

Małgorzata NABRDALIK<sup>1</sup> i Ewa MOLISZEWSKA<sup>1</sup>

## WYKORZYSTANIE ANTAGONISTYCZNYCH WŁAŚCIWOŚCI *Bacillus subtilis* WOBEC *Rhizoctonia solani*

### APPLICATION OF ANTAGONISTIC PROPERTIES OF *Bacillus subtilis* AGAINST *Rhizoctonia solani*

**Abstrakt:** Celem badań była ocena antagonistycznych właściwości, wyizolowanego z ryzosfery korzenia buraka cukrowego, szczepu *Bacillus subtilis* EM1 wobec *Rhizoctonia solani* ID105. Aktywność przeciwgrzybową określono w badaniach *in vitro* na podstawie zahamowania wzrostu grzybni patogenu oraz w doświadczeniu wazonowym, w którym określono wpływ *B. subtilis* EM1 na wzrost roślin porażonych tym patogenem. W pracy określono zdolność bakterii *B. subtilis* EM1 do biosyntezy kwasu indolilo-3-octowego (IAA). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że testowany szczep zahamowuje w 85,0% wzrost grzybni fitopatogenu, jednak nie ogranicza jego wpływu na wzrost i porażenie roślin. *B. subtilis* EM1 wykazuje zdolność do biosyntezy IAA. Największe stężenie 67,6 µg/cm<sup>3</sup> IAA stwierdzono po 7 dniach inkubacji szczepu w obecności 2000 µg/cm<sup>3</sup> L-tryptofanu. Badany szczep stymulował wzrost siewek buraka cukrowego.

**Słowa kluczowe:** *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*, aktywność przeciwgrzybowa, auksyny

### Wprowadzenie

Bakterie ryzosferowe promujące wzrost roślin (PGRP - plant growth-promoting rhizobacteria) stały się ważnym narzędziem w integrowanej ochronie roślin po wprowadzeniu 1 stycznia 2014 r. dyrektywy 2009/128/WE [1]. Zgodnie z ogólnymi zasadami integrowanej ochrony roślin, określonymi w załączniku III do ww. dyrektywy [1], nad chemiczne metody zwalczania organizmów szkodliwych przedkładać należy między innymi metody biologiczne, jeżeli zapewniają one ochronę przed organizmami szkodliwymi [1]. Do PGRP zaliczamy zarówno wolno żyjące bakterie glebowe bytujące w strefie korzeniowej, jak i bakterie endofityczne zasiedlające powierzchniowe tkanki korzeni, ale niewywołujące objawów chorobowych u roślin. Ich pozytywne działanie na rośliny można podzielić na bezpośrednie oraz pośrednie. Stymulacja bezpośrednia związana jest z produkcją fitohormonów (auksyn, cytokin, giberelin), zdolnością kontrolowania poziomu jonów żelaza dzięki produkcji sideroforów, wytwarzaniem kwasów organicznych oraz obniżeniem produkcji etylenu negatywnie wpływającego na rozwój roślin. Stymulacja pośrednia wzrostu roślin dotyczy procesów związanych z ochroną przed patogenami. Mechanizmy wykorzystywane w ochronie przed fitopatogenami to na przykład: indukcja odporności systemicznej, produkcja antybiotyków, egzopolisacharydów i enzymów litycznych, synteza metabolitów przeciwgrzybowych, wytwarzanie związków lotnych oraz konkurencja o niszę ekologiczną [2-6]. Jako bakterie ryzosferowe ograniczające choroby roślin wymienia się najczęściej niepatogeniczne szczepy należące do rodzaju *Bacillus* oraz *Pseudomonas* [4-6]. Bakterie te wykorzystywano w zwalczaniu fitopatogennych szczepów *Fusarium oxysporum* [7-10], *F. solani* [8, 10], *Alternaria*

<sup>1</sup> Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6, 45-032 Opole, tel. 77 401 60 50, email: mnabrdalik@uni.opole.pl

Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 16, Zakopane, 5-8.10.2016

*alternata* [8], *Colletotrichum falcatum* [11], *C. camelliae* [8], *C. gloeosporioides* [8, 9], *Pestalotiopsis eugeniae* [9], *Phytophthora capsici* [9], *Sclerotinia sclerotiorum* [8, 10], *Sclerospora graminicola* [5, 12], *Verticillium* sp. [13] oraz *Rhizoctonia solani* [8-10, 14, 15].

*Rhizoctonia solani* (Kühn) jest ważnym patogenem buraka cukrowego, powoduje szereg uszkodzeń, w tym zgorzel siewek i gnicie korzeni określane jako rizoktoniozy. Klasyfikacja patogenu oparta jest na przynależności do grup anastomozowych (AG - Anastomosis Group) od AG 1 do AG 13 i AG BI, które utworzono na podstawie zdolności łączenia się strzępek grzybni. Za najbardziej patogeniczne w stosunku do buraka cukrowego uznaje się szczepy należące do grup anastomozowych AG 2 i AG 4. Pierwsza z nich powoduje najczęściej gnicie korzeni, druga zazwyczaj przyczynia się do zgorzeli siewek [16, 17]. Ze względu na to, iż Polska zajmuje 6 miejsce w świecie i 3 miejsce w Europie w produkcji buraka cukrowego, ochrona plantacji przed tym patogenem jest niezmiernie ważna [18].

Brak możliwości chemicznej ochrony buraka przed *R. solani* skłania do poszukiwania alternatywnych metod, jak na przykład zastosowanie mikroorganizmów o dużej aktywności metabolicznej. Celem podjętych badań była ocena antagonistycznych właściwości, wyizolowanego z ryzosfery korzenia buraka cukrowego, szczepu *B. subtilis* EM1 wobec *R. solani* ID105. Aktywność przeciwrzybową analizowanego szczepu określono na podstawie: zdolności do zahamowania wzrostu grzybni patogenu, zdolności do ochrony siewek buraka cukrowego przed tym patogenem oraz zdolności do biosyntezy kwasu indolilo-3-octowego.

## **Materiał i metody**

### *Materiał biologiczny*

W badaniach użyto szczepu *B. subtilis* EM1 wyizolowanego, w trakcie wcześniejszych badań, z ryzosfery buraka cukrowego (*Beta vulgaris*). Bakterie były przechowywane w chłodni na skosach agarowych, a bezpośrednio przed doświadczeniem inkubowano je w bulionie odżywczym. *R. solani* ID 105 pochodził z kolekcji grzybów rodzaju *Rhizoctonia* zgromadzonej w Uniwersytecie Opolskim. Został wyizolowany z korzeni buraka cukrowego [19]. Przechowywany był na skosie PDA w chłodni, przed użyciem w doświadczeniu inkubowano go na pożywce PDA. Izolat ten został we wcześniejszych badaniach zakwalifikowany do grupy anastomozowej 2-2IIIB. Jest to grupa skupiająca patogeny m.in. korzeni buraka cukrowego. W doświadczeniu użyto otoczkowanych nasion buraka cukrowego odmiany Janosik (KHBC).

### *Metoda hodowlano- płytkowa*

W doświadczeniu określono antagonistyczne właściwości ryzosferowego szczepu *B. subtilis* EM1 wobec fitopatogenicznego szczepu *R. solani* ID105 AG 2-2 IIIB. W hodowlach testowych na podłoże PDA wprowadzono supernatanty 48-godzinnych hodowli *B. subtilis* EM1, a następnie podłoża zaszczerpiono krążkami podłoża PDA o średnicy 8 mm przerośniętymi 7-dniową kulturą *R. solani* ID105. Kontrolę stanowiły hodowle *R. solani*, które zamiast supernatantu zawierały sterylne podłoże bulionowe.

Wszystkie hodowle płytkowe prowadzono w temperaturze 22°C, dokonując codziennie pomiaru średnicy kultury do czasu, gdy w kombinacji kontrolnej grzybnia dorosła do brzegów płytki. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach, przyjmując za powtórzenie jedną szalkę z podłożem z jednym krążkiem grzybni.

Po zakończeniu hodowli wykonano preparaty mikroskopowe i dokonano charakterystyki morfologicznej *R. solani* ID105 - pomiaru średnicy strzępek [µm] oraz oceny obecności komórek monilioidalnych.

Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono *współczynnik inhibicji/stymulacji wzrostu liniowego grzybni I*:

$$I = \frac{K - B}{K} \cdot 100\%$$

gdzie: *K* - średnica kolonii grzyba w kontroli [mm], *B* - średnica kolonii grzyba w próbie badanej [mm].

Wpływ badanego szczepu EM1 na dynamikę wzrost *R. solani* ID105 określono na podstawie *indeksu tempa wzrostu (ITW)*, wyliczonego według wzoru [20]:

$$ITW = \frac{A}{D} + \frac{b_1}{d_1} + \frac{b_2}{d_2} + \dots + \frac{b_x}{d_x}$$

gdzie: *A* - średnia z pomiarów średnicy kolonii grzyba [mm], *D* - czas trwania doświadczenia [dni], *b*<sub>1</sub> ... *b*<sub>*x*</sub> - przyrost średnicy kolonii [mm], *d*<sub>1</sub> ... *d*<sub>*x*</sub> - liczba dni od ostatniego pomiaru.

#### *Doświadczenie wazonowe*

W warunkach doświadczenia wazonowego analizowano wpływ szczepu *B. subtilis* EM1 na wzrost buraka cukrowego w wazonach z podłożem zainfekowanym i niezainfekowanym *R. solani* ID105. W badaniach jako podłoże wykorzystano glebę ogrodową, glebę pochodzącą z pola uprawnego (piasek gliniasty) oraz perlit wymieszane w proporcjach 2 : 1 : 0,5. W wazonach o pojemności 500 cm<sup>3</sup> wysiano po 10 sztuk otoczkowanych nasion buraka cukrowego. Doświadczenie prowadzono w warunkach laboratoryjnych, w temperaturze 22°C, z zastosowaniem sztucznego oświetlenia typu Fluora przy 12-godzinnym fotoperiodzie. Wazony podlewano wodą wodociągową tak, aby gleba była stale wilgotna. W trakcie trwania doświadczenia z wazonów sukcesywnie usuwano rośliny chore i zamierające. Po 6 tygodniach usunięto najsłabsze rośliny, pozostawiając w wazonach po 6 najlepiej rozwiniętych sztuk, wtedy do gleby wprowadzono po 5 cm<sup>3</sup> dwudniowych hodowli *B. subtilis* EM1 inkubowanych w bulionie odżywczym. Po tygodniu od inokulacji bakteriami do części wazonów wprowadzono dodatkowo po 5 cm<sup>3</sup> inokulum *R. solani* ID105, pochodzącego z 3-tygodniowej hodowli na pożywce piaskowo-kukurydzianej.

Stopień porażenia siewek i/lub młodych roślin buraka określono w skali 4-stopniowej, w której: 0 oznacza brak objawów chorobowych, 1 - słabe objawy porażenia (pojedyncze, drobne plamy), 2 - silne objawy porażenia (50% lub więcej powierzchni korzenia objęte nekrozą), 3 - roślina zamarała z całkowicie zniszczonym korzeniem [19]. Na tej podstawie wyliczono procent porażonych roślin, a następnie obliczono *indeks porażenia korzeni (IPK)* według wzoru Townsenda i Heubergera [21]:

$$IPK = \frac{\sum(n \cdot a) \cdot 100\%}{v \cdot N}$$

gdzie:  $n$  - liczba roślin w danym stopniu porażenia,  $a$  - stopień porażenia,  $v$  - najwyższy stopień skali,  $N$  - całkowita liczba badanych roślin.

Dla roślin niewykazujących objawów chorobowych, ocenionych w skali porażenia jako 0, zmierzono długość korzenia i liści, określono świeżą i suchą masę. Wyniki przeliczono na pojedynczą roślinę.

#### *Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego (IAA)*

Oceniłono zdolność *B. subtilis* EM1 do biosyntezy kwasu indolilo-3-octowego metodą kolorymetryczną. Metoda oparta jest na reakcji pomiędzy odczynnikiem Salkowskiego a IAA i pomiarze intensywności zmiany koloru spektrofotometrycznie przy długości fali 530 nm [22].

Szczep *B. subtilis* BM1 hodowano w pożywce LB (Laurin Broth) bez L-tryptofanu oraz w pożywce LB z dodatkiem aminokwasu w stężeniach 500, 1000, 2000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  i inkubowano w temperaturze 30°C przez 168 godzin. Po inkubacji pożywkę wirowano przez 20 minut przy 10 000 obrotów na minutę w temperaturze 10°C. Następnie do 1  $\text{cm}^3$  supernatantu dodano 2  $\text{cm}^3$  odczynnika Salkowskiego i po 30 minutach przechowywania w ciemności określono ilość wytworzonego IAA [ $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ]. Oznaczenia przeprowadzono w 3 powtórzeniach co 24 godziny.

W celu określenia potencjału przeciwgrzybowego szczepu *B. subtilis* EM1 wyniki biosyntezy IAA porównano z wynikami uzyskanymi w takich samych warunkach doświadczenia dla szczepu *B. subtilis* QST713, zastosowanego jako szczep referencyjny. Szczep ten wyizolowano z preparatu Serenade ASO (Bayer) - biologicznego środka ochrony roślin przed grzybami.

#### *Analiza statystyczna*

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z użyciem testu Tukeya, przyjmując wyniki za istotne statystycznie na poziomie  $p < 0,05$ .

#### **Wyniki i ich omówienie**

Przeprowadzone badania *in vitro* pozwoliły określić bezpośredni wpływ *B. subtilis* EM1 na dynamikę wzrostu grzybni *R. solani* ID105 (tab. 1). Wprowadzenie do podłoża metabolitów *B. subtilis* EM1 skutkowało zahamowaniem wzrostu grzybni o 85,0% i tempa jej wzrost o ponad 91,0% w stosunku do próby kontrolnej. Dzienny średni przyrost grzybni w próbie kontrolnej wynosił 8,20 mm, a w obecności metabolitów *B. subtilis* EM1 już tylko 0,55 mm. Znacznie większym tempem wzrostu charakteryzował się szczep *R. solani*, analizowany przez Elkahoui i in. [23], dla którego dzienny przyrost grzybni wynosił około 10,0 mm w próbie kontrolnej i 3,50 mm w obecności *B. subtilis*. Autorzy uzyskali zahamowania wzrostu grzybni jedynie na poziomie 44,0%. Hernández i in. [24] w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem szczepów *Bacillus* spp. uzyskali zahamowanie grzybni *R. solani* w granicach od 29,4 do 40,4%. Zbliżone wartości dla różnych szczepów

*B. subtilis* otrzymali Imran i in. [25]. Natomiast, znacznie wyższe wartości, porównywalne z wynikami badań własnych, zaprezentowali Kai i in. [26]. Wahyudi i in. [27] u 75,0% analizowanych ryzosferowych szczepów *Bacillus* spp. stwierdzili antagonistyczne właściwości wobec *R. solani*, które powiązali ze zdolnością do produkcji sideroforów.

Tak duże rozbieżności w uzyskanych wynikach są efektem różnych warunków prowadzenia prezentowanych doświadczeń *in vitro*, takich jak: rodzaj podłoża, rodzaj i pochodzenie szczepów, warunki hodowli. Jednak wydaje się, iż szczepy, które działają jedynie fungistatycznie i powodują zahamowanie wzrostu grzybni mniej niż w 80,0%, należy uznać za szczepy o słabych właściwościach antagonistycznych wobec fitopatogenów rodzaju *Rhizoctonia*. W badaniach własnych, pomimo znaczącego ograniczenia wzrostu *R. solani* ID105 przez testowane bakterie, zaobserwowano istotne zwiększenie średnicy strzępek grzybni o 1,11  $\mu\text{m}$  w porównaniu do grzybni kontrolnej i wcześniejsze wytworzenie komórek monilioidalnych. Komórki te, łącząc się, tworzą twarde grubościennne struktury zwane sklerocjami, dzięki którym grzybnia może przetrwać niekorzystne warunki środowiska. W optymalnych warunkach środowiska sklerocja kiełkują ponownie w intensywnie rozwijającą się grzybnię. Wówczas najbardziej narażone na infekcje są młode, wolno rosnące rośliny. Badany szczep *B. subtilis* EM1 nie powoduje uszkodzenia komórek patogenu, zatem przy braku jego metabolitów w środowisku *R. solani* może z powodzeniem infekować siewki buraka cukrowego.

Wpływ *in vitro* *B. subtilis* EM1 na wzrost grzybni *R. solani* ID105

Tabela 1

The influence of *B. subtilis* EM1 on mycelial growth of *R. solani* ID105

Table 1

Próba	Średnica strzępek [ $\mu\text{m}$ ]		Obecność komórek monilioidalnych	Współczynnik inhibicji wzrostu grzybni [%]		Indeks tempa wzrostu [-]	
	średnia	$\pm SD^*$		średnia	$\pm SD^*$	średnia	$\pm SD^*$
Kontrola <i>R. solani</i> ID105	6,92	0,90	+	0,00	0,00	92,56	0,21
<i>B. subtilis</i> EM1 + <i>R. solani</i> ID105	8,0	2,0	+	85,0	1,5	8,0	1,6

\* odchylenie standardowe, \* standard deviation

Powyższe stwierdzenie potwierdza przeprowadzone doświadczenie wazonowe, w którym oceniono wpływ *B. subtilis* EM1 na wzrost roślin nieinokulowanych i inokulowanych *R. solani* ID105 (tab. 2). W próbie kontrolnej, bez inokulum *B. subtilis* EM1 i *R. solani* ID105, nie stwierdzono roślin porażonych. Wzbogacenie gleby w inokulum badanych szczepów skutkowało wystąpieniem porażenia. W obecności *R. solani* ID105 dominowały rośliny z całkowicie zamartwym korzeniem, a niewielki odsetek stanowiły rośliny zdrowe. W przypadku wazonów inokulowanych kulturami *B. subtilis* EM1 odsetek porażonych roślin wynosił nieco ponad 18,0%, a wynikało to z obecności pojedynczych roślin porażonych i ocenionych wg skali na 1. Różnice pomiędzy wartościami *IPK* oraz ilością porażonych roślin w stosunku do kontroli nie były istotne statystycznie. Natomiast w wazonach, do których wprowadzono zarówno *B. subtilis* EM1, jak i *R. solani* ID105, nie stwierdzono roślin zdrowych. Dominowały rośliny zainfekowane

w skali 2 oraz 3. Stąd w tabeli 3 brak dla tych prób wyników takich parametrów, jak: długość korzenia i liści oraz świeża i sucha masa. Parametry te określono tylko dla roślin bez objawów chorobowych (tab. 3). Należy podkreślić, iż wykorzystany w doświadczeniu szczep *R. solani* ID105 nie miał istotnego wpływu na rozwój korzeni oraz liści zdrowo wyglądających rośliny. Natomiast w przypadku oddziaływania na młode rośliny buraka *B. subtilis* EM1 wpływ ten był widoczny w przypadku korzeni, które były dłuższe o 26,0% w stosunku do roślin kontrolnych (różnica istotna statystycznie) i o 15,8% w stosunku do roślin pochodzących z wazonów z glebą wzbogaconą o inokulum *R. solani* ID105 (różnica nieistotna statystycznie).

Tabela 2

Wpływ *B. subtilis* EM1 na porażenie buraka cukrowego

Table 2

The influence of *B. subtilis* EM1 of sugar beet infection

Próba	Indeks porażenia korzeni [%]		Ilość porażonych roślin [%]	
	średnia	±SD*	średnia	±SD*
Kontrola	0,00 a	0,00	0,00 a	0,00
<i>R. solani</i> ID105	62 b	15	84b	11
<i>B. subtilis</i> EM1	6,0 a	4,8	18 a	14
<i>B. subtilis</i> EM1 + <i>R. solani</i> ID105	82c	11	100 b	0,00

\* odchylenie standardowe, \* standard deviation

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w kolumnach nie różnią się istotnie przy  $p < 0,05$ Mean values with the same letter in the column are not significantly different at  $p < 0.05$ 

Tabela 3

Wpływ *B. subtilis* EM1 na wzrost buraka cukrowego

Table 3

The influence of *B. subtilis* EM1 on sugar beet plants growth

Próba	Długość korzenia [cm]		Długość liścia [cm]		Świeża masa [g]		Sucha masa [g]	
	średnia	±SD*	średnia	±SD*	średnia	±SD*	średnia	±SD*
Kontrola	9,0 a	2,0	17,4 a	4,1	5,85 a	0,35	0,64 a	0,33
<i>R. solani</i> ID105	9,8 ab	2,5	16,0 a	1,5	4,28 a	0,20	0,46 b	0,23
<i>B. subtilis</i> EM1	11,4 b	2,4	18,5 a	3,9	6,14 a	0,23	0,49 cb	0,24
<i>B. subtilis</i> EM1 + <i>R. solani</i> ID105	0,00 c	0,00	0,00 b	0,00	0,00 b	0,00	0,00 d	0,00

\* odchylenie standardowe, \* standard deviation

Średnie wartości oznaczone tą samą literą w kolumnach nie różnią się istotnie przy  $p < 0,05$ Mean values with the same letter in the column are not significantly different at  $p < 0.05$ 

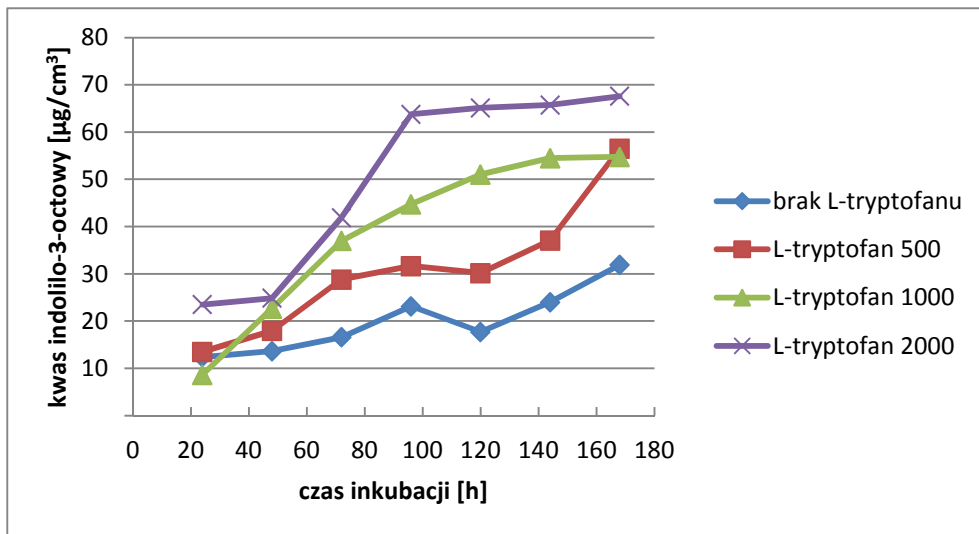
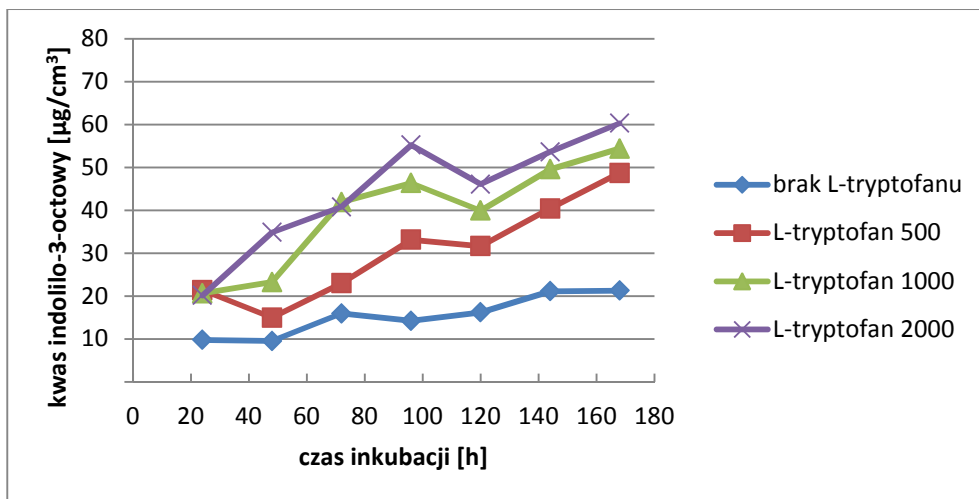
Aktywność przeciugrzybowa *B. subtilis* wynikała zarówno z indywidualnych cech szczepu antagonistycznego, jak i cech patogenu. Potwierdzają to badania Kiewnick i in. [16], którzy wykorzystali znacznie mniej wirulentny szczep *R. solani*, należący także do grupy anastomozowej AG 2-2. Procent porażonych siewek buraka cukrowego w próbie kontrolnej wynosił w tym przypadku jedynie 27,3%, a indeks porażenia 2,81%. Natomiast ilość porażonych roślin po zastosowaniu sześciu szczepów *Bacillus* spp., wobec takiego

mało wirulentnego patogenu, wynosiła już tylko od 13,5 do 20,9%. Z kolei Moliszewska [28] ilość porażonych roślin buraka cukrowego w próbach z *B. subtilis* i *R. solani* określiła na poziomie 50,0%, pomimo braku inhibicji wzrostu grzybni w doświadczeniu *in vitro*.

Wobec powyższych ustaleń nasuwa się kolejny wniosek, iż aktywność przeciwgrzybowa bakterii rodzaju *Bacillus* jest związana z ich zdolnością do produkcji substancji aktywnych biologicznie uwalnianych w określonych warunkach środowiska. Do takich związków należą między innymi antybiotyki peptydowe. Można tu wymienić przeciwgrzybicze peptydy cykliczne należące do grupy ituryn: mykosubtilina, bacillomycyna, surfaktyna, fungistatyna, subsporyna oraz peptydy liniowe, takie jak rhizoktycyna [24]. Rodzaj *Bacillus* produkuje również szereg innych metabolitów, w tym enzymy rozkładające ścianę komórkową, czy też związki lotne wspomagające mechanizmy odporności roślin, np. fitohormony z grupy auksyn [16, 29].

Kolejna część badań dotyczyła oceny zdolności *B. subtilis* EM1 do biosyntezy kwasu indolilo-3-octowego (IAA) - jednej z ważniejszych auksyn naturalnych. W badaniach uwzględniono wpływ czasu oraz stężenia L-tryptofanu, prekursora IAA, na ilość tworzonych auksyn (rys. 1). Kontrolę pozytywną stanowił *B. subtilis* QST713, wykorzystany przez firmę Bayer szczep o udokumentowanych właściwościach przeciwgrzybowych (rys. 2). Wykorzystane w doświadczeniu szczepy wytwarzały IAA na różnym poziomie zarówno w obecności L-tryptofanu, jak i przy jego braku w pożywce. Zależność pomiędzy zdolnością do biosyntezy IAA a dawką L-tryptofanu i czasem reakcji jest wprost proporcjonalna. Wraz ze wzrostem stężenia L-tryptofanu oraz upływem czasu zwiększała się ilość produkowanego IAA. Dla szczepu *B. subtilis* EM1 najmniej, 8,64  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  IAA, uzyskano po zastosowaniu 1000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  L-tryptofanu po 24 godzinach inkubacji. Natomiast najwięcej, 67,6  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  IAA, uzyskano przy najwyższym stężeniu L-tryptofanu (rys. 1). Podobnie było w przypadku szczepu *B. subtilis* QST713, gdzie najniższe stężenie IAA (9,80  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) otrzymano w pierwszym dniu hodowli na podłożu niezawierającym aminokwasu. Natomiast największe stężenie IAA - około 60,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  - otrzymano po zastosowaniu najwyższej dawki L-tryptofanu po 168 godzinach (rys. 2). Wydłużenie czasu inkubacji szczepów w podłożach z L-tryptofanem do 168 godzin pozwoliło na ponad 3-krotne zwiększenie ilości tej substancji wydzielonej do pożywki.

Produkcja IAA przez szczep *B. subtilis* EM1 jest zbliżona do wartości prezentowanych przez innych badaczy. Mohite [22] uzyskał stężenie IAA na niskim poziomie 7,00  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , a zastosowanie przez niego podłoża z ekstraktem drożdżowym pozwoliło na osiągnięcie stężenia fitohormonu zbliżonego do wyników badań własnych, czyli 60,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Ponadto, w jego badaniach podwyższenie pH środowiska z 7 do 8 spowodowało wzrost stężenia IAA do ponad 80,0  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Huu Dat i in. [30] dla szczepu *B. subtilis* TIB6 uzyskali 76,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  IAA. Z kolei w badaniach Wahyudi i in. [27] spośród 118 szczepów *Bacillus* spp. aż 90 wykazywało zdolność do biosyntezy IAA w granicach od 0,81 do 86,8  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Znacznie wyższe wartości, bo 106,4  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  IAA, uzyskali Hussein i in. [29] już po 72 godzinach hodowli *B. subtilis*. Badania Swain i in. [31] potwierdzają, iż wraz ze wzrostem czasu inkubacji oraz stężenia L-tryptofanu, jako prekursora auksyn, szczepy *B. subtilis* zdolne są do zwiększonej biosyntezy IAA. Podobnie jak w badaniach własnych, maksymalne stężenie IAA autorzy ci stwierdzili po 8 dniach inkubacji, pod koniec fazy stacjonarnej wzrostu bakterii i przy największej zastosowanej dawce L-tryptofanu 2000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Rys. 1. Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego przez *B. subtilis* EM1Fig. 1. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by *B. subtilis* EM1Rys. 2. Biosynteza kwasu indolilo-3-octowego przez *B. subtilis* QST713Fig. 2. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by *B. subtilis* QST713

Prezentowane wyniki badań dotyczące biosyntezy IAA przez różne szczepy *B. subtilis* pozwalają wnioskować, iż stężenie L-tryptofanu w pożywce jako prekursora IAA powinno wahać się w granicach od 250 do 2000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , a czas inkubacji hodowli to minimum 3 dni. Zdolność do metabolizmu L-tryptofanu przez różne szczepy bakterii jest zróżnicowana



w zależności od predyspozycji fizjologicznych tego szczepu i warunków prowadzenia hodowli.

### Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły na ocenę aktywności przeciwgrzybowej, wyizolowanego z ryzosfery buraka cukrowego, szczepu *B. subtilis* EM1. W badaniach *in vitro* wykazano antagonistyczne właściwości szczepu bakterii wobec *R. solani* ID105. Właściwości te nie znalazły odzwierciedlenia w dalszej części badań - doświadczeniu wazonowym. Ilość porażonych roślin w wazonach inokulowanych *R. solani* ID105 była porównywalna z ilością zakażonych roślin w wazonach wzbogaconych dodatkowo potencjalnie antagonistycznym szczepem *B. subtilis* EM1. Natomiast indeks porażenia siewek w tym przypadku był znacznie większy, co zdyskwalifikowało badany szczep bakterii jako szczep antagonistyczny wobec *R. solani* AG 2-2IIIB.

Na podstawie dokonanych analiz stwierdzono, iż niezależnie od zastosowanego stężenia L-tryptofanu badany szczep ryzosferowy charakteryzował się zdolnością do syntezy IAA. Nawet na podłożu bez dodatku prekursora auksyn produkcja IAA była o prawie 50,0% większa w porównaniu do szczepu kontrolnego/referencyjnego. Badania potwierdzają, że IAA produkowany przez bakterie może mieć wpływ na wzrost roślin buraka. Wzbogacenie gleby hodowlą *B. subtilis* EM1 skutkowało zwiększeniem długości korzenia i liści, a co za tym idzie świeżej masy siewek buraka cukrowego.

### Literatura

- [1] Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0128&from=PL>.
- [2] Ahemad M, Kibret M. J King Saud University - Sci. 2014;26(1):1-20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001
- [3] Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK, Singh V. J Microb Biochem Technol. 2015;7:096-102. DOI: 10.4172/1948-5948.1000188.
- [4] Noumavo PA, Agbodjato NA, Baba-Moussa F, Adjanohoun A, Baba-Moussa L. Afr J Biotechnol. 2016;15(27):1452-1463. DOI: 10.5897/AJB2016.15397.
- [5] Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moëgne-Loccoz Y, Muller D, et al. Front Plant Sci. 2013;17(4):356. DOI: 10.3389/fpls.2013.00356.
- [6] Kundan R, Pant G, Jadon N, Agrawal PK. J Biofertil Biopestici. 2015;6:155. DOI: 10.4172/2471-2728.1000155.
- [7] Dąbrowska G, Zdziechowska E. Progress Plant Protect. 2015;55(4):498-506. DOI: 10.14199/ppp-2015-083
- [8] Saha D, Purkayastha GD, Ghosh A, Isha M, Saha A. J Plant Pathol. 2012;94(1):109-118. DOI: 10.4454/jpp.fa.2012.020.
- [9] Lin HF, Chen TH, Liu SD. Afr J Microbiol Res. 2011;5(14):1723-1728. DOI: 10.5897/AJMR10.169.
- [10] Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R. Front Microbiol. 2014;5:636. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00636.
- [11] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Appl Environ Microbiol. 2005;71(9):4951-4959. DOI: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.
- [12] Raj SN, Lavanya SN, Amruthesh KN, Niranjana SR, Reddy MS, Shett HS. Biol Control. 2012;60(2):90-102. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2011.10.011.
- [13] Yang P, Sun ZX, Liu SY, Lu HX, Zhou Y, Sun M. Crop Protect. 2013;47:17-23. DOI: 10.1016/j.cropro.2012.12.020.
- [14] Nabrdalik M, Grata K. Proc ECOpole. 2014;8(1):65-69. DOI: 10.2429/proc.2014.8(1)008.
- [15] Grata K, Nabrdalik M. Proc ECOpole. 2014;8(1):37-41. DOI: 10.2429/proc.2014.8(1)004.
- [16] Kiewnick S, Jacobsen BJ, Braun-Kiewnick A, Eckhoff JLA, Bergman JW. Plant Disease. 2001;85(7):718-72. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.7.718.

- [17] Strausbaugh CA, Eujayl IA, Panella LW. Plant Disease. 2013;9(9):1175-1180. DOI: 10.1094/PDIS-11-12-1078-RE.
- [18] Rocznik Statystyczny Rolnictwa. Warszawa: Główny Urząd Statystyczny; 2015. <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-statystyczny-rolnictwa-2015,6,9.html>.
- [19] Moliszewska EB. Etiologia wybranych chorób korzeni buraka cukrowego. Studia i Monografie nr 412, Opole: Uniwersytet Opolski; 2009.
- [20] Burgiel Z. Wpływ niektórych herbicydów na występowanie i rozwój patogenów powodujących choroby podsuszkowe pszenicy ozimej. Cz. II. Rozwój patogenów. Acta Agraria et Silvestria, Series Agraria. 1984;28:187-196.
- [21] Townsend GR, Heuberger JW. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicides experiments. Plant Dis Rep. 1943;27(17):340-343.
- [22] Mohite B. J Soil Sci Plant Nutr. 2013;13(3):638-649. DOI: 10.4067/S0718-95162013005000051.
- [23] Elkahoui S, Djébalí N, Tabbene O, Hadjbrahim A, Mnasri B, Mhamd R, et al. Afr J Biotechnol. 2012;11(18): 4196-4201. DOI: 10.5897/AJB11.3354.
- [24] Hernández CFD, Castillo FR, Gallegos GM, Rodríguez RH, Aguilar C. Biological Control of Root Pathogens by Plant- Growth Promoting Bacillus spp. In: Soloneski S, Larramendy M, editors. Weed and Pest Control - Conventional and New Challenges: InTech. 2013. DOI: 10.5772/54229.
- [25] Imran H, Darine TH, Mohamed ELG. Afr J Biotechnol. 2012;11(81):14660-14670. DOI: 10.5897/AJB10.2508.
- [26] Kai M, Effmert U, Berg G, Piechulla B. Arch Microbiol. 2007;187:351-360. DOI: 10.1007/s00203-006-0199-0.
- [27] Wahyudi A, Astuti RP, Widyawati A, Meryandini A, Nawangsih AA. J Microbiol Antimicrob. 2011;3(2):34-40. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/54530>.
- [28] Moliszewska EB. Proc ECOpole. 2011;5(2):401-405. [http://tchie.uni.opole.pl/PECO11\\_2/PECO\\_2011\\_2p1.pdf](http://tchie.uni.opole.pl/PECO11_2/PECO_2011_2p1.pdf).
- [29] Hussein KA, Kadhum NH, Yasser YK. J Contemp Med Sci. 2016;2(7):88-92. <http://www.jocms.org/index.php/jcms/article/view/82/57>.
- [30] Huu Dat TT, Kim Cuc NT, Cuong PV. Int J Develop Res. 2015;5(4):4036-4042. <http://www.journalijdr.com/sites/default/files/3180.pdf>.
- [31] Swain MR, Naskar SK, Ray RC. Pol J Microbiol. 2007;56(2):103-100.

## APPLICATION OF ANTAGONISTIC PROPERTIES OF *Bacillus subtilis* AGAINST *Rhizoctonia solani*

Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

**Abstract:** The aim of the research was an assessment of antagonistic properties of strain *Bacillus subtilis* EM1, isolated from the rhizosphere of sweet beetroot, against *Rhizoctonia solani* ID105. Antifungal activity was determined in *in vitro* test on the basis of the mycelial growth inhibition of the pathogen in a pot test, in which the influence of *B. subtilis* EM1 on the growth of infected plants was evaluated. The paper also determines the ability of *B. subtilis* EM1 to synthesize indole-3-acetic acid (IAA). Conducted research proved that tested strain inhibits the mycelial growth of the pathogen by 85.0%, however, it does not affect the plant's growth or the infection process. *B. subtilis* EM1 shows the ability to synthesize IAA. The highest concentration of IAA amounting 67.6 µg/cm<sup>3</sup> was noted after 7 days of strain incubation in the presence of 2000 µg/cm<sup>3</sup> L-tryptophan. The strain under study stimulated the growth of sugar beetroot seedlings.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*, antifungal activity, auxins