

Grzybobójcze właściwości bakterii *Bacillus* w uprawie pieczarki i ich znaczenie w zwalczaniu zielonej pleśni

Dr inż. Joanna Szumigaj-Tarnowska,

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy w Skierniewicach

W procesie wytwarzania podłoża pieczarkowego, a także w poszczególnych fazach uprawy pieczarki, bardzo ważną rolę odgrywają mikroorganizmy. W tych warunkach mają miejsce złożone procesy mikrobiologiczne, w których biorą udział różne drobnoustroje, zarówno te korzystne dla uprawy, jak i patogenne, a więc powodujące choroby pieczarki. Oczywiście jest dążenie do tego, aby w uprawie pieczarki występowała tylko mikroflora sprzyjająca rozwojowi pieczarki, a rozwój patogenów był utrudniony bądź skutecznie hamowany.

Na przestrzeni lat, aby zapobiec rozwojowi drobnoustrojów patogennych, stosowano głównie ochronę chemiczną. Obecnie zdecydowanie wzrosła świadomość zagrożenia wynikającego ze stosowania środków chemicznych, wzrasta więc zainteresowanie żywnością zdrową i ekologiczną, czyli bez pestycydów. Jednocześnie liczba dostępnych środków ochrony roślin jest coraz mniejsza, a w uprawie pieczarki pozostała tylko jedna substancja czynna, którą można zastosować przeciw chorobom grzybowym. Zatem ochrona roślin z wykorzystaniem ekologicznych metod staje się konieczna i zarazem bardziej powszechna, a badania w zakresie ochrony upraw roślinnych z wykorzystaniem ekologicznych i bezpiecznych substancji pochodzenia roślinnego i biologicznego są coraz częściej przeprowadzane.

Do ochrony upraw pieczarki zarejestrowane są dwa preparaty biologiczne Amylo-X WG i Serifel, zawierające, odpowiednio, bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* szczep D747 i *Bacillus amyloliquefaciens* szczep MBI600. Preparaty te są zarejestrowane do ochrony przed rozwojem zielonej pleśni wywołanej przez grzyb *Trichoderma aggressivum* w podłożu pieczarkowym.

Wcześniej w ochronie upraw pieczarki przed zieloną pleśnią wykorzystywano gatunek *B. subtilis* OST 713, natomiast po analizie genomu ostatecznie zidentyfikowano go jako *B. velezensis* (poprzednio znany też jako *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*).

Bakterie *Bacillus* spp. są ogólnie uważane za skuteczne w ochronie biologicznej ze względu na wykazywanie antagonizmu w stosunku do patogenów roślin uprawnych, konkurencję przestrzenną i żywieniową, produkcję środków przeciwdrobnoustrojowych, stymulację wzrostu roślin i indukcję odporności roślin. Wydzielają one szereg metabolitów wtórnych, jak lipopetydy, enzymy, które wykazują właściwości antibakteryjne, przeciwegrzybicze oraz mają zdolność degradacji ściany komórkowej innych drobnoustrojów. Ponadto bakterie te tworzą złożone wielokomórkowe struktury tzw. biofilmy, co ułatwia im lepszą kolonizację i przetrwanie w różnych warunkach. Wszystkie te cechy pozwalają bakteriom *Bacillus* być wysoce konkurencyjnymi i skutecznymi drobnoustrojami w ochronie upraw roślinnych.

Przydatność bakterii z rodzaju *Bacillus*, izolowanych z okrywy torfowej, w zwalczaniu grzybów *Trichoderma* była badana *in vitro* między innymi przez irlandzkich naukowców. Do badań wykorzystano zaawansowaną technologię, tzw. proteomikę, opartą na badaniach ekspresji białek oraz wzajemnym oddziaływaniu białek gospodarza i patogena, aby poznać dokładnie przebieg rozwoju infekcji. Identyfikując konkretne białka, ulegające nadekspresji lub niedostatecznej ekspresji w wyniku tego kontaktu, można określić mechanizmy odpowiedzialne za patogeniczność danego drobnoustroju, a także mechanizmy obronne komórki. Z okrywy wyizolowano bakterie *B. velezensis* charakteryzujące się hamowaniem

Tabela 1. Ocena przerośnięcia podłoża pieczarkowego i okrywy przez grzybnie pieczarki po zainfekowaniu zarodnikami *Trichoderma* i dodaniu preparatów biologicznych

Kombinacja	Bez preparatu	Serenade ASO	Serifel	Limocide
	Ocena przerośnięcia podłoża pieczarkowego			
Kontrola bez infekcji	5,0	5,0	5,0	5,0
CNC 10 ⁴	4,2	5,0	3,8	4,5
T11.02 10 ⁴	4,5	5,0	4,8	5,0
P23 10 ⁴	3,8	4,8	4,2	5,0
średnia	4,4	5,0	4,5	4,9
		Ocena przerośnięcia okrywy torfowej		
Kontrola bez infekcji	5,0	5,0	5,0	5,0
CNC 10 ⁴	2,0	2,5	2,3	3,8
T11.02 10 ⁴	4,5	2,5	4,8	4,0
P23 10 ⁴	2,5	3,0	2,5	4,8
średnia	3,5	3,3	3,7	4,4

* średnia ocena z czterech powtórzeń

wzrostu grzybów *Trichoderma* na pożywce stałej. Wzajemne oddziaływanie białek bakterii *B. velezensis* i patogena przeprowadzono w hodowli płynnej. Badania polegały na wprowadzaniu komórek bakterii do płynnej pożywki, w której hodowano grzyby *T. aggressivum*. Po 24 godzinach określono przyrost biomasy grzybni patogena oraz przeprowadzono analizę proteomiczną syntezowanych białek przez izolat grzybowy w hodowli kontrolnej oraz w hodowli z bakterią.

Wykazano, że w hodowli z bakterią rozwój grzybni *T. aggressivum* był zahamowany. W wyniku ekspozycji *T. aggressivum* na *B. velezensis* nastąpiło istotne zmniejszenie ilości wytwarzanych białek związanych ze wzrostem. Jednocześnie nastąpił wzrost produkcji białek związanych z procesem rozkładu ważnych aminokwasów. Na szkodliwy wpływ bakterii *B. velezensis* na grzyby *Trichoderma* wskazywał też wzrost aktywności białek, które są związane ze stresem oksydacyjnym komórki. Jednocześnie stwierdzono zmniejszenie produkcji białek, które są odpowiedzialne za zapobieganie rozpadowi komórek.

Nie stwierdzono negatywnego wpływu *B. velezensis* na grzybnię pieczarki, a po inkubacji z badaną bakterią wzrost biomasy grzybni był nieznacznie stylizowany. Przeprowadzony eksperyment nie odzwierciedlał środowiska uprawowego pieczarki, jednakże wyraźnie zaznaczono, że badany szczep *B. velezensis* wykazywał bardzo korzystne cechy, które można uznać za ważny aspekt w ochronie upraw grzybów. W innej pracy również stwierdzono, że po zastosowaniu bakterii *Bacillus* sp. uzyskano wyższe plony w uprawie pieczarki oraz bocznika. W uprawie bocznika wykazano skuteczność preparatu Serifel przeciwko zielonej pleśni wywoływanej przez *T. pleurotium*.

W ramach badań* z zakresu ochrony pieczarki metodami ekologicznymi w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierzwicach przeprowadzane są doświadczenia określające skuteczność preparatów zawierających bakterie z rodzaju *Bacillus* (Serifel oraz Serenade ASO) oraz substancje pochodzenia roślinnego (preparat Limocide, olejek pomarańczowy) w zwalczaniu izolatów wywołujących zieloną

Tabela 2. Pierwszy rzut owocników - dokumentacja fotograficzna doświadczenia

Uprawa kontrolna zainfekowana	Uprawa zainfekowana z dodatkiem preparatu Serenade ASO	Uprawa zainfekowana z dodatkiem preparatu Serifel	Uprawa zainfekowana z dodatkiem preparatu Limocide
<p><i>T. aggressivum</i> CNC</p> 			
<p><i>T. aggressivum</i> P23</p> 			

pleśń w uprawie. Podłoże fazy II zainfekowano zawieszoną zarodników, o gęstości 104/ml i 105/ml, tak aby uzyskać 12 i 120 zarodników na 1 g podłoża. Następnie dodano preparaty w takiej ilości, aby uzyskać 1,0 x 107 komórek bakterii *B. subtilis* na 1 g kompostu. Każdą kombinację założono w czterech powtórzeniach. Po 10 dniach przeprowadzono obserwacje rozwoju grzybni pieczarki oraz *Trichoderma* w podłożu według następującej skali: 0 – brak przerostu podłoża przez grzybnię pieczarki, rozwój zielonej pleśni w podłożu; 1 – bardzo słaby rozwój grzybni pieczarki (10% objętości podłoża przerosnięte) i rozwój zielonej pleśni; 2 – niedostateczny rozwój grzybni pieczarki (10-40%) i rozwój *Trichoderma*; 3 – dostateczny rozwój grzybni pieczarki (40-70%); 4 – dobry rozwój grzybni pieczarki (70-90%); 5 – bardzo dobry rozwój pieczarki (90-100%) w całej objętości. Na podłoże przerosnięte grzybnią pieczarki i nie wykazujące objawów porażenia przez zieloną pleśń nakładano okrywę torfową i prowadzono uprawę. Poniżej przeprowadzono obserwację po siedmiu dniach przerastania okrywy, a oceny dokonano według następującej skali: 0 – brak przerostu okrywy przez grzybnię pieczarki, rozwój zielonej pleśni; 1 – słaby rozwój grzybni pieczarki i rozwój zielonej pleśni; 2 – niedostateczny rozwój grzybni pieczarki, brak zawiązków; 3 – niedostateczny rozwój grzybni, mało związków; 4 – dobry rozwój grzybni pieczarki, obecne związki; 5 – prawidłowy rozwój grzybni i związków na powierzchni okrywy.

Infekcja wyższą liczbą zarodników izolatów *Trichoderma* spowodowała całkowite porażenie podłoża przez zieloną pleśń, a zastosowanie preparatów biologicznych nie wpłynęło na zahamowanie rozwoju choroby w podłożu. Niższa liczba zarodników pozwoliła różnicować patogeniczność izolatów i ocenić ewentualną skuteczność badanych środków ochrony. Stopień przerosnięcia podłoża i okrywy przez grzybnię pieczarki w tych kombinacjach przedstawiono w Tabeli 1. Średni przerost podłoża pieczarkowego był najlepszy w kombinacjach z preparatem Limocide i preparatem Serenade. Po nałożeniu okrywy nastąpił rozwój *Trichoderma* w większości kombinacji. Nieznacznie lepszy przerost okrywy przez grzybnię pieczarki uzyskano w kombinacji z preparatem Serifel, a największą skuteczność stwierdzono dla preparatu Limocide. W pierwszym rzucie w kombinacjach zakazanych uzyskano mniejszy plon owocników niż w kombinacjach z dodatkiem preparatów biologicznych i preparatu Limocide (Tabela 2).

Uzyskane wyniki skłaniają do stwierdzenia, że skuteczność badanych środków była zależna od stopnia porażenia podłoża, a więc patogeniczności izolatu i liczby zarodników wprowadzonych do podłoża. Badania wymagają kontynuacji z wykorzystaniem izolatów o różnej patogeniczności i sprawdzenia efektywności preparatów w podłożu III fazy. ■