku rodzaju *Paecilomyces* mechanizm infekcji i intoksykacji organizmu owada jest skomplikowany. Trudno przypisać określoną biologiczną funkcję metabolitom produkowanym przez oba badane szczepy. W świetle badań dotyczących innych grzybów będących patogenami owadów, wydaje się, że główną rolę w procesie porażania odgrywają enzymy a zwłaszcza proteazy [Kucera, 1980; Gupta *et al.*, 1992; Gupta *et al.*, 1993]. Z powodu dużej różnorodności tworzonych związków oraz ich niezwykle małych stężeń, badania strukturalne i przypisywanie funkcji biologicznych poszczególnym metabolitom jest trudnym zadaniem, wymagającym wielu badań nie gwarantujących sukcesu.

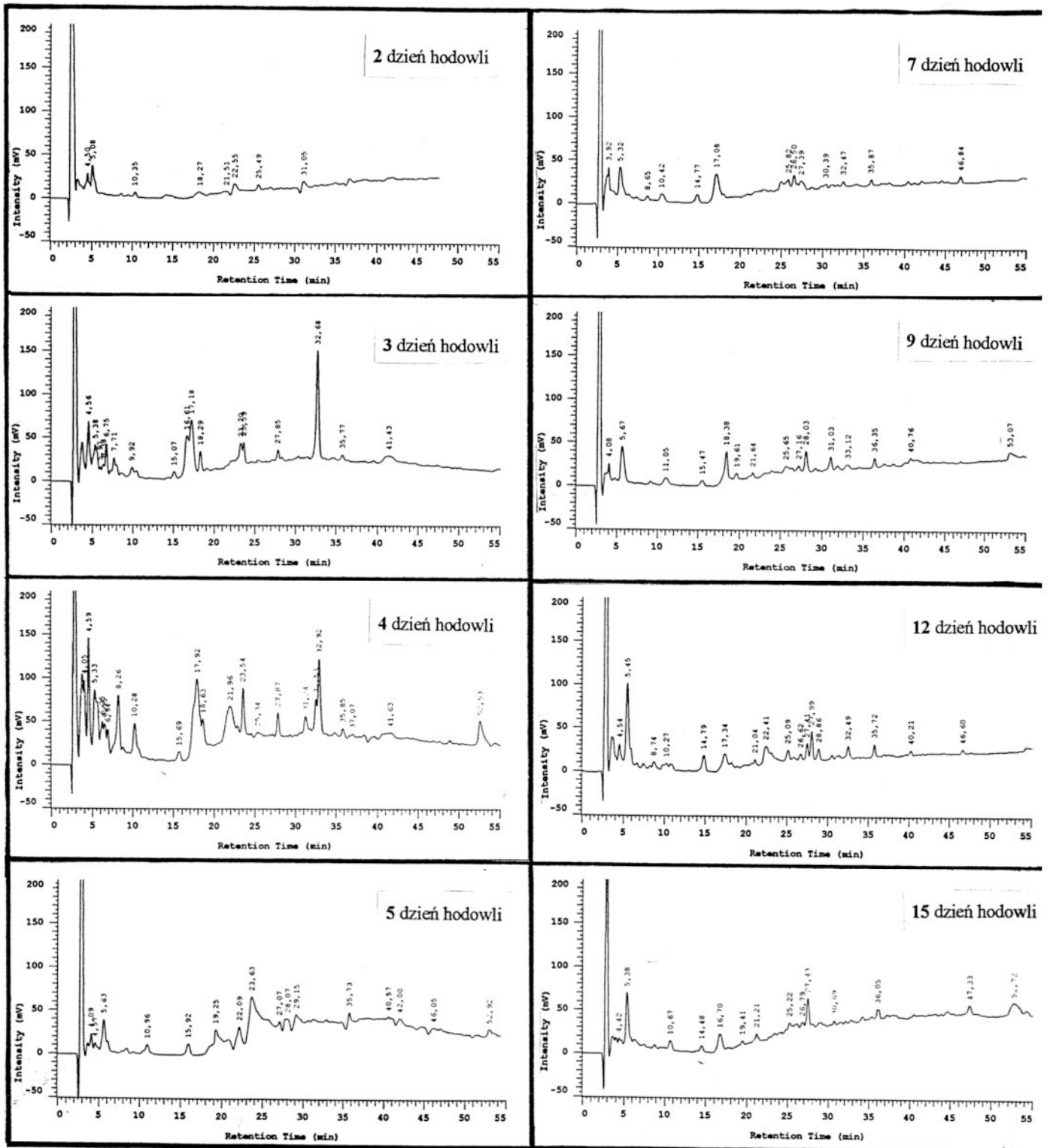


Rys. 9. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d

Tabela 6. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24 h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3             | 0                        | 100                      | -                        |
| 5             | 10                       | 10                       | 80                       |
| 6             | 0                        | 80                       | 20                       |
| 7             | 0                        | 100                      | -                        |
| 8             | 0                        | 100                      | -                        |
| 11            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 12            | 0                        | 0                        | 60                       |
| 13            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 14            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 16            | 0                        | 100                      | -                        |
| 18            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 20            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 22            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 26            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 29            | 0                        | 100                      | -                        |
| 32            | 0                        | 30                       | 70                       |
| 35            | 0                        | 20                       | 80                       |
| 39            | 0                        | 100                      | -                        |

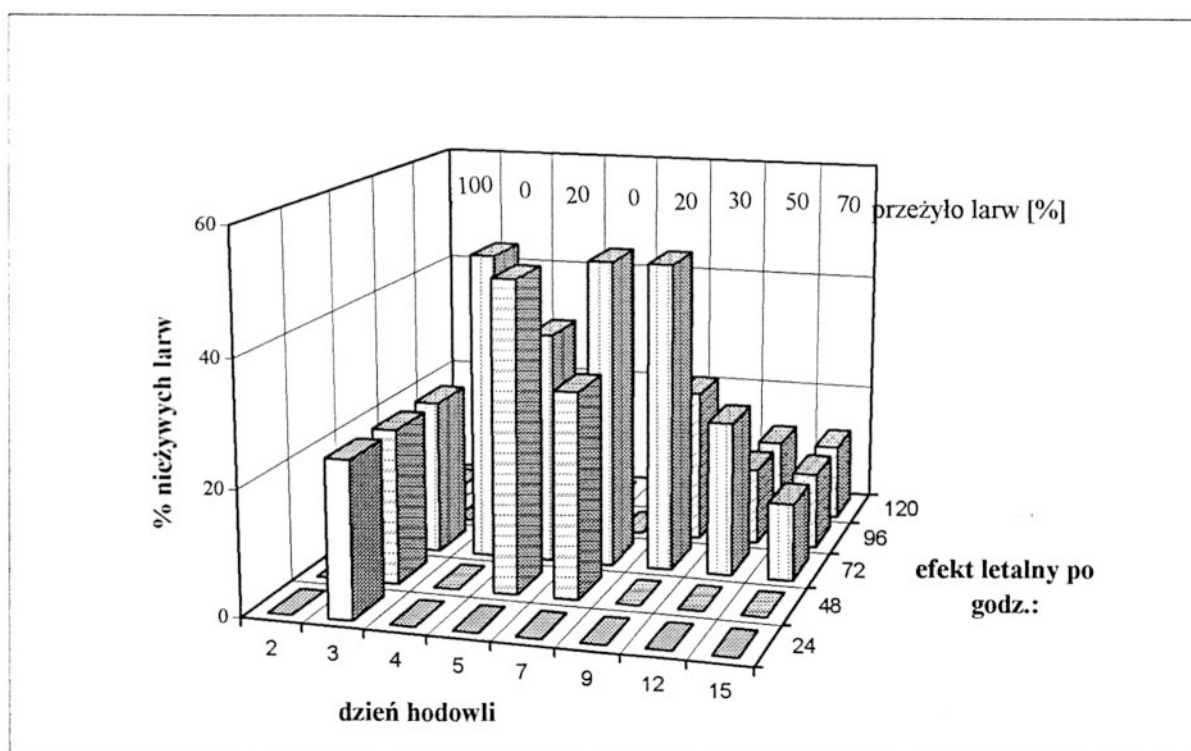
Rys. 9A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d względem larw *G. mellonella*

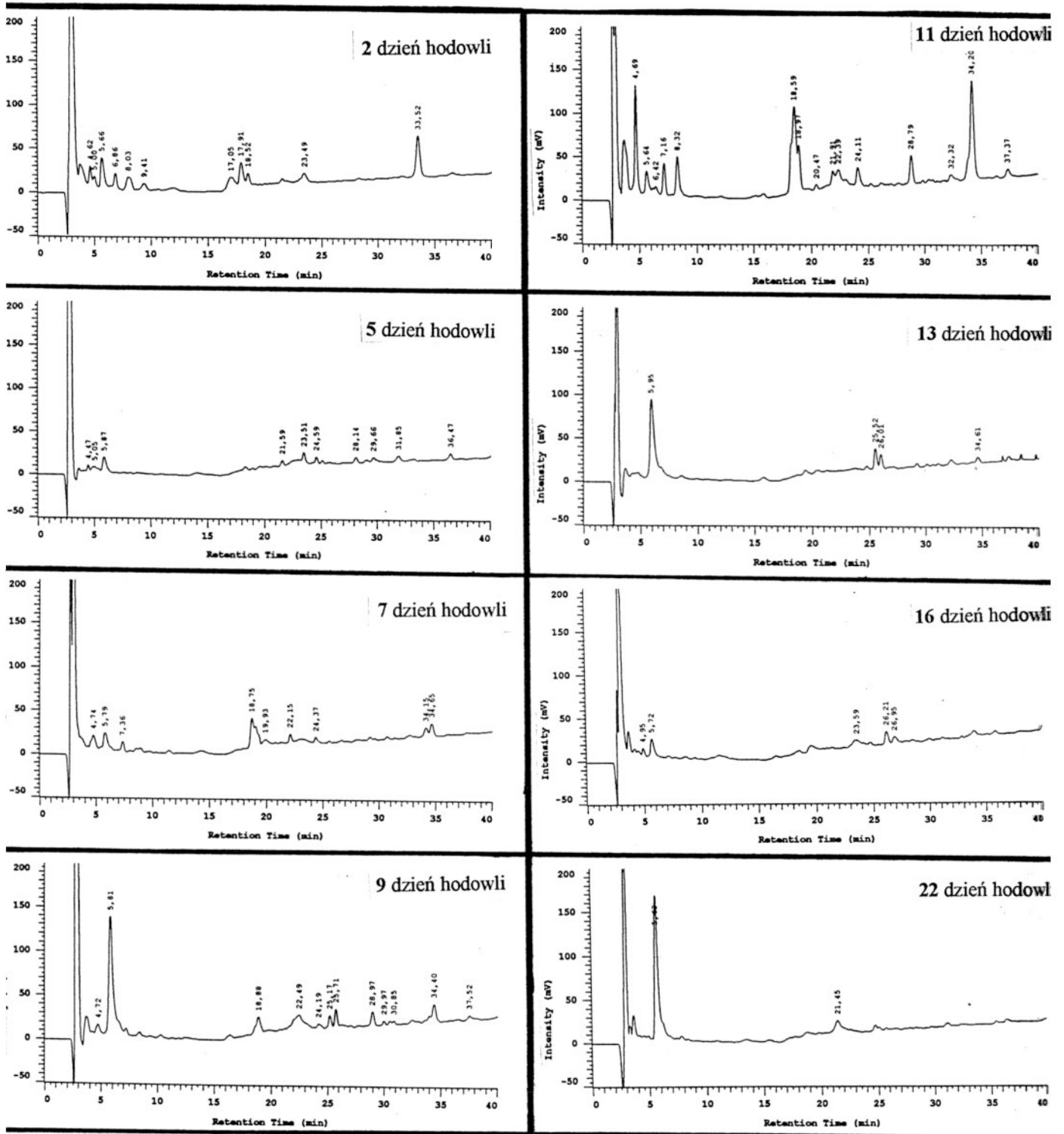


Rys. 10. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d

Tabela 7. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24 h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] | Larwy martwe po 96 h [%] | Larwy martwe po 120 h [%] |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 2             | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        | 0                         |
| 3             | 20                       | 20                       | 20                       | 0                        | 40                        |
| 4             | 0                        | 0                        | 50                       | 30                       | 0                         |
| 5             | 0                        | 50                       | 40                       | 10                       | -                         |
| 7             | 0                        | 30                       | 50                       | 0                        | 0                         |
| 9             | 0                        | 0                        | 50                       | 20                       | 0                         |
| 12            | 0                        | 0                        | 30                       | 10                       | 10                        |
| 15            | 0                        | 0                        | 10                       | 10                       | 10                        |

Rys. 10A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d względem larw *G. mellonella*.

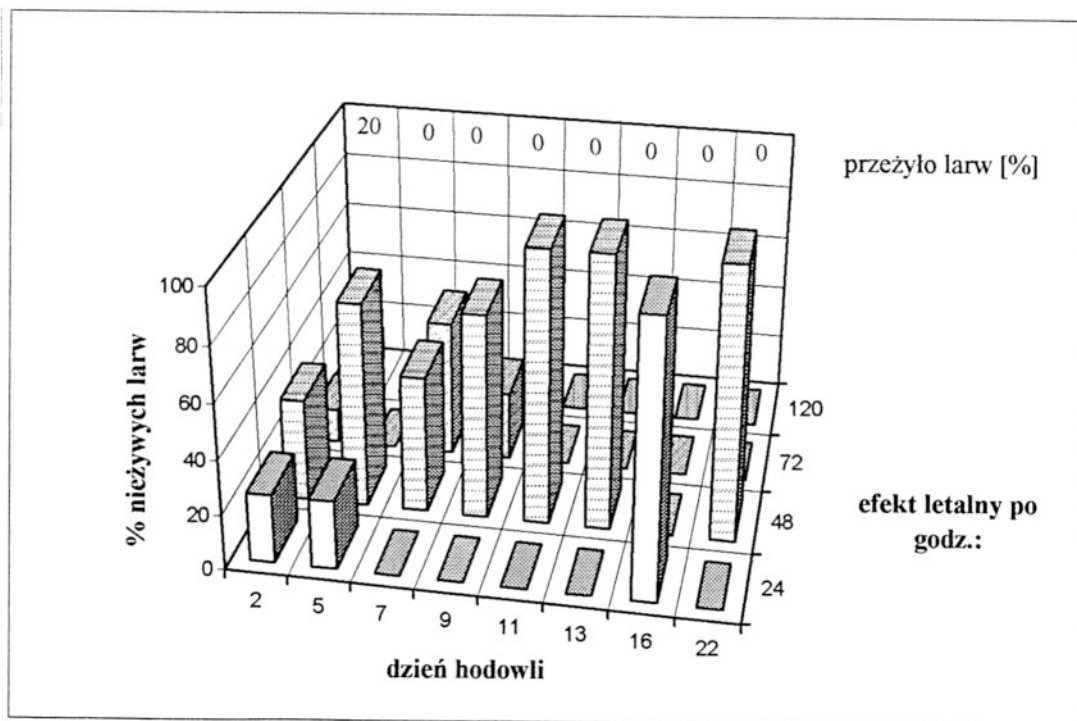


Rys. 11. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp.nr kat. 2428d

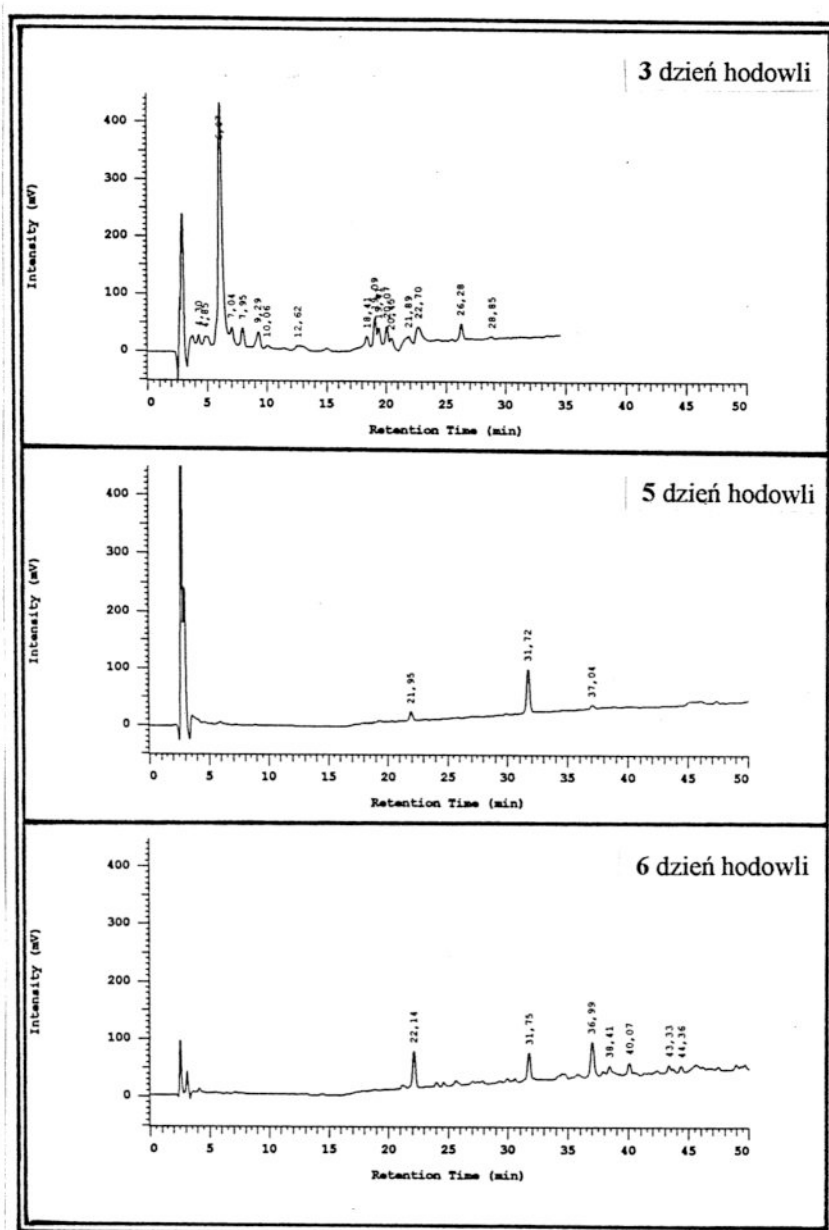


Tabela 8. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24 h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] | Larwy martwe po 96 h [%] |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2             | 20                       | 40                       | 10                       | 10                       |
| 5             | 20                       | 80                       | -                        | -                        |
| 7             | 0                        | 50                       | 50                       | -                        |
| 9             | 0                        | 80                       | 20                       | -                        |
| 11            | 0                        | 100                      | -                        | -                        |
| 13            | 0                        | 100                      | -                        | -                        |
| 16            | 100                      | -                        | -                        | -                        |
| 22            | 0                        | 100                      | -                        | -                        |

Rys. 11A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d względem larw *G. mellonella*.

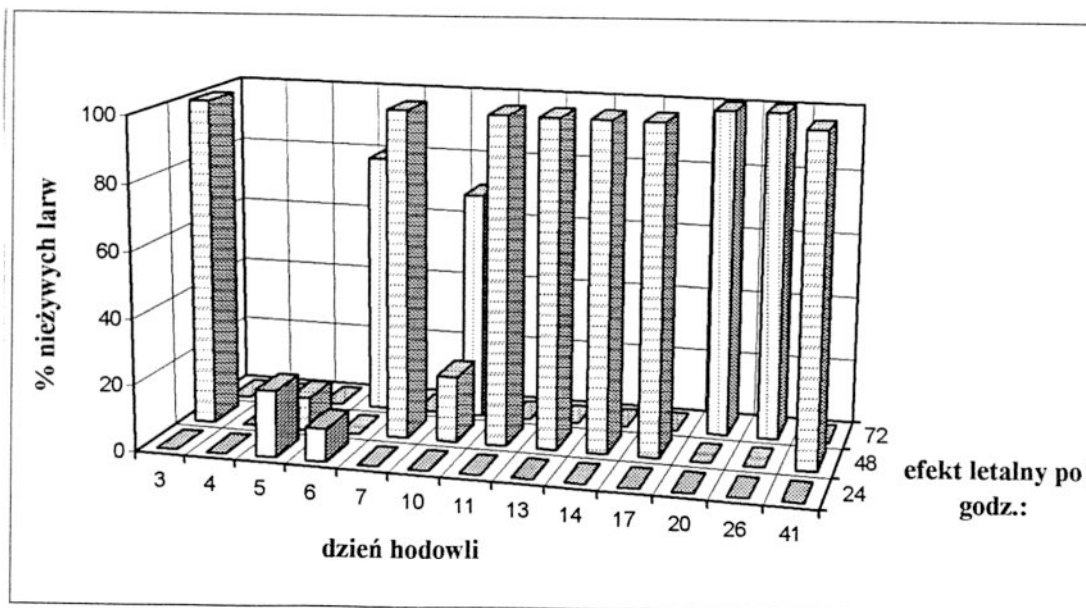




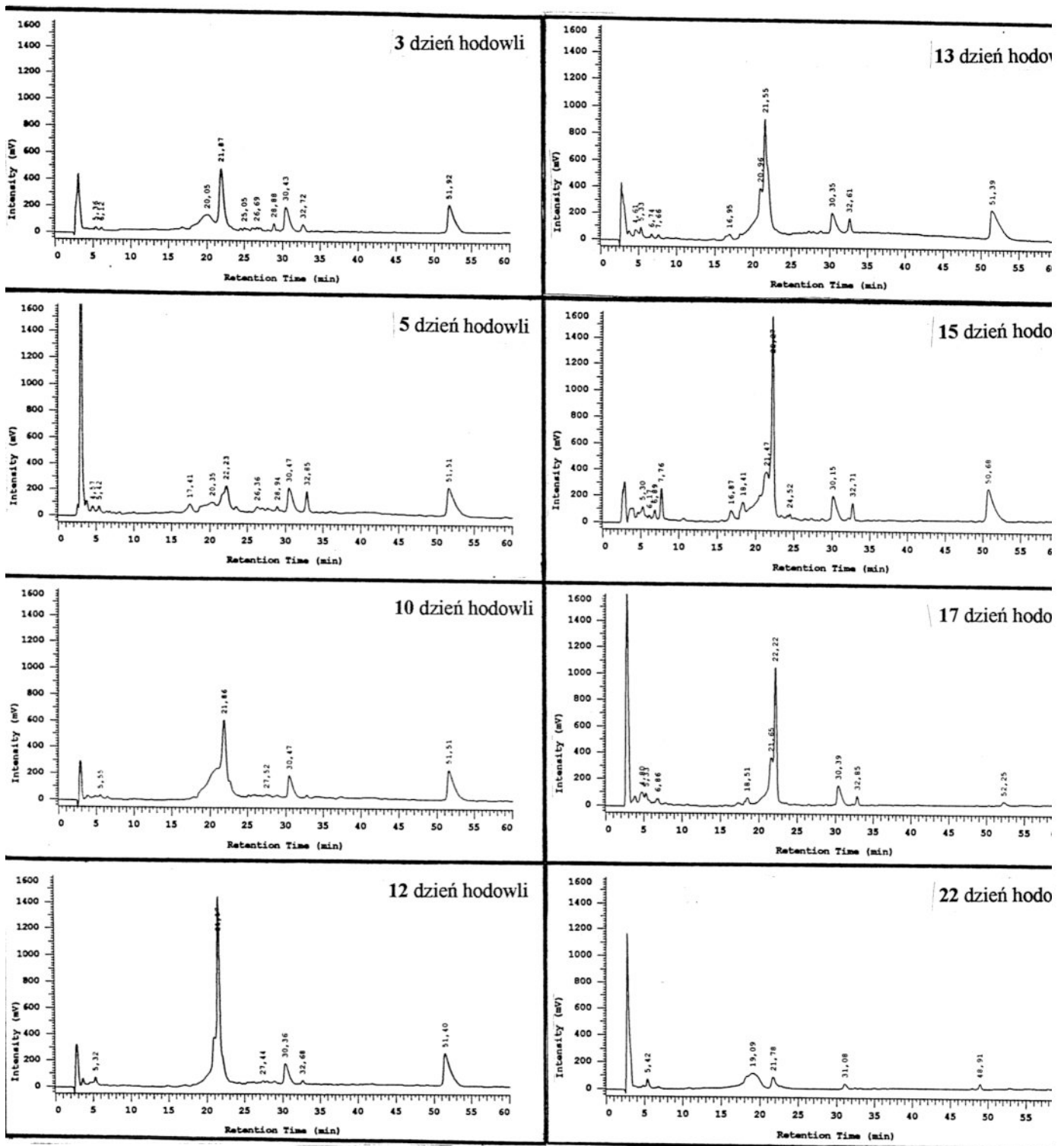
Rys. 12. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d  
(Hodowla z dodatkiem hemolimfy larw *G. mellonella*)

Tabela 9. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d  
(Hodowla z dodatkiem hemolimfy larw *G. mellonella*)

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24 h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3             | 0                        | 100                      | -                        |
| 4             | 0                        | 0                        | 0                        |
| 5             | 20                       | 10                       | 0                        |
| 6             | 10                       | 0                        | 80                       |
| 7             | 0                        | 100                      | -                        |
| 10            | 0                        | 20                       | 70                       |
| 11            | 0                        | 100                      | -                        |
| 13            | 0                        | 100                      | -                        |
| 14            | 0                        | 100                      | -                        |
| 17            | 0                        | 100                      | -                        |
| 20            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 26            | 0                        | 0                        | 100                      |
| 41            | 0                        | 100                      | -                        |



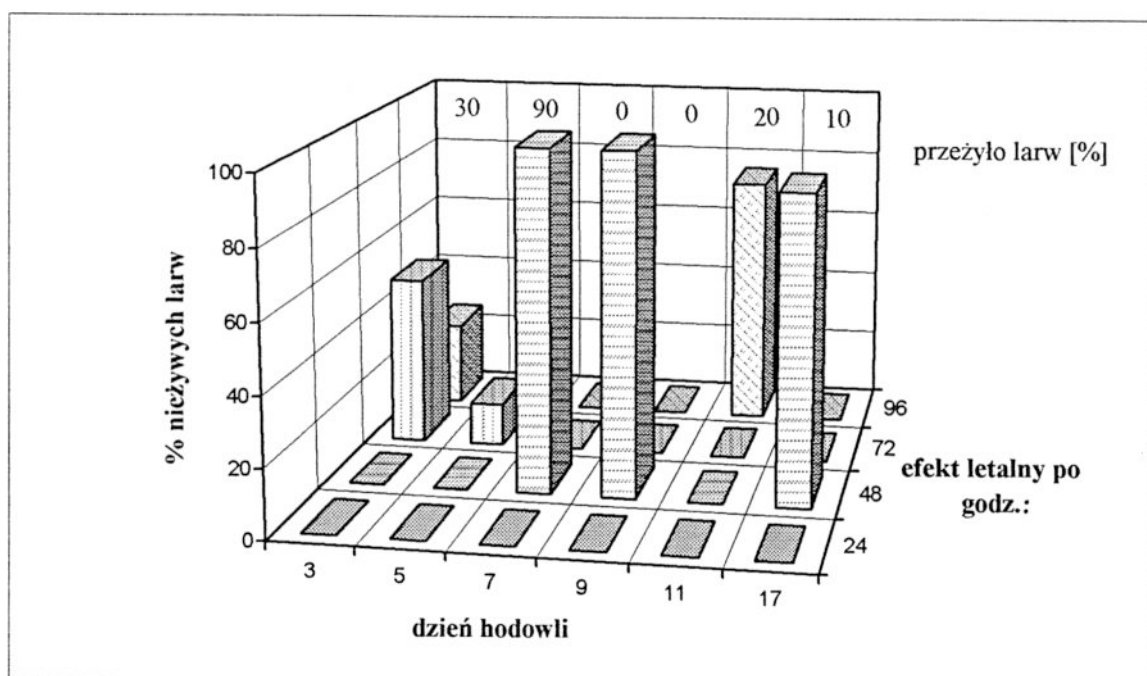
Rys. 12A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d względem larw *G. mellonella* (Hodowla z dodatkiem hemolimfy)



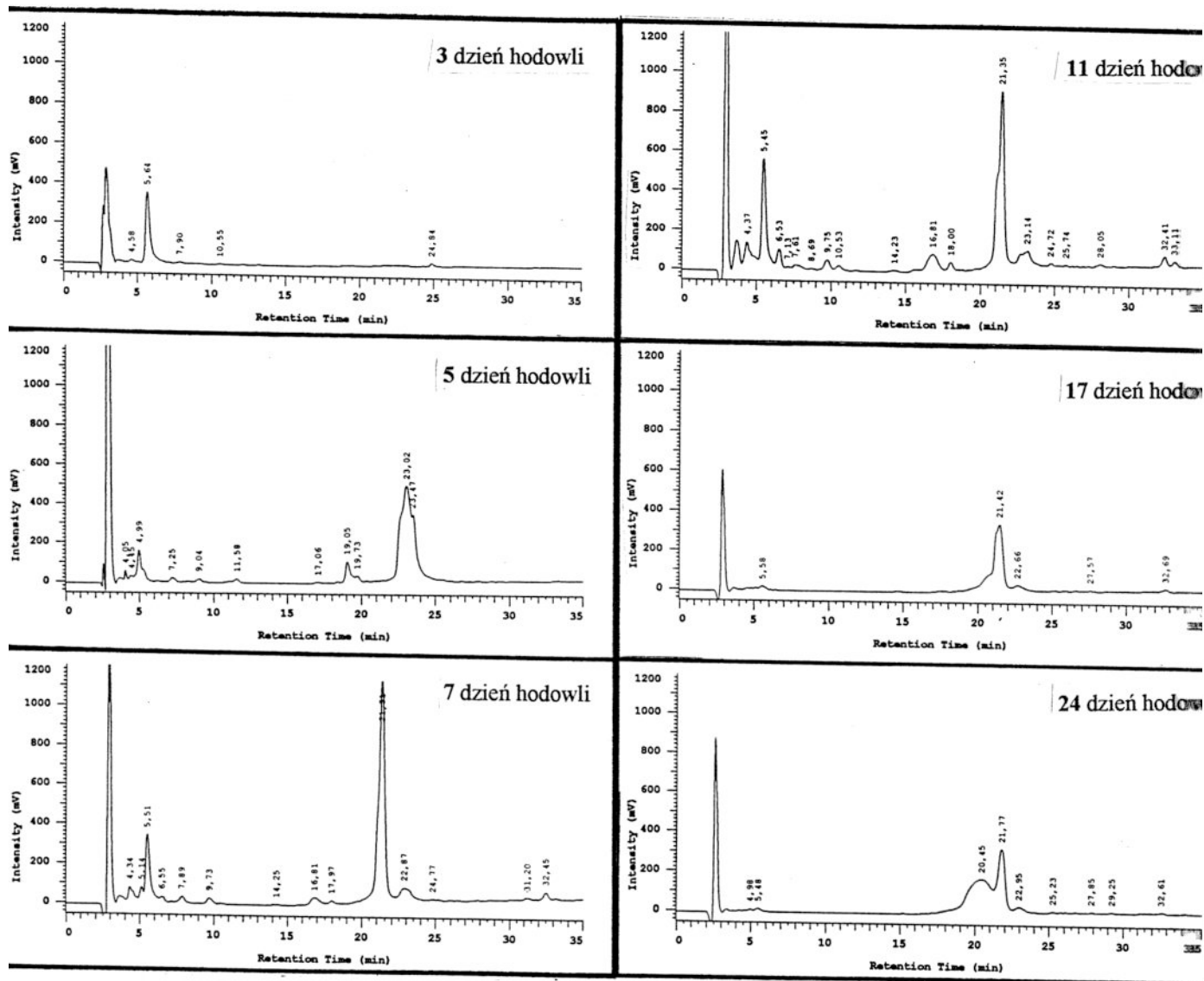
Rys.13. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d  
(Hodowla szczepiona bezpośrednio ze skosów)

Tabela 10. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp.  
nr kat. 2428d (Hodowla szczepiona bezpośrednio ze skosów)

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] | Larwy martwe po 96 h [%] |
|---------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3             | 0                       | 0                        | 50                       | 20                       |
| 5             | 0                       | 0                        | 10                       | 0                        |
| 7             | 0                       | 100                      | -                        | -                        |
| 9             | 0                       | 100                      | -                        | -                        |
| 11            | 0                       | 0                        | 80                       | 0                        |
| 17            | 0                       | 90                       | 0                        | 0                        |



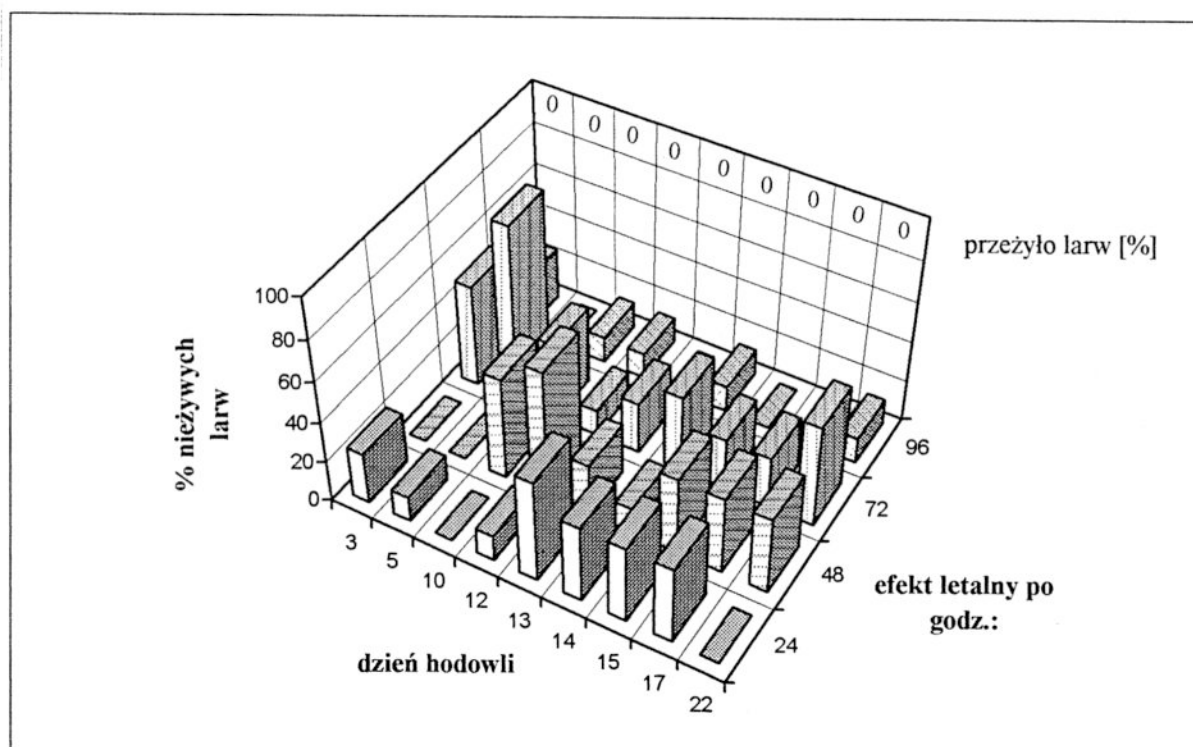
Rys. 13A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d  
względem larw *G. mellonella* (Hodowla szczepiona bezpośrednio ze skosu)



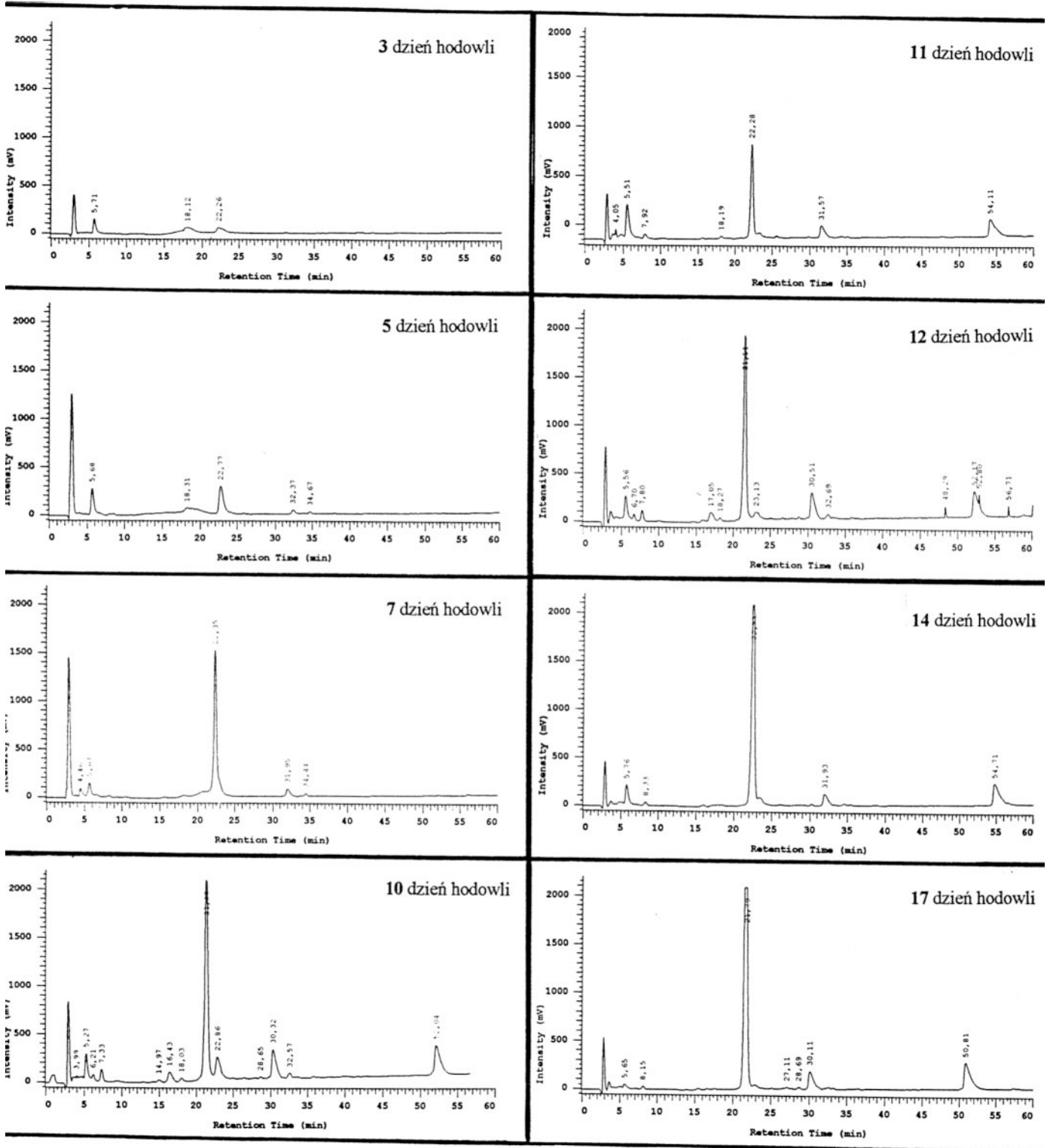
Rys. 14. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1

Tabela 11. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces sp.*  
nr kat. 2430a1

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24 h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] | Larwy martwe po 96 h [%] |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3             | 20                       | 0                        | 50                       | 30                       |
| 5             | 10                       | 0                        | 90                       | -                        |
| 10            | 0                        | 50                       | 40                       | 10                       |
| 12            | 10                       | 70                       | 10                       | 10                       |
| 13            | 50                       | 30                       | 20                       | -                        |
| 14            | 40                       | 10                       | 40                       | 10                       |
| 15            | 40                       | 40                       | 20                       | -                        |
| 17            | 40                       | 40                       | 20                       | -                        |
| 22            | 0                        | 40                       | 50                       | 10                       |



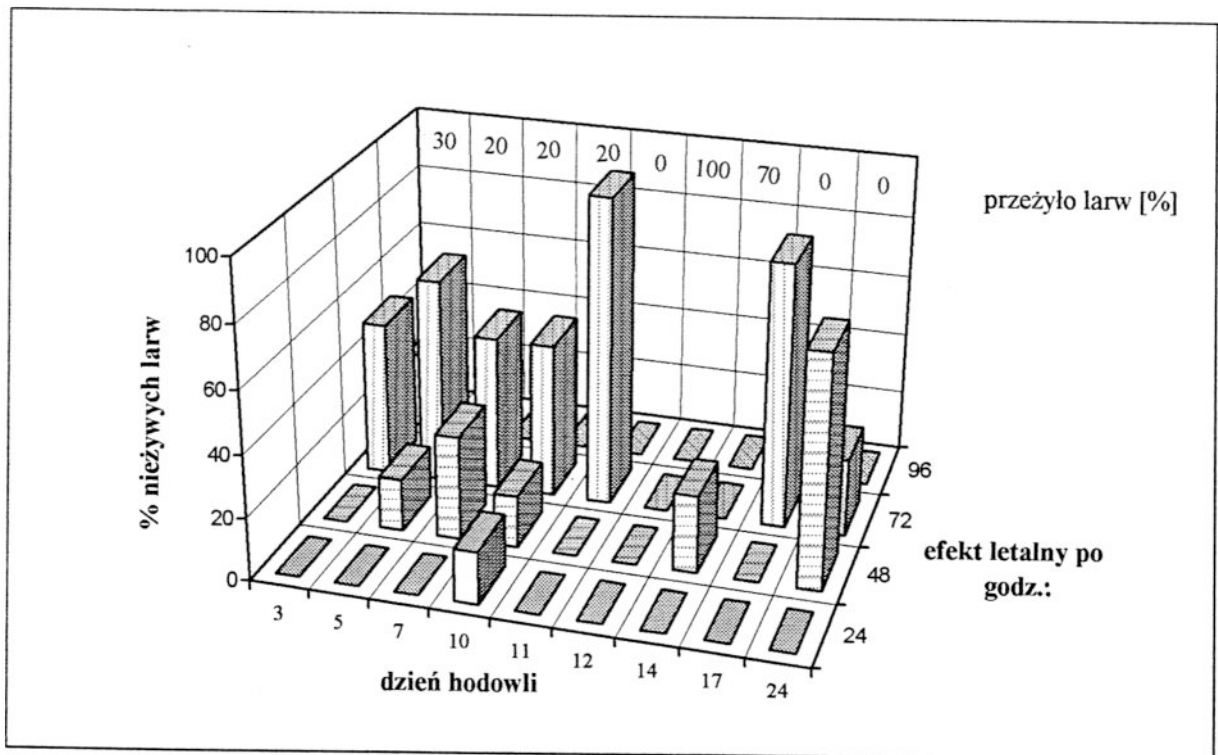
Rys. 14A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces sp.*  
nr kat. 2430a1 względem larw *G. mellonella*



Rys. 15. Chromatogramy HPLC płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1

Tabela 12. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces sp.*  
nr kat. 2430a1

| Dzień hodowli | Larwy martwe po 24 h [%] | Larwy martwe po 48 h [%] | Larwy martwe po 72 h [%] | Larwy martwe po 96 h [%] |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3             | 0                        | 0                        | 50                       | 20                       |
| 5             | 0                        | 20                       | 60                       | 0                        |
| 7             | 0                        | 30                       | 50                       | 0                        |
| 10            | 20                       | 20                       | 50                       | 0                        |
| 11            | 0                        | 0                        | 100                      | -                        |
| 12            | 0                        | 0                        | 0                        | 0                        |
| 14            | 0                        | 30                       | 0                        | 0                        |
| 17            | 0                        | 0                        | 90                       | 10                       |
| 24            | 0                        | 70                       | 30                       | -                        |



Rys. 15A. Aktywność biologiczna płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces sp.*  
nr kat. 2430a1 względem larw *G. mellonella*



### 3.2.1. Próba izolacji peptydu peptaibolowego z płynu po hodowli grzyba

#### *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d

Na podstawie wcześniejszych doniesień wiadomo było, że pojedyncze gatunki z rodzaju *Paecilomyces* (nie będące grzybami entomopatogenicznymi) produkują peptydy peptaibolowe (zawierające niebiałkowy aminokwas Aib - kwas  $\alpha$ -aminoizobutyrynianowy oraz jego homolog -izowalinę (Iva) i wykazujące aktywność antybiotyczną) [Brückner *et al.*, 1991]. Postanowiono zatem sprawdzić, czy badany grzyb nie produkuje tego typu połączeń. Przeprowadzono próbę izolacji takiego peptydu z hodowli grzyba *Paecilomyces* 2428 na wzór izolacji peptaibolowego antybiotyku z *Hypocrea muroiana* Hino *et* Katsumoto [Becker *et al.*, 1997]. Płyn pohodowlany po 14 dniach hodowli, o objętości 1.7 litra przepuszczono przez kolumnę wypełnioną niepolarnym adsorbentem. Po przemyciu wodą i 40% metanolem, zaadsorbowane związki eluowano rosnącym od 40% do 100% gradientem metanolu w wodzie uzyskując 13 frakcji. Próba detekcji poszczególnych frakcji za pomocą metody TLC opisanej w powyższej publikacji dla peptydów peptaibolowych zakończyła się niepowodzeniem - po rozwinięciu w eluencie o składzie: chloroform/metanol/acetonitryl i woda (65:25:3:4) oraz spryskaniu wodą nie uzyskano żadnego obrazu. Najlepsze efekty przyniosło rozwinięcie próbek w eluencie o składzie: n-butanol/kwas octowy/woda (4:1:5) i spryskanie roztworem ninhydryny. Na płycie widoczne były wówczas plamki o czerwono-bordowym zabarwieniu. Frakcja metanolowa (3 mg) zawierała najmniej składników (tylko 3 plamki), natomiast na innych było widać wiele związków o zbliżonej polarności. Przeprowadzono ESI MS frakcji zawierających 40, 60, 80 i 100 % metanolu. We frakcji metanolowej stwierdzono obecność dwóch peptydów o masach 806 Da i 801 Da. Ten pierwszy ma najprawdopodobniej cykliczną strukturę. Świadczy o tym jego słaba fragmentacja. Na widmie masowym obserwowano jedynie dwa jony o  $m/e = 383.9$  i  $645.2$ . W pozostałych frakcjach nie stwierdzono obecności połączeń ulegających jonizacji. W celu otrzymania obu peptydów w ilości pozwalającej na ich dokładniejszą charakterystykę (analiza NMR) powtórzono ten eksperyment na większą skalę. Zakończyło się to jednak niepowodzeniem. W kolejnych trzech hodowlach grzyb nie wyprodukował tych związków. W czwartej, tym razem prowadzonej na małą skalę (tylko 5

kolb) stwierdzono ponownie obecność obu peptydów, jednak było ich zbyt mało aby podejmować się izolacji. Ponieważ frakcja zawierająca peptydy nie wykazywała szczególnej aktywności względem larw *G. mellonella* poniechano dalszych prób izolacji tych związków.

### 3.3. Aktywność biologiczna i enzymatyczna grzyba *Zoophthora neoaphidis*

*Zoophthora neoaphidis* jest grzybem powodującym częste epizooty mszyc w naturze. Jest to szczególnie istotne z powodu dużej szkodliwości gospodarczej tych stawonogów - bezpośredniej poprzez uszkodzanie roślin i pobieranie z nich substancji odżywczych, a także pośredniej poprzez przenoszenie wirusów roślin uprawnych [Bałazy *et al.*, 1990]. Do tej pory badania prowadzone na tym gatunku, podobnie jak na wielu innych należących do rodzaju *Zoophthora*, dotyczyły głównie warunków ich sporylacji i zastosowań praktycznych. Spowodowane jest to trudnościami w hodowli tych grzybów w warunkach laboratoryjnych. Minimalny skład podłoża umożliwiający ich wzrost zawiera w przeciwieństwie do pożywki wykorzystywanej do hodowli grzybów z rodzaju *Paecilomyces* duże stężenia organicznego źródła węgla i azotu, co praktycznie przesłania produkty grzyba wytwarzane w bardzo małych ilościach. We wcześniejszych pracach prowadzonych w naszym laboratorium opisano pożywki do hodowli laboratoryjnej oraz aktywności enzymatyczne wybranych grzybów entomopatogenicznych z rodzaju *Zoophthora* [Urbańczyk *et al.*, 1992]. Dokonano także doboru pożywki do hodowli *Zoophthora (Erynia) neoaphidis* oraz przedstawiono skład neutralnych lipidów tego grzyba [Zabża *et al.*, 1995].

W przeciwieństwie do innych patogenów, grzyby nie muszą być połykane przez żywicieli aby powodować infekcję. Zamiast tego kiełkujące zarodniki penetrują kutikulę owada, co wspomagane jest przez enzymy degradujące kutikulę owada, a więc: proteazy, lipazy i chitynazy. Jednym z celów obecnej pracy było sprawdzenie, czy zachodzi korelacja pomiędzy aktywnościami enzymów wydzielanych przez *Z. neoaphidis* do płynu pohodowlanego, a jego oddziaływaniem na larwy *G. mellonella*. (Aktywności enzymatyczne badano wspólnie z p. J. Matuszak i są elementem jej pracy magisterskiej). Badano aktywność proteolityczną, lipolityczną, chitynolityczną oraz amylolityczną metodami opisa-

nymi w części eksperymentalnej. Przeprowadzono kilka hodowli z wielomiesięcznymi przerwami spowodowanymi zahamowaniem wzrostu tego grzyba w okresie wiosenno-letnim. Najbardziej miarodajne wyniki przedstawiono w Tabeli 13. Hodowlę prowadzono na pożywce pełnej, bez dodawania stymulatorów aktywności chitynolitycznej, co prawdopodobnie było przyczyną braku tej aktywności. Nie stwierdzono również aktywności amylolitycznej. Enzymami wykazującymi największą aktywność były proteazy. Wydaje się to logiczne, gdyż białka stanowią około 50-80% składników kutikuli owada [Nevill, 1975], poza tym pożywka zawierała peptydy będące ich substratami.

Badania prowadzone na innych grzybach patogenicznych w stosunku do owadów wykazały zależność produkcji enzymów od składu podłoża, przy czym dla różnych szczepów tego samego gatunku uzyskiwano wręcz przeciwstawne wyniki. Przykładem na to mogą być badania dotyczące pięciu szczepów grzyba *Beauveria bassiana* [Gupta *et al.*, 1992]. Trzy spośród nich produkują więcej proteaz na pożywce zawierającej żelatynę zamiast glukozy, natomiast pozostałe wymagają właśnie glukozy do produkcji tych enzymów.

Proteazy były enzymami wydzielanymi w dużych ilościach także przez takie grzyby entomopatogeniczne jak *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* czy *Nomureaea riley*, z którego oczyszczono i scharakteryzowano trypsynę [Gupta *et al.*, 1991; 1992; 1993]. Aktywność lipolityczna mierzona metodą miareczkową nie była zbyt wysoka, a na płytkach była w ogóle niewidoczna.

Aktywność biologiczną w stosunku do larw *G. mellonella* badano poprzez wstrzykiwanie larwom płynu pohodowlanego z wybranych dni hodowli (Tab. 14). W celu rozpoznania wielkości czynnika odpowiedzialnego za efekt letalny, płyn z 12 dnia hodowli posiadający największą aktywność biologiczną poddano ultrafiltracji. Uzyskano w ten sposób frakcje teoretycznie różniące się masami cząsteczkowymi składników. Wstrzykiwano je larwom i porównywano ich działanie w celu stwierdzenia, która z nich jest najbardziej aktywna (Tab. 15). Najsilniej oddziaływał surowy płyn co wskazuje na synergistyczne działanie kilku czynników różniących się masami.

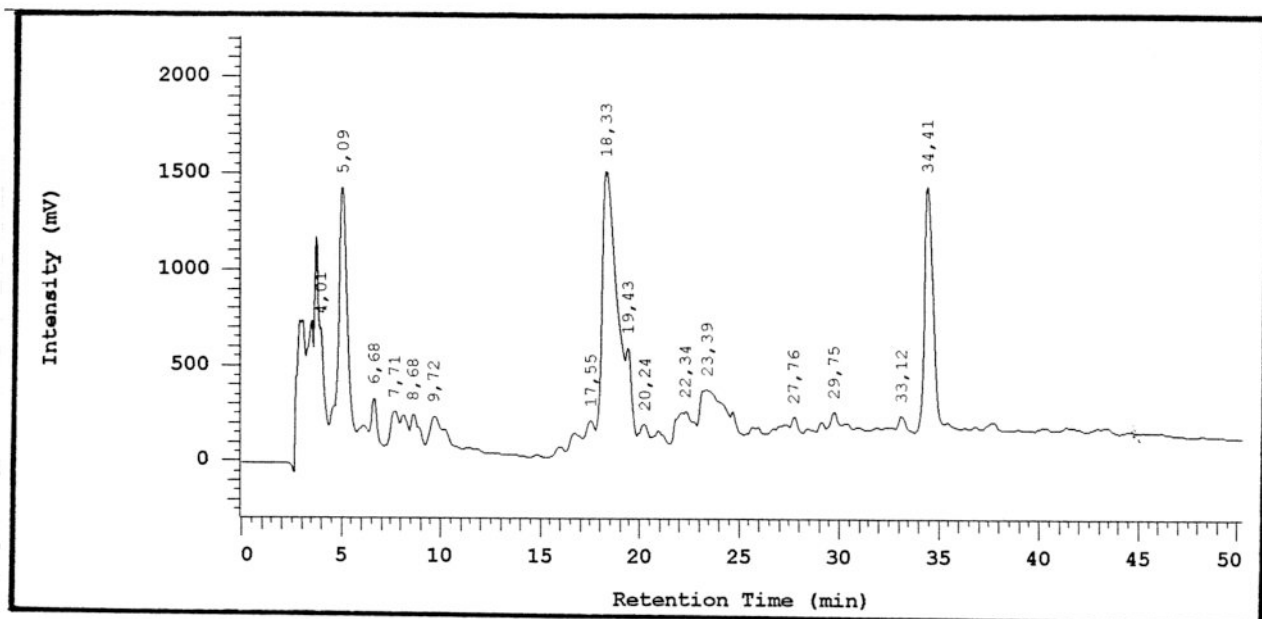
W trakcie wzrostu tego grzyba przeprowadzono kilkakrotnie chromatografię HPLC zagęszczonego płynu pohodowlanego (Rys. 16), lecz sygnały pochodzące od składników pożywki (Rys. 17) były za każdym razem tak silne, że nie udało się zaobserwować żadnego

sygnału o którym można byłoby powiedzieć, że pochodzi od metabolitu grzyba. W związku z tłem pożywki, hodowle głębinowe nie są najlepszym sposobem na otrzymywanie metabolitów tego grzyba, dlatego były podejmowane także próby opracowania sposobów stymulacji produkcji metabolitów wtórnych na powierzchni grzyba rosnącego na pożywkach stałych poprzez wprowadzanie warunków stresowych [Piątkowski *et al.*, 1998] lub dodawanie do pożywki soli różnych metali [Zabza *et al.*, 1996].

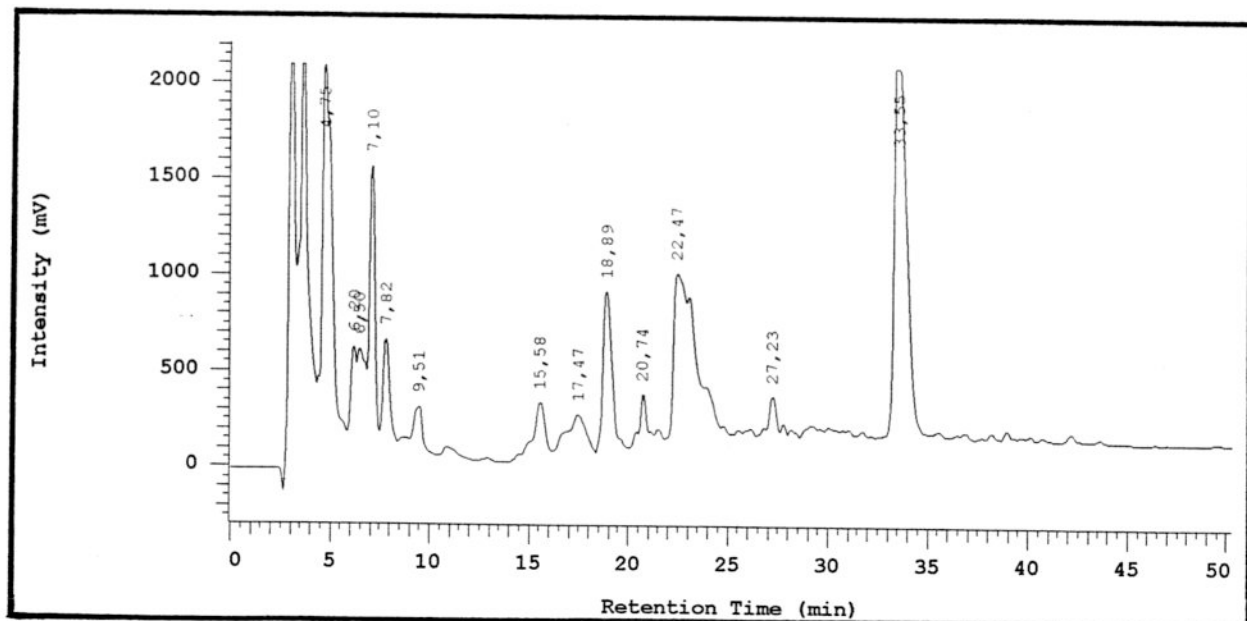
Tabela 13. Aktywność proteolityczna i lipolityczna w zależności od dnia hodowli grzyba

*Zoophthora neoaphidis*

| Dzień hodowli | pH płynu | masa mycelium [g/l] | Aktywność proteolityczna [mm] | Aktywność lipolityczna [U/ml] |
|---------------|----------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2             | 5.9      | -                   | 15                            | 2.0                           |
| 3             | 5.9      | -                   | 18                            | 1.6                           |
| 4             | 6.0      | -                   | 20                            | 2.4                           |
| 5             | 6.1      | -                   | 22                            | 2.8                           |
| 6             | 6.1      | -                   | 30                            | 1.6                           |
| 7             | 6.2      | -                   | 25                            | 1.6                           |
| 8             | 6.5      | 38.5                | 25                            | 0.8                           |
| 11            | 6.7      | -                   | 25                            | 1.2                           |
| 12            | 7.2      | 90.2                | 24                            | 2.0                           |
| 13            | 7.2      | -                   | 24                            | 1.2                           |
| 14            | 7.2      | -                   | 23                            | 1.2                           |
| 15            | 7.0      | -                   | 23                            | 1.2                           |
| 16            | 7.25     | -                   | 27                            | 0.8                           |
| 21            | 7.5      | -                   | 20                            | 2.0                           |
| 22            | 7.5      | 60.5                | 18                            | 3.6                           |
| 25            | 7.6      | -                   | 10                            | 1.2                           |
| 26            | 7.6      | 45.0                | brak                          | 0.8                           |



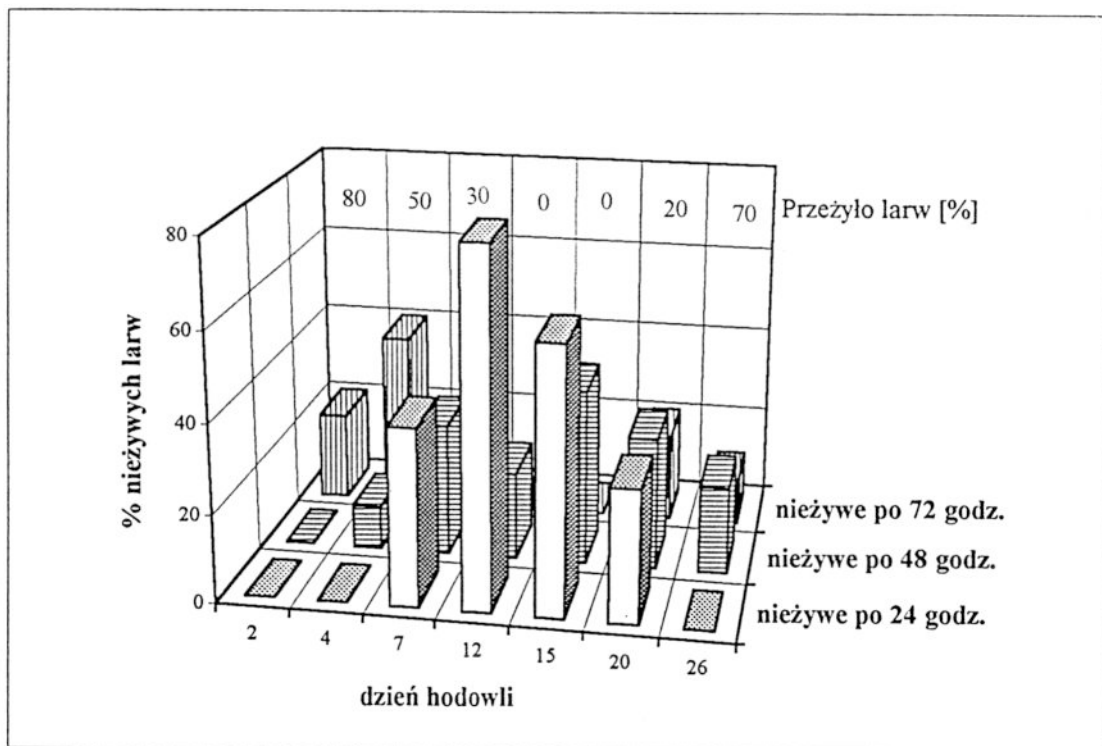
Rys.16. Chromatogram HPLC pożywki „pełnej”



Rys. 17. Chromatogram HPLC płynu pochodzącego po 35 dniach hodowli szczepu  
*Zoophthora neoaphidis*

Tabela 14. Aktywność biologiczna płynu po hodowli grzyba *Z. neoaphidis* względem larw *G. mellonella*

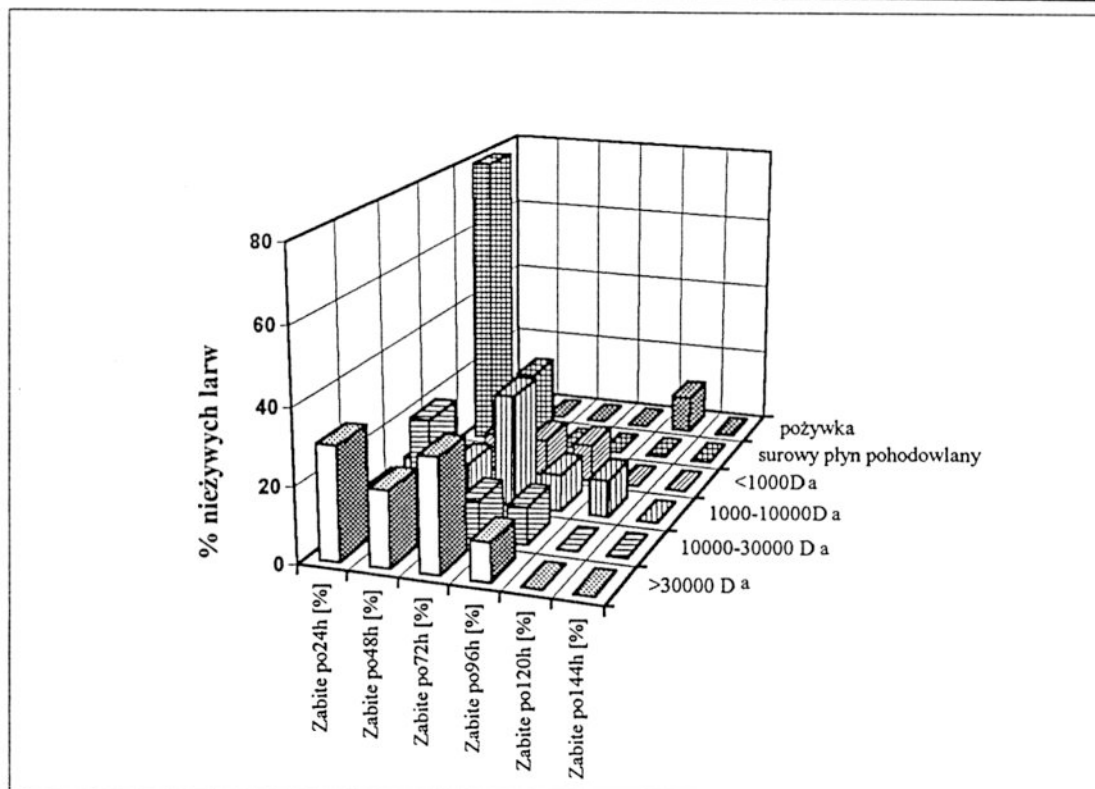
| Dzień hodowli | Martwe po 24h [%] | Martwe po 48h [%] | Martwe po 72h [%] |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 2             | 0                 | 0                 | 20                |
| 4             | 0                 | 10                | 40                |
| 7             | 40                | 30                | -                 |
| 12            | 80                | 20                | -                 |
| 15            | 60                | 40                | -                 |
| 20            | 30                | 30                | 20                |
| 26            | 0                 | 20                | 10                |
| kontrola      | 0                 | 0                 | 0                 |



Rys. 18. Aktywność biologiczna płynu po hodowli grzyba *Z. neoaphidis* względem larw *G. mellonella*

Tabela 15. Aktywność biologiczna poszczególnych frakcji po ultrafiltracji płynu z 12 dnia hodowli grzyba *Z. neoaphidis*

| Frakcja            | Martwe<br>po<br>24h [%] | Martwe<br>po<br>48h [%] | Martwe<br>po<br>72h [%] | Martwe<br>po<br>96h [%] | Martwe<br>po<br>120h [%] | Martwe<br>po<br>144h [%] |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| >30000 Da          | 30                      | 20                      | 30                      | 10                      | 0                        | 0                        |
| 10000-<br>30000 Da | 10                      | 30                      | 10                      | 10                      | 0                        | 0                        |
| 1000-<br>10000 Da  | 10                      | 10                      | 30                      | 10                      | 10                       | 0                        |
| <1000 Da           | 0                       | 10                      | 10                      | 10                      | 0                        | 0                        |
| płyn surowy        | 80                      | 20                      | -                       | -                       | -                        | -                        |
| pożywka            | 0                       | 0                       | 0                       | 0                       | 10                       | 0                        |



Rys. 19. Aktywność biologiczna poszczególnych frakcji po ultrafiltracji płynu z 12 dnia hodowli grzyba *Z. neoaphidis*



### 3.4. Biotransformacje przy użyciu grzybów entomopatogenicznych należących do rodzajów *Zoophthora* i *Paecilomyces*

We wcześniejszych badaniach stereochemii biotransformacji z użyciem grzybów należących do różnych rzędów, rodzajów i rodzin, stwierdzono, że niektóre z nich, jak np. *Rhodotorula* sp. [Siewiński *et al.*, 1979; Dmochowska-Gładysz *et al.*, 1987] i *Aphanocladium* sp. [(Dmochowska-Gładysz *et al.* 1987] wykazują własności redukujące. Z kolei *Botritis* sp. [Dmochowska-Gładysz *et al.* 1986], *Acremonium* [Siewiński *et al.*, 1983] oraz *Armiralliella* sp. [Draczyńska *et al.*, 1985] przeprowadzają reakcje utleniania z różną enancjospicyficznością. Przedmiotem badań obecnej pracy były grzyby patogeniczne owadów, które jako bioinsektycydy mogą być stosowane łącznie z tradycyjnymi środkami ochrony roślin. Ważne więc było sprawdzenie czy mikroorganizmy te mogą degradować, bądź transformować powyższe związki do substancji o odmiennych właściwościach biologicznych. Interesujące było również rozpoznanie wpływu chemicznych środków ochrony roślin na organizm grzyba. Wiadomo też, że enzymy produkowane przez patogeniczne grzyby odgrywają ważną rolę w procesie intoksykacji owada. Poznanie procesów biotransformacji pozwala też na pełniejszą charakterystykę układów enzymatycznych tych mikroorganizmów. Oczywiście prowadzenie transformacji mikrobiologicznej w kolbie nie oddaje w pełni złożonych procesów zachodzących w przyrodzie, gdzie pestycydy podlegają różnym, nie tylko biotycznym reakcjom. Przemiany te zależą też od innych czynników, m.in. od właściwości gleby, warunków środowiskowych, występowania innych mikroorganizmów i.t.p. [Scheunert, 1992].

#### 3.4.1. Badania stereochemii biotransformacji

Do badań stereochemii biotransformacji, dobrymi substratami okazały się ketony alkilo- $\alpha$ -kamfolenowe. Związki te zawierają bowiem w swojej strukturze grupę karbonylową, podwójne wiązanie, podstawiony trzema grupami metylowymi pierścień cyklopentenowy, oraz centrum chiralne przy atomie węgla C-1'. Te grupy funkcyjne, w zależności od właściwości redukcyjno-utleniających grzyba, mogą w procesie



biotransformacji ulegać różnym przemianom. Może to być np. epoksydacja wiązania podwójnego,  $\alpha$ -oksydacja w stosunku do wiązania podwójnego w pierścieniu lub w grupie metylowej, reakcja Bayera-Villigera, czy też redukcja grupy karbonylowej. Obecność chiralnego atomu węgla w pozycji C-1' umożliwia badanie enancjospicyficzności prowadzonej transformacji. Izoprenoidowy układ cykliczny kamfolenu przypomina fragmenty strukturalne feromonów czy juwenoidów, które są wykorzystywane również jako bioinsektycydy. Te modelowe substraty używane były wcześniej w badaniach stereochemii reakcji transformacji prowadzonych przez inne mikroorganizmy; w tym przez symbiotyczny w stosunku do owada grzyb *Aphanocladium album* (izolowany z przewodu pokarmowego owadów) [Dmochowska-Gładysz *et al.*, 1986; 1987], czy też patogena owadów *Zoophthora* (*Erynia*) *ovispora* [Urbańczyk *et al.*, 1993].

#### 3.4.1.1. Biotransformacje z wykorzystaniem szczepu *Zoophthora phyllobii*

Pierwsze próby biotransformacji racemicznego ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego [1-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-propan-2-onu] (**1**) przy udziale *Z. phyllobii* przeprowadzono jeszcze w ramach pracy magisterskiej. Ustalono wówczas główny ciąg reakcji nie wnikając w zagadnienia enancjospicyficzności tego procesu. W ramach obecnej pracy doktorskiej, izolując poszczególne produkty, przedstawiono pełny obraz przemian. Kolejnymi substratami użytymi do prowadzonych badań były: racemiczny nityl  $\alpha$ -kamfolenowy (1-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-acetonityl) (**7**) oraz oba enancjomery nienasyconych estrów kamfolenowych: (+)(4R)-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'ylo)-butenolan-2 (**11**) i (-)(4S)-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'ylo)-butenolan-2 (**12**).

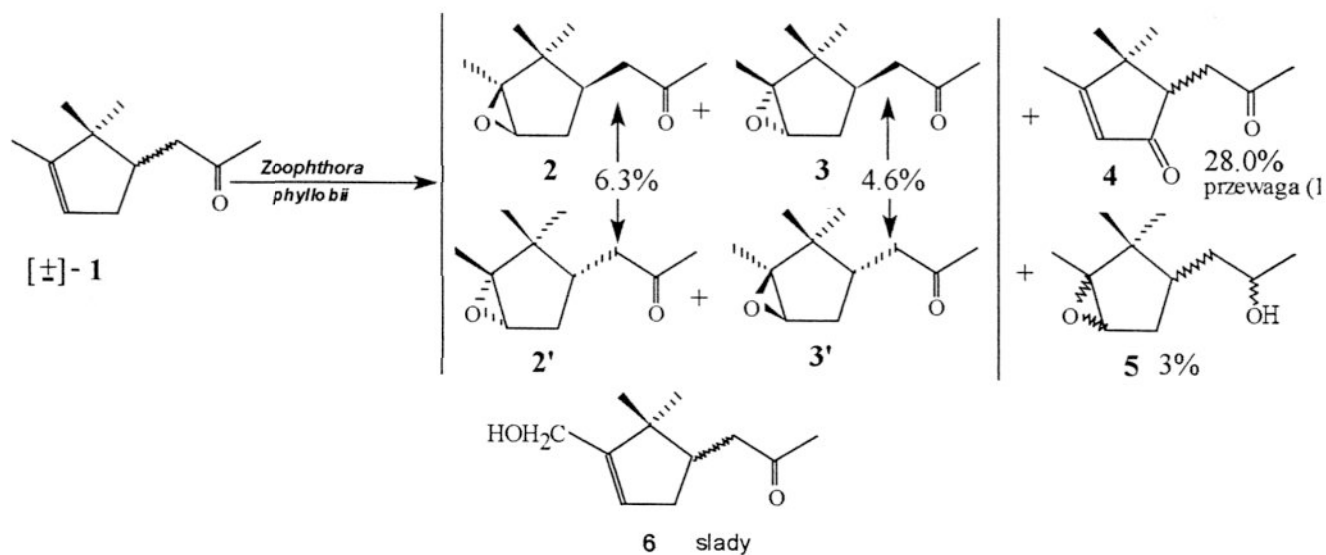
Przeprowadzając biotransformację w sposób opisany w rozdz. 6.3.1., stwierdzono wyraźne właściwości utleniające tego szczepu. Potwierdziło to wcześniejsze obserwacje przeprowadzania reakcji utleniania przez mikroorganizmy należące do rodzaju *Zoophthora* [Urbańczyk *et al.*, 1993]. Głównym produktem biotransformacji były optycznie czynne  $\alpha,\beta$ -nienasycone ketony **4** i **10**, oraz racemiczna mieszanina epoksydów **2**, **2'**, **3** i **3'** z (-+)-**1** i **8**, **8'**, **9** i **9'** z (-+)-**7** (Rys.20 i 21). Ich widma NMR i MS były identyczne z otrzymanymi

wcześniej dla produktów biotransformacji ketonu **1** za pomocą szczepu *Z. (Erynia) ovispora* [Urbańczyk *et al.*, 1993]. W mniejszych ilościach tworzył się keto-alkohol **6** i epoksy-alkohol **5**. Strukturę związku **6** potwierdziło jego widmo MS identyczne z widmem opisanego wcześniej związku [Urbańczyk *et al.*, 1993]. Utworzenie epoksy-alkoholu **5** było szczególnie interesujące, ponieważ był to pierwszy przypadek redukcji grupy karbonylowej przez grzyb należący do rodzaju *Zoophthora*. Struktura tego związku została ustalona za pomocą spektroskopii NMR. Na widmie  $^1\text{H}$ -NMR obecność grupy OH w pozycji C-2 była sygnalizowana przez dublet grupy  $\text{CH}_3$  przy  $\delta=1.2$  (d,  $J=6.1$  Hz, H-3), multiplet protonu H-2 przy  $\delta=3.76$ , brak sygnału protonów olefinowych, a w zamian sygnał od protonu H-4' ( $\delta=3.24$ ), odsłanianego przez pierścień epoksydowy. Strukturę tę potwierdziło także widmo  $^{13}\text{C}$ -NMR: brak sygnału od trygonalnego atomu węgla (C-2) a w zamian sygnał przy  $\delta=66.4$  węgla z grupą OH. Podobna redukcja grupy karbonylowej przez mikroorganizmy wykazujące silne własności utleniające była obserwowana w przypadku biotransformacji prowadzonych przez *Botritis cinerea* [Dmochowska-Gładysz *et al.*, 1986]. W przeciwieństwie do *Z. (Erynia) ovispora* [Urbańczyk *et al.*, 1993], w przypadku *Z. phyllobii* nie stwierdzono zachodzenia reakcji Bayera-Villigera. Wprowadzenie funkcji tlenowej w pozycję C-5' przebiegało tylko na jednym z enancjomerów, natomiast reakcja epoksydacji w pozycji C3'-C4' nie była enancjosecypiczna. Można to wytłumaczyć różnicą odległości od miejsca reakcji do chiralnego centrum cząsteczki. Atom węgla C-5' znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie chiralnego centrum C-1', podczas gdy pozycja C3'-C4' jest od niego znacznie oddalona. We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że czysty (+)-(1'R)-enancjomer diketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego (**4**) charakteryzował się skręcalnością optyczną  $[\alpha]_D = -26^\circ$  [Dmochowska-Gładysz *et al.*, 1986]. Skręcalność otrzymanego diketonu była niewielka i wynosiła  $[\alpha]_D = +6.9^\circ$ , co świadczy o tworzeniu się tego produktu z niewielką przewagą enancjomeru o przeciwnym znaku chiralności (-)-(1'S) (26.5% e.e.). Jego krzywa dichroizmu kołowego (CD) posiada wyraźne ujemne ekstremum przy 314.00 nm ( $\Delta\epsilon=0.022$ ), które towarzyszy przejściu n-p\*. Zgodnie z regułą Snatzke'go [Snatzke, 1970], ujemny sygnał efektu Cottona potwierdza absolutną konformację tego związku (Rys.22). Krzywa CD ketonu **10** wykazała pojedynczy, silny ujemny efekt Cottona przy  $\lambda_{\text{max}}=310.8$  nm (przejście n- $\pi^*$ ) ( $\Delta\epsilon=0.191$ ). Może to świadczyć o tym, że produkt ten

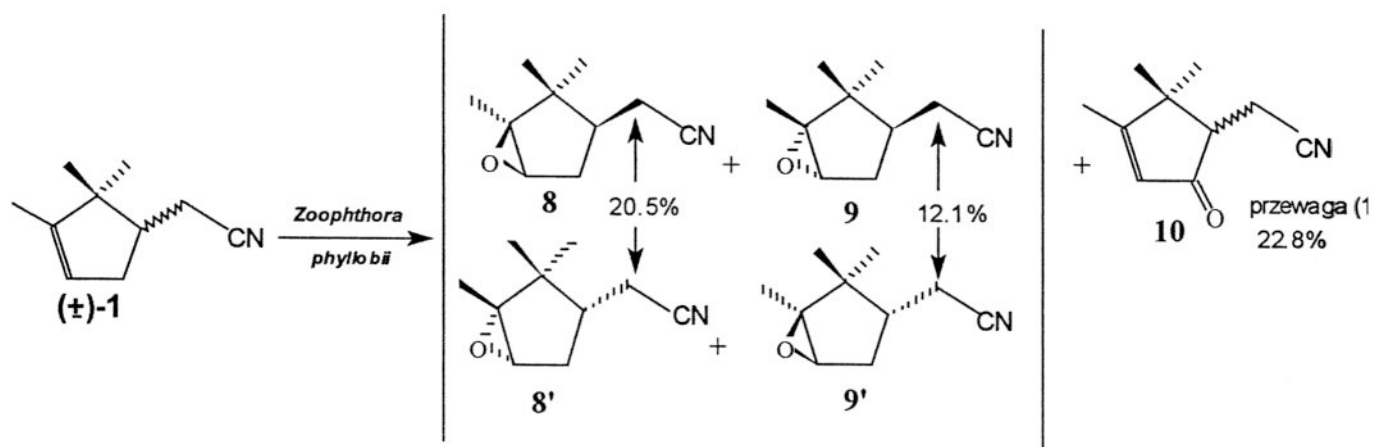
tworzy się z o wiele większą przewagą enancjomeru (1'S) niż diketon **4**. Ten sam znak efektu Cottona wskazuje na taką samą konfigurację obu związków (Rys. 22).

Oba enancjomery nienasyconych estrów **11** i **12** nie ulegały biotransformacji. Po 10 dniach prowadzenia procesu odzyskano te substraty niemal w całości. Biorąc pod uwagę fakt, że sumaryczna wydajność biotransformacji była wyższa w przypadku nitrilu  $\alpha$ -kamfolenowego niż ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego, można przypuszczać, że o podatności na biotransformację decydują własności przestrzenne bocznego łańcucha węglowego. Nienasycona grupa estrowa jest znacznie większa od grupy  $\text{CH}_3\text{CO}$  lub  $\text{CN}$ . Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

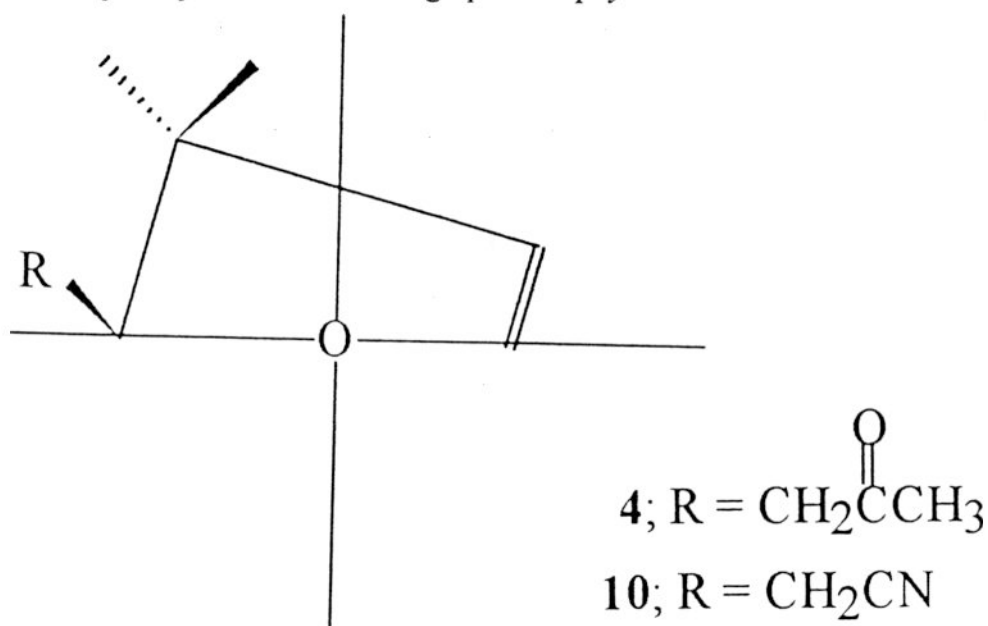
Pomimo wyraźnych utleniających właściwości grzyba *Z. phyllobii*, nie nadaje się on do wykorzystywania w preparatywnych procesach biotransformacji zarówno z powodu niezbyt wysokiej wydajności, jak i bardzo małej stereo- oraz enancjoselektywności. Nie wyklucza to jednakże znaczenia tych właściwości w procesie intoksykacji organizmu owada przez entomopatogeniczne grzyby, tym bardziej, że podobne właściwości były obserwowane także dla innego owadomorka [Urbańczyk *et al.*, 1993].



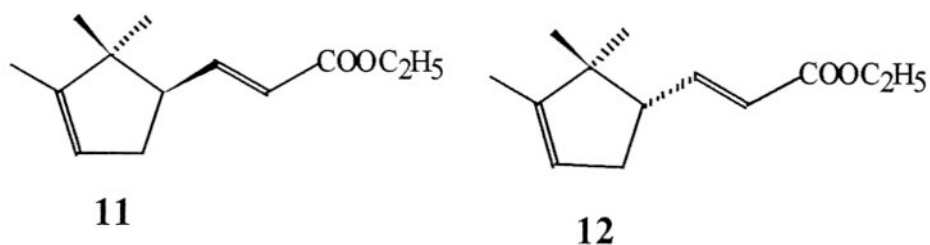
Rys.20. Transformacja ketonu metylo-  $\alpha$ -kamfolenowego przez *Z. phyllobii*



Rys.21. Transformacja nitrylu  $\alpha$ -kamfolenowego przez *Z. phyllobii*.



Rys. 22. Diagram oktantowy ketonu **4** i **10**



Rys. 23. Estry kamfolenowe.

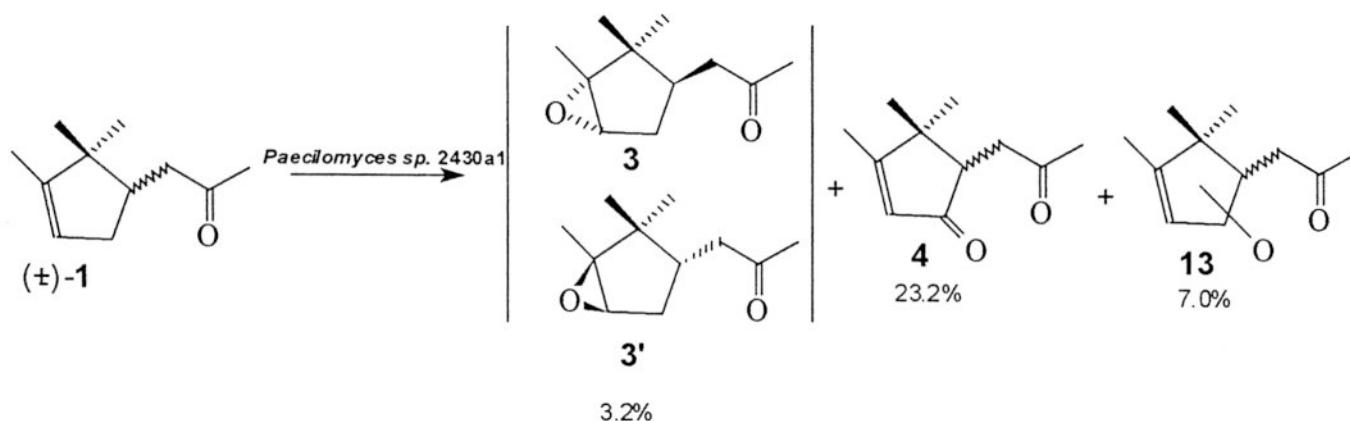
### 3.4.1.2. Biotransformacja ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego przy użyciu szczepu *Paecilomyces* 2430a1

*Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1 należy do innego niż *Zoophthora* rodzaju grzybów patogenicznych owadów. Interesujące więc było stwierdzenie czy wykazuje on zdolności utleniające analogiczne do *Z. phyllobii*. Do biotransformacji wykorzystano ponownie keton metylo- $\alpha$ -kamfolenowy (**1**). Wśród produktów reakcji, podobnie jak w przypadku *Z. phyllobii* stwierdzono obecność diketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego (**4**) (23.2%) oraz cis epoksydu (**3**) (3.2%) (Rys.24). Identyfikacji produktów dokonano na podstawie ich widm MS. Były one identyczne z widmami tych samych związków izolowanych wcześniej dla *Z. phyllobii* [Zabża, Greb-Markiewicz *et al.*, 1995] i *Z. ovispora* [M. Urbańczyk *et al.* 1993]. Obok tych połączeń tworzył się też nowy produkt (7.0%) o RT= 14.95 (**13**), którego jednak nie udało się wyizolować. Z masy jego jonu molekularnego ( $m/e=182$ ) na widmie MS wynioskowano, że do cząsteczki substratu został wprowadzony 1 atom tlenu. Sygnał podstawowy przy  $m/e=43$ , pochodził najprawdopodobniej od charakterystycznego dla ketonów metylowych jonu  $\text{CH}_3\text{CO}^+$ . Inny sygnał o znacznym natężeniu był widoczny przy  $m/e=123$ . Może to sugerować, że miejscem wprowadzenia atomu tlenu jest pierścień kamfolenowy. Niestety widmo MS okazało się niewystarczające dla jednoznacznego określenia struktury tego związku, a mała ilość mieszaniny przy jego niewielkiej zawartości procentowej uniemożliwiła przeprowadzenie dokładniejszych analiz. Stwierdzono jedynie, że nie jest to ketoalkohol (**5**). Ponieważ głównym celem była ogólna charakterystyka kierunków prowadzonych przez ten szczep biotransformacji, nie podejmowano dalszych prób zmierzających do identyfikacji związku. Warto podkreślić, że nie został utworzony izomer cis epoksydu, co świadczy o stereospecyficzności tego procesu w przypadku *Paecilomyces* sp. 2430a1.

Wykorzystując ten sam substrat, w naszym laboratorium przeprowadzono próby biotransformacji także przy użyciu innego szczepu należącego do rodzaju *Paecilomyces* - *Paecilomyces* sp. nr kat. 2428d [J. Bujak, praca dyplomowa 1995]. Głównym produktem tego procesu podobnie jak w przypadku *Paecilomyces* sp. 2430a1 był diketon (**4**) (13.1%). Z większą wydajnością następowała epoksydacja izomeru cis (**3,3'**) (12.0%) niż trans (**2,2'**)

(6.3%). W nieco większej ilości niż w przypadku *Z. phyllobii* powstał keto-alkohol (**6**) (4.6%). Przeprowadzenie dla tego szczepu biotransformacji na nitrilu kamfolenowym [B. Matkowska, praca dyplomowa 1998] wykazało powstanie produktów analogicznych jak w przypadku *Z. phyllobii*. Skręcalność optyczna ketonu nitrilu (**10**) będącego głównym produktem biotransformacji nitrilu  $\alpha$ -kamfolenowego wynosiła  $[\alpha]_D = -16.3^\circ$ . Ta stosunkowo wysoka wartość skręcalności optycznej świadczy o większej enancjospicyficzności procesu utlenienia prowadzonego przez ten szczep w porównaniu do *Z. phyllobii*, a znak o przewadze przeciwnego enancjomeru (1'R).

Można stwierdzić, że badane szczepy z rodzaju *Paecilomyces* charakteryzują się znaczną stereospecyficznością, jednakże tworzą zbyt wiele produktów aby mogły być wykorzystywane w laboratoriach do celów preparatywnych.



Rys. 24. Biotransformacja ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego przez *Paecilomyces* sp. 2430a1

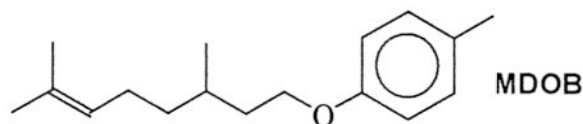
### 3.4.2. Biotransformacja analogów hormonów juvenilnych owadów przez szczep *Paecilomyces* sp. 2428d

Szczepem wykorzystywanym do dalszych biotransformacji był *Paecilomyces* sp. 2428d, gdyż przeprowadzał reakcje podobne do reakcji prowadzonych przez *Z. phyllobii* i *Paecilomyces* sp. 2430a1 a rósł zdecydowanie lepiej na pożywce „nieorganicznej”. Substratami tego grzyba były związki zaliczane do grupy juvenoidów. Połączenia te, z

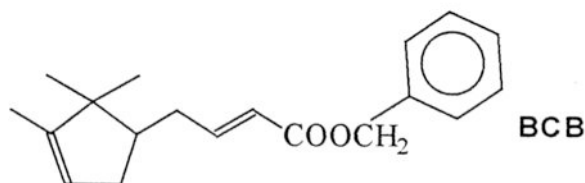
uwagi na analogiczne do hormonów juvenilnych owadów właściwości biologiczne, wykorzystuje się w niektórych przypadkach jako skuteczne bioinsektycydy.

Biotransformacji poddano następujące związki:

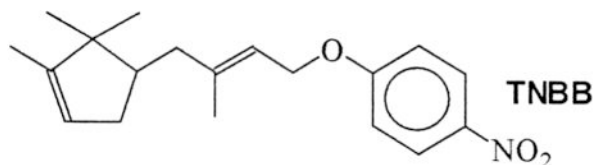
a) (RS)-4-metylo-1-(3,7-dimetylo-6-oktenyloksy)-benzen (**MDOB**);



b) (2E)-(R)-(+)-benzylo-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopentenylo)-butenolan-2 (**BCB**);



c) eter p-nitrofenylo-3-metylo-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopentenylo)-buten-2-ylowy (**TNBB**).



Charakterystykę tworzących się produktów oparto o chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią masową.

#### 3.4.2.1. Biotransformacja (RS)-4-metylo-1-(3,7-dimetylo-6-oktenyloksy)-benzenu (**MDOB**)

Głównym produktem biotransformacji **MDOB** (**14**) był związek oznaczony numerem **16** na rys. 25. Z masy jego jonu molekularnego ( $m/e=280$ ) wywnioskowano, że do cząsteczki substratu zostały wprowadzone dwa atomy tlenu. O obecności układu aromatycznego świadczyły charakterystyczne dla niego sygnały, występujące także w widmie substratu, a mianowicie kation fenyłowy  $C_6H_5^+$  ( $m/e=77$ ), kation tropyliowy  $C_7H_7^+$



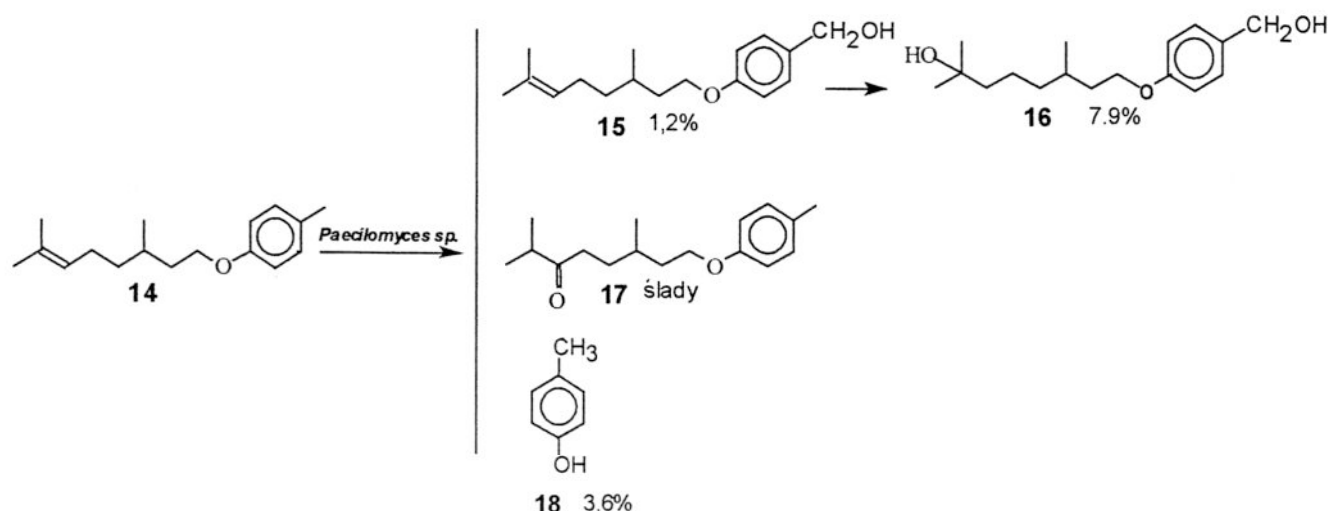
( $m/e=91$ ) oraz kation  $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{O}^+$  ( $m/e=108$ ). Wprowadzenie grupy hydroksylowej w pozycji C-7 potwierdził pik przy  $m/e=59$  pochodzący od jonu oksoniowego  $[\text{C}_2\text{H}_6\text{-C-OH}]^+$ . O hydroksylacji atomu węgla jednej z pozostałych dwóch grup metylowych informowała obecność innego jonu oksoniowego  $[\text{H}_2\text{C-OH}]^+$  ( $m/e=31$ ) typowego dla rozpadu alkoholi pierwszorzędowych. Masa fragmentu alifatycznego - kationu karbeniowego ( $m/e=155$ ) była większa tylko o 16 jednostek masy od jego odpowiednika w substracie. Można więc było wnioskować, że drugim miejscem hydroksylacji może być grupa metylowa przy pierścieniu aromatycznym.

Z o wiele niższą wydajnością powstał związek o krótszym czasie retencji (**15**), będący prawdopodobnie stadiem przejściowym prowadzącym do wcześniej opisanego produktu. Masa jego jonu molekularnego ( $m/e=258$ ) wskazywała na wprowadzenie do cząsteczki tylko 1 atomu tlenu. Obecność jonów  $\text{C}_3\text{H}_5^+$  ( $m/e=41$ ) oraz  $m/e=69$  świadczyła o zachowaniu wiązania podwójnego. Analogiczne jak w poprzednim produkcie sygnały (77, 91, 108), potwierdziły obecność układu aromatycznego. Podstawienie atomu węgla grupy metylowej przy pierścieniu aromatycznym grupą OH sugerował sygnał przy  $m/e=137$  będący odpowiednikiem pików  $m/e=121$  w substracie.

Uzyskano także śladowe ilości związku oznaczonego na rysunku jako **17**. Jak wynika z masy jego jonu molekularnego, on także został utworzony w wyniku wprowadzenia do cząsteczki substratu jednego atomu tlenu. Na widmie masowym charakterystyczna była obecność pików przy  $m/e=71$  pochodzącego najprawdopodobniej od kationu  $[\text{C}_4\text{H}_9\text{C=O}]^+$ , świadczącego o wprowadzeniu grupy karbonylowej w pozycję C-6. Dodatkowym potwierdzeniem jest sygnał jonu  $\text{C}_3\text{H}_7^+$  ( $m/e=43$ ). Jony będące wynikiem fragmentacji układu aromatycznego ( $m/e=77$ , 91 i 108) udowadniały jego obecność. Oprócz powyższych produktów na chromatogramie gazowym mieszaniny poreakcyjnej **MDOB** widoczna była duża różnorodność produktów o krótszych czasach retencji w porównaniu do substratu. Świadczyło to o stosunkowo efektywnej degradacji tego związku, zwłaszcza w części izoprenoidowej. Wśród nich zdecydowanie największym udziałem wyróżniał się 4-metylofenol (**18**), będący wynikiem eliminacji łańcucha alifatycznego. Na jego widmie masowym dominował pik przy  $m/e=107$  pochodzący od kationu hydroksytropyliowego, typowego dla widm MS krezoli. O zachowanym układzie



aromatycznym świadczy również sygnał jonu fenyłowego oraz jonu utworzonego na skutek odszczepienia od niego cząsteczki acetylenu ( $m/e=51$ ). Powyżej  $m/e=107$  nie odnotowano znaczących sygnałów. Dodatkowym potwierdzeniem struktury była pełna zgodność z widmem wzorca.

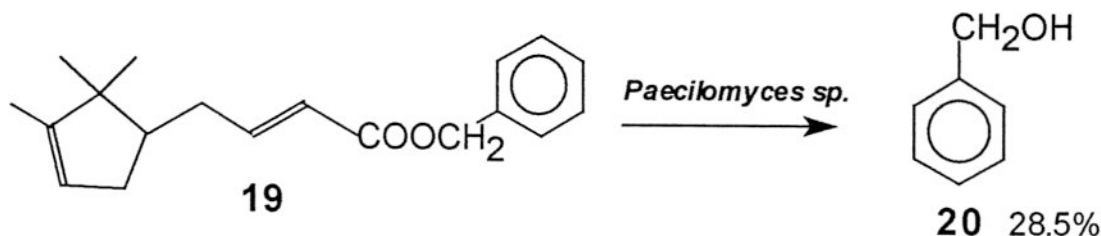


Rys.25. Biotransformacja **MDOB**

#### 3.4.2.2. Biotransformacja (2E)-(R)-(+)-benzylo-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopentenyl)-butanolanu-2 (**BCB**)

Kolejnym substratem użytym do biotransformacji, był związek zawierający fragment izoprenoidowy w postaci cyklicznego układu kamfolenowego (**19**). Jakkolwiek w mieszaninie poreakcyjnej stwierdzono 14.1% nieprzereagowanego substratu, to ilość pozostałych produktów świadczyła o daleko posuniętej degradacji, zwłaszcza części izoprenoidowej (Rys.6). Głównym rozpoznawalnym produktem był alkohol benzyłowy (**20**), będący wynikiem hydrolizy grupy estrowej. Jego strukturę udowadniają charakterystyczne sygnały jonów: oksoniowego ( $m/e=31$ ), fenyłowego ( $m/e=79$ ), tropyliowego ( $m/e=91$ ), hydroksytropyliowego ( $m/e=108$ ), oraz powstałego na skutek odszczepienia cząsteczki acetylenu od jonu fenyłowego, jonu o  $m/e=51$ . Widmo MS tego produktu jest zgodne z

widmem związku wzorcowego. Widoczne na chromatogramie gazowym inne związki nie były identyfikowane z powodu ich bardzo małych wydajności. Ich czasy retencji były znacznie krótsze niż obserwowane dla substratu, co świadczyło o daleko posuniętej degradacji tych związków.



Rys.6. Biotransformacja BCB

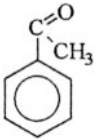
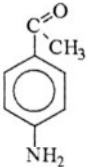
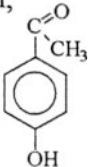
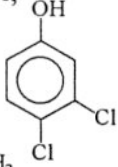
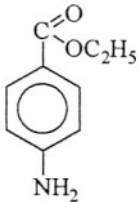
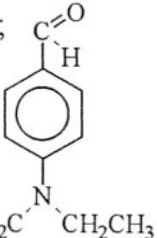
#### 3.4.2.3. Biotransformacja eteru p-nitrofenylo-3-metylo-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopentenyl)-buten-2-yłowego (TNBB)

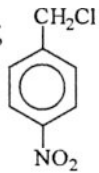
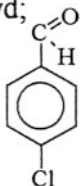
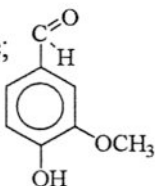
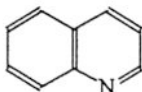
W odróżnieniu od poprzedniego substratu TNBB (**21**) bardzo łatwo ulegał degradacji. W produktach biotransformacji nie znaleziono nawet śladowych ilości substratu. Z dużą wydajnością biegł proces odcięcia fragmentu izoprenoidowego, a następnie jego utlenienia. Jest to szczególnie interesujące, gdyż estry kamfolenowe **11** i **12** o zbliżonej budowie nie były transformowane przez szczepy należące do rodzaju *Zoophthora*. Na chromatogramie mieszaniny poreakcyjnej można było zauważyć stosunkowo dużą liczbę produktów o nakładających się czasach retencji w zakresie RT = 3.8-5.0 min. Z otrzymanego dla tej mieszaniny, złożonego widma MS można było wywnioskować, że w strukturze pozostał nienaruszony układ kamfolenowy. Świadczyły o tym sygnały m/e = 55, 67, 123 i 137. Natomiast nie stwierdzono sygnałów charakterystycznych dla fragmentu aromatycznego. Ponieważ na widmie MS sygnały od związków tworzących mieszaninę nakładały się na siebie, ich identyfikacja na tej podstawie nie była możliwa. Pomimo stosunkowo wysokiej wydajności procesu biotransformacji, nie dysponowano wystarczająco dużą ilością mieszaniny poreakcyjnej aby wyizolować któryś z produktów.

Oprócz powyższych związków na chromatogramie gazowym widoczne były także sygnały pochodzące od metabolitów własnych grzyba: kwas heksadekanowy i olejowy.

### 3.4.3. Biotransformacja wybranych związków aromatycznych przez szczep *Paecilomyces sp.* 2428d

Układ aromatyczny stanowi często pojawiający się fragment strukturalny różnych insektycydów czy herbicydów. Z tego też powodu uważano za celowe przeprowadzenie reakcji biotransformacji na wybranych związkach modelowych zawierających układ aromatyczny, przy dodatkowym sprawdzeniu wpływu tych związków na rozwój grzyba. Do tego celu wybrano następujące połączenia:

- acetofenon; 
- 4-aminoacetofenon; 
- 4-hydroksyacetofenon; 
- 3,4- dichlorofenol; 
- p-nitrotoluen; 
- p-aminobenzoesan etylu; 
- aldehyd dietyloaminobenzoesowy; 

- chlorek 4-nitrobenzylu; 
- 4-chloro-benzaldehyd; 
- wanilinę; 
- chinolinę. 

Związki te w różny sposób oddziaływały na wzrost grzyba, w zależności od jego fazy wzrostu w momencie dodania tych ksenobiotyków do pożywki (Tab. 16). Interesujące było, że wanilina dodana pierwszego dnia hodowli okazała się dobrym źródłem węgla, co objawiło się zdecydowanie lepszym wzrostem niż w przypadku kontroli; natomiast dodana po siedmiu dniach oddziaływała na przyrost grzybni ujemnie. Acetofenon dodany pierwszego dnia nie wykazał żadnego działania, podczas gdy dodany 7 dnia hodowli powodował zmiany objawiające się niewielkim obniżeniem masy grzybni i znacznym spadkiem wartości pH płynu hodowlanego. Zupełnie przeciwny wpływ na badany grzyb miał 4-aminoacetofenon. Dodany na początku hodowli prawie całkowicie zahamował rozwój grzyba, podczas gdy dodanie go w późniejszym stadium nie miało większego wpływu na rozwój tego mikroorganizmu. W obu przypadkach nastąpiło silne zakwaszenie płynu. Chinolina wykazała zdecydowanie silniejszy efekt toksyczny w momencie dodania jej pierwszego dnia. Pozostałe związki były toksyczne dla grzyba niezależnie od momentu ich dodania, przy czym 3,4-dichlorofenol dodany na początku powodował duży wzrost wartości pH płynu hodowlanego.

Porównując chromatogramy HPLC substratów i mieszaniny produktów stwierdzono, że pierścień benzenowy jest słabo degradowany przez szczep *Paecilomyces sp.* 2428. Proces

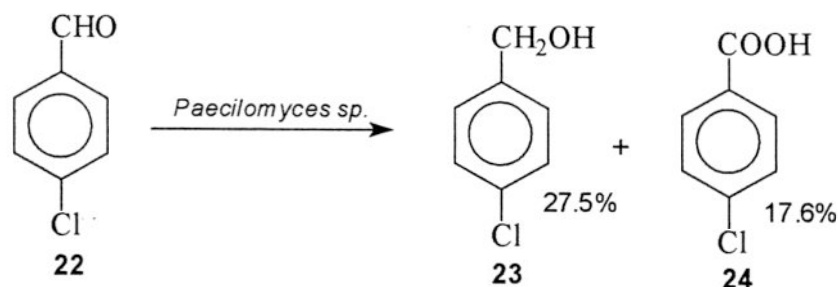
biotransformacji przebiegał tylko dla dwóch substratów: 4-chlorobenzaldehydu i chlorku-4-nitrobenzylowym. Wydajność tych reakcji określono przy pomocy chromatografii gazowej, natomiast strukturę tworzących się produktów zidentyfikowano na podstawie ich widm masowych.

Tabela 16. Wpływ ksenobiotyków na wzrost grzyba *Paecilomyces sp.* nr kat 2428d na pożywcę nieorganicznej.

| L. p |                                     | Czas dodania ksenobiotyku |                                              |                 |                                              |
|------|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|
|      |                                     | 1 dzień hodowli           |                                              | 7 dzień hodowli |                                              |
|      |                                     | pH                        | masa suchej grzybni<br>[g] (14 dnia hodowli) | pH              | masa suchej grzybni<br>[g] (14 dnia hodowli) |
| 1    | acetofenon                          | 5.85                      | 2.13                                         | 3.84            | 1.04                                         |
| 2    | 4-aminoacetofenon                   | 4.50                      | 0.13                                         | 3.50            | 1.94                                         |
| 3    | 4-hydroksyacetofenon                | 5.80                      | 1.13                                         | 4.45            | 0.45                                         |
| 4    | 3,4-dichlorofenol                   | 7.94                      | 0.09                                         | 4.45            | 0.60                                         |
| 5    | p-nitrotoluen                       | 6.40                      | 0.08                                         | 4.71            | 0.50                                         |
| 6    | p-aminobenzoesan<br>etylu           | 6.87                      | brak wzrostu                                 | 4.53            | 0.10                                         |
| 7    | aldehyd dietylo-<br>aminobenzoesowy | 6.85                      | 0.10                                         | 4.11            | 0.69                                         |
| 8    | chlorek<br>4-nitrobenzylu           | 6.85                      | 0.17                                         | 5.07            | 0.10                                         |
| 9    | 4-chloro<br>benzaldehyd             | 6.86                      | brak wzrostu                                 | 4.52            | 0.60                                         |
| 10   | wanilina                            | 4.43                      | 3.64                                         | 4.26            | 0.63                                         |
| 11   | chinolina                           | 6.89                      | brak wzrostu                                 | 4.50            | 1.35                                         |
| 12   | kontrola                            | 5.40                      | 2.50                                         | -               | -                                            |

### 3.4.3.1. Biotransformacja aldehydu 4-chlorobenzoesowego

Aldehyd 4-chlorobenzoesowy (**22**) ulegał ciekawej reakcji dysproporcjonowania Cannizarro (Rys. 27). W wyniku biotransformacji otrzymano bowiem porównywalne ilości alkoholu 4-chlorobenzylometylowego (**23**) i kwasu 4-chlorobenzoesowego (**24**). Należy przy tym zaznaczyć, że proces przebiegał przy pH środowiska obojętnym lub słabo kwaśnym i w kontrolnym eksperymencie, przeprowadzonym bez udziału grzybni, nie obserwowano tworzenia się tych produktów. Ich struktury udawadniają jednoznacznie widma MS. Na widmie alkoholu **23** podstawowym sygnałem był pik jonu fenyłowego ( $m/e=77$ ). Oprócz niego widoczny był jon hydroksytropyliowy ( $m/e=107$ ), jon molekularny ( $m/e=142$ ), oraz słaby pik jonu oksoniowego ( $m/e=31$ ). W przypadku kwasu 4-chlorobenzoesowego (**24**), największą intensywność wykazał sygnał przy  $m/e=139$ , powstały w wyniku eliminacji cząsteczki wody od jonu molekularnego ( $m/e=158$ ). Ponadto obecny był dosyć silny pik ( $m/e=111$ ) pochodzący od kationu fenyłowego z przyłączonym atomem chloru. Prawdliwość tych interpretacji potwierdziła zgodność z obrazem widm wzorców.

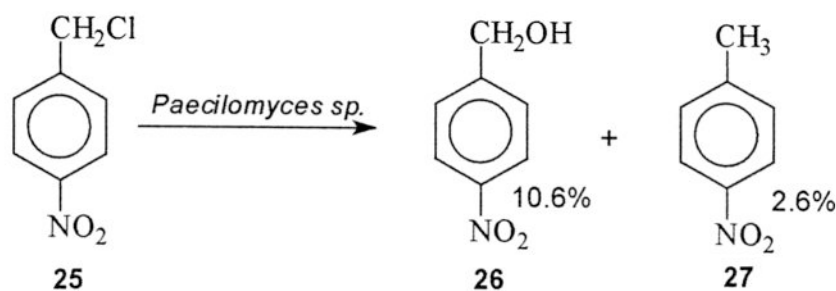


Rys. 27. Transformacja 4-chlorobenzaldehydu przez *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d

### 3.4.4.2. Biotransformacja chlorku 4-nitrobenzylu

Biotransformacja chlorku 4-nitrobenzylu (**25**) zachodziła z niewielką wydajnością (Rys. 28). Nieprzereagowało ponad 67% substratu. Reakcja biegła głównie w kierunku zastąpienia atomu chloru grupą OH (**26**). Potwierdza to widmo MS, na którym widoczny

jest jon hydroksytropyliowy ( $m/e=107$ ) a brak jonu chlorotropyliowego ( $m/e=125$ ), obserwowanego na widmie substratu, oraz zamiana masy jonu molekularnego z  $m/e=171$  w przypadku substratu, na  $m/e=153$  w przypadku produktu. Ze śladową wydajnością przebiegała też zamiana atomu chloru na atom wodoru (**27**). Może o tym świadczyć bardzo silny sygnał jonu tropyliowego [ $C_7H_7^+$ ]. Dodatkowym potwierdzeniem tych ustaleń była zgodność widm obu produktów z widmami wzorców.



Rys.28. Transformacja chlorku 4-nitrobenzylu przez *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d

Podobnie jak *Z. phyllobi*, oba szczepy *Paecilomyces* wykazały właściwości utleniające. Szczególnie aktywnym miejscem w cząsteczce było wiązanie podwójne. Ulegało ono epoksydacji, albo skierowywało funkcję tlenową w  $\alpha$ -pozycję do tego wiązania. Powyższe reakcje na pierścieniu kamfolenowym przebiegały z różną szybkością na obu enancjomerach, w zależności od tego, do jakiego rodzaju grzybów należał użyty szczep. Wprowadzenie funkcji tlenowej do pierścienia kamfolenowego przez szczepy z rodzaju *Zoophthora* i *Paecilomyces* przebiegało z różną szybkością na obu enancjomerach. Układ aromatyczny, za wyjątkiem TNBB, nie był degradowany przez szczep *Paecilomyces sp.* 2428d. Natomiast ciekawe przemiany miały miejsce na podstawnikach tego układu. Grupa aldehydowa ulegała reakcji dysproporcjonowania, a atom chloru w grupie chlorometylenowej był wymieniany na atom wodoru lub grupę hydroksylową.

## 4. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Wśród składników frakcji neutralnych lipidów nie stwierdzono żadnych związków, które można byłoby uważać za silnie toksyczne. Jedynie stosunkowo wysokie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza kwasu heksadekanowego, może wywierać negatywny wpływ na rozwój owada. Interesujące było stwierdzenie stosunkowo dużej ilości skwalenu we frakcji węglowodorowej, gdyż jest to związek rzadko izolowany z grzybów.
2. Dla obu szczepów należących do rodzaju *Paecilomyces* nie stwierdzono zależności pomiędzy sygnałami biosyntezowanych metabolitów na chromatogramach HPLC a ich aktywnością w stosunku do larw *Galleria mellonella*. Można przypuszczać, iż stężenie związków odpowiedzialnych za tę aktywność było zbyt niskie, aby były one widoczne na chromatogramach HPLC, albo ich działanie oparte jest na bardziej skomplikowanych zależnościach, jak np. współdziałaniu z wydzielanymi enzymami, w związku z czym niemożliwe jest zaobserwowanie prostej korelacji. Przeprowadzone badania wskazują, że tworzące się metabolity należą do grupy peptydów o silnych właściwościach hydrofilowych.
3. Duże trudności w prowadzeniu badań dotyczących grzyba *Zoophthora neoaphidis* wynikały z powtarzających się co roku wielomiesięcznych zahamowań jego wzrostu (maj-listopad).
4. Z powodu złożonego składu pożywki, koniecznego dla uzyskania wzrostu grzyba *Z. neoaphidis*, nie można było przeprowadzić badań analogicznych jak dla szczepów należących do rodzaju *Paecilomyces*. Przesącz po hodowli tego grzyba najsilniejszy efekt biologiczny wykazywał 12 dnia hodowli. W tym dniu obserwowane było niewielkie lokalne maximum aktywności lipolitycznej, natomiast aktywność proteolityczna nie ulegała większym zmianom. Poszczególne frakcje tego przesączu uzyskane przez ultrafiltrację oddziaływały na larwy *G. mellonella* o wiele słabiej. Pozwala to przypuszczać, że mamy do czynienia z efektem synergistycznym kilku związków różniących się masami cząsteczkowymi.



5. Badania aktywności enzymatycznej wykazały, że w przypadku szczepu *Z. neoaphidis* najbardziej aktywne były proteazy. Lipazy wykazały o wiele mniejszą aktywność, natomiast aktywności chitynolitycznej i amylolitycznej w warunkach prowadzonych testów nie stwierdzono. Wydaje się to logiczne, gdyż większość składników kutikuli owada stanowią białka.

6. Wszystkie badane mikroorganizmy wykazały zdolność prowadzenia reakcji utleniania, co może odgrywać pewną rolę w procesie porażania organizmu owadów. Szczególnie aktywnym miejscem w cząsteczce substratu było wiązanie podwójne. Układ aromatyczny związków modelowych w większości nie ulegał biotransformacji, natomiast przemiany nastąpiły w kilku przypadkach na podstawnikach tego układu. Analogi hormonów juwenilnych ulegały procesowi biotransformacji głównie w kierunku degradacji tych połączeń. W związku z tym wydaje się, iż stosowanie tych mikroorganizmów jako bioinsektycydów, łącznie z innymi środkami ochrony roślin, powinno być wcześniej dokładnie sprawdzone pod względem ich wzajemnego oddziaływania. Badane grzyby nie są przydatne w prowadzeniu biotransformacji na większą skalę, z powodu niewysokiej wydajności prowadzonych przez nie procesów oraz stosunkowo małej stereo- oraz enancjoselektywności.

7. Stwierdzono, iż wpływ ksenobiotyków aromatycznych na wzrost *Paecilomyces sp.* 2428d zależy od jego fazy wzrostu w momencie dodania tych związków do podłoża.

## 5. MATERIAŁY

### 5. 1. Drodnoustroje

Wykaz szczepów grzybów użytych do badań wraz z ich opisem przedstawiono w Tabeli 1. Szczep *Zoophthora neoaphidis* pochodził z kolekcji prof. dr hab. I. Majchrowicz z Akademii Rolniczej w Szczecinie. Pozostałe szczepy otrzymano jako świeżo wyizolowane z żywicieli przez prof. dr hab. S. Bałazego z Zakładu Ochrony Środowiska Rolniczego i Leśnego P. A. N. w Poznaniu. Prof. dr hab. S. Bałazy okresowo sprawdzał używane do badań grzyby odnośnie ich czystości i przynależności gatunkowej.

Tabela 17. Grzyby wykorzystywane do badań

| L.p. | Nazwa szczepu                | Nr katalogowy | Pochodzenie                                                     |
|------|------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1    | <i>Zoophthora phyllobii</i>  | 2360          | Chrząszcz <i>Phyllobius</i> sp.<br>(Wielkopolski Park Narodowy) |
| 2    | <i>Paecilomyces</i> sp.      | 2428d         | Larwa chrząszcza na wilgotnej łące<br>(Bawaria)                 |
| 3    | <i>Paecilomyces</i> sp.      | 2430a1        | Larwa chrząszcza z rodzaju <i>Lampyrus</i><br>(Bawaria)         |
| 4    | <i>Zoophthora neoaphidis</i> | 67            | mszyce <i>Acyrtosiphon</i><br><i>pisum</i>                      |

## 5. 2. Podłoża

Szczepy przechowywano na skosach agarowych w temperaturze 4°C na podłożu o

|           |                    |                     |
|-----------|--------------------|---------------------|
| składzie: | bakto pepton       | - 12g;              |
|           | wyciąg drożdżowy   | - 5g;               |
|           | hydrolizat kazeiny | - 2g;               |
|           | NaCl               | - 1.5g;             |
|           | glukoza            | - 2;                |
|           | agar               | - 30g;              |
|           | woda destylowana   | - 1000ml; pH = 6.8. |

Do prowadzenia hodowli głębinowych wykorzystywano dwa rodzaje pożywek:

- **pożywkę „pełną”** o składzie przedstawionym powyżej, lecz zubożonym o agar [Greb-Markiewicz *et al.*, 1994]

- **pożywkę „nieorganiczną”** [Urbańczyk *et al.*, 1992] zmodyfikowaną zastąpieniem  $\text{MnCl}_2$  przez  $\text{MnCO}_3$ , o następującym składzie:

|                                           |                    |
|-------------------------------------------|--------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | - 2.64g            |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | - 5.65g            |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | - 2.38g            |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | - 1g               |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | - 0.06g            |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | - 0.01g            |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | - 0.01g            |
| $\text{MnCO}_3$                           | - 0.05g            |
| glukoza                                   | - 15g              |
| woda destylowana                          | - 1000ml; pH = 6.8 |

Do badań aktywności enzymatycznych używano następujących składników:

- **aktywność proteolityczna:** mleko odtłuszczone 100ml, agar 25g, woda destylowana 1000ml; pH = 7.2;

- **aktywność amylolityczna:** Gause I (  $\text{KNO}_3$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , NaCl

0.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g), skrobia 20g, agar 20g, woda destylowana 1000ml; pH = 7.2;

- **aktywność chitynolityczna:** koloidalna chityna 1g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001g, agar 20g, woda destylowana 1000ml; pH = 5.5;

- **aktywność lipolityczna:** 10% emulsja oliwy z oliwek w 2% alkoholu poliwinylowym, 0.01M roztwór NaOH, 0.05M bufor Tris-HCl o pH=8.0, 1% roztwór tymoloftaleiny w etanolu, etanol, aceton.

Składniki pożywek, takie jak bakto pepton, hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy, agar i skrobia pochodziły z firmy Difco. Pozostałe składniki zostały wyprodukowane przez P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne w Gliwicach.

Hodowlę owadów *Galleria mellonella* prowadzono na podłożu o następującym składzie: śruta pszenna 250g, kasza kukurydziana 500g, mąka pszenna 250g, mleko w proszku 250g, drożdże suszone 125g, glicerol 200g, воск 375g, miód 250g.

### 5. 3. Aparatura

#### 5.3.1. Izolacja i identyfikacja neutralnych lipidów grzyba *Zoophthora phyllobii*

Wysokociśnieniową Chromatografię Cieczową (HPLC) z użyciem elucji gradientowej z silikażelowej kolumny (Si 60, dp 10  $\mu\text{m}$ , 250\*8mm) zastosowano do rozdziłu frakcji neutralnych lipidów na poszczególne klasy związków. Przepływ eluentu - 1.5 ml/min; zawór iniekcyjny firmy Knauer z pętlą 20  $\mu\text{l}$ . Gradient po wysokiej stronie ciśnienia był wytwarzany przez dwie pompy Shimadzu LC 6A sterowane przez komputer SCL-6B. Detekcji dokonywano za pomocą uniwersalnego rozpraszającego światła detektora opisanego przez Stolyhwo et al. [1983; 1984]. Detektor ten pozwala na elucję gradientową związków nie absorbujących w zakresie UV (np. lipidy), rozpuszczalnikami

wysoce absorbującymi te promienie. Zastosowano gradient chlorku metylenu w eterze naftowym.

Chromatografię gazową wykonano stosując aparat Varian Aerograph 1400 przystosowany do pracy z kolumną kapilarną o szybkości rozdziału 1:30 dla portu iniekcyjnego i system dostosowujący dla detektora FID. „Make-up” gaz - azot przepływ 30ml/min; gaz nośny - Argon. Kolumny:

- kolumna kapilarna (Si) o długości 10m i średnicy wewnętrznej 0.18 mm pokryta filmem fazy ciekłej RTX-1 o grubości 0.1 $\mu$ m, Restek Corporation;
- kolumna kapilarna (Si) o dł. 15m i śr. wewn. 0.205mm pokryta filmem fazy ciekłej DB-1 o grubości 0.33 $\mu$ m, J & W Scientific;
- kolumna kapilarna (Si) o dł. 30m i śr. wewn. 0.25mm pokryta filmem fazy ciekłej CP SIL 5CB o grubości 0.25 $\mu$ m, Chrompack.

Spektrometria masowa została wykonana na VG 16F Micromass spektrometrze masowym sterowanym przez VG Data System 2000, przy energii jonizacji 70 eV. Próbkki były wprowadzane poprzez chromatograf gazowy wyposażony w kolumny wymienione powyżej dla GC. Gaz nośny - Hel; źródło jonów przechowywane w 270°C; Dla „odcisku palca” próbek przy desorpcji polem oraz uzyskania wysokiej rozdzielczości pomiarów użyto podwójnie zbierającego spektrometru Varian MAT 711. Instrument ten wyposażony był w łączone źródło jonów EI/FI/FD i kalibrowany w zakresie PFK.

Pomiary NMR: widma nmr 1D oraz 2D wykonywano w temperaturze pokojowej za pomocą spektrometru Bruker AMX-500 wyposażonego w system danych X32.

### 5.3.2. Biotransformacje

Chromatografię cienkowarstwową (TLC) prowadzono na płytkach szklanych pokrytych silikazalem (Merck) stosując jako układ rozwijający mieszaninę: heksan-octan etylu (2:1). Płytki detekowano parami jodu.

‘Flash’ chromatografię wykonywano stosując kolumnę o średnicy 30 mm wypełnioną 15 g silikażelu (Si 60, Merck) na 1g mieszaniny produktów. Jako eluent stosowano rosnący gradient octanu etylu w heksanie w następujących proporcjach (každorazowo po 100 ml) (v/v): 0%, 4%, 8%, 15%, 25%, 50%, 100%. Na końcu kolumnę przemywano metanolem.

Półpreparatywną Wysokociśnieniową Chromatografię Cieczową (HPLC) pochodnych kamfolenowych wykonano na aparacie firmy Beckmann z detektorem RI; kolumna - UltrasphereSi, 10\*250mm; eluent - mieszanina heksanu i octanu etylu w stosunku 2:1; przepływ eluentu - 2.4 ml/min; rejestrator BD40 KIPP & ZONEN; szybkość przesuwu papieru 10 mm/min; zawór iniekcyjny Rheodyne z pętlą 200μl.

Do analitycznej chromatografii HPLC związków aromatycznych użyto zestawu 2 pomp 110B ze sterownikiem 420 Controller firmy Beckman z podłączonym integratorem HP 3396 II Series i detektorem UV HP Series 1050. Kolumna Ultrasphere-ODS; 4.6\*250mm; eluent: metanol/woda (80:20); przepływ 1.0 ml/min; detekcja przy  $\lambda = 254\text{nm}$ ; zawór iniekcyjny Beckman z pętlą 20μl.

Kapilarną Chromatografię Gazową przeprowadzano na aparacie HP Gas Chromatograph Series II 5890 z detekcją FID. Zastosowano kolumnę kapilarną o długości 25 m i śr. wewn. 0.2mm; gaz nośny - azot; przepływ  $1\text{cm}^3/\text{min}$ ; gradient temperatury  $100^\circ\text{C}$  -  $-260^\circ\text{C}$  (przyrost  $4^\circ\text{C}/\text{min}$ ).

Widma MS wykonano na spektrometrze HP Mass Selective Detector 5971 A sprzężonym z chromatografem gazowym HP 5890; kolumna HP-1 o długości 12m (dla pochodnych kamfolenowych) oraz 25m (dla połączeń aromatycznych) i śr. wewn. 0.2mm; gaz nośny - He; przepływ  $0.5\text{cm}^3/\text{min}$ ; energia jonizacji - 70 eV. Gradient temperatury dla pochodnych kamfolenowych  $100^\circ\text{C}$  -  $190^\circ\text{C}$  (przyrost  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ ), dla połączeń aromatycznych i analogów hormonów juvenilnych zakres temperatury zmieniano zależnie od substratu :

MDOB:  $130^\circ\text{C}$  -  $290^\circ\text{C}$  (przyrost  $8^\circ\text{C}$ ); TNBB:  $180^\circ\text{C}$  -  $290^\circ\text{C}$  (przyrost  $9^\circ\text{C}$ ); BCB:  $160^\circ\text{C}$  -  $290^\circ\text{C}$  (przyrost  $8^\circ\text{C}$ ); aldehyd 4-chlorobenzoesowy:  $80^\circ\text{C}$  -  $270^\circ\text{C}$  (przyrost  $6^\circ$ );

chlorek 4-nitrobenzylu: 140°C - 290°C (przyrost 10°C).

Widma NMR wykonano na spektrometrach DRX 300 i/lub AM 250 Bruker, przy użyciu  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 7.26$ ) jako standardu wewnętrznego.

Pomiary optycznej rotacji przeprowadzono na polarymetrze JASCO DIP 370. Widma CD zmierzono na spektropolarymetrze JASCO 710.

### 5.3.3. Poszukiwanie metabolitów zaangażowanych w proces infekcji organizmu owada

Analityczną chromatografię HPLC prowadzono przy użyciu systemu LaChrom firmy Merck (pompa L-7100, D-7000 Interface, detektor UV L-7400, termostat L-7360) sterowanego komputerowo za pomocą programu D-7000 HPLC System Manager. Kolumna Econosphere C-18 5 $\mu\text{m}$ ; zawór iniekcyjny Rheodyne z pętlą 20 $\mu\text{l}$ ; temperatura 22°C; przepływ eluentu 1ml/min; detekcja UV  $\lambda = 220\text{nm}$ , eluent: A: 0.1% TFA, B: Acetonitryl/ Woda / TFA w stosunku 70 : 30 : 0.1.

| Czas<br>[min] | %A  | %B  |
|---------------|-----|-----|
| 0.0           | 100 | 0   |
| 10.0          | 100 | 0   |
| 60.0          | 50  | 50  |
| 70.0          | 0   | 100 |
| 90.0          | 0   | 100 |

Przed chromatografią, każdą próbkę poddawano filtracji przez filtr MINISART RC 4 o wielkości por 0.2 $\mu\text{m}$ .

Spektrometrię masową ESI MS (Elektrospray Mass Spectrometry) oraz tandemową spektrometrię MS/MS wykonano na aparacie Finnigan TSQ 700 (ESI +Q1MS). Analizę NMR wykonano na aparacie Bruker DRX300 przy użyciu  $\text{D}_2\text{O}$  jako standardu wewnętrznego.

## 6. METODY

### 6.1. Hodowle głębinowe

Hodowle głębinowe prowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 1000 ml, zawierających po 200 ml pożywki, na wytrząsarce (160 uderzeń na minutę) w temperaturze około 20°C. W celu otrzymania inoculum 2 kolby z podłożem płynnym zaszczepiano ze skosu agarowego. Po upływie kilku dni (zależnie od szybkości wzrostu danego szczepu) większą ilość kolb szczepiono uzyskanym inoculum za pomocą szklanych, wysterylizowanych pipet ze skróconymi końcówkami (4 ml inoculum na kolbę). Glukozę sterylizowano oddzielnie w postaci 50% roztworu i dodawano do kolb z pożywką przed samym szczepieniem.

### 6.2. Neutralne lipidy grzyba *Zoophthora phyllobii*

W celu izolacji metabolitów prowadzono hodowle głębinowe *Zoophthora phyllobii* na pożywce pełnej w sposób opisany w punkcie 6.1. Do zaszczepienia 25 kolb używano siedmio-dniowego inoculum. Świeżo zaszczepione kolby wytrząsano następnie przez 8 dni. Po tym czasie grzybnię odsączano od płynu pohodowlanego i dwukrotnie przepłukiwano wodą destylowaną na lejku Büchnera pod próżnią pompki wodnej (18mm Hg) przez 15 minut. Wilgotną grzybnię poddawano dwukrotnej ekstrakcji, po 150 ml acetonu na 10 g uzyskanej grzybni. Następnie ekstrakty te łączono i odparowywano aceton, otrzymując fazę wodną, którą 3-krotnie ekstrahowano octanem etylu. Grzybnię po ekstrakcji acetonem poddawano także 3-krotnej ekstrakcji octanem etylu. Ekstrakty octanowe łączono, suszono bezwodnym  $MgSO_4$  i odparowywano pod próżnią pompki wodnej. Rozdziału mieszaniny na poszczególne klasy związków, poddawane następnie dokładniejszym analizom (GC i GC/MS), dokonano za pomocą HPLC.



### 6.2.1. Otrzymywanie pochodnych

#### Pochodne sililowe.

Do sililacji steroli, diacylogliceroli i monoacylogliceroli (próbki ok. 1mg) zastosowano ogólną procedurę z użyciem mieszaniny N,O-bis(trimetylosililo)acetamidu (BSA) oraz trimetylochlorosilanu (TMCS) (17:3 v/v) w 100°C przez 15 minut.

#### Pochodne acetylowe steroli.

Próbka steroli (ok. 1mg) była rozpuszczana w mieszaninie bezwodnika octowego i pirydyny (1:1, v/v) a następnie ogrzewana w zatopionej ampułce w 80°C przez 30 minut. Próbkę odparowywano w strumieniu azotu do sucha a pozostałość rozpuszczano w chlorku metylenu w celu poddania analizom GC.

#### Estry metylowe kwasów tłuszczowych.

Do próbki mieszaniny kwasów (ok. 0.2mg) dodawano mieszaninę BF<sub>3</sub> - metanol (14%, w/v), a następnie roztwór ogrzewano w 80°C przez 30 minut.

#### Bezpośrednie przeprowadzenie TAG w estry sililowe kwasów tłuszczowych.

W tym celu przeprowadzano saponifikację triacylogliceroli w metanolowym roztworze KOH, odparowywano alkohol, produkty hydrolizy poddawano sililacji a następnie analizom GC/MS. Próbkę TAG (0.2mg) rozpuszczano w 50 µl 0.5M KOH w metanolu w probówce z teflon-lined septum. Roztwór ogrzewano przez 3 godziny w 70°C. Rozpuszczalnik odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Pozostałość ogrzewano z 40µl BSA i 10µl TMCS w 70°C przez 30 minut. Tak przygotowaną próbkę poddawano bezpośrednio analizie GC/MS [Bruschweiler & Hautfeune, 1990].

### 6.3. Biotransformacje

#### 6.3.1. Biotransformacja związków alkilo- $\alpha$ -kamfolenowych przez szczep *Zoophthora phyllobii*

Do biotransformacji użyto racemicznego ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego (1-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-propan-2-onu) (**1**), racemicznego nitrylu  $\alpha$ -kamfolenowego (1-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-acetonitrylu) (**7**) oraz obu enancjomerów estrów  $\alpha$ -kamfolenowych: (+)(4R)-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-buty-2-enolanu (**11**) i (-)(4S)-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-buty-2-enolanu (**12**). Związki te otrzymano wcześniej w naszym laboratorium [Derdziński et al., 1984; Wawrzeńczyk et al., 1984].

Hodowlę prowadzono na podłożu pełnym w warunkach opisanych w punkcie 5.1.1. W piątym dniu hodowli, w warunkach sterylnych dodawano do kolb po 0.035g odpowiedniego substratu rozpuszczonego w 0.3 ml metanolu (175 mg na 1 litr hodowli) i prowadzono proces biotransformacji na wytrząsarce przez kolejnych 10 dni. Po tym czasie płyn pohodowlany oddzielano od grzybni na lejku Buchnera pod próżnią pompki wodnej i 3-krotnie ekstrahowano chloroformem. Połączone ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem magnezu a następnie odparowywano rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej pod próżnią pompki wodnej. Następnie przeprowadzano chromatografię TLC oraz HPLC w celu stwierdzenia czy zachodzi proces biotransformacji. Uzyskane mieszaniny rozdzielano za pomocą 'flash' chromatografii i łączono we frakcje przy użyciu chromatografii TLC - punkt 5.3. Za pomocą półpreparatywnego HPLC frakcje te dzielono na poszczególne związki o stopniu czystości umożliwiającym ich identyfikację za pomocą analiz GC/MS i NMR.

Analizy spektralne produktów biotransformacji ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego (**1**) przez szczep *Zoophthora phyllobii* (czas retencji i zawartość związków określono na podstawie chromatografii gazowej):

(2, 2') trans-1-(2',2',3'-trimetylo-3',4'-epoksycyklopentan-1'-ylo)-propan-2-on  
(RT=15.5, wydajność 6.3%)

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 0.74 (3H, s, H-8'); 0.98 (3H, s, H-7'); 1.20 (1H, m, H-5'a); 1.31 (3H, s, H-6'); 1.91 (1H, m, H-1'); 2.10 (3H, m, H-3'); 2.10 (1H, m, H-1); 2.10 (1H, m, H-5'b); 2.37 (1H, dd,  $J = 15.3$  i  $3.6$  Hz; H-1'); 3.22 (1H, s, H-4").

MS (70 eV, 295 K)  $m/e$ : 182 ( $M^+$ ), 125(4), 109(16), 97(14), 95(10), 81(12), 70(7), 69(11), 67(6), 55(13), 53(8), 43(100), 41(34), 39(14).

**(3, 3') cis-1-(2',2',3'-trimetylo-3',4'-epoksycyklopentan-1'-ylo)-propan-2-on**

(RT = 17.0, wydajność 4.6).

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 0.96 (3H, s, H-7'); 0.99 (3H, s, H-8'); 1.28 (3H, s, H-6'); 1.54 i 2.06 (oba protony w pozycji C-5'); 2.08 (3H, s, H-3); 2.10 (1H, m, H-1'); 2.58 (2H, m, H-1); 3.25 (1H, s, H-4).

MS (70 eV, 295 K)  $m/e$ : 182 ( $M^+$ ), 141(25), 123(4), 109(14), 97(14), 95(10), 81(12), 70(7), 69(10), 67(6), 55(13), 53(8), 43(100), 41(33), 39(15).

Widma NMR oraz MS epoksydów 2, 2' i 3, 3' były identyczne z otrzymanymi dla tych związków we wcześniejszych badaniach [Urbańczyk et al., 1993].

**(4) 1-(2',2',3'-trimetylo-5'-okso-3'-cyklopenten-1'-ylo)-propan-2-on**

(RT = 19.2, wydajność 28.0%).

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 0.95 (3 H, s, H-8'); 1.26 (3H, s, H-7'); 2.03 (3H, d,  $J = 1.2$  Hz, H-6'); 2.22 (3H, s, H-3); 2.43 (1H, dd,  $J = 13.0$  oraz  $8.5$  Hz, H-1); 2.77 (1H, dd,  $J=8.5$  oraz  $4.7$  Hz, H-1'); 2.92 (1H, dd,  $J = 13.0$  oraz  $4.7$  Hz, H'-1); 5.82 (1H, d  $J = 1.2$  Hz, H-4').

$^{13}\text{C}$  NMR (ppm): 14.3 (C-8'); 23.0 (C-7'); 25.8 (C-6'); 30.1 (C-3); 40.3 (C-1); 45.7 (C-2'); 53.2 (C-1'); 127.5 (C-4'); 184.8 (C-3'); 207.3 (C-2); 208.3 (C-5').

MS (70 eV, 295 K)  $m/e$ : 181 ( $M^+$ ), 165(3), 138(27), 123(72), 109(14), 95(11), 79(15), 67(32), 55(17), 53(13.5), 43(100), 32(5).

CD: minimum przy  $\lambda_{\text{max}} = 314.00$  nm,  $\Delta\epsilon = -0.022$  (etanol)

$[\alpha]_{\text{D}} = +6.9^\circ$  ( $c = 2.50$ ,  $\text{CHCl}_3$ )

**(5) 1-(2',2',3'-trimetylo-3',4'-epoksycyklopentan-1'-ylo)-propan-2-ol**

(RT=17.4; wydajność około 3%)

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 0.75 (3H, s, H-8'); 0.99 (3H, s, H-7'); 1.20 (3H, d,  $J = 6.1$  Hz, H-3); 1.33 (3H, s, H-6'); 3.24 (1H, bs, H-4'); 3.76 (1H, m, H-2).

$^{13}\text{C}$  NMR (ppm): 13.2 (C-8'), 18.7 (C-7'), 20.6 (C-6'), 24.4 (C-3), 32.1 (C-5'), 38.8 (C-1'); 39.2 (C-1), 62.3 (C-4'), 66.4 (C-2), 68.5 (C-3').

MS (70 eV, 295 K) m/e: 166 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ), 151(2), 138(3), 123(13), 111(17), 97(13), 83(16), 69(18), 55(39), 45(44), 43(100), 32(11).

**(6) 1-(2',2'-dimetylo-3'-hydroksymetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-propan-2-on**

(RT = 23.6; wydajność śladowa).

MS (70 eV, 295 K) m/e: 178 ( $\text{M}^+$ ) (0.2), 164(4), 148(4), 102(100), 91(70), 77(16), 65(38), 51(16), 39(22), 31(7).

Analizy spektralne produktów biotransformacji nitrylu  $\alpha$ -kamfolenowego (7):

**(8, 8') trans-1-(2',2',3'-trimetylo-3',4'-epoksycyklopentan-1'-ylo)-acetonitryl**

(RT = 8.8; wydajność 20.5%)

MS (70 eV, 295 K) m/e: 165 ( $\text{M}^+$ ), 150(37), 125(64)109(37), 69(31), 55(52), 43(100).

**(9, 9') cis-1-(2',2',3'-trimetylo-3',4'-epoksycyklopentan-1'-ylo)-acetonitryl**

(RT = 8.92; wydajność 12.1%)

MS (70 eV, 295 K) m/e: 165 ( $\text{M}^+$ ), 150(38), 125(65), 109(38), 69(31), 55(51), 43(100).

Z powodu bardzo podobnych czasów retencji nie rozdzielono izomerów cis oraz trans i analizę NMR przeprowadzono na mieszaninie związków: **8, 8', 9, 9'**:

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 0.82 i 1.00 (3H każdy, s, H-8'); 1.04 i 1.08 (3H każdy, s, H-7'); 1.29 i 1.32 (3H każdy, s, H-6'); 3.28 i 3.24 (1H każda, bs, H-4').

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , wewn., ppm): 39.4 i 42.2 (C-2); 41.0 i 42.4 (C-2'); 61.3 i 63.3 (C-4'); 68.5 i 70.0 (C-3'); 118.9 i 120.3 (C-1); inne wartości: 127, 12, 12.9, 16.8, 17.6, 18.3, 20.5, 22.7, 26.4, 30.3, 31.7.

**(10) 1-(2',2',3'-trimetylo-5'-okso-3'-cyklopenten-1'-ylo)-acetonitryl**

(RT = 10.18, wydajność 22.8%)

$^1\text{H}$  NMR (ppm): 1.19 (3H, s, H-8'); 1.37 (3H, s, H-7'); 2.07 (3H, d,  $J = 1.3$  Hz, H-6'); 2.23 (1H, dd,  $J = 17.2$  i 11.5 Hz, H-1a); 2.47 (1H, dd,  $J = 11.5$  i 3.6 Hz, H-1'); 2.90 (1H, dd,  $J = 17.2$  i 3.6 Hz, H-1b); 5.85 (1H, q,  $J = 1.3$  Hz, H-4').

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , wewn., ppm): 13.6 (C-2); 14.3 (C-8'); 22.7 (C-7'); 25.3 (C-6'); 45.6 (C-2'); 53.5 (C-1'); 118.8 (C-1); 127.1 (C-4'); 184.8 (C-3'); 204.0 (C-5').

IR (cm<sup>-1</sup>): 3491, 2969, 2448, 1702, 1616, 1434, 1265, 1170, 1111, 852.

MS (70 eV, 295 K) m/e: 163 (M<sup>+</sup>), 148(100), 123(36), 95(71), 67(43), 53(31), 39(73).

CD: minimum przy  $\lambda_{\max} = 310.80$  nm,  $\Delta\epsilon = -0.191$  (etanol)

$[\alpha]_D = +33.1^\circ$  (c = 4.50, CHCl<sub>3</sub>).

### 6.3.2. Biotransformacja ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego przez szczep *Paecilomyces* sp. nr kat. 2430a1

Biotransformację ketonu metylo- $\alpha$ -kamfolenowego za pomocą grzyba *Paecilomyces* sp. 2430 przeprowadzono na pożywce pełnej w sposób opisany dla *Zoophthora phyllobii*. Jedynie dodanie substratu nastąpiło już 4 dnia hodowli z powodu szybszego wzrostu tego grzyba w porównaniu do *Zoophthora*. Surowy ekstrakt chloroformowy poddano analizom TLC, HPLC, GC oraz GC/MS.

Analizy spektralne:

#### (1) (1-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopenten-1'-ylo)-propan-2-onu)

GC( 80/4/260): RT= 10.1; pozostałość nieprzereagowana - 2.5%

MS (70 eV) m/e: 164 (M<sup>+</sup>), 149(48), 121(100), 105(42), 91(46), 55(13), 43(76).

#### (3, 3') cis-1-(2',2',3'-trimetylo-3',4'-epoksycyklopentan-1'-ylo)-propan-2-on

GC( 80/4/260): RT = 17.3; wydajność 3.2%

MS (70 eV) m/e: 167(1.5), 141(7), 123(7.5), 109(25), 97(28), 81(13), 69(10), 55(10.5), 43(100).

#### (4) 1-(2',2',3'-trimetylo-5'-okso-3'-cyklopenten-1'-ylo)-propan-2-on

GC( 80/4/260): RT = 20.2; zawartość w mieszaninie produktów - 23.2%

MS (70 eV) m/e: 180(1.5), 165(4), 137(40), 123(100), 109(13), 95(10), 77(11), 67(21), 55(10.5), 43(72), 41(16), 39(22).

#### (13) związek niezidentyfikowany

GC( 80/4/260): RT = 15.0; wydajność- 7.0%

MS (70 eV) m/e: 182(27), 167(25), 149(11), 123(43), 99(41), 97(32), 83(31), 69(25), 55(16), 43(100).

### 6.3.3. Biotransformacje analogów hormonów juwenilnych owadów oraz związków aromatycznych przez *Paecilomyces sp.* nr kat. 2428d

Biotransformację z użyciem szczepu *Paecilomyces sp.* 2428d przeprowadzono na pożywce nieorganicznej. Substraty w ilości po 100mg na kolbę (rozpuszczone w 3 ml etanolu) dodawano 6 dnia hodowli. Po kolejnych 10 dniach przerywano hodowlę. Przeprowadzano ekstrakcję octanem etylu i analizy HPLC, GC i GC/MS otrzymanego ekstraktu.

Dane spektralne substratów i otrzymanych produktów:

#### (14) (RS)-4-metylo-1-(3,7-dimetylo-6-oktenylooksy)benzen (MDOB)

RT = 13.1; pozostałość nieprzereagowana - 2.2%

MS (70 eV) m/e: 246(M<sup>+</sup>; 4.5), 161(1.5), 121(7.5), 108(100), 91(31), 77(37), 69(60), 55(31), 41(87).

#### (15) (RS)-4-hydroksymetyleno-1-(3,7-dimetylo-oktenylooksy)benzen

RT = 13.4; zawartość w mieszaninie produktów - 1.21%

MS (70 eV) m/e: 258(1.5), 151(9), 137(28), 121(60), 108(100), 91(85), 79(82), 89(72), 69(27), 66(34), 55(27), 53(42), 43(30), 41(49), 39(36).

#### (16) (RS)-4-hydroksymetyleno-1-(3,7-dimetylo-7-hydroksyoktanylooksy)benzen

RT = 17.2; wydajność - 7.9%

MS (70 eV) m/e: 280(3), 222(1.5), 155(3), 108(100), 91(22), 77(28), 59(85), 43(50), 41(36), 31(25).

#### (17) (RS)-4-metylo-1-(3,7-dimetylo-6-keto-oktanylooksy)benzen

RT = 14.8; wydajność śladowa

MS (70 eV) m/e: 262(1.5), 213(1.5), 181(1.5), 171(3), 155(19), 129(7.5), 108(46), 101(16), 91(25), 88(30), 77(15), 71(49), 55(43), 43(100).

#### (18) 4-metylofenol

RT = 3.6 ; wydajność - 3.6%

MS (70 eV) m/e: 107(100), 90(7.5), 79(34), 77(52), 51(33), 39(30).

#### (19) (2E)-(R)-(+)-benzylo-4-(2,2,3-trimetylo-3-cyklopentenylo)buty-2-enolan (BCB)

RT = 14.1; pozostałość nieprzereagowana - 1.1%

MS (70 eV) m/e: 193(6), 175(2), 147(3), 107(10), 91(100), 79(24), 65(13), 41(9).

**(20) alkohol benzyłowy**

RT = 2.8; wydajność 4.0%

MS (70 eV) m/e: 108(33), 91(18), 79(100), 51(65), 39(40), 31(25).

**(21) eter p-nitrofenylo-3-metylo-4-(2',2',3'-trimetylo-3'-cyklopentenylo)-buten-2-ylowy (TNBB)**

RT = 14.7; pozostałość po biotransformacji - 0%

MS (79 eV) m/e: 270(0.6), 177(24), 139(10), 135(42), 121(80), 109(100), 93(51), 79(36),  
67(37), 55(41).

**(22) aldehyd 4-chlorobenzoesowy**

RT = 8.5; pozostałość nieprzereagowana - 0%

MS (70 eV) m/e: 139(100), 111(53), 85(3.5), 75(25), 50(20).

**(23) alkohol 4-chlorobenzylometyłowy**

RT = 12.1; wydajność - 27.5%

MS (70 eV) m/e: 142(65), 113(19), 107(70), 79(69), 77(100), 51(21), 43(21), 31(8).

**(24) kwas 4-chlorobenzoesowy**

RT = 15.7; wydajność - 17.6%

MS (70 eV) m/e: 158(25), 156(77), 139(100), 113(105), 111(42), 75(24), 50(15).

**(25) chlorek 4-nitrobenzylu**

RT = 6.6; pozostałość nieprzereagowana - 67.6%

MS (70 eV) m/e: 171(50.5), 136(73), 125(43), 89(100), 77(46), 63(67), 51(26), 30(44).

**(26) 1-hidroksymetylo-4-nitrobenzen**

RT = 7.7; wydajność - 10.6%

MS (70 eV) m/e: 153(22), 136(14), 107(79), 89(39), 77(100), 51(27), 30(39).

**(27) 1-metylo-4-nitrobenzen**

RT = 3.96; wydajność - 2.6%

MS (70 eV) m/e: 137(80.5), 107(40), 91(100), 77(27), 65(73), 51(13), 30(38).

### 6.3.3.1. Wpływ ksenobiotyków na wzrost szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d

W celu sprawdzenia wpływu danego ksenobiotyku na wzrost grzyba, dodawano go do dwóch kolb pierwszego dnia a do dwóch innych siódmego dnia hodowli (100mg/kolbę). W obu przypadkach - 14 dnia odsączano i suszono, a następnie ważono grzybnię, jednocześnie mierząc pH płynu pohodowlanego. Jako kontrolę stosowano masę grzybni i pH płynu pohodowlanego po 14 dniach hodowli grzyba bez dodatku ksenobiotyku. Wyniki przedstawiono w Tabeli 16.

## 6.4. Analiza metabolitów

### 6.4.1. Testy biologiczne

Do testów biologicznych pobierano próbki płynu pohodowlanego z hodowli płynnych prowadzonych z zachowaniem powtarzalności warunków na pożywce pełnej w przypadku *Zoophthora neoaphidis* a na nieorganicznej w przypadku grzybów z rodzaju *Paecilomyces*.

Kolby szczepiono siedmio- (*Paecilomyces*) lub czternasto- (*Zoophthora*) dniowym inoculum. W wybranych dniach hodowli pobierano sterylnie próbki po 20 ml płynu pohodowlanego. Kilkakrotnie przerywano hodowlę całej kolby w celu zważenia masy grzybni.

Do zbadania wpływu metabolitów wydzielanych do pożywki w trakcie rozwoju grzyba na larwy *G. mellonella* zastosowano metodę iniekcijną [Mollier *et al.*, 1994; Yendol *et al.*, 1968]. Podczas wstępnych prób, stwierdzono, że woda lub pożywka w objętości nie przekraczającej 25µl nie powoduje znaczących negatywnych efektów. Sama pożywka (25µl) tylko sporadycznie zabijała larwy po 72 godz. od momentu jej wstrzyknięcia. Nie zaobserwowano większego wpływu stadium rozwoju larw na działanie płynu pohodowlanego. W związku z tym do dalszych badań wybrano larwy znajdujące się w 7 stadium larwalnym jako większe i z tego powodu łatwiejsze do wykonania iniekcji. Do iniekcji używałam insulinówek o pojemności 1ml (1kreska = 25µl). Każdą próbkę płynu odsączonego od grzybni i dodatkowo przefiltrowanego przez filtr 0.2 µm wstrzykiwano 10



larwom, które następnie umieszczano na szalce Petri'ego z odpowiednią ilością pokarmu. Jako kontrolę na osobnej szalce umieszczano 10 larw, którym wstrzykiwano taką samą objętość (25µl) pożywki. Co 24 godziny liczono ilość nieżywych larw po wstrzyknięciu próbki i kontroli.

Larwy *G. mellonella* hodowano metodą Sehnala [1966], a limfę z nich uzyskiwano na podstawie metody opisanej przez Ożyhara i współpracowników [Ożyhar *et al.*, 1983], lecz przeprowadzonej z dużymi uproszczeniami wynikającymi z zastosowania hemolimfy jedynie jako składnika pożywki.

#### 6.4.2. Analizy HPLC

Z uwagi na bardzo niskie stężenia metabolitów grzyba w płynie pohodowlanym, do analizy chromatograficznej konieczne było jego 10-krotne zagęszczenie. W tym celu 3 ml odsączonego płynu pohodowlanego odparowywano do sucha na wyparce rotacyjnej w 35°C, a pozostałość (zwykle ok. 0.5 mg) rozpuszczano w 300 µl 0.1% TFA, będącego wyjściowym eluentem w HPLC.

#### 6.4.3. Testy enzymatyczne

Aktywność proteolityczną, chitynolityczną i amylolityczną płynu pohodowlanego w poszczególnych dniach hodowli badano na płytkach Petri'ego zawierających po 25ml odpowiedniego podłoża. Po 200µl płynu wlewano do cylinderków i po inkubacji mierzono strefę hydrolizy. Ponieważ celem było sprawdzenie zmian aktywności enzymatycznej w trakcie wzrostu grzyba konieczne było zmodyfikowanie znanych metod - na podłoża nie przeszczepiano grzyba, tylko do cylinderków wlewano płyn pohodowlany, w związku z czym skrócono czas inkubacji (nie trzeba było czekać aż wyrośnie grzyb a przy dłuższym okresie inkubacji płytki ulegały zakażeniu).

W przypadku **aktywności proteolitycznej** [Waksman, 1961] płytki inkubowano przez 3 dni w 20°C a następnie zalewano je 3% roztworem kwasu trójchlorooctowego i mierzono strefę hydrolizy.

**Aktywność amylolityczną** badano na podłożu Gause I [Waksman, 1961; Mordarski et al., 1970] Po 3 dniach inkubacji w 20°C zalewano je 7 ml płynu Lugola. Po dziesięciu minutach roztwór usuwano i obserwowano, czy występuje strefa hydrolizy.

**Aktywność chitynolityczną** badano według metody Wiliamsa i Robinsona [1981]. Jako substrat zastosowano koloidalną chitynę otrzymaną w sposób zaproponowany przez Price'a i Storck'a [1975] oraz Hsu i Lockwood'a [1975]. 5g chityny (Sigma, practical grade) rozpuszczono w stężonym kwasie solnym (1g/100ml; mieszanie 45 minut), a następnie wytrącono biały osad (chitynę koloidalną) przesączając roztwór przez watę szklaną do wody destylowanej (1 litr). Zneutralizowany przy pomocy 4 N NaOH (do pH 6-7), roztwór odwirowano (3000 obr/min, 20 minut), uzyskując biały osad, który pięciokrotnie przemyto wodą destylowaną. Po 48 godzinach suszenia w temperaturze 60°C uzyskano 2.1g koloidalnej chityny, która była składnikiem podłoża do testu na aktywność chitynolityczną. Po 3 dniach inkubacji w 20°C obserwowano, czy nastąpiła hydroliza.

**Aktywność lipolityczną** mierzono metodą miareczkową [Liu *et al.*, 1972]. Metodę tę zmodyfikowano w ten sposób, że uwolnione kwasy tłuszczowe miareczkowano 0.01M zamiast 0.05M roztworem NaOH w obecności wskaźnika – tymoloftaleiny ( w celu zwiększenia dokładności metody).

1 ml płynu pohodowlanego dodawano do probówek zawierających 2.5 ml emulsji oliwy z oliwek i 2ml 0.05M buforu Tris-HCl. Do próby kontrolnej zamiast płynu pohodowlanego dodawano 1 ml buforu. Próby inkubowano w temp. 30°C przez 30 minut. Następnie zawartość każdej próbki przelewano do kolby Erlenmayera zawierającej 20 ml mieszaniny alkohol: aceton (1:1), dodawano 4 krople roztworu tymoloftaleiny i miareczkowano roztworem NaOH do wystąpienia niebieskiej barwy. Od objętości roztworu NaOH potrzebnego do zmiareczkowania próby właściwej odejmowano objętość NaOH zużytego do zmiareczkowania próby kontrolnej. Za jednostkę aktywności enzymu przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu powoduje uwolnienie 1  $\mu$ mola kwasu tłuszczowego.

#### **6.4.4. Próba izolacji peptydu peptaibolowego z płynu po hodowli szczepu *Paecilomyces* sp. 2428d**

Próbie izolacji przeprowadzono na wzór izolacji peptaibolowego antybiotyku z *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto [Becker *et al.*, 1997]. Płyn po 14 dniach hodowli (1.7 l) przepuszczono przez kolumnę o wymiarach 25\*300 mm wypełnioną niepolarnym adsorbentem - Amberlite XAD-4 (Fluka, wielkość cząsteczek 20-50µm). Wypełnienie przemyto wodą (300ml) i 40% metanolem (150ml), a następnie zaadsorbowane związki eluowano rosnącym od 40% do 100% gradientem metanolu w wodzie (co 5% po 50ml każdego stężenia) uzyskując 13 frakcji. Najlepsze efekty przyniosło przeprowadzenie chromatografii TLC w eluencie o składzie: n-butanol/kwas octowy/woda (4:1:5) i spryskanie roztworem ninhydryny. Przeprowadzono ESI MS frakcji: 40, 60, 80 i 100% metanol.

## 7. LITERATURA

**Al-Aidroos and Roberts, 1987**

Mutants of *Metarhizium anisopliae* with increased virulence toward mosquito larvae

Canadian Journal of Genetic Cytology, 20: 211.

**Aldridge D.C. and Turner W.B., 1969**

Structures of Cytochalasins C and D.

J. Chem. Soc. (C), 923-928.

**Allen G.E., 1980**

Integrated pest management: A special issue.

Bioscience, 30: 655-701.

**Bałaży S., 1993**

*Entomophthorales* (Owodomorkowe). W: Fungi (Mycota) Vol. XXIV Flora polska (A. Skirgiełło Ed.) P.A.N Kraków, str.: 175 i 199.

**Bałaży S., Miętkiewski R. i Majchrowicz I., 1990**

Mikozy mszyc – ich znaczenie i perspektywy wykorzystania w ochronie roślin.

Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 392: 35-56.

**Batko A., 1974**

Filogeneza a struktury taksonomiczne *Entomophthoraceae*. W 'Ewolucja biologiczna, szkice teoretyczne i metodologiczne'. (C. Niwiński, Ed.), P.A.N Wrocław, str.: 209-306.

**Becker D., Kiess M. and Bruckner H., 1997**

Structures of Peptaboil Antibiotics Hypomurocin A and B from the Ascomycetous Fungus *Hypocrea muroiana* Hino et Katsumoto.

Liebigs Ann./Recueil, 767-772.

**Bell J., 1977**

Mycoses. W 'Insect Diseases' Vol. 1

G. Cantwell, ed. New York: Marcel Dekker

**Boczek J., 1992**

Niechemiczne metody zwalczania szkodników roślin.

Wydawnictwo SGGW, Warszawa

**Brooks C.J.W., Horning E.C. and Young J.S., 1968**

Characterization of sterols by gas chromatography-mass spectrometry of the trimethylsilyl ethers.

Lipids, 3: 391-402.

**Bruschweiler H. and Hautfeune A., 1990**

Determination of the ester-emulsifiers components content after hydrolysis and silylation by gas chromatography.

Pure and Appl. Chem., 62: 781-793.

**Brückner H., Maisch J., Reinecke C. and Kimonyo A., 1991**

Use of  $\alpha$ -aminoisobutyric acid and isovaline as marker amino acids for the detection of fungal polypeptide antibiotics.

Amino Acids, 1: 251-257.

**Claydon N., 1978**

Insecticidal secondary Metabolites from Entomogenous Fungi: *Entomophthora virulenta*.

J. Invertebrate Pathology, 32:319-324.

**Claydon N. and Grove J.F., 1978**

Metabolic Products of *Entomophthora virulenta*.

J. Invertebrate Pathology, 32(3): 312-324.

**Christie W.W., 1985**

Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection.

J. Lipid Res., 26: 507-512.

**Curstedt T., 1974**

Mass spectra of trimethylsilyl ethers of deuterium-labelled mono- and diglycerides.

Biochim. Biophys. Acta, 360:12-23.

**Demain A., 1986**

Regulation of secondary metabolism in fungi

Pure & Appl. Chem., 58(2): 219-226.

**Derdziński K., Wawrzeńczyk C. and Zabza A., 1984**

Insect growth regulators. 3. Juvenoids with cyclopentane ring. Synthesis of alkyl w-(2,2,3-trimetyl-cyklopent-3-en-1-yl)- 2-alkeno-ates and w-(2,2,3-trimetyl-cyklopent-3-en-1-yl)-alkyl phenyl ethers.

J. prakt. Chem., 326: 196-212.

**Dmochowska-Gładysz J., Kołek T., Siewiński A., Derdziński K., Zabza A., Galera E. and Walkowiak U., 1987**

The ability of *Aphanocladium album* and *Rhodotorula mucilaginosa* to transform some compounds of juvenoid type.

J. Basic Microbiol., 27: 489-496.

**Dmochowska-Gładysz J., Kołek T., Siewiński A., Zabza A. and Nespiak A., 1986**

Introduction of oxygen function into isoprenoid systems by means of *Botrytis cinerea* (Persoon).

J. Basic Microbiol., 26: 577-585.

**Draczyńska B., Cagara C., Siewiński A., Rymkiewicz A., Zabza A. and Leufven A., 1985**

Biotransformations of pinenes. XVII. Transformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinenes by means of *Armillariella mellea* (honey fungus), a parasite of woodlands.

J. Basic Microbiol., 25:487-492.

**Fabre-Joneau M., Barand B.J. and Cassagne C., 1969**

C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D 268:2282.

**Fargues J., 1984**

Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity.

W ' Infection Processes of Fungi, A Bellagio Conference', D.W. Roberts and J.R. Aist, eds. New York: The Rockefeller Foundation.

**Fargues J. and Roberts P.H., 1986**

Potential insecticides des destoxines, mycotoxines produites par l'hyphomycete entomopathogene, *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sor. C. R. 4ieme Congres sur la Protection de la Sante Humaine et des Cultures en Milieu Tropical, June 2-4, 1986, Marseille, 357-362.

**Fau M.Z. and Li Z.Z., 1994**

2 new pathogens of dipteraen insects.  
Mycotaxon, 50: 307-314.

**Ferron P., 1978**

Biological control of insect pests by entomogenous fungi.  
Annual Review of Entomology, 23: 409.

**Fuxa J.R., 1987**

Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM.  
Annual Review of Entomology, 32: 225-251.

**Frisvad J.C., Filtenborg O. and Thrane U., 1989**

Analysis and Screening for Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Fungal Cultures by Thin-Layer Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography.  
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18: 331-335.

**Greb-Markiewicz B., Piątkowski J., Zabza A., 1994**

Laboratory culture media of selected entomopathogenic fungi of *Zoophthora* genus.  
Materiały Konferencyjne: 'The second joint polish-indo seminar on bilateral cooperation in biotechnology.' Poznań, str.: 73-76.

**Greb-Markiewicz B., Zabza A., Szafranek B., Szafranek J., Maliński E., Synak E. and Cimino G., 1998**

Neutral metabolites of fungus *Zoophthora* (*Neopandora*) *phyllobii*.  
IOBC/WPRS, Vol. 21(4): 97-100.

**Gupta S.C., Leathers T.D., El-Sayed G.N. and Ignoffo C.M., 1991**

Production of Degradative Enzymes by *Metarhizium anisopliae* during Growth on Defined Media and Insect Cuticle.

Experimental Mycology, 15: 310-31.

**Gupta S.C., Leathers T.D., El-Sayed G.N. and Ignoffo C.M., 1992**

Insect Cuticle-Degrading Enzymes from the Entomogenous Fungus *Beauveria bassiana*.

Experimental Mycology, 16:132-137.

**Gupta S.C., Leathers T.D., El-Sayed G.N. and Ignoffo C.M., 1993**

Purification and Characterization of Trypsin from an Entomopathogen, *Nomuraea riley* NRRL 13755.

Current Microbiology, 27: 103-107.

**Hamill R.L., Higgins C.E., Boaz M.E. and Gorman M., 1969**

The Structure of Beauvericin, a new Depsipeptide Antibiotic Toxic to *Artemia salina*.

Tetrahedron Letters, 49:4255.

**Heinze S., Ritzau m., Ihn W., Hülsmann H., Schlegel B., Dornberger K., Fleck W.F.,**

**Zerlin M., Christner C., Gräfe U., Küllertz G. and Fischer G., 1997**

Lipohexin, a new inhibitor of Prolyl Endopeptidase from *Moeszia lindtneri* (HKI-0054) and *Paecilomyces sp.* (HKI-0055; HKI-0096).

Journal of Antibiotics, 50(5): 379-383.

**Hoffmann and Frodsham, 1993**

Natural Enemies of Vegetable Insect Pests.

Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63 pp.

**Hoy M.A. and Herzog D.G. 1985**

'Biological Control in Agricultural IPM Systems'. Orlando, Fla.: Academic Press.

**Humber R. A., 1984**

The identity of Entomophaga species (*Entomophthorales: Entomophthoraceae*) attacking *Lepidoptera*.

Mycotaxon, 21: 265 – 272.

**Hsu S.C. and Lockwood J.L., 1975**

Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil.



- Appl. Microbiol., 29(3): 422-425.
- Itoh T., Tani H., Fukushima K., Tamura T. and Matsumoto T., 1982**  
Structure-retention relationship of sterols and triterpene alcohols in gas chromatography on a glass capillary column.  
J. Chromatogr., 265: 1-18.
- Jaworska M., Ropek D., 1998**  
Fungi and nematodes interaction against *S. lineatus*.  
IOBC/WPRS Bulletin, Vol. 21(4): 113-116.
- Kenneth R., Wallis G., Gerson U. and Plant H.N. 1972**  
Observation and experiments on *Triplosporium floridanum* (Entomophthorales) attacking spider mites in Israel.  
J. Invert. Pathol., 19:366.
- King D.S. and Humber R.A., 1981**  
Identification of *Entomophthorales*. In Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980, H.D. Burges ed., London
- Krueger S.R., Villani M.G., Martins A.S. and Roberts D.W., 1992**  
Efficacy of Soil Applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin Conidia, and Standard and Lyophilized Mycelial Particles against Scarab Grubs.  
J. Invertebrate Pathology, 59: 54-60.
- Kucera M., 1980**  
Protease from the fungus *Metarhizium anisopliae* toxic for *Galleria mellonella* larvae.  
J. Invertebrate Pathology, 35: 304-310.
- Liu W.H., Beppu T. and Arima K., 1972**  
Cultural conditions and some properties of the lipase of *Humicola lanuginosa* S-38.  
Agric. Biol. Chem., 36(11): 1919-1924.
- Lomer C.J., Bateman R.P., Godonou I. Kpindou D., Shah P.A., Paraiso A. and MacLeod D.M. 1963**  
Entomophthorales infections. W., Insect Pathology: An Advanced Treatise.  
Steinhaus ed. New York Academic Press, pp 189-231.

**Lösel D. M., 1988**

Fungal lipids, w 'Microbial lipids C. Ratledge & S.C. Willinson (Eds.), Vol. 1.  
Academic Press. London, str.: 793.

**MacLeod D. M., 1963**

Entomophthorales infections. W: 'Insect Pathology: An Advanced Treatise, Vol. 2  
Steinhaus ed. New York: Academic Press

**Mazet I., Hung S.Y. and Boucias D.G., 1994**

Detection of toxic metabolites in the hemolymph of *Beauveria bassiana* infected  
*Sodoptera exigua* larvae.  
Experientia, 50: 142-147.

**Mazet I. and Vey A., 1995**

Hirsutellin A a toxic protein produced in vitro by *Hirsutella thompsonii*.  
Microbiology, 141:1343-1348.

**Metcalf L. 1980**

Changing roles of insecticides in crop protection.  
Annual Review of Entomology, 25: 219-256.

**Mikami M., 1984**

Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Pecilomyces lilanus* and their  
possible role in fungal infection.  
Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A], 257(2): 275-283.

**Millstein J.A., Brown G.C. and Nordin G.L., 1983**

Microclimatic moisture and conidial production in *Erynia* sp.: In vivo moisture  
balance and conidiation phenology.  
Environmental Entomology, 12: 1339.

**Milner R.J, Soper R.S., Lutton G.G., 1982**

'Field release of an Israeli strain of the fungus *Zoophthora radicans*(Brefeld) Batko  
for biological control of *Therioaphis trifoli* (Monell) f. *maculata*.'  
Journal of the Australian Entomological Society, 21:113.

**Mollier P., Lagnel J., Fournet B., Aioun A. and Riba G., 1994**

A Glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*.

J. of Insect Pathol., 64: 200-207.

**Müller E. i Loeffler W., 1987**

Zarys mikologii.

PWRiL, Warszawa, str. 344

**Myher J.J., Kuksis A., Marai L. and Yeung S.K.F., 1978**

Microdetermination of molecular species of oligo- and polyunsaturated diacylglycerols by gas chromatography – mass spectrometry of their tert-butyl dimethylsilyl ethers.

Anal. Chem., 50:557-561.

**Nielsen-LeRoux C., 1998**

Resistance to microbial insecticides: will it only be a problem for bacterial larvicides?

IOBC/WPRS Bulletin, Vol. 21(4): 17-20.

**Nevill A.C., 1975**

Biology of the Arthropod Cuticle.

Springer-Verlag KG, Berlin, str.: 71-123.

**Ożyhar A., Wiśniewski J.R., Sehnal F and Kochman M., 1983**

Age dependent changes in the binding and hydrolysis of juvenile hormone in the haemolymph of last instar larvae of *Galleria mellonella*.

Insect Biochem., 13(4): 435-441.

**Pawlaczyk-Szpilowa M., 1997**

Biologia i ekologia.

Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej

**Paterson R.R.M., Simmons M.S.J. and Bealey W.M., 1987**

Mycopesticidal Effects of Characterized Extracts of *Penicillium* Isolates and Purified Secondary Metabolites (Including Mycotoxins) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptora littoralis*.

- J. Invert. Pathol., 50: 124-133.
- Pell J.K., MacCaulay E.D.M. and Wilding N., 1993**  
Biocontrol Sci. Technol., 3: 315-320.
- Pereira R.M and Roberts D.W., 1990**  
Dry Mycelium Preparations of Entomopathogenic Fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*.  
J. Invertebr. Pathol., 56: 39-46.
- Pereira R.M and Roberts D.W., 1991**  
Alginate and Cornstarch Mycelial Formulations of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.  
J. econ. Entomol., 84: 1657-1661.
- Perry D.F. and Latge J.P., 1982**  
Dormancy and germination of *Conidiobulus obscurus* azygospores.  
Transactions of the British Mycological Society, 78:221.
- Piątkowski J., Zabża A., Rokomińska M. and Greb-Markiewicz B., 1998**  
Antibacterial activity of metabolites produced by *Zoophthora neoaphidis* under stress conditions.  
IOBC/WPRS Bulletin, Vol. 21(4): 135-138.
- Price J.S. and Storck R., 1975**  
Production, purification and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*.  
J. Bacteriol., 124(3): 1574-1584.
- Prior A., 1993**  
Biocontrol Sci. Technol., 3: 337-346.
- Prior C., Jollands P. and Le Patourel G., 1988**  
Infectivity of Oil and Water Formulations of *Beauveria bassiana* (deuteromycotina: Hyphomycetes) to the Cocoa Weevil Pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae).  
J. Invert. Pathol., 52:66-72.

**Reinecke P., Andersch W., Stenzel K. and Hartwig J., 1990**

Proceedings, Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases, 49-54.

**Roberts D.W., 1981**

Toxins of entomopathogenic fungi. W 'Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980' H.D. Burges, Ed. Academic Press, London 441-465.

**Roberts D.W. and Humber A.S., 1981**

Entomogenous fungi. W 'Biology of Conidial Fungi', G.T. Cole and B. Kendrick, eds. New York: Academic Press

**Scheunert I., 1992**

Transformation and Degradation of Pesticides in Soil. W 'Chemistry of Plant protection' część 8 - Terrestrial Behavior of Pesticides, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str.: 23 – 75.

**Sehnal F., 1966**

Kritisches Studium der Bionomic und Biometrik der in verschiedenen Lebensbedinungen gezuchteten Wachsmotte, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). Z. Wiss. Zool., 174:53-82.

**Siewiński A., Dmochowska-Gładysz J., Kołek T., Zabża A. and Derdziński K., 1979**

Microbiological transformations. XII. Microbiological reduction of racemic 1-(2',2'3,'-trimethyl-cyclopent-3'-en-1'-yl)-propan-2-one and 1-(2',2'3,'-trimethyl-cyclopent-3'-en-1'-yl)-butan-2-one by *Rhodotorula mucilaginosa*. Tetrahedron, 35:1409-1414.

**Siewiński A., Dmochowska-Gładysz J., Kołek T., Zabża A., Derdziński K and Nespiak A., 1983**

Microbiological transformations. XV. Microbiological transformatio of 1-(2,2,3,-trimethyl-cyclopent-3-en-yl)-propan-2-one and their homologues by *Acremonium roseum* s.s. Gams 1971. Tetrahedron, 39:2265-2270.

**Snatzke G., 1970**

Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry Heyden & Son LTD, London, str.: 202-216.

**Soper R., Shimazu M., Humber R.A., Ramos M E. and Hajek A.E., 1984**

Isolation and Characterization of *Entomophaga maimaiga* sp. nov., a Fungal Pathogen of Gypsy Moth, *Lymantria dispar*, from Japan  
J. of Invertebrate Pathology, 51: 229-241.

**Stolyhwo A., Colin H. and Guiochon G., 1983**

Use of light scattering detector principle in liquid chromatography.  
J. Chromatogr., 265: 1-18.

**Stolyhwo A., Colin H., Martin M. and Guiochon G., 1984**

Study of the qualitative and quantitative properties of the light scattering detector.  
J. Chromatogr., 188: 253-275.

**Strasser H., Abendstein D., Stuppner H. and Schinner F., 1998**

Detection of primary and secondary metabolites excreted by *Beauveria brongniartii*.  
IOBC/WPES Bulletin, Vol. 21 (4): 61-66.

**Suzuki A., Kanaoka M., Isogai A., Murakoshi S., Ichinoe M. and Tamura S., 1977**

Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*.  
Tetrahedron Letters, 25: 2167-2170.

**Tempst P., Hood L.E. and Kent S.B.H., 1987**

Practical High Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides.  
Modern Methods of Plant Analysis. Nowa Seria Vol.5 (Linskens & J.F.Jackson Ed.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1987.

**Tyrrel D. and MacLeod D.M., 1972**

Spontaneous formation of protoplasts by a species of *Entomophthora*.  
Journal of Invertebrate Pathology, 19:354.

**Urbańczyk M.J., Sołoducho J., Zabża A., Sodano G. and Grassi A., 1993**

Introduction of oxygen function into isoprenoid systems by means of *Zoophthora* (*Erynia*) *ovispora* (Nowakowski) Batko.  
J. Basic Mikrobiol, 33:141-146.

**Urbańczyk M.J., Zabża A., Cichacz Z., Cimino G. and Szafranek J., 1992**

Neutral lipids of the fungus *Zoophthora* (*Erynia*) *ovispora* (Nowakowski) Batko.

J. Basic Microbiol., 32: 347-353.

**Urbańczyk M.J., Zabża A., Peczyńska-Czoch W. and Bałazy S., 1992**

Laboratory culture media and enzyme activity of some entomopathogenic fungi of *Zoophthora* (Zygomycetes: Entomophthoraceae).

J. Invert. Pathol., 59: 250-257.

**Vey A., 1998**

Researches on insecticidal mycotoxins as a contribution to the development of biological control and suitable agriculture.

IOBC/WPRS Bulletin, Vol. 21 (4): 71-76

**Vey A. and Riba G. 1989**

Toxines insecticides de champignons entomopathogenes. Etat actuel des connaissances et nouvelles strategies d'utilisation de leurs activites.

C.R. Acad. Agric. Fr., 75: 143-149.

**Wallace D.R., MacLeod D.M., Sullivan C.R., Tyrrel D. and De Lyzer A.J., 1976**

Induction of resting spores germination in *Entomophthora aphidis* by long-day light conditions.

Canadian Journal of Botany, 54:1410.

**Wawrzeńczyk C., Derdziński K and Zabża A., 1984**

Insect growth regulators. 14. Juvenoids with cyclopentene ring. Synthesis of isopropyl 3,7-dimethyl-10-(2,2,3-trimethyl-cyklopent-3-en-1-yl)-deca-2,8-dienoate and -deca-2,4,8-trienoate.

J. prakt. Chem., 326 213-221.

**Weete L.D., 1976**

Algal and fungal waxes. W 'Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes'.

Kollattukudy P.E., Ed., Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York, str. 349-417

**Weete L.D., Weber D.J. and Laseter J.L., 1970**

Lipids of *Rhizopus arrhizus* Fisher

J. Bacteriol., 103:565-540.

**Wilding N., 1969**

Effect of humidity on the sporulation of *Entomophthora aphidis* and *Entomophthora thaxteriana*.

Transactions of the British Mycology Society

**Wilding N., 1973**

The survival of *Entomophthora* sp. in mummified aphids at different temperatures and humidities.

Journal of Invertebrate Pathology, 21:309.

**Wilding N., Brobyn P.I. and Mardell S.K., 1983**

Rothamsted Experimental Station Report for 1983, Part 1, str.: 95.

**Wright J.E. 1993**

J. econ. Entomol., 86:1355-1358.

**Zabza A., Karaszewski R., Szafranek B., Synak E. and Szafranek J., 1995**

Laboratory culture media and neutral lipids of the *Zoophthora (Erynia) neoaphidis*.

J. Basic Microbiol., 35: 123-131.

**Zabza A., Greb-Markiewicz B., Sodano G. and De Riccardis F., 1995**

Microbial transformation of isoprenoid systems by means of fungi of *Zoophthora* genus - Microbial transformation of compounds with  $\alpha$ -kamfolenic system by means of fungus *Zoophthora (Neopandora) sp.*

J. Basic Microbiol., 35(6): 433-439.

**Zabza A., Piątkowski J., Greb-Markiewicz B. and Bujak J., 1996**

Secondary metabolites produced by entomopatogenic fungi of the genera *Zoophthora* and *Paecilomyces*.

IOBC/WPRS Bulletin, Vol.19(9): 196-199.

**Zimmermann G., 1992**

In Jackson T.A. & Glare T.R., Use of Pathogens in Scarab Pest Management, Intercept, Andover, str.: 199-208.

**Zimmermann G., 1994**

Strategies for the utilization of Entomopathogenic fungi.



Vith International colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control

Materiały konferencyjne, Tom I: 67-73.

**Yendol G., Miller E. and Behnke Ch., 1968**

Toxic substances from Entomophthoraceous fungi.

J. Invertebr. Pathol., 10: 313-319.

GREB-MARKIEWICZ Beata Monika

**Searching for factors engaged in process of infection and intoxication of the insect organism by entomopathogenic fungi belonging to *Zoophthora* and *Paecilomyces* genera**

In theoretical part, principles of Integrated Pest Management System (IPM), life-cycle of entomopathogenic fungi and known mycotoxins produced by these fungi are presented.

In experimental part are presented:

1. Analysis of neutral lipids fraction isolated from mycelium of *Zoophthora* (*Neopandora*) *phyllobii* at 8th day of fungus growth;
2. HPLC analysis and biological activity of metabolites secreted to liquid medium by means of *Zoophthora* and *Paecilomyces* genera, depending on age of culture;
3. Enzymatic activity of filtrates after cultivation of *Z. (Erynia) neoaphidis* depending on age of culture;
4. Trials of isolation metabolites produced by means of *Paecilomyces* genus;
5. Microbial transformation of isoprenoid and aryl systems by means of fungi from *Zoophthora* and *Paecilomyces* genera.



JEDN. ARCHIWIZUJĄCA      ROK ARCH.      KOD ARCH.      NR ARCH.      RODZAJ

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | Ø | 4 | / | 9 | 9 | / | P | - | Ø | 1 | 2 | N |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|

**DONA**

Zas      ChP      Roz      Pdd      Rok Zal.      Data zdokumentowania

|   |   |   |   |  |                       |
|---|---|---|---|--|-----------------------|
| N | P | V | N |  | 1 9 9 9    Ø 5    Ø 6 |
|---|---|---|---|--|-----------------------|

CPBR / GRANT

|   |      |     |    |
|---|------|-----|----|
| 6 | PØ4B | ØØ1 | Ø9 |
|---|------|-----|----|

Nr Kierunku Badań

|   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|
| Ø | 4 | Ø | Ø | 4 |
|---|---|---|---|---|

Nr Zlecenia

|   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 | 5 | Ø | 1 | 4 | 3 |
|---|---|---|---|---|---|

Kody Inst. (Kat. Zakt. ...)

|   |   |   |  |  |
|---|---|---|--|--|
| I | Ø | 4 |  |  |
|---|---|---|--|--|

Kody Wydziałów

|   |   |   |  |  |
|---|---|---|--|--|
| W | Ø | 3 |  |  |
|---|---|---|--|--|

Klasyfikacja APIN

|   |   |   |   |  |
|---|---|---|---|--|
| Ø | 4 | 1 | 2 |  |
|---|---|---|---|--|

Opis bibliograficzny

346792 Greb-Markiewicz, Beata

Poszukiwanie czynników zaangażowanych w proces infekcji i intoksykacji organizmu owada przez grzyby entomopatogeniczne z rodzaju Zoophthora i Paecilomyces.

Raporty Inst. Chem. Org. PWroc. 1999 Ser. PRE nr 12, 116 s. 27 rys. 17 tab. bibliogr. /105/ poz. maszyn. powiel.

Rozprawa doktorska

Politechnika Wrocławska, Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Wrocław

Promotor: prof. dr hab.

Ø62Ø8Ø Zabża, Andrzej

c.d. opis bibliograficzny (uwagi)

Analiza

AUTOR ANALIZY:

PODPIS:

Słowa kluczowe

grzyby entomopatogeniczne, mykotoksyna, lipid neutralny,  
biotransformacja ksenobiotyków, aktywność biologiczna,  
aktywność enzymatyczna

Podpisy i potwierdzenia

| WYPEŁNIA INSTYTUT |                        | WYPEŁNIA BIBLIOTEKA GŁÓWNA I OINT |                 |
|-------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| Redaktor naskowy  | Asyst. ds. badań nauk. | Zgłoszenie uzupełnień             | Przyjęcie karty |
|                   |                        |                                   |                 |