

# BIOAKTYWNE METABOLITY RYZOSFEROWYCH BAKTERII *Pseudomonas*

Urszula JANKIEWICZ

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Katedra Biochemii

*Słowa kluczowe: antagonizm, fitopatogen, Pseudomonas*

## Streszczenie

Celem badań było określenie, jakie metabolity, bioaktywne względem wybranych fitopatogenów zbóż, są syntetyzowane przez wyizolowane z ryzosfery pszenicy bakterie *Pseudomonas*. Do doświadczeń wybrano dwa różne szczepy bakterii *Pseudomonas fluorescens*, które charakteryzowały się w warunkach *in vitro* silnym antagonizmem w stosunku do fitopatogenów zbóż z rodzaju *Pyrenophora*, *Alteria* i *Fusarium*. Jak wykazały badania obydwu szczepów bakterii w warunkach doświadczeń intensywnie wydzielały cyjanowodor oraz siderofory, w tym piowerdynę. Kwas salicylowy lub jego pochodną wykryto w hodowli tylko jednego z badanych izolatów. Obydwa zastosowane w doświadczeniu szczepy *P. fluorescens* charakteryzowały się zdolnością do syntezy zewnątrzkomórkowych peptydaz o różnym poziomie aktywności. W hodowlach bakterii nie wykryto enzymów litycznych, zdolnych do rozkładu wiązań glikozydowych – chitynazy i  $\beta$ -1,3 glukanazy.

## WSTĘP

Uprawy zbóż i innych roślin uprawnych w Polsce są narażone na zakażenia wieloma grzybowymi patogenami, m.in. z rodzaju *Fusarium* i *Alternaria*. Chemiczne środki stosowane do zwalczania tych patogenów są kosztowne i szkodliwe dla środowiska naturalnego, a przy tym bywają nieskuteczne. Dlatego w ostatnich latach, na całym świecie, obserwuje się wzmożone zainteresowanie preparatami biologicznymi, opartymi na niepatogennych mikroorganizmach glebowych. Biopreparaty mogą stanowić doskonałą alternatywę dla pestycydów, ponieważ ich

skuteczność jest duża. W poszukiwaniach odpowiednich szczepów bakterii warto zwrócić uwagę na występujące licznie i aktywnie w ryzosferze roślin uprawnych bakterie z rodzaju *Pseudomonas*.

Wiele gatunków niepatogennych bakterii rodzaju *Pseudomonas* należy do grupy PGPR (ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria), skupiającej mikroorganizmy wywierające korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Przyczyny tego zjawiska mogą być związane z bezpośrednim lub pośrednim oddziaływaniem mikroorganizmów na rośliny. Bezpośrednie oddziaływanie mikroorganizmów ryzosfery wiąże się ze wzbogacaniem gleby w składniki pokarmowe oraz zwiększaniem ich przyswajalności dla roślin, jak również syntezą fitohormonów i witamin. Oddziaływania pośrednie natomiast wynikają głównie z poprawy zdrowotności roślin przez inhibicję wzrostu fitopatogenów oraz indukcję odporności roślin na choroby. Pozytywne oddziaływanie bakterii PGPR na rośliny jest możliwe dzięki wywarzaniu przez nie biologicznie aktywnych metabolitów, jak również regulatorów wzrostu. Częstym obiektem badań są szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, występujące licznie i aktywnie w ryzosferze roślin uprawnych. Jak wynika z literatury niektóre szczepy *Pseudomonas* wykształciły różne mechanizmy ograniczające chorobotwórcze działanie patogenów grzybowych i bakteryjnych. Należy do nich m.in. synteza enzymów litycznych, antybiotyków i sideroforów oraz cyjanowodoru [HANDELSMAN, STABB, 1996; NAGARAJKUMAR, BHASKARAN, VELAZHAHAN, 2004].

Celem badań była detekcja potencjalnie fungistatycznych substancji syntetyzowanych przez ryzosferowe bakterie *Pseudomonas*, które wykazywały antagonizm wobec wybranych gatunków fitopatogenów. Uzyskane wyniki umożliwiły zweryfikowanie wciąż niepełnych i czasem sprzecznych danych literaturowych, dotyczących roli bakterii *P. fluorescens* w procesie stymulacji wzrostu i ochrony zdrowotności roślin zbożowych.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

### MATERIAŁ BIOLOGICZNY

Materiałem badawczym były dwa różne szczepy bakterii *Pseudomonas fluorescens* (nazwane F1 i F2) wyizolowane z gleby. Identyfikację gatunkową drobnoustrojów przeprowadzono na podstawie klasycznych testów biochemicznych oraz analizy mikroskopowej.

Rozróżnienie szczepów w obrębie gatunku przeprowadzono metodą MP PCR [JANKIEWICZ, KUZAWIŃSKA, 2009]. Bakterie przechowywane z dodatkiem 15% glicerolu w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  uaktywniano przez dwukrotne pasażowanie w podłożu King B [KING, WARD, RANEY, 1954].

## OKREŚLENIE WŁAŚCIWOŚCI ANTAGONISTYCZNYCH BAKTERII *P. fluorescens* WOBEC FITOPATOGENÓW GRZYBOWYCH

Grzyby (*Fusarium solani*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *Alternaria Alternata*, *Pyrenophora tritici*) hodowano na stałej pożywce PDA (ang. Potato-Dextrose Agar) przez 72 godziny. Następnie wycięte korboborem krążki agaru porośnięte grzybnią przenoszono na szalki z podłożem King B uprzednio zaszczerpionym bakteriami *Pseudomonas*. Bakterie szczepiono liniowo na pożywce King B, inkubowano 24 h w temperaturze pokojowej. Próbę kontrolną stanowiły hodowle grzyba na czystym podłożu King B.

Stopień zahamowania wzrostu grzybni oceniano na podstawie porównania długości promienia grzybni kontrolnej, którą przyjęto za 100%, i grzybni rosnącej w obecności bakterii.

### WARUNKI HODOWLI BAKTERII I DETEKcja POSZCZEGÓLNYCH SUBSTANCJI

Szkoło laboratoryjne wykorzystywane w doświadczeniach było myte w roztworze  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl, a następnie płukane kilkakrotnie wodą dejonizowaną.

W celu wykrycia sideroforów i kwasu salicylowego bakterie hodowano na płynnej pożywce SSM o składzie (w  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 6,0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 1,0,  $\text{MgSO}_4$  – 0,2, kwas bursztynowy – 4,0.

Odczyn pożywki doprowadzano przed sterylizacją do pH 6,8 za pomocą NaOH ( $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

Siderofory wykrywano uniwersalną metodą z wykorzystaniem Chrome Azurol S [SCHWYN, NEILANDS, 1987].

Piowerdynę wykrywano spektrofotometrycznie w hodowli bakterii przy długości fali 400 nm. Stężenie tego związku obliczano na podstawie wartości molowego współczynnika absorbancji [MEYER, ABDALLAH, 1978].

Kwas salicylowy wykrywano po uprzedniej jego ekstrakcji z hodowli bakterii [MEYER, AZELVANDRE, GEORGES, 1992] techniką chromatografii cienkowarstwowej. Rozdział prowadzono w kwasie octowym i chloroformie, zmieszanych w proporcjach 9:1. Wzorzec stanowił syntetyczny kwas salicylowy (Sigma) o stężeniu  $5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Identyfikację widocznych w świetle UV pasm przeprowadzono przez porównanie wartości współczynnika  $R_f$  dla wzorca i badanej próby.

Cyjanowódor wykrywano w hodowlach bakterii prowadzonych w płynnej pożywce bulionowej (1% TSB) z dodatkiem 0,5% glicyny. Inkubację bakterii prowadzono 48 h w temperaturze 28°C. Detekcję wytworzonego przez bakterie cyjanowodoru prowadzono metodą MEENA i in. [2001].

## OZNACZENIA ENZYMATYCZNE METODAMI SPEKTROFOMETRYCZNYMI

W celu oznaczenia aktywności chitynazy i  $\beta$ -1,3 gluknanazy bakterie hodowano na pożywce płynnej o pH 6,8 i składzie: pepton – 0,2%,  $K_2HPO_4$  – 0,2%,  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,1%, i NaCl – 0,05% wzbogaconej 0,2% koloidalnej chityny (oznaczenie aktywności chitynaz) lub laminarinu (oznaczenie aktywności  $\beta$ -1,3 gluknanazy). Oznaczenia enzymatyczne prowadzono metodami fotometrycznymi [NAGARAJKUMAR, BHASKARAN, VELAZHAHAN, 2004].

Aktywność proteolityczną oznaczano w supernatancie uzyskanym po odwirowaniu hodowli bakterii prowadzonej na 1,5% bulionie odżywczym. Jako substrat do oznaczeń stosowano 1% azokazeinę [EWINGS, O'CONNER, MITCHELL, 1984].

## DETEKCJA AKTYWNOŚCI PROTEOLITYCZNEJ NA ZYMOGRAMACH

Zymogramy uzyskiwano po elektroforetycznym rozdziale zewnątrzkomórkowych białek płynu pochodowlanego [LAEMMLI, 1970]. Elektroforezę natywną prowadzono na 10% żelu poliakryloamidowym z unieruchomioną 0,1% azokazeiną. Po rozdziale elektroforetycznym żele inkubowano w buforze Tris-HCl o pH 8,0, przez 20 minut, w temperaturze 37°C. Następnie wybarwiano je w czerni amidowej i płukano w kwasie octowym [WROBEL, JONES, 1992]. Jasne, niezabarwione pasma na ciemnoniebieskim tle odpowiadały lokalizacji w żelu poliakryloamidowym aktywnych enzymów proteolitycznych.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Wybrane do doświadczeń dwa różne szczepy bakterii *Pseudomonas fluorescens* charakteryzowały się w warunkach *in vitro* silnym antagonizmem w stosunku do fitopatogenów zbóż z rodzaju *Fusarium*, *Alternaria* i *Pyrenophora* (tab. 1).

**Tabela 1.** Antagonistyczna aktywność *Pseudomonas fluorescens* F1 i F2 w stosunku do fitopatogenów grzybowych

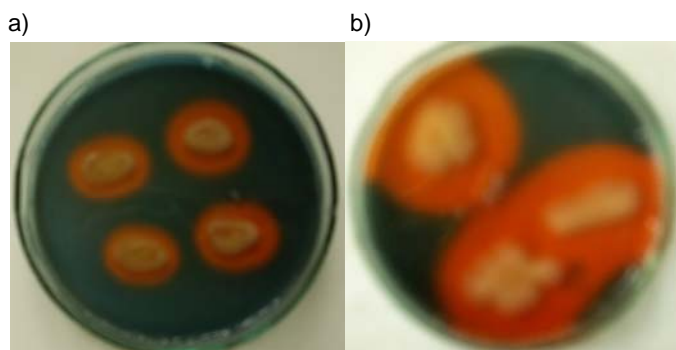
**Table 1.** Antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* F1 and F2 against fungal plant pathogens

Grzybowy patogen Fungal pathogens	Inhibicja wzrostu grzyba przez szczep, % % of fungal growth inhibition by the strain	
	<i>P. fluorescens</i> F1	<i>P. fluorescens</i> F2
<i>Alternaria alternata</i>	50	30
<i>Fusarium culmorum</i>	80	85
<i>Fusarium oxysporum</i>	80	90
<i>Fusarium avenaceum</i>	65	75
<i>Fusarium graminearum</i>	60	60
<i>Pyrenophora tritici</i>	30	40

Bakterie *P. fluorescens* F1 i *P. fluorescens* F2 wykazywały zbliżony stopień inhibicji wzrostu grzybni poszczególnych patogenów. Jedynie wobec *Alternaria alternata* zaobserwowano zdecydowanie większą aktywność szczepu F1. Najbardziej wrażliwymi gatunkami patogenów okazały się *F. culmorum* i *F. oxysporum*. Natomiast najmniej podatny na antagonistyczne działanie bakterii okazał się grzyb z rodzaju *Pyrenophora*.

Antagonistyczne działanie bakterii *Pseudomonas* wobec niektórych gatunków grzybów mikroskopowych jest zjawiskiem już opisanym w literaturze. Obecne badania koncentrują się głównie wokół czynników wywołujących taki efekt. Skuteczne zahamowanie wzrostu fitopatogenów jest często wynikiem współdziałania i uzupełniania się różnych mechanizmów. Bezpośredni antagonizm bakterii *Pseudomonas* w stosunku do fitopatogenów jest spowodowany wytwarzaniem przez te bakterie różnorodnych substancji [MARK i in., 2006; ULTAN i in., 2001].

Badane szczepy bakterii charakteryzowały się w warunkach doświadczeń intensywnym wydzielaniem sideroforów. Już po 48 godzinach hodowli obserwowano zmiany zabarwienia podłoża hodowlanego z niebieskiego na pomarańczowe, świadczące o produkcji chelatów żelaza (fot. 1). Różne rozmiary strefy zmiany barwy podłoża na szalkach mogą świadczyć o wyższym poziomie wydzielanych do podłoża chelatów żelaza przez szczep F2.



Fot. 1. Podłoża z CAS agarem inokulowane *P. fluorescens* a) F1, b) F2; pomarańczowe strefy wokół kolonii wskazują na wydzielanie sideroforów, a ich rozmiar jest proporcjonalny do ilości wydzielanych sideroforów

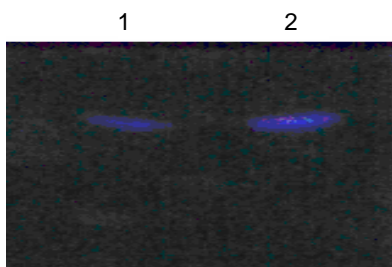
Photo 1. CAS agar plates inoculated with *P. fluorescens* a) F1, b) F2 strains; the orange halo surrounding the colony indicates the excretion of siderophore and its size approximates the amount of siderophore excreted

W trakcie 72 godzin inkubacji stwierdzono zmianę zabarwienia w płynnych hodowlach bakterii na żółtozielone. Barwa ta jest charakterystyczna dla szczepów wytwarzających piowerdynę.

Stężenie piowerdyny w hodowli badanych szczepów było zbliżone i wynosiło w przypadku szczepu F1 ok.  $51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , a w przypadku szczepu F2 –  $47 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

Piowerdyna jest typowym sideroforem wytwarzanym przez fluoryzujące szczepy *Pseudomonas*. Siderofor ten może być wyjątkowo skutecznym narzędziem hamowania wzrostu fitopatogenów, ponieważ wykazuje wysokie powinowactwo do jonów żelaza (III). Ta właściwość piowerdyny ogranicza w znacznym stopniu dostęp zwalczanego mikroorganizmu do żelaza [BOOPATHI, SANKARA RAO, 1999; FUCHS i in., 2001; JANKIEWICZ, KUZAWIŃSKA, 2009].

Kolejny, potencjalnie bioaktywny metabolit, kwas salicylowy, został wykryty na chromatogramach jedynie w ekstrakcie z hodowli *P. fluorescens* F2 (fot. 2). Po przeprowadzonym w analogicznych warunkach rozdziale ekstraktu z hodowli szczepu F1 nie zaobserwowano charakterystycznego pasma widocznego w świetle UV. Warto zauważyć, że obecność kwasu salicylowego może świadczyć o możliwości syntezy i wydzielania przez te bakterie także innego typu sideroforu, pseudomoniny [MERCADO-BLANCO i in., 2001].



Fot. 2. Cienkowarstwowa chromatografia ekstraktu z hodowli bakterii *P. fluorescens* F2 (ścieżka 1) i kontrola – kwas salicylowy  $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  (ścieżka 2)

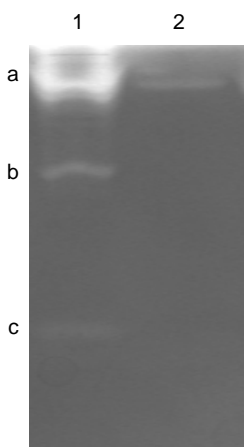
Photo 2. Thin layer chromatogram of the extract from cultures of *P. fluorescens* strain F2 (lane 1) and control – salicylic acid  $5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  (lane 2)

Kwas salicylowy oprócz bezpośredniego wpływu na zahamowanie wzrostu fitopatogenów przez ograniczanie ich dostępu do składników pokarmowych może odgrywać także inną rolę, związaną z indukcją systemicznej odporności u roślin [HEIL, BOSTOCK, 2002].

Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że obydwa szczepy bakterii syntetyzują cyjanowodór o podobnym stężeniu. Jak wykazują badania, substancja ta bardzo efektywnie hamuje wzrost grzybowych fitopatogenów [MCSPADDEN, GARDENER, 2007].

Żaden z badanych szczepów nie wydzieliał enzymów o aktywności chitynazy i  $\beta$ -1,3 glukanazy zdolnych do rozkładu wiązań glikozydowych w ścianie komórkowej grzybów. W literaturze przypisuje się tym enzymom dużą rolę w hamowaniu wzrostu różnych gatunków patogenów [LIM, KIM, KIM, 1991; NAGARAJKUMAR, BHASKARAN, VELAZHAHAN, 2004]. Obydwa szczepy natomiast syntetyzowały zewnątrzkomórkowe proteazy. W supernatancie uzyskanym po odwirowaniu hodowli szczepu F1 poziom aktywności endopeptydazy był wyższy niż w hodowli

szczepu F2. Na zymogramach rozdziału białek bakterii F1 i F2 obserwowano główne, typowe dla bakterii *P. fluorescens*, pasmo aktywności wydzielanej do podłoża endopeptydazy (fot. 3). Interesujące jest to, że w przypadku szczepu F1 na zymogramach widoczne były dwa dodatkowe pasma aktywności (fot. 3). Jak wynika z literatury bakterie *P. fluorescens* w większości opisanych przypadków są zdolne do syntezy pojedynczego zewnątrzkomórkowego białka o aktywności endopeptydazy [JANKIEWICZ, SZAWŁOWSKA, SOBAŃSKA, 2010]. Dodatkowe izoformy tego enzymu opisano jedynie w przypadku nielicznych szczepów bakterii tego gatunku [KOKA, WEIMER, 2000; LIAO, MCCALLUS, 1998; SCHOKKER, BOEKEL, 1997].



Fot. 3. Detekcja zewnątrzkomórkowych proteaz w supernatantach hodowli *P. fluorescens* F1 (ścieżka 1) i F2 (ścieżka 2); a – pasmo aktywności endopeptydazy, b, c – pasma aktywności dodatkowych izoform endopeptydazy

Photo 3. Detection of extracellular proteases in supernatants of *P. fluorescens* F1 (lane 1) and F2 (lane 2) cultures a – band of endopeptidase activity, b, c – bands of the activity of additional endopeptidase isoforms

Na podstawie wyników badań można stwierdzić, że inhibicja wzrostu grzybni wybranych gatunków patogenów zachodzi głównie w wyniku mechanizmów związanych z syntezą przez bakterie związków ograniczających wzrost grzybni. Ciekawa jest rola zewnątrzkomórkowych peptydaz. Dane literaturowe wykazują, że peptydazy *Pseudomonas*, obok podstawowej roli w dostarczaniu składników pokarmowych, mogą również ograniczać wzrost patogenów grzybowych [YUE-HORNG i in., 2006].

## WNIOSKI

1. Wyizolowane z ryzofery pszenicy bakterie *Pseudomonas fluorescens* wykazywały, w warunkach *in vitro*, antagonizm względem fitopatogenów grzybowych rodzaju *Alternaria*, *Fusarium* i *Pyrenophora*.
2. Szczepy bakterii F1 i F2 różniły się pod względem rodzaju i stężenia wydzielanych metabolitów o działaniu potencjalnie fungistatycznym, pomimo podobnego stopnia inhibicji wzrostu grzybní patogenów.
3. Obydwa badane szczepy bakterii syntetyzowały cyjanowodór oraz siderofory.
4. Szczep F2 syntetyzował kwas salicylowy, a szczep F1 nie miał takiej właściwości.
5. Zdolność do syntezy zewnątrzkomórkowych proteaz wykryto zarówno u szczepu F1, jak i F2, jednak poziom aktywności tego enzymu był różny. Bakterie F1 miały zdolność syntezy dodatkowych izoform tego enzymu.
6. Żaden z badanych szczepów nie wydzieliał enzymów litycznych o aktywności chitynazy i  $\beta$ -1,3 glukanazy, zdolnych do rozkładu wiązań glikozydowych w ścianie komórkowej grzybów.
7. Uzyskane wyniki umożliwiły detekcję bioaktywnych metabolitów syntetyzowanych przez dwa różne szczepy *P. fluorescens*, antagonistycznych względem kilku gatunków patogenów pszenicy.

## LITERATURA

- BOOPATHI E., SANKARA RAO K., 1999. A siderophores from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1435 s. 30–40.
- EWINGS K.N., O'CONNOR R.E., MITCHELL G.E., 1984. Proteolytic microflora of refrigerated raw milk in south east Queensland. *Aust. J. Dairy Technol.* 39 s. 267–275.
- 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 s. 31–57.
- HANDELSMAN J., STABB E.V., 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell.* 8 s. 1855–1869.
- HEIL M., BOSTOCK R.M., 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annual Botany* 89 s. 503–512.
- JANKIEWICZ U., KUZAWIŃSKA O., 2009. Purification and partial characterization of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas putida*. *EJPAU*, 12 (on line) <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue1>
- JANKIEWICZ U., SZAWŁOWSKA U., SOBAŃSKA M., 2010. Biochemical characterization of an alkaline metallopeptidase secreted by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *J. Basic Microbiol.* 50 s. 1–10.
- KING E.O., WARD M.K., RANEY D.E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44 s. 301–307.
- KOKA R., WEIMER B.C., 2000. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. *J. Applied Microbiol.* 89 s. 280–288.
- LAEMMLI U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 s. 680–685.



- LIAO C.H., MCCALLUS D.E., 1998. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl. Env. Microbiol.* 64 s. 914–921.
- LIM H., KIM Y., KIM S., 1991. *Pseudomonas stutzeri* YLP-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Env. Microbiol.* 57 s. 510–516.
- 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 s. 165–173.
- MCSPADDEN GARDENER B.B., 2007. Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathol.* 97 s. 221–226.
- MEENA B., MARIMUTHU T., VIDHYASEKARAN P., VELAZHAHAN R., 2001. Biological control of root rot of groundnut with antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains. *J. Plant Dis. Protect.* 108 s. 369–381.
- MERCADO-BLANCO J., VAN DER DRIFT K.M., OLSSON P.E., THOMAS-OATES J.E., VAN LOON L.C., BAKKER P.A., 2001. Analysis of the pms CEAB gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J. Bacteriol.* 6 s. 1909–1920.
- MEYER J.M., AZELVANDRE P., GEORGES C., 1992. Iron metabolism in *Pseudomonas*: salicylic acid, a siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *BioFactors* 4 s. 23–27.
- MEYER J.M., ABDALLAH M.A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *J. Gen. Microbiol.* 107 s. 319–328.
- 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 s. 73–78.
- SCHOKER E.P., VAN BOEKEL M.A.J.S., 1997. Production, purification and partial characterization of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22f. *Int Dairy J.* 7 s. 265–271.
- SCHWYN B., NEILANDS J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160 s. 47–56.
- ULTAN F.W., MORRISSEY J.P., O’GARA F., 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion Biotechnol.* 12 s. 289–295.
- WROBEL R., JONES B.L., 1992. Appearance of endoproteolytic enzymes during the germination of barley. *Plant Physiol.* 10 s. 1508–1516.
- YUE-HORNG Y., PEI-LING L., CHUAN-LU W., SAN-LANG W., 2006. An antifungal protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Microbial Technol.* 39 s. 311–317.

Urszula JANKIEWICZ

## BIOACTIVE METABOLITES OF THE RHIZOSPHERE *Pseudomonas* BACTERIA

*Key words:* antagonism, plant pathogen, *Pseudomonas*

### S u m m a r y

The study was aimed at estimating which metabolites (bioactive towards selected cereal plant pathogens) are synthesized by *Pseudomonas* isolated from wheat rhizosphere. Two different strains of *Pseudomonas fluorescens* characterised by the strong *in vitro* antagonism in relation to cereal plant

pathogens of the genera *Pyrenophora*, *Alteria* and *Fusarium* were selected for experiments. Both bacterial strains under experimental conditions intensively released hydrogen cyanide and siderophores including pyoverdine. Salicylic acid and its derivative were found in the culture of only one of analysed isolates. Both strains of *P. fluorescens* were able to synthesize extracellular peptidases of different activity. No hydrolysing enzymes able to decompose glycoside bonds (chitinase and  $\beta$ -1.3 gluconase) were found in bacterial cultures.

---

Recenzenci:

*prof. dr hab. Wiesław Barabasz*

*prof. dr hab. Stefan Russel*

Praca wpłynęła do Redakcji 24.09.2009 r.