

Received: 30.09.2021 / Accepted: 18.10.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Bakterie kompostowe jako potencjalne czynniki biologicznej ochrony roślin

Compost bacteria as potential agents in biological plant control

Katarzyna Marchwińska^{A,1*}, Daniela Gwiazdowska^{B,1}, Krzysztof Juś^{C,1}, Romuald Gwiazdowski^{D,2}

Streszczenie

Założenia integrowanej ochrony roślin kładą duży nacisk na rozwój metod niechemicznych, co zwiększa zainteresowanie metodami biologicznymi i poszukiwaniem mikroorganizmów, które stanowiłyby alternatywę dla stosowanych najczęściej fungicydów. Celem doświadczeń była izolacja bakterii kompostowych, określenie ich aktywności fungistatycznej względem wybranych patogenicznych grzybów z rodzajów *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* oraz *Pythium* w warunkach *in vitro* oraz identyfikacja wybranych izolatów. Z kompostu przydomowego wyizolowano 44 szczepy bakterii, których aktywność fungistatyczną oceniano metodą dyfuzji studzienkowej. Uzyskane wyniki pozwoliły na selekcję 12 izolatów bakterii kompostowych, charakteryzujących się najszerszym spektrum aktywności i najsilniejszym oddziaływaniem wobec badanych grzybów. Identyfikacja izolatów bakterii metodami: spektrometrii masowej MALDI-TOF oraz sekwencjonowania genu 16S rRNA wykazała ich przynależność do gatunków *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Serratia liquefaciens*.

Słowa kluczowe: biologiczna ochrona roślin, patogeniczne grzyby, bakterie kompostowe

Abstract

The assumptions of integrated pest management put great emphasis on the development of non-chemical methods which increases the interest in biological methods and the search for microorganisms that would be an alternative to the most frequently used fungicides. The aim of the experiments was the isolation of the compost bacteria, *in vitro* determination of their fungistatic activity against some pathogenic fungi of the genus *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* and *Pythium* and identification of selected isolates. From the backyard compost, 44 bacterial strains were isolated and assessed for the fungistatic properties by the well diffusion method. The obtained results allowed for the selection of 12 isolates of compost bacteria, characterised by the broadest and the strongest fungistatic activity spectrum against tested fungi. Identification of bacterial isolates by: MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rRNA gene sequencing methods showed their belonging to the species *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Serratia liquefaciens*.

Key words: biological plant protection, pathogenic fungi, compost bacteria

¹Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu
Instytut Nauk o Jakości, Katedra Przyrodniczych Podstaw Jakości
al. Niepodległości 10, 61-875 Poznań

²Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Centrum Badań Rejestracyjnych Agrochemikaliów
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

*corresponding author: katarzyna.marchwinska@ue.poznan.pl

ORCID: ^A0000-0001-9546-5334, ^B0000-0002-0972-6225, ^C0000-0001-8113-5481, ^D0000-0003-0226-7457

Wstęp / Introduction

Patogeniczne grzyby każdego roku przyczyniają się do strat w uprawach roślin i obniżenia jakości plonów, a wytwarzane przez nie toksyczne metabolity stanowią zagrożenie dla bezpieczeństwa zdrowotnego w łańcuchu żywnościowym. Szczególnie istotny problem stanowi również zanieczyszczenie ziarna zbóż mykotoksynami, stanowiącymi zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka oraz zwierząt (Desjardins 2006; Dweba i wsp. 2017). Do grzybów, najczęściej występujących w wielu ważnych gospodarczo uprawach roślin należą gatunki z rodzajów: *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia* czy *Rhizoctonia* (Meena i wsp. 2016; Dweba i wsp. 2017; Mielniczuk i Skwaryło-Bednarz 2020).

Główną metodą walki z grzybami odpowiedzialnymi za choroby roślin jest stosowanie fungicydów, jednak założenia integrowanej ochrony roślin kładą nacisk na wprowadzanie metod niechemicznych. W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania biologiczną ochroną roślin przed sprawcami chorób, ze względu na potrzebę wprowadzenia rozwiązań, które będą bardziej przyjazne dla środowiska w porównaniu z powszechnie stosowanymi środkami chemicznymi (Ongena i Jacques 2008). Metoda biologiczna polega na ograniczeniu populacji patogenów roślinnych przez tzw. czynniki biologicznej ochrony (BCA – ang. biological control agents), tj. bakterie, grzyby, nicienie czy pasożyty (Heimpel i Mills 2017; Martinez-Sastre i wsp. 2020), izolowane z różnych środowisk. Mechanizmy fungistatycznego oddziaływania mikroorganizmów zaliczanych do czynników biologicznej ochrony są różne. Wśród nich wymienić należy rywalizację o składniki odżywcze i przestrzeń (Spadaro i Droby 2016), a także indukowanie odporności na infekcje patogenem w tkankach roślinnych bez bezpośredniej interakcji z patogenem (Pieterse i wsp. 2014; Conrath i wsp. 2015). Mikroorganizmy te mogą również wchodzić w bezpośrednią interakcję z patogenem na drodze hiperpasożytnictwa, niszcząc grzybnie i zarodniki grzybów oraz komórki bakterii (Ghorbanpour i wsp. 2018), bądź też wytwarzając przeciwdrobnoustrojowe metabolity hamujące rozwój patogenów (Raaijmakers i Mazzola 2012). Wśród bakterii najważniejszą rolę w kontroli biologicznej odgrywają szczepy z rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Agrobacterium* (Fira i wsp. 2018).

Celem niniejszej pracy była izolacja bakterii z przydomowej przemy kompostowej i określenie ich aktywności fungistatycznej względem wybranych grzybów strzępkowych z rodzajów *Fusarium*, *Alternaria*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizoctonia* oraz *Pythium* w warunkach laboratoryjnych oraz identyfikacja wybranych izolatów.

Materialy i metody / Materials and methods

Material badawczy

Material badawczy stanowiły 44 izolaty bakterii, które zostały pozyskane z przydomowego kompostu, w następujący sposób: do 10 g kompostu wprowadzano 90 ml pożywki peptonowej (pepton, 10 g; enzymatyczny hydrolizat kazeiny, 2 g; ekstrakt drożdżowy, 2 g; chlorek sodu, 6 g; glukoza, 20 g; agar techniczny, 20 g; woda destylowana do 1000 ml). Do równoległej próbki 10 g kompostu wprowadzano bulion wzbogacony (BIOMAXIMA). Wartość pH podłoża wynosiła 7,0. Przygotowane próbki kompostu poddano inkubacji w temperaturze 30°C przez 48 h. Po zakończeniu inkubacji w próbkach określono liczebność bakterii, a także oceniono ich aktywność fungistatyczną. Z próbek tych izolowano czyste kultury bakterii kompostowych.

Przebieg izolacji czystych kultur bakterii kompostowych

Z próbek kompostu po inkubacji w pożywce peptonowej i bulionie wzbogaconym wykonano seryjne rozcieńczenia dziesiętne, a następnie posiew metodą zalewową na podłożu PCA (Plate Count Agar, BIOMAXIMA). Inkubację prowadzono w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Wybrane losowo kolonie pasażowano na podłożu PCA, wykonując posiew redukcijny i inkubowano w warunkach opisanych powyżej, w celu uzyskania czystych kultur. Otrzymane hodowle 44 izolatów zdeponowano w kolekcji Katedry Przyrodniczych Podstaw Jakości Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu. Wyizolowane bakterie przechowywano w bulionie odżywczym w temperaturze –20°C, z 80% glicerolem w stosunku 1 : 1.

Ocena właściwości fungistatycznych

Oddziaływanie fungistatyczne próbek kompostu po inkubacji w podłożu peptonowym oraz bulionie odżywczym, a także wyizolowanych z nich czystych kultur bakterii oceniano wobec 13 gatunków grzybów wskaźnikowych: *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium langsethiae*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium poae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Pythium* spp. Grzyby pochodziły z kolekcji Centrum Badań Rejestracyjnych Agrochemikaliów Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego (IOR – PIB). Do tego celu wykorzystano metodę dyfuzji studzienkowej (Gwiazdowski i wsp. 2015). Zawiesiny zarodników lub strzępek grzybni badanych grzybów przygotowano w jałowej 8,5% soli fizjologicznej, a następnie wysiewano metodą zalewową z wykorzystaniem pożywki PDA (ang. – Potato Dextrose Agar, A&A Biotechnology). Po zestaleniu podłoża, korkoborem wyci-

nano studzienki o średnicy 10 mm. Następnie do studzienek wprowadzano 100 µl próbki kompostu po inkubacji w podłożu peptonowym oraz bulionie odżywczym, lub 100 µl 24-godzinnych hodowli izolatów bakterii kompostowych prowadzonych w bulionie odżywczym w temperaturze 30°C o gęstości 10^9 jtk/ml. Hodowle płytkowe prowadzono w temperaturze ok. 20°C w warunkach tlenowych przez 5–10 dni, w zależności od gatunku grzyba. Po zakończeniu inkubacji mierzono średnice stref zahamowania wzrostu grzybów wokół studzienek w mm. Doświadczenia prowadzono w trzech równoległych powtórzeniach.

Identyfikacja wybranych izolatów bakterii

Izolaty bakterii kompostowych zidentyfikowane zostały z zastosowaniem spektrometru masowego MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight, Bruker, Niemcy) zgodnie ze standardowym protokołem producenta (Dec i wsp. 2014). Z 24-godzinnych hodowli izolatów bakterii kompostowych w bulionie odżywczym (pH 7,0; temp. 30°C) wykonano posiewy powierzchniowe metodą redukcijną w celu uzyskania pojedynczych kolonii. Wyrosłe 24-godzinne, odosobnione kolonie zostały wykorzystane w doświadczeniach w celu uzyskania profilu białkowego mikroorganizmów. Izolaty zostały zidentyfikowane na podstawie porównania uzyskanych wyników widm masowych MALDI-TOF z przechowywanymi w bibliotece referencyjnej BioTyper oraz The National Center for Biotechnology Information (NCBI). W celu interpretacji poziomu ufności, wyniki odcisku palca białek rybosomalnych komórek (MALDI-TOF MS) podzielono zgodnie z kryteriami Bruker MALDI-TOF BioTyper. Pewność wyników zapewnia wartość wskaźnika identyfikacyjnego ≥ 2 . Wyniki 1,99–1,70 wskazują na identyfikację na niskim poziomie ufności, a wartość $< 1,70$ uniemożliwia identyfikację drobno-ustroju. Kalibrację spektrometru masowego MALDI-TOF przeprowadzono bezpośrednio przed analizami stosując preparat bakterii *Escherichia coli* DH5 (Bruker, Niemcy).

Izolację bakterii kompostowych przeprowadzono także na podstawie analizy częściowej sekwencji genu 16S rRNA, która wymagała izolacji genomowego DNA, przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – ang. polymerase chain reaction) z odpowiednio dobranymi starterami, sekwencjonowania oraz analizy uzyskanych sekwencji. Doświadczenia wykonano z zastosowaniem gotowego zestawu do izolacji Genomic Mini AX Bacteria+ Spin (A&A Biotechnology), zgodnie z protokołem producenta. Łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) przeprowadzono w termocyklerze (Biometra) przy użyciu odpowiednio dobranej uniwersalnej pary starterów: 1492r (5'–3' ggT TAC CTT gTT ACg ACT T) i SD-Bact-0008 (5'–3' AgA gTT TgA TCM Tgg CTC AG) oraz gotowy zestaw reakcyjny PCR Mix Plus HGC (A&A Biotechnology). Obecność poszukiwanego fragmentu genu potwierdzono wykonując elektroforezę w żelu agarowym z barwnikiem Midori Green.

Sekwencje o długości 1500 par zasad, pozyskane na drodze sekwencjonowania produktu PCR, zostały edytowane, połączone i wygenerowane przy użyciu programów Finch TV 1.4.0 i GeneDoc 2.7.000. Wyszukiwanie sekwencji homologicznych dopasowanych do identyfikowanych bakterii prowadzono za pomocą narzędzia BLAST (Megablast Algoritm) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Konsorcja mikroorganizmów otrzymane w wyniku inkubacji próbek kompostu w bulionie odżywczym i pożywce peptonowej wykazały oddziaływanie na wzrost wybranych 11 gatunków grzybów z rodzajów *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* i *Sclerotinia* (tab. 1). Z otrzymanych próbek wyizolowano łącznie 44 czyste kultury bakterii, które poddano ocenie właściwości fungistatycznych wobec 13 grzybów wskaźnikowych. Izolaty bakterii oznaczone symbolami BK01-BK22 pochodziły z próbek kompostu inkubowanych z dodatkiem podłoża peptonowego, natomiast izolaty BK23-BK44 z próbek namnażanych po uprzednim uzupełnieniu bulionem wzbogaconym.

Spśród 44 wyizolowanych z kompostu izolatów bakterii, 12 izolatów charakteryzowało się najszerszym zakresem aktywności wykazując wpływ na rozwój przynajmniej 6 grzybów wskaźnikowych oraz najsilniejszym oddziaływaniem (tab. 2). Najwyższą aktywność fungistatyczną wykazały izolaty BK03, BK21 oraz BK33, które hamowały wzrost wszystkich badanych grzybów patogenicznych. Izolaty BK15 oraz BK27 charakteryzowały się najmniejszym zakresem aktywności fungistatycznej, wykazując oddziaływanie jedynie wobec 6 grzybów. Niskie strefy zahamowania wzrostu grzybni (w porównaniu z pozostałymi izolatami) zaobserwowano dla izolatów BK30, BK33 i BK37. Badane gatunki grzybów strzępkowych wykazywały zróżnicowaną wrażliwość wobec działania poszczególnych izolatów bakterii kompostowych (fot. 1–3). Najwyższą wrażliwość wobec badanych izolatów wykazywały grzyby *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. brassicicola* i *F. avenaceum*. Zahamowanie wzrostu *B. cinerea*, *R. solani*, *S. sclerotiorum* oraz *Pythium* sp. poprzez oddziaływanie wybranych bakterii kompostowych, w zależności od izolatu, obserwowano w postaci wyraźnej strefy, bądź jako zahamowanie wzrostu grzybni powietrznej wraz ze zmianą jej struktury i barwy.

Wybrane na podstawie aktywności fungistatycznej izolaty kompostowe poddano identyfikacji opartej na analizie profilu białek rybosomalnych metodą MALDI-TOF MS. Otrzymane wyniki identyfikacji wskazały, iż trzy izolaty należały do gatunku *Alcaligenes faecalis*, po dwa izolaty do gatunku *Serratia liquefaciens* i *Bacillus subtilis* oraz pięć izolatów do rodzaju *Stenotrophomonas*. Wyniki przedstawiono w tabeli 3. Niska wartość wskaźnika identyfikacji dla izolatu BK15 wraz z brakiem identyfikacji na poziomie

Tabela 1. Aktywność fungistatyczna konsorcjów mikroorganizmów w próbkach kompostu
Table 1. Fungistatic activity of microbial consortia in compost samples

Mikroorganizm wskaźnikowy Indicator microorganism	Konsorcjum namnożone na podłożu: Consortium propagated in:	
	bulion wzbogacony enriched broth	bulion peptonowy peptone broth
	$6,2 \times 10^8$ jtk/ml	$4,2 \times 10^8$ jtk/ml
<i>Alternaria alternata</i> KZF 13	+++	+++
<i>Alternaria brassicicola</i> BPR 1735	+++	+++
<i>Botrytis cinerea</i> BPR 187	++	++
<i>Fusarium avenaceum</i> KZF 3	+++	+++
<i>Fusarium culmorum</i> KZF 5	+	+
<i>Fusarium equiseti</i> KZF 6	++	+++
<i>Fusarium graminearum</i> KZF 1	+++	+++
<i>Fusarium langsethiae</i> KZF 2	++	++
<i>Fusarium oxysporum</i> KZF 10	++	+
<i>Fusarium poae</i> KZF 18	++	++
<i>Rhizoctonia solani</i> BPR 1923	nb	nb
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KZF 23	+++	+
<i>Pythium</i> sp. BPR 1785	nb	nb

+ – wielkość strefy zahamowania wzrostu grzybni <10 – size of the mycelial inhibition zone <10

++ – wielkość strefy zahamowania wzrostu grzybni 10–20 mm – size of the mycelial inhibition zone 10–20 mm

+++ – wielkość strefy zahamowania wzrostu grzybni >20 mm – size of the mycelial inhibition zone >20 mm

nb – nie badano – not tested

gatunkowym 5 izolatów bakterii z rodzaju *Stenotrophomonas* skłoniły do przeprowadzenia dodatkowej identyfikacji na podstawie fragmentu genu 16S rRNA. Identyfikacja genetyczna potwierdziła wyniki otrzymane z zastosowaniem identyfikacji metodą spektrometrii masowej MALDI-TOF, pozwalając jednocześnie na określenie przynależności gatunkowej badanych izolatów.

Dane literaturowe opisują różne mikroorganizmy jako potencjalnych kandydatów na BCA, jednak najczęściej badania koncentrują się na przedstawicielach rodzaju *Bacillus*. Gatunki z tego rodzaju zostały uznane za biologicznie bezpieczne i coraz częściej są wykorzystywane w rolnictwie. Są one zdolne do zasiedlania różnych środowisk, głównie dzięki zdolności do wytwarzania form przetrwalnych, co jednocześnie wpływa na stabilność tych mikroorganizmów w gotowych preparatach (Ongena i Jacques 2008; Tanaka i wsp. 2015; Mnif i wsp. 2016). Bakterie z rodzaju *Bacillus* mają zdolność kolonizacji korzeni, mogą stymulować wzrost roślin (są zaliczane do PGPR – ang. plant growth-promoting rhizobacteria) i indukować systemowy mechanizm odporności u roślin (Sicua i wsp. 2015). Ich przeciwdrobnoustrojowy potencjał jest związany ze zdolnością do wytwarzania szerokiej gamy strukturalnie różnych substancji o działaniu antibakteryjnym i przeciwgrzybiczym, m.in. bakteriocyn, peptydów przeciwdrobnoustrojowych i lipopeptydów, poliketydów i sideroforów (Stein 2005; Ongena i Jacques 2008). Wśród gatunków budzących największe

zainteresowanie ze względu na ich przeciwdrobnoustrojowy potencjał wymienia się *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus mojavensis* czy *Bacillus pasteurii* (Bacon i wsp. 2015).

Również Gram-ujemne bakterie z rodzajów *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes* i *Serratia* wskazywane są coraz częściej jako potencjalne BCA (Zhang i Yuen 2000), szczególnie ze względu na wytwarzanie substancji fungistatycznych. *Stenotrophomonas maltophilia*, gatunek który zidentyfikowano również w prezentowanej pracy, jest bakterią rozpowszechnioną w środowisku, izolowaną często z ryzosfery pszenicy, owsa, ogórka, kukurydzy i ziemniaka. *Stenotrophomonas maltophilia* należy również do organizmów stymulujących wzrost roślin, a przy tym aktywnie hamuje wzrost fitopatógenów, takich jak *Pythium* sp., *Bipolaris sorokiniana* czy *Ralstonia solanacearum* (Dunne i wsp. 1997; Zhang i Yuen 2000; Pages i wsp. 2008). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki także wskazywały na aktywność izolatów zidentyfikowanych jako *S. maltophilia* wobec *Pythium* sp. Zdecydowanie mniej danych można znaleźć na temat zastosowania bakterii z rodzaju *Alcaligenes* czy *Serratia* jako czynników hamujących rozwój patogenicznych grzybów. Gatunek *A. faecalis* jest znany głównie jako PGPR przede wszystkim ze względu na zdolność do wytwarzania kwasu indolooctowego (IAA), deaminazy ACC (1-aminocyklopropano-1-karboksylowej) i solubilizacji fosforanów oraz wiązania

Tabela 2. Aktywność fungistatyczna wybranych izolatów bakterii kompostowych wobec grzybów wskaźnikowych
Table 2. Fungistatic activity of selected isolates of compost bacteria against indicator fungi

Mikroorganizm wskaźnikowy Indicator microorganism	Strefa zahamowania wzrostu grzybnii [mm] przez wybrane izolaty bakterii – Mycelium growth inhibition zone [mm] by selected bacterial isolates											
	BK03	BK04	BK05	BK11	BK15	BK21	BK26	BK27	BK30	BK33	BK37	BK38
<i>A. alternata</i> KZF 13	32,00±0,82	43,00±1,63	35,00±0,82	37,00±1,63	0	41,00±0,82	17,00±3,27	14,50±0,41	24,50±0,41	21,00±0,00	17,00±0,00	31,00±0,82
<i>A. brassicicola</i> BPR 1735	40,00±4,08	31,00±1,63	0	36,00±0,82	0	35,00±0,82	21,50±2,66	15,00±0,82	37,00±0,82	28,00±0,82	18,50±2,04	27,00±0,82
<i>B. cinerea</i> BPR 187	52,00±2,45	50,00±2,16	44,30±0,47	50,00±1,63	x	x	x	x	0	17,00±0,00	11,50±0,41	40,00±1,41
<i>F. avenaceum</i> KZF 3	32,00±0,82	41,00±0,82	20,00±0,82	53,30±2,87	0	25,00±0,00	18,50±0,41	0	21,00±0,82	19,00±0,82	16,00±0,00	16,00±0,82
<i>F. culmorum</i> KZF 5	22,00±0,82	19,00±0,82	0	26,00±0,82	0	34,50±0,41	0	0	23,50±1,22	17,00±0,82	0	0
<i>F. equiseti</i> KZF 6	16,00±0,82	29,00±1,63	0	13,50±0,41	0	30,00±0,00	0	0	11,50±0,41	16,00±1,63	14,50±1,22	15,00±0,00
<i>F. graminearum</i> KZF 1	14,00±2,45	17,00±0,00	13,00±0,00	28,00±2,94	22,00±3,56	41,50±1,22	30,00±0,82	22,50±2,04	21,00±1,63	17,50±2,04	20,00±0,82	0
<i>F. langsethiae</i> KZF 2	20,50±1,22	0	0	0	30,00±0,82	41,00±0,82	35,00±0,00	0	16,50±0,41	19,00±0,82	0	14,30±0,47
<i>F. oxysporum</i> KZF 20	18,50±0,41	20,50±0,41	0	12,50±1,22	0	30,00±0,82	0	0	19,00±0,82	11,00±0,00	19,50±2,04	11,00±0,00
<i>F. poae</i> KZF 18	16,00±0,82	22,00±0,82	23,00±0,82	21,50±0,41	0	23,50±1,22	30,00±0,82	23,00±0,82	14,50±0,41	16,00±0,82	0	15,00±0,00
<i>R. solani</i> BPR 1923	x	x	0	x	16,50±1,22	34,00±0,82	34,00±0,82	0	x	x	x	0
<i>S. sclerotiorum</i> KZF 23	45,00±1,63	66,00±2,94	21,00±0,82	68,00±2,16	x	x	x	x	0	15,00±0,00	21,00±1,63	0
<i>Pythium</i> sp. BPR 1785	27,00±2,45	x	28,00±1,63	x	20,00±4,08	37,50±2,04	28,50±1,22	0	21,50±1,63	30,00±4,08	0	0

– redukcja wzrostu grzybnii powietrznej – growth reduction of air mycelium

x – redukcja wzrostu grzybnii powietrznej – growth reduction of air mycelium

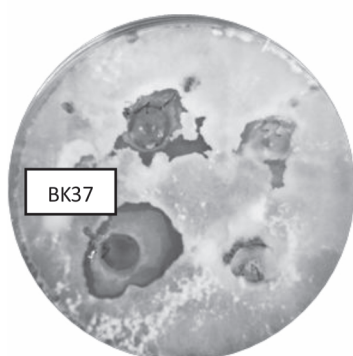
Tabela 3. Identyfikacja 12 wybranych izolatów metodami spektrometrii masowej MALDI-TOF oraz sekwencjonowania genu 16S rRNA
Table 3. Identification of 12 selected isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rRNA gene sequencing

Izolat Isolate	Identyfikacja MALDI-TOF MALDI-TOF Identification		Sekwencjonowanie genu 16S rRNA 16S rRNA gene sequencing		Wyniki Results
	szczonep referencyjny (NCBI) reference strain (NCBI strain no.)	wartość LS ^{1,2} LS value	szczonep referencyjny (GeneBank ID) reference strain (GeneBank ID)	wartość ID ³ ID value	
Źródło izolacji: konsorcjum namnożone w bulionie wzbogaconym – Isolation source: consortium propagated in enriched broth					
BK03	<i>Bacillus subtilis</i> (135461)	2.10	<i>Bacillus subtilis</i> (KU361185.1)	99,79%	<i>Bacillus subtilis</i>
BK04	<i>Serratia liquefaciens</i> (614)	2.31	<i>Serratia liquefaciens</i> (MH668087.1)	99,15%	<i>Serratia liquefaciens</i>
BK05	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (40323)	2.03	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (MN826555.1)	99,86%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BK11	<i>Alcaligenes faecalis</i> (32001)	2.03	<i>Alcaligenes faecalis</i> (MK603124.1)	99,10%	<i>Alcaligenes faecalis</i>
BK 15	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (40323)	1.91	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (MN826545.1)	99,85%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BK21	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (40323)	2.03	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (JF934697.1)	99,81%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Źródło izolacji: konsorcjum namnożone w bulionie peptonowym – Isolation source: consortium propagated in peptone broth					
BK26	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (40323)	2.00	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KJ781965.1)	99,65%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
BK27	<i>Bacillus subtilis</i> (1423)	2.00	<i>Bacillus subtilis</i> (MN756647.1)	99,86%	<i>Bacillus subtilis</i>
BK30	<i>Alcaligenes faecalis</i> (511)	2.01	<i>Alcaligenes faecalis</i> (MK599247.1)	99,65%	<i>Alcaligenes faecalis</i>
BK33	<i>Alcaligenes faecalis</i> (32001)	2.01	<i>Alcaligenes faecalis</i> (MK603124.1)	98,63%	<i>Alcaligenes faecalis</i>
BK37	<i>Serratia liquefaciens</i> (614)	2.28	<i>Serratia liquefaciens</i> (MH668087.1)	95,18%	<i>Serratia liquefaciens</i>
BK38	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (40323)	2.05	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KJ781965.1)	99,65%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

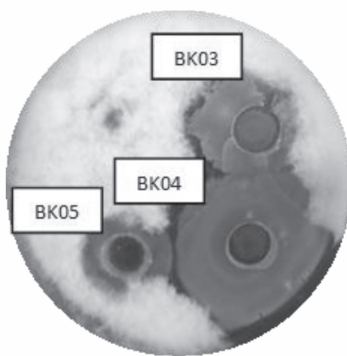
¹wartość LS – wartość wyniku BioTyper Log – LS value – value of BioTyper Log result

²istotność wskaźnika identyfikacji według Bruker MALDI Biotyper – the significance of the identification indicator by Bruker MALDI Biotyper

³wartość ID – wartość identyfikacyjna – ID value – identification value



1. *Sclerotinia sclerotiorum* KZF 23



2. *Fusarium avenaceum* KZF 3



3. *Fusarium graminearum* KZF 1

Fot. 1–3. Właściwości fungistatyczne badanych izolatów bakterii kompostowych wobec wzrostu grzybów wskaźnikowych
Photo 1–3. The fungistatic properties of the tested compost bacteria isolates against the growth of indicator fungi

azotu atmosferycznego (Neethu i wsp. 2016). Również bakterie z rodzaju *Serratia*, m.in. gatunek *S. liquefaciens*, wzbudzają duże zainteresowanie badaczy ze względu na wysoki potencjał do stymulacji wzrostu roślin (Kshetri i wsp. 2019). Tym samym mikroorganizmy te mogą być stosowane m.in. jako bionawóz w celu zwiększenia wzrostu i plonowania

różnych roślin w warunkach stresu (Omer 2017). Niektóre badania wskazują jednak na spory potencjał fungistatyczny wymienionych bakterii. Przykładowo, Gong i wsp. (2019) wykazali szerokie spektrum aktywności fungistatycznej szczepu *A. faecalis* N1-4 obejmując *F. graminearum*, *F. equiseti*, *A. alternata*, *B. cinerea*, *Aspergillus niger* i

Colletotrichum graminicola. Izolaty zidentyfikowane jako *A. faecalis* w niniejszej pracy wykazywały również szeroki zakres aktywności, obejmujący niemal wszystkie badane grzyby, jedynie wobec *R. solani* działanie ograniczało się do hamowania grzybni powietrznej. Jeden izolat, BK 30, nie wykazywał aktywności względem *B. cinerea* i *S. sclerotiorum*.

Wnioski / Conclusions

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Kompost okazał się źródłem izolatów bakterii wykazujących silną aktywność fungistatyczną wobec grzybów z rodzajów: *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia* oraz *Pythium*.
2. Aktywność fungistatyczna wybranych izolatów uzależniona jest przede wszystkim od rodzaju grzyba wskaźnikowego.
3. Identyfikacja wybranych izolatów wykazała ich przynależność do gatunków *B. subtilis*, *A. faecalis*, *S. maltophilia* i *S. liquefaciens*.
4. Otrzymane izolaty bakterii kompostowych wykazują duży potencjał jako czynnik biologiczny w ograniczaniu patogenów roślin.

Literatura / References

- Bacon C.W., Palencia E.R., Hinton D.M. 2015. Abiotic and biotic plant stress-tolerant and beneficial secondary metabolites produced by endophytic *Bacillus* species. s. 163–177. W: Plant microbes symbiosis: applied facets (N. Arora, red.) Springer, New Delhi. DOI: 10.1007/978-81-322-2068-8_8
- Conrath U., Beckers G.J.M., Langenbach C.J.G., Jaskiewicz M.R. 2015. Priming for enhanced defense. Annual Review of Phytopathology 53: 97–119. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080614-120132
- Dec M., Urban-Chmiel R., Gnat S., Puchalski A., Wernicki A. 2014. Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. Research in Microbiology 165 (3): 190–201. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.02.003
- Desjardins A.E. 2006. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul, MN, USA, 268 ss. ISBN 0-89-54-335-6.
- Dunne C., Crowley J.J., Moëne-Loccoz Y., Dowling D.N., O’Gara F. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is mediated by an extracellular proteolytic activity. Microbiology 143 (12): 3921–3931. DOI: 10.1099/00221287-143-12-3921
- Dweba C.C., Figlan S., Shimelis H.A., Motaung T.E., Sydenham S., Mwadzingeni L., Tsilo T.J. 2017. *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. Crop Protection 91: 114–122. DOI: 10.1016/j.cropro.2016.10.002
- Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. Journal of Biotechnology 285: 44–55. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.044
- Ghorbanpour M., Omidvari M., Abbaszadeh-Dahaji P., Omidvar R., Kariman K. 2018. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. Biological Control 117: 147–157. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.11.006
- Gong A.D., Wu N.N., Kong X.W., Zhang Y.M., Hu M.J., Gong S.J., Dong F.Y., Wang J.H., Zhao Z.Y., Liao Y.C. 2019. Inhibitory effect of volatiles emitted from *Alcaligenes faecalis* N1-4 on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in storage. Frontiers in Microbiology 10: 1419. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01419
- Gwiazdowski R., Kluczyńska K., Gwiazdowska D. 2015. Wpływ wybranych bakterii fermentacji mlekowej na wzrost patogenów występujących w uprawie rzepaku. [Impact of the selected lactic acid bacteria on the growth of pathogens occurring in oilseed rape crops]. Progress in Plant Protection 55 (4): 446–452. DOI: 10.14199/ppp-2015-073
- Heimpel G.E., Mills N. 2017. Biological Control – Ecology and Applications. Cambridge University Press, Cambridge, 379 ss. ISBN 978-0-521-84514-4.
- Kshetri L., Naseem F., Pandey P. 2019. Role of *Serratia* sp. as biocontrol agent and plant growth stimulator, with prospects of biotic stress management in plant. s. 169–200. W: Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management. Microorganisms for Sustainability, Vol. 13 (R. Sayyed, red.). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-6986-5_6
- Martinez-Sastre R., Garcia D., Minarro M., Martin-Lopez B. 2020. Farmers’ perceptions and knowledge of natural enemies as providers of biological control in cider apple orchards. Journal of Environmental Management 266: 110589. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110589
- Meena M., Zehra A., Dubey M.K., Aamir M., Gupta V.K., Upadhyay R.S. 2016. Comparative evaluation of biochemical changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) infected by *Alternaria alternata* and its toxic metabolites (TeA, AOH, and AME). Frontiers in Plant Science 7: 1408. DOI: 10.3389/fpls.2016.01408
- Mielniczuk E., Skwaryło-Bednarz B. 2020. *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. Agronomy 10 (4): 509. DOI: 10.3390/agronomy10040509
- Mnif I., Grau-Campistany A., Coronel-Leon J., Hammami I., Triki M.A., Manresa A., Ghribi D. 2016. Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. Environmental Science and Pollution Research International 23: 6690–6699. DOI: 10.1007/s11356-015-5826-3
- Neethu S., Vishnupriya S., Mathew J. 2016. Isolation and functional characterisation of endophytic bacterial isolates from curcuma longa. International Journal of Pharma and Bio Sciences 7 (1): 455–464.
- Omer A.M. 2017. Inducing plant resistance against salinity using some rhizobacteria. Egyptian Journal of Desert Research 67 (1): 187–208. DOI: 10.21608/EJDR.2017.6498

- Ongena M., Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology* 16 (3): 115–125. DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009
- Pages D., Rose J., Conrod S., Cuine S., Carrier P., Heulin T., Achouak W. 2008. Heavy metal tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS One* 3 (2): e1539. DOI: 10.1371/journal.pone.0001539
- Pieterse C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C.M., Bakker P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347–375. DOI: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Raaijmakers J.M., Mazzola M. 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 50: 403–424. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172908
- Sicuia O.A., Constantinescu F., Cornea C.P. 2015. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. *Romanian Biotechnological Letters* 20 (5): 10737–10750.
- Spadaro D., Droby S. 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology* 47: 39–49. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.11.003
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56 (4): 845–857. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- Tanaka K., Amaki Y., Ishihara A., Nakajima H. 2015. Synergistic effects of [Ile(7)]Surfactin homologues with Bacillomycin D in suppression of gray mold disease by *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol strain SD-32. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (22): 5344–5353. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01198
- Zhang Z., Yuen G.Y. 2000. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology* 90 (4): 384–389. DOI: 10.1094/PHYTO.2000.90.4.384