

AKTYWNOŚĆ *IN VITRO* *BACILLUS SUBTILIS* I *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* W HAMOWANIU ROZWOJU GRZYBÓW PATOGENICZNYCH DLA ROŚLIN BOBOWATYCH

KATARZYNA SADOWSKA, ANNA PUKACKA, MARIA RATAJ-GURANOWSKA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Bank Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
k.sadowska@iorpib.poznan.pl

I. WSTĘP

Rośliny uprawne w Polsce narażone są na zakażenia wieloma gatunkami grzybów patogenicznych. Środki chemiczne stosowane do zwalczania tych mikroorganizmów są kosztowne, szkodliwe dla środowiska naturalnego i czasami nieskuteczne ze względu na uodpornianie się patogenów. W związku z tym z roku na rok wzrasta zainteresowanie preparatami biologicznymi, w których wykorzystuje się niepatogeniczne mikroorganizmy glebowe.

Wiele gatunków bakterii rodzaju *Pseudomonas* określanych jest jako PGPR (ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Do grupy tej zalicza się mikroorganizmy wywierające korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Zjawisko to związane jest z bezpośrednim lub pośrednim oddziaływaniem mikroorganizmów na rośliny. Bezpośrednie oddziaływanie mikroorganizmów ryzosferowych wiąże się ze wzbogacaniem gleby w składniki pokarmowe oraz zwiększaniem ich przyswajalności dla roślin, jak również syntezą fitohormonów i witamin.

Oddziaływania pośrednie wynikają głównie z poprawy zdrowotności roślin przez inhibicję wzrostu patogenów oraz indukcję odporności roślin na choroby. Pozytywne oddziaływanie bakterii PGPR na rośliny jest możliwe dzięki wytwarzaniu przez nie biologicznie aktywnych metabolitów np. antybiotyków, cyjanowodoru, sideroforów, jak również regulatorów wzrostu i enzymów rozkładających ścianę komórkową patogenów (Handelsman i Stabb 1996; Kloepper i wsp. 1999; Nagarajkumar i wsp. 2004).

Celem pracy była ocena i porównanie aktywności fungistatycznej bakterii *Pseudomonas fluorescens* i *Bacillus subtilis* w stosunku do 4 gatunków grzybów patogenicznych dla roślin bobowatych.

II. MATERIAŁY I METODY

W badaniach wykorzystano patogeniczne szczepy grzybów *Sclerotinia sclerotiorum* (1240, 1241, 1275, 1515, 1283), *Botrytis cinerea* (984, 1855, 1871, 1896, 1912), *Fusa-*

rium oxysporum (841, 857, 1434, 127, 1857) i *Rhizoctonia solani* (1843, 1844, 1843, 1915), pochodzące z fasoli, lucerny, bobu, koniczyny, łubinu białego, łubinu wąskolistnego i łubinu żółtego. Wszystkie kultury pochodziły z Banku Patogenów Roślin i Badania ich Bioróżnorodności Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego i zostały wyizolowane w latach 1992–2009.

Antagonistyczne oddziaływanie bakterii *P. fluorescens* i *B. subtilis* oceniano w stosunku do wyżej wymienionych grzybów *in vitro* metodą podwójnych kultur.

Na pożywkę PDA (Potato-Dextrose Agar) posiewano w formie linii 24-godzinna kulturę bakterii, w odległości 2,5 cm od brzegu płytki. Po 48 godzinach inkubacji w odległości 4 cm od linii wzrostu bakterii, wykładano krążki o średnicy 5 mm wycięte z obwodu kolonii grzyba rosnącego na pożywce PDA. Strefę zahamowania wzrostu liniowego grzyba mierzono po 2 i 5 dniach wspólnej hodowli w temperaturze 22°C.

Doświadczenie założono w układzie bloków losowych, w 4 powtórzeniach po 1 płytce. Kontrolę dla szybkości wzrostu grzybni stanowiły płytki z samymi krążkami grzybni ułożonymi 2,5 cm od brzegu płytki.

W celu przedstawienia liczebności izolatów danego grzyba ograniczanych we wzroście przez kultury *Bacillus* i *Pseudomonas* oraz siły antagonistycznego oddziaływania tych bakterii, zastosowano 5-stopniową skalę, w zależności od szerokości tworzonej strefy zahamowania wzrostu.

Grupa I	≥ 20 mm	Grupa II	19,9–15 mm	Grupa III	14,9–10 mm
Grupa IV	9,9–5 mm	Grupa V	≤ 5 mm		

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji i półprzedziałów ufności Tukeya.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

Po 2 dniach wspólnego wzrostu bakterii z badanymi gatunkami grzybów strefa hamowania wynosiła od 1,5 do 29,2 mm zależnie od testowanego izolatu. Po 5 dniach efektywność antagonistycznego oddziaływania bakterii wobec grzybów była nieznacznie słabsza niż po 2 dniach. U 82% podwójnych kultur stwierdzono po 5 dniach strefę zahamowania wzrostu wynoszącą od 5 do 27,5 mm (w tym 8 izolatów grzybów znalazło się w I grupie i tyle samo w II grupie).

Wszystkie gatunki patogenów były hamowane przez bakterie *P. fluorescens* (tab. 1). Istotnie szerszą strefę zahamowania wzrostu niż u pozostałych izolatów stwierdzono w przypadku szczepu *P. fluorescens* wobec 14 izolatów grzybów po 2 dniach inkubacji, a po 5 dniach efektywność antagonistycznego oddziaływania była słabsza.

Największą aktywność fungistatyczną wykazywał szczep *P. fluorescens* wobec *S. sclerotiorum* (1240). W przypadku izolatów *R. solani* strefa zahamowania po 5 dniach wspólnego wzrostu z *B. subtilis*, jak i *P. fluorescens* była najniższa spośród testowanych patogenów i wynosiła poniżej 5 mm (V grupa).

Szczep *B. subtilis* charakteryzował się mniejszą aktywnością fungistatyczną w stosunku do wszystkich patogenów, aniżeli *P. fluorescens* i oddziaływał najsilniej na *B. cinerea* (1896).

Skuteczne zahamowanie wzrostu patogenów przez niepatogeniczne bakterie rodzajów *Pseudomonas* i *Bacillus* jest wynikiem wydzielania różnych substancji oraz współdziałania i uzupełniania się różnych mechanizmów (Ultan i wsp. 2001; Mark i wsp. 2006). Bakterie te kolonizują korzenie roślin tworząc wokół nich biofilmy oraz wydzie-

Tabela 1. Strefa zahamowania wzrostu 4 gatunków grzybów (w skali I–V) przez bakterie antagonistyczne po 2 i 5 dniach inkubacji na pożywca PDA

Table 1. Growth inhibition zone 4 fungi species (in scale I–V) by antagonistic bacteria after 2 and 5 days of incubation on PDA medium

Gatunek grzyba Fungi species	Liczba izolatów grzybów hamowanych przez bakterie Number of fungi isolates inhibited by bacteria																		
	<i>P. fluorescens</i>					<i>B. subtilis</i>													
	po 2 dniach po 5 dniach		after 2 days after 5 days			po 2 dniach po 5 dniach		after 2 days after 5 days			po 2 dniach po 5 dniach		after 2 days after 5 days						
Skala Scale	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
<i>S. sclerotiorum</i>	2	0	0	0	3	2	0	0	0	1	0	1	3	0	0	0	1	4	0
<i>B. cinerea</i>	2	0	0	0	2	3	0	0	0	1	0	1	3	0	0	0	1	4	0
<i>F. oxysporum</i>	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>R. solani</i>	0	1	1	1	0	1	0	0	3	0	0	1	2	1	0	0	0	0	4

lają do środowiska takie metabolity, jak cyjanowodór, siderofory (w tym piowerdyna, która ogranicza dostęp zwalczanego organizmu do żelaza), kwas salicylowy, peptydazy czy enzymy lityczne rozkładające wiązania glikozydowe (Fuchs i wsp. 2001). Różne gatunki laseczek rodzaju *Bacillus*, zasiedlających glebę charakteryzują się zdolnością tworzenia przetrwalników opornych na skrajne warunki środowiska, a obecność rzęsek ułatwia im penetrację środowiska naturalnego (Phae i wsp. 1990; Święcicka i Hauschild 1996). *Bacillus subtilis* znany jest jako antagonista szczególnie takich rodzajów grzybów jak: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* i *Pythium*, ale także jako czynnik stymulujący wzrost roślin (Utkhede i Smith 2000).

Antagonistyczne oddziaływanie bakterii wobec niektórych gatunków grzybów mikroskopowych jest zjawiskiem często opisywanym w literaturze, stąd od wielu lat wykorzystuje się te mikroorganizmy w biologicznej ochronie roślin (Walsh i wsp. 2001; Rudrappa i wsp. 2008). Bakterie te mogą być także alternatywą dla stosowania środków chemicznych, gdyż zgodnie z dyrektywami Unii Europejskiej ciągle dąży się do systematycznego ograniczania chemizacji środowiska. Dodatkową kwestią jest problem ciągłego uodporniania się patogenów na stosowane preparaty chemiczne. Z tego względu prowadzone są poszukiwania drobnoustrojów, które na drodze konkurencji o źródło pokarmu, energii, węgla i siedlisko mogłyby chronić rośliny przed czynnikami chorobotwórczymi. Wydaje się, że użycie bakterii antagonistycznych w integrowanej ochronie roślin może temu zapobiec (Nicot i wsp. 1996).

IV. WNIOSKI

1. Oba gatunki bakterii wykazywały trwale właściwości antagonistyczne wobec *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*.
2. Izolat *P. fluorescens* wykazywał większą aktywność fungistatyczną niż *B. subtilis*.
3. Zdolność do ograniczania wzrostu patogenów przez badane gatunków bakterii była większa po 2 dniach biotycznego oddziaływania i zmniejszała się po 5 dniach.

V. LITERATURA

- Fuchs R., Schäfer M., Geoffroy V., Meyer J.M. 2001. Siderotyping – A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 31–57.
- Handelsman J., Stabb E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell*. 8: 1855–1869.
- Kloepper J.W., Rodriguez-Ubana R., Zehnder G.W., Murphy J.F., Sikora E., Fernandez C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathol.* 28: 21–26.
- Mark G., Morrissey J.P., Higgins P., O’Gara F. 2006. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56: 165–173.
- Nagarajkumar M., Bhaskaran R., Velazhahan R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* 159: 73–78.
- Nicot P.C., Morison N., Decognet V. 1996. Protection pruning wounds on greenhouse tomatoes by saprophytic microorganisms against infection by *Botrytis cinerea*. In: 11th International Botrytis Symposium. Wageningen, Neetherlands, 23–27 VI 1996, p. 70.
- Phae C.G., Sasaki M., Shoda M., Kubota H. 1990. Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganisms. *Soil Sci. Nutr.* 36: 576–586.
- Rudrappa T., Biedrzycki M., Bais H.P. 2008. Causes and consequences of plant - associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64: 153–166.
- Święcicka I., Hauschild T. 1996. Rodzaj *Bacillus* - występowanie i znaczenie w środowiskach naturalnych. *Post. Microbiol.* 35: 27–41.
- Ultan F.W., Morrissey J.P., O’Gara F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 289–295.
- Utkhede R., Smith F.M. 2000. Impact of chemical, biological and cultural treatments on the growth and yield of apple in replant – disease soil. *Aust. Plant Pathol.* 29: 129–136.
- Walsh U.F., Morrissey J.P., O’Gara F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens from functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 289–295.

KATARZYNA SADOWSKA, ANNA PUKACKA, MARIA RATAJ-GURANOWSKA

IN VITRO ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* AND *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* IN GROWTH INHIBITION OF PATHOGENIC FUNGI FOR FABACEAE PLANTS

SUMMARY

The aim of presented studies was the biotic interaction of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* with the *Fabaceae* pathogens: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. The fungi were isolated from *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Vicia faba*, *Trifolium repens*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus albus* and *Lupinus luteus*. After 2 and 5 days of dual cultivation the inhibition zone between the bacteria and each of the fungus isolates was measured. Both isolates of bacteria inhibited the growth of fungi on PDA medium. The highest antagonistic activity showed *P. fluorescens* after 2 days in dual cultivation with *S. sclerotiorum* (1240).

Key words: antagonism, plant pathogens, biocontrol