

Received: 01.10.2021 / Accepted: 05.11.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

## Bakterie z rodzaju *Paenibacillus* jako biologiczny czynnik kontroli grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w badaniach modelowych

### *Paenibacillus* bacteria as a biological factor to control *Fusarium* fungi and mycotoxins in model studies

Krzysztof Juś<sup>A,1\*</sup>, Romuald Gwiazdowski<sup>B,2</sup>, Daniela Gwiazdowska<sup>C,1</sup>, Katarzyna Marchwińska<sup>D,1</sup>, Agnieszka Waśkiewicz<sup>E,3</sup>

#### Streszczenie

Do kontroli toksynotwórczych grzybów w uprawach zbóż coraz powszechniej stosowane są różnego rodzaju mikroorganizmy, które stanowią ważny element integrowanej ochrony roślin ograniczający stosowanie zabiegów chemicznych. Celem badań była ocena potencjału bakterii z rodzaju *Paenibacillus* do hamowania wzrostu grzybów i mykotoksyn fuzaryjnych w układzie modelowym na ziarnach ryżu. Aktywność badanych szczepów w zakresie hamowania wzrostu grzybów oraz redukcji poziomu mykotoksyn określono analizując chromatograficznie (HPLC) zawartość ergosterolu (ERG), zearalenonu (ZEA) i deoksyniwalenolu (DON) w ziarnach ryżu po ich inokulacji hodowlami bakteryjnymi oraz zainfekowaniu przez *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*. Bazując na uzyskanych wynikach można stwierdzić, iż badane szczepy bakterii skutecznie hamowały wzrost grzybów z rodzaju *Fusarium*, jak również, w poszczególnych wariantach, redukowały poziom ZEA i DON w ziarnach ryżu. Aktywność testowanych bakterii w analizowanym doświadczeniu uzależniona była zarówno od szczepu bakteryjnego, rodzaju grzyba, jak i objętości hodowli bakterii użytej do inokulacji ryżu.

**Słowa kluczowe:** biologiczna kontrola roślin, bakterie *Paenibacillus* sp., mykotoksyny, bezpieczeństwo żywności

#### Abstract

Various types of microorganisms are commonly used to control toxinogenic fungi in cereal crops and constitute an important element of integrated pest management, limiting the use of chemical treatments. The aim of the study was to evaluate the potential of *Paenibacillus* bacteria for the growth inhibition of *Fusarium* fungi and mycotoxins in a model studies on rice grains. The activity of the studied strains in inhibiting the growth of fungi and reducing the level of mycotoxins was determined by chromatographic (HPLC) analysis of the content of ergosterol (ERG), zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) in rice grains after their inoculation with bacterial cultures and infection by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. Based on the obtained results it can be concluded that the studied strains of bacteria effectively inhibited the growth of fungi of the genus *Fusarium* and, in individual variants, reduced the levels of ZEA and DON in rice grains. The activity of the tested bacteria in the analyzed range depended on the bacterial strain, the type of fungus and the amount of bacterial culture used to inoculate rice.

**Key words:** biological plant control, *Paenibacillus* sp. bacteria, mycotoxins, food safety

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

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

<sup>3</sup>Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Wydział Leśny i Technologii Drewna, Katedra Chemii  
Wojska Polskiego 75, 60-625 Poznań

\*corresponding author: krzysztof.jus@ue.poznan.pl

ORCID: <sup>A</sup>0000-0001-8113-5481, <sup>B</sup>0000-0003-0226-7457, <sup>C</sup>0000-0002-0972-6225,  
<sup>D</sup>0000-0001-9546-5334, <sup>E</sup>0000-0003-4113-1595

## Wstęp / Introduction

Grzyby z rodzaju *Fusarium* należą do jednych z najbardziej szkodliwych patogenów roślin na świecie, odpowiedzialnych m.in. za wyniszczającą chorobę zbóż – fuzariozę kłosów (FHB – ang. Fusarium Head Blight). Spośród różnych gatunków wywołujących fuzariozę kłosów zbóż *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum* dominują w większości regionów na całym świecie. W skład kompleksu gatunków odpowiedzialnych za tą chorobę wchodzi również gatunki, takie jak: *F. chlamydosporum*, *F. boothii*, *F. scirpi*, *F. arthrosporioides*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. asiaticum* i *F. cortaderiae* (O'Donnell i wsp. 2004; van der Lee i wsp. 2015; Dweba i wsp. 2017; Mielniczuk i Skwaryło-Bednarz 2020). Choroby powodowane przez *Fusarium* spp. przyczyniają się przede wszystkim do znacznych strat ekonomicznych obniżając wielkość i jakość plonów upraw, a dodatkowo istotny problem stanowi zanieczyszczenie ziarna mykotoksynami (Dweba i wsp. 2017). Do najczęściej wykrywanych w ziarnach zbóż należą trichoteceny, w tym deoksyniwalenol i jego pochodne, niwalenol i fuzarenon, jak również zearalenon i fumonizyny. Stopień skażenia ziarna zbóż mykotoksynami wytwarzanymi przez grzyby z rodzaju *Fusarium* zależy od wielu czynników, takich jak warunki pogodowe, system uprawy, sposób i termin zbioru ziarna, a także stopień odporności uprawianych odmian na infekcje (Goliński i wsp. 2010; Hofgaard i wsp. 2016). Ze względu na powszechność występowania mykotoksyn w łańcuchu żywnościowym, jak również różnorodność mechanizmu oddziaływania na organizmy żywe, związki te stanowią zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka oraz zwierząt (Desjardins 2007).

Najczęściej w walce z toksynotwórczymi grzybami wykorzystywane są fungicydy, jednak obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania metodami niechemicznymi, w tym biologicznymi. Dodatkowo, stale rosnące zapotrzebowanie na żywność, zwłaszcza z sektora rolniczego, determinuje potrzebę ciągłego doskonalenia metod i technik kontroli patogenów roślin dla zapewnienia optymalnej ilości plonów oraz odpowiedniego poziomu ich bezpieczeństwa, przy równoczesnym zachowaniu dbałości o środowisko naturalne (Singh i Singh 2017). Wspomniane założenia należą do jednych z głównych celów wielu koncepcji, takich jak zrównoważony rozwój rolnictwa (Żmija 2014), rolnictwo inteligentne zorientowane klimatycznie (ang. Climate-Smart Agriculture – CSA) (Singh i Singh 2017), czy koncepcja One Health (Garcia i wsp. 2020), które w bardzo podobny sposób koncentrują się na zagadnieniach związanych ze zrównoważoną, proekologiczną produkcją żywności. Działania zmierzające do ograniczenia stosowania chemicznych środków ochrony roślin powodują, iż coraz częściej rozważa się włączanie do zabiegów ochrony różnego rodzaju metod biologicznych, w tym mikroorganizmów. Tego typu rozwiązania znacznie odciążają środowisko naturalne i stanowią ważny element rozwoju integrowanej ochrony roślin

(Nagendran i wsp. 2020; Rahman i wsp. 2020; Holtappels i wsp. 2021).

Wśród mikroorganizmów wymienianych jako potencjalne czynniki biologicznej ochrony roślin duże zainteresowanie naukowców budzą bakterie z rodzaju *Paenibacillus*, szeroko rozpowszechnione w ryzofe roślin uprawnych, a zarazem wytwarzające szereg substancji przeciwdrobnoustrojowych, jak polimyksyny, fusarycydyna czy związki lotne (Beatty i Jensen 2002; Shaheen i wsp. 2011; Raza i wsp. 2015). Niektóre gatunki, jak *P. polymyxa*, *P. elgii*, *P. koreensis* mogą hamować rozwój patogenicznych grzybów w warunkach *in vitro* (Chung i wsp. 2000; Beatty i Jensen 2002; Ding i wsp. 2011).

W niniejszej pracy przedstawiono badania mające na celu określenie możliwości wykorzystania trzech szczepów bakterii z rodzaju *Paenibacillus* jako biologicznego czynnika zwalczania toksynotwórczych grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* w układzie modelowym na ziarnach ryżu.

## Materiały i metody / Materials and methods

Materiał badawczy stanowiły bakterie z rodzaju *Paenibacillus*: *P. macerans* PCM 1399, *P. alvei* PCM 481 oraz *P. polymyxa* PCM 2015 z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu. Testowane bakterie hodowano na bulionie odżywczym (Nutrient Broth, BIOSHOP) w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Jako mikroorganizmy wskaźnikowe wykorzystano dwa gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium*: *F. graminearum* KZF 1 oraz *F. culmorum* KZF 5, które pochodziły z kolekcji Centrum Badań Rejestracyjnych Agrochemikaliów Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu. Grzyby namnażano na podłożu PDA (Potato Dextrose Agar, BIOSHOP) przez 5–7 dni w temperaturze 25°C±1°C.

Aktywność badanych bakterii z rodzaju *Paenibacillus* w zakresie hamowania wzrostu grzybów i redukcji mykotoksyn fuzaryjnych określano w układzie modelowym na ziarnach ryżu bazując na metodyce opisanej przez Shi i wsp. (2014), Abd El Daim i wsp. (2015) oraz Perczaka i wsp. (2020) z pewnymi modyfikacjami. Do kolbek stożkowych odważono 50 g białego ryżu pochodzącego z ziaren ryżu siewnego (*Oryza sativa* L.), dodano 10 ml wody destylowanej i wyjałowiono w autoklawie (121°C, 27 minut), w celu usunięcia potencjalnej mikrobioty. Następnie, wyjałowiony ryż zaszczepiano 24-godzinnymi hodowlami bakterii testowych (*P. macerans* PCM 1399, *P. alvei* PCM 481 i *P. polymyxa* PCM 2015) o gęstości 10<sup>7</sup> jtk/ml i całość dokładnie wymieszano. Każdy szczep bakteryjny wprowadzano do odrębnego układu modelowego w dwóch wariantach – dodając 10 i 15 ml hodowli. W wariantach kontrolnych ryż mieszało się z jałowym bulionem odżywczym

(w ilości 10 oraz 15 ml). Zainokulowany ryż zakażono grzybami z rodzaju *Fusarium* (*F. graminearum* i *F. culmorum*) dodając po 3 krążki grzybni o średnicy 6 mm, wycięte ze świeżych (7-dniowych) hodowli. Tak przygotowane próbki inkubowano przez 21 dni w temperaturze pokojowej (około 20–25°C). Po okresie inkubacji próbki suszono w temperaturze 25°C±1°C, homogenizowano i poddano analizie w kierunku określenia poziomu ergosterolu (ERG) jako wskaźnika wzrostu grzybów, zearalenonu (ZEA) i deoksyniwalenolu (DON) z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w oparciu o procedurę opisaną przez Waśkiewicz i wsp. (2014) z pewnymi modyfikacjami.

W celu oznaczenia zawartości ERG do próbek odważono po 0,1 g zhomogenizowanych próbek, po czym zawieszono w metanolu (2 ml) oraz 2 M wodnym roztworze wodorotlenku sodu (0,5 ml) i poddano trzykrotnemu działaniu mikrofal (370 W) przez 10 sekund. Po doprowadzeniu próbek do temperatury pokojowej do mieszaniny dodano 1 M roztwór kwasu chlorowodorowego (1 ml) w celu zobojętnienia oraz metanol (2 ml) i wykonano trzykrotną ekstrakcję z wykorzystaniem n-pentanu (4 ml). Uzyskane po ekstrakcji frakcje przenoszono do fiolek i odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Przed wprowadzeniem na kolumnę chromatograficzną, pozostałość po suszeniu rozpuszczano w metanolu (1 ml) i przepuszczano przez 0,2 µm filtr (Chromafil, Macherey-Nagel, Duren, Niemcy). Zawartość ERG oznaczono przy zastosowaniu aparatu Waters 2695 i Photodiode Array Detector (Waters Division of Millipore, Milford, MA, USA) oraz kolumny 3,9 × 15 mm C<sub>18</sub> Nova Pak, 4 µm przy szybkości przepływu 1 ml/min stosując roztwór metanol : acetonitryl (90 : 10, v/v) jako fazę ruchomą. W celu określenia stężenia ERG porównywano czas retencji ze standardem zewnętrznym przy progu wykrywalności 10 ng/g.

Oznaczenie DON i ZEA polegało na zawieszaniu 10 g zmielonej próbki w 25 ml roztworu acetonitryl : woda [DON – (80 : 20, v/v), ZEA – (90 : 10, v/v)], poddaniu dwuminitowej homogenizacji i przefiltrowaniu 10 ml supernatantu przez sączek Wathman nr 4. Przefiltrowane ekstrakty przepuszczano przez kolumnę powinowactwa DON Test™ oraz ZearalaTest™ z szybkością przepływu 1–2 kropli na sekundę, suszono, po czym wymywano toksyny za pomocą metanolu (3 ml). Odparowaną do sucha pozostałość rozpuszczano w 1 ml mieszaniny acetonitryl : woda (70 : 30, v/v) (dla DON) oraz 0,5 ml acetonitryl : metanol : woda (70 : 20 : 10, v/v/v) (dla ZEA), homogenizowano w łaźni ultradźwiękowej (Ultron, typ U-505) i dozowano na kolumnę. Do oznaczeń chromatograficznych DON zastosowano aparat Waters 2695 i Photodiode Array Detector Waters 2996 (Waters, Milford, PA, USA) oraz kolumnę C<sub>18</sub> Nova Pak 3,9 × 300 mm przy następujących parametrach rozdziału: faza ruchoma: woda : metanol (70 : 30, v/v/v); przepływ: 0,5 ml/min; objętość dozowania: 10–20 µl; czas retencji:

12,44 min; próg wykrywalności: 10 ng/g. Dla oznaczenia ZEA zastosowano aparat Waters 2695, z zestawem detektorów Multi Fluorescence Detector Waters 2475, Photodiode Array Detector Waters 2996 (Waters, Milford, PA, USA) oraz kolumnę C<sub>18</sub> Nova Pak 3,9 × 150 mm przy następujących parametrach rozdziału: faza ruchoma: acetonitryl : woda : metanol (46 : 46 : 8, v/v/v); przepływ: 0,5 ml/min; objętość dozowania: 10–20 µl; czas retencji: 8,45 min; próg wykrywalności: 0,3 ng/g.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono jako średnie (± odchylenia standardowe) z trzech równoległych powtórzeń. Analiza statystyczna wpływu badanych bakterii na poziom ERG, ZEA i DON w ziarnach ryżu została przeprowadzona za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Jednorodność wariancji została zweryfikowana przy użyciu testu Levene'a, co pozwoliło dobrać odpowiedni test post-hoc. Dla jednorodnych prób zastosowano test Tukeya z wartością p < 0,05, natomiast dla prób niejednorodnych zastosowano test Gamesa-Howella z wartością p < 0,05. Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem programu statystycznego IBM SPSS.

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Wyniki doświadczeń dotyczące możliwości ograniczania wzrostu grzybów i redukcji poziomu mykotoksyn przez bakterie z rodzaju *Paenibacillus* sp. w układzie modelowym na ziarnach ryżu przedstawiono w tabelach 1–3. Aktywność fungistatyczną testowanych szczepów bakteryjnych wobec grzybów z rodzaju *Fusarium* wyrażono jako redukcję stężenia ERG w ziarnach ryżu. Na podstawie tabeli 1. można stwierdzić, że badane bakterie z rodzaju *Paenibacillus* skutecznie hamowały wzrost grzybów na ziarnach ryżu, co potwierdzają istotnie mniejsze stężenia ERG w porównaniu do prób kontrolnych. Poziom redukcji ERG zależał zarówno od szczepu bakterii, jak i izolatu grzyba, i kształtował się w zakresie od 11,6 do 84,6%, przy czym *F. graminearum* okazał się bardziej wrażliwy na działanie bakterii *Paenibacillus* w porównaniu do *F. culmorum*. Największy stopień redukcji ERG obserwowano w próbkach ryżu inokulowanych *P. alvei* PCM 481, gdzie redukcja sterolu wynosiła 73,2 i 74,7% (w przypadku *F. graminearum*) oraz 51,0 i 52,2% (w przypadku *F. culmorum*) w zależności od objętości dodatku hodowli bakteryjnej. Szczep *P. macerans* PCM 1399 najskuteczniej hamował wzrost *F. graminearum* w obu wariantach inokulacji ziaren ryżu (ponad 80% redukcja ERG), natomiast w ryżu zakażonym *F. culmorum* redukcja ERG nie przekroczyła 20%. Inokulacja ryżu hodowlą bakterii *P. polymyxa* PCM 2015 okazała się najmniej skuteczna w zakresie hamowania wzrostu *F. graminearum*, gdzie obserwowano redukcję stężenia ERG na poziomie 12,6 i 22,5% kolejno dla dodatku 10 i 15 ml hodowli. Warto podkreślić, iż zwiększenie objętości hodowli do in-

**Tabela 1.** Wpływ bakterii *Paenibacillus* sp. na wzrost grzybów z rodzaju *Fusarium* na ziarnach ryżu  
**Table 1.** Effect of *Paenibacillus* sp. bacteria on the growth of *Fusarium* fungi on rice grains

Wariant doświadczenia Variant of the experiment	Zawartość [ $\mu\text{g/g}$ ] i redukcja [%] ergosterolu w ziarnach ryżu Ergosterol content [ $\mu\text{g/g}$ ] and reduction [%] in rice grains			
	<i>Fusarium graminearum</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
	[ $\mu\text{g/g}$ ]	[%]	[ $\mu\text{g/g}$ ]	[%]
Dodatek 10 ml bulionu odżywczo/hodowli bakteryjnej Addition of 10 ml of nutrient broth/bacterial culture				
Kontrola Control	2216,31 d $\pm 19,73$	–	1087,77 d $\pm 17,44$	–
<i>P. macerans</i> PCM 1399	355,27 a $\pm 7,12$	84,0	963,24 c $\pm 13,68$	11,6
<i>P. alvei</i> PCM 481	594,55 b $\pm 5,51$	73,2	532,76 a $\pm 19,81$	51,0
<i>P. polymyxa</i> PCM 2015	1937,36 c $\pm 17,91$	12,6	894,49 b $\pm 19,08$	17,8
Dodatek 15 ml bulionu odżywczo/hodowli bakteryjnej Addition of 15 ml of nutrient broth/bacterial culture				
Kontrola Control	2612,38 d $\pm 20,04$	–	1215,62 d $\pm 15,53$	–
<i>P. macerans</i> PCM 1399	402,18 a $\pm 4,15$	84,6	1000,82 c $\pm 13,50$	17,7
<i>P. alvei</i> PCM 481	660,82 b $\pm 3,71$	74,7	580,78 a $\pm 7,82$	52,2
<i>P. polymyxa</i> PCM 2015	2024,11 c $\pm 11,96$	22,5	930,67 b $\pm 9,59$	23,5

Średnie oznaczone różnymi literami (a–d) dla danego wariantu różnią się istotnie na poziomie  $p < 0,05$   
 Average with different letters (a–d) for each variant are significantly different at the  $p < 0.05$

okulacji ryżu nie wpływało znacząco na poziom redukcji ERG w ziarnach. Większą redukcję ERG (ponad 5%) przy zwiększonym dodatku hodowli bakteryjnej obserwowano w przypadku *P. polymyxa* PCM 2015 oraz *P. marcescens* PCM 1399 w przypadku ryżu zakażonego *F. culmorum*.

Analizując zawartość ZEA w ziarnach ryżu (tab. 2) można zauważyć, że stopień ograniczenia wzrostu grzybów przez badane bakterie *Paenibacillus* nie w każdym przypadku przekładał się na redukcję stężenia toksyny. Objętość hodowli bakteryjnej użyta do inokulacji ryżu tylko w niektórych wariantach wpłynęła znacząco na redukcję ZEA. Po inokulacji ryżu 10 ml hodowli bakteryjnej tylko przy wykorzystaniu hodowli *P. polymyxa* PCM 2015 obserwowano niższe stężenie ZEA w ziarnach, przy czym istotną różnicę w porównaniu do próbki kontrolnej odnotowano tylko w ryżu zakażonym *F. culmorum*. Dodatek hodowli *P. macerans* PCM 1399 oraz *P. alvei* PCM 481 w objętości 10 ml nie wpływał na zmniejszenie stężenia ZEA w ziarnach ryżu. Istotną redukcję ZEA obserwowano po dodaniu do ryżu 15 ml hodowli *P. macerans* PCM 1399 w próbkach zakażonych *F. graminearum* (41,7%) oraz *P. alvei* PCM 481 i *P. polymyxa* PCM 2015 w próbkach zakażonych *F. culmorum* (redukcja ZEA odpowiednio o 32,5 i 37,8%).

W pozostałych przypadkach redukcja poziomu toksyny była niewielka (od 4,0 do 12,6%), a stężenie ZEA nie różniło się istotnie od stężenia w próbkach kontrolnych.

Stężenie DON w ziarnach ryżu inokulowanych hodowlami bakterii *Paenibacillus* było redukowane w większym stopniu w porównaniu do ZEA. Największy stopień redukcji DON (tab. 3) odnotowano dla próbek ryżu inokulowanego hodowlami *P. alvei* PCM 481. Spadek stężenia toksyny kształtował się na poziomie 97,2 i 89,3% przy dodatku 10 ml hodowli do ryżu zakażonego przez *F. graminearum* i *F. culmorum* oraz 98,0 i 94,4% dla dodatku 15 ml hodowli. Wysoki poziom redukcji DON (>85%) obserwowano również w próbkach z dodatkiem hodowli *P. macerans* PCM 1399 do ryżu zakażonego *F. graminearum* (85,7% i 90,0% dla dodatków odpowiednio 10 i 15 ml), natomiast w ryżu zakażonym *F. culmorum* inokulacja tym szczepem nie wpłynęła istotnie na redukcję stężenia DON. Szczep *P. polymyxa* PCM 2015 skutecznie (w ponad 58%) redukował poziom DON w ziarnach ryżu zakażonych *F. graminearum*, jednakże w ryżu zakażonym *F. culmorum* tylko inokulacja 15 ml hodowli istotnie obniżyła zawartość toksyny.

Przedstawione wyniki potwierdzają antagonistyczne oddziaływanie badanych bakterii *Paenibacillus* wobec grzy-

**Tabela 2.** Wpływ bakterii *Paenibacillus* sp. na stężenie zearalenonu w ziarnach ryżu  
**Table 2.** Effect of *Paenibacillus* sp. bacteria on the concentration of zearalenone in rice grains

Wariant doświadczenia Variant of the experiment	Zawartość [ $\mu\text{g/g}$ ] i redukcja [%] zearalenonu w ziarnach ryżu Zearalenone content [ $\mu\text{g/g}$ ] and reduction [%] in rice grains			
	<i>Fusarium graminearum</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
	[ $\mu\text{g/g}$ ]	[%]	[ $\mu\text{g/g}$ ]	[%]
Dodatek 10 ml bulionu odżywczo/hodowli bakteryjnej Addition of 10 ml of nutrient broth/bacterial culture				
Kontrola Control	248,32 ab $\pm 11,43$	–	54,12 b $\pm 2,27$	–
<i>P. macerans</i> PCM 1399	251,88 b $\pm 15,48$	–	66,49 c $\pm 4,37$	–
<i>P. alvei</i> PCM 481	257,40 b $\pm 6,04$	–	58,44 bc $\pm 3,86$	–
<i>P. polymyxa</i> PCM 2015	218,64 a $\pm 14,13$	12,0	36,84 a $\pm 4,59$	31,9
Dodatek 15 ml bulionu odżywczo/hodowli bakteryjnej Addition of 15 ml of nutrient broth/bacterial culture				
Kontrola Control	224,90 b $\pm 24,74$	–	53,78 b $\pm 17,43$	–
<i>P. macerans</i> PCM 1399	131,11 a $\pm 19,56$	41,7	51,60 b $\pm 1,00$	4,0
<i>P. alvei</i> PCM 481	208,75 b $\pm 25,90$	7,2	36,32 a $\pm 6,10$	32,5
<i>P. polymyxa</i> PCM 2015	196,66 b $\pm 12,45$	12,6	33,44 a $\pm 0,61$	37,8

Średnie oznaczone różnymi literami (a–c) dla danego wariantu różnią się istotnie na poziomie  $p < 0,05$   
 Average with different letters (a–c) for each variant are significantly different at the  $p < 0.05$

bów z rodzaju *Fusarium*. Inokulacja ziaren ryżu hodowlami bakteryjnymi, zarówno w objętości 10 i 15 ml, skutecznie ograniczyła wzrost *F. graminearum* oraz *F. culmorum*, co obserwowano jako spadek stężenia ERG w stosunku do prób kontrolnych. Jednakże, w przypadku redukcji poziomu ZEA i DON dodatek hodowli bakteryjnych nie zawsze wpływał na zmniejszenie stężenia toksyn w ziarnach, pomimo istotnego hamowania wzrostu grzybów. Przykładowo, inokulacja ziaren ryżu 10 ml hodowli *P. macerans* PCM 1399 indukowała syntezę mykotoksyn przez *F. culmorum*, gdzie stężenie DON lub ZEA było istotnie wyższe niż w próbkach kontrolnych. Zjawisko to może być związane z różnym mechanizmem reagowania grzybów na czynniki antagonistyczne, które w analizowanej pracy stanowiły bakterie z rodzaju *Paenibacillus*. Podobne spostrzeżenia poruszyły w pracy przeglądowej Suchorzyńska i Misiewicz (2009) analizując oddziaływanie chemicznych środków ochrony roślin na grzyby. Pomimo tego, w wielu wariantach przedstawionych w pracy odnotowano pozytywny efekt inokulacji ryżu bakteriami *Paenibacillus* związany z redukcją stężenia DON i ZEA, choć mechanizm działania badanych bakterii w tym zakresie nie był jeszcze analizowany. Dostępne dane literaturowe dość obszernie opisują

aktywność fungistatyczną bakterii z rodzaju *Paenibacillus*, co stanowi podstawę do poszukiwania nowych szczepów do biologicznej kontroli patogenów roślin. Przykładowo, Liu i wsp. (2011) opisali wpływ szczepu *P. polymyxa* na hamowanie wzrostu *F. graminearum*, a El Meleigi i wsp. (2014) udowodnili aktywność fungistatyczną szczepu *P. polymyxa* ME6 wobec *F. solani*. Inne szczepy *Paenibacillus* również charakteryzują się właściwościami antagonistycznymi względem grzybów z rodzaju *Fusarium*, czego przykładem może być szczep *Paenibacillus* sp. M4, wykazujący działanie fungistatyczne wobec *F. solani* i *F. oxysporum* (Janiewicz i Świątek-Brzezinska 2016), *P. ehimensis* KWN38, aktywny wobec *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Naing i wsp. 2014), czy *P. macerans* PCM 2633, który wykazywał działanie fungistatyczne względem *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. langsethiae* oraz *F. oxysporum* (Juś 2016). Bakterie z rodzaju *Paenibacillus* wykazują również aktywność antagonistyczną względem innych grzybów patogenicznych dla roślin, takich jak: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* oraz *Rhizopus stolonifer* (Deng i wsp. 2011), *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum caudatum* i *Pythium aphanidermatum* (Naing i wsp. 2014), czy *Alter-*

**Tabela 3.** Wpływ bakterii *Paenibacillus* sp. na stężenie deoksynivalenolu w ziarnach ryżu  
**Table 3.** Effect of *Paenibacillus* sp. bacteria on the concentration of deoxynivalenol in rice grains

Wariant doświadczenia Variant of the experiment	Zawartość [ $\mu\text{g/g}$ ] i redukcja [%] deoksynivalenolu w ziarnach ryżu Deoxynivalenol content [ $\mu\text{g/g}$ ] and reduction [%] in rice grains			
	<i>Fusarium graminearum</i>		<i>Fusarium culmorum</i>	
	[ $\mu\text{g/g}$ ]	[%]	[ $\mu\text{g/g}$ ]	[%]
Dodatek 10 ml bulionu odżywczego/hodowli bakteryjnej Addition of 10 ml of nutrient broth/bacterial culture				
Kontrola Control	629,24 d $\pm 25,76$	–	8,53 b $\pm 0,06$	–
<i>P. macerans</i> PCM 1399	90,01 b $\pm 20,12$	85,7	17,95 c $\pm 0,87$	–
<i>P. alvei</i> PCM 481	17,86 a $\pm 3,00$	97,2	0,91 a $\pm 0,18$	89,3
<i>P. polymyxa</i> PCM 2015	263,80 c $\pm 18,69$	58,1	9,74 b $\pm 0,38$	–
Dodatek 15 ml bulionu odżywczego/hodowli bakteryjnej Addition of 15 ml of nutrient broth/bacterial culture				
Kontrola Control	702,84 d $\pm 6,26$	–	12,39 c $\pm 0,84$	–
<i>P. macerans</i> PCM 1399	70,10 b $\pm 7,16$	90,0	11,73 c $\pm 0,90$	5,3
<i>P. alvei</i> PCM 481	14,15 a $\pm 0,44$	98,0	0,70 a $\pm 0,09$	94,4
<i>P. polymyxa</i> PCM 2015	212,86 c $\pm 15,20$	69,7	8,66 b $\pm 0,15$	30,1

Średnie oznaczone różnymi literami (a–d) dla danego wariantu różnią się istotnie na poziomie  $p < 0,05$   
 Average with different letters (a–d) for each variant are significantly different at the  $p < 0.05$

*aria alternata* (Gwiazdowski i wsp. 2013), co wskazuje na szerokie spektrum oddziaływania tej grupy bakterii. Zdecydowanie mniej w literaturze opisany jest wpływ bakterii *Paenibacillus* na ograniczenie wzrostu grzybów i redukcję mykotoksyn na ziarnach zbóż. Jednakże, interesujące badania przedstawił Abd El Daim i wsp. (2015) udowadniając, że badane szczepy *P. polymyxa* skutecznie ograniczały wzrost grzybów *F. graminearum* i *F. culmorum* w układzie modelowym na ziarnach pszenicy, jak również w istotny sposób redukowały zawartość DON i ZEA w ziarnach, przy czym różniły się efektywnością działania. Natomiast Shi i wsp. (2014) analizowali potencjał izolatów bakteryjnych z rodzaju *Bacillus*, pozyskanych z łupin orzechów, w zakresie hamowania wzrostu *F. graminearum* w układzie modelowym na pszenicy wykazując, że badane izolaty bakteryjne wyraźnie ograniczały wzrost grzyba po 10-dniowej inkubacji, natomiast po 18 dniach nie obserwowali już różnic w porównaniu z próbą kontrolną. W zakresie ograniczenia stężenia DON dla dwóch izolatów, autorzy odnotowali wysoki stopień redukcji toksyny (na poziomie 88–90%), natomiast pozostałe trzy wykorzystane izolaty charakteryzowały się niskim stopniem redukcji DON. Podobne rezultaty otrzymano w prezentowanej

pracy, obserwując różnice pomiędzy zdolnością badanych szczepów *Paenibacillus* w redukcji stężenia DON. Efekt zastosowania bakterii z rodzaju *Bacillus* jako biologicznego czynnika ochrony roślin został również opisany przez Chan i wsp. (2009), którzy badali wpływ szczepu *B. subtilis* D1/2 na redukcję stężenia ERG i DON produkowanych przez *F. graminearum* w ziarnach kukurydzy w warunkach polowych. We wspomnianej pracy badany szczep bakteryjny powodował spadek stężenia ERG w granicach 53–58% oraz DON w granicach 41–51%, a stopień redukcji metabolitów grzybowych zależny był zarówno od czasu, jak i dawki użytego inokulatu bakteryjnego po zakażeniu ziaren kukurydzy zarodnikami *F. graminearum*. Wpływ objętości dodatku hodowli bakteryjnej na poziom redukcji metabolitów grzybowych obserwowano również w niniejszym opracowaniu.

Uzyskane wyniki badań oraz doniesienia literaturowe wskazują na wysoki potencjał różnego rodzaju mikroorganizmów jako biologicznych czynników ochrony roślin. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań w tym obszarze dla określenia możliwie najszerszego spektrum działania aktywnych biologicznie szczepów oraz optymalizacji warunków ich stosowania.

## Wnioski / Conclusions

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Wszystkie testowane bakterie z rodzaju *Paenibacillus* skutecznie hamowały wzrost grzybów z rodzaju *Fusarium* w układzie modelowym na ziarnach ryżu.
2. Redukcja poziomu ZEA i DON w ziarnach ryżu kształtowała się w zakresie od 0 do 98% w zależności od

szczepu bakteryjnego oraz grzybów strzępkowych, jak również od objętości dodatku hodowli bakteryjnej do inokulacji ziaren.

3. Objętość hodowli bakteryjnej zastosowana do inokulacji ryżu wpływała na redukcję ZEA i DON w ziarnach, natomiast w mniejszym stopniu wpływała na stężenie ERG.

## Literatura / References

- Abd El Daim I.A., Häggblom P., Karlsson M., Stenström E., Timmusk S. 2015. *Paenibacillus polymyxa* A26 Sfp-type PPTase inactivation limits bacterial antagonism against *Fusarium graminearum* but not of *F. culmorum* in kernel assay. *Frontiers in Plant Science* 6: 368. DOI: 10.3389/fpls.2015.00368
- Beatty P.H., Jensen S.E. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Canadian Journal of Microbiology* 48 (2): 159–169. DOI: 10.1139/W02-002
- Chan Y.K., Savard M.E., Reid L.M., Cyr T., McCormick W.A., Seguin C. 2009. Identification of lipopeptide antibiotics of a *Bacillus subtilis* isolate and their control of *Fusarium graminearum* diseases in maize and wheat. *BioControl* 54 (4): 567–574. DOI: 10.1007/s10526-008-9201-x
- Chung Y.R., Kim C.H., Hwang I., Chun J. 2000. *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 (4): 1495–1500. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1495
- Deng Y., Lu Z., Bi H., Lu F., Zhang C., Bie X. 2011. Isolation and characterization of peptide antibiotics LI – F04 and polymyxin B<sub>6</sub> produced by *Paenibacillus polymyxa* strain JSa – 9. *Peptides* 32 (9): 1917–1923. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.08.004
- Desjardins A.E. 2007. *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. American Phytopathological Society (APS Press). St. Paul, MN, USA, 268 ss. ISBN 0-89-54-335-6.
- Ding R., Wu X.C., Qian C.D., Teng Y., Li O., Zhan Z.J., Zhao Y.H. 2011. Isolation and identification of lipopeptide antibiotics from *Paenibacillus elgii* B69 with inhibitory activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Microbiology* 49 (6): 942–949. DOI: 10.1007/s12275-011-1153-7
- 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
- El Meleigi M.A., Al-Rogaibah A.A., Ibrahim G.H., Al Gamhan K.A. 2014. Role of antibiosis and production of indole-3-acetic acid by bacilli strains in suppression of root pathogens and growth promotion of alfalfa seedlings. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (6): 685–696.
- Garcia S.N., Osburn B.I., Jay-Russell M.T. 2020. One health for food safety, food security, and sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 4: 1. DOI: 10.3389/fsufs.2020.00001
- Goliński P., Waśkiewicz A., Wiśniewska H., Kiecana I., Mielniczuk E., Gromadzka M., Kostecki M., Bocianowski J., Rymaniak E. 2010. Reaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to infection with *Fusarium* spp. - mycotoxins contamination in grain and chaff. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27: 1015–1024. DOI: 10.1080/19440041003702208
- Gwiazdowski R., Gwiazdowska D., Juś K., Bednarek-Bartsch A., Danielewicz B. 2013. Wstępna charakterystyka fungistatycznych metabolitów wytwarzanych przez *Paenibacillus* sp. [Preliminary characteristics of fungistatic metabolites produced by *Paenibacillus* sp.]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 53 (3): 533–537. DOI: 10.14199/ppp-2013-059
- Hofgaard I.S., Aamot H.U., Torp T., Jestoi M., Lattanzio V.M.T., Klemsdal S.S., Waalwijk C., Van der Lee T., Brodal G. 2016. Associations between *Fusarium* species and mycotoxins in oats and spring wheat from farmers' fields in Norway over a six-year period. *World Mycotoxin Journal* 9 (3): 365–378. DOI: 10.3920/WMJ2015.2003
- Holtappels D., Fortuna K., Lavigne R., Wagemans J. 2021. The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production. *Current Opinion in Biotechnology* 68: 60–71. DOI: 10.1016/j.copbio.2020.08.016
- Jankiewicz U., Świątek-Brzezinska M. 2016. The role of exochitinase type a1 in the fungistatic activity of the rhizosphere bacterium *Paenibacillus* sp. M4. *Archives of Biological Science* 68 (2): 451–459. DOI: 10.2298/ABS150619138J
- Juś K. 2016. Biologiczna kontrola grzybów strzępkowych z rodzaju *Fusarium* poprzez wykorzystanie bakterii *Paenibacillus* sp. s. 79–86. W: *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce. Mikrobiologia i ekologia* (M. Panfil, red.). *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Monografie. Młodzi Naukowcy*, Poznań. ISBN 978-83-65362-55-1.
- Liu Z., Fan L., Zhang D., Li Y. 2011. Antifungal depsipeptide compounds from *Paenibacillus polymyxa* HY96-2. *Chemistry of Natural Compounds* 47 (3): 496–497.
- Mielniczuk E., Skwaryło-Bednarz B. 2020. *Fusarium* head blight, mycotoxins and strategies for their reduction. *Agronomy* 10 (4): 509. DOI: 10.3390/agronomy10040509
- Nagendran K., Kumari S., Dubey V., Pandey K.K. 2020. Development of integrated disease management (IDM) module for major diseases in bitter melon. *Vegetable Science* 47 (1): 39–43.
- Naing K.W., Anees M., Kim S.J., Nam Y., Kim Y.C., Kim K.Y. 2014. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups. *Annals of Microbiology* 64 (1): 55–63. DOI: 10.1007/s13213-013-0632-y

- O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Magnon K.C., Cox P.A., Revankar S.G., Sanche S., Geiser D.M., Juba J.H., van Burik J.H., Padhye A., Anaissie E.J., Francesconi A., Walsh T.J., Robinson J.S. 2004. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (11): 5109–5120. DOI: 10.1128/JCM.42.11.5109-5120.2004
- Perczak A., Gwiazdowska D., Gwiazdowski R., Juś K., Marchwińska K., Waśkiewicz A. 2020. The inhibitory potential of selected essential oils on *Fusarium* spp. growth and mycotoxins biosynthesis in maize seeds. *Pathogens* 9 (1): 23. DOI: 10.3390/pathogens9010023
- Rahman M.T., Rubayet M.T., Khan A.A., Bhuiyan M.K.A. 2020. Integrated management of fusarium root rot and wilt disease of soybean caused by *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Biosciences* 17 (2): 83–96. DOI: 10.12692/ijb/17.2.83-96
- Raza W., Yuan J., Ling N., Huang Q., Shen Q. 2015. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biological Control* 80: 89–95. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2014.09.004
- Shaheen M., Li J., Ross A.C., Vederas J.C., Jensen S.E. 2011. *Paenibacillus polymyxa* PKB1 produces variants of polymyxin B-type antibiotics. *Chemistry & Biology* 18 (12): 1640–1648. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.09.017
- Shi C., Yan P., Li J., Wu H., Li Q., Guan S. 2014. Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (1): 1094–1105. DOI: 10.3390/ijerph110101094
- Singh R., Singh G.S. 2017. Traditional agriculture: a climate-smart approach for sustainable food production. *Energy, Ecology and Environment* 2 (5): 296–316. DOI: 10.1007/s40974-017-0074-7
- Suchorzyńska M., Misiewicz A. 2009. Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju *Fusarium* i ich wykrywanie technikami PCR. [Mycotoxigenic phytopathogenic fungi of *Fusarium* genus and their identification by PCR techniques]. *Postępy Mikrobiologii* 48 (3): 221–230.
- van der Lee T., Zhang H., van Diepeningen A., Waalwijk C. 2015. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. Foreword 32 (4): 453–460. DOI: 10.1080/19440049.2014.984244
- Waśkiewicz A., Morkunas I., Bednarski W., Mai V.C., Formela M., Beszterda M., Wiśniewska H., Goliński P. 2014. Deoxynivalenol and oxidative stress indicators in winter wheat inoculated with *Fusarium graminearum*. *Toxins* 6 (2): 575–591. DOI: 10.3390/toxins6020575
- Żmija D. 2014. Zrównoważony rozwój rolnictwa i obszarów wiejskich w Polsce. [Sustainable development of agriculture and rural areas in Poland]. *Studia Ekonomiczne* 166: 149–158.