

Ocena zdolności antagonistycznych izolatorów kompostowych

Streszczenie

Celem pracy było pozyskanie mikroorganizmów o uzdolnieniach fungistatycznych z kompostów polowych przygotowanych na bazie odpadów rolno-spożywczych. W doświadczeniach wykorzystano dwa rodzaje kompostów o następującym składzie: I słoja pszeniczna, wywar gorzelniczy, osad ściekowy i II słoja pszeniczna, wywar gorzelniczy. Podczas fazy termofilnej oraz na początku drugiej fazy mezofilnej dokonano izolacji 13 szczepów bakteryjnych dominujących w kompostach. Antagonistyczne oddziaływanie izolatów kompostowych sprawdzano w hodowlach płytkowych wobec wybranych patogenów roślinnych z rodzajów: *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Trichothecium*, *Fusarium*, *Ulocladium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Wśród izolatów kompostowych stwierdzono obecność dziewięciu laseczek przetrwalnikujących *Bacillus*, dwóch pałeczek i dwóch ziarniaków. Siedem izolatów wykazywało antagonistyczne oddziaływanie na wzrost grzybów wskaźnikowych. Jednak aktywność fungistatyczna tych izolatów zależała od rodzaju fitopatogena.

1. Wprowadzenie

Proces kompostowania należy do najstarszych metod utylizacji odpadów, a otrzymany produkt charakteryzuje wysoka wartość nawozowa. Do procesu kompostowania kierowane są głównie odpady poprodukcyjne różnych gałęzi przemysłu, odpady zieleni, miejskie, a także osady ściekowe o niskiej zawartości metali ciężkich i zanieczyszczeń specjalnych [16]. Kompostowanie odbywa się przy udziale licznych grup mikroorganizmów. Na podkreślenie zasługuje fakt, że skład kompostowanej masy wywiera ogromny wpływ na rodzaj mikroorganizmów zdolnych do jej zasiedlenia [10]. W procesie kompostowania mamy do czynienia z naturalną sukcesją poszczególnych grup drobnoustrojów, lecz również z ich selekcją. Pryzma kompostowa jest specyficznym środowiskiem, w którym rozwijające się mikroorganizmy narażone są na liczne stresy związane z warunkami ich wzrostu, tj. zmiany temperatury, pH, wilgotności, niedobór składników pokarmowych, tlenu. Wymienione czynniki stresowe bardzo często indukują w komórkach mikroorganizmów biosyntezę metabolitów, które poprawiają ich zdolności przystosowawcze do danych warunków środowiska. Mają one zwykle charakter związków biologicznie aktywnych. Z tego względu uważa się, że komposty, szczególnie polowe, stanowią idealne środowisko dla masowej produkcji mikroflory aktywnej w ochronie roślin [8]. Do drobnoustrojów najczęściej izolowanych z kompostów zaliczamy: *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Gliocladium virens*, *Flavobacterium balustinum*. Większość z nich wykazuje antagonizm wobec patogenów roślinnych [1, 6, 7, 12].

Celem niniejszej pracy było pozyskanie mikroorganizmów o uzdolnieniach fungistatycznych z kompostów polowych przygotowanych na bazie odpadów rolno-spożywczych.

2. Materiały

W doświadczeniach wykorzystano dwa rodzaje kompostów o następującym składzie: I pryzma - słoja pszeniczna, wywar gorzelniczy, osad ściekowy (stosunek wagowy 1:1:2); II pryzma - słoja pszeniczna, wywar gorzelniczy (stosunek wagowy 1:1).

Proces kompostowania prowadzono w warunkach polowych na terenie gospodarstwa rolnego „MATRON” w Kąsinowie w okresie od 6 listopada do 17 grudnia 2003 roku.

Pryzmy kompostowe uformowano z zastosowaniem przyczepy za pomocą ładowarki samojezdnej. Przyjęto założenie, że każda pryzma musi otrzymać sześć dawek wywaru. Jednorazowo wprowadzano do pryzmy około 360 kg wywaru. Przyjęto następujący sposób postępowania: pierwsze trzy dawki wywaru były wprowadzane do pryzmy co dwa dni, kolejne co trzeci dzień. Po każdym rozlaniu wywaru pryzmy przewietrzano i mieszano wywar z kompostowanym materiałem, przy zastosowaniu prototypu ciągnikowego aeratora pryzm. Podczas procesu kompostowania dokonano izolacji mikroorganizmów dominujących w kompostach oraz oceniano ich antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do wybranych patogenów roślinnych.

3. Przebieg doświadczeń

3.1. Izolacja mikroflory kompostowej

Do kolby zawierającej 90 ml soli fizjologicznej odważano 10 g próbki kompostu, a następnie całość wstrząsano przez 20 minut. Po zdekantowaniu z otrzymanej zawiesiny przygotowano rozcieńczenia dziesiętne. Następnie z każdego rozcieńczenia przenoszono po 1 ml próbki do dwóch równoległych płytek Petriego i zalewano upłynnionym, schłodzonym do około 45°C podłożem wzrostowym. Po zestaleniu podłoża, hodowlę umieszczano w ciepłarniach. W tab. 1 przedstawiono warunki inkubacji optymalne dla poszczególnych grup drobnoustrojów.

Tab. 1. Warunki inkubacji dla poszczególnych grup mikroorganizmów zasiedlających komposty

Grupa mikroorganizmów	Podłoże wzrostowe	Temperatura inkubacji [°C]	Czas inkubacji [h]
Mezofile	Agar odżywczy (P-0021 - BTL, Łódź)	37	24
Termofile	Agar odżywczy (P-0021 - BTL, Łódź)	55	24
Pleśnie i drożdże	Podłoże dla pleśni i drożdży (P-0127 - BTL, Łódź)	28	96
Pałeczki <i>Pseudomonas</i>	Podłoże Kinga B [Burbianka i in. 1983]	37	48

Po okresie inkubacji z wyrosłych koloni eż pobierano materiał biologiczny i dokonywano posiewu na skosy z podłożem wzrostowym. Izolacji dokonano na podstawie wzrokowej oceny podstawowych cech wyrosłych kolonii tj. kształtu, barwy, profilu powierzchni, struktury, charakteru brzegów,

zdolności barwienia podłoża itp. Hodowle izolatów na skosach prowadzono w temperaturze optymalnej dla danej grupy drobnoustrojów (tab. 3).

3.2. Charakterystyka morfologiczna izolatów kompostowych

Charakterystykę morfologiczną izolatów kompostowych przeprowadzono na podstawie obserwacji mikroskopowych (Nikon ECLIPSE 200). Preparaty barwione metodą Grama obserwowano pod immersją w jasnym polu widzenia i w kontraście fazowym.

3.3. Ocena antagonistycznej aktywności izolatów kompostowych

Antagonistyczne oddziaływanie izolatów kompostowych sprawdzano wobec następujących grzybowych patogenów roślin: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Trichothecium roseum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Ulocladium AW1*, *Penicillium expansum*. Grzyby te pochodziły z Banku Patogenów Roślin Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu oraz z kolekcji własnej Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego AR w Poznaniu. Wszystkie szczepy wskaźnikowe przechowywano na skosach z pożywką Czapka w warunkach chłodniczych przeszczepiając co cztery tygodnie.

Przygotowanie izolatów kompostowych do oznaczeń

Wyrośnię na skosach agarowych izolaty przenoszono eżąd do 10 ml bulionu odżywczego i hodowano 24 godziny w temperaturze optymalnej dla grupy drobnoustrojów, z której izolat pochodził (tab. 3). Otrzymałą hodowlą zaszczerpiano 90 ml świeżej pożywki. Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 ml, w warunkach dynamicznych (150 obr./min.) w optymalnej temperaturze (tab. 3) przez 24 godziny. Po tym czasie 10 ml otrzymanej hodowli wprowadzano do 90 ml upłynnionego agaru odżywczego i rozlewano do płytek Petriego po około 15 ml. Po zestaleniu podłoża hodowlę prowadzono w temperaturze optymalnej dla danego izolatu (tab. 1).

Przygotowanie grzybów wskaźnikowych do oznaczeń

Grzyby wskaźnikowe przeszczepiano na skosy z pożywką Czapka i inkubowano w temperaturze 28°C aż do otrzymania obfitego wzrostu (7-10 dni), a następnie spłukiwano 10 ml jałowej wody destylowanej i zdrapywano eżąd. Przygotowaną zawiesinę grzyba wskaźnikowego zaszczerpiano 100 ml upłynnionego podłoża Czapka, a następnie rozlewano do płytek Petriego po około 15 ml. Hodowle grzybów prowadzono w temperaturze 28°C.

Tab. 2. Charakterystyka morfologiczna izolatów kompostowych

Izolat (symbol)	Forma morfologiczna
Szczepy mezofile	
ML1	laseczka przetrwalnikująca G(-)
ML2	laseczka przetrwalnikująca gramozmienna
ML3	laseczka przetrwalnikująca G(-)
MZ4	ziarniak
ML5	laseczka przetrwalnikująca G(-)
ML6	laseczka przetrwalnikująca G(-)
ML7	laseczka przetrwalnikująca G(-)
MZ8	ziarniak
ML9	laseczka przetrwalnikująca G(+)
MP1	pałeczka G(-)
MP2	pałeczka G(-)
Szczepy termofilne	
TL1	laseczka przetrwalnikująca G(+)
TL2	laseczka przetrwalnikująca gramozmienna

Metoda oznaczania antagonistycznej aktywności

Z 24 godzinnych hodowli grzyba wskaźnikowego i izolatów kompostowych na podłożu stałym przy użyciu korkoboru wycinano koreczki o średnicy 10 mm. Koreczki umieszczano na uprzednio rozlanym do płytek Petriego i zestalonym podłożu Czapka. W centralnej części płytki umieszczano koreczek z grzybem wskaźnikowym, a na obrzeżach płytki koreczki z izolatami kompostowymi. Przygotowane hodowle płytkowe prowadzono przez 10 dni w temperaturze 28°C. Po tym czasie mierzono promień strefy wzrostu grzyba wskaźnikowego. Otrzymany wynik porównywano z hodowlą kontrolną, którą stanowiły płytki z podłożem, na które naniesiono tylko koreczek z grzybem wskaźnikowym (promień wzrostu grzyba na płytce kontrolnej przyjmowano jako 100%). Końcowy wynik podawano jako procent zahamowania wzrostu grzyba wskaźnikowego.

4. Wyniki badań

4.1. Izolacja mikroflory kompostowej

Izolacji mikroflory kompostowej dokonano w różnych okresach procesu kompostowania, tj. w fazie termofilnej w 14. i 21. dniu kompostowania oraz na początku drugiej fazy mezofilnej w 41. dniu kompostowania. Takie postępowanie wynikało z przyjętego celu pracy, którym było pozyskanie mikroorganizmów o uzdolnieniach fungistatycznych. Temperatura powyżej 40°C jest czynnikiem selekcyjnym i pozwala na przeżycie i rozwój jedynie mikroorganizmom zdolnym do przetrwania w niesprzyjających warunkach środowiska [9]. Należą do nich głównie laseczki wytwarzające termooporne endospory [18]. Z danych literaturowych wynika, że warunki stresowe niejednokrotnie wymuszają u drobnoustrojów syntezę i sekrecję metabolitów np. enzymów, bakteriocyn, aktywnych białek, antybiotyków chroniących je przed inaktywacją [2]. W tab. 2 zestawiono wyizolowane szczepy i podano ich charakterystykę morfologiczną. Większość izolatów należała do grupy laseczek przetrwalnikujących siedem spośród szczepów mezofilnych oraz oba szczepy termofilne. Z podłoża Kinga B wyizolowano 2 szczepy należące do grupy pałeczek.

4.2. Antagonistyczne oddziaływanie izolatów kompostowych

Oddziaływanie izolatów kompostowych na wzrost grzybów wskaźnikowych przedstawiono w tab. 3. Spośród trzynastu izolatów fungistatyczny charakter wykazywało siedem. Były to szczepy mezofilne oznaczone symbolami: MZ4, ML6, ML7, MZ8, ML9 oraz oba szczepy termofilne TL1 i TL2. Wśród nich dominowały laseczki przetrwalnikujące, uważane za najważniejsze mikroorganizmy w biologicznej walce z grzybowymi chorobami roślin. Aktywność fungistatyczna izolatów była zróżnicowana. Szczepy ML9 i TL1 hamowały wzrost trzech fitopatogenów, szczepy ML6, ML7, ML8 oraz TL2 dwóch, natomiast szczep MZ4 jednego. Najwięcej izolatów hamowało wzrost *A. ochraceus* pięć spośród biologicznie aktywnych izolatów.

Najsilniejszy efekt supresyjny obserwowano w przypadku grzybów z rodzaju *Fusarium*. Szczepy ML9 i TL2 hamowały wzrost *F. culmorum*, natomiast szczepy MZ4 i ML6 wzrost *F. oxysporum*. W obu przypadkach zahamowanie wzrostu grzyba przekraczało 80%.

S. sclerotiorum i *Ulocladium* były wrażliwe na oddziaływanie trzech izolatów. Wzrost *S. sclerotiorum* hamowany był przez szczepy ML7, ML8 i TL1, przy czym izolaty ML7 i TL1 hamowały wzrost grzyba o ponad 50% w po-

Tab. 3. Fungistatyczne oddziaływanie izolatów kompostowych

Izolat	Zahamowanie wzrostu grzyba wskaźnikowego [%]								
	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>	<i>T. roseum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Ulocladium</i>	<i>P. expansum</i>
ML1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ML2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ML3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MZ4	—	—	—	—	83	—	—	—	—
ML5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ML6	—	—	—	—	80	37	—	—	—
ML7	59	—	—	—	—	75	—	—	—
MZ8	7	—	—	—	—	70	—	—	—
ML9	—	—	—	85	—	13	—	34	—
TL1	55	—	—	—	—	10	—	63	—
TL2	—	—	—	80	—	—	—	38	—
MP1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MP2	—	—	—	—	—	—	—	—	—

równaniu z kontrolą. Najsilniejszy efekt supresyjny w stosunku do *Ulocladium* wykazywał szczep TL1 zahamowanie wzrostu grzyba przekraczało 60% w porównaniu z kontrolą. Słabszą aktywność antagonistyczną w stosunku *Ulocladium* obserwowano w przypadku szczepów ML9 oraz TL2.

Grzyby *R. solani*, *T. roseum* i *P. expansum* okazały się niewrażliwe na oddziaływanie żadnego z testowanych izolatów kompostowych.

5. Podsumowanie

Bezpośrednim impulsem do podjęcia niniejszych badań były doniesienia literaturowe o właściwościach fungistatycznych kompostów pozyskiwanych z różnych materiałów roślinnych, jak również obornika [7, 8, 17]. Uważa się, że biologiczna aktywność kompostów jest związana z pewnymi grupami saprofitycznych mikroorganizmów zasiedlających komposty, często zwanych pożytecznymi, antagonistycznymi lub czynnikami biokontroli, które hamują lub całkowicie uniemożliwiają rozwój patogena, a tym samym rozwój choroby rośliny. Oddziaływanie tych mikroorganizmów oparte jest na czterech podstawowych mechanizmach biokontroli: współzawodnictwie, antybiozie, pasożytnictwie/drapieżnictwie oraz indukcji oporności systemicznej w roślinie [3]. W przeprowadzonych przez nas badaniach wyizolowano grupę szczepów o uzdolnieniach antagonistycznych. Wykazywały one zróżnicowane i wybiórcze oddziaływanie na rozwój grzybów wskaźnikowych. Wybiórcze oddziaływanie szczepów izolowanych z kompostów oraz innych środowisk naturalnych na rozwój fitopatogenów wykazano w wielu pracach [4, 5, 11, 12, 13, 14]. Sugeruje to konieczność oceny aktywności fungistatycznej tego rodzaju izolatów w stosunku do szerokiego spektrum patogenów roślinnych.

Wyniki niniejszego doświadczenia, również dane literaturowe wskazują, że rola kompostów się zmienia. Dotychczas służyły one wyłącznie jako nawóz oraz materiał poprawiający strukturę podłoża. Obecnie mogą być one wykorzystywane również do produkcji oraz przygotowywania biopreparatów chroniących rośliny przed patogenami.

6. Literatura

- [1] Chung Y.R. i Hoitink H.A.J. Interactions between thermophilic fungi and *Trichoderma hamatum* in suppression of *Rhizoctonia damping-off* in a bark compost-amended container medium; *Phytopath.*; 80: 73-77, 1990
- [2] Chmiel A. *Biotechnologia podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa, 1994
- [3] Cotxarrera L., Trillas-Gay M.I., Steinberg C., Alabouvette C. Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to suppress *Fusarium* wilt of tomato; *Soil Biol. Biochem.*; 34: 467-476, 2002
- [4] Czaczek K., Stachowiak B., Trojanowska K. Antifungal activity of *Bacillus* sp. isolated from compost; *Folia Microbiol.*; 45(6): 552-554, 2001
- [5] Folkman W., Lisiecka B., Stachowiak B., Trojanowska K., Gulewicz K. Studies on fungistatic activity of *Bacillus coagulans* against *Trichothecium roseum* and characteristics of the bacterial metabolites; *J. Plant Protect. Res.*; 43(2): 121-132, 2003
- [6] Hadar Y. I Gorodecki B. Suppression of germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* in compost; *Soil Biol. Biochem.*; 23: 303-306, 1991
- [7] Hardy G.E.St.J. i Sivasithamparam K. Suppression of *Phytophthora* root rot by a composted eucalyptus bark mix; *Austr. J. Bot.*; 39: 153-159, 1991
- [8] Hoitink H.A.J., Stone A.G., Han D.Y. Suppression of plant diseases by composts; *Hort Sci.*; 32(2): 184-187, 1997
- [9] Jankowski K., Kisielińska B. Kompost nawóz wysokiej wartości; *Nowoczesne rolnictwo*; 4(55): 39-48, 1999
- [10] Kim K.D., Nemec S., Musson G. Effects of composts and soil amendments on soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper; *Crop Protect.*; 16(2): 165-172, 1997
- [11] Mari M., Guizzardi M., Pratella G.C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria; *Biol. Control*; 7: 30-37, 1996
- [12] Phae C.-G., Sasaki M., Shoda M., Kubota H. Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganisms; *Soil Sci. Nutr.*; 36(4): 575-586, 1990
- [13] Phae C.-G. i Shoda M. Expression of the suppressive effect of *Bacillus subtilis* on phytopathogenes in inoculated composts; *J. Ferment. Bioengin.*; 70(6): 409-414, 1990
- [14] Podile A.R. i Prakash A.P. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AFI; *Can. J. Microbiol.*; 42: 533-538, 1996
- [15] Reis A., Silveira N.S.S., Michereff S.J., Pereira G.F.A., Mariano R.L.R. *Bacillus subtilis* as a potential biocontrol agent of the northern leaf blight of corn; *Rev. Microbiol., São Paulo*; 25(4): 255-260, 1994
- [16] Siuta J. Kompost z odpadów; *Nowoczesne rol.*; 11(62): 46-47, 1999
- [17] Stachowiak B., Trojanowska K., Gulewicz K. Wykorzystanie słomy łubinowej do otrzymywania kompostów o właściwościach fungistatycznych; *Zeszyty Problemowe Post.Nauk Roln.*; 495: 425-434, 2003
- [18] Świąćicka I. i Hauschild T. Rodzaj *Bacillus* - występowanie i znaczenie w środowiskach naturalnych; *Post. Mikrobiol.*; 35 (1): 27-42, 1996.

Evaluation of antagonistic activity of composting isolates

Summary

The aim of the research was the isolation of microorganisms characterized by fungistatic properties from field composts. The composts were prepared from: I - wheat straw + stillage+ sewage sludge and II wheat straw + stillage. During thermophilic phase and at the beginning of the second mesophilic phase isolation of thirteen strains predominant in composts was done. Antagonistic activity of composting isolates was checked in Petri dishes cultures against selected plant pathogens belonging to rods of *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Trichothecium*, *Fusarium*, *Ulocladium*, *Aspergillus*, *Penicilium*. Nine spore-forming bacilli, two rod-shaped bacterium and two micrococcus were found among isolates. Seven isolates inhibited growth of indicator fungi but their fungistatic activity depended on phytopathogenes kind.