

Received: 31.01.2023 / Accepted: 11.04.2023

ARTYKUŁ ORYGINALNY

## Wpływ bionawozów zawierających substancje humusowe na wzrost grzybów z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium* w warunkach *in vitro*

### The effect of biofertilizers containing humic substances on the growth of *Beauveria* and *Metarhizium* fungi *in vitro*

Anna Majchrowska-Safaryan\* , Cezary Tkaczuk 

#### Streszczenie

Biostymulatory, a wśród nich bionawozy wydają się jednym z najlepszych sposobów na wzrost lub utrzymanie obecnego tempa produkcji żywności, przy jednoczesnym zapewnieniu stabilności środowiska przyrodniczego. Celem pracy było określenie wpływu wybranych bionawozów zawierających substancje humusowe na wzrost w warunkach *in vitro* grzybów owadobójczych z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium* w kontekście łącznego ich stosowania w uprawie i ochronie roślin. W warunkach laboratoryjnych zbadano wpływ bionawozów Rosahumus, Liqhumus 18 i BNB na wzrost kolonii czterech wybranych gatunków grzybów entomopatogenicznych *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* i *Metarhizium flavoviride*. Bionawozy do podłoża hodowlanego Sabourauda (SDA) dodano w zalecanej dawce polowej. Obserwacje wzrostu kolonii prowadzono co 5 dni aż do 20. dnia mierząc średnicę kolonii w mm. Przeprowadzone badania wykazały, iż zastosowane w doświadczeniu bionawozy zawierające substancje humusowe działały w sposób zróżnicowany na wzrost gatunków grzybów owadobójczych z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium*. Spośród testowanych bionawozów, tylko preparat BNB w stosunku do wszystkich testowanych izolatów wykazał działanie inhibicyjne. Największe działanie stymulujące badanych preparatów stwierdzono w stosunku do grzybów *B. bassiana* i *M. flavoviride*, natomiast najbardziej wrażliwym gatunkiem okazał się *M. anisopliae*.

**Słowa kluczowe:** bionawozy, substancje humusowe, grzyby entomopatogeniczne, wzrost kolonii

#### Abstract

Biofertilizers, including biofertilizers, seem to be one of the best ways to increase or maintain the current rate of food production, while ensuring the stability of the natural environment. The aim of the study was to determine the effect of selected biofertilizers containing humic substances on the *in vitro* growth of entomopathogenic fungi of the genus *Beauveria* and *Metarhizium* in the context of their combined use in plant cultivation and protection. The effect of biofertilizers Rosahumus, Liqhumus 18 and BNB on the growth of colonies of four selected species of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* was tested in laboratory conditions. Biofertilizers were added to the Sabourauda (SDA) culture medium at the recommended field dose. Colony growth observations were made every 5 days until day 20th by measuring colony diameters in mm. The conducted research showed that the biofertilizers containing humic substances used in the experiment acted in a different way on the growth of insecticidal fungi of the genus *Beauveria* and *Metarhizium*. Among the tested biofertilizers, only the BNB preparation showed an inhibitory effect on all the tested isolates. The greatest stimulating effect of the tested preparations was found in relation to the fungi *B. bassiana* and *M. flavoviride*, while the most sensitive species turned out to be *M. anisopliae*.

**Key words:** biofertilizers, humic substances, entomopathogenic fungi, colony growth

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach  
Wydział Agrobiotechnologii i Nauk o Zwierzętach, Instytut Rolnictwa i Ogrodnictwa  
ul. Konarskiego 2, 08-110 Siedlce  
\*corresponding author: anna.majchrowska-safaryan@uph.edu.pl

## Wstęp / Introduction

Rozwój rolnictwa od początków istnienia w skali globalnej spowodował, iż obecnie obserwujemy i odczuwamy coraz intensywniej jego konsekwencje, takie jak wyczerpywanie się zasobów naturalnych, zwiększoną erozję i utratę naturalnej żyzności gleb, wzrost znaczenia nowych chorób i szkodników, niedobory wody, ograniczenie produkcji biomasy i spadek różnorodności biologicznej organizmów (Dara 2019; Baker i wsp. 2020; Hamid i wsp. 2021; Kuźniar i wsp. 2021). Poszukiwanie więc nowych, przyjaznych środowisku rozwiązań w uprawie roślin stało się nieuniknione. W tym kontekście wprowadzenie bionawozów staje się lepszą alternatywą niż stosowanie syntetycznych nawozów i środków ochrony roślin (Dara 2019; Baker i wsp. 2020; Hamid i wsp. 2021). Obecny trend zintegrowanej produkcji rolnej opiera się na koncepcji „Europejskiego Zielonego Ładu” i strategii „Od pola do stołu” (Ginter 2021).

W rolnictwie ekologicznym i integrowanym podstawowym założeniem jest odpowiednio wykluczenie i ograniczenie stosowania syntetycznych środków produkcji, przez co biopreparaty, a wśród nich biostymulatory, bionawozy i biopestycydy stanowią jeden z elementów agrotechniki, który może wpływać pozytywnie na wielkość i jakość plonów, a także mikrobiotę gleby (Rutkowska 2016). Jednymi z najważniejszych biostymulatorów roślin powszechnie stosowanymi od wielu lat są substancje humusowe, które powstają na skutek chemicznego i biologicznego rozkładu materii organicznej (Pylak i wsp. 2019). Substancje humusowe powodują wzrost pojemności wodnej gleby, poprawiają jej strukturę, zwiększają jej aktywność mikrobiologiczną, poprzez stymulację wzrostu i rozmnażania mikroorganizmów, co może między innymi przyspieszać rozkład substancji zanieczyszczających glebę (Ulukan 2008; Canelas i wsp. 2015; de Jardín 2015; Rutkowska 2016). Kolejną ważną

grupą są biopestycydy, które mogą stanowić alternatywę dla stosowania chemicznych środków ochrony roślin. W ich skład wchodzi bionsektycydy, ograniczające liczebność szkodliwych owadów (Grzyb i wsp. 2019). Zawierają m.in. grzyby z rodzajów *Beauveria*, *Metarhizium*, *Cordyceps* (Ciesielska i wsp. 2011; Sosnowska 2018, 2019; Grzyb i wsp. 2019). Grzyby owadobójcze licznie zasiedlają środowisko glebowe i wywołują w nich naturalne mykozy stawonogów (Tkaczuk 2008; Sosnowska 2013; Tkaczuk i wsp. 2013, 2014, 2016; Majchrowska-Safaryan 2022). Wykorzystanie owadobójczych grzybów jako środków biologicznej ochrony roślin zamiast pestycydów jest alternatywną metodą skutecznego ograniczania populacji szkodników. Grzyby entomopatogenne w przeciwieństwie do syntetycznych pestycydów nie mają negatywnego wpływu na zdrowie człowieka i środowisko.

Celem pracy było określenie wpływu wybranych bionawozów zawierających substancje humusowe na wzrost grzybów owadobójczych z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium* w warunkach *in vitro*.

## Materiały i metody / Materials and methods

W warunkach laboratoryjnych zbadano wpływ bionawozów zawierających substancje humusowe na wzrost kolonii czterech wybranych gatunków grzybów entomopatogenicznych *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin i *Metarhizium flavoviride* W. Gams & Rozsypal. Charakterystykę testowanych izolatów grzybów przedstawiono w tabeli 1.

Grzyby oznaczono makroskopowo za pomocą standardowych kluczy (Rehner i wsp. 2011; Humber 2012; Inglis i wsp. 2012), a dodatkowo ich przynależność taksonomiczną

**Tabela 1.** Charakterystyka izolatów grzybów entomopatogenicznych wykorzystanych w doświadczeniu  
**Table 1.** Characteristics of entomopathogenic fungal isolates used in the experiment

Gatunek grzyba Fungal species	Pochodzenie grzyba The origin of the fungus
<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill.	wyzolowany z gleby łąkowej za pomocą podłoża selektywnego – Klimonty (woj. mazowieckie) isolated from meadow soil using a selective medium – Klimonty (Mazowieckie Voivodeship)
<i>Beauveria brongniartii</i> (Sacc.) Petch	wyzolowany z gleby z zadrzewienia śródpolnego za pomocą podłoża selektywnego – Boćki (woj. podlaskie) isolated from the soil of mid-field shelterbelts using a selective medium – Boćki (Podlaskie Voivodeship)
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	wyzolowany z gleby z pola uprawnego za pomocą larw <i>Galleria mellonella</i> – Chodów (woj. mazowieckie) isolated from the soil of a cultivated field with <i>Galleria mellonella</i> larvae – Chodów (Mazowieckie Voivodeship)
<i>Metarhizium flavoviride</i> W. Gams & Rozsypal	wyzolowany z gleby z pola uprawnego za pomocą larw <i>Galleria mellonella</i> – Samowicze (woj. lubelskie) isolated from the soil of a cultivated field with <i>Galleria mellonella</i> larvae – Samowicze (Lubelskie Voivodeship)

na potwierdzono za pomocą badań molekularnych. Do identyfikacji wybrano marker ITS, który został zaproponowany jako uniwersalny marker kodu DNA dla grzybów (Schoch i wsp. 2012). Identyfikację molekularną izolatów przeprowadzono w laboratorium mikologicznym Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego z wykorzystaniem materiałów eksploatacyjnych firm Qiagen oraz Blirt (zestawy do izolacji DNA, zestaw do przeprowadzania reakcji PCR, zestaw do czyszczenia po reakcji). Reakcję PCR przeprowadzono według schematu zamieszczonego w pracy Kovač i wsp. (2020). Przy reakcji sekwencjonowania metodą Sangera wykorzystano pojedyncze startery ITS2, ITS3, ITS4 i ITS5 oraz zestaw BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) zawierający wyznakowane fluorescencyjnie trifosforany dideoksynukleotydów (ddNTP), trifosforany deoksynukleotydów (dNTP), polimerazę Taq FS oraz bufor. Czyszczenie produktu po sekwencjonowaniu przeprowadzono metodą sączenia molekularnego na kolumnkach z wykorzystaniem Sephadex G-50, a odczyt wyniku powierzono firmie Genomed (Warszawa). Uzyskane sekwencje zostały porównane poprzez algorytm BlastN 2.2.2 (Altschul i wsp. 1997) z sekwencjami obecnymi w bazach danych NCBI.

W doświadczeniu zostały użyte trzy bionawozy, takie jak: Rosahumus, Liqhumus 18 i Bopon natural biohumus (BNB) zawierające substancje humusowe (tab. 2). Nawozy dodawano do podłoża hodowlanego Sabourauda (SDA bio-Mérieux) o składzie enzymatycznym: hydrolizat kazeiny – 5,0 g, enzymatyczny hydrolizat tkanek zwierzęcych – 5,0 g,

glukoza – 40 g, agar – 15,0 g. Podłoża te były sterylizowane przy użyciu autoklawu parowo-ciśnieniowego w temperaturze 120°C przy ciśnieniu 1 atmosfery. Zastosowane w doświadczeniu bionawozy dodano do podłoża hodowlanego w zalecanej dawce połowej, a następnie przeniesiono na sterylne plastikowe szalki Petriego o średnicy 90 mm. Izolaty grzybów pochodziły z 10-dniowych kultur rosnących na SDA w temperaturze 21°C. Materiał pobierano za pomocą ezy i inokulowano nim centralnie podłoże stałe SDA. Szalki z wyszczepionymi izolatami umieszczono w inkubatorach, bez dostępu światła w temperaturze 22°C. Co 5 dni aż do 20. dnia wzrostu mierzono średnicę kolonii. Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach. Kontrolę stanowiły kultury rosnące na podłożach bez dodatku bionawozów. Wyniki przedstawiono jako wielkość średnicy kolonii wyrażoną w mm.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem program Statistica 13.3 TIBCO Software Inc. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i post-hoc test Tukeya. Wyliczone średnie połączono w jednorodne grupy na poziomie istotności  $\alpha < 0,05$ . Obliczono odchylenie standardowe.

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Biostymulatory to produkty stosowane na powierzchnię rośliny lub do gleby, zawierające żywe mikroorganizmy lub substancje humusowe, które sprzyjają wzrostowi i rozwojowi roślin, a także poprawiają kondycję gleby. Obecnie

**Tabela 2.** Charakterystyka bionawozów zawierających substancje humusowe zastosowane w doświadczeniu  
**Table 2.** Characteristics of biofertilizers containing humic substances used in the experiment

Preparat Producent Preparation Producer	Skład chemiczny Chemical composition	Dawka – uprawy rolnicze Dose – farm crops
Rosahumus Humintech Agrosimex	substancja organiczna 56%, w tym kwasy humusowe – 85%, tlenek potasu ( $K_2O$ ) – 12%, żelazo (Fe) – 0,6% organic substance 56%, including humic acids – 85%, potassium oxide ( $K_2O$ ) – 12%, iron (Fe) – 0,6%	doglebowo: 3–6 kg/ha w 300–500 l wody; dolistnie: 250–300 g/ha w 500 l wody soil application: 3–6 kg/ha in 300–500 l of water; foliar application: 250–300 g/ha in 500 l of water
Liqhumus 18 Rosier S.A.	kwasy humusowe – 18%, tlenek potasu ( $K_2O$ ) – 2,5%, żelazo (Fe) – 0,2% humic acids – 18%, potassium oxide ( $K_2O$ ) – 2,5%, iron (Fe) – 0,2%	doglebowo: 25–35 l/ha w 300–500 l wody; dolistnie: 0,7–1,5 l/ha w 300 l wody soil application: 25–35 l/ha in 300–500 l water; foliar application: 0.7–1.5 l/ha in 300 l water
Bopon natu- ral biohumus (BNB) Bros Sp. z o.o.	z hodowli dżdżownic kalifornijskich, substancja organiczna w tym kwasy humusowe – 40%, azot (N) – 0,02%, pięciotlenek fosforu ( $P_2O_5$ ) – 0,04%, tlenek potasu ( $K_2O$ ) – 0,05% from the breeding of California earthworms, organic substance including humic acids – 40%, nitrogen (N) – 0,02%, phosphorus pentoxide ( $P_2O_5$ ) – 0,04%, potassium oxide ( $K_2O$ ) – 0,05%	60–120 ml/1 litr wody 60–120 ml/1 liter of water

stosowane w ochronie roślin produkty mikrobiologiczne zawierają w swoim składzie bakterie z rodzajów *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* i *Bacillus* (*Bacillus thuringiensis*), sinice (BGA), nicienie, a także grzyby entomopatogeniczne z rodzajów *Beauveria* i *Metarhizium* (Sosnowska 2013, 2018, 2019; Tkaczuk i wsp. 2016; Kuźniar i wsp. 2021; Majchrowska-Safaryan 2022).

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowane w doświadczeniu bionawozy wpływały w sposób zróżnicowany na wzrost badanych gatunków grzybów owadobój-

czych. Stwierdzono, że rozwój kolonii testowanych izolatów uzależniony był od gatunku grzyba, a także rodzaju zastosowanego preparatu oraz terminu prowadzonej obserwacji (tab. 3, 4).

Spośród testowanych w doświadczeniu bionawozów, preparat Rosahumus wykazał najsilniejsze działanie stymulujące wzrost kolonii grzyba *B. bassiana* (tab. 3). W każdym terminie obserwacji średnice szczepu *B. bassiana* osiągały rozmiary większe od kolonii kontrolnych, przy czym w 5. dniu wzrostu różnica ta była statystycznie istotna. Bio-

**Tabela 3.** Średnica kolonii grzyba *Beauveria bassiana* i *Beauveria brongniartii* w trakcie hodowli na podłożach z dodatkiem bionawozów zawierających substancje humusowe [wyrażona w mm]

**Table 3.** Colony diameters of the fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* during culture on media with the addition of biofertilizers containing humic substances [expressed in mm]

Preparat Preparation	Średnica kolonii grzyba [mm] – Diameter of fungus colony [mm]			
	5 dzień 5th day	10 dzień 10th day	15 dzień 15th day	20 dzień 20th day
<i>Beauveria bassiana</i>				
Rosahumus	13,5 ± 0,58 a	24,5 ± 1,0 a	37,3 ± 1,15 a	49,6 ± 0,57 ab
Liqhumus 18	11,2 ± 0,95 b	16,5 ± 0,85 b	29,3 ± 2,15 ab	57,2 ± 2,21 a
BNB	11,0 ± 0,0 b	16,8 ± 0,74 b	24,5 ± 2,14 b	46,0 ± 1,82 b
Kontrola – Control	10,2 ± 0,81 b	19,2 ± 1,41 ab	32,0 ± 0,95 ab	47,2 ± 0,95 b
<i>Beauveria brongniartii</i>				
Rosahumus	16,3 ± 0,95 a	30,0 ± 1,41 a	46,7 ± 0,50 a	59,7 ± 0,70 a
Liqhumus 18	12,2 ± 0,85 b	22,5 ± 1,25 b	34,2 ± 0,50 a	55,0 ± 0,45 ab
BNB	10,8 ± 0,75 b	19,0 ± 0,95 b	35,2 ± 0,96 a	46,0 ± 0,74 b
Kontrola – Control	17,8 ± 0,95 a	28,6 ± 0,48 a	41,2 ± 0,85 a	52,8 ± 1,25 ab

BNB – Bopon natural biohumus; a, b – poziom istotności  $\alpha < 0,05$  – significance level  $\alpha < 0,05$ ; ± – odchylenie standardowe – standard deviation

**Tabela 4.** Średnica kolonii grzyba *Metarhizium anisopliae* i *Metarhizium flavoviride* w trakcie hodowli na podłożach z dodatkiem bionawozów zawierających substancje humusowe [wyrażona w mm]

**Table 4.** Colony diameters of the fungus *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* during culture on media with the addition of biofertilizers containing humic substances [expressed in mm]

Preparat Preparation	Średnica kolonii grzyba [mm] – Diameter of fungus colony [mm]			
	5 dzień 5th day	10 dzień 10th day	15 dzień 15th day	20 dzień 20th day
<i>Metarhizium anisopliae</i>				
Rosahumus	14,8 ± 0,25 a	32,3 ± 0,50 a	50,3 ± 1,24 a	65,6 ± 1,90 a
Liqhumus 18	11,3 ± 0,75 b	14,8 ± 0,50 b	31,3 ± 0,95 b	58,0 ± 1,25 a
BNB	11,0 ± 0,85 b	15,5 ± 1,25 b	35,5 ± 1,00 b	58,7 ± 1,09 a
Kontrola – Control	17,2 ± 0,84 a	31,4 ± 1,50 a	50,2 ± 0,84 a	67,2 ± 2,12 a
<i>Metarhizium flavoviride</i>				
Rosahumus	14,7 ± 0,98 a	31,0 ± 1,12 a	48,2 ± 1,41 a	63,0 ± 2,23 a
Liqhumus 18	8,75 ± 0,95 b	14,7 ± 1,20 b	35,2 ± 0,58 c	53,0 ± 0,81 b
BNB	8,75 ± 0,25 b	12,2 ± 0,95 c	38,0 ± 0,98 bc	51,5 ± 0,82 b
Kontrola – Control	16,0 ± 0,95 a	25,4 ± 0,85 a	42,2 ± 2,12 ab	51,8 ± 1,33 b

BNB – Bopon natural biohumus; a, b, c – poziom istotności  $\alpha < 0,05$  – significance level  $\alpha < 0,05$ ; ± – odchylenie standardowe – standard deviation



nawozy Lighumus 18 i BNB dodane do podłoża hodowlanego, w 5. dniu obserwacji stymulowały wzrost kolonii grzyba *B. bassiana*, natomiast w dwóch kolejnych terminach wykazały działanie inhibicyjne. W ostatnim dniu hodowli preparat BNB działał inhibicyjnie, natomiast Lighumus 18 stymulował wzrost kolonii testowanego grzyba, którego średnice osiągały 57,2 mm, a różnica ta była statystycznie istotna. W 10. i 15. dniu obserwacji grzyba *B. bassiana* stwierdzono brak istotnego statystycznie zahamowania wzrostu kolonii przez testowane bionawozy. Badania prowadzone przez Hirose i wsp. (2001), którzy testowali wpływ trzech bionawozów (EM-4, Multibion i Supermagro) na wzrost wegetatywny i kiełkowanie dwóch gatunków grzybów entomopatogenicznych, takich jak *M. anisopliae* i *B. bassiana* stwierdzili, że Multibion wykazywał umiarkowane działanie inhibicyjne w stosunku do grzyba *B. bassiana*. Felizatti i wsp. (2021) badając wpływ różnych biopolimerów, a wśród nich kwasów huminowych na wzrost i kiełkowanie zarodników grzyba *B. bassiana* nie zaobserwowali działania inhibicyjnego. Dodanie do podłoża kwasów huminowych sprzyja odporności i stabilności termicznej grzybów (Tomaszewski i wsp. 2011; de Melo i wsp. 2016).

Grzyb *B. brongniartii* okazał się bardziej wrażliwy na zalecaną dawkę połową testowanych preparatów humusowych niż *B. bassiana* (tab. 3). Badania wykazały, że preparat BNB miał najsilniejsze działanie inhibicyjne, ograniczając wzrost izolatu we wszystkich terminach obserwacji. Stwierdzono, iż izolat *B. brongniartii* rosnący na pożywce z dodatkiem bionawozów BNB i Lighumus 18, w dwóch pierwszych terminach obserwacji, osiągał statystycznie istotnie mniejszą średnicę w stosunku do rozmiarów kolonii kontrolnych. W odniesieniu do bionawozu Rosahumus nie stwierdzono istotnego statystycznego zahamowania wzrostu testowanego izolatu, w żadnym z terminów badań. W 20. dniu obserwacji szczep grzyba *B. brongniartii* rosnący na podłożu hodowlanym z dodatkiem bionawozu Rosahumus i Lighumus 18 osiągał rozmiary większe od kolonii kontrolnych, przy czym różnica ta była statystycznie nieistotna. Fedoseeva i wsp. (2021) podają, że substancje humusowe oddziałują bezpośrednio na żywe komórki, wywołując szerokie spektrum różnorodnych efektów biologicznych stymulując lub hamując rozwój grzybów.

Przeprowadzone badania wykazały, iż w pierwszych trzech terminach obserwacji dodanie do podłoża hodowlanego w zalecanej dawce połowej preparatów Lighumus 18 i BNB ograniczało wzrost izolatu *M. anisopliae* w stosunku do kontroli, a różnica ta była statystycznie istotna (tab. 4). Preparat Rosahumus nie wykazał statystycznie istotnego wpływu na wzrost *M. anisopliae*, przy czym w 10. i 15. dniu zaobserwowano niewielką stymulację wzrostu kolonii. W 20. dniu obserwacji wszystkie bionawozy ograniczały wzrost *M. anisopliae*, natomiast nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic wrażliwości badanego szczepu na poszczególne bionawozy. W 20. dniu wzrostu, kolonie

*M. anisopliae* na pożywce z dodatkiem bionawozu Rosahumus osiągały nieznacznie mniejsze rozmiary w porównaniu z kontrolą. W badaniach prowadzonych przez Hirose i wsp. (2001), preparaty EM-4 i Multibion dodane do podłoża hodowlanego w zalecanej dawce połowej zmniejszały współczynnik kiełkowania oraz ograniczały wzrost wegetatywny grzybni *M. anisopliae*.

Bionawóz Rosahumus dodany do podłoża hodowlanego w zalecanej dawce połowej w 10. i 15. dniu obserwacji nie ograniczał wzrostu grzyba *M. flavoviride*, a nawet wykazał działanie stymulujące (tab. 4). Kolonie osiągały rozmiary większe w porównaniu z kontrolą, jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. W 5. i 10. dniu obserwacji na pożywce z dodatkiem bionawozu Lighumus 18 i BNB stwierdzono istotnie statystyczne zahamowanie wzrostu testowanego izolatu, a w stosunku do preparatu Lighumus 18 również w 15. dniu. W 20. dniu prowadzonych badań preparaty Rosahumus i Lighumus 18 stymulowały wzrost grzyba *M. flavoviride* w porównaniu z kontrolą, przy czym tylko w stosunku do Rosahumus stwierdzono statystycznie istotne różnice. Stosowanie selektywnych produktów jest ważną strategią w integrowanej ochronie roślin w kontekście ograniczania ilości preparatów chemicznych możliwych do wykorzystania przeciwko agrofagom. W niektórych przypadkach kompatybilne produkty, takie jak bionawozy mogą być stosowane jednocześnie z grzybami owadobójczymi, zwiększając skuteczność ich działania (Moino i Alves 1998; Quintela i McCoy 1998).

Do tej pory przeprowadzono bardzo nieliczne badania dotyczące wpływu substancji humusowych na rozwój grzybów entomopatogenicznych. Według Kaisera i wsp. (2019) kwasy humusowe wykazały w warunkach *in vitro* wysoki potencjał ochrony (powyżej 90%) w stosunku do zarodników grzyba *B. bassiana* przed promieniowaniem UV, znanym czynnikiem fizycznym ograniczającym kiełkowanie konidiów grzybów owadobójczych (Fargues i wsp. 1996; Fernandes i wsp. 2007). Ponadto w warunkach polowych zaobserwowano znaczny wzrost przeżywalności zarodników tego grzyba po 7 i 14 dniach, przy łącznym stosowaniu z preparatami zawierającymi kwasy humusowe w stosunku do kontroli (Kaiser i wsp. 2019).

Grzyby entomopatogenne to heterogeniczne organizmy, które pełnią różne role ekologiczne w środowisku, nie tylko kontrolują naturalne populacje stawonogów (Tkaczuk 2008, 2014, 2016), ale także tworzą złożone relacje z roślinami i innymi mikroorganizmami (Canfora i wsp. 2023). Opiswane są one jako endofity korzeni, łodyg i liści roślin (Jaber i Enkerli 2017), dlatego istotne jest poznanie ich interakcji z preparatami użyźniającymi glebę. Produkty zawierające w swoim składzie substancje humusowe, z uwagi na korzystny wpływ, na właściwości bio-fizyko-chemiczne gleb, jak również mikroorganizmy glebowe oraz procesy zachodzące w roślinach i ich wzajemne powiązania, mogą stanowić wsparcie oraz alternatywę w uprawie i ochronie roślin,

w szczególności w kontekście strategii Europejskiego Zielonego Ładu.

## Wnioski / Conclusions

1. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowane w doświadczeniu bionawozy zawierające substancje humusowe działały w sposób zróżnicowany na wzrost gatunków grzybów owadobójczych z rodzaju *Beauveria* i *Metarhizium*.

2. Bionawóz Rosahumus dodany do podłoża hodowlanego stymulował wzrost badanych gatunków grzybów od początku, aż do końca eksperymentu i może być zalecany do łącznego stosowania z grzybami entomopatogenicznymi w uprawie i ochronie roślin.

3. Preparaty Lighumus 18 i BNB wykazały inhibicyjny wpływ na wzrost testowanych izolatów grzybów, głównie w pierwszych terminach prowadzonych obserwacji, natomiast w 20. dniu hodowli preparat Lighumus 18 w stosunku do grzyba *B. bassiana*, *B. brongniartii* i *M. flavoviride* wykazał działanie stymulujące.

## Literatura / References

- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25 (17): 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389
- Baker B.P., Green T.A., Loker A.J. 2020. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. *Biological Control* 140: 104095. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104095
- Canellas L.P., Olivares F.L., Aguiar N.O., Jones D.L., Nebbioso A., Mazzei P., Piccolo A. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196: 15–27. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.013
- Canfora L., Tartanus M., Manfredini A., Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Malusà E. 2023. The impact of *Beauveria* species bioinocula on the soil microbial community structure in organic strawberry plantations. *Frontiers in Microbiology* 13: 1073386. DOI: 10.3389/fmicb.2022.107338
- Ciesielska J., Malusà E., Sas-Paszat L. 2011. Środki ochrony roślin stosowane w rolnictwie ekologicznym. Opracowanie innowacyjnych technologii dla ekologicznej produkcji roślin sadowniczych. praca 3: 1–81.
- Dara S.K. 2019. The new integrated pest management paradigm for the modern age. *Journal of Integrated Pest Management* 10 (1): 12; 1–9. DOI: 10.1093/jipm/pmz010
- de Melo B.A.G., Motta F.L., Santana M.H.A. 2016. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science Engineering* 62: 967–974. DOI: 10.1016/j.msec.2015.12.001
- de Jardin P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196: 3–14. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.021
- Fargues J., Goettel M.S., Smits N., Ouedraogo A., Vidal C., Lacey L.A. 1996. Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic Hyphomycetes. *Mycopathologia* 135: 171–181. DOI: 10.1007/BF00632339
- Fedoseeva E.V., Tereshina V.M., Danilova E.A., Ianutsevich E.A., Yakimenko O.S., Terekhova V.A. 2021. Effect of humic acid on the composition of osmolytes and lipids in amelanin-containing phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Environmental Research* 193. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110395
- Felizatti A.P., Manzano R.M., Rodrigues I.M.W., das Graças Fernandes M.F., Fernandes J.B., Forim M.R. 2021. Encapsulation of *B. bassiana* in biopolymers. Improving microbiology of insect pest control. *Frontiers in Microbiology* 12: 704812. DOI: 10.3389/fmicb.2021.704812
- Fernandes É.K.K., Rangel D.E.N., Moraes Á.M.L., Bittencourt V.R.E.P., Roberts D.W. 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 96 (3): 237–243. DOI: 10.1016/j.jip.2007.05.007
- Ginter A. 2021. Małe gospodarstwa rolne wobec wyzwań zrównoważonego rozwoju i Zielonego Ładu. Monografia. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, 174 ss. ISBN 978-83-66541-76-4.
- Grzyb A., Waraczewska Z., Niewiadomska A., Wolna-Maruwka A. 2019. Czym są biopreparaty i jakie jest ich zastosowanie? *Nauka – Przyroda – Technologie* 13 (2): 65–76. DOI: 10.17306/J.NPT.2019.2.7
- Hamid B., Zaman M., Farooq S., Fatima S., Sayyed R.Z., Baba Z.A., Sheikh T.A., Reddy M.S., Enshasy H.E., Gafur A., Suriani N.L. 2021. Bacterial plant biostimulants: a sustainable way towards improving growth, productivity, and health of crops. *Sustainability* 13 (5): 2856. DOI: 10.3390/su13052856
- Hirose E., Neves P.M.O.J., Zequi J.A.C., Martins L.H., Peralta C.H., Moino A. 2001. Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44 (4): 419–423. DOI: 10.1590/S1516-89132001000400013
- Humber R.A. 2012. Identification of entomopathogenic fungi. s. 151–187. W: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (L.A. Lacey, red.). Academic Press, London, UK, 504 ss. Paperback ISBN 9780123868992. eBook ISBN 9780123869005.
- Inglis G.D., Enkerli J., Goettel M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. *Hypocreales*. Chapter VII. s. 189–253. W: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (L.A. Lacey, red.). Academic Press, London, UK, 504 ss. Paperback ISBN 9780123868992. eBook ISBN 9780123869005.
- Jaber L.R., Enkerli J. 2017. Fungal entomopathogens as endophytes: can they promote plant growth? *Biocontrol Science and Technology* 27 (1): 28–41. DOI: 10.1080/09583157.2016.1243227
- Kaiser D., Bacher S., Mène-Saffrané, Grabenweger G. 2019. Efficiency of natural substances to protect *Beauveria bassiana* conidia from UV radiation. *Pest Management Science* 75 (2): 556–563. DOI: 10.1002/ps.5209

- Kovač M., Gorczyk M., Wrzosek M., Tkaczuk C., Pernek M. 2020. Identification of entomopathogenic fungi as naturally occurring enemies of the invasive oak lace bug, *Corythucha arcuata* (Say) (Hemiptera: Tingidae). *Insects* 11 (10): 679. DOI: 10.3390/insects11100679
- Kuźniar A., Włodarczyk K., Gromadzka P., Siara A., Wolińska A. 2021. Aktualny stan wiedzy na temat biopreparatów stosowanych w rolnictwie. Wydawnictwo KUL, Lublin, 32 ss. ISBN 978-83-8061-964-7.
- Majchrowska-Safaryan A. 2022. Występowanie grzybów entomopatogenicznych w glebach murszowo-glejowych doliny rzecznej Liwca. [Occurrence of entomopathogenic fungi in muck-gial soils of the Liwiec river valley]. *Progress in Plant Protection* 62 (2): 91–99. DOI: 10.14199/ppp-2022-011
- Moino Jr. A., Alves S.B. 1998. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27 (4): 611–619. DOI: 10.1590/S0301-80591998000400014
- Pylak M., Oszust K., Frąc M. 2019. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Environmental Science and Biotechnology* 18: 597–616. DOI: 10.1007/s11157-019-09500-5
- Quintela E.D., McCoy C.W. 1998. Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *Journal of Economic Entomology* 91 (1): 110–122. DOI: 10.1093/jee/91.1.110
- Rehner S.A., Minnis A.M., Sung G.H., Luangsa-ard J.J., Devotto L., Humber R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103 (5): 1055–1073. DOI: 10.3852/10-302
- Rutkowska A. 2016. Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin. *Studia i Raporty IUNG-PIB* 48 (2): 65–80. DOI: 10.26114/sir.iung.2016.48.05
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109 (16): 6241–6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109
- Sosnowska D. 2013. Postępy w badaniach i wykorzystanie grzybów pasożytniczych w integrowanej ochronie roślin. [Progress in research and the use of pathogenic fungi in integrated plant protection]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 53 (4): 747–750. DOI: 10.14199/ppp-2013-018
- Sosnowska D. 2018. Konserwacyjna metoda biologiczna wsparciem integrowanej ochrony roślin i rolnictwa ekologicznego. [The contribution of conservation biological control method to integrated plant protection and organic farming]. *Progress in Plant Protection* 58 (4): 288–293. DOI: 10.14199/ppp-2018-040
- Sosnowska D. 2019. Grzyby pasożytnicze i antagonistyczne w biologicznej ochronie roślin w Polsce. [Parasitic and antagonistic fungi in biological plant protection in Poland]. *Progress in Plant Protection* 59 (4): 223–231. DOI: 10.14199/ppp-2019-029
- Tkaczuk C. 2008. Występowanie i potencjał infekcyjny grzybów owadobójczych w glebach agrocenoz i środowisk seminaturalnych w krajobrazie rolniczym. *Rozprawa Naukowa nr 94*. Wydawnictwo Akademii Podlaskiej, Siedlce, 160 ss.
- Tkaczuk C., Król A., Majchrowska-Safaryan A., Niecewicz Ł. 2014. The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated in a conventional and organic system. *Journal of Ecological Engineering* 15 (3): 137–144. DOI: 10.12911/22998993.1125468
- Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Harasimiuk M. 2016. Występowanie oraz potencjał infekcyjny grzybów entomopatogenicznych w glebach z pól uprawnych, łąk i siedlisk leśnych. [The occurrence and infective potential of entomopathogenic fungi in the soil of arable fields, meadows and forest habitats]. *Progress in Plant Protection* 56 (1): 5–11. DOI: 10.14199/ppp-2016-001
- Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Zawadzka M. 2013. Wpływ spinosadu oraz wybranych insektycydów syntetycznych na wzrost grzybów entomopatogenicznych w warunkach *in vitro*. [The effect of spinosad and selected synthetic insecticides on the growth of entomopathogenic fungi *in vitro*]. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering* 58 (4): 194–197.
- Tomaszewski J.E., Schwarzenbach R.P., Sandar M. 2011. Protein encapsulation by humic substances. *Environmental Science and Technology* 45 (14): 6003–6010. DOI: 10.1021/es200663h
- Ulukan H. 2008. Effect of soil applied humic acid at different sowing times on some yield components of wheat (*Triticum* spp.) hybrids. *International Journal of Botany* 4 (2): 164–175. DOI: 10.3923/ijb.2008.164.175