

SPRAWOZDANIE

z badań podstawowych prowadzonych w 2020 roku
na rzecz rolnictwa ekologicznego

Kierownik Projektu: dr inż. Joanna Szumigaj-Tarnowska

Warzywnictwo ekologiczne, w tym uprawa ziół: badania w zakresie możliwości wykorzystywania substancji podstawowych w ochronie warzyw i ziół w uprawie ekologicznej. Możliwość wykorzystania substancji podstawowych w ograniczaniu występowania chorób bakteryjnych w ekologicznej uprawie pieczarki

na podstawie § 8 ust.1 pkt 2, ust.2 pkt 2 i ust.10 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170, z 2016 r. poz. 1614, z 2017 r. poz.1470 oraz z 2019 r. poz. 901 i poz. 1522)

decyzja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi
z dnia 08.04.2020 r., nr JPR.re.027.1.2020

DYREKTOR

INSTYTUTU OGRODNICTWA
INSTYTUTU OGRODNICTWA

D. Konopacka

prof. dr hab. Dorota Konopacka

prof. dr hab. Dorota Konopacka

Wykonawcy: dr Joanna Szumigaj-Tarnowska, mgr Joanna Augustyniak, mgr Zbigniew Uliński, techn. Alina Lichman, techn. Halina Łągiewska

Skierniewice, 2020



Wstęp

Polska od kilkunastu lat jest liderem w produkcji pieczarek w Europie. Rocznie produkuje się w naszym kraju około 350 tys. ton tych grzybów. Produkcja ekologiczna pieczarki, podobnie jak w przypadku pozostałych upraw warzyw, stanowi jedynie niewielki procent całości produkcji, jednakże rynek ten stale się rozwija. Jednym z głównych problemów prowadzenia uprawy pieczarek metodami ekologicznymi jest ochrona przed szkodnikami i chorobami, z powodu braku dostępności środków zwalczających patogeny i szkodniki w tych uprawach (Motała 2018). Tym samym, aby wspierać gospodarstwa ekologiczne należy intensywnie poszukiwać nowych metod i związków naturalnych, które mogłyby skutecznie ograniczać występujące w uprawach choroby i szkodniki. Choroby bakteryjne są szczególnie dokuczliwym problemem dla producentów pieczarki. Zbierane pieczarki są nie tylko gorszej jakości, ale szacuje się, że straty plonu wywołane przez chorobotwórcze bakterie sięgają nierzadko 30 - 40%. W literaturze wymienianych jest kilka gatunków bakterii z rodzaju *Pseudomonas* powodujących brązowienie pieczarki (Soler-Rivas i wsp. 1999).

W projekcie badano przydatność substancji podstawowych, tj. ocet winny oraz nadtlenek wodoru, a także olejków z ekstraktów roślinnych w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych dla pieczarki. Substancje podstawowe zostały wybrane na podstawie wykazu zatwierdzonych substancji w Unii Europejskiej umieszczonego na stronie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi - <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/wykaz-zatwierdzonych-w-ue-substancji-podstawowych>.

Choroby bakteryjne w uprawie pieczarki pojawiają się stosunkowo często, zwłaszcza w okresie jesienno-zimowym, gdy wilgotność powietrza jest wysoka. W tym okresie łatwo dochodzi do zaburzenia równowagi między temperaturą powietrza a owocników, co powoduje wzrost ich wilgotności, a to jest przyczyną szybkiego namnażania się bakterii na ich powierzchni. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, które to głównie odpowiadają za wywoływanie bakterioz pieczarki, posiadają duże zdolności adaptacyjne, a także zdolności przechodzenia z formy niepatogenicznej w patogeniczną. W środowisku uprawowym pieczarki w wyniku aktywności metabolicznej i wytwarzania zewnątrzkomórkowych substancji, w tym między innymi toksycznej tolasyny, wnikają w tkankę grzybów powodując jej degradację.

Objawami chorób bakteryjnych pieczarki są plamy na owocnikach o różnej barwie i nasileniu. W zależności od źródła infekcji, objawy i czas rozwoju choroby mogą być różne. Źródłem występowania bakterii może być okrywa torfowa, ale bakterie są też przenoszone na rękach, butach i sprzęcie używanym przez pracowników. Najczęściej pojawiającymi się chorobami bakteryjnymi pieczarki są plamistość brunatna wywoływana przez *Pseudomonas tolaasii* (Tolass, 1915; Paine 1919; Gill, 1995) i plamistość imbirowa wywoływana przez *Pseudomonas 'gingeri'* (Soler-Rivas i wsp. 1999) – Fot. 1.

Plamistość brunatna objawia się pojawianiem się ciemno-brązowych, wklęsłych plam na kapeluszach, a w przypadku ostrego porażenia również na trzonkach grzybów (Largeteau i Savoie 2010; Wong i Preece 1980). Objawy chorobowe mogą pojawić się w każdym stadium rozwojowym grzybów uprawnych. Porażone owocniki stają się lepkie i często ulegają zniekształceniom. W przypadku zainfekowania młodych owocników, grzyby nie rozwijają się prawidłowo (Soler-Rivas i wsp. 2000).

Plamistość imbirowa objawia się żółto-brązowymi plamami, które w miarę rozwoju zmieniają barwę na czerwono-rudą. Zmiany te są powierzchniowe, nie tworzą wgłębień na kapeluszach, jak to jest w przypadku plamistości brunatnej. Plamy rozwijają się przeważnie na obrzeżach kapeluszy, jednak w przypadku ostrej infekcji pokrywają również całą ich powierzchnię. Chorobę może wywołać niewielka liczba komórek bakterii, które w sprzyjających warunkach szybko namnażają się i powodują typowe objawy chorobowe (Wong i Preece 1982). Objawy plamistości często ujawniają się dopiero w warunkach chłodniczych, w trakcie przechowywania, przez co pieczarki tracą na jakości i wartości handlowej.



Fot. 1. Choroby bakteryjne pieczarki, porażone przez *P. tolaasii* (A) oraz porażone przez *P. 'gingeri'* (B)

Ochrona upraw pieczarki przed chorobami bakteryjnymi polega między innymi na przeprowadzaniu dezynfekcji w zakładzie pieczarkarskim, a najczęściej stosowane są związki chlorowe, np. chlorowana woda podchlorynem sodu i dwutlenkiem chloru, kwas nadoctowy, a także związki czwartorzędowych soli amoniowych. Częste stosowanie i złe dawkowanie środków dezynfekcyjnych powoduje uodparnianie się patogenów na te preparaty (Szymański i in., 2000; Szymański i Szudyga, 2004). Obecnie dąży się do ograniczenia stosowania środków chemicznych w trakcie uprawy i przechowywania pieczarki, a jedyną metodą ochrony upraw grzybów przed bakteryjnymi patogenami jest profilaktyka i wysoka higiena w pieczarkarni przy zakładaniu uprawy, w trakcie rzutów oraz po zakończonym cyklu uprawowym.

W ostatnich latach z uwagi na rosnące zapotrzebowanie na zdrową żywność zmienia się koncepcja ochrony upraw pieczarki, a znaczenie mają nowe metody ochrony upraw z wykorzystaniem niechemicznych środków ochrony, a zwrócenie uwagi na ekologiczne i jednocześnie nieszkodliwe preparaty dla zdrowia człowieka. Pojawiają się zatem doniesienia naukowe o skuteczności olejków eterycznych i wyciągów roślinnych w ochronie pieczarki przed patogenami bakteryjnymi (Dawoud i Eweis 2006; Wang i wsp. 2016). Wykazano też skuteczność dodatku oleju z oliwek w hamowaniu objawów wywoływanych przez *P. tolaasii* (Soler-Rivas i wsp. 2006). Stwierdzono, że właściwości bakteriobójcze miał 4-metylokatechol oraz katechol (związki obecne w wodzie otrzymanej podczas produkcji oleju z oliwek). Sokovic i Griensven (2006) przebadali olejki z rumianku pospolitego, mięty pieprzowej, lebidki pospolitej, bazylii pospolitej, tymianku właściwego, szalwii lekarskiej oraz ich składników jako inhibitory wzrostu bakterii patogenicznych. Największą aktywność bakteriobójczą wykazał olejek z lebidki pospolitej (oregano) oraz tymianku. Skuteczne działanie bakteriobójcze w stosunku do *P. tolaasii* w warunkach laboratoryjnych wykazano też dla ekstraktu z *Chamaemelum nobile*, czyli rumianu rzymskiego (Dezfooli i wsp. 2012). Według Dawoud i Eweis (2006) wyciągi z szalwii czerwonokorzeniowej oraz cytryny zwyczajnej mogą również przyczynić się do zwalczania bakterii chorobotwórczych w uprawie pieczarki. Skuteczność wyciągów roślinnych w ograniczaniu innych patogenów grzybów uprawnych jest potwierdzana również w badaniach Górskiego i wsp. (2010), Regnier i Combrinck (2010) oraz Wang i wsp. (2016).

Zastosowanie w ochronie roślin ozdobnych przed plamistością bakteryjną wywoływaną przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* ma ocet winny. Ponadto wykazano jego skuteczność w hamowaniu rozwoju *Pseudomonas tolaasii* w uprawie bocznika (Bruno i wsp. 2015). Wykorzystanie biologicznie czynnych ekstraktów roślinnych wydaje się być optymistyczną alternatywą do ochrony ekologicznych upraw pieczarki.

Cel badań

Badania miały na celu ocenę skuteczności substancji podstawowych, tj. ocet winny oraz nadtlenek wodoru oraz olejków z ekstraktów roślinnych w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych w uprawie ekologicznej pieczarki. Celem badań było też zwrócenie uwagi na możliwość wykorzystania substancji biologicznie czynnych do ochrony upraw pieczarki przed patogenami bakteryjnymi.

Metody badań

1. Badania *in vitro*

1.1. Namnażanie i pozyskiwanie izolatów bakteryjnych

Izolaty bakteryjne pozyskiwano z owocników z objawami chorób bakteryjnych, które pozyskano z pieczarkarni z rejonu łódzkiego, mazowieckiego i łosickiego. Porażoną tkankę owocnika wykładano na agarową pożywkę odżywczą, odpowiednią dla bakterii, i inkubowano w temperaturze 24°C przez 24 godziny. Następnie z namnożonej biomasy bakteryjnej wykonywano posiew redukcijny i otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii, które hodowano na skosach agarowych. Czyste kultury bakteryjne przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C i wykorzystywano do dalszych badań. Na podstawie testów mikrobiologicznych i biochemicznych, a także testów patogeniczności bakterie identyfikowano, jako chorobotwórcze wobec pieczarki.

Przed przystąpieniem do doświadczeń bakterie namnażano w odżywczej pożywce płynnej (Nutrient Agar), odpowiedniej dla wzrostu bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i inkubowano w temperaturze 24°C przez 24 godziny. Aktywne izolaty bakteryjne wykorzystywano do badań skuteczności substancji podstawowych i olejków roślinnych.

Do badań wykorzystywano następujące izolaty bakterii:

- *Pseudomonas tolaasii*: MG, HA, LE, BO, BI, H4, B23

- *Pseudomonas 'gingeri'*: MO, 3A, B5, B12, P1, B.08-7, które pochodziły z własnej kolekcji Pracowni Uprawy Warzyw i Grzybów Jadalnych lub zostały pozyskane z porażonych pieczarek, a następnie poddane identyfikacji.

1.2. Ocena skuteczności substancji podstawowych i olejków z ekstraktów roślinnych w badaniach *in vitro*

Określenie skuteczności badanych substancji w hamowaniu rozwoju bakterii patogenicznych w warunkach *in vitro* prowadzono w laboratorium mikrobiologicznym, wyposażonym w komorę laminarną, ciepłarni inkubacyjne, badawczy mikroskop świetlny firmy Nikon połączony z komputerem i kamerą.

Skuteczność substancji podstawowych i olejków z ekstraktów roślinnych badano metodą rozcieńczeń w próbkach z podłożem płynnym, w którym przygotowano odpowiednie stężenia badanych substancji (tabela 1). Dobór stężeń substancji opierał się na danych literaturowych, etykietach środków i wcześniejszych doświadczeniach.

Do próbek następnie dodawano 100 µl zawiesiny bakterii o gęstości $1,0 \times 10^7$ jtk/ml. Próby inkubowano przez 48 h w temperaturze 24-25°C. Wzrost bakterii, na podstawie zmętnienia podłoża, określano po 24 i 48 godzinach inkubacji. Próby, w których nie stwierdzano wzrostu bakterii wysiewano na stałą odżywkę pożywkę (agar odżywczy) metodą rozcieńczeń. Po 48 godzinach inkubacji w 24-25°C oceniano wzrost bakterii na pożywce stałej, licząc wyrosnięte kolonie bakteryjne. W celu określenia skuteczności bakteriobójczej nadtlenu wodoru i octu winnego, zawiesiny zostały posiane na pożywki agarowe, z tych stężeń w których bakterie nie wykazywały wzrostu.

Na podstawie liczby kolonii (jtk/ml) w próbie badanej i kontrolnej bez substancji określano stopień skuteczności badanej substancji. Dodatkowo obliczono liczbę komórek jako logarytm jednostek

tworzących kolonie, tj. log jtk/ml, a następnie wyznaczono równanie regresji opisujące zmienność liczby bakterii w zależności od stężenia nadtlenu wodoru i octu winnego.

W badaniach wykorzystano 2 substancje podstawowe (nadtlenek wodoru i ocet winny) oraz 15 olejków roślinnych (tabela 1), których skuteczność badano względem 13 bakterii patogenicznych. Stężenia dla nadtlenu wodoru i octu winnego zostały określone na podstawie wyników badań w roku 2019. W przypadku olejków roślinnych badano stężenie 1%, z wyjątkiem olejku tymiankowego oraz z drzewa herbacianego.

Tabela 1. Substancje wykorzystane w badaniach

Substancja	Badane stężenie (%)
Nadtlenek wodoru	0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05
Ocet winny	0,15; 0,30; 0,50; 0,75; 1,0
Olejek z drzewa herbacianego	0,5; 1,0;
Olejek tymiankowy	0,5; 1,0;
Olejek anyżowy	1,0
Olejek cytrynowy	1,0
Olejek eukaliptusowy	1,0
Olejek goździkowy	1,0
Olejek melisowy	1,0
Olejek z mięty pieprzowej	1,0
Olejek szalwiowy	1,0
Olejek pichtiowy	1,0
Olejek jałowcowy	1,0
Olejek lawendowy	1,0
Olejek cytronelowy	1,0
Olejek cynamonowy	1,0
Olejek lemongrasowy	1,0

2. Badania uprawowe *in vivo*

2.1. Ocena skuteczności substancji podstawowych w warunkach uprawowych

Badania przeprowadzono w klimatyzowanych halach, przystosowanych do uprawy pieczarki, zapewniając temperaturę 22–23°C, stężenie dwutlenku węgla na poziomie 3000 mg·dm⁻³ i względną wilgotność powietrza 88–90%. Doświadczenie przeprowadzono w doniczkach wypełnionych podłożem ekologicznym III fazy przerośniętym grzybnią pieczarki A15 w ilości 1,7 kg i ziemią okrywową o grubości 4 cm (pole powierzchni okrywy wynosiło 0,038 m²) – Fot. 2. Jednocześnie dla zapewnienia warunków optymalnych do wzrostu pieczarek, czyli zapewnienia właściwego stężenia dwutlenku węgla i utrzymania wysokiej wilgotności powietrza w obecności doniczek w tej samej hali na dolnych półkach prowadzono uprawę pieczarki.



Fot. 2. Doświadczenie doniczkowe w Pracowni Grzybów Uprawnych.

Założono 32 m² uprawy, a na każdym m² układano ok. 90 kg podłoża pieczarkowego. Po nałożeniu kostek na regały uprawowe na podłoże nakładano okrywę torfową z firmy Torfan w ilości 50 l/m² uprawy, co dawało warstwę o grubości 5 cm. Na powierzchnię okrywy rozsypywano przerośnięte grzybnia podłoże (kaking) w ilości 50 dag/m² uprawy, które następnie wymieszano ręcznie z okrywą. Zabieg ten miał na celu zapewnienie równomiernego przerośnięcia okrywy grzybnia oraz skrócenie okresu przerastania. Po rozgarnięciu i wyrównaniu okrywy przystępowano do stopniowego nawadniania upraw, a uprawę poddawano siedmiodniowej inkubacji, podczas której w halach utrzymywano warunki optymalne dla wzrostu grzybni w okrywie. Podczas przerastania okrywy uprawę nawadniano, stosując do 20 litrów wody na m² uprawy. Zabieg wykonywano ręcznie z wykorzystaniem lancy z sitem.

Po przerośnięciu okrywy w uprawach wykonywano zabieg zwany „szokiem”. Polegał on na kontrolowanym obniżeniu w halach temperatury powietrza i podłoża, stężenia CO₂ oraz wilgotności, w celu powstrzymania wzrostu wegetatywnego grzybni i spowodowania przejścia uprawy w fazę plonowania (generatywną). Z upraw zbierano dwa rzuty owocników. Po zakończeniu rzutu pierwszego zastosowano do 12 litrów wody na m² uprawy. Dawki te zależały od wilgotności i aktywności podłoża oraz wilgotności okrywy w okresie plonowania.

2.2 Materiał badany

Do badań wykorzystano, dwa izolaty bakteryjne z gatunku *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'*, wytypowane w badaniach laboratoryjnych. Przygotowane doniczki z podłożem pieczarkowym III fazy i okrywą, zainfekowano zawiesiną bakterii o gęstości 1x10⁴ i 1x10⁶ jtk/ml w ilości 10 ml w piątym dniu po nałożeniu okrywy, co warunkowało uzyskanie około 2,6 x 10⁶ i 2,6 x 10⁸ komórek na m² okrywy. Po zainfekowaniu okrywy, uprawa została podlana wodnymi zawiesinami substancji podstawowych w odpowiednich stężeniach, tj. nadtlenek wodoru w stężeniu 0,05 i 0,5% oraz ocet winny w stężeniu 2% i 4%. Substancje były aplikowane w jednej i w dwóch dawkach.

W pierwszym i drugim rzucie owocników określano przebieg rozwoju choroby bakteryjnej, na podstawie stopnia nasilenia objawów (ilość i jakość plam na owocnikach), szybkość pojawienia się pierwszych objawów oraz plon owocników zdrowych i porażonych. Obserwacje prowadzono codziennie od momentu pojawienia się zawiązków grzybów, aż do końca trwania rzutu owocników.

Ponadto obliczono nasilenie występowania objawów chorobowych w pierwszym i drugim rzucie pieczarki jako stosunek plonu owocników porażonych do całkowitego plonu uzyskanego w danej kombinacji według wzoru: $NC (\%) = (P_{oc} / P_c) \cdot 100\%$, gdzie: P_{oc} – plon owocników chorych; P_c – plon całkowity (plon owocników zdrowych i chorych). Wyniki przedstawiono na wykresie

zależności średniego plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby bakteryjnej w pierwszym i drugim rzucie.

Doświadczenie miało charakter dwuczynnikowy. Czynnikiem pierwszym stanowiły różne koncentracje liczby bakterii, zaś drugim były stosowane substancje podstawowe. Uprawę przeprowadzono dwukrotnie, a każda kombinacja obejmowała 4 powtórzenia. Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji dwuczynnikowej przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki

1. Skuteczność substancji podstawowych i olejków roślinnych w warunkach *in vitro*

1.1 Skuteczność substancji podstawowych

Skuteczność bakteriobójczą nadtlenu wodoru i octu winnego badano w pożywce płynnej zawierającej różne stężenia badanych substancji. Określano wzrost bakterii w tych pożywkach, a następnie zawiesiny wysiewano metodą rozcieńczeń na pożywki stałe, w celu określenia liczby komórek bakterii. Na tej podstawie określano skuteczność bakteriobójczą substancji. Wyniki przedstawiono w tabeli 2 i 3.

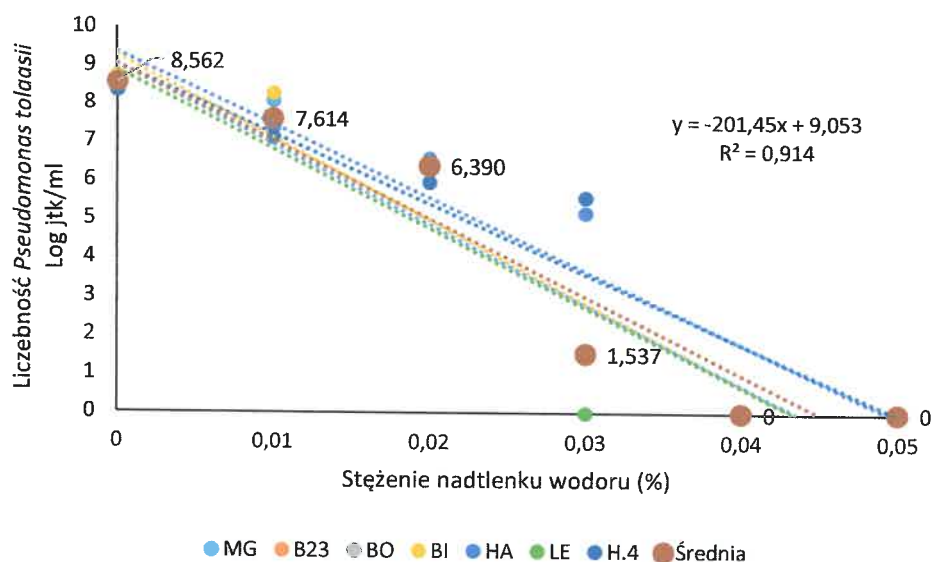
Bakterie wykazały zróżnicowaną wrażliwość na nadtlenek wodoru w stężeniach 0,02 – 0,05% (tabela 2). Rozwój izolatów z gatunku *P. tolaasii* był ograniczony przy stężeniu 0,02% tej substancji w pożywce płynnej, a całkowicie zahamowany w stężeniu 0,03–0,04%. W przypadku gatunku *P. 'gingeri'* stężeniem hamującym wzrost było 0,02–0,04 % w zależności od izolatu, a bakteriobójczym 0,04–0,05%.

Określając liczbę komórek bakterii metodą rozcieńczeń w pożywkach stwierdzono niższą liczebność komórek w pożywkach zawierających nadtlenek wodoru względem kontroli. Stwierdzono o dwa rzędy wielkości niższą liczbę komórek badanych bakterii w pożywkach zawierających 0,02% nadtlenu wodoru.

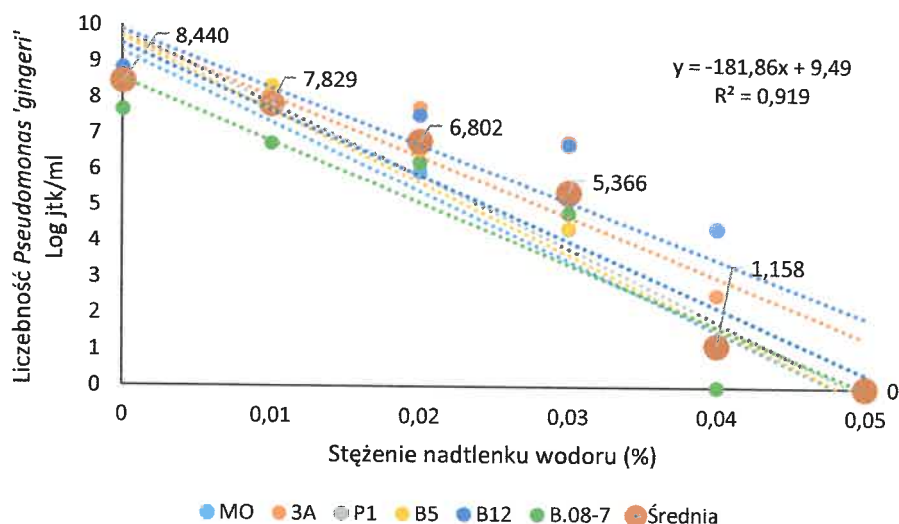
Dodatkowo obliczono liczbę komórek bakterii jako logarytm jednostek tworzących kolonie (\log jtk/ml) i wyznaczono równanie regresji opisujące zmienność liczby bakterii w zależności od stężenia nadtlenu wodoru (wykres 1 i 2). Wyniki wskazują na wysoką korelację liczebności komórek bakterii ze stężeniem nadtlenu wodoru. Wysokie współczynniki korelacji $r^2 = 0,914$ i $r^2 = 0,919$ wyznaczonych równań regresji wskazują na wysokie dopasowanie wyników empirycznych do prognozowanych. Ponadto można zaobserwować zmniejszenie o dwie jednostki logarytmiczne średniej liczby bakterii *P. tolaasii* przy stężeniu 0,02% nadtlenu wodoru w stosunku do kontroli i o 1,6 jednostki mniejszą liczbę komórek *P. 'gingeri'* (wykres 2). Należy zaznaczyć, że skuteczność bakteriobójcza danej substancji wynosi 99%, gdy liczba bakterii zmniejsza się o dwie jednostki w skali logarytmicznej.

Tabela 2. Wzrost i liczba komórek bakterii *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'* w pożywce zawierającej różne stężenia nadtlenu wodoru

Izolat	Stężenie nadtlenu wodoru (%)						
	Rodzaj pożywki	0,0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05
MG	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$2,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^6$	-	-	-
B23	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$4,4 \times 10^8$	$2,45 \times 10^7$	$3,1 \times 10^6$	-	-	-
BO	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$5,3 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^6$	-	-	-
BI	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$5,5 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$	-	-	-
HA	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$3,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$	$3,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	-	-
LE	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$3,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	-	-	-
H.4	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$2,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	$9,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	-	-
MO	plynna	+	+	-	-	-	-
	stała	$2,5 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$	$8,6 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$	-	-
3A	plynna	+	+	+	+	-	-
	stała	$2,1 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$	$6,2 \times 10^6$	$3,4 \times 10^4$	-
P1	plynna	+	+	+	-	-	-
	stała	$6,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$7,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^5$	-	-
B5	plynna	+	+	+	+	-	-
	stała	$4,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	-
B12	plynna	+	+	+	+	-	-
	stała	$6,0 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	$5,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^4$	-
B.08-7	plynna	+	+	+	-	-	-
	stała	$4,5 \times 10^7$	$5,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$6,3 \times 10^4$	-	-



Wykres 1. Zmiana liczby komórek bakterii *Pseudomonas tolaasii* w pożywce zawierającej nadtlenek wodoru.



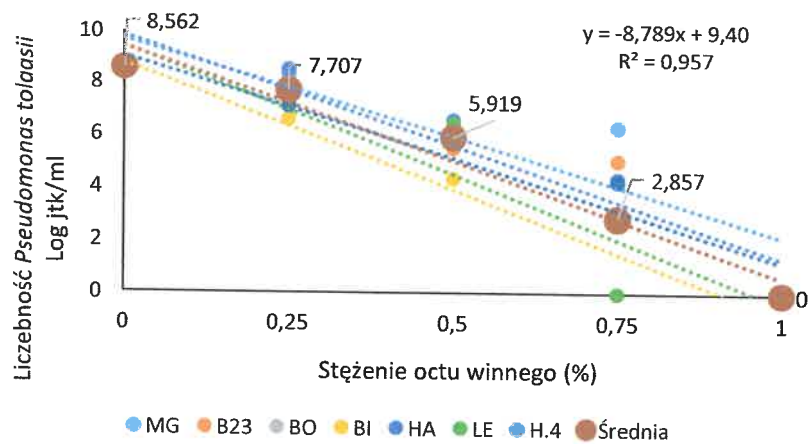
Wykres 2. Zmiana liczby komórek bakterii *Pseudomonas 'gingeri'* w pożywce zawierającej nadtlenek wodoru.

Wykazano również aktywność bakteriobójczą octu winnego (tabela 3). Rozwój bakterii *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'* w pożywce płynnej był ograniczony przy stężeniu 0,5%, zaś całkowite zahamowanie wzrostu tych bakterii stwierdzono przy stężeniu 1%. Na podstawie liczby komórek bakterii w pożywce płynnej wykazano rozwój bakterii w pożywkach zawierających ocet winny w stężeniu 0,5–0,75%.

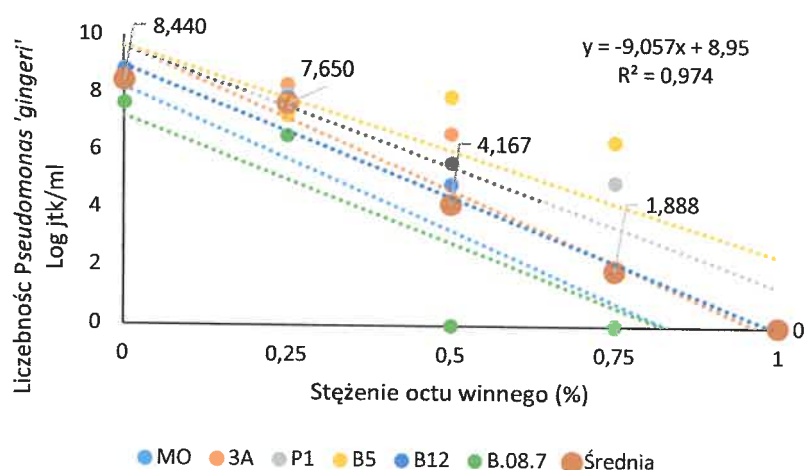
Na wykresach 3 i 4 przedstawiono zależność liczby komórek badanych bakterii w skali logarytmicznej od stężenia octu winnego w pożywce płynnej. Wyniki wskazują na wysoką korelację liczebności komórek bakterii ze stężeniem nadtlenu wodoru, o czym świadczą wysokie współczynniki korelacji $r^2 = 0,957$ i $r^2 = 0,974$. Ponadto średnia liczba bakterii *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'* obniżyła się, odpowiednio, o 2,6 i 4,4 jednostki logarytmiczne przy stężeniu 0,5% octu winnego w stosunku do kontroli (wykres 3 i 4).

Tabela 3. Wzrost i liczba komórek bakterii *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'* w pożywce zawierającej różne stężenia octu winnego

Izolat	Stężenie octu winnego (%) w pożywce					
	Rodzaj pożywki	0,0	0,25	0,5	0,75	1,0
MG	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$2,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$3,9 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	-
B23	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$4,4 \times 10^8$	$8,5 \times 10^7$	$3,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$	-
BO	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$5,3 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	-	-
BI	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$5,5 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	-	-
HA	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$3,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$3,6 \times 10^6$	$2,3 \times 10^4$	-
LE	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$3,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^7$	$2,8 \times 10^6$	-	-
H.4	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$2,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^7$	$7,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	-
	Rodzaj pożywki	0,0	0,25	0,5	0,75	1,0
MO	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$2,5 \times 10^8$	$8,5 \times 10^7$	-	-	-
3A	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$4,1 \times 10^6$	-	-
P1	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$6,5 \times 10^8$	$9,8 \times 10^7$	$4,1 \times 10^5$	$9,2 \times 10^4$	-
B5	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$4,2 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	-
B12	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$6,0 \times 10^8$	$7,4 \times 10^7$	$7,3 \times 10^4$	-	-
B.08-7	płynna	+	+	-	-	-
	stała	$4,5 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	-	-	-



Wykres 3. Zmiana liczby komórek bakterii *Pseudomonas tolaasii* w pożywce zawierającej ocet winny.



Wykres 4. Zmiana liczby komórek bakterii *Pseudomonas 'gingeri'* w pożywce zawierającej ocet winny.

1.2. Skuteczność olejków z ekstraktów roślinnych

W ramach zadania sprawdzono również przydatność piętnastu olejków roślinnych w ograniczaniu rozwoju bakterii odpowiedzialnych za plamistości pieczarki.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki wzrostu bakterii *P. tolaasii* w pożywkach płynnych zawierających badane olejki, a także liczbę bakterii określoną metodą rozcieńczeń. Określano liczebność komórek bakterii w pożywkach, a wynik podawano jako jednostki tworzące kolonie w ml. Wykazano wysoką aktywność bakteriobójczą olejku tymiankowego w stężeniu 0,5% i z drzewa herbacianego w stężeniu 1%. W pożywkach płynnych z dodatkiem tych olejków wszystkie badane bakterie nie wykazywały wzrostu. Słaby wzrost bakterii obserwowano też w pożywkach zawierających olejek eukaliptusowy i goździkowy.

Największy spadek liczby komórek stwierdzono w pożywkach zawierających olejek tymiankowy i z drzewa herbacianego, bo o ponad 3 rzędy wielkości. Spadek liczby komórek obserwowano także w obecności olejku eukaliptusowego i goździkowego dla niektórych izolatów, m.in. MG i B23 (tabela 4).

Tabela 4. Liczba komórek bakterii *P. tolaasii* w pożywkach płynnych zawierających olejki roślinne w stężeniu 1% i 0,5% (olejek z drzewa herbacianego i tymiankowy)

Olejek	Izolaty bakteryjne							
	Pożywka	MG	B23	BO	BI	HA	LE	H.4
Kontrola	płynna	+	+	+	+	+	+	+
	stała	$2,5 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
Olejek z drzewa herbacianego (1%)	płynna	-	-	-	-	-	-	-
	stała	$3,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
Olejek z drzewa herbacianego (0,5%)	płynna	-	-	-	-	-	-	-
	stała	$2,1 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
Olejek tymiankowy (0,5%)	płynna	-	-	-	-	-	-	-
	stała	$1,2 \times 10^6$	$4,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$6,3 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^2$
Olejek anyżowy	płynna	+	+	+	+	+	+	+

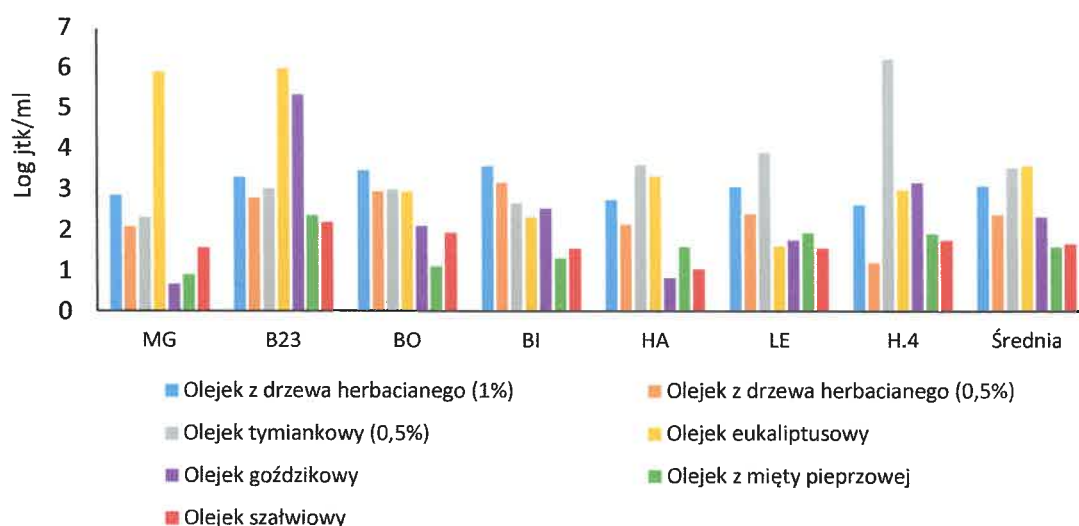
	stała	1,1x 10 ⁸	2,2x 10 ⁷	6,1x 10 ⁷	6,0x 10 ⁵	3,2x 10 ⁷	1,2x 10 ⁸	2,6x 10 ⁷
Olejek cytrynowy	płynna	+	+	+	+	+	+/-	+
	stała	2,4x 10 ⁸	8,2x 10 ⁵	1,8x 10 ⁷	1,7x 10 ⁸	1,8x 10 ⁸	8,4x 10 ⁷	5,7x 10 ⁷
Olejek eukaliptusowy	płynna	-	-	+/-	-	+	-	+/-
	stała	3,0x 10 ²	4,5x 10 ²	6,0x 10 ⁵	2,6x 10 ⁶	1,2x 10 ⁵	8,7x 10 ⁶	2,2x 10 ⁵
Olejek goździkowy	płynna	+	-	-	+	-	+	-
	stała	5,4x 10 ⁷	2,0x 10 ³	4,2x 10 ⁶	1,6x 10 ⁶	3,8x 10 ⁷	6,3x 10 ⁶	1,5x 10 ⁵
Olejek melisowy	płynna	+	+	+	+	+	+	+
	stała	2,2x 10 ⁸	1,2x 10 ⁸	7,9x 10 ⁷	2,4x 10 ⁸	1,8x 10 ⁸	1,2x 10 ⁸	9,2x 10 ⁷
Olejek z mięty pieprzowej	płynna	+	+	+/-	+	+	+/-	+
	stała	3,2x 10 ⁷	1,9x 10 ⁶	4,2x 10 ⁷	2,8x 10 ⁷	6,5x 10 ⁶	4,1x 10 ⁶	2,7x 10 ⁶
Olejek szalwiowy	płynna	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+
	stała	6,8x 10 ⁶	2,8x 10 ⁶	6,2x 10 ⁶	1,6x 10 ⁷	2,3x 10 ⁷	9,8x 10 ⁶	3,9x 10 ⁶
Olejek pichtiowy	płynna	+	+	+	+	+	+	+
	stała	2,0x 10 ⁸	7,7x 10 ⁷	8,0x 10 ⁷	6,5x 10 ⁷	2,7x 10 ⁷	1,8x 10 ⁸	1,2x 10 ⁸
Olejek jałowcowy	płynna	+	+	+	+	+	+	+
	stała	1,2x 10 ⁸	3,3x 10 ⁷	3,2x 10 ⁸	2,3x 10 ⁸	2,7x 10 ⁸	1,1x 10 ⁸	9,6x 10 ⁷
Olejek lawendowy	płynna	+	+	+	+	+	+	+
	stała	1,2x 10 ⁷	2,1x 10 ⁷	3,6x 10 ⁷	2,8x 10 ⁷	4,1x 10 ⁷	1,3x 10 ⁷	1,1x 10 ⁷
Olejek cytronelowy	płynna	+	+	+	+/-	+	+	+
	stała	2,2x 10 ⁸	1,6x 10 ⁸	1,4x 10 ⁸	3,6x 10 ⁸	1,0x 10 ⁸	3,3x 10 ⁸	1,2x 10 ⁸
Olejek cynamonowy	płynna	+	+	-	+	+	-	+
	stała	5,2x 10 ⁷	2,2x 10 ⁷	8,6x 10 ⁶	1,6x 10 ⁸	6,6x 10 ⁷	1,1x 10 ⁷	4,0x 10 ⁷
Olejek lemongrasowy	płynna	+	+	+	+	+	-	+
	stała	4,2x 10 ⁷	8,2x 10 ⁶	5,6x 10 ⁷	9,6x 10 ⁷	1,6x 10 ⁸	2,3x 10 ⁷	2,5x 10 ⁸

* - brak wzrostu bakterii (brak zmętnienia pożywki); + wzrost bakterii (zmętnienie); +/- słaby wzrost bakterii

Na wykresach 5, 6 i 7 przedstawiono różnicę pomiędzy liczbą komórek bakterii *P. tolaasii* (w skali logarytmicznej) w pożywce kontrolnej, a liczbą komórek w pożywkach z badanymi olejkami roślinnymi.

Na wykresie 5 przedstawiono wpływ siedmiu olejków na rozwój bakterii, które wykazały najwyższą aktywność bakteriobójczą. Analizując średnią różnicę liczby komórek stwierdzono, że olejek eukaliptusowy, tymiankowy (0,5%) i z drzewa herbacianego (1%) wykazały najlepszą aktywność, bo średnia liczba komórek bakterii spadła o ponad 3 jednostki logarytmiczne. Najslabiej działały olejki z mięty pieprzowej i szalwii, a średnia liczba komórek w pożywkach z tymi olejkami zmalała o ok. 1,5 jednostki logarytmicznej. Olejek z drzewa herbacianego (0,5%) i goździkowy zahamowały rozwój bakterii o ponad dwa rzędy wielkości - spadek liczby komórek o 2,3 jednostki logarytmiczne.

Analizując poszczególne bakterie *P. tolaasii* stwierdzono bardzo dużą wrażliwość izolatów MG i B23 na olejek eukaliptusowy (zmniejszenie liczby komórek o 6 jednostek), a izolatu B23 także na olejek goździkowy (log jtk/ml spadł o 5,3 jednostki). Bardzo wysoką wrażliwość na olejek tymiankowy stwierdzono też w przypadku izolatu H.4, którego liczba komórek spadła o ponad 6 jednostek logarytmicznych (wykres 5).

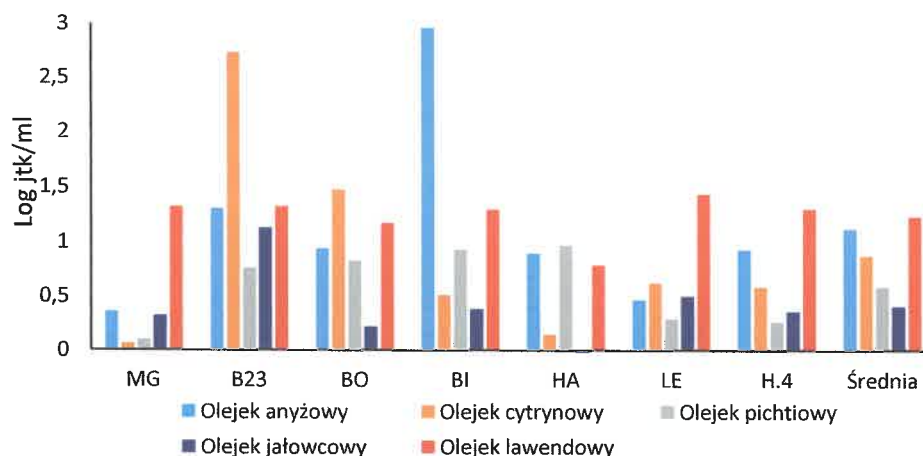


Wykres 5. Skuteczność olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii *P. tolaasii*.

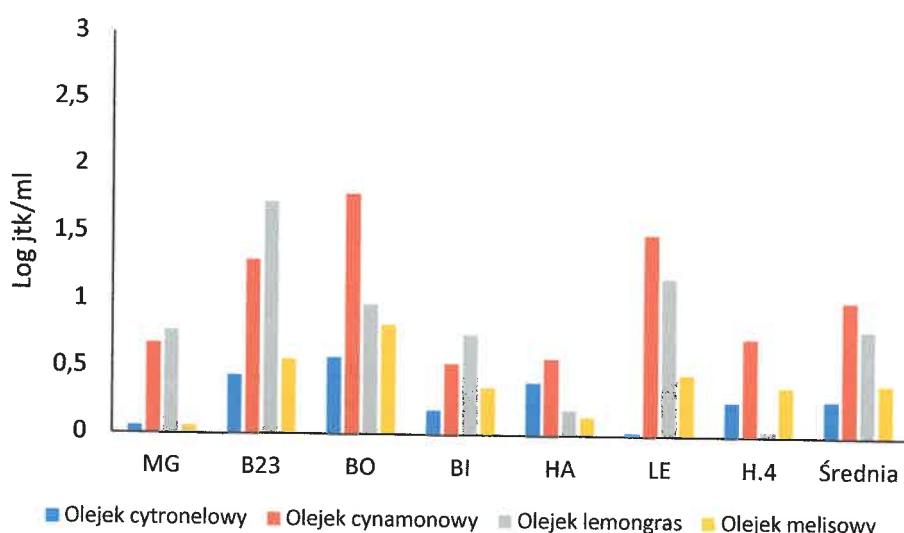
Na wykresie 6 i 7 przedstawiono różnicę pomiędzy liczbą komórek bakterii w kontroli (w skali logarytmicznej), a liczbą w pożywkach zawierających olejki, które wykazały najniższe aktywności bakteriobójcze spośród wszystkich badanych.

Analizując średnią różnicę liczby komórek na obu wykresach stwierdzono zadowalającą skuteczność olejku anyżowego, lawendowego i cynamonowego, gdyż średnia liczba komórek bakterii spadła o jedną jednostkę logarytmiczną. Brak aktywności bakteriobójczej w stosunku do bakterii *P. tolaasii* odnotowano dla olejków pichtiowego, jałowcowego, cytrynowego i melisowego.

Analizując poszczególne izolaty *P. tolaasii* stwierdzono bardzo dużą wrażliwość izolatu B23 na olejek cytrynowy (zmniejszenie liczby komórek o ponad 2,5 jednostki logarytmiczne), a izolatu BI na olejek anyżowy (log jtk/ml spadł o blisko 3 jednostki) – wykres 6. Liczba komórek izolatów B23, BO i LE w pożywce z olejkiem cynamonowym zmniejszyła się o ponad 1,5 jednostki logarytmicznej (wykres 7).



Wykres 6. Skuteczność olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii *P. tolaasii*



Wykres 7. Skuteczność olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii *P. tolaasii*

W tabeli 5 przedstawiono wyniki wzrostu bakterii *P. 'gingeri'* w pożywkach płynnych zawierających badane olejki, a także liczbę bakterii określoną metodą rozcieńczeń w zawiesinach. Ponownie wykazano wysoką aktywność bakteriobójczą olejku tymiankowego w stężeniu 0,5% i z drzewa herbacianego w stężeniu 1%. W pożywkach płynnych z dodatkiem tych olejków wszystkie badane izolaty nie wykazywały wzrostu. Słaby wzrost bakterii obserwowano też w pożywkach zawierających olejki eukaliptusowy, goździkowy, z mięty pieprzowej, lemongrasowy i cynamonowy. Największy spadek liczby komórek stwierdzono w pożywkach zawierających olejek tymiankowy i z drzewa herbacianego, bo od 3 do 5 jednostek logarytmicznych. Liczba komórek izolatów MO, 3A i B.08-7 spadła o 3 jednostki logarytmiczne w pożywce z olejkiem goździkowym, melisowym i z mięty pieprzowej (tabela 5).

Tabela 5. Liczba komórek bakterii *P. 'gingeri'* w pożywkach płynnych zawierających olejki roślinne w stężeniu 1% i 0,5% (olejek z drzewa herbacianego i tymiankowy)

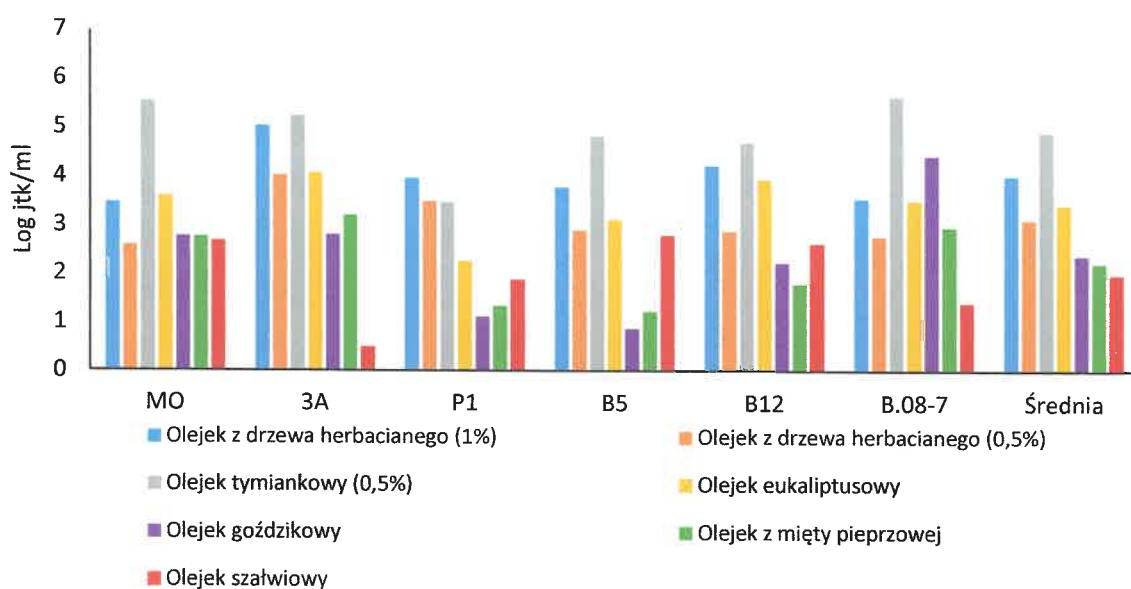
Olejek	Pożywka	Izolaty bakterijny					
		MO	3A	P1	B5	B12	B.08-7
Kontrola	płynna	+	+	+	+	+	+
	stała	$2,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$6,5 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$
Olejek z drzewa herbacianego (1%)	płynna	-	-	-	-	-	-
	stała	$8,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^3$	$7,1 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
Olejek z drzewa herbacianego (0,5%)	płynna	-	-	-	-	-	-
	stała	$6,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$
Olejek tymiankowy (0,5%)	płynna	-	-	-	-	-	-
	stała	$7,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^5$	$6,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$
Olejek anyżowy	płynna	+	+	+	+	+	+
	stała	$7,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	$7,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^7$
Olejek cytrynowy	płynna	+	+	+	+	+	+/-
	stała	$1,9 \times 10^7$	$1,3 \times 10^7$	$1,8 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$
Olejek eukaliptusowy	płynna	-	-	+/-	+/-	-	-
	stała	$6,3 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$	$2,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
Olejek goździkowy	płynna	-	+	+	+	-	+

	stała	$4,2 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$
Olejek melisowy	plynna	-	-	+	+	-	-
	stała	$5,9 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$8,9 \times 10^6$
Olejek z mięty pieprzowej	plynna	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
	stała	$4,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$
Olejek szalwiowy	plynna	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-
	stała	$5,2 \times 10^5$	$6,7 \times 10^7$	$8,5 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$
Olejek pichtiowy	plynna	+	+	+	+	+	+
	stała	$2,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
Olejek jałowcowy	plynna	+	+	+	+	+	+
	stała	$2,0 \times 10^8$	$9,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
Olejek lawendowy	stała	+	+	+	+	+	-
	plynna	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$9,4 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$
Olejek cytronelowy	stała	+	+	+	+/-	+	+
	stała	$1,4 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$	$9,9 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
Olejek cynamonowy	plynna	-	-	+	+	+	-
	stała	$7,6 \times 10^6$	$8,4 \times 10^6$	$3,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$9,6 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
Olejek lemongrasowy	plynna	-	-	+	+	+	-
	stała	$8,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$

* - brak wzrostu bakterii (brak zmętnienia pożywki); + wzrost bakterii (zmętnienie); +/- słaby wzrost

Na wykresach 8, 9 i 10 przedstawiono różnicę pomiędzy liczbą komórek bakterii *P. 'gingeri'* (w skali logarytmicznej) w próbach kontrolnych, a w pożywkach z badanymi olejkami. Analiza wykresu 8 wskazuje na wysoką skuteczność bakteriobójczą olejku tymiankowego i z drzewa herbacianego w stężeniu 1%. Analizując średnią różnicę liczby komórek w pożywkach z tymi olejkami względem kontroli zaobserwowano, że średnia liczba komórek bakterii spadła, odpowiednio, o 5 i 4 jednostek logarytmicznych. Najslabiej działały olejki z szalwii, mięty pieprzowej i goździka, a średnia liczba komórek w pożywkach z tymi olejkami zmniejszyła się o ok. 2 jednostki logarytmiczne. Olejek z drzewa herbacianego (0,5%) i eukaliptusowy zahamowały rozwój bakterii średnio o 3 jednostki logarytmiczne.

Analizując poszczególne bakterie stwierdzono bardzo dużą wrażliwość izolatów MO, 3A i B.08-7 na olejek tymiankowy, a także 3A na olejek z drzewa herbacianego (1%), bo liczba ich komórek spadła o ponad 5 jednostek logarytmicznych. Izolaty P1, B5, B12 okazały się też wysoce podatne na działanie olejku z drzewa herbacianego (1%), a liczba ich komórek spadła o blisko 4 rzędy wielkości. Ponadto rozwój izolatów 3A, B.08-7 i B12 w pożywce z olejkami eukaliptusowym był wyraźnie ograniczony, a liczba komórek spadła blisko o 4 jednostki. Stwierdzono też wysoką wrażliwość izolatu B.08-7 na olejek goździkowy, gdyż liczba komórek spadła o 4,4 jednostek logarytmicznych (wykres 8).

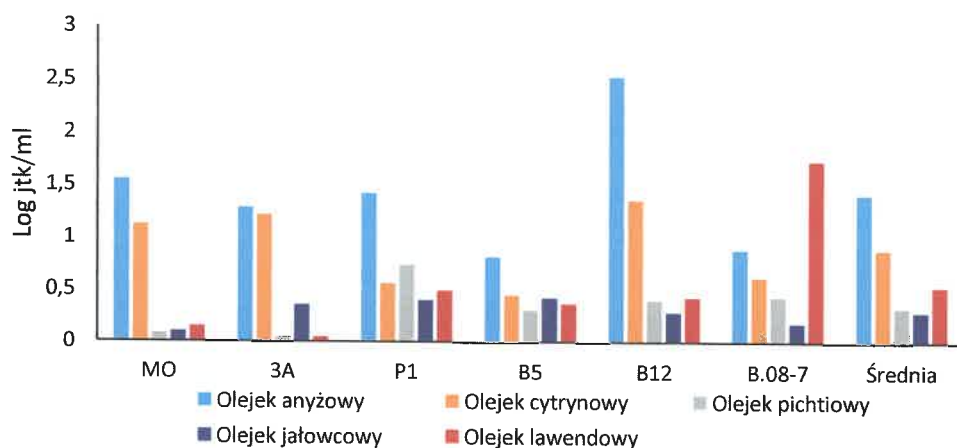


Wykres 8. Skuteczność olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii *P. 'gingeri'*.

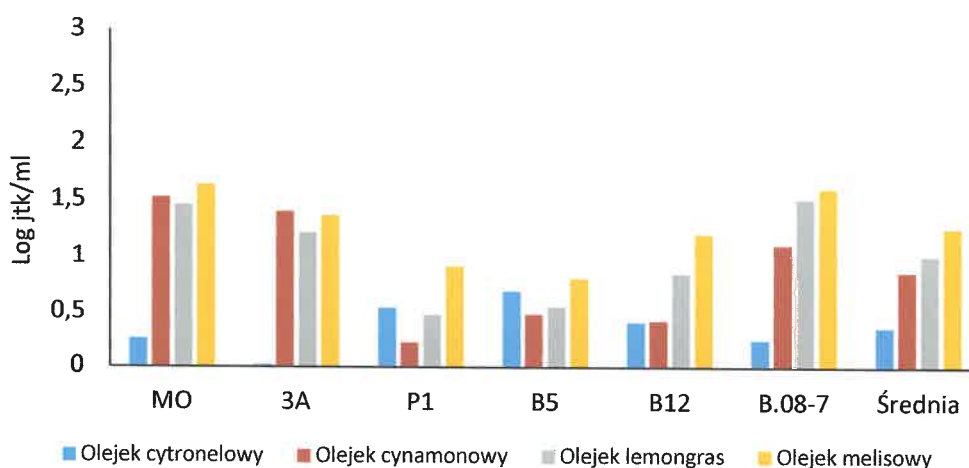
Na wykresie 9 i 10 przedstawiono różnicę pomiędzy liczbą komórek bakterii *P. 'gingeri'* w pożywce kontrolnej (w skali logarytmicznej), a liczbą w pożywkach z dodatkiem olejków, które wykazały najniższe aktywności bakteriobójcze spośród wszystkich badanych.

Analizując średnią liczbę komórek na obu wykresach stwierdzono, że zadowalającą skuteczność względem *P. 'gingeri'* wykazały olejek anyżowy i melisowy, a średnia liczba komórek bakterii spadła o 1,5 jednostek logarytmicznych. Spadek liczby komórek o jeden rząd wielkości obserwowano w pożywkach z olejkami cytrynowym, cynamonowym i lemongrasowym. Brak aktywności bakteriobójczej natomiast stwierdzono dla olejków pichtiowego, jałowcowego, lawendowego i cytronelowego.

Analizując poszczególne izolaty *P. 'gingeri'* stwierdzono bardzo dużą wrażliwość izolatu B12 na olejek anyżowy (zmniejszenie liczby komórek o ponad 2,5 jednostki logarytmiczne) – wykres 9. Ponadto izolaty MO, 3A i B.08-7 wykazały stosunkowo duży spadek liczby komórek, bo blisko o 1,5 jednostek logarytmicznych w pożywce z dodatkiem olejku cynamonowego, lemongrasowego i melisowego (wykres 10).



Wykres 9. Skuteczność olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii *P. 'gingeri'*.



Wykres 10. Skuteczność olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii *P. 'gingeri'*.

2. Skuteczność substancji podstawowych w warunkach uprawowych

W warunkach uprawowych badano skuteczność substancji podstawowych, tj. nadtlenek wodoru oraz ocet winny, które w warunkach laboratoryjnych ograniczały rozwój bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w stężeniach 0,05% (nadtlenek wodoru) oraz 1% (ocet winny). Skuteczność w warunkach uprawowych badano dla wyższych stężeń tych substancji, z uwagi na szybki ich rozkład w środowisku organicznym, równych odpowiednio, 0,1 i 0,5% (nadtlenek wodoru) oraz 2 i 4% (ocet winny), a na okrywę aplikowano je w jednej i dwóch dawkach. Po zainfekowaniu uprawy pieczarki komórkami bakterii z gatunku *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'* w ilości $2,6 \times 10^6$ i $2,6 \times 10^8$ komórek na m^2 okrywy objawy chorobowe w postaci plam i przebarwień na owocnikach, a także zahamowania rozwoju grzybów obserwowano w pierwszym rzucie we wszystkich badanych próbach.

Doświadczenie I

W uprawie infekowanej izolatem *P. tolaasii* w pierwszym rzucie plon owocników zdrowych wynosił $359,3 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ przy liczbie komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy. Uzyskany plon owocników nie różnił się od plonu w próbach kontrolnych, nieinfekowanych (tabela 6). Stwierdzono nieistotne zwiększenie średniego plonu owocników zdrowych w próbach traktowanych badanymi substancjami w wyższym stężeniu. Nasilenie choroby było na poziomie od 5 do 10% w zależności od stosowanej substancji, stężenia i ilości dawek (wykres 11).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy wyniósł $227,0 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych. Uzyskano również wysoki średni plon owocników porażonych, bo $126,3 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Po zastosowaniu substancji podstawowych plon owocników zdrowych nieznacznie wzrósł po zastosowaniu octu winnego. Nasilenie choroby wynosiło około 20–40 % dla nadttlenku wodoru przy stężeniu 0,5% i 25–45% przy stężeniu 0,1%, zaś w przypadku octu winnego 30% przy stężeniu 4% i 26–40 przy stężeniu 2%, przy czym niższe nasilenie objawów obserwowano po zastosowaniu dwóch dawek substancji (wykres 11).

Tabela 6. Plon owocników (kg/m²) w pierwszym rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

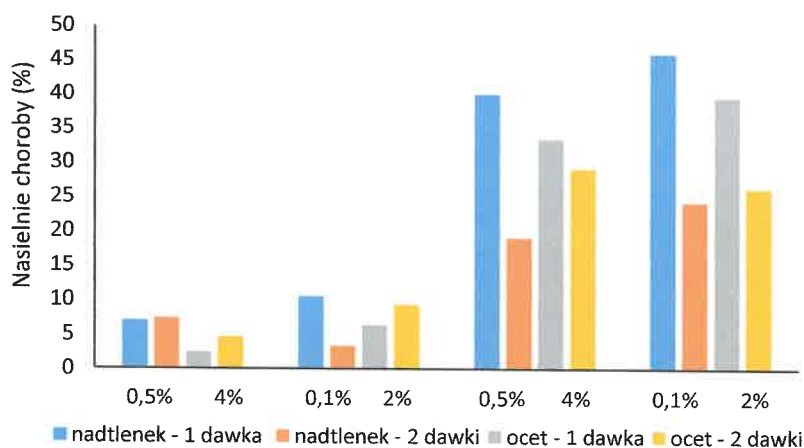
Liczba komórek (jtk/ m ² okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		417,0 A				NIR = 87,4 NIR = 44,9
2,6 x 10 ⁶	zdrowe	359,3 A		359,3 A		359,4 A
	porażone	36,4 B		36,4 B		36,4 B
2,6 x 10 ⁶ + preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	316,7	373,7	434,2	429,5	388,5 A
	porażone	23,5	29,3	10,7	20,8	21,1 B
2,6 x 10 ⁶ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	265,8	335,3	365,3	323,3	322,4 A
	porażone	27,8	11,0	23,0	30,0	22,9 B
Średnia NIR = 87,4 NIR = 44,9	zdrowe	291,3 A	354,5 A	399,7 A	376,4 A	-
	porażone	25,6 B	20,2 B	16,8 B	25,4 B	-
2,6 x 10 ⁸	zdrowe	227,0 B		227,0 B		227,0 B
	porażone	126,3 A		126,3 A		126,3 A
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	194,3	240,3	283,7	263,7	245,5 B
	porażone	130,3	56,5	143,0	108,8	109,6 A
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	161,2	179,0	201,5	259,3	200,2 B
	porażone	138,3	57,5	133,2	92,7	105,4 A
Średnia NIR = 87,4 NIR = 44,9	zdrowe	177,8 B	209,6 B	242,6 B	261,5 B	-
	porażone	134,3 A	57,0 B	138,1 A	100,7 AB	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%



Wykres 11. Nasilenie choroby bakteryjnej wywoływanej przez *P. tolaasii* w pierwszym rzucie (Pierwsza i druga grupa słupków – liczba komórek bakterii - 2,6 x 10⁶; Trzecia i czwarta grupa słupków – liczba komórek bakterii - 2,6 x 10⁸)

W drugim rzucie plon owocników zdrowych wynosił $164,2 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^2$ przy liczbie komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy i był istotnie niższy niż w próbach kontrolnych, nieinfekowanych (tabela 7). Zastosowanie nadtlenu wodoru i octu winnego wpłynęło na zwiększenie plonu owocników zdrowych, a średni plon z upraw traktowanych tymi substancjami równy $232,2 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^2$ był istotnie wyższy niż w próbie zainfekowanej. Nie obserwowano wystąpienia choroby bakteryjnej po zastosowaniu nadtlenu wodoru i octu winnego w wyższych stężeniach i po zastosowaniu nadtlenu wodoru w dwóch dawkach w niższym stężeniu. W pozostałych próbach nasilenie choroby było nie wyższe niż 10% (wykres 12).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy wyniósł $189,5 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^2$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych. Plon owocników porażonych był równy $45,2 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^2$. Po zastosowaniu substancji podstawowych nie obserwowano znaczącego wzrostu plonu owocników zdrowych, jednakże plon owocników porażonych był istotnie niższy niż w próbie kontrolnej, zainfekowanej. Nasilenie choroby wynosiło około 10% dla nadtlenu wodoru w badanych stężeniach przy zastosowaniu 1 dawki, zaś w przypadku octu winnego 4–7% przy stężeniu 4% oraz 10–20% przy stężeniu 2% (wykres 12).

Tabela 7. Plon owocników (kg/m^2) w drugim rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) w zależności od zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

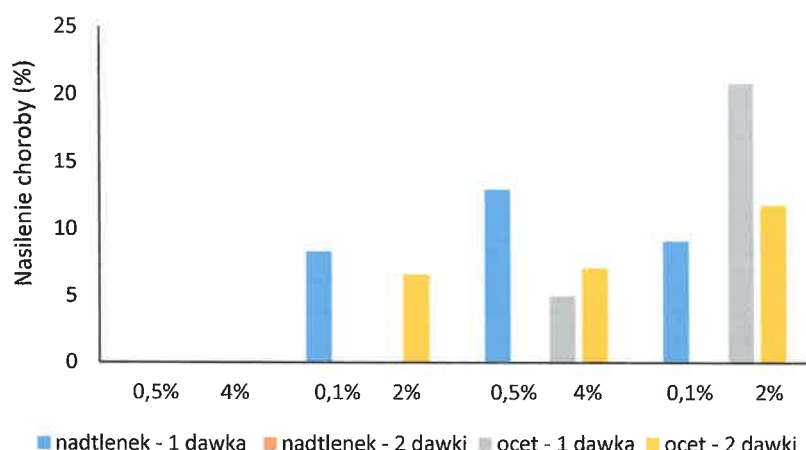
Liczba komórek (jtk/ m^2 okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji $2,6 \times 10^6$	zdrowe	252,0 A				NIR = 62,0
	porażone					NIR = 16,1
$2,6 \times 10^6 +$ preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	164,2	164,2	164,2	164,2	164,2 A
	porażone	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0 A
$2,6 \times 10^6 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	194,7	251,0	248,2	234,7	232,2 B
	porażone	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 A
Średnia NIR = 62,0	zdrowe	232,8	214,3	227,7	211,7	221,6 AB
	porażone	21,1	0,0	0,0	15,0	9,0 A
Średnia NIR = 16,1	zdrowe	213,7 A*	232,6 A	238,0 A	223,2 A	-
	porażone	10,8	0,0	0,0	7,5	-
$2,6 \times 10^8$	zdrowe	189,5	189,5	189,5	189,5	189,5 A
	porażone	45,2	45,2	45,2	45,2	45,2 B
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	228,0	198,3	258,7	198,0	220,7 A
	porażone	34,0	0,0	13,5	15,0	15,6 A
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	201,7	195,0	179,0	127,3	175,7 A
	porażone	20,2	0,0	47,0	17,0	21,1 A
Średnia NIR = 62 NIR = 16,1	zdrowe	214,8 A	196,6 A	218,8 A	162,6 A	-
	porażone	27,1 A	0,0 B	30,2 A	16,0 AB	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%



Wykres 12. Nasilenie choroby bakteryjnej wywoływanej przez *P. tolaasii* w drugim rzucie.

W uprawie inokulowanej izolatem *P. 'gingeri'* w pierwszym rzucie plon owocników zdrowych wynosił $327,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ przy liczbie komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy. Uzyskany plon owocników był niższy niż w próbie kontrolnej, ale statystycznie nieistotny (tabela 8). Po zastosowaniu substancji podstawowych plon owocników zdrowych nieznacznie wzrósł, ale tylko po ich aplikacji w 1 dawce. Ostatecznie średni plon uzyskanych owocników nie był istotnie wyższy niż w próbie infekowanej, kontrolnej. Nasilenie choroby było na poziomie 5% w próbach, gdzie stosowano ocet winny i nieznacznie wyższy w próbach z nadtlaniem wodoru, bo od 10 do 18% w zależności stężenia i ilości dawek (wykres 13).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy był rzędu $287,5 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych, nieinfekowanych. Stwierdzono też wysoki średni plon owocników porażonych równy $105,5 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Po zastosowaniu substancji podstawowych plon owocników zdrowych nie uległ istotnemu zwiększeniu. Nasilenie choroby było stosunkowo wysokie, ok. 25% przy zastosowaniu wyższych stężeń substancji, natomiast przy niższych stężeniach octu winnego stwierdzono nasilenie choroby na poziomie 10–20% (wykres 13).

Tabela 8. Plon owocników (kg/m²) w pierwszym rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas 'gingeri'* (MO) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

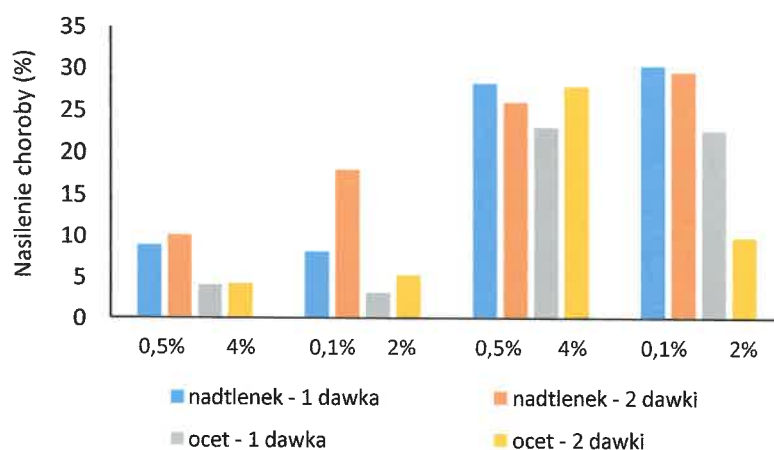
Liczba komórek (jtk/ m ² okrywy)	Stan owochników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		417,0 A				NIR = 93,5 NIR = 28,9
2,6 x 10 ⁶	zdrowe	327,7		327,7		327,7 A
	porażone	45,0		45,0		45,0 A
2,6 x 10 ⁶ + preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	390,5	346,7	364,6	280,7	345,6 A
	porażone	38,0	38,9	15,5	12,5	26,2 A
2,6 x 10 ⁶ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	327,5	294,2	355,5	307,5	321,2 A
	porażone	26,5	52,8	11,2	16,1	26,6 A
Średnia NIR = 90,5 NIR = 28,9	zdrowe	359,0 A	320,4 A	360,1 A	308,6 A	-
	porażone	32,2 AB	45,8 A	13,3 B	14,3 B	-
2,6 x 10 ⁸	zdrowe	287,5		287,5		287,5 A
	porażone	105,5		105,5		105,5 B
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	262,0	263,0	256,5	290,7	268,1 A
	porażone	103,0	92,2	76,5	112,5	96,1 B
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	244,2	280,5	221,5	326,5	268,2 A
	porażone	106,5	118,0	64,7	35,7	81,2 B
Średnia NIR = 90,5 NIR = 28,9	zdrowe	253,1 A	271,7 A	239,0 A	308,6 A	-
	porażone	104,7 B	105,0 B	70,6 C	78,6 BC	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%



Wykres 13. Nasilenie choroby bakteryjnej wywołanej przez *P. 'gingeri'* w pierwszym rzucie.

W drugim rzucie plon owocników zdrowych wynosił 248,2 g · 0,038 m⁻² przy liczbie komórek 2,6 · 10⁶ na m² okrywy (tabela 9). Zastosowanie nadtlenku wodoru i octu winnego nie wpłynęło na zwiększenie plonu owocników zdrowych. Nie obserwowano też zmniejszenia objawów chorobowych

w próbach z badanymi substancjami (wykres 14). We wszystkich próbach nasilenie choroby kształtowało się na poziomie 5–8% w zależności od stosowanej substancji, stężenia i ilości dawek (wykres 14).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy wyniósł $162,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych, bez infekcji. Plon owocników porażonych był równy $47,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Po zastosowaniu substancji podstawowych zaobserwowano zmniejszenie plonu owocników porażonych w próbach, gdzie preparaty stosowano w niższych stężeniach. Ponadto nasilenie choroby było wyższe w próbach, w których zastosowano wyższe stężenia badanych substancji, bo od 10 do 17% dla nadtlenu wodoru i od 6 do 10% dla octu winnego. Nasilenie choroby było niższe przy niższych stężeniach substancji podstawowych, bo od 3 do 9% (wykres 14).

Tabela 9. Plon owocników (kg/m^2) w drugim rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas 'gingeri'*(MO) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

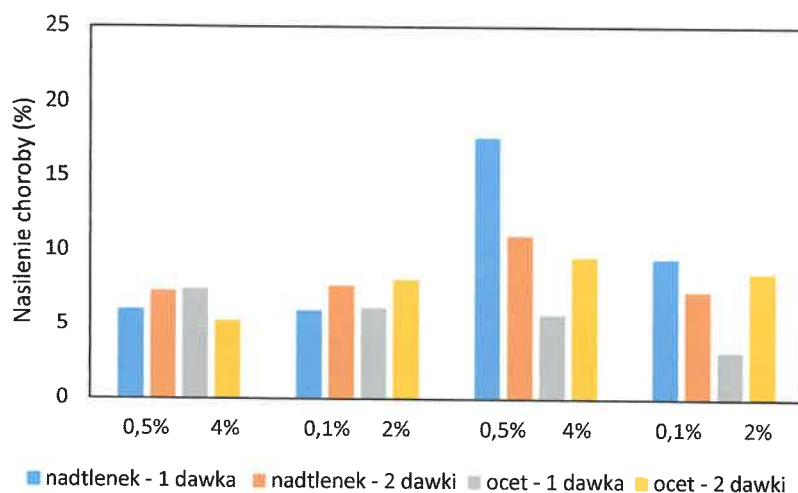
Liczba komórek (jtk/ m^2 okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		252,0 A				NIR = 55,6 NIR = 21,9
$2,6 \times 10^6$	zdrowe	248,2 A		248,2 A		248,2 A
	porażone	27,5		27,5		27,5 AB
$2,6 \times 10^6 +$ preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	250,5	223,7	224,7	187,5	219,3 A
	porażone	16,0	17,5	18,0	10,4	15,5 AB
$2,6 \times 10^6 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	174,0	261,2	236,0	228,0	224,8 A
	porażone	11,0	21,7	15,4	20,0	17,0 AB
NIR = 58,2	zdrowe	212,2 A	242,4 A	230,8 A	207,7 A	-
NIR = 21,9	porażone	13,5 A	19,6 A	16,7 A	15,2 A	-
$2,6 \times 10^8$	zdrowe	162,7 B		162,7 B		162,7 B
	porażone	47,7		47,7		47,7 A
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	154,2	193,6	257,7	189,0	198,6 AB
	porażone	33,0	24,0	15,5	20,0	23,1 AB
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	172,0	199,2	226,4	162,7	190,1 B
	porażone	18,0	15,6	7,6	15,2	14,1 B
Średnia NIR = 55,6	zdrowe	163,1 B	196,4 AB	212,1 AB	175,8 B	-
NIR = 21,9	porażone	25,5 A	19,8 A	11,5 A	17,6 A	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

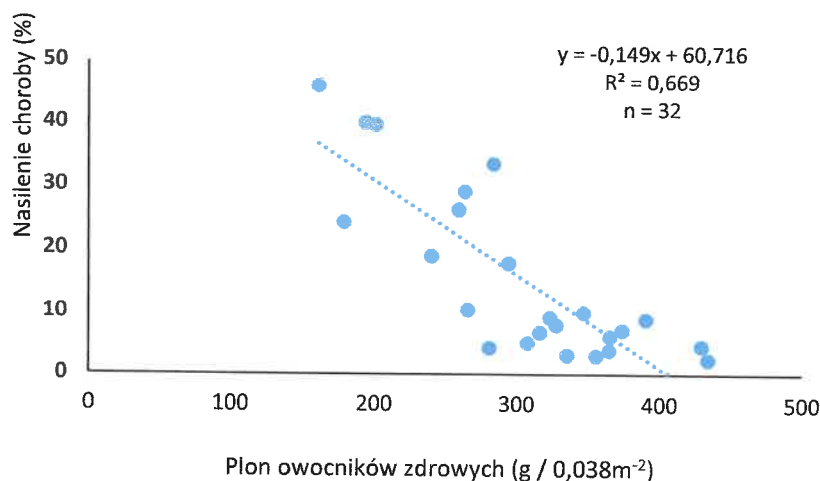
* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenu wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%

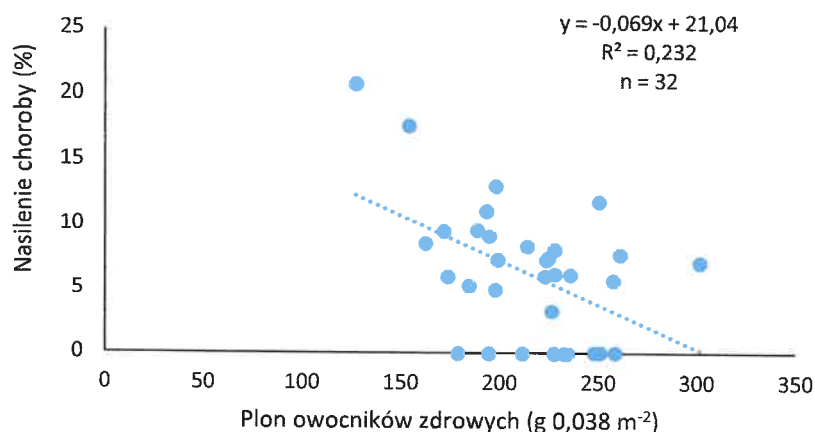


Wykres 14. Nasilenie choroby bakteryjnej wywoływanej przez *P. 'gingeri'* w drugim rzucie.

Na podstawie wyznaczonej krzywej zależności plonu owocników zdrowych od nasilenia chorób bakteryjnych (dla obu badanych izolatów) w pierwszym rzucie, można odczytać wysoką korelację między danymi, $r = 0,817$ ($r^2 = 0,669$) (wykres 15). Wysokie nasilenie objawów chorobowych koreluje z niskim plonem owocników zdrowych. Natomiast w drugim rzucie korelacja ta jest wyraźnie mniejsza, a współczynnik regresji wyniósł $r = 0,482$ ($r^2 = 0,232$), co wskazuje, że plon owocników zdrowych zależał też od innych czynników (wykres 16). Ponadto należy zauważyć, że nasilenie objawów choroby jest obliczone na podstawie plonu owocników porażonych. W drugim rzucie obserwowano większe zamieranie owocników, co wpłynęło na mniejsze plony zarówno owocników zdrowych, jak i porażonych.



Wykres 15. Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby w I rzucie .



Wykres 16. Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby w II rzucie

Doświadczenie II

W uprawie infekowanej izolatem *P. tolaasii* w pierwszym rzucie plon owocników zdrowych wynosił $421,5 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ przy liczbie komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy i był istotnie niższy od plonu w próbach kontrolnych, nieinfekowanych (tabela 10). Zastosowanie substancji podstawowych wpłynęło istotnie na zwiększenie plonu owocników zdrowych, który wyniósł $491,3 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ (przy wyższych stężeniach). Nasilenie choroby (4%) było najniższe po zastosowaniu octu winnego w stężeniu 4%. W pozostałych kombinacjach nasilenie plamistości bakteryjnej było na poziomie 8 – 12% w zależności od stosowanej substancji, stężenia i ilości dawek (wykres 17).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy wyniósł $291,0 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych. Uzyskano również wysoki średni plon owocników porażonych, bo $167,5 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. W próbach gdzie aplikowano badane substancje obserwowano wyraźny wzrost owocników zdrowych, a średni plon wynosił 386,0 i 412,9 g na $0,038 \text{ m}^2$, odpowiednio przy niższym i wyższym stężeniu substancji. Nasilenie choroby wynosiło 14–20% dla nadtlenu wodoru przy stężeniu 0,5% i ponad 20% przy stężeniu 0,1%, zaś w przypadku octu winnego 30% przy stężeniu 4% i 20–25% przy stężeniu 2% (wykres 17).

Tabela 10. Plon owocników (kg/m²) w pierwszym rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

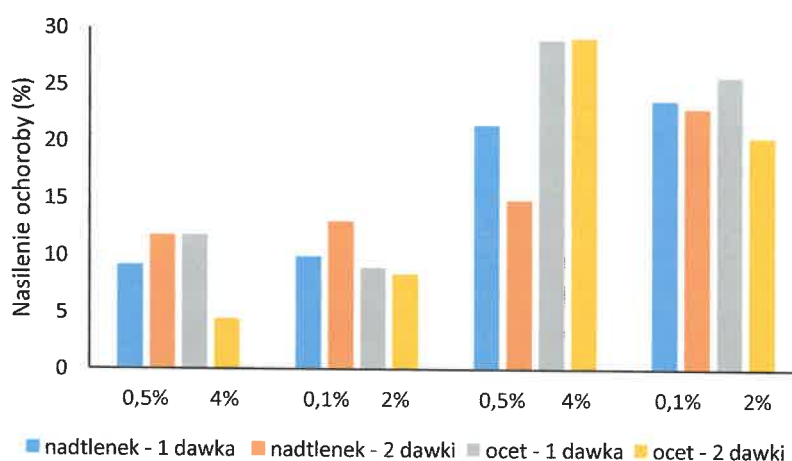
Liczba komórek (jtk/ m ² okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		513,7 A				NIR = 87,8
2,6 x 10 ⁶						NIR = 37,8
	zdrowe	421,5		421,5		421,5 B
	porażone	79,5		79,5		79,5 A
2,6 x 10 ⁶ + preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	502,2	480,7	471,2	510,2	491,3 AB
	porażone	50,7	64,2	63,0	23,7	51,1 A
2,6 x 10 ⁶ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	458,0	441,7	436,2	461,2	449,3 AB
	porażone	50,5	66,0	42,7	42,4	50,4 A
Średnia NIR = 87,8	zdrowe	480,1 A	461,2 A	453,7 A	485,7 A	-
Średnia NIR = 37,8	porażone	50,6	64,1	52,8	33,0	-
2,6 x 10 ⁸	zdrowe	291,0		291,0		291,0 B
	porażone	167,5		167,5		167,5
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	403,7	398,7	358,5	383,2	386,0 A
	porażone	110,2	69,5	146,4	157,7	120,9
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	374,7	412,7	481,7	382,7	412,9 A
	porażone	116,2	123,0	167,5	98,2	126,2
Średnia NIR = 87,8	zdrowe	389,2 AB	405,7 A	420,1 A	382,9 AB	-
NIR = 37,8	porażone	113,2 AB	96,2 B	156,9 A	127,9 AB	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%



Wykres 17. Nasilenie choroby bakteryjnej wywołanej przez *P. tolaasii* w pierwszym rzucie (Pierwsza i druga grupa słupków – liczba komórek bakterii - 2,6 x 10⁶; Trzecia i czwarta grupa słupków – liczba komórek bakterii - 2,6 x 10⁸)

W drugim rzucie plon owocników zdrowych wynosił 331,0 g · 0,038 m⁻² przy liczbie komórek *P. tolaasii* równej 2,6 · 10⁶ na m² okrywy (tabela 11). Zastosowanie nadtlenku wodoru i octu winnego nie wpłynęło na zwiększenie plonu owocników zdrowych. Nie obserwowano zmniejszenia objawów

chorobowych w próbach z badanymi substancjami, z wyjątkiem kombinacji z octem winnym w stężeniu 2%, gdzie nie stwierdzono owocników porażonych (wykres 18, tabela 11). W pozostałych uprawach nasilenie choroby było na poziomie 5–8% w zależności od stosowanej substancji, stężenia i ilości dawek (wykres 18).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy był rzędu $302,0 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych, bez infekcji. Plon owocników porażonych wynosił $73,2 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Plon owocników zdrowych nie wzrósł po zastosowaniu substancji podstawowych, natomiast zaobserwowano zmniejszenie plonu owocników porażonych w próbach, gdzie je aplikowano w niższych stężeniach. Nasilenie choroby było wyższe w próbach, w których zastosowano wyższe stężenia badanych substancji, bo od 12 do 16% w zależności od substancji, zaś przy niższych stężeniach nasilenie objawów kształtowało się od 7 do 12% (wykres 18).

Tabela 11. Plon owocników (kg/m^2) w drugim rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

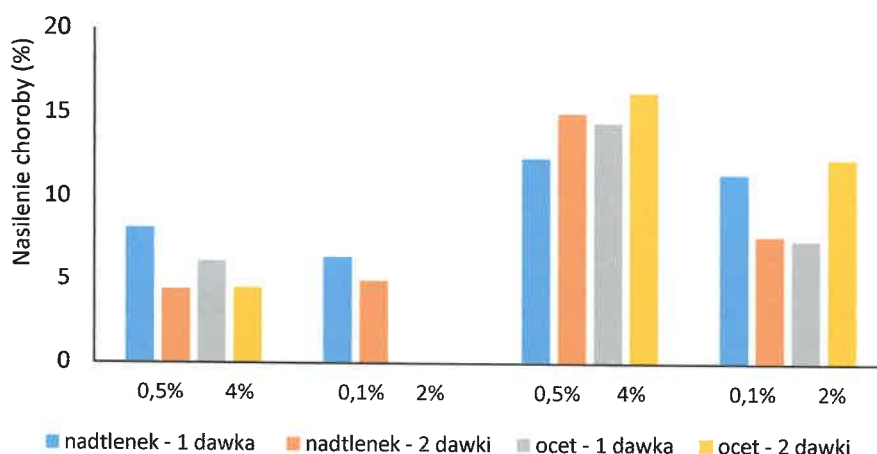
Liczba komórek (jtk/ m^2 okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		386,5 A				NIR = 70,1 NIR = 24,0
$2,6 \times 10^6$	zdrowe	331,0		331,0		331,0 A
	porażone	24,7		24,7		24,7 A
$2,6 \times 10^6 +$ preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	323,7	315,2	306,0	327,5	318,1 A
	porażone	28,7	14,5	20,0	15,5	19,7 A
$2,6 \times 10^6 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	322,0	356,5	386,0	346,5	352,7 A
	porażone	22,0	18,5	0,0	0,0	10,1 A
Średnia NIR = 70,1	zdrowe	322,8 A	335,8 A	346,0 A	337,0 A	-
Średnia NIR = 24,0	porażone	25,3 A	16,5 A	10,0 A	7,8 A	-
$2,6 \times 10^8$	zdrowe	302,0		302,0		302,0 A
	porażone	73,2		73,2		73,2 B
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	308,5	342,5	304,5	328,0	320,4 A
	porażone	43,5	60,5	51,5	63,7	57,3 BC
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	314,2	319,5	295,8	349,2	327,2 A
	porażone	40,6	26,5	23,7	49,2	35,0 C
Średnia NIR = 70,1	zdrowe	311,4 A	331,0 A	300,2 A	338,6 A	-
NIR = 24,0	porażone	42,0 A	43,3 A	37,6 A	56,5 A	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%



Wykres 18. Nasilenie choroby bakteryjnej wywoływanej przez *P. tolaasii* w drugim rzucie.

W uprawie infekowanej izolatem *P. 'gingeri'* w pierwszym rzucie plon owocników zdrowych wynosił $491,2 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ przy liczbie komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy i nie był niższy od plonu w próbach kontrolnych, nieinfekowanych (tabela 12). Zastosowane substancje podstawowe nie miały istotnego wpływu na przebieg choroby przy tej liczbie komórek bakterii, a plon owocników zdrowych w tych próbach był porównywalny do plonu w próbach infekowanych. Nasilenie choroby było niskie i wynosiło od 3 do 8% w zależności od stosowanej substancji, stężenia i ilości dawek (wykres 19).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy wyniósł $385,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych i przy niższym inokulum komórek *P. 'gingeri'*. Średni plon owocników porażonych wyniósł $163,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Substancje zastosowane w niższych stężeniach wpłynęły na zmniejszenie liczby owocników porażonych, a średni plon tych grzybów wyniósł $116,6 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Nasilenie choroby wynosiło ok. 15%, gdy zastosowano dwie dawki badanych substancji w niskich stężeniach, podczas gdy ponad 20% w pozostałych kombinacjach (wykres 19).

Tabela 12. Plon owocników (kg/m²) w pierwszym rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas 'gingeri'* (MO) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

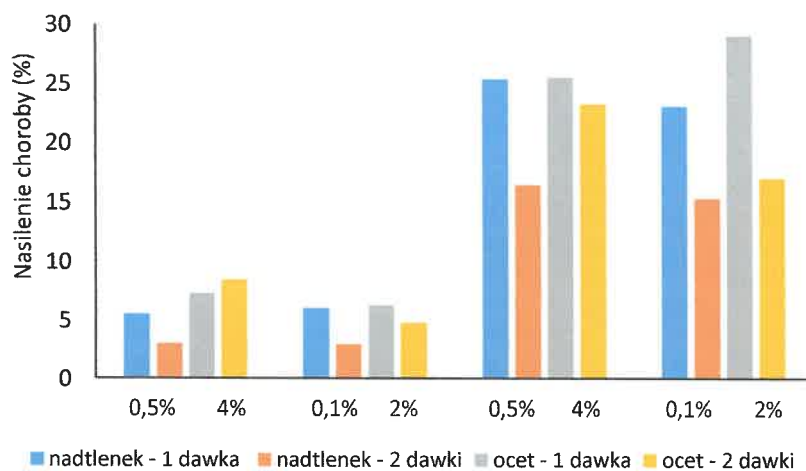
Liczba komórek (jtk/ m ² okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		513,7 A				NIR = 64,6 NIR = 27,5
2,6 x 10 ⁶	zdrowe	491,2		491,2		491,2 AC
	porażone	44,5		44,5		44,5 A
2,6 x 10 ⁶ + preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	518,7	526,2	491,5	534,5	517,7 A
	porażone	30,2	16,0	38,5	49,2	33,5 A
2,6 x 10 ⁶ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	494,6	521,5	497,2	519,0	508,1 A
	porażone	31,5	15,5	33,2	26,0	26,6 A
Średnia NIR = 70,1	zdrowe	506,6 A	523,8 A	494,4 A	526,7 A	-
Średnia NIR = 27,5	porażone	30,8 A	15,7 A	35,8 A	37,6 A	-
2,6 x 10 ⁸	zdrowe	385,7 B		385,7 B		385,7 B
	porażone	163,7		163,7		163,7 B
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	438,7	460,3	440,5	430,5	442,5 BC
	porażone	149,1	90,5	151,0	130,2	130,2 BC
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	457,2	424,2	400,2	436,6	429,5 BC
	porażone	136,5	76,5	164,0	89,5	116,6 C
Średnia NIR = 64,6	zdrowe	447,9 B	442,2 B	420,4 B	433,5 B	-
NIR = 27,5	porażone	142,8 A	78,5 B	167,5 A	109,8 B	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%



Wykres 19. Nasilenie choroby bakteryjnej wywoływanej przez *P. 'gingeri'* w pierwszym rzucie.

W drugim rzucie plon owocników zdrowych wynosił 335,2 g · 0,038 m² przy inokulum komórek *P. 'gingeri'* 2,6 · 10⁶ na m² okrywy (tabela 13) i był porównywalny do próby nieinfekowanej, co świadczyło małym nasileniu plamistości imbirowej. Zastosowanie badanych substancji nie miało więc istotnego wpływu na przebieg choroby, której nasilenie wynosiło od 3 do 5% (wykres 20).

Plon owocników zdrowych przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy był rzędu $258,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$ i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych, bez infekcji. Plon owocników porażonych równał się $67,7 \text{ g} \cdot 0,038 \text{ m}^{-2}$. Stwierdzono nieznaczne zwiększenie plonu owocników zdrowych po zastosowaniu badanych substancji (zwłaszcza przy niższym stężeniu), który nie był istotnie wyższy niż plon w próbie zainfekowanej, ale porównywalny z plonem, który uzyskano przy niższym inokulum infekcyjnym. Plon owocników porażonych istotnie zmniejszył się w próbach z substancjami podstawowymi, zwłaszcza, gdzie zastosowano dwie dawki (tabela 13). Nasilenie choroby było najniższe (4%) w próbach, w których zastosowano podwójne dawki octu winnego, a najwyższe (15%) przy dwóch dawkach nadtlenku wodoru, niezależnie od stężenia (wykres 20).

Tabela 13. Plon owocników (kg/m^2) w drugim rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas 'gingeri'* (MO) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

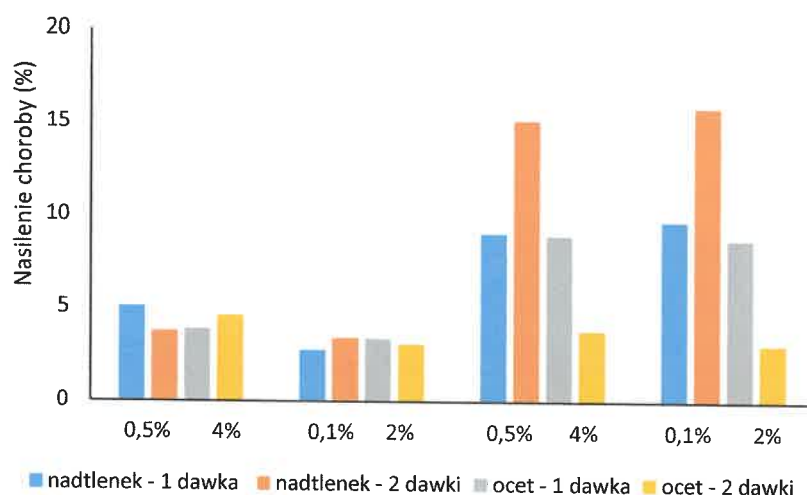
Liczba komórek (jtk/ m^2 okrywy)	Stan owocników	Badania substancja				Średnia
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny		
		1 dawka	2 dawki	1 dawka	2 dawki	
Kontrola bez infekcji		386,5 A				NIR = 76,0 NIR = 19,7
$2,6 \times 10^6$	zdrowe	335,2		335,2		335,2 A
	porażone	18,5		18,5		18,5 A
$2,6 \times 10^6 +$ preparat** (0,5%; 4%)	zdrowe	339,7	333,7	337,5	334,4	336,3 A
	porażone	18,0	13,0	13,5	16,0	15,1 A
$2,6 \times 10^6 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	355,7	390,5	323,5	355,2	356,2 A
	porażone	10,0	13,7	11,2	11,3	11,6 A
Średnia NIR = 70,1	zdrowe	347,7 A	362,1 A	330,5 A	344,8 A	-
Średnia NIR = 19,7	porażone	14,0	13,4	12,4	13,6	-
$2,6 \times 10^8$	zdrowe	258,7 B		258,7 B		258,7 B
	porażone	67,7		67,7		67,7 B
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,5%; 4%)	zdrowe	297,5	311,5	257,6	249,5	279,0 AB
	porażone	22,5	29,2	55,7	15,2	30,6 C
$2,6 \times 10^8 +$ preparat (0,1%; 2%)	zdrowe	298,0	326,0	319,5	326,8	317,6 AB
	porażone	28,8	51,5	27,8	10,0	29,5 C
Średnia NIR = 76,0	zdrowe	297,7 A	318,7 A	288,5 A	288,1 A	-
NIR = 19,7	porażone	25,6 AB	40,3 A	41,7 A	12,6 B	-

Objaśnienia:

* średnie w kolumnach w obrębie stanu owocników, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

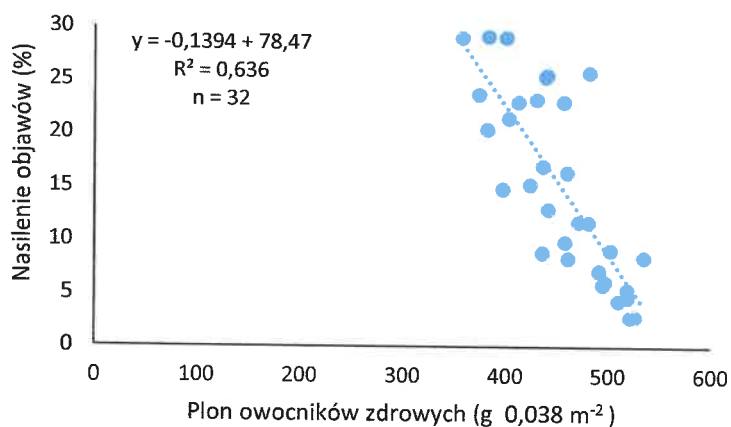
* średnie w wierszach, oznaczone tą samą lit oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

**preparat: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,5% i 0,1%; ocet winny stosowany w stężeniach 4% i 2%

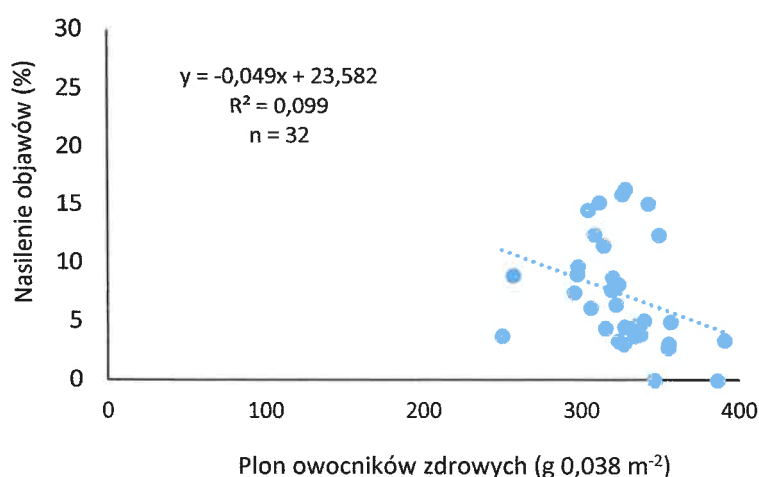


Wykres 20. Nasilenie choroby bakteryjnej wywoływanej przez *P. 'gingeri'* w drugim rzucie.

Na podstawie wyznaczonej krzywej zależności plonu owocników zdrowych od nasilenia plamistości bakteryjnych (dla obu badanych izolatów) w pierwszym rzucie, można odczytać wysoką korelację między danymi, $r = 0,797$ ($r^2 = 0,636$) (wykres 21). Wysokie nasilenie symptomów koreluje z niskim plonem owocników nieporażonych. Natomiast w drugim rzucie korelacja była niska, a współczynnik regresji wyniósł $r = 0,315$ ($r^2 = 0,099$), co wskazuje, że plon owocników zdrowych zależał też od innych czynników (wykres 21). Analogiczne wyniki uzyskano w pierwszym cyku doświadczalnym.



Wykres 21. Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby w I rzucie



Wykres 22. Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby w II rzucie

Wnioski

1. Wykazano aktywność bakteriobójczą i bakteriostatyczną badanych substancji podstawowych, tj. nadtlenu wodoru i octu winnego względem 13 izolatów z gatunku *Pseudomonas tolaasii* i *Pseudomonas 'gingeri'*.
2. Liczba komórek bakterii *P. tolaasii* przy stężeniu 0,02% nadtlenu wodoru uległa zmniejszeniu o 2 jednostki logarytmiczne, a *P. 'gingeri'* o 1,6 jednostki. Całkowite zahamowanie rozwoju bakterii obserwowano przy stężeniu 0,04 – 0,05%.
3. Ocet winny w stężeniu 0,5 – 0,75% ograniczał rozwój bakterii, a liczebność komórek bakterii przy stężeniu 0,5% dla bakterii *P. tolaasii* i *P. 'gingeri'* obniżyła się, odpowiednio, o 2,6 i 4,4 jednostki logarytmiczne w stosunku do kontroli. Całkowite zahamowanie rozwoju bakterii obserwowano przy stężeniu 1%.
4. Najwyższą aktywność bakteriobójczą wykazano dla olejku tymiankowego w stężeniu 0,5% i z drzewa herbacianego w stężeniu 1%. W pożywkach zawierających w/w olejki obserwowano spadek liczby komórek *P. tolaasii* o ponad 3 jednostki logarytmiczne, a *P. 'gingeri'* o 3–5 jednostek.
5. Wysoką aktywnością charakteryzowały się także olejki eukaliptusowy, goździkowy i z mięty pieprzowej, które hamowały rozwój bakterii na poziomie 2–3 jednostki logarytmiczne w zależności od izolatu.
6. Brak aktywności bakteriobójczej w stosunku do badanych bakterii stwierdzono dla olejków pichtiowego, jałowcowego i cytronelowego.
7. Badane substancje podstawowe, tj. nadtlenek wodoru i ocet winny, w warunkach uprawowych wykazały zróżnicowaną skuteczność w hamowaniu rozwoju plamistości bakteryjnej pieczarki, w zależności od rzutu owocników, liczby komórek bakterii i stosowanych stężeń.
8. W uprawie infekowanej bakteriami w ilości komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy nasilenie plamistości bakteryjnej w pierwszym i drugim rzucie owocników było stosunkowo nieduże, bo wynosiło od 3 do 10% w zależności od izolatu, od stosowanej substancji, stężenia i ilości dawek. Zastosowanie badanych substancji nie miało więc istotnego wpływu na przebieg choroby, jednakże obserwowano kombinacje traktowane octem winnym w niskim stężeniu, w których nie stwierdzano objawów choroby.
9. W uprawie infekowanej izolatem *P. tolaasii* w ilości komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy plon owocników zdrowych był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych. Po zastosowaniu substancji podstawowych obserwowano nieznaczny wzrost plonu owocników zdrowych. Ponadto średni plon owocników porażonych z prób traktowanych badanymi substancjami był istotnie niższy niż próbie zainfekowanej. W pierwszym rzucie nasilenie choroby w tych kombinacjach wynosiło 20–45 % w zależności od izolatu, od substancji, stężenia i ilości

dawek, natomiast w drugim rzucie nasilenie objawów było poniżej 20% i było istotnie niższe niż w próbie infekowanej.

10. W uprawie infekowanej izolatem *P. 'gingeri'* w ilości komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m² okrywy w pierwszym i drugim rzucie plon owocników zdrowych był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych, nieinfekowanych. Po zastosowaniu substancji podstawowych plon owocników zdrowych nie uległ istotnemu zwiększeniu, jednakże obserwowano w tych próbach zmniejszenie liczby owocników porażonych. W pierwszym rzucie nasilenie choroby było rzędu 10–25%, przy czym przy niższych stężeniach substancji odnotowywano mniejsze nasilenie objawów plamistości imbirowej. W drugim rzucie plamistość występowała w mniejszym nasileniu, bo od 3 do 17% i przy niższych dawkach substancji objawy chorobowe były słabsze.
11. Wyznaczono wysoką zależność między plonem owocników zdrowych a nasileniem choroby w pierwszym rzucie, natomiast w drugim korelacja była wyraźnie niższa co wskazuje, że na plon owocników w drugim rzucie wpływają też inne czynniki, nie tylko wystąpienie choroby bakteryjnej.
12. Zastosowanie nadtlenu wodoru i octu winnego do ograniczenia plamistości bakteryjnej pieczarki jest alternatywą dla innych chemicznych metod ochrony, a przede wszystkim może być wykorzystane w ekologicznej uprawie pieczarki.

Literatura

- Abou-Zeid M.A. 2012. Pathogenic variation in isolates of *Pseudomonas* causing the brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Brazilian Journal of Microbiology 43(3): 1137–1146.
- Bruno G.L., Corato U.D., Rana G.L., Luca P.D., Pipoli V., Lops R., Scarola L., Manneruccia F., Piscitelli L., Cariddi C. 2015. Suppressiveness of white vinegar and steam-exploded liquid waste against the causal agents of *Pleurotus eryngii* yellowing. Crop Protection, 70: 61-69.
- Dawoud M.E.A., Eweis M. 2006. Phytochemical control of edible mushrooms pathogenic bacteria. J. Food Agr. Environ. 4(1): 321-324.
- Dezfooli N. A., Hasanzadeh N., Rezaee M.B., Ghasemi A. 2012. Antibacterial activity and chemical compositions of *Chamaemelum nobile* essential oil/extracts against *Pseudomonas tolaasii*, the causative agent of mushroom brown blotch. Annals of Biological Research, 3 (6): 2602-2608.
- Fermor T.R., Lynch J.M. 1988. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*: Screening, isolation and characterization of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). J. Appl. Microbiol. 65: 179-187.
- Fletcher J. T., Gaze R. H. 2008. Mushroom Pest and Disease Control: A Colour Handbook. Manson Publishing LTD, London, 192 pp.
- Gill W.M. 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. Rep. Tottori Mycol. Ins. 33: 34-55
- Górski, R. 2004. Effectiveness of natural essential oils added to yellow sticky traps in the monitoring of sciarid flies [Sciaridae]. Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Ogrodnictwo, 38: 43-48.
- Krzywicka H., Bielicka A., Janowska J., Jaszczuk E., Tadeusiak B. 1982. Metody badania aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych. Wydawnictwo metodyczne PZH
- Matyjaszyk E., Szulc M. 2017. Protection possibilities of organic crops using plant oils in the European Union, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 62 (4):7-12
- Motała R. 2018. Wykaz środków ochrony roślin do produkcji ekologicznej. <https://www.ior.poznan.pl/19,wykaz-srodkow-ochrony-roslin-do-produkcji-ekologicznej>
- Olivier J.M., Mamoun M., Munsch P. 1997. Standardization of the a method to assess mushroom blotch resistance in cultivated and wild *Agaricus bisporus* strains. Canadian Journal of Plant Pathology 19: 36–42
- Paine S.G. 1919. Studies in bacteriosis. II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Appl. Biol.* 5: 206-219.
- Regnier T., Combrinck S. 2010. In vitro and in vivo screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. South African Journal of Botany, 76 (4): 681-685.

- Soković M., Van Griensven L.J.L.D. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 116(3): 211-224.
- Soler-Rivas C., Arpin N., Oliver J.-M., Wichers H.J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (5): 591-614.
- Soler-Rivas C., Arpin N., Oliver J.-M., Wichers H.J. 2000. Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycol. Res.* 104: 351-356.
- Soler-Rivas C., Garcia-Rosado A., Polonia I., Junca-Blanch G., Marin F.R., Wichers H.J. 2006. Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 57(1): 37-44.
- Szafranek P., Lewandowski M. 2018. Zwalczanie muchówek w uprawie pieczarki metodą integrowaną – kierunki badań. *Biuletyn Producenta Pieczarek Pieczarki* 1: 48-51.
- Szumigaj-Tarnowska J., Uliński Z., Ślusarski C. 2012. Skuteczność wybranych preparatów dezynfekcyjnych w zwalczaniu patogenicznej bakterii *Pseudomonas tolaasii*. *Postępy w ochronie roślin/Progress in Plant Protection*, 52 (3): 701-706.
- Szymański J., Savage D.K., Głowacki J. 2000. Chlorine dioxide as new form chlorine for prophylaxis and controlling bacterial diseases and general disinfection AT cultivated mushroom house. *Proceedings of the XVth Czech and Slovak Plant Protection Conference*. Brno. 12-14.09.2000.
- Szymański J., Szudyga K. 2004. Wpływ niektórych preparatów dezynfekcyjnych na bakterie powodujące miękką zgniliznę pieczarki. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 497: 735-742.
- Tolaas A.G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5: 5.
- Wang G., Gong Y., Huang Z., Bian Y. 2016. Identification of and antimicrobial activity of plant extracts against *Pseudomonas putida* from rot fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. *Scientia Horticulturae*, 212 (22): 235-239
- Wong W.C., Preece T.F. 1980. *Pseudomonas tolaasi* in Mushroom Crops: A note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 305-314.
- Wong W.C., Preece T.F. 1982. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: numbers of the bacterium and symptom development on mushrooms grown in various environments after artificial inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 87-96.
- Xing K., Zhu X., Peng X., Qin S. 2014. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2):569-588

Zalecenia dla warzywnictwa ekologicznego

Badania wykonane w ramach projektu przyczyniły się do określenia wpływu substancji podstawowych oraz olejków roślinnych do ograniczania rozwoju bakterii patogenicznych w uprawie ekologicznej pieczarki. Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące zalecenia:

1. Nieodłączną zasadą ochrony ekologicznej uprawy pieczarki przed chorobami bakteryjnymi są następujące metody agrotechniczne, na które składają się m.in.:
 - używanie sprawdzonych, wolnych od patogenów okryw pieczarkowych,
 - wyposażenie fal uprawowych w odpowiednie, sterylne filtry,
 - codzienna lustracja upraw, w celu szybkiego wykrycia infekcji i szybkiego reagowania,
 - zachowanie odpowiednich parametrów uprawowych (mikroklimatu) w halach, aby nie stwarzać warunków sprzyjających rozwojowi infekcji.
2. Celem ograniczenia chorób bakteryjnych w ekologicznej uprawie pieczarki zaleca się zastosowanie z ostatnią wodą podlewającą nadtlenuk wodoru w stężeniu 0,1% bądź ocet winny w stężeniu 1-2%.
3. Zapewnienie odpowiednich warunków uprawowych w halach, tj. optymalna wilgotność powietrza i temperatura w hali. Zaburzenia równowagi między temperaturą powietrza a temperaturą owocników, prowadzą do wzrostu ich wilgotności, a to jest przyczyną szybkiego namnażania się bakterii patogenicznych na powierzchni grzybów. Woda na owocnikach skrapla się, gdy temperatura punktu rosy (temperatura, w której para wodna w powietrzu przy określonym ciśnieniu staje się nasycona, a poniżej której staje się przesycona i skrapla się) jest wyższa niż temperatura powierzchni owocnika. W wilgotnych pomieszczeniach, ogrzewanie temperatury powietrza powoduje wzrost temperatury punktu rosy. Podgrzewanie temperatury pomieszczenia, należy rozpocząć jeszcze przed zabiegiem podlewania uprawy, w warunkach średniej wilgotności względnej, co ułatwia potem proces parowania wody z owocników bez kondensacji pary wodnej na grzybach.
4. Przestrzeganie higieny w całym obiekcie oraz jego otoczeniu. Używanie zdezynfekowanego sprzętu do zbierania grzybów, czystych skrzynek, pojemników, wózków i innych urządzeń używanych w pieczarkarni. Informowanie pracowników o konieczności zmian fartuchów, rękawiczek oraz butów w zależności od miejsca zbierania grzybów. Usuwanie brudnego sprzętu oraz trzonków grzybów z hal i korytarzy po zakończonym zbiorze.