

ENZYMATYCZNE I ANTAGONISTYCZNE WŁAŚCIWOŚCI FLUORYZUJĄCYCH PAŁECZEK Z RODZAJU *Pseudomonas*, WYIZOLOWANYCH Z RYZOPLANY LNU WŁÓKNISTEGO

Anna Ligocka, Justyna Bauza-Kaszewska, Zbigniew Paluszak
Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy

Streszczenie. W pracy zbadano stopień aktywności enzymów pektynolitycznych, celulozylitycznych, amylolitycznych i proteolitycznych, a także zdolność do uruchamiania nierozpuszczalnych fosforanów przez fluoryzujące pałeczki z rodzaju *Pseudomonas*. Bakterie wyizolowano z ryzoplany lnu włóknistego, uprawianego w systemie zmianowania i monokultury. Żaden z izolatów nie wykazywał aktywności enzymatycznej wobec celulozy, natomiast pozostałe wielocukry hydrolizowane były przez wszystkie izolaty. Bakterie były najbardziej aktywne wobec białka. Oceniono również ich właściwości antagonistyczne względem wybranych patogenów grzybowych wyizolowanych z tego samego środowiska. Wszystkie z nich, chociaż w różnym stopniu, hamowały rozwój grzybów.

Słowa kluczowe: len, ryzoplana, *Pseudomonas*, antagonizm, patogeny, grzyby

WSTĘP

Lnu włóknistego (*Linum usitatissimum* L.) nie należy siał na tym samym polu częściej niż co 6-7 lat, ponieważ mogą wystąpić objawy zmęczenia gleby, czyli wynienienia. Największe straty plonów, sięgające 10-20%, powodują fitopatogeny grzybowe, zwłaszcza grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma* i *Botrytis* [Herse 1986]. W strefie przykorzeniowej roślin stymulowany jest także rozwój bakterii PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), które należą do grupy organizmów niekorzystnych dla patogenów i w zespołach agrobiocenotycznych są miernikami korzystnych zmian fitosanitarnych [Łasicowa 1989]. Należą do nich bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, zwłaszcza szczepy fluoryzujące. Ich wspólną cechą jest produkowanie pigmentów, które fluoryzują w świetle UV. Niektóre z nich zawierają siderofory, a ich produkcja znacznie wzrasta w warunkach niedoboru żelaza. Za pomocą sideroforów oraz metabolitów wykazujących aktywność antybiotyczną mikroorganizmy te są w stanie ograni-

czyć rozwój grzybów *Fusarium oxysporum*, *F. tabacinum*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp. oraz bakterii *Erwinia* sp. czy *Streptomyces* sp. [Duijff i in. 1993, Scher i Baker 1982].

Celem pracy było wyizolowanie z ryzoplany lnu włóknistego oraz zidentyfikowanie saprotroficznych pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* oraz scharakteryzowanie ich właściwości enzymatycznych i właściwości uruchamiania nierozpuszczalnych trójfosforanów. Oceniono również znaczenie tych mikroorganizmów w ograniczaniu wzrostu grzybowych patogenów: *Fusarium solani*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Verticillium* sp. i *Phoma* sp.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto mikroorganizmy wyizolowane z ryzoplany lnu włóknistego – *Linum usitatissimum* odmiany Artemida, uprawianego w systemie zmianowania (6-polówka: len, żyto, bobik, pszenżyto ozime, ziemniak, owies) oraz 30-letniej monokultury na poletkach Zakładu Doświadczalnego w Bałcynach koło Ostródy. Rośliny pobrano w dwóch stadiach rozwojowych – w stadium wschodów (pod koniec maja) i kwitnienia (w końcu czerwca). Opłukane pod bieżącą wodą główne korzenie lnu pocięto na 0,5 cm inokula i ponownie płukano pod bieżącą wodą przez 1 h. Następnie odkażano je powierzchniowo w 75% alkoholu, chlorku rtęci (sublimacie) i trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Inokula przeniesiono na pożywkę PDA (Potato Dextrose Agar, Merck, 1.10130) i inkubowano przez 4-5 dni w temperaturze 20°C. Wyrosłe po tym czasie drobnoustroje przeszczepiono na pożywkę PDA (grzyby) i pożywkę selektywną dla fluoryzujących bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (pożywkę Kinga B [King i in. 1954]). W przypadku tych ostatnich, fluorescencję sprawdzano w świetle UV. Dodatkowo wykonano preparaty barwione metodą Grama. Izolaty grzybów oznaczono za pomocą kluczy mykologicznych [Gilman 1957, Barnet 1960, Barron 1972].

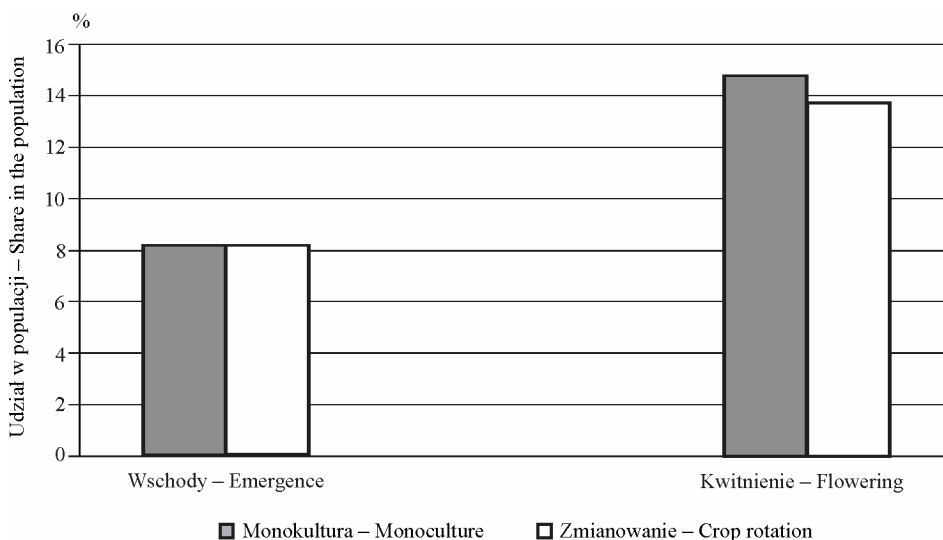
Oceniono właściwości celulolityczne (aktywność C_x-celulazy), amylolityczne, pektynolityczne (pożywka o pH 5,2 – do oznaczenia poligalakturonazy, natomiast żywka o pH 8,0 – liaz pektynowych) i proteolityczne bakterii. W tym celu zaszczerpiono je na żywki zawierające odpowiednio: sól sodową karboksymetylocelulozy [Strzelczyk i Szpotkański 1989], skrobię [Boguszewska 1980], pektynę [Hankin i in. 1971] i żelatynę [Sobczak i in. 1978] oraz inkubowano przez 7-14 dni w temperaturze 20°C. Po tym czasie mierzono średnice stref hydrolizy poszczególnych związków, które ujawniły się po zalaniu żywek odpowiednimi odczynnikami. Izolaty testowano również pod kątem zdolności rozpuszczania fosforanu trójwapniowego na żywce fosforanowej [Pikowska 1948]. Po 3-tygodniowej hodowli sprawdzano obecność stref hydrolizy. Wszystkie testy wykonano w trzech powtórzeniach, a ocenę poziomu enzymatycznych właściwości badanych izolatów przeprowadzono według następującej skali: 0 cm – brak aktywności enzymatycznej, 0,1-0,50 cm – aktywność bardzo słaba, 0,51-0,99 cm – aktywność słaba, 1,0-1,99 cm – aktywność średnia, 2,0-3,0 cm – aktywność duża, 3,10 cm i powyżej – aktywność bardzo duża.

Wykonano również badania mające na celu określenie właściwości antagonistycznych fluoryzujących pałeczek wobec patogenów grzybowych *Fusarium solani*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Verticillium* sp. i *Phoma* sp. Bakterie zaszczerpiano liniowo z boku płytki na żywce Kinga B i inkubowano je przez 48 godz. w temperaturze 24°C. Następnie, po

72 godzinach hodowli grzybów, korkoborem wycinano brzeżną część grzybni i przenoszono wycięte krążki na środek pożywki w szalce Petriego z uprzednio zaszczerpioną bakterią. Testy wykonano w trzech powtórzeniach. Dodatkowo wykonano próbę kontrolną, którą stanowiła hodowla grzyba na podłożu Kinga B bez bakterii. Stopień antagonistycznego oddziaływania bakterii w stosunku do testowanych grzybów oceniano po 96 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej. Mierzono promień grzybni, a następnie określono stopień inhibicji, wyrażający różnicę między długością promienia grzyba rozwijającego się na płytkach kontrolnych a długością grzybni rozwijającej się w obecności bakterii. Różnicę wyrażono w procentach, przyjmując za 100% wielkość promienia grzybni rozwijającej się na płytkach kontrolnych. Do interpretacji wyników przyjęto 5-stopniową skalę opartą na wskaźniku inhibicji – na podstawie zmodyfikowanej metody Coopera i Chiltona [1950], w której: 0-1% oznaczał brak działania, 2-25% – działanie słabe, 26-50% – działanie średnie, 51-75% – działanie silne, 76-100% – działanie bardzo silne.

WYNIKI

Badania ilościowe bakterii wykazały, że fluoryzujące szczepy *Pseudomonas* spp. częściej izolowano w czasie kwitnienia niż w czasie wschodów, niezależnie od systemu uprawy (rys. 1).



Rys. 1. Procentowy udział bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w ogólnej populacji bakterii wyizolowanych z ryzoplany lnu włóknistego

Fig. 1. Percentage of *Pseudomonas* genus bacteria in the total population of bacteria isolated from flax rhizoplane

Wszystkie izolaty bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wykazywały zbliżoną aktywność hydrolityczną w stosunku do węglowodanów i białka, a także w podobnym stopniu prowadziły mobilizację nierozpuszczalnych form fosforu (tab. 1). Najaktywniejszej

biodegradacji podlegało białko, natomiast żaden z izolatów nie posiadał właściwości biodegradacji soli sodowej karboksymetylocelulozy (CMC-Na).

Tabela 1. Aktywność enzymatyczna bakterii z rodzaju *Pseudomonas* spp. w stosunku do wybranych węglowodanów, białka i nieorganicznej formy fosforu

Table 1. Enzymatic activity of bacteria of the *Pseudomonas* spp. genus towards selected carbohydrates, protein and inorganic form of phosphorus

Numer izolatu <i>Pseudomonas</i> spp. Number of <i>Pseudomonas</i> spp. isolate	Węglowodany – Carbohydrates				Białko Protein	Mobilizacja nierozpuszczalnych form fosforu Mobilization of insoluble forms of phosphorus
	Skrobia Starch	Pektyny – Pectins		Sól sodowa karboksymetylocelulozy Sodium carboxymethylcellulose		
		pH 5,0	pH 8,0			
M589	+++	+	++	–	+	++
M622	+	+	+	–	++++	++
M627	++	++	++	–	+	++
M654	++	+	+	–	+++	–/+
M868	+++	++	++	–	+++	+
Z168	+	++	++	–	+++	++
Z704	+	++	++	–	++++	++
Z728	++	++	++	–	++	++
Z732	++++	++	++	–	+	++
Z933	++	++	++	–	++	++
Z936	++	++	+++	–	+++	++

– brak aktywności enzymatycznej – no enzymatic activity

–/+ aktywność bardzo słaba – very weak activity

+ słaba – weak activity

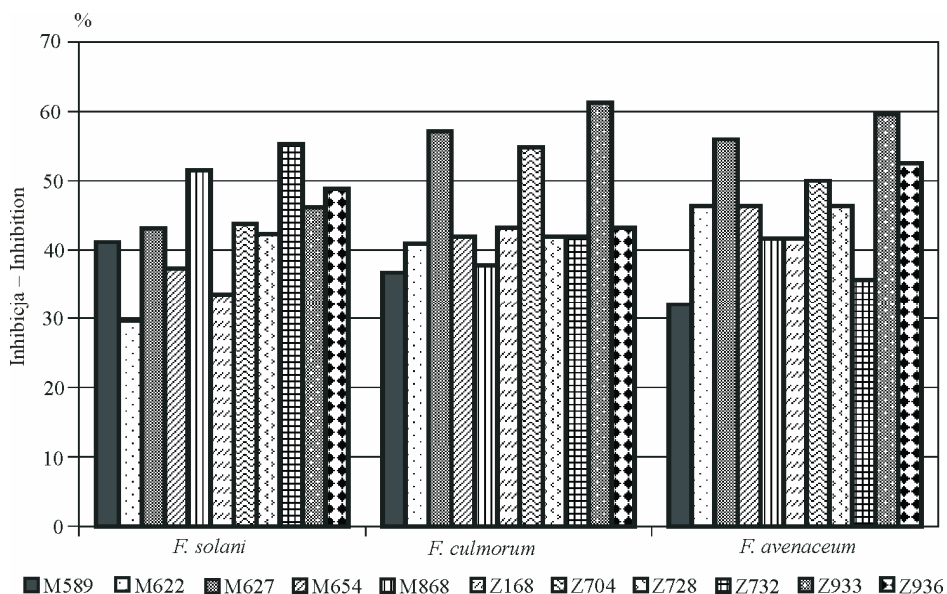
++ średnia – medium activity

+++ duża – strong activity

++++ bardzo duża – very strong activity

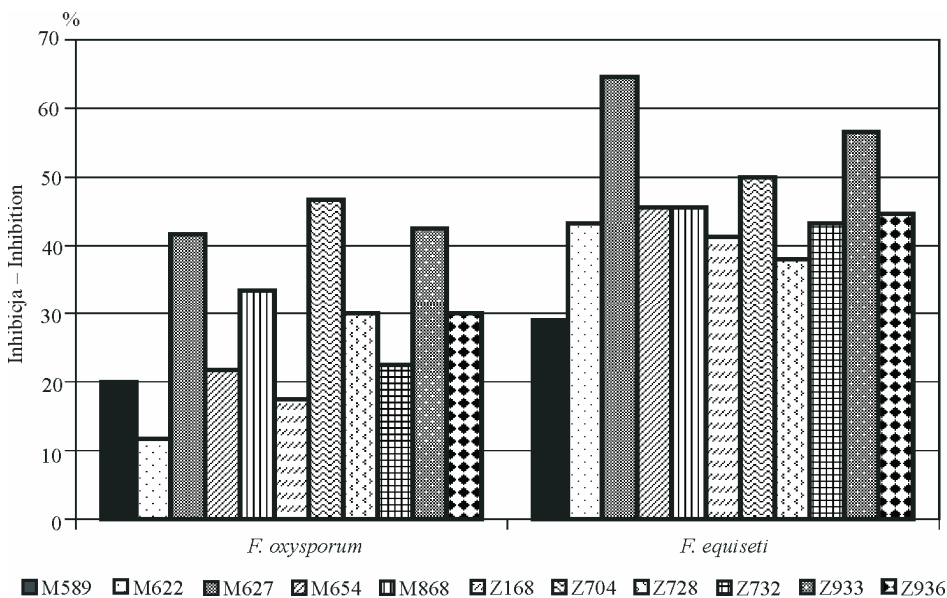
Spośród wszystkich wyizolowanych grzybów do dalszych badań wybrano następujące izolaty: *Fusarium solani* M651, *F. avenaceum* M410, *F. oxysporum* M402, *F. culmorum* Z869 i *F. equiseti* M385, *Botrytis cinerea* Z132, *Alternaria alternata* M369, *Rhizoctonia solani* M664, *Verticillium* sp. Z29 i *Phoma* sp. Z162. Testy antagonistyczne, w których sprawdzano wpływ fluoryzujących pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* na rozwój grzybów z rodzaju *Fusarium*, wykazały, że w każdym przypadku dochodziło do słabszej lub silniejszej inhibicji patogena (rys. 2 i 3).

Najbardziej aktywnymi izolatami *Pseudomonas* spp. okazały się M627, Z704 i Z933, które ograniczały rozwój grzybni w około 50%. Najbardziej wrażliwym gatunkiem *Fusarium* był *F. avenaceum*, podczas gdy najbardziej opornym na inhibicyjne działanie bakterii – *F. oxysporum*. Największą rolę w ograniczeniu wzrostu grzybni pozostałych patogenów odegrały izolaty M868, Z728, Z933 i Z936 (inhibicja w ponad 64%) (rys. 4 i 5). Należy zwrócić uwagę, że większość najbardziej aktywnych izolatów uzyskano z roślin uprawianych w systemie zmianowania. Patogeniem najbardziej wrażliwym na antagonistyczne działanie pałeczek *Pseudomonas* spp. był *Alternaria alternata*, a najbardziej opornym – *Verticillium* sp.



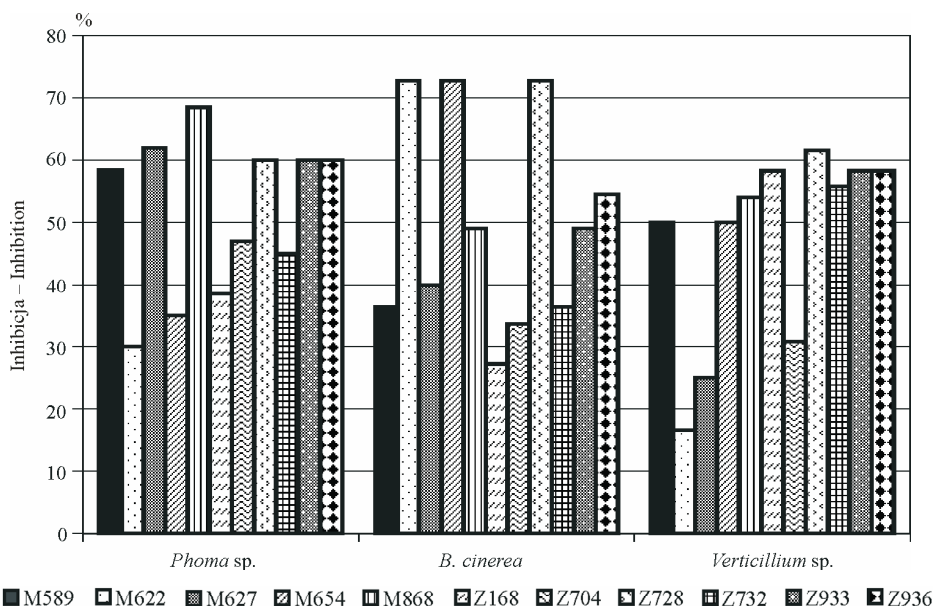
Rys. 2. Antagonistyczne działanie fluoryzujących pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* na grzyby z rodzaju *Fusarium*, wyrażone w % inhibicji

Fig. 2. Antagonistic effect of fluorescent rods of *Pseudomonas* genus on *Fusarium* genus fungi, expressed as % of inhibition



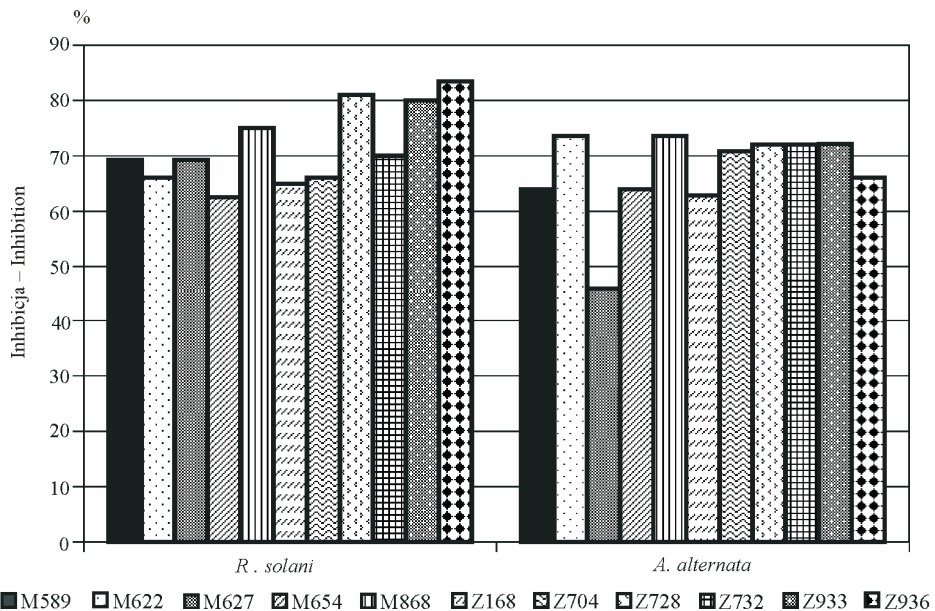
Rys. 3. Antagonistyczne działanie fluoryzujących pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* na grzyby z rodzaju *Fusarium*, wyrażone w % inhibicji

Fig. 3. Antagonistic effect of fluorescent rods of *Pseudomonas* genus on *Fusarium* genus fungi, expressed as % of inhibition



Rys. 4. Antagonistyczne działanie fluoryzujących pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* na fitopatogeny grzybowe, wyrażone w % inhibicji

Fig. 4. Antagonistic effect of fluorescent rods of *Pseudomonas* genus on different phytopathogenic fungi, expressed as % of inhibition



Rys. 5. Antagonistyczne działanie fluoryzujących pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* na fitopatogeny grzybowe, wyrażone w % inhibicji

Fig. 5. Antagonistic effect of fluorescent rods of *Pseudomonas* genus on different phytopathogenic fungi, expressed as % of inhibition

DYSKUSJA

Właściwości enzymatyczne patogenicznych mikroorganizmów (głównie hydroliza pektyn i celulozy) wiążą się z ich pasożytniczym trybem życia, natomiast w przypadku saprofitycznych mikroorganizmów mogą wpływać na ograniczenie wzrostu fitopatogenów. Degradacja białka i skrobi również pełni niebagatelną rolę, zwłaszcza w drugim etapie penetracji komórek roślinnych czy mikroorganizmów. Poza tym ektoenzymy uczestniczą w rozkładzie martwej materii organicznej w środowisku.

Większość izolatów z rodzaju *Pseudomonas* najintensywniej biodegradowało celulozę i białko, natomiast żaden z nich nie posiadał właściwości biodegradacji soli sodowej karboksymetylocelulozy. Wszystkie testowane bakterie, choć w różnym stopniu, były w stanie przeprowadzić nierozpuszczalne trójfosforany do rozpuszczalnych, a więc przyswajalnych dla roślin i mikroorganizmów monofosforanów.

Odpowiednie następstwo roślin sprzyja częstszemu występowaniu mikroorganizmów pożytecznych, do których zalicza się m.in. fluoryzujące bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, będące swoistą biologiczną ochroną przed fitopatogenami. W tworzeniu biologicznej bariery ograniczającej rozwój fitopatogenów ważne znaczenie mają siderofory produkowane m.in. przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Hamują one rozwój grzybów *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. oraz DRMO [Leisinger i Margraf 1979, Kloeppe i in. 1980], a także patogenów (w glebach opornych) powodujących fuzaryjne wędnięcie lnu, rzodkiewki i ogórka [Scher i Baker 1982], zgorzel podstawy źdźbła [Cook i Weller 1987] oraz czarną zgniliznę korzeni tytoniu [Stutz i in. 1986]. Dodanie do gleby szczepu B-10 bakterii z rodzaju *Pseudomonas* lub jej sideroforu – pseudobakteryjny skutecznie ograniczało również wędnięcie lnu powodowane przez *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* [Kloeppe i in. 1980]. Wyniki badań własnych wskazują, że wszystkie fluoryzujące izolaty *Pseudomonas* spp. wykazywały aktywność antagonistyczną, wyrażającą się powstaniem stref zahamowania wzrostu grzybni fitopatogenów. Jedynie *F. oxysporum* był odporny na ich działanie.

Alternatywnym rozwiązaniem zapobiegającym chorobom lnu pochodzenia fitopatogennego może stać się bakteryzacja nasion. W wyniku jej stosowania porażenie lnu przez *Fusarium* sp. obniżono o 40-70% [Borecki 1996]. Szczepienie drobnoustrojami antagonistycznymi nasion, korzeni i pędów uznano za najbardziej skuteczną metodę zwalczania glebowych patogenów roślinnych. W wyniku szybkiej kolonizacji antagonisty mogą chronić rośliny przed niespecyficznymi patogenami jak: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp. i wieloma innymi [Strzelczyk 1988].

Profilaktyka ochronna prowadzona sposobami biologicznymi może okazać się niezwykle skuteczna, jeżeli w strefę korzeniową roślin będą wprowadzane preparaty na bazie izolatów mikroorganizmów, które pomyślnie przeszły serię badań laboratoryjnych.

WNIOSKI

1. Fluoryzujące szczepy *Pseudomonas* spp. częściej izolowano w czasie kwitnienia niż w okresie wschodów, niezależnie od systemu uprawy. Bakterie wykazywały zbliżoną aktywność hydrolityczną w stosunku do węglowodanów (poza solą sodową karboksymetylocelulozy) i białka, a także w podobnym stopniu prowadziły mobilizację nierozpuszczalnych form fosforu, jednak żaden z izolatów *Pseudomonas* spp. nie posiadał właściwości biodegradacji celulozy.

2. Większość najbardziej aktywnych wobec patogenów grzybowych izolatów *Pseudomonas* spp. uzyskano z roślin uprawianych w systemie zmianowania. Patogenem najbardziej wrażliwym na antagonistyczne działanie tych bakterii był *Alternaria alternata*, a najbardziej opornym – *Verticillium* sp., natomiast spośród grzybów z rodzaju *Fusarium* najbardziej wrażliwym gatunkiem okazał się być *F. avenaceum*, a najbardziej opornym – *F. oxysporum*.

PIŚMIENNICTWO

- Barnet H.L., 1960. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company.
- Barron G.L., 1972. The Genera of Hyphomycetes from soil. R.E. Krieger Publishing Company.
- Boguszewska J., 1980. Izolowanie i niektóre właściwości pozakomórkowych amylaz *Fusarium martii*. Acta Mycol. XVI (2), 237-245.
- Borecki Z., 1996. Nauka o chorobach roślin. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa.
- Cook R.J., Weller D.M., 1987 Management of take-all in consecutive crops of wheat or barley. [W:] Innovative Approaches to Plant Disease Control, New York, Wiley, 41-76.
- Cooper W.E., Chilton J.P., 1950. Studies on antibiotic soil organisms. I. Actinomycetes antibiotic to *Pythium Arrhenomanes* in sugar-cane soils of Louisiana. Phytopathology 40, 544-551.
- Duijff B.J., Meijer J.W., Bakker P.A., Schippers B., 1993. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. Neth. J. Plant Pathol. 99, 277-289.
- Gilman J.C., 1957. A manual of soil fungi. The Iowa State College Press – Ames, Iowa, USA.
- Hankin L., Zucker M., Sands D.C., 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of peptolytic bacteria. Appl. Microbiol. 22 (2), 205-209.
- Herse J., 1986. Szczegółowa uprawa roślin. PWN Warszawa.
- 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, 301-307.
- Klopper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N., 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. Current Microbiol. 4, 317-320.
- Leisinger T., Margraff R., 1979. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonas. Microbiol. Rev. 43, 422-442.
- Łasicowa B., 1989. System ochrony roślin rolniczych przed chorobami. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 374, 21-29.
- Pikowska R.J., 1948. Mobilizacja fosforów w poczwie w swiazi z zizniedziejatielnostiu niekoto-rych widow mikrobow. Mikrobiologija 5 (17), 362-371.
- Scher F.M., Baker R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. Phytopathology 72, 1567-1573.
- Sobczak E., Duszkiewicz W., Grzybowski R., 1978. Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej. Skrypt SGGW-AR w Warszawie.
- Strzelczyk E., 1988. Biologiczne zwalczanie roślinnych patogenów glebowych. Post. Mikrobiol. 27 (3), 255-272.
- Strzelczyk E., Szpotański T., 1989. Cellulolytic and pectinolytic activity of streptomycetes isolated from root-free soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.). Biol. Fert. Soils 9, 269-272.
- Stutz E., Defago G., Kern H., 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. Phytopath. 76, 181-185.

**ENZYMATIC AND ANTAGONISTIC PROPERTIES OF FLUORESCENT
Pseudomonas BACILLI ISOLATED FROM FLAX RHIZOPLANE**

Abstract. The degree of pectinolytic, cellulolytic, amylolytic and proteolytic enzymes activity as well as the ability to set in motion insoluble phosphates by the fluorescent bacilli of the genus *Pseudomonas* were evaluated. The bacteria were isolated from the rhizoplane of flax (*Linum usitatissimum* L.) grown in crop rotation and monoculture. None of the *Pseudomonas* isolates showed the enzymatic activity towards cellulose, while the other polysaccharides were hydrolyzed by all of them. Bacteria were most active towards protein. Their antagonistic properties towards selected pathogenic fungi isolated from the same environment were also evaluated. Isolates of the genus *Pseudomonas* were tested towards selected fungal pathogens. All of them inhibited the development of fungi, though to different extent.

Key words: flax, rhizoplane, *Pseudomonas*, antagonism, pathogens, fungi

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 03.11.2005