

Kamila NAGRODZKA<sup>1</sup>, Ewa MOLISZEWSKA<sup>1</sup>, Katarzyna GRATA<sup>1</sup>  
i Małgorzata NABRDALIK<sup>1</sup>

## BIOLOGICZNA KONTROLA *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB PRZEZ METABOLITY *Bacillus subtilis*

### BIOLOGICAL CONTROL OF *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIB BY *Bacillus subtilis* METABOLITES

**Abstrakt:** Celem doświadczenia było określenie aktywności metabolitów produkowanych przez bakteryjny szczep *Bacillus subtilis* wobec izolatu *Rhizoctonia solani* należącego do grupy AG 2-2IIIB. Antagonistyczne właściwości metabolitów *B. subtilis* były oceniane w kulturach płytkowych na podłożu Czapka po 6, 24 i 48 godzinach hodowli w temperaturze 30 i 37°C. Wpływ metabolitów wytwarzanych przez *B. subtilis* na wzrost *R. solani* AG 2-2IIIB przedstawiono w postaci współczynnika tempa wzrostu liniowego grzyba. Uzyskane wyniki wykazały, że na fungistatyczną aktywność metabolitów *B. subtilis* wobec *R. solani* AG 2-2IIIB wpływa zarówno czas, jak i temperatura inkubacji bakterii. Wzrost grzybni był najmocniej hamowany przez metabolity uzyskane po 6-godzinnej hodowli w temp. 37°C.

**Słowa kluczowe:** *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*, aktywność fungistatyczna, kontrola biologiczna

### Wprowadzenie

*Rhizoctonia solani* (teleomorfa: *Thanatephorus cucumeris*) jest podstawczakiem rozpowszechnionym na całym świecie. Patogen ten posiada szeroki zakres żywicieli, powoduje choroby ponad 200 gatunków roślin [1-3]. Grzyb ten poraża korzenie, siewki, łodygi, owoce oraz liście [4]. W środowisku naturalnym występuje w postaci strzępek grzybni. W glebie bądź w szczątkach roślinnych może pozostać w postaci sklerocjów nawet przez kilka lat [5].

*R. solani* jest gatunkiem genetycznie niejednorodnym, w którym na podstawie zdolności łączenia się ze sobą strzępek wyróżniono przynajmniej trzynaście grup anastomozowych (AG). Wiele z tych grup dodatkowo podzielono na podgrupy [6]. Podgrupa *R. solani* AG 2 powoduje zgorzele wielu roślin okopowych [1]. Podgrupa AG 2-2IIIB jest ściśle związana z uprawą buraka cukrowego oraz kukurydzy, w których powoduje poważne straty [7, 8]. Ponadto, co istotne, w Europie nie zatwierdzono dotąd żadnych fungicydów, które byłyby skuteczne przeciwko temu patogenowi [9].

Aby utrzymać odpowiednią jakość i obfitość plonów roślin uprawnych, niezbędne jest zapobieganie ich infekcjom, a także kontrolowanie chorób. W tym celu wskazane jest stosowanie dobrych praktyk agrotechnicznych i ogrodniczych. Jednak w ciągu ostatnich 100 lat rolnicy zdecydowanie częściej sięgali po nawozy sztuczne i pestycydy, które w znaczący sposób poprawiają wydajność i jakość plonów. Nadmierne stosowanie środków chemicznych przyczyniło się do zanieczyszczenia środowiska [10].

Ze względu na niekorzystne, a nawet niebezpieczne działanie chemicznych środków ochrony roślin na środowisko naturalne istnieje coraz większe zainteresowanie

<sup>1</sup> Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. kard. B. Kominka 6, 45-032 Opole, tel. 77 401 60 42, e-mail: nagrodzka.kamila@gmail.com

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

biologicznymi metodami ochrony roślin. Metody biologiczne wykorzystują mikroorganizmy ograniczające wzrost mikroorganizmów patogennych w celu poprawy zdrowotności roślin. Biologiczna kontrola może być wynikiem wielu różnych rodzajów interakcji pomiędzy organizmami, jednak we wszystkich przypadkach patogeny są antagonizowane przez obecność i sposób działania innych organizmów [10]. W prezentowanym przez nas doświadczeniu postanowiono skupić uwagę na aktywności metabolitów produkowanych przez bakterie. Do metabolitów produkowanych przez bakterie należą m.in. antybiotyki, takie jak bacillomycyna D i gliotoksyna (tab. 1).

Do najefektywniejszych bakterii hamujących wzrost fitopatogennych grzybów w glebie należą gatunki bakterii rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*, a w szczególności *B. subtilis* i *P. fluorescens* [11]. Virgen-Calleros i in. [12] wykazali hamujące działanie bakterii rodzaju *Bacillus* na *Rhizoctonia solani*. Część z wyizolowanych przez nich bakterii wykazywała antagonistyczne działanie wobec grzybni *R. solani*, należących do różnych grup anastomozowych, a część tylko wobec niektórych grup [12].

Celem doświadczenia było określenie aktywności metabolitów produkowanych przez *Bacillus subtilis* Kg wobec izolatu *Rhizoctonia solani* ID105, należącego do grupy AG 2-2IIIB.

Wybrane antybiotyki produkowane przez mikroorganizmy

Tabela 1

Chosen antibiotics produced by microorganisms

Table 1

	<b>Antybiotyk</b>	<b>Mikroorganizm</b>	<b>Patogen docelowy</b>	<b>Źródło</b>
1	Bacillomycyna D	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	[13]
2	Bacillomycyna, Fengicyna	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Fusarium oxysporum</i>	[14]
3	Gliotoksyna	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	[15]
4	Iturin A	<i>Bacillus subtilis</i> QST713	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>R. solani</i>	[16, 17]
5	Pyrrrolnityryna	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>R. solani</i> , <i>Pyricularia oryzae</i>	[18]

## Materiały i metody

Materiał badawczy w doświadczeniu stanowił szczep bakterii *B. subtilis* Kg oraz izolat ID105 grzyba *R. solani* (AG 2-2IIIB).

Hodowlę *B. subtilis* Kg o ekstynkcji 1,0 prowadzono w bulionie odżywczym w dwóch różnych temperaturach - w 30 i 37°C. Hodowle w każdej z temperatur prowadzono przez 6, 24 i 48 godzin. Po upływie każdego z czasów hodowle wyjmowano z ciepłarek, mieszano i odwirowywano (8000 rpm przez 15 min). Następnie z nadosadu pobierano supernatanty zawierające metabolity bakteryjne.

W dalszej kolejności porcje (0,25 cm<sup>3</sup>) supernatantu wylewano na płytki Petriego o średnicy 90 mm z podłożem Czapka (źródło węgla - sacharoza), po czym równomiernie rozprawczano za pomocą sterylnych głaszczek. Następnie w centralnej części płytek umieszczano po krążku 1-tygodniowej grzybni *R. solani* o średnicy 10 mm. Próbe kontrolną stanowiła płytka Petriego z podłożem Czapka, zaszczepionym grzybnią *R. solani* tak jak próby badawcze oraz potraktowana porcją bulionu odżywczego w miejsce supernatantu z hodowli bakterii.

Określenie aktywności metabolitów *B. subtilis* Kg wobec izolatu *R. solani* ID105 polegało na pomiarach wzrostu grzybni (wzdłuż dwóch prostopadłych linii) dla każdej

próby po 24, 48 i 72 godzinach od założenia doświadczenia. Doświadczenie zakończono w momencie całkowitego zarośnięcia płytki kontrolnej przez grzybnię.

Doświadczenie założono w trzech powtórzeniach, za powtórzenie przyjmując pojedynczą płytkę Petriego z podłożem Czapka. Doświadczenie prowadzono w termostacie, w ciemności, w temperaturze  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Wpływ metabolitów wytwarzanych przez *B. subtilis* Kg na wzrost *R. solani* ID105 przedstawiono jako różnicę pomiędzy średnicą kolonii grzybni na płytkach kontrolnych a średnicą kolonii grzybni na płytkach testowych. Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci współczynnika tempa wzrostu liniowego grzyba, stosując następujący wzór [19]:

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

gdzie:  $T$  - współczynnik tempa wzrostu liniowego grzyba,  $A$  - średnia z pomiarów średnicy grzybni [cm],  $D$  - czas trwania doświadczenia [ilość dni],  $b_1, b_2, b_x$  - przyrost średnicy grzybni od ostatniego pomiaru [cm],  $d_1, d_2, d_x$  - ilość dni od ostatniego pomiaru.

Ponadto za pomocą wzoru Abbotta obliczono współczynnik zahamowania wzrostu liniowego grzyba  $\Delta H$  [20]:

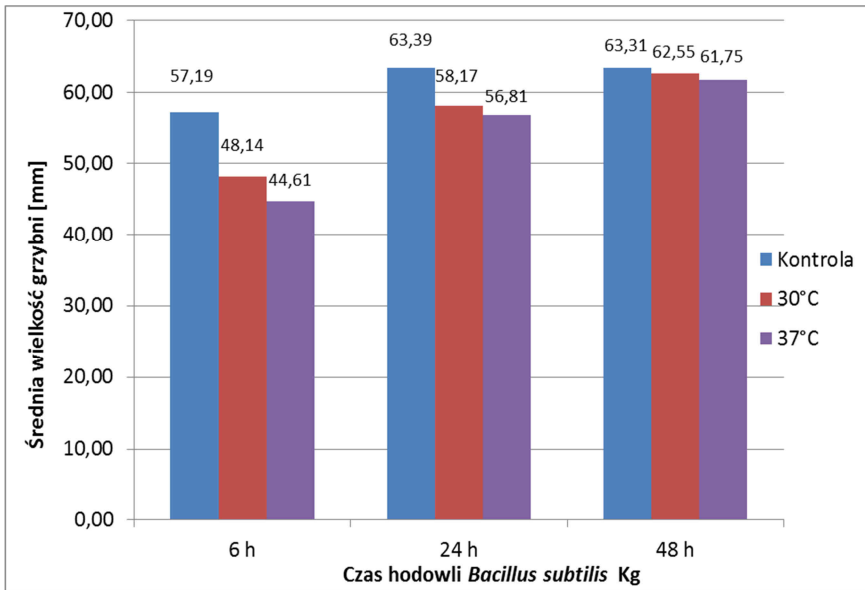
$$\Delta H = \frac{K_0 - F}{K_0} \cdot 100\%$$

gdzie:  $\Delta H$  - współczynnik zahamowania rozrostu liniowego grzyba [%],  $K_0$  - średnica kolonii na szalce kontrolnej [mm],  $F$  - średnica kolonii na szalce z supernatantem z hodowli *B. subtilis* Kg.

## Wyniki

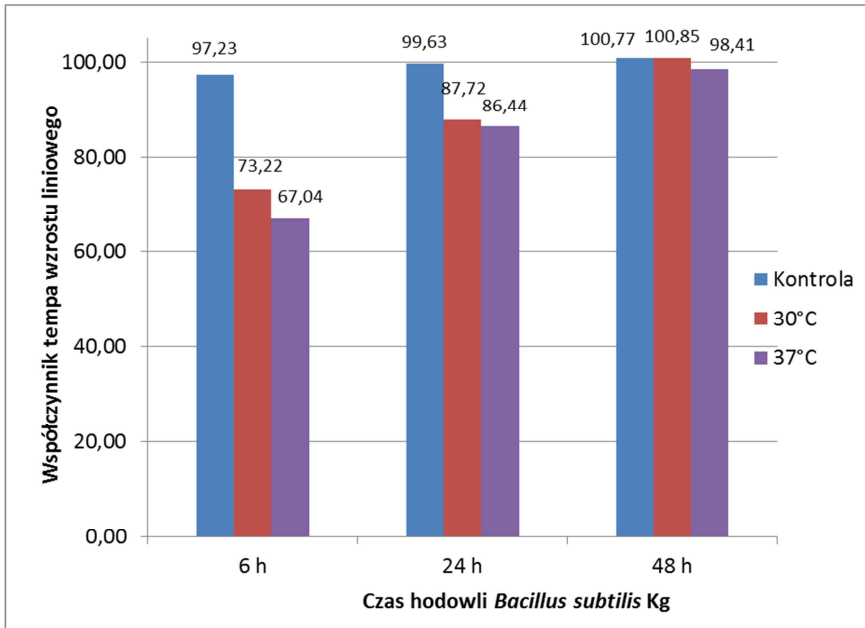
Podczas trwania doświadczenia określano zdolność szczepu *B. subtilis* Kg do produkcji metabolitów mogących wykazywać właściwości fungistatyczne wobec izolatu *R. solani* ID105 należącego do grupy anastomozowej AG 2-IIIB. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż aktywność fungistatyczna badanego szczepu *B. subtilis* Kg jest niewielka i zależy od wieku kultury bakteryjnej oraz temperatury, w jakiej prowadzona jest hodowla bakteryjna.

Z uzyskanych pomiarów wynika, że metabolity *B. subtilis* Kg wykazują tylko niewielki hamujący wpływ na średnią wielkość grzybni w porównaniu z próbą kontrolną. Największą różnicę średnicy grzybni *R. solani* w stosunku do kombinacji kontrolnej zanotowano w przypadku zastosowania supernatantu uzyskanego po 6-godzinnej hodowli *B. subtilis* Kg - w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , wynosiła ona 12,58 mm, po zastosowaniu kultury bakteryjnej wyhodowanej w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  była ona nieco mniejsza i wynosiła 9,05 mm. Najmniejszą różnicę zanotowano w przypadku zastosowania supernatantu bakteryjnego uzyskanego po 48-godzinnej hodowli, w przypadku niższej z badanych temperatur wynosiła ona zaledwie 0,76 mm, a w odniesieniu do wyższej temperatury różnica ta była nieco większa i wynosiła tylko 1,56 mm. W hodowlach grzybni *R. solani* prowadzonych z zastosowaniem supernatantów otrzymanych po 24-godzinnej hodowli *B. subtilis* Kg w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  średnia wielkość grzybni była mniejsza o 5,22 mm w porównaniu do próby kontrolnej, a w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  o 6,58 mm (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ *B. subtilis* Kg inkubowanych w różnych temperaturach na rozrost grzybni *R. solani* ID105

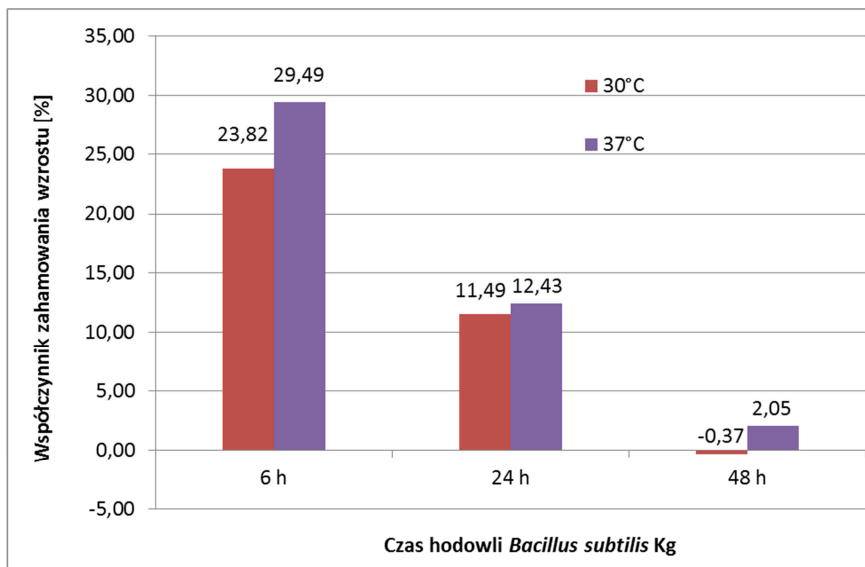
Fig. 1. The influence of *B. subtilis* incubated in different temperatures on the growth of *R. solani* ID105



Rys. 2. Współczynnik tempa wzrostu (T) *R. solani* ID105 w próbie kontrolnej i w próbie badawczej

Fig. 2. The impacts of linear growth (T) of *R. solani* ID105 obtained in the experiment

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynniki tempa wzrostu liniowego *R. solani* ID105 i dokonano porównania tego tempa w każdej z badanych temperatur. Najwyższy współczynnik tempa wzrostu dla każdej z prób odnotowano w próbie z supernatantem uzyskanym po 48-godzinnej hodowli bakterii, wynosił on odpowiednio 100,85 w temperaturze 30°C i 98,41 w temperaturze 37°C, nie różniąc się istotnie od próby kontrolnej (wartość współczynnika  $T = 100,77$ ). Najniższy współczynnik tempa wzrostu grzybni uzyskano w wyniku potraktowania hodowli *R. solani* 6-godzinną kulturą bakterii. Współczynnik  $T$  wynosił 67,04 dla wyższej z badanych temperatur, natomiast w niższej z temperatur osiągnął wartość 73,22. W przypadku zastosowania 6-godzinnej hodowli *B. subtilis* uzyskano również największe różnice współczynnika tempa wzrostu w porównaniu z próbą kontrolną - odpowiednio o 24,01 i 30,19. Współczynniki tempa wzrostu grzybni *R. solani* po potraktowaniu jej 24-godzinną hodowlą bakterii osiągały wartości pośrednie pomiędzy wartościami współczynników tempa wzrostu uzyskanymi w przypadku zastosowania 6- i 48-godzinnych hodowli bakterii (rys. 2).



Rys. 3. Wpływ metabolitów bakteryjnych *B. subtilis* Kg na wartość współczynnika zahamowania wzrostu liniowego  $\Delta H$  izolatu *R. solani* ID105 (wartość ujemna oznacza stymulację wzrostu grzybni)

Fig. 3. The influence of *B. subtilis* Kg metabolites on the growth of the *R. solani* ID105 mycelium showed as impacts of the growth inhibition ( $\Delta H$ ) (the result with "-" means a stimulation of the growth)

Obliczono także współczynniki zahamowania rozrostu liniowego ( $\Delta H$ ) *R. solani* ID105 potraktowanego badanymi supernatantami *B. subtilis* Kg. Największe zahamowanie rozrostu grzybni uzyskano w przypadku 6-godzinnej hodowli bakterii w temperaturze 37°C, współczynnik zahamowania rozrostu grzybni wyniósł wtedy 29,49%. Po tym samym czasie hodowli bakterii w niższej z badanych temperatur współczynnik zahamowania rozrostu grzybni osiągnął nieco niższą wartość - 23,82%. Znacznie słabsze zahamowanie wzrostu

grzybni powodowały metabolity z 24-godzinnej hodowli *B. subtilis* Kg, współczynniki te wynosiły odpowiednio 11,49% dla próby z 30°C i 12,45% dla próby z 37°C. Metabolity bakterii z 48-godzinnej hodowli w zasadzie nie wykazywały zdolności do zahamowania wzrostu grzybni,  $\Delta H$  wynosił tylko 2,05% po zastosowaniu supernatantów uzyskanych w temperaturze 37°C i -0,37% dla supernatantów uzyskanych w temperaturze 30°C, co oznacza niewielką stymulację wzrostu grzybni *R. solani* (rys. 3).

## Dyskusja

Przeprowadzone doświadczenie pokazało znaczne różnice w aktywności fungistatycznej metabolitów wytwarzanych przez badany szczep bakterii *B. subtilis* Kg. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że na fungistatyczną aktywność metabolitów *B. subtilis* Kg wobec *R. solani* ID105 należącego do AG 2-2IIIB wpływa zarówno czas, jak i temperatura, w której hodowane są bakterie. Wzrost grzybni *R. solani* AG 2-2IIIB najmocniej był hamowany przez metabolity *B. subtilis* Kg uzyskane w wyniku 6-godzinnej hodowli w temperaturze 37°C. Najslabszymi właściwościami fungistatycznymi cechowały się metabolity otrzymane w wyniku 48-godzinnej hodowli bakterii, co oznacza spadek zdolności do wytwarzania takich związków wraz z wiekiem hodowli oraz sugeruje ich nietrwałość w supernatancie. Różne szczepy *B. subtilis* cechują się zróżnicowanymi właściwościami antagonistycznymi wobec innych mikroorganizmów, w tym grzybów fitopatogenicznych. Właściwości te zależą zarówno od cech indywidualnych szczepu bakteryjnego, jaki i gatunku patogenu grzybowego, co wyraźnie wykazała Moliszewska [21]. Stępniewska i Mańka [22] wskazują na wpływ glebowej mikroflory na grzyby glebowe, co potwierdza celowość prowadzonych badań mających na celu poszukiwanie takich izolatów mikroorganizmów, które będą zdolne do ograniczania rozwoju glebowych fitopatogenów. W rezultatach badań interesujący wydaje się fakt stopniowego zanikania składników aktywnych działających fungistatycznie na grzybnię *R. solani*, co może być uwzględnione jako zdolność do usuwania potencjalnego biopestycydu ze środowiska. Wciąż jednak należy poszukiwać szczepów o wyższej aktywności fungistatycznej lub fungicydalnej. Takie możliwości wykazały Nabrdalik i Grata [23], wskazując, że *Pseudomonas* sp. BK1 może powodować nawet 77% zahamowanie wzrostu *Fusarium* sp.

## Podsumowanie i wnioski

Szczep *B. subtilis* Kg może znaleźć zastosowanie w biologicznej ochronie roślin przed chorobami powodowanymi przez *R. solani* AG 2-2IIIB. Wskazane byłoby jednak przeprowadzenie dalszych badań, np. z zastosowaniem ochrony z wykorzystaniem tej bakterii wspomaganej klasycznymi fungicydami lub dalsze poszukiwanie warunków hodowlanych sprzyjających wytwarzaniu aktywnych fungistatycznie metabolitów bakteryjnych. Stosując badany szczep *B. subtilis*, należy brać pod uwagę istotne znaczenie wieku hodowli bakterii.

## Literatura

- [1] Anderson NA. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. *Annu Rev Phytopathol.* 1982;20:329-47.
- [2] Salazar O, Julian MC, Hyakumachi M, Rubio V. Phylogenetic grouping of cultural types of *Rhizoctonia solani* AG 2-2 based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia.* 2000;92(3):505-9. DOI: 10.2307/3761509.

- [3] Stepniewska-Jarosz S, Mańka M, Asiegbu FO. Studies on anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolates causing disease in two forest nurseries in Poland. *Forest Pathology*. 2006;36:97-109. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2006.00439.x.
- [4] Mordue JEM, Banniza S, Bridge PD, Rutherford MA, Holderness M. Integrated biochemical, cultural and numerical methods. W: Sneh B, Jabaji-Hare S, Neate S, Dijst G, redaktor. *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1996.
- [5] Wibberg D, Andersson L, Tzelepis G, Rupp O, Blom J, Jelonek L, Pühler A, et al. Genome analysis of the sugar beet pathogen *Rhizoctonia solani* AG2-IIIB revealed high numbers in secreted protein and cell wall degrading enzymes. *BMC Genomics*. 2016;17:245. DOI 10.1186/s12864-016-2561-1.
- [6] Ogoshi A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*. *Annu Rev Phytopathol*. 1987;25:125-43. DOI: 10.1146/annurev.py.25.090187.001013.
- [7] Panella LW. Pathogenicity of different anastomosis groups and sub groups of *Rhizoctonia solani* on sugar beet. 33<sup>rd</sup> Biennial Meeting of American Society of Sugarbeet Technologist. Blackwell 2005.
- [8] Strausbaugh C., Eujayl IA, Panella LW, Hanson LE. Virulence, distribution and diversity of *Rhizoctonia solani* from sugar beet in Idaho and Oregon. *Canadian J Plant Pathology*. 2011;33(2):210-26. DOI: 10.1080/07060661.2011.558523.
- [9] Buddemeyer J, Pfahler B, Petersen J, Marlander B. Genetic variation in susceptibility of maize to *Rhizoctonia solani* (AG 2-IIIB) symptoms and damage under field conditions in Germany. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 2004;111(6):521-533. <http://www.jstor.org/stable/43215609>.
- [10] Pal KK, McSpadden Gardener B. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 2006. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- [11] Weller D. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol*. 1988;26:379-407. DOI: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115.
- [12] Virgen-Calleros G, Olalde-Portugal V, Carling DE. Anastomosis Groups of *Rhizoctonia solani* on potato in central Mexico and potential for biological and chemical control. *Amer J Potato Res*. 2000;77:219-224. DOI: 10.1007/BF02855789.
- [13] Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol*. 2001;90:622-629. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01290.x.
- [14] Koumoutsi A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Gabriele H, Franke P, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J Bact*. 2004;186:1084-1096. DOI: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004.
- [15] Wilhite SE, Lunsden RD, Strancy DC. Peptide synthetase gene in *Trichoderma virens*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5055-5062. DOI: 10.1128/AEM.67.11.5055-5062.2001.
- [16] Paulitz TC, Belanger RR. Biological control in greenhouse systems. *Annu Rev Phytopathol*. 2001;39:103-133. DOI: 10.1146/annurev.phyto.39.1.103.
- [17] Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. Induce systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*. 2004;94:1259-1266. DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259.
- [18] Homma Y, Kato Z, Hirayama F, Konno K, Shiraham H, Suzui T. Production of antibiotics by *Pseudomonas cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biol Biochem*. 1989;21:723-728. DOI: 10.1016/0038-0717(89)90070-9.
- [19] Burgiel ZJ. Wpływ niektórych herbicydów na występowanie i rozwój patogenów powodujących choroby podsuszkowe pszenicy ozimej. Cz. II, Rozwój patogenów. *Acta Agrobotanica et Silvestria, Seria Agr*. 1984;23:187-196.
- [20] Kowalik R, Krechniak E. Szczegółowa metodyka biologicznych i laboratoryjnych badań środków grzybobójczych. Materiały do metodyki badań biologicznej oceny środków ochrony roślin. Poznań: IOR; 1961.
- [21] Moliszewska EB. Aspects of decrease of some soil pathogens of sugar beet by *Bacillus subtilis* and *Streptomyces*. *Proc ECOpole*. 2011;5(2):401-406. [http://tchie.uni.opole.pl/PECO11\\_2/PECO\\_2011\\_2p1.pdf](http://tchie.uni.opole.pl/PECO11_2/PECO_2011_2p1.pdf).
- [22] Stepniewska S, Mańka M. Biotic relations between *Rhizoctonia solani* (damping-off pathogen) and soil fungal communities from forest nursery. *Plant Protect Sci*. 2002;38(Special Issue 1):235-238.
- [23] Nabrdalik M, Grata K. Antifungal activity of bacterial species *Pseudomonas*. *Proc ECOpole*. 2011;5(2):407-412. DOI: 10.2429/proc.2012.6(2)073.

## **BIOLOGICAL CONTROL OF *Rhizoctonia solani* AG 2-2IIIIB BY *Bacillus subtilis* METABOLITES**

Independent Chair of Biotechnology and Molecular Biology, University of Opole

**Abstract:** The aim of the experiment was to determine the activity of metabolites produced by bacteria *Bacillus subtilis* Kg against fungus isolate of *Rhizoctonia solani* ID 105 belonging to the anastomosis group AG 2-2IIIIB. The antagonist properties of *B. subtilis* Kg metabolites were evaluated with a culture-plate method on Czapek growth media for *B. subtilis* Kg cultures after 6, 24 and 48 hours of culture at temp. 30 and 37°C. The impact of *B. subtilis* Kg metabolites on the growth of *R. solani* AG 2-2IIIIB was shown as a growth rate index of the fungus. The results showed that on the fungistatic activity of the metabolites of *B. subtilis* against *R. solani* AG 2-2IIIIB affects both the time and temperature of the bacterial culture. Mycelial growth was most strongly inhibited by the metabolites obtained after 6 hours cultivation at 37°C.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, *Rhizoctonia solani*, fungistatic activity, biological control