

MIŁOSZ TKACZYK, SŁAWOMIR ŚLUSARSKI, IWONA SKRZECZ

Zastosowanie elektronicznego nosa do detekcji lotnych związków organicznych wytwarzanych przez grzyby patogeniczne dla roślin*

Use of an electronic nose for the detection of volatile organic compounds produced by plants pathogenic fungi

ABSTRACT

Tkaczyk M., Ślusarski S., Skrzecz I. 2019. Zastosowanie elektronicznego nosa do detekcji lotnych związków organicznych wytwarzanych przez grzyby patogeniczne dla roślin. Sylwan 163 (7): 551-555. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2019025>.

The dynamic recent development of technologies provides more and more new tools, thanks to which it is possible to quickly detect and identify the chemical composition of volatile organic compounds of fungal origin. An 'electronic nose' (e-nose) is one of such tools. The Forest Research Institute launched in the period of 2018-2020 the project entitled 'Forecasting threats to forest ecosystems through the implementation of innovative electronic odor recognition system'. Its aim is to use an electronic nose to detect the odors of fungal pathogens that cause damping-off of seedlings belonging to *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocarpon*, *Phytophthora* and *Pythium* genera as well as pine foils on an example of pine tree lappet caterpillars (*Dendrolimus pini* L.). In presented paper special attention was paid to the organic compounds of fungal origin. Many authors indicate that a large number of fungi secrete specific organic compounds that can be used to recognize them. The composition of these compounds may, however, differ depending on the conditions in which the organism develops or even on the virulence itself. Similar research made it possible to introduce an e-nose device for general use. They are used, *inter alia*, at airports to detect dangerous substances, to determine the quality of coffee, or to check food for its suitability for consumption. The aim of this work is to review the basic information on the volatile organic compounds released by fungi, their composition and the possibility of using an electronic nose for their early detection. Paper provides information on: methods used to identify volatile organic compounds, the basic differences between the discussed methods and information on the examples of the use of this technology in various industries, from the food industry, through medicine, to the army.

KEY WORDS

volatile organic compounds, fungi, VOS, e-nose, detection

ADDRESSES

Miłosz Tkaczyk – e-mail: m.tkaczyk@ibles.waw.pl
Sławomir Ślusarski – e-mail: s.slusarski@ibles.waw.pl
Iwona Skrzecz – e-mail: i.skrzecz@ibles.waw.pl

Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn

*Badania współfinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach umowy BIOSTRATEG3/347105/9/NCBR/2017.

Wstęp

Lotne związki organiczne (LZO) to grupa związków wykazująca łatwe przechodzenie w postaci gazową, niską rozpuszczalność w wodzie, wysoką prężność pary oraz temperaturę wrzenia w przedziale 20-250°C [Pagans i in. 2006]. Dotychczas zidentyfikowano około 250 różnych związków organicznych pochodzenia grzybowego. Zalicza się do nich głównie alkohole, ketony, estry, terpeny i związki siarki, ale także fenole, furany, aldehydy, proste związki węglowodorowe itp. [Chiron, Michelot 2005; Korpi i in. 2009; Ortíz-Castro i in. 2009]. Emitowane przez grzyby związki dyfundują do gleby i atmosfery w postaci mieszanin gazów na drodze różnych procesów metabolizmu pierwotnego i wtórnego [Korpi i in. 2009]. Wytwarzanie przez grzyby lotnych związków organicznych nasila się podczas wytwarzania mykotoksyn, a także w czasie sporulacji [Zeringue i in. 1993].

Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu podstawowych informacji na temat lotnych związków organicznych uwalnianych przez grzyby, ich składu oraz możliwości wykorzystania elektronicznego nosa do ich wczesnego wykrywania.

Lotne związki organiczne wydzielane przez grzyby

Lotne związki organiczne często mają charakterystyczny zapach, wyczuwalny nawet przez ludzki narząd węchu. Badania nad lotnymi związkami organicznymi wydzielanymi przez grzyby (zwane dalej LZO grzybów) rozpoczęto od organizmów, które dało się wyczuć, czyli takich jak cenione w sztuce kulinarnej grzyby trufle. W skład organicznych związków wydzielanych przez trufle wchodzi m.in. takie związki jak alkohole, aldehydy, terpeny, aromaty i tiole [Breheret i in. 1997; Tirillini i in. 2000; Splivallo i in. 2007; Cho i in. 2008; Fraatz, Zorn 2010]. Kolejnym przykładem może być zapach stęchlizny emitowany przez wiele mikroskopijnych grzybów. W tym rodzaju zapachów przeważają 1-okten-3-ol i 3-oktanon [Morey i in. 1997]. Emitowane przez grzyby lotne związki organiczne mogą być również wykorzystywane jako baza do środków odstraszających owady i inne bezkręgowce. W badaniach Morath i in. [2012] wykazano możliwości zastosowania LZO grzybów w rolnictwie w biologicznej ochronie roślin przed patogenami grzybowymi. Lotne związki organiczne badano również jako potencjalne źródło do wytwarzania biopaliwa popularnie określanego jako „mycodiesel” [Morath i in. 2012].

Na skład oraz zawartość produkowanych LZO wpływ ma wiele czynników. W przypadku grzybów skład ten zależny jest głównie od ich gatunku (a nawet od szczepu), jednak na zawartość poszczególnych związków mają także wpływ warunki środowiskowe, w których dany organizm się rozwija, takie jak temperatura, substrat, składniki odżywcze, czas inkubacji itp. [Pasanen i in. 1997; Nilsson i in. 2004; Fiedler i in. 2005]. Jelén i in. [1995] wykazali, że szczep *Penicillium verrucosum* wytwarzający ochratoksynę (mykotoksyna) wydzieliał więcej lotnych ketonów niż szczep, który nie syntetyzował tego związku. Grupa fińskich naukowców badała seskwiterpeny (węglowodory z grupy terpenów) wydzielane przez dwa szczepy *Fusarium sambucinum* (jeden toksyczny, drugi nietoksyczny), w celu ich odróżnienia od siebie [Pasanen i in. 1996]. Wyniki prac wykazały, że stężenie zsyntetyzowanych seskwiterpenów jest znacznie niższe w przypadku nietoksycznego szczepu. Natomiast w toksycznych szczepach *Fusarium sporotrichoides* synteza lotnych terpenów wydawała się być związana z produkcją trichotecenu (mykotoksyny). Inne badania prowadzone w Szwecji wykazały, że grzyb *Penicillium aurantiogriseum* rosnący na nasionach owsa wydzieliał więcej lotnych związków organicznych (głównie alkoholi) niż ten sam szczep rosnący na podłożu sztucznym [Börjesson i in. 1990].

Zastosowanie elektronicznego nosa do detekcji LZO

Ze względu na wciąż ograniczone możliwości metodologiczne i technologiczne badania nad LZO grzybów są daleko w tyle w porównaniu do innych metabolitów grzybowych. Co więcej, jak już wcześniej wspomniano, produkcja lotnych związków wydzielanych przez grzyby jest procesem bardzo dynamicznym i zależy od wielu czynników [Pasanen i in. 1997; Nilsson i in. 2004; Fiedler i in. 2005].

„Elektroniczny nos” lub „e-nos” to obiecująca nowość w wykrywaniu lotnych związków zapachowych grzybów. Urządzenia te obejmują zestawy elektronicznych czujników chemicznych z odpowiednimi systemami rozpoznawania wzorców, zdolnych do wychwytywania prostych lub bardziej złożonych zapachów [Gardner, Bartlett 1992; Wilson, Baietto 2009]. Ich popularność jest wynikiem stałego ulepszania technologii czujników chemicznych (takich jak elektrody jonoselektywne, jonoselektywne tranzystory polowe i czujniki światłowodowe) oraz rosnącego zapotrzebowania na zautomatyzowane systemy wykrywania gazu. Termin „e-nos” dotyczy dużej klasy zestawów składających się z dwóch głównych podsystemów: macierzy niespecyficznych czujników gazu i modułów analizujących dane [Wilson, Baietto 2009, 2011]. Zastosowanie tej metody umożliwia między innymi jakościową ocenę zmian masy, właściwości optycznych lub elektrycznych analizowanych lotnych związków organicznych oraz określenie całej mieszaniny związków organicznych bez oddzielania poszczególnych jej składników. W ostatnich latach czujniki gazu, zorganizowane w formie e-nosa, były szeroko stosowane w wielu praktycznych zastosowaniach, w tym w tak odległych obszarach jak kosmetyka, przemysł spożywczy czy cele wojskowe (wykrywanie materiałów wybuchowych).

Prowadzono też badania nad zastosowaniem e-nosa do nieinwazyjnego rozróżniania istotnych z medycznego punktu widzenia grzybów [Sahgal i in. 2006; Sahgal, Magan 2008] oraz do określania skuteczności i odporności grzybów na leki przeciwgrzybicze [Naraghi i in. 2010; Pont i in. 2012]. Technologii tej używa się również do wczesnego wykrywania grzybów wytwarzających mykotoksyny w żywności, np. ziarnach, owocach czy produktach mięsnych [Magan, Evans 2000; Sahgal i in. 2007; Cabanes i in. 2009; Leggieri i in. 2010]. Elektroniczny nos jest również stosowany w rolnictwie do określania ogólnego stanu gleby [Bastos, Magan, 2007].

Potencjalne możliwości zastosowania e-nosa w leśnictwie

W związku z rozwojem opisanych technologii zwiększają się również możliwości stosowania takich urządzeń. Jednym z pomysłów jest zastosowanie inteligentnego urządzenia do rozpoznawania zapachów w leśnictwie, m.in. wydzielanych przez grzyby lub owady. Instytut Badawczy Leśnictwa w ramach współpracy z Politechniką Warszawską prowadzi badania mające na celu stworzenie wspomnianego urządzenia do oceny zagrożeń ze strony patogenów grzybowych powodujących zgorzel siewek w szkółkach leśnych oraz do oceny zagrożenia drzewostanów przez barczatkę sosnowkę *Dendrolimus pini* L. Prace realizowane w projekcie podzielono na dwa bloki tematyczne: zastosowanie e-nosa do detekcji patogenów wywołujących zgorzel siewek oraz do detekcji zimujących gąsienic barczatki sosnowki [Skrzecz i in. 2018].

Pierwszy blok prac ma na celu ułatwić detekcję patogenów wywołujących patogeniczną zgorzel siewek w szkółkach leśnych. Dzięki zastosowaniu e-nosa możliwe będzie uzyskanie informacji na temat obecności w glebie patogenów wywołujących zgorzel z pominięciem etapu prac laboratoryjnych, co w znaczący sposób przyspieszy proces diagnostyki. Szybka identyfikacja sprawcy pozwoli na dobranie optymalnych metod ograniczenia rozwoju choroby w szkółkach leśnych.

W ramach projektu PROZEL, oprócz patogenów grzybowych, zdecydowano się włączyć do badań gąsienice barczatki sosnówki. Jest to jeden z podstawowych foliofagów sosny, który występując w drzewostanach jednogatunkowych, może doprowadzić do znaczącej defoliacji [Śliwa 1992; Kolk i in. 1996]. Żerowanie gąsienic oraz ich wędrówka do i z miejsc zimowania zazwyczaj odbywa się w zróżnicowanych liczebnie grupach (czasem behavior może być samotniczy). Gąsienice występujące w grupach zjadają znacznie większe ilości pokarmu niż żerujące pojedynczo. Przechodzą też szybszy rozwój, a także mają mniejszą śmiertelność [Kolk i in. 1996]. Gąsienice muszą się zatem między sobą komunikować, przypuszczalnie za pomocą feromonów agregacyjnych. W nauce oraz praktyce leśnej znane są i wykorzystywane feromony dla motyli *Dendrolimus pini* – jest to mieszanina alkoholu z aldehydem w proporcjach 1:1 – (Z)-5-(E)-7-dodekadienol oraz (Z)-5-(E)-7-dodekadienal [Kovalev 1993]. Nie są jednak znane substancje chemiczne stanowiące mieszaninę zapachów będącą składową feromonów agregacyjnych gąsienic barczatki sosnówki.

Oznaczenie tych substancji, a także określenie stopnia ich stężenia w powietrzu w drzewostanach, w których występuje barczatka sosnówka, stworzy nowe możliwości w prognozowaniu występowania tego gatunku owada w drzewostanach sosnowych. Obecnie do prognozowania pod koniec sezonu wegetacyjnego wykorzystuje się metody jesiennych poszukiwań szkodników pierwotnych w ściółce [Instrukcja... 2012], na wiosnę lepowanie drzew oraz kosztowną i pracochłonną ścinkę drzew na płachty. Zastosowanie elektronicznego urządzenia (e-nos) wykrywającego zapach gąsienic barczatki sosnówki (zarówno populacji jesiennej, jak i wiosennej) przyczyni się do dokładniejszego prognozowania wystąpienia zagrożenia ze strony tego owada, a także do znacznych oszczędności podczas wykonywania prac ochroniarskich w lasach.

Literatura

- Bastos A. C., Magan N. 2007. Soil volatile fingerprints: use for discrimination between soil types under different environmental conditions. *Sens. Actuators B* 125: 556-562.
- Börjesson T., Stöhlman U., Schnürer J. 1990. Volatile metabolites and other indicators of *Penicillium aurantiogriseum* growth on different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3705-3710.
- Breheret S., Talou T., Rapior S., Bessiere J. M. 1997. Monoterpenes in the aromas of fresh wild mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 45: 831-836.
- Cabanes F., Sahgal N., Bragulat M., Magan N. 2009. Early discrimination of fungal species responsible of ochratoxin A contamination of wine and other grape products using an electronic nose. *Mycotoxin Res.* 25: 187-192.
- Chiron N., Michelot D. 2005. Odeurs de champignons: chimie et role dans les interactions biotiques – une revue. *Cryptogamie, Mycologie* 26: 299-364.
- Cho I. H., Namgung H. J., Choi H. K., Kim Y. S. 2008. Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing). *Food Chem.* 106: 71-76.
- Fiedler N., Laumbach R., Kelly-McNeil K., Lioy P., Fan Z. H., Zhang J., Ottenweller J., Ohman-Strickland P., Kipen H. 2005. Health Effects of a Mixture of Indoor Air Volatile Organics, Their Ozone Oxidation Products, and Stress. *Environ. Health Perspect.* 113: 1542-1548.
- Fraatz M. A., Zorn H. 2010. Fungal flavours. W: Hofrichter M. [red.]. *The Mycota X: Industrial Applications*. Second ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 249-264.
- Gardner J. W., Bartlett P. N. 1992. *Sensors and Sensory Systems for an Electronic Nose*. Kluwer Academic Publisher, Norwell, MA.
- Instrukcja ochrony lasu. 2012. CILP, Warszawa.
- Jelén H. H., Mirocha C. J., Wasowicz E., Kamiński E. 1995. Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 3815-3820.
- Kolk A., Starzyk J. R. 1996. Atlas szkodliwych owadów leśnych. Multico, Warszawa.
- Korpi A., Järnberg J., Pasanen A. L. 2009. Microbial Volatile Organic Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39: 139-193.
- Kovalev B. G., Bolgar T. S., Zubov P. A., Zharkov D. G., Golosova M., Nesterov E. A., Tvaradze M. S. 1993. Identification of additional components of the sex pheromone of *Dendrolimus pini*. *Chem Nat Compd* 29: 135.
- Leggieri M. C., Pont N. P., Battilani P., Magan N. 2010. Detection and discrimination between ochratoxin producer and nonproducer strains of *Penicillium nordicum* on a ham-based medium using an electronic nose. *Mycotoxin Res.* 27: 29-35

- Magan N., Evans P. 2000. Volatiles as an indicator of fungal activity and differentiation between species, and the potential use of electronic nose technology for early detection of grain spoilage. *J. Stored Prod. Res.* 36: 319-340.
- Morath S. U., Hung R., Bennett J. W. 2012. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26 (2-3): 73-83.
- Morey P., Wortham A., Weber A., Horner E., Black M., Muller W. 1997. Microbial VOCs in moisture damaged buildings. *Healthy Build.* 1: 245-250.
- Naraghi K., Sahgal N., Adriaans B., Barr H., Magan N. 2010. Use of volatile fingerprints for rapid screening of antifungal agents Fungal volatile organic compounds 81 for efficacy against dermatophyte *Trichophyton* species. *Sens. Actuators B* 146: 521-526.
- Nilsson A., Kihlstrom E., Lagesson V., Wessen B., Szponar B., Larsson L., Tagesson C. 2004. Microorganisms and volatile organic compounds in airborne dust from damp residences. *Indoor Air* 14: 74-82.
- Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 4: 701-712.
- Pagans E., Font X., Sanchez A. 2006. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: Abatement by biofiltration. *J. Hazard. Mater.* 131: 179-186.
- Pasanen A.-L., Lappalainen S., Pasanen P. 1996. Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. *The Analyst* 121: 19-49.
- Pasanen P., Korpi A., Kallioikoski P., Pasanen A.-L. 1997. Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. *Environ. Int.* 23: 425-432.
- Pearce T. C., Schiffman S. S., Nagle H. T., Gardner J. W. 2006. Handbook of machine olfaction: electronic nose technology. John Wiley & Sons.
- Pont N. P., Kendall C. A., Magan N. 2012. Analysis of volatile fingerprints for monitoring anti-fungal efficacy against the primary and opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mycopathologia* 173: 93-101.
- Sahgal N., Magan N. 2008. Fungal volatile fingerprints: discrimination between dermatophyte species and strains by means of an electronic nose. *Sens. Actuators B* 131: 117-120.
- Sahgal N., Monk B., Wasil M., Magan N. 2006. *Trichophyton* species: use of volatile fingerprints for rapid identification and discrimination. *Br. J. Dermatol.* 155: 1209-1216.
- Sahgal N., Needham R., Cabanes F. J., Magan N. 2007. Potential for detection and discrimination between mycotoxigenic and non-toxigenic spoilage moulds using volatile production patterns: a review. *Food Addit. Contam.* 24: 1161-1168.
- Skrzecz I., Karpierz M., Ślusarski S., Tkaczyk M., Oszako T., Adamowicz L., Jastrzębski C., Pura B., Siegoczyński R. M., Tarakowski R. 2018. Modern technologies in forest protection – an attempt to use an electronic nose for detecting harmful insects and pathogens. *Folia Forestalia Polonica* 60 (2): 131-133.
- Splivallo R., Novero M., Bertea C. M., Bossi S., Bonfante P. 2007. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 175: 417-424.
- Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R., Schuhmacher R. 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J. Microbiol. Methods* 81: 187-193.
- Śliwa E. 1992. Barczatka sosnówka. Biblioteczka leśnika. PWRiL, Warszawa.
- Tirillini B., Verdelli G., Paolucci F., Ciccio P., Frattoni M. 2000. The volatile organic compounds from the mycelium of *Tuber borchii* Vitt. *Phytochemistry* 55: 983-985.
- Wilson A. D., Baietto M. 2009. Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors* 9: 5099-5148.
- Wilson A. D., Baietto M. 2011. Advances in electronic-nose technologies developed for biomedical applications. *Sensors* 11: 1105-1176.
- Zeringue H. J., Bhatnagar D., Cleveland T. E. 1993. C(15)H(24) Volatile Compounds Unique to Aflatoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2264-2270.