



INSTYTUT OGRODNICTWA w Skierniewicach

Załącznik 2a

Autoreferat w języku polskim

Bakterie PGPR w uprawach warzyw – od laboratorium do pola

Magdalena Szczech
Zakład Mikrobiologii
Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

Skierniewice 2019

1. **Imię i nazwisko:** Magdalena Szczech

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

- Magister inżynier rolnictwa, specjalizacja ochrona roślin, Wydział Rolniczy, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego AR w Warszawie, 1990 r.

- Doktor nauk ogrodniczych, Wydział Ogrodniczy, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego AR w Warszawie, 1995 r. Tytuł rozprawy doktorskiej „Oporność wermikompostu w stosunku do patogenów grzybowych w uprawie pomidorów”, promotor prof. dr hab. Michał W. Brzeski.

3. **Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- Asystent w Samodzielnej Pracowni Mikrobiologii, Instytut Warzywnictwa w Skierniewicach (obecnie Instytut Ogrodnictwa), 1990 – 1996 r.

- Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, od 1996 r. do chwili obecnej.

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)**

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:** Bakterie PGPR w uprawach warzyw – od laboratorium do pola.

b) **Wykaz prac dokumentujących osiągnięcie naukowe:**

1. Szczech M., Shoda M., 2004. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. Journal of Phytopathology, 152: 549 – 556. (IF^a: 0,575; MNiSW^b: 20)

2. Szczech M., Shoda M., 2005. The influence of *Bacillus subtilis* RB14-C on the development of *Rhizoctonia solani* and indigenous microorganisms in the soil. Canadian Journal of Microbiology, 51: 405 – 411. (IF: 1,15; MNiSW: 20)

3. Szczech M., Shoda M., 2006. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. Journal of Phytopathology, 154: 370 – 377. (IF: 0,817; MNiSW: 20)

4. Szczech M., Dyki B., 2007. Combination of microbial biocontrol agents to control of damping-off and fusarium wilt of tomato. IOBC/WPRS Bulletin, 30: 415 – 418.

5. Szczech M., Dyśko J., 2008. The possibility to use selected mixtures of PGPR bacteria in tomato cultivation. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 68: 47 – 56. (MNiSW: 14)
6. Szczech M., Kowalska B., Dyki B., Horbowicz M., Kowalczyk W., 2009. Microbial mixtures enhancing plant resistance to pathogen stress. *IOBC/WPRS Bulletin*, 43: 89 – 94.
7. Szczech M., Maciorowski R., 2016. Microencapsulation technique with organic additives for biocontrol agents. *Journal of Horticultural Research* 24 (1): 111 – 122. (MNiSW: 14)
8. Szczech M., Szafirowska A., Kowalczyk W., Szwejska-Grzybowska J., Włodarek A., Maciorowski R. 2016 a. The effect of plant growth promoting bacteria on transplants growth and lettuce yield in organic production. *Journal of Horticultural Research* 24 (2): 101 – 107. (MNiSW: 14)
9. Szczech M., Kowalska B., Sobolewski J., 2016 b. Wpływ wybranych bakterii PGPB na plonowanie oraz zdrowotność sałaty i ogórka w uprawie polowej. *Progress in Plant Protection* 56 (3): 354 – 359. (MNiSW: 12)

Sumaryczny Impact Factor dla prac dokumentujących osiągnięcie naukowe: 2,542

Łączna liczba punktów MNiSW: 114

^a – wartość IF wg JCR podano zgodnie z rokiem ich opublikowania.

^b – punktację MNiSW podano wg wykazu uaktualnionego w 2017 r.

Wkład wnioskodawcy w wyżej wymienione prace przedstawiono w załączniku 5 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych publikacji, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, znajdują się w załączniku 4.

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

1. Wprowadzenie

Zastosowanie nawożenia mineralnego i chemicznych środków ochrony w rolnictwie przyczyniło się do gwałtownej poprawy plonowania roślin i wzrostu produkcji żywności na całym świecie. Jednak po latach ich stosowania pojawiły się problemy z pozostałościami toksycznych związków w glebie i produktach rolnych, a także z zanieczyszczeniem wód gruntowych (Ollivier i in. 2011, Meena i in. 2017, Vimal i in. 2017). Już pod koniec XX wieku zaczęto dostrzegać negatywne skutki intensywnego rozwoju rolnictwa i stwierdzono postępującą degradację gleb oraz utratę ich żyzności. Według Gomiero (2016) na świecie silnej degradacji uległo około 25% terenów rolniczych, a 44% zaliczono do średnio zdegradowanych. Z degradacją gleb związana jest redukcja bioróżnorodności i aktywności mikroorganizmów glebowych (Lange i in. 2015, Patel i in. 2015, Singh 2015, Ambrosini i in. 2016). Aktywność biologiczna gleby jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o jej żyzności, gdyż zarówno mikroorganizmy glebowe jak i mikrofauna mają znaczący wpływ na tworzenie warstwy próchnicznej, właściwej struktury oraz na obieg pierwiastków biogennych w środowisku glebowym. Jednak coraz częściej, aby uzyskać dobre plonowanie, rolnicy muszą z roku na rok zwiększać nawożenie, co tworzy błędne koło, przyspieszając degradację gleb oraz zanieczyszczenie środowiska. Do tego stanu rzeczy przyczyniły się również wielkoobszarowe uprawy mono gatunkowe i ograniczone zmianowanie (Newton i in. 2009). Zmniejszenie bioróżnorodności środowisk rolniczych sprzyja rozprzestrzenianiu patogenów i szkodników roślin, co intensyfikuje stosowanie pestycydów (Ab Rahman i in. 2018). Silna presja pestycydów powoduje z kolei uodparnianie się patogenów na najczęściej stosowane w ochronie substancje aktywne (Leroux i in. 2002, Lamichhane 2017, McLeod i in. 2017).

Polityka Unii Europejskiej jest obecnie ukierunkowana na redukcję użycia pestycydów w rolnictwie, w skutek czego wycofano z rynku wiele środków ochrony roślin (Matyjaszczyk 2008, Hillocks 2012, Lamichhane 2017). Ogromne znaczenie ma również wzrost świadomości konsumentów, którzy wymagają żywności „zdrowej”, bez pozostałości szkodliwych substancji i pestycydów. Rezultatem dążeń do zapewnienia bezpieczeństwa żywności i środowiska naturalnego było wprowadzenie integrowanego systemu produkcji w rolnictwie oraz integrowanej ochrony roślin. Integrowana produkcja stanowi sposób gospodarowania uwzględniający zrównoważone wykorzystanie postępu technicznego i biotechnologicznego w uprawie, ochronie i nawożeniu roślin (Lescourret 2017). W związku z powyższym nastąpił zwrot w kierunku opracowywania technologii i produktów, które miałyby jak najmniej ujemne działanie na zdrowie ludzi i zwierząt oraz środowisko naturalne. Już w 1965 r., na sympozjum zorganizowanym w Berkeley pt. „Ecology of soilborne plant pathogens: prelude to biological control”, jako jedną z nowych strategii uprawy, zaproponowano biologiczną ochronę roślin. Strategię tą zdefiniowano jako ograniczanie rozwoju oraz aktywności patogenów przez jeden lub więcej organizmów

innych niż człowiek, czego wynikiem jest redukcja występowania chorób wywoływanych przez te patogeny (Garrette 1965, Cook i Baker 1983). Szersza definicja określa biologiczną ochronę jako działania skierowane przeciwko szkodliwym organizmom, inne niż przy użyciu chemicznych środków ochrony roślin. Do takich działań można zaliczyć m.in. stosowanie mikroorganizmów do poprawy zdrowotności i wzrostu roślin.

Wieloletnie badania dowodzą, że mikroorganizmy odgrywają istotną rolę w ochronie roślin. Bakterie i grzyby wspomagają wzrost roślin oraz ochronią je przed patogenami i stresami abiotycznymi wykorzystując szeroką gamę mechanizmów takich jak: symbiotyczne i niesymbiotyczne wiązanie azotu atmosferycznego, zwiększanie przyswajalności trudno dostępnych dla roślin składników pokarmowych, produkcja stymulujących wzrost fitohormonów, indukcja mechanizmów odporności w roślinach oraz antagonistyczne działanie wobec patogenów. Szczegółowo mechanizmy działania mikroorganizmów zostały opisane w wielu publikacjach przeglądowych (Junaid i in. 2013, Calvo i in. 2014, Daguerre i in. 2014, Meena i in. 2017).

Szczególnie dużo uwagi poświęca się zastosowaniu bakterii, które mają korzystny wpływ na wzrost roślin oraz ich odporność na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Bakterie te z angielskiego nazywane są plant growth-promoting bacteria (PGPB) lub, jeśli pochodzą ze strefy korzeniowej roślin, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) (Kloepper i in. 1989). Najintensywniejsze interakcje pomiędzy roślinami a bakteriami zachodzą w strefie korzeniowej – ryzosferze, gdzie wydzieliny korzeniowe kreują środowisko bogate w substancje odżywcze i sprzyjające intensywnemu rozwojowi mikroorganizmów. Poprzez korzenie rośliny wydzielają między 40% a 60% produktu fotosyntezy (Keiluweit i in. 2015). Substancje organiczne wydzielane przez korzenie zawierają m.in. aminokwasy, kwasy organiczne, regulatory wzrostu, sterole, cukry, witaminy, sterole i in. (Meena i in. 2017). Kompozycja i ilość wydzielin korzeniowych zależy od genotypu i wieku rośliny, warunków glebowych, pH, dostępności wody i dwutlenku węgla. Zmiany tych czynników powodują zmianę składu wydzielin i mają silny wpływ na aktywność oraz strukturę zespołów mikroorganizmów towarzyszących roślinie (Ambrosini i in. 2016). Ze względu na swą bioróżnorodność mikrobiologiczną strefa korzeniowa roślin jest najczęściej wykorzystywanym źródłem izolacji szczepów aktywnych bakterii, choć szczepy takie izolowane są również z gleby poza-ryzosferowej, fyllosfery, a ostatnio także z wewnętrznych tkanek roślin – endosfery (Santoyo i in. 2016).

Standardowo, pierwszy etap selekcji aktywnych mikroorganizmów obejmuje testy *in vitro* na podłożach agarowych, w których badany jest antagonizm izolatów bakterii wobec kolonii grzybów patogenicznych. Oprócz tego często wykonywane są badania, również *in vitro*, określające metaboliczny potencjał testowanych bakterii. Między innymi określane są zdolności do rozpuszczania związków fosforu, produkcji sideroforów, kwasu indolilo-3-octowego (IAA), deaminazy ACC, cyjanowodoru czy amoniaku (McSpadden Gardener i Fravel 2002, Salete Mota i in. 2017). Okazuje się, że w tego typu testach większość badanych izolatów wykazuje pozytywny potencjał (Köhl i in. 2011). Do dalszych badań wybierane są te izolaty, które wykazują najszersze spektrum działania. Chociaż jest to uproszczony system selekcji i wiele z wyselekcjonowanych w ten sposób bakterii okazuje się nieskutecznych w warunkach polowych, to pozwala na wstępne określenie

potencjalnych możliwości tych mikroorganizmów, a według de Boer'a (2017) system ten sprawdza się w przypadku selekcji izolatów należących do rodzajów bakterii znanych ze swoich ochronnych zdolności jak: *Pseudomons* sp., *Bacillus* sp. czy *Sterptomyces* sp.

Kolejnym etapem badań są doświadczenia *in planta* prowadzone w warunkach laboratoryjnych lub szklarniowych, gdzie działanie wybranych izolatów jest sprawdzane w układzie bakteria – roślina – patogen. Również i ten system jest bardzo uproszczony, gdyż testy prowadzone są z użyciem tylko jednego gatunku/odmiany rośliny wobec zazwyczaj jednego szczepu patogena, a ponadto w warunkach kontrolowanych i uproszczonej wersji podłoża. Taki układ nie odzwierciedla warunków panujących w glebie. Ten etap jest jednak następnym krokiem selekcji izolatów i zawęża liczbę tych, które zostaną wybrane do doświadczeń polowych i bardziej szczegółowych badań nad możliwościami aplikacyjnymi bakterii. Selekcja mikroorganizmów według takiego schematu jest powszechnie stosowana ze względu na mało skomplikowany układ testów i niskie koszty, pozwalające na przetestowanie wielu izolatów. Wyniki tego typu doświadczeń mogą być wykorzystywane do izolacji mikroorganizmów, które docelowo mają być stosowane w szklarniach i tunelach lub na etapie produkcji rozsady, gdzie relacje podłoże – roślina i warunki otoczenia są bardziej uproszczone - kontrolowane. Jednak obecnie wiadomo, że ten system nie zawsze jest skuteczny w przypadku zastosowania bakterii w warunkach upraw polowych, a wiele badań, obiecujących w początkowych fazach, kończy się na tym etapie. Świadczą o tym liczne publikacje, w których zawarto pozytywne wyniki doświadczeń kontenerowych i szklarniowych. Jednak tylko niektóre z tych badań były/są z pozytywnym skutkiem kontynuowane w warunkach polowych.

Najbardziej istotnym etapem w badaniach nad opracowaniem preparatów mikrobiologicznych do wykorzystania w rolnictwie jest ocena ich skuteczności w testach polowych oraz formulacja. Jest to najtrudniejszy etap, ponieważ wiele wyselekcjonowanych bakterii nie jest w stanie konkurować z rodzimymi zespołami mikroorganizmów zasiedlającymi glebę i strefę korzeniową roślin. Według aktualnego stanu wiedzy mikroorganizmy wprowadzane do środowiska naturalnego są traktowane jako organizmy inwazyjne (Mallon i in. 2015). Skuteczność zasiedlania przez nie środowiska zależy od bioróżnorodności występującego w nim mikrobiomu i to nie tylko różnorodności taksonomicznej, ale i funkcjonalnej (Eisenhauer i in. 2013, de Boer 2017). Im większa bioróżnorodność tym mniejsza skuteczność „inwazyjna” i metaboliczna wprowadzanego mikroorganizmu (Ambrosini i in. 2016). Skład oraz funkcjonalność zespołów mikroorganizmów w interakcjach z roślinami zależy w dużej mierze od gatunku i stadium rozwojowego roślin, stanu ich odżywienia, dostępności składników pokarmowych oraz czynników fizyko-chemicznych jak pH, wilgotność, temperatura, typ gleby i wielu innych (Chaparro i in. 2013, Calvo i in. 2014, Lange i in. 2015). Aby skutecznie konkurować w tak zróżnicowanym środowisku jakim jest gleba, wprowadzane bakterie muszą wykazywać się silną konkurencyjnością i zdolnością do kolonizacji roślin. Niestety, w większości przypadków ich liczebność obniża się gwałtownie po inokulacji i nie mają one znaczącego wpływu na zmiany w natywnych zespołach mikroorganizmów, co obserwowali w swoich badaniach Felici i in. (2008), Baudoin i in. (2009) i de Salamone i in. (2010) po inokulacji pomidorów, kukurydzy i ryżu bakteriami PGPB.

Dlatego, aby uzyskać oczekiwany efekt działania, inokulum wprowadzane do gleby musi zawierać wysokie zagęszczenie aktywnych komórek bakterii. Najczęściej stosowane są zagęszczenia w zakresie $10^7 - 10^9$ jednostek tworzących kolonie (jtk) na 1 ml zawiesiny inokulacyjnej. Typowym sposobem inokulacji, szeroko stosowanym w pracach badawczych, jest użycie płynnego inokulum bakterii, które stanowi kultura bakterii w pożywce płynnej lub odseparowane od płynu hodowlanego komórki, zawieszane w zbuforowanej cieczy. Płynne inokulum jest mieszane z glebą, używane do podlewania roślin lub do moczenia ich korzeni. Jest to bardzo uproszczona metoda aplikacji, ale jest szybka, mało skomplikowana technologicznie i stosunkowo tania. Ten sposób inokulacji, szczególnie w warunkach polowych, nie daje jednak żadnej osłony bakteriom wprowadzanym do złożonego i opornego środowiska glebowego. Nie jest to również forma inokulacji właściwa z praktycznego punktu widzenia (niestabilna skuteczność działania, brak możliwości dłuższego przechowywania w warunkach typowych dla handlu). Dlatego, kolejnym etapem prac badawczych jest opracowanie właściwej formy użytkowej (formulacji), czyli fizycznej postaci preparatu biologicznego zawierającego mikroorganizmy jako składnik aktywny i nośniki zapewniające im ochronę, trwałość i ułatwiające stosowanie.

Obszerną publikację przeglądową na temat nośników oraz sposobów formulacji bakterii opracowali Bashan i in. (2016). W tej pracy autorzy przedstawili różnorodne kategorie nośników jak np.: torf, zmielone skały, węgiel brunatny, odpadowe materiały roślinne, polimery i inne. Określili również główne cechy charakteryzujące nośnik: (i) powinien być obojętny dla mikroorganizmów, a jednocześnie przedłużać ich żywotność oraz zabezpieczać podczas przechowywania i po aplikacji, (ii) odporny na zmienne warunki przechowywania, (iii) powinien mieć określony i powtarzalny skład oraz cechy, (iv) bezpieczny dla ludzi, zwierząt i środowiska, (v) łatwo dostępny i tani, (vi) kompatybilny z powszechnie używanym sprzętem rolniczym. W komercyjnym użyciu ważną cechą preparatów mikrobiologicznych jest jak najdłuższy termin przechowywania. Jest to mniejszy problem dla Gram dodatnich bakterii jak np. *Bacillus* sp., które wytwarzają przetrwalniki. Takiej właściwości natomiast nie posiadają bakterie Gram ujemne, których żywotność można przedłużyć m.in. dzięki obniżeniu wilgotności preparatu poprzez suszenie lub liofilizację (Bashan i in. 2016).

Jak wspomniano powyżej, brak stabilnego - powtarzalnego działania preparatów biologicznych jest jedną z ich głównych wad, która może zniechęcać użytkowników do ich stosowania. Aby poprawić konkurencyjność i skuteczność mikroorganizmów w zmiennych warunkach naturalnych zalecane jest stosowanie mieszanek różnych rodzajów, gatunków a nawet szczepów aktywnych grzybów, bakterii lub bakterii z grzybami, cechujących się różnymi mechanizmami działania (Szczech 2008, Eisenhauer i in. 2013). Na przykład wspólne zastosowanie grzybów mykoryzowych oraz bakterii rizobiowych zwiększa produktywność roślin strączkowych (Xavier i Germida 2002 i 2003, Wang i in. 2011). Liczne przykłady pozytywnego działania mieszanek bakterii PGPR i grzybów mykoryzowych oraz przykłady badań nad mieszankami mikroorganizmów do zastosowania w ochronie roślin opisali również Vimal i in. (2017) i Sarma i in. (2015). Użycie konsorcjów kilku kompatybilnych mikroorganizmów, o różnych wymaganiach i

mechanizmach działania na rośliny i patogeny, zwiększa szansę uzyskania ich skutecznego działania w uprawach. Ze względu na inne wymagania środowiskowe mikroorganizmy w mieszance mogą kolonizować różnorodne nisze w strefie korzeniowej roślin i w zależności od warunków uruchamiać różne mechanizmy wpływające na ochronę roślin np. produkcję substancji hamujących rozwój organizmów patogenicznych lub aktywujących reakcje odpornościowe w roślinach (Szczech 2008, Sarma i in. 2015). Jakkolwiek, interesujący, krytyczny pogląd na teorie dotyczące stosowania mieszanek mikroorganizmów *versus* praktyczne ich współdziałanie w naturalnym środowisku przedstawili Xu i in. (2011)

Prezentowany cykl publikacji jest wynikiem badań dotyczących zastosowania bakterii w biologicznej ochronie roślin warzywnych przed patogenami grzybowymi. Szczególnie badania te koncentrowały się na zagadnieniach związanych z efektywnością działania mieszanek antagonistycznych bakterii.

Pomimo obecności na komercyjnym rynku różnych preparatów mikrobiologicznych jest ich wciąż zbyt mało aby pokryć zapotrzebowanie producentów. Rolnicy są coraz bardziej świadomi konieczności ochrony środowiska, a w szczególności utrzymania żyzności gleb. W związku z tym wzrasta ich zainteresowanie i zapotrzebowanie na środki biologiczne, które mogą być alternatywą lub uzupełnieniem dla syntetycznych preparatów.

Prace nad wykorzystaniem szczepów antagonistycznych bakterii w ochronie roślin rozpoczęła autorka podczas dwuletniego stażu w Japonii, a następnie kontynuowała badania w Instytucie Warzywnictwa w Skierniewicach, obecnie Instytut Ogrodnictwa.

Celem tych prac było:

- Określenie możliwości wykorzystania w biologicznej ochronie roślin bakterii *Bacillus subtilis* RB14-C, posiadającej zdolność do produkcji antybiotyków iturinu A i surfaktyny oraz zwiększenie efektywności jej działania poprzez zastosowanie w kombinacji z antagonistycznym szczepem *Burkholderia cepacia* BY.
- Opracowanie mieszanek bakterii skutecznych w ochronie roślin warzywnych przed kompleksem patogenów grzybowych.
- Ocena efektywności działania mieszanek wybranych bakterii w warunkach polowych.
- Utrwalenie i wydłużenie żywotności bakterii poprzez opracowanie techniki ich formulacji.

2. Omówienie wyników prac dokumentujących osiągnięcie naukowe

2.1. Badanie skuteczności różnych metod aplikacji bakterii *Bacillus subtilis* RB14-C i *Burkholderia cepacia* BY w ograniczaniu zgorzeli siewek pomidora wywoływanej przez grzyb *Rhizoctonia solani*.

Prace nad ochronnym działaniem *B. subtilis* RB14-C i *B. cepacia* BY prowadzono w latach 2001-2003. We wcześniejszych badaniach przedstawionych przez Ohno i in. (1992) oraz Asakę i Shodę (1996) wykazano, że bakteria RB14 jest producentem antybiotyków iturinu A i surfaktyny oraz ma zdolność do ograniczania rizoktoniozy pomidora. Ituriny i surfaktyny stanowią grupę lipopeptydowych antybiotyków, które wykazują silnie hamujące działanie wobec licznych grzybów, w tym patogenicznych dla roślin (Ongena i

Jacques 2008, Wang i in. 2015, Fira i in. 2018). Według Velivelli i in. (2014) RB14 posiada również zdolność do produkcji DAPG, pyoluteiryny, pyrrolnityny, fengicyny i fenazy. W swoich badaniach Shoda (2000) stwierdził, że *B. subtilis* RB14 w krótkim czasie po wprowadzeniu do gleby wytwarzał przetrwalniki, które nie produkowały antybiotyków. Postawiono hipotezę, że spory *Bacillus* kiełkują i produkują aktywne substancje w ryzosferze roślin. W związku z tym pracę autorka rozpoczęła od określenia dynamiki populacji aktywnych form bakterii RB14-C *versus* formy przetrwalnikowe w podłożu bez udziału roślin oraz w strefie korzeniowej testowych roślin pomidora. Szczep RB14-C był stabilnym mutantem szczepu *B. subtilis* RB14, odpornym na streptomycynę i zachowującym zdolność do produkcji iturinu A i surfaktyny na poziomie wyjściowego szczepu RB14. Oceniany był stopień kolonizacji przez RB14-C w dwóch strefach korzeni pomidorów (0 – 3 cm i >3 cm długości korzenia) w zależności od metody aplikacji tych bakterii. W doświadczeniach zastosowano trzy metody aplikacji: (i) zawiesinę komórek mieszano z glebą (SA), (ii) zaprawiano nasiona (SC), (iii) łączona aplikacja - zawiesinę komórek RB14-C mieszano z glebą, a po 4 dniach wysiewano zaprawiane tą bakterią nasiona pomidora (SA+SC).

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych. Zastosowano dwa systemy doświadczalne: (i) testy prowadzone w doniczkach o pojemności 0,5 l, (ii) tzw. „mikro-testy” w probówkach. W pierwszym systemie do skażonej *R. solani* gleby aplikowano bakterie RB14-C wg trzech powyżej wymienionych metod. W tym systemie badano stopień zasiedlenia podłoża przez RB14-C w ciągu czterech dni inkubacji od momentu aplikacji oraz dynamikę produkcji antybiotyku iturin A przez te bakterie. Następnie, po dwóch tygodniach wzrostu roślin pomidora w badanych podłożach, oceniano stopień porażenia tych roślin przez *R. solani* oraz zasięg i intensywność kolonizacji korzeni przez RB14-C, w zależności od metody inokulacji bakterii. W drugim systemie, tzw. „mikro-testach”, badano poziom kolonizacji przez RB14-C strefy wokół nasion oraz intensywność produkcji iturinu A. Dokładny opis tych doświadczeń zamieszczono w pracy Szczech i Shoda (2006).

Wykazano, że ochronne działanie antagonistycznej bakterii *B. subtilis* RB14-C jest ściśle uzależnione od sposobu ich aplikacji. Najlepszą ochronę roślin pomidora uzyskiwano, gdy zawiesina komórek była dodawana do podłoża i równomiernie z nim wymieszana. Stwierdzono, że w tym układzie liczebność introdukowanej bakterii silnie wzrastała w ciągu 24 godzin od momentu aplikacji, a w populacji przeważały aktywne komórki w formie wegetatywnej. Podwyższona liczebność antagonisty utrzymywała się w podłożu tylko przez 2-3 dni. Po tym okresie powracała do poziomu wyjściowego (bezpośrednio po inokulacji), a większość komórek bakterii RB14-C wchodziła w fazę spoczynkową. We wstępnej fazie po inokulacji antagonistą produkował też iturin A. Jednak krótko po tym, z powodu przechodzenia komórek w formę spoczynkową, poziom produkcji iturinu A spadał. Zmniejszenie koncentracji antybiotyku w glebie mogło być również wynikiem rozkładu tej substancji przez inne mikroorganizmy oraz wypłukiwania podczas podlewania. Pomimo to, produkcja antybiotyku zaraz po inokulacji RB14-C do podłoża była wystarczająca aby ograniczyć patogeniczną aktywność *R. solani*. Potwierdza to wyniki uzyskane przez Haasa i Keela (2003), którzy stwierdzili, że niektóre antybiotyki mogą efektywnie hamować rozwój patogenów, nawet jeżeli ich koncentracja jest bardzo niska.

W przypadku wymieszania RB14-C z podłożem z pewnością duże znaczenie miało też równomierne rozmieszczenie komórek antagonisty, co zwiększyło kontakt z grzybnią *R. solani*. Jak wykazano w innych doświadczeniach autorki bezpośredni kontakt antybiotyku z grzybnią patogena gwarantował zahamowanie jego rozwoju (Szczech i Shoda 2005). Ochronny efekt tej aplikacji (mieszanie z podłożem) mógł być również związany z regularną kolonizacją korzeni roślin. Cały system korzeniowy pomidorów był zasiedlony przez RB14-C, a zagęszczenie tych bakterii było większe w dolnych partiach korzeni, które jako najmłodsze mogły być bardziej wrażliwe na atak patogena.

W odróżnieniu do dogłębowej aplikacji, zaprawianie nasion pomidora bakteriami RB14-C nie było skuteczną metodą ochrony. Prawdopodobnie ilość antagonisty wprowadzona wraz zaprawianymi nasionami do podłoża była zbyt mała, aby jego działanie było wystarczające dla zahamowania infekcji roślin. Pomimo wzrostu liczebności bakterii RB14-C wokół nasion po ich wysianiu, produkcja iturinu A w znaczącym stężeniu rozpoczęła się dopiero po trzech dniach od inokulacji (Szczech i Shoda 2006). Natomiast obserwacje autorki wykazują, że najsilniejsza infekcja kiełkujących nasion pomidora przez *R. solani* następowała już po dwóch dniach (Szczech, dane nie publikowane). A więc produkcja antybiotyku w tym przypadku była zbyt opóźniona żeby skutecznie obniżyć porażenie. Również kolonizacja korzeni pomidora była bardzo słaba i ograniczała się głównie do wyższych partii korzeni, co nie zapewniało dostatecznej ochrony w późniejszym okresie wzrostu roślin.

Podwójna aplikacja RB14-C, polegająca na wymieszaniu bakterii z glebą, a następnie wysianiu do tej gleby zaprawianych bakteriami nasion pomidora, nie poprawiła skuteczności działania antagonisty. Porażenie siewek pomidora w tym obiekcie nie różniło się istotnie od kontroli z podłożem skażonym *R. solani*. Było to prawdopodobnie związane z zaburzeniami w produkcji iturinu A przez bakterie, a także zmienną kolonizacją korzeni roślin. Dwadzieścia cztery godziny po wysianiu zaprawianych nasion do inokulowanej wcześniej bakteriami gleby, ogólna liczebność bakterii RB14-C wzrosła, jednak była niższa niż poziom populacji obserwowany w tym terminie w przypadku aplikacji dogłębowej. Stwierdzono, że większość komórek bakterii RB14-C było w formie przetrwalników. Sytuacja ta utrzymywała się przez kolejne dwa dni trwania eksperymentu. Miało to wpływ na obniżenie produkcji iturinu A. Prawdopodobnie dodatkowe wprowadzenie RB14-C wraz z nasionami do gleby uprzednio inokulowanej spowodowało zaburzenia w funkcjonowaniu tych bakterii, szczególnie w układzie doświadczenia laboratoryjnego prowadzonego w pojemnikach o ograniczonej pojemności. Również kolonizacji korzeni pomidorów nie była stabilna, gdyż w pewnych doświadczeniach rozkład bakterii na korzeniach był podobny jak przy aplikacji dogłębowej, natomiast w innych jak przy zaprawianiu nasion.

Uzyskane wyniki wskazują, że sposób aplikacji aktywnych mikroorganizmów może mieć kluczowy wpływ na ich skuteczność. W tym przypadku odnosi się to do bakterii, których głównym mechanizmem działania jest zdolność do produkcji antybiotyków hamujących rozwój patogena. Aby uzyskać efekt ochronny antybiotyk powinien mieć bezpośredni kontakt z organizmem chorobotwórczym.

Kolejnym etapem badań wykonywanych przez autorkę było określenie oddziaływania *B. subtilis* RB14-C na rozwój *R. solani* oraz innych mikroorganizmów w

inokulowanym podłożu. Opis tych doświadczeń oraz wyniki zamieszczono w publikacji Szczech i Shoda (2005). W eksperymentach kontenerowych obserwowano dynamikę liczebności grup ogólnych bakterii i grzybów oraz wprowadzonego do podłoża *R. solani*, pod wpływem zawiesiny komórek *B. subtilis* RB14-C odseparowanych od podłoża hodowlanego. Stwierdzono, że szczep RB14-C istotnie obniżał liczebność bakterii w podłożu już po dwóch dniach inkubacji. Natomiast zastosowanie zawiesiny komórek tej bakterii nie miało istotnego wpływu na liczebność grzybów strzępkowych i *R. solani* w badanym podłożu. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach, w których badano działanie zawiesiny komórek RB14-C na mikroorganizmy zasiedlające ryzosferę pomidorów, w tym na zagęszczenie *R. solani*. Liczebności mikroorganizmów w strefie korzeniowej roślin rosnących w podłożu traktowanym i nie traktowanym RB14-C określano po trzech tygodniach od inokulacji i dwóch tygodniach wzrostu roślin w podłożach. I w tym przypadku aplikacja RB14-C istotnie zmniejszała liczebność bakterii na korzeniach roślin, natomiast liczebność grzybów ogółem i *R. solani* była we wszystkich badanych obiektach podobna.

Według doniesień wielu autorów (Podile 1994, Probanza i in. 2002, Ramos i in. 2003) bakterie z rodzaju *Bacillus* spp. dodane do gleby lub zastosowane jako zaprawa nasienna, mogą zmieniać skład flory bakteryjnej w ryzosferze roślin. Redukcja liczebności bakterii mogła wynikać z konkurencji o miejsce i limitowane składniki pokarmowe. Mniejsze znaczenie mogła mieć antybioza, gdyż według informacji zawartych w opracowaniu Wanga i in. (2015) ituriny wykazują małą efektywność jeśli chodzi o hamowanie wzrostu bakterii. Aplikacja komórek RB14-C nie miała natomiast wpływu na ogólną populację grzybów glebowych, co potwierdza wyniki uzyskane podczas badania zagęszczenia *R. solani*. Chociaż inni autorzy podają przykłady zmniejszenia liczebności grzybów w ryzosferze orzeszków ziemnych przez *B. subtilis* AF1 (Podile 1994) oraz grzybów mikoryzowych *Pisolithus tinctorius* przez *B. pumilus* i *B. licheniformis* (Probanza i in. 2001). W tym przypadku zastosowanie zawiesiny komórek bakterii odseparowanych od podłoża hodowlanego, zawierającego wyprodukowane przez te bakterie antybiotyki, znacznie osłabiło ich antygrzybowe działanie. Potwierdzają to wyniki kolejnych doświadczeń, również opisanych w pracy autorki, w których zastosowano zawiesinę komórek RB14-C oraz kulturę tych bakterii w pożywce hodowlanej. W przypadku aplikacji kultury RB14-C do podłoża skażonego *R. solani* stwierdzono istotne obniżenie liczebności jednostek tworzących kolonie tego grzyba, w przeliczeniu na 1 g podłoża, a także obniżenie koncentracji ergosterolu. Natomiast zawiesina komórek bakterii w wodzie nie miała wpływu na redukcję *R. solani* i obniżenie ilości ergosterolu w porównaniu z kontrolą. Ergosterol jest uważany za wskaźnik wielkości populacji grzybów *Rhizoctonia* w glebie (Ruzicka i in. 2000), o czym świadczyła niska koncentracja tego związku w podłożu, gdzie nie dodano *R. solani* (Szczech i Shoda 2005).

O hamującym wpływie antybiotyków produkowanych przez *B. subtilis* RB14-C na *R. solani* świadczą również wyniki testu, w którym obserwowano pod mikroskopem wzrost grzybni *R. solani* poddanej działaniu zawiesiny płukanych komórek RB14-C lub kultury tych bakterii. W obiekcie, gdzie zastosowano zawiesinę komórek stwierdzono nieznaczne zahamowanie wzrostu grzybni patogena w porównaniu do grzybni kontrolnej.

Natomiast tam, gdzie użyto bakterie wraz z płynem pochodzonym wzrost grzybni był silnie zahamowany.

Powyższe badania wykazały znaczenie wyższej koncentracji substancji antybiotycznych dla skutecznego ochronnego działania RB14-C wobec patogena zgorzelowego *R. solani*. Doświadczenia wykonano w warunkach laboratoryjnych i pokazują one duży potencjał tych bakterii w biologicznej ochronie roślin. Należałoby jednak określić jakie możliwości mają bakterie *B. subtilis* RB14-C w glebie uprawnej. Często w warunkach naturalnego środowiska glebowego produkcja i działanie antybiotyków przez mikroorganizmy może być ograniczona. Powodów ograniczonego działania antybiotyków na liczebność patogenów w naturalnym środowisku może być wiele. Po pierwsze, oprócz limitowanej produkcji, innymi czynnikami wpływającymi na działanie metabolitów antagonistycznych bakterii jest ich rozkład przez mikroorganizmy zasiedlające glebę, wychwytywanie i blokowanie tych substancji w kompleksach sorpcyjnych gleby, a także wypłukiwanie przez wodę przenikającą z powierzchni do głębszych warstw. Należy również wspomnieć o różnej wrażliwości patogenów na toksyczne metabolity produkowane przez antagonistów. Niektóre grzyby patogeniczne wytwarzają mechanizmy obronne, dzięki którym odznaczają się tolerancją na obecność toksycznych metabolitów (Duffy i in. 2003). Do tych mechanizmów należą m.in. produkcja enzymów rozkładających substancje antybiotyczne lub zdolność do usuwania toksyn z komórek (Morrissey i Osbourn 1999). Zmienną wrażliwością na poszczególne antybiotyki charakteryzują się nie tylko grzyby różnych rodzajów. Często szczepy należące do tego samego gatunku na danym obszarze, a nawet w tym samym siedlisku są mniej lub bardziej odporne na toksyczne metabolity (Fry i in. 1992, McDonald i in. 1994, niepublikowane badania własne autorki).

Kolejny etap badań obejmował ocenę skuteczności ochronnego działania kombinacji dwóch szczepów antagonistycznych bakterii *B. subtilis* RB14-C i *B. cepacia* BY. Szczep bakterii BY oznaczony jako *Burkholderia cepacia* został wyizolowany z gleby wulkanicznej używanej w doświadczeniach z RB14-C. Autorka wyizolowała go na podłożu Martina, przeznaczonym do izolacji grzybów z gleby, z różem bengalskim i streptomycyną. Kolonia utworzona na powierzchni pożywki przez tą bakterie wykazywała silne hamujące działanie wobec grzybów rosnących na tym podłożu. Po izolacji i oczyszczeniu szczep BY hamował również silnie wzrost grzybni *R. solani* w testach *in vitro*.

W wielu badaniach wykazano, że kombinacja kilku mikroorganizmów może poprawić wynik ich ochronnego działania (Rapauch i Kloepper 1998, De Boer i in. 1999, Guetsky i in. 2002). W związku z tym przeprowadzono badania nad ograniczeniem porażenia pomidorów przez *R. solani* przy użyciu kombinacji bakterii RB14-C i BY, które opisano w publikacji Szczech i Shoda (2004). W pierwszej kolejności przebadano wzajemne relacje pomiędzy obydwoma szczepami. Stwierdzono, że BY nieznacznie hamowała wzrost RB14-C na szalkach. Natomiast RB14-C nie ograniczała wzrostu *B. cepacia*, która była odporna również na iturin A. Odporność bakterii *B. cepacia* na liczne antybiotyki potwierdzają również inne doniesienia (Parke i Gurian-Sherman 2001). Wstępne testy przeprowadzone na filtrach z włókna szklanego, zaszczepionych *R. solani* i

umieszczonymi w ziemi inokulowanej mieszanką bakterii RB14-C i BY lub tymi szczepami osobno, wykazały całkowite zahamowanie wzrostu grzybni patogena przez mieszankę bakterii na filtrach, oglądanych pod mikroskopem. Ograniczony wzrost grzybni *R. solani* obserwowano również po zastosowaniu pojedynczych szczepów RB14-C i BY, przy czym silniejsze działanie wykazywał szczep BY. Następnie skuteczność kombinacji tych dwóch szczepów bakterii badano w doświadczeniach kontenerowych z roślinami pomidora. W tych doświadczeniach bakterie były aplikowane do podłoża w różnych konfiguracjach: (i) RB14-C+BY dodawane do podłoża 4 dni przed wysiewem pomidora, (ii) RB14-C aplikowany do podłoża 4 dni, a BY 2 dni przed wysiewem pomidora, (iii) RB14-C aplikowany do podłoża 4 dni, a BY bezpośrednio przed wysiewem pomidora. Dla porównania, w doświadczeniach użyto również pojedyncze szczepy tych bakterii, przy czym BY aplikowano bezpośrednio przed wysiewem nasion oraz dwa lub cztery dni przed wysiewem. Z kolei RB14-C, we wszystkich wariantach, dodawano do podłoża na cztery dni przed wysiewem pomidora. Podłoże przed inokulacją bakteriami było skażone *R. solani*. Po dwóch tygodniach od wysiewu określano liczbę roślin pomidorów, które wyrosły w poszczególnych obiektach i ich masę. Analizowano również liczebność *R. solani* oraz *B. subtilis* RB14-C w podłożach.

Obie bakterie, użyte jako pojedyncze szczepy, ograniczały zgorzel pomidora wywołaną przez *R. solani*. Najlepszy efekt w przypadku pojedynczej aplikacji uzyskano po użyciu BY na cztery dni przed wysiewem nasion. Natomiast wśród wszystkich obiektów najmniejsze porażenie pomidorów uzyskiwano po zastosowaniu kombinacji RB14-C+BY dodawanej dwa dni przed wysiewem, a następnie RB14-C+BY cztery dni przed wysiewem. Bakterie zwiększały również istotnie masę roślin pomidora. Największe rośliny uzyskiwano po zastosowaniu BY. Masa roślin w tych wariantach była porównywalna do roślin rosnących w podłożu nie skażonym *R. solani*. Aplikacje bakterii RB14-C i BY do podłoża skażonego *R. solani* istotnie redukowały populację patogena. Istotnie większą skutecznością odznaczała się bakteria *B. cepacia* BY. W wariantach, gdzie dodano tę bakterię liczebność *R. solani* w podłożu była ok. trzykrotnie niższa niż w podłożu kontrolnym. Działanie RB14-C było znacznie słabsze.

Badanie liczebności *B. subtilis* RB14-C w podłożach wykazało, że po czterech dniach od aplikacji liczebność tych bakterii utrzymywała się na poziomie ok. 7×10^8 jtk/ g podłoża i to głównie w formie przetrwalników. Natomiast tam, gdzie zastosowano RB14-C w kombinacji z BY ogólna liczebność *Bacillus* nie zmieniła się, ale istotnie obniżała się liczba form spoczynkowych RB14-C - około 30% populacji tych bakterii było aktywnych.

Badania te wykazały, że nowo wyizolowana bakteria *B. cepacia* BY okazała się mieć silniejsze właściwości antagonistyczne wobec *R. solani* niż *B. subtilis* RB14-C. Obie grupy tych bakterii, zarówno *Bacillus* jak i *Burkholderia*, zaliczane są do mikroorganizmów wykazujących szerokie spektrum mechanizmów, które można wykorzystać w biologicznej ochronie roślin (Parke i Gurian-Sherman 2001, Kowalska i Szczech 2005, Santoyo i in. 2012, Sivasakthi i in. 2014). Jednak badania autorki były jednymi z pierwszych, gdzie wykorzystano obie bakterie i wykazano większą skuteczność takiej kombinacji. Powyższe badania wykazały również, że ochronna skuteczność mikroorganizmów może być zależna od terminu aplikacji bakterii.

2.2. Opracowanie mieszanek bakterii skutecznych w ochronie roślin warzywnych przed kompleksem patogenów grzybowych.

Badania nad wykorzystaniem mieszanek aktywnych bakterii w biologicznej ochronie roślin autorka kontynuowała w kolejnych latach. Celem badań było opracowanie mieszanek aktywnych mikroorganizmów skutecznych w ochronie roślin warzywnych przed kompleksem patogenów grzybowych. Prace rozpoczęto od izolacji i selekcji bakterii pod kątem możliwości ich zastosowania w ochronie roślin. Bakterie izolowano z podłoży z dodatkiem wermikompostu, które we wcześniejszych badaniach wykazywały znaczną oporność wobec patogenów. Zjawisko to było związane z wysoką zawartością mikroorganizmów antagonistycznych (Szczech 1999, Szczech i in. 2002). Bakterie izolowano również z ryzosfery roślin warzywnych (pomidor, sałata, ogórek). Pozyskane izolaty były badane w testach *in vitro* pod kątem zdolności do produkcji antybiotyków, stymulacji wzrostu roślin, udostępniania składników pokarmowych oraz indukcji odporności. W wyniku tych działań w Pracowni Mikrobiologii (obecnie Zakład Mikrobiologii) powstała kolekcja bakterii o różnych mechanizmach działania, o potencjalnym wykorzystaniu w ochronie roślin i jako biostymulanty. Właściwości izolatów bakterii przedstawiono w pracach: Szczech i Dyki (2007), Szczech (2009), Szczech i in. (2009) oraz Szczech i in. (2016 a).

Wybrane bakterie, oznaczone jako: 207, PT42, *Bacillus sp.* PZ9 i SZ141, *Enterobacter sp.* B125 i PT60, T20, *Burkholderia cepacia* CAT5 użyto w różnych kombinacjach do ochrony roślin przed chorobami odglebowymi, w licznych doświadczeniach kontenerowych. Doświadczenia prowadzono z roślinami testowymi pomidora, ogórka i sałaty. W pierwszej kolejności, w testach *in vitro*, sprawdzono wzajemne oddziaływanie bakterii aby określić ich kompatybilność lub wzajemny antagonizm. Następnie przygotowywano mieszanki bakterii, których działanie na testowe rośliny badano w doświadczeniach z podłożami skażonymi *R. solani* i patogenicznymi szczepami *Fusarium (F. oxysporum f. sp. lycopersici FOL, F. solani)*. Wszystkie doświadczenia powtarzano dwu- lub trzykrotnie. Wyniki badań laboratoryjnych i szklarniowych zostały opisane w pracach Szczech i Dyki (2007), Szczech i Dyśko (2008), Szczech i in. (2009) i Szczech i in. (2016 a).

W skład badanych mieszanek wchodziły dwa lub trzy izolaty bakterii. Mieszanki przygotowywano bezpośrednio przed użyciem w formie zawiesin komórek w roztworze soli fizjologicznej. Udział objętościowy każdej z zawiesin bakteryjnych w mieszankach był równy. W doświadczeniach, w których badano skuteczność kombinacji bakterii w ograniczaniu zgorzeli siewek pomidora wywoływanej przez *R. solani*, zastosowano test na płytkach Phytotoxkit (Tigret) (Szczech i Dyki 2007, Szczech i Dyśko 2008). Płytki wypełniano podłożem skażonym patogenem, a następnie wysiewano nasiona pomidora, które były moczone w zawiesinach bakteryjnych. Płytki umieszczano w komorze wegetacyjnej i po 7 dniach inkubacji oceniano intensywność wschodów roślin. W doświadczeniach z *R. solani* zastosowano następujące mieszanki bakterii: B125+207+PT42; PT42+SZ141; B125+PT42; PT60+SZ141; PT60+PT42. Dla porównania

nasiona zaprawiano również zawiesinami pojedynczych szczepów bakterii, które były używane w mieszankach.

W doświadczeniach z *R. solani*, skażenie podłoża powodowało prawie całkowite zahamowanie wschodów roślin. Zaprawianie nasion mieszankami bakterii istotnie zwiększało liczbę siewek, w porównaniu do wariantów, w których wysiano nasiona nie zaprawiane bakteriami. Najlepsze działanie w tych doświadczeniach wykazywała mieszanka bakterii PT42+SZ141, która ograniczała zgorzel siewek pomidora i zwiększała wschody o ok. 30% w porównaniu do kontroli. Zaobserwowano, że pojedyncze izolaty również poprawiały wschody pomidorów w skażonym podłożu, ale ich skuteczność była zmienna w kolejnych testach. Natomiast mieszanki bakterii bardziej stabilnie chroniły pomidory przed zgorzelą.

Doświadczenia z podłożem skażonym *Fusarium* FOL przeprowadzono w warunkach szklarniowych, w doniczkach wypełnionych podłożem skażonym zarodnikami patogena (Szczech i Dyki 2007, Szczech i Dyśko 2008). Do podłoża wysadzano rozsadę pomidorów, których korzenie moczo w zawieszynie mieszanek bakteryjnych: PT42+SZ141+T20; PT42+PT60+T20; SZ141+PT60+T20; PT60+PT42; PT60+SZ141; PT42+SZ141; PT42+B125. Po miesiącu wzrostu roślin oceniano stopień ich porażenia przez *Fusarium* na podstawie stopnia nekrozy tkanek na przekroju poprzecznym szyjki korzeniowej. Ocenę wykonywano w skali 0 – 4 (0 – brak objawów porażenia, 4 – 100% nekrozy na przekroju). Określano również liczebność *Fusarium* spp. w ryzosferze roślin, za pomocą posiewów na podłożu selektywne dla tych grzybów.

W tych doświadczeniach, istotne ograniczenie porażenia roślin pomidora przez *Fusarium* uzyskiwano po zastosowaniu mieszanek bakterii PT42+PT60+T20; SZ141+PT60+T20 (Szczech i Dyki 2007) oraz PT42+B125 (Szczech i Dyśko 2008). Pozostałe mieszanki użyte w tych doświadczeniach nie wykazywały ochronnego działania. Tak jak w przypadku testów z *R. solani*, pojedyncze izolaty również wykazywały właściwości ochronne w niektórych doświadczeniach, ale ich skuteczność nie była powtarzalna w kolejnych testach. Najbardziej efektywny okazał się szczep B125. Natomiast T20 wykazywał tendencje do stymulacji porażenia roślin przez *Fusarium*. Pomiarzy zagęszczenia jednostek propagacyjnych patogena w ryzosferze roślin pomidora nie wykazały istotnego wpływu inokulacji bakteriami na liczebność *Fusarium*. Ograniczenie stopnia porażenia roślin przez mieszanki bakteryjne nie miało również wpływu na poprawę plonowania pomidorów w podłożach silnie skażonych tym patogenem (Szczech i Dyśko 2008).

Oprócz doświadczeń z podłożami skażonymi osobno *R. solani* lub *Fusarium*, wykonano badania nad potencjałem ochronnym mieszanek bakterii oraz grzyba *Trichoderma harzianum* PBG na stopień porażenia roślin dwóch roślin testowych (pomidora i ogórka) w podłożach skażonych kompleksem grzybów patogenicznych (Szczech i in. 2009). W doświadczeniach użyto podłoża skażone patogenami: *R. solani*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* i *F. solani*. Badano działanie mieszanek zawierających bakterie PT60 i CAT5 z grzybem PBG oraz bakterie PT60 i B125 z grzybem PBG. Nasiona roślin testowych były traktowane zawiesinami mieszanych mikroorganizmów lub

pojedynczych szczepów. Traktowane mikroorganizmami rośliny uprawiano w skażonych patogenami podłożach przez 6 tygodni, w warunkach szklarniowych.

Ze względu na kompleksowe skażenie podłoża kilkoma patogenami, ochronne działanie zastosowanych mikroorganizmów i ich mieszanek oceniano na podstawie parametrów rozwoju systemu korzeniowego: powierzchni, objętości, długości i liczby stożków wzrostu. Pomiary wykonano za pomocą skanera HP Scanjet 7400C połączonego z systemem WinRhizo (Reagent Instruments Inc., Kanada). Badano także zmiany strukturalne korzeni pomidora, na przekroju poprzecznym, wybarwianym barwnikiem Sudan III, który zabarwia ligniny, suberyny i kutynę w ksylemie na kolor pomarańczowy. Przy pomocy programu Quick Photo Camera (Olympus, Polska), pod mikroskopem, mierzono grubość ksylemu na przekrojach korzeni traktowanych mikroorganizmami. Oceniano również zawartość związków fenolowych w korzeniach. Obecność i koncentracja tych związków wskazuje na możliwość wystąpienia reakcji odpornościowych w roślinach (Lattanzio i in. 2006).

Stwierdzono, że działanie badanych mikroorganizmów było różne w zależności od gatunku rośliny testowej. Silniejsze działanie ochronne uzyskiwano w przypadku roślin pomidorów niż ogórków. Korzenie traktowanych pomidorów charakteryzowały się lepszymi parametrami wzrostu w obiektach, gdzie zastosowano mieszanki mikroorganizmów. Najlepsze działanie wykazywała mieszanka zawierająca bakterie PT60, B125 i grzyb PBG. Rośliny pomidora traktowane tą mieszanką, rosnące w skażonym podłożu, odznaczały się istotnie lepiej rozwiniętym systemem korzeniowym niż rośliny nie traktowane mikroorganizmami. Spośród pojedynczych szczepów najlepszym ochronnym działaniem, ale słabszym niż mieszanki, odznaczała się bakteria B125. Pozostałe szczepy bakterii nie miały istotnego wpływu na rozwój systemu korzeniowego pomidorów. Obie zastosowane mieszanki mikroorganizmów istotnie zwiększały zawartość związków fenolowych w pomidorach. Podwyższona zawartość tych substancji stwierdzono również po aplikacji bakterii CAT5 i PT60. Najniższe stężenie fenoli było w korzeniach roślin kontrolnych, które rosły w podłożu skażonym patogenami. Związki fenolowe w roślinach mają istotny udział w reakcjach odpornościowych na infekcje przez czynniki chorobotwórcze, posiadają również właściwości antybiotyczne oraz odgrywają istotną rolę w tworzeniu mechanicznych barier ścian komórkowych (Castellano 2012). W przypadku opisanych powyżej doświadczeń, w korzeniach pomidorów traktowanych kombinacjami mikroorganizmów obserwowano zwiększoną lignifikację wiązek przewodzących, widoczną w silniej rozbudowanym ksylemie. Lignifikacja tkanek jest jednym z mechanizmów obronnych roślin, stanowiących mechaniczną barierę przeciwko penetracji grzybów (Hückelhoven 2007). Istotnie silniejszą lignifikację tkanek obserwowano również po zastosowaniu grzyba *Trichoderma*, co sugeruje, że w mieszankach ten szczep mógł być czynnikiem decydującym o tworzeniu barier fizycznych w korzeniach.

Rośliny ogórka ogólnie były mniej podatne na zastosowane mikroorganizmy. Najlepiej reagowały na działanie pojedynczych szczepów bakterii CAT5 i grzyba PBG. Te dwa szczepy istotnie zwiększały wszystkie mierzone parametry wzrostu korzeni w porównaniu do roślin uprawianych w podłożu skażonym patogenami, a także do roślin kontrolnych z podłoża bez dodatku grzybów chorobotwórczych. Istotną stymulację

wzrostu korzeni ogórków uzyskano również stosując mieszankę zawierającą CAT5+PT60+PBG. Jednak, pomimo pozytywnego wpływu, mieszanka działała w tym przypadku słabiej niż jej komponenty zastosowane osobno. Użyte mikroorganizmy nie miały wpływu na istotne zwiększenie koncentracji związków fenolowych w korzeniach ogórków.

Ochronne oddziaływanie inokulowanych w strefie korzeniowej mikroorganizmów ograniczało się prawdopodobnie do tej strefy, gdyż testy wykonane na odciętych liściach roślin traktowanych tymi mikroorganizmami, które zakażano nekrotroficznym patogenem *Botrytis cinerea*, nie wykazały wystąpienia reakcji odpornościowych w nadziemnych częściach tych roślin (Szczech i in. 2009). Generalnie nie obserwowano istotnego ograniczania rozwoju nekroz na liściach roślin traktowanych aktywnymi mikroorganizmami w porównaniu do liści roślin kontrolnych. Wyjątkiem była mieszanka PT60+B125+PBG, w przypadku której we wszystkich przeprowadzonych testach uzyskano istotne ograniczenie porażenia przez *B. cinerea* i to zarówno na liściach pomidorów jak i ogórków. Żaden z pojedynczych szczepów, użytych w tych badaniach mikroorganizmów takich właściwości nie wykazywał. Wyniki te sugerują, że w przypadku tej mieszanki w roślinach mogły wystąpić reakcje odporności systemicznej.

W kolejnych doświadczeniach oceniano możliwość zastosowania bakterii w produkcji rozsady sałaty. Badano wpływ aplikacji bakterii do podłoża na równomierność wschodów nasion sałaty oraz intensywność wzrostu roślin. Celem tych prac była produkcja dobrze rozwiniętej rozsady tych roślin bez użycia zapraw chemicznych. Bakterie dodawano do podłoża stosowanych do produkcji rozsady, w formie zawiesin komórek, a następnie wysiewano nasiona. Produkcja rozsady była prowadzona w szklarni. Przetestowano kilkanaście kombinacji różnych szczepów bakterii (Szczech, dane nie publikowane). Jednak najlepszym i najbardziej stabilnym działaniem odznaczała się mieszanka bakterii B125 i PZ9 (Szczech i in. 2016 a i b). Kombinacja tych bakterii nie tylko istotnie poprawiała wschody sałaty we wszystkich eksperymentach, ale również przyspieszała wzrost rozsady i istotnie zwiększała masę roślin.

2.3. Ocena efektywności działania mieszanek wybranych bakterii w warunkach polowych.

Skuteczność działania mieszanek bakterii, wybranych na podstawie testów laboratoryjnych i szklarniowych, oceniano w doświadczeniach polowych, opisanych w pracach Szczech i Dyśko (2008), Szczech i in. (2016 a i b). Pierwsze doświadczenia wykonano w uprawie gruntowej pomidorów w tunelu foliowym (Szczech i Dyśko 2008). Korzenie rozsady przed wysadzeniem do gruntu moczo w zawiesinach mieszanek bakterii: PT60+PT42, PT60+SZ141, PT42+SZ141 i PT42+B125. Doświadczenie prowadzono w dwóch kolejnych latach. Gleba w tunelu nie była sztucznie skażona patogenami. W czasie wzrostu roślin monitorowano występowanie objawów naturalnego porażenia pomidorów przez patogeny. Jednak w obu latach badań nasilenie chorób było niskie. Dlatego nie udało się ocenić ochronnego działania zastosowanych bakterii. Oceniano natomiast plonowanie roślin oraz rozwój ich systemu korzeniowego. Nie stwierdzono istotnego wpływu aplikacji bakterii na ogólny plon pomidorów. Natomiast w pierwszym roku badań obserwowano istotną stymulację rozwoju systemu korzeniowego

pod wpływem bakterii. Zjawisko to nie powtórzyło się jednak w kolejnym roku. Generalnie w uprawie polowej nie stwierdzono istotnego oddziaływania bakteryjnej aplikacji na wzrost i plonowanie pomidorów, pomimo obiecujących wyników uzyskanych w doświadczeniach szklarniowych.

Podobnie, w doświadczeniach polowych z sałatą nie uzyskano pozytywnego wpływu bakterii na zdrowotność i plonowanie tych roślin (Szczech i in. 2016a i 2016b). Przeprowadzono dwa, trwające po trzy lata, doświadczenia w różnych systemach uprawy: na certyfikowanym polu ekologicznym oraz w konwencjonalnej uprawie na poletkach doświadczalnych Zakładu Ochrony Roślin Instytutu Ogrodnictwa. Gleba w tej ostatniej lokalizacji charakteryzowała się silnym skażeniem patogenami, głównie *Sclerotinia sclerotiorum*. W obu doświadczeniach bakterie B125 i PZ9 aplikowano na etapie produkcji rozsady. Rozsadę produkowano w szklarni w podłożu torfowym Klamann. Po wysiewie do podłoża nasiona sałaty podlewano zawiesinami badanych bakterii. Stosowano zarówno mieszankę szczepów jak i oba szczepy pojedynczo. Dodatkowo, w doświadczeniach w systemie konwencjonalnym, gdzie sałatę uprawiano na skażonym polu Zakładu Ochrony Roślin, w jednym z wariantów podczas produkcji rozsady nasiona zaprawiano Zaprawą Nasienną T 75 DS/WS (75% tiuram).

Aplikacja mieszanki bakterii B125+PZ9 na etapie produkcji rozsady istotnie przyspieszała wzrost roślin, które były większe i lepiej rozwinięte niż rośliny kontrolne. Pojedyncze szczepy bakterii również pozytywnie wpływały na wzrost sałaty, ale ich działanie było słabsze niż mieszanki obu tych szczepów (Szczech i in. 2016a). Z kolei chemiczne zaprawianie nasion hamowało wzrost rozsady (Szczech i in. 2016b).

Sałata po wysadzeniu do gruntu nie była już ponownie traktowana bakteriami. W czasie wzrostu monitorowano występowanie chorób, a po zbiorach oceniano plonowanie i skład chemiczny roślin (tylko w przypadku uprawy ekologicznej). Stwierdzono, że pomimo wcześniejszej stymulacji wzrostu sałaty, zastosowane bakterie nie miały wpływu na dalszy rozwój i plonowanie roślin po wysadzeniu do gruntu, zarówno w uprawie konwencjonalnej jak i ekologicznej. Efektem, który obserwowano po aplikacji bakterii, było zwiększenie zawartości azotu ogólnego w roślinach i obniżenie koncentracji witaminy C (Szczech i in. 2016a), które mogło być następstwem większej zawartości azotu i produkcji protein w roślinach (Herencia i in. 2011). Bakterie nie chroniły sałaty przed chorobami po posadzeniu do gruntu, ale nie obserwowano też ich negatywnego wpływu na zdrowotność sałaty, który stwierdzano w przypadku roślin traktowanych Zaprawą Nasienną T (Szczech i in. 2016 b).

W warunkach polowych efekt ochronny uzyskano jedynie w doświadczeniach z ogórkami trzykrotnie podlewanymi zawiesiną bakterii PT60 (Szczech i in. 2016 b). W ciągu trzech lat doświadczeń, aplikacja tego szczepu bakterii istotnie ograniczała występowanie mączniaka rzekomego wywołwanego przez *Pseudoperonospora cubensis*. Ograniczenie porażenia roślin nie było jednak wystarczające aby wpłynąć na zwiększenie plonu ogórków.

Opisane powyżej rezultaty doświadczeń polowych ze szczepami bakterii, które wykazywały właściwości ochronne i stymulowały wzrost roślin w testach prowadzonych w środowisku kontrolowanym, pokazują jak trudno uzyskać satysfakcjonujące efekty w

naturalnych warunkach uprawy. Jak wspomniano we wstępie, zdolność mikroorganizmów antagonistycznych do kolonizacji nowego środowiska jest ściśle związana z skutecznością ich działania. Aby uzyskać satysfakcjonującą ochronę roślin, populacja antagonisty powinna utrzymywać się na odpowiednio wysokim poziomie przez okres, w którym mikroorganizm ten jest w stanie skutecznie ograniczyć patogeniczne działanie organizmów chorobotwórczych lub oddziaływać na metabolizm rośliny. W początkowych fazach opracowywania produktów mikrobiologicznych, w doświadczeniach kontenerowych, introdukowane mikroorganizmy mają bardziej sprzyjające warunki aby wykazać swoje działanie. Po pierwsze, w ograniczonej objętości podłoża, w którym uprawiane są rośliny testowe, istnieje możliwość utrzymania wyższej koncentracji wprowadzonych bakterii. Sprzyjają temu również warunki, w których ilość niekontrolowanych czynników mogących ograniczać działanie mikroorganizmów jest znacznie mniejsza niż w naturalnym środowisku. Warunki doświadczeń szklarniowych, czy też kontenerowych są znacznie bardziej uproszczone w porównaniu do tych, w których funkcjonują mikroorganizmy w glebie. Silna presja licznych biotycznych i abiotycznych czynników w uprawach może nie tylko powodować gwałtowną redukcję liczebności wprowadzonych mikroorganizmów, ale także „wyciszać” aktywowanie mechanizmów ich działania. Kolejną przyczyną braku efektywności stosowanych mikroorganizmów może być sposób ich aplikacji. Jak pokazała autorka w badaniach z *B. subtilis* RB14-C (Szczech i Shoda 2006) metoda aplikacji bakterii może istotnie wpływać na ich działanie. Jednak, kierując się względami praktycznymi i ekonomicznymi należy ograniczać ilości/objętości stosowanego inokulum, aby zmniejszać koszty i upraszczać aplikację. W doświadczeniach kontenerowych nie jest to trudne, można zaprawiać nasiona, moczyć korzenie rozsady, podlewać rośliny zawiesinami bakterii. Pojawiają się jednak trudności przy przechodzeniu ze skali laboratoryjnej do półtechnicznej lub technicznej w komercyjnych uprawach. Okazuje się, że ilość inokulum stosowanego w badaniach może być niewystarczająca w produkcji polowej, a jego zwiększenie podwyższa koszty produkcji i stanowi techniczne utrudnienie w aplikacji dla rolnika. Zaprawianie nasion lub dodawanie inokulum do podłoża przy produkcji rozsady może być skuteczną i ekonomiczną metodą ochrony roślin na tym etapie produkcji, gdyż jest łatwe i nie wymaga dużych ilości inokulum. Skuteczność tej metody pokazano na przykładzie produkcji rozsady sałaty (Szczech i in. 2016 a i b). Pozytywne działanie bakterii stosowanych na nasiona, które stymulowały wzrost i chroniły siewki różnych roślin uprawnych wykazali również inni autorzy np. Zheng i Sinclair (2000), Bardin i in. (2004), Schoina i in. (2011). Może to jednak nie mieć znaczenia w dalszych etapach uprawy. Lepsze rezultaty można uzyskać stosując kilkukrotną aplikację w ciągu sezonu wegetacyjnego, jak to pokazują doświadczenia z bakterią PT60 w uprawie ogórka gruntowego (Szczech i in. 2016 b).

Oczywiście skuteczność inokulacji wyselekcjonowanymi bakteriami zależy również od specyfiki mechanizmu/mechanizmów ich działania, jak również od gatunków roślin i warunków uprawy. Jednak mikroorganizmy wprowadzane do środowiska wymagają wsparcia, które może polegać na zastosowaniu nośników chroniących komórki i przedłużających ich żywotność lub na kształtowaniu warunków bardziej sprzyjających dla

introdukowanych organizmów np. odpowiednie nawożenie, zmiana pH, utrzymanie wilgotności gleby i inne.

2.4. Utrwalenie i wydłużenie żywotności bakterii poprzez opracowanie techniki ich formulacji.

Utrwalenie i wydłużenie żywotności mikroorganizmów, które wykazują skuteczność w uprawie roślin, jest zasadniczym etapem, decydującym o możliwości ich komercyjnego użytkowania. W literaturze można znaleźć wiele doniesień na temat różnych sposobów formulacji bakterii. Najszersze i najnowsze opracowania na ten temat przedstawili Bashan i wsp. (2014 i 2016). Jak dotychczas najbardziej popularnymi nośnikami, stosowanymi w badaniach, a także w komercyjnych preparatach są: torf, perlit, pyliste formy węgla i skał, maltodekstryna, różnorodne polimery. Stosowane są również liofilizowane kultury bakterii. Każda z tych form ma swoje wady i zalety. Do głównych wad zalicza się koszty produkcji, niską trwałość, trudności z uzyskaniem jednorodności i powtarzalność jakościowej materiału oraz problemy z utrzymaniem żywotności komórek mikroorganizmów wprowadzonych na nośnik w czasie przechowywania.

W swojej pracy autorka zdecydowała się na zastosowanie alginianu sodu – polimeru pozyskiwanego z alg morskich, który jest łatwo dostępny i tani (Yabur i in. 2007). Inne zalety tego materiału to możliwość utrzymania standardowej jakości, materiał ten jest prawie sterylny i nie toksyczny w stosunku do żywych organizmów i środowiska. Możliwość wykorzystania alginianu sodu jako nośnika dla mikroorganizmów stosowanych w rolnictwie badali Bashan z zespołem (Bashan 1986, Bashan i Gonzalez 1999, Bashan i in. 2002). Opracowali oni system produkcji makro-, a następnie mikrokapsuł alginianowych, które stanowiły ochronę dla bakterii po wprowadzeniu do gleby, a także skutecznie przedłużały ich żywotność w czasie przechowywania. Szczególne zalety według tych autorów wykazywały mikrokapsuły (o średnicy 50 – 200 μm), które utrzymują wysokie zagęszczenie komórek, a które można bardziej równomiernie rozprowadzić w środowisku glebowym, strefie korzeniowej roślin lub zaprawić nimi nasiona. Makrokapsuły osiągające wielkość 1 – 4 mm ograniczają dostęp tlenu do „zamkniętych” w nich mikroorganizmów co ma wpływ na żywotność komórek w środkowej części kapsuły, trudno jest również zaaplikować ich odpowiednią ilość w pobliżu korzeni czy nasion, gdzie zachodzą interakcje mikroorganizmów z rośliną (Bashan i in. 2002).

Do produkcji mikrokapsuł alginianowych autorka wybrała metodę opisaną przez Windera i in. (2003), która opierała się na zmodyfikowanym procesie emulsyfikacji składników w oleju roślinnym (Szczech i Maciorowski 2016). Mikrokapsulacji poddano kilka szczepów bakterii z różnych rodzajów (CAT5 *B. cepacia*, PZ9 i SZ61 *Bacillus*) oraz zarodniki konidialne grzyba *Trichoderma*. Mikrokapsulacji poddano również szczepy B125, jednak jego przeżywalność podczas tego procesu i przechowywania była bardzo niska, dlatego danych tych nie przedstawiono w publikacji.

Przy produkcji mikrokapsuł alginianowych wprowadzono również dodatkowe materiały - suplementacyjne (zmielony i sterylizowany torf, chitozan i odtłuszczone mleko

w proszku), których zadaniem było polepszenie przeżywalności mikroorganizmów podczas procesu kapsulacji oraz podczas utrwalania mikrokapsuł za pomocą liofilizacji. Do produkcji preparatów wykorzystywano dwudniowe kultury bakterii bulionie odżywczym, w których zagęszczenie komórek wynosiło $10^{10} - 10^{11}$ jtk ml⁻¹. W przypadku grzyba *Trichoderma* wykorzystywano zawiesinę zarodników konidialnych o zagęszczeniu 10^8 jtk ml⁻¹. Uzyskane mikrogranule przechowywano w różnych warunkach: część wilgotnych mikrogranul przechowywano w sterylizowanych pojemnikach w temperaturze 4 °C, drugą część liofilizowano, a następnie przechowywano w również w sterylizowanych pojemnikach w tych samych warunkach.

W doświadczeniach oceniano przeżywalność mikroorganizmów w mikrokapsułach oraz wydajność procesu produkcji w zależności od użytych materiałów suplementacyjnych. Stwierdzono, że zastosowane z alginianem dodatki nie miały istotnego wpływu na przeżywalność mikroorganizmów w czasie emulsyfikacji i kapsulacji, ale istotnie poprawiały produktywność procesu, a także wpływały na jakościowe parametry mikrokapsuł podczas przechowywania. Stwierdzono, że liczebność żywych komórek mikroorganizmów w mikrokapsułach była na zbliżonym poziomie jak w kulturach użytych do produkcji kapsuł. Sam proces więc nie redukował inokulum w uzyskanym preparacie. Natomiast liofilizacja mikrokapsuł istotnie obniżała żywotność zawartych w nich komórek, średnio stukrotnie (z 10^{11} na 10^9 jtk g⁻¹) w przypadku bakterii, a w przypadku zarodników grzyba *Trichoderma* tysiąckrotnie (z 10^8 na 10^5 jtk g⁻¹). Najlepszą odporność na liofilizację i najwyższą żywotność wykazywała bakteria PZ9. Dodawane do alginianu materiały nie miały istotnego wpływu na przeżywalność mikroorganizmów podczas liofilizacji.

Rozmiar mikrokapsuł wahał się w granicach od 10 do 110 μm, w zależności od użytego szczepu bakterii. Najmniejsze kapsuły uzyskiwano z bakterią SZ61, a największe z PZ9. Rozmiar mikrokapsuł był również uzależniony od dodanego do alginianu materiału suplementacyjnego. Największe kapsuły produkowano z użyciem sproszkowanego torfu i chitozanu. Użycie tych dwóch materiałów istotnie poprawiało również wydajność produkcji, która była wyższa o ok. 50% w porównaniu do mikrokapsuł wyprodukowanych z samego alginianu sodu. Najgorszej jakości mikrokapsuły były z dodatkiem mleka odtłuszczonego. Wydajność produkcji tych kapsuł była niska i ulegały one silnym zanieczyszczeniom podczas przechowywania.

Rodzaj mikrokapsuł nie miał jednak istotnego wpływu na przeżywalność mikroorganizmów w czasie przechowywania. Najlepszą żywotnością odznaczały się zarodniki konidialne *Trichoderma*, których liczebność w liofilizowanych i nie liofilizowanych mikrokapsułach utrzymywała się na podobnym poziomie podczas półrocznego okresu przechowywania. Bakterie były mniej stabilne podczas przechowywania. Obniżenie ich żywotności obserwowano już po miesiącu przechowywania. Po 6 miesiącach liczebność żywych komórek w kapsułach, niezależnie od ich rodzaju, obniżała się średnio stukrotnie. Najbardziej trwałym szczepem okazały się bakterie PZ9 z rodzaju *Bacillus*. Z kolei drugi szczep bakterii z tego rodzaju - SZ61 był najmniej stabilny podczas przechowywania. Trwałość mikrokapsuł z tym szczepem bakterii była obniżona również ze względu na wystąpienie skażeń innymi mikroorganizmami. W badaniach stwierdzono, że materiały suplementacyjne dodane do

alginianu podczas produkcji mikrokapsułów, pomimo że nie miały istotnego oddziaływania na żywotność mikroorganizmów, to jednak znacząco wpływały na jakość przechowywanych kapsułów. Dodatek torfu i chitozanu znacznie obniżał poziom niepożądanych zanieczyszczeń, które pogarszały jakość mikrokapsułów przechowywanych w postaci wilgotnej. Natomiast mleko odtłuszczone silnie stymulowało rozwój innych mikroorganizmów, które mogły znaleźć się w preparacie na różnych etapach produkcji. Zanieczyszczeń nie obserwowano w mikrokapsułach, które były liofilizowane.

Na podstawie powyższych badań stwierdzono, że najlepszą produktywnością i jakością odznaczają się mikrogranule z dodatkiem torfu. Działanie tego produktu zawierającego badane mikroorganizmy sprawdzono w doświadczeniach kontenerowych z roślinami pomidora i podłożem skażonym patogenicznym szczepem grzyba *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Mikrogranule zawierające szczepy bakterii PZ9, SZ61 lub CAT5 oraz zarodniki *Trichoderma*, dodawano do wysterylizowanego podłoża skażonego *Fusarium* w dawce 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ podłoża. Do podłoża wysiewano nasiona pomidorów. Po 4 tygodniach wzrostu w szklarni oceniano stopień porażenia roślin na podstawie pomiaru ich masy oraz poziom liczebności *Fusarium* w podłożu. Warianty kontrolne stanowiły rośliny pomidora uprawiane w podłożu nie skażonym *Fusarium* i bez dodatku mikrogranul oraz rośliny zaprawiane Zaprawą Nasienną T. *Fusarium* powodowało silne porażenie roślin, których masa była 6-krotnie niższa niż w kontroli. Bakterie zastosowane w mikrokapsułach obniżały porażenie roślin pomidora. Jednak istotna ochrona, na poziomie chemicznej zaprawy nasiennej, była uzyskiwana tylko po zastosowaniu mikrokapsułów z bakterią PZ9 (Szczech i Maciorowski 2016). Interesującym i niepokojącym zjawiskiem, pomimo ograniczenia fuzariozy, był wzrost liczebności *Fusarium* w podłożu, gdzie dodawano mikrokapsuły alginianowe. Podobne zjawisko obserwowano również w doświadczeniach z sałatą, gdzie do nie sterylizowanego podłoża dodawano mikrokapsuły z dodatkiem torfu, zawierające różne szczepy bakterii m.in. PZ9. W wariantach z mikrokapsułami wystąpiła zgorzel siewek wywołana przez grzyby z rodzaju *Pythium* obecne w użytym podłożu (Szczech, dane nie publikowane). W kolejnych doświadczeniach, gdzie jako dodatkową kontrolę do podłoża dodano mikrokapsuły alginianowe bez bakterii, stwierdzono najsilniejsze porażenie siewek w tym wariantcie. Tam, gdzie zastosowano mikrokapsuły zawierające bakterie nasilenie zgorzeli siewek było słabsze, ale większe niż w kontroli bez mikrogranul. Analiza liczebności grzybów z rodzaju *Pythium* w podłożach wykazała wzrost populacji tych grzybów pod wpływem dodatku alginianu. Autorka nie znalazła podobnych doniesień w literaturze. Konieczne jest dokładniejsze wyjaśnienie i potwierdzenie tego niekorzystnego zjawiska, co wymaga dalszych badań. Jednak w innych przypadkach obserwowano, że stosowanie dodatkowych źródeł substancji pokarmowych, np. nie przekompostowana lub świeża materia organiczna wprowadzana do gleby równoległe z mikroorganizmami antagonistycznymi, stwarza korzystne warunki dla rozwoju zarówno dla antagonisty jak i patogena i niweluje efekt ochronny (Chung i in. 1988). Być może w tym przypadku mikrokapsuły alginianowe posłużyły jako źródło pokarmu dla mikroorganizmów zasiedlających podłoże, w tym patogenicznych.

3. Podsumowanie

Przedstawiona powyżej praca stanowi przekrój etapów badań nad opracowaniem preparatów mikrobiologicznych do wykorzystania w uprawie roślin, począwszy od izolacji bakterii i selekcji najbardziej aktywnych szczepów oraz oceny ich działania w warunkach kontrolowanych, w układzie mikroorganizm – roślina – patogen. W kolejnym etapie, autorka oceniała działanie bakterii w doświadczeniach polowych i podjęła próby formułacji bakterii w celu zachowania ich żywotności i przystosowania do komercyjnego użycia. Pomimo obiecujących wyników uzyskanych w badaniach laboratoryjnych i kontenerowych, zastosowanie bakterii w warunkach polowych nie dawało oczekiwanych rezultatów. Obserwowano jedynie tendencje wskazujące na reakcje roślin na użyte mikroorganizmy takie jak: stymulacja rozwoju systemu korzeniowego u pomidorów i sałaty, wzrost zawartości azotu ogólnego w roślinach sałaty, czy ograniczone występowanie mączniaka rzekomego na ogórkach. Przyczyną małej efektywności użytych bakterii była prawdopodobnie ich słaba konkurencyjność w naturalnym środowisku glebowym.

Mikroorganizmy występujące w glebie stanowią barierę dla wprowadzanego organizmu (inokulanta), który według Mallona i in. (2015) jest mikroorganizmem inwazyjnym. Szczepy, które mają zdolność do wykorzystywania wielu różnorodnych źródeł pokarmowych mogą lepiej konkurować z mikroorganizmami glebowymi i kolonizować nowe środowisko (Eisenhauer i in. 2013), a zdolność do intensywnej kolonizacji może znacznie wspomagać ich działanie. Jednak, jak wykazują badania z ostatnich lat, jest to wysoce uzależnione od funkcjonalnej bioróżnorodności danego ekosystemu.

Intensywny rozwój technik molekularnych, a szczególnie wprowadzenie metod sekwencjonowania DNA i RNA, jest znaczącym krokiem do uzyskania kompleksowych profili mikroorganizmów występujących w badanych zbiorowiskach. Stwierdzono, że większa bioróżnorodność świadczy o większej żyzności gleby (Ambrossini i in. 2016). Jednak w takim układzie zmniejsza się aktywność wprowadzonych mikroorganizmów, które przegrywają konkurencję. Większe szanse mają inokulowane bakterie w środowisku bardziej zubożałym pod względem biologicznym. Jednak wykazano, że mniej ważna jest taksonomiczna bioróżnorodność mikroorganizmów niż ich różnorodność funkcjonalna, która stanowi o oporności środowiska (Eisenhauer i in. 2013, de Boer 2017). Tak więc możliwość zasiedlania nowego środowiska przez inokulanta jak i jego oddziaływanie na rośliny i organizmy patogeniczne są wypadkową licznych interakcji w obrębie danego mikrobiomu. Pomimo ponad 20 lat badań sposób, w który różnorodność taksonomicznych grup wpływa na różnorodność grup funkcjonalnych w systemie glebowym nie jest tak naprawdę poznany (Ambrossini i in. 2016). Również niewiele jeszcze wiadomo na temat oddziaływania mikroorganizmów w różnych systemach rolniczych, które może być zmienne w zależności od lokacji geograficznej, a także od gatunków, a nawet odmian uprawianych roślin. Pomędzy roślinami i mikroorganizmami następuje wymiana licznych molekularnych sygnałów, które prowadzą do nawiązania różnego typu interakcji. Rodzaj i intensywność tych interakcji zależy od genotypu rośliny, szczepu bakterii jak i warunków

biotycznych i abiotycznych środowiska (Lange i in. 2015). W przypadku mikroorganizmów antagonistycznych należy brać również pod uwagę zróżnicowaną wrażliwość patogenów, które jak inne mikroorganizmy, posiadają mechanizmy ochronne wobec działania metabolitów produkowanych przez inokulanty (De Boer 2017).

W świetle przedstawionych powyżej informacji widać jak skomplikowane i zmienne są układy pomiędzy wprowadzanymi do środowiska żywymi mikroorganizmami a czynnikami biotycznymi i abiotycznymi, z którymi te mikroorganizmy mają do czynienia w danym ekosystemie. Jest to przyczyną ograniczonej stabilności działania preparatów biologicznych w warunkach uprawowych, a także często ich niskiej skuteczności, pomimo pozytywnego działania mikroorganizmów na etapie badań. Według Bashana i in. (2016) zwiększenie efektywności aktywnych mikroorganizmów w głównej mierze zależy od ich właściwej formulacji, czyli opracowania formy użytkowej dla tych mikroorganizmów, która będzie przedłużała ich żywotność w okresie od produkcji do zastosowania oraz w nowym środowisku po aplikacji. Jest to niewątpliwie bardzo ważny etap, decydujący o komercyjnym zastosowaniu mikroorganizmów, jednak na podstawie własnych doświadczeń jak i doniesień w literaturze fachowej z ostatnich lat, autorka sugeruje, że przede wszystkim należy zmienić systemy selekcji i badań, szczególnie jeśli chodzi o mikroorganizmy przeznaczone do zastosowania w uprawach polowych. Użycie inokulantów w produkcji rozsady i uprawach szklarniowych jest bardziej efektywne ze względu na uproszczone i bardziej kontrolowane warunki panujące w tych systemach uprawy.

W celu poprawy efektywności działania aktywnych mikroorganizmów proponowanych jest wiele rozwiązań np. stosowanie wysokich dawek inokulum, które mogą zaindukować zmiany w lokalnych strukturach mikrobiomu; selekcjonowanie mikroorganizmów o wysokiej tolerancji na warunki stresowe; zastosowanie konsorcjów mikroorganizmów o różnych wymaganiach pokarmowych i mechanizmach działania; szczepienie roślin mikroorganizmami endofitycznymi wpływającymi pozytywnie na rośliny (Calvo i in. 2014, Ambrossini i in. 2016, Del Carmen Orozco-Mosqueda i in. 2018, Rojas-Solis i in. 2018). Każde z tych rozwiązań ma swoje zalety i wady. Na przykład stosowanie wysokiej koncentracji mikroorganizmów jest możliwe w uprawie roślin pod osłonami lub w kontenerowej np. przy produkcji rozsady. Jednak w wielkoobszarowych uprawach polowych nie jest to uzasadnione ekonomicznie. Obiecującą metodą jest stosowanie kombinacji dwóch lub więcej szczepów mikroorganizmów. Wiele badań wykazało, że mieszanki mikroorganizmów działają bardziej stabilnie i skuteczniej niż te same szczepy użyte pojedynczo (Szczech 2008). Pozytywne działanie mieszanek mikroorganizmów pokazała również autorka w swoich badaniach (Szczech i Shoda 2004, Szczech i Dyki 2007, Szczech i Dyśko 2008, Szczech i in. 2009). Z drugiej strony, bakterie w mieszance mogą nawzajem „wyciszać” w pewnych warunkach produkcję aktywnych metabolitów (de Boer 2017).

Interesujące założenia dotyczące kolejnych etapów badań nad mikroorganizmami przedstawił Köhl i współautorzy w swojej pracy z 2011 r. na temat selekcji mikroorganizmów do komercyjnego użycia w biologicznej ochronie roślin. Według tych autorów, w pierwszej kolejności należy ustalić w jakiej uprawie i do zwalczania jakich

patogenów będzie stosowany mikroorganizm. Następnym etapem jest wybór źródła i metody izolacji mikroorganizmu oraz szybka selekcja dużej liczby izolatów. Wybrane izolaty powinny być poddane klasyfikacji do rodzaju, a ich właściwości antagonistyczne zbadane w testach prowadzonych w warunkach kontrolowanych. Kolejnym, ważnym etapem proponowanym przez tych autorów jest ocena możliwości masowej produkcji wybranych izolatów oraz opracowanie pilotowej formulacji do wstępnych testów polowych, a także ocena kosztów produkcji i możliwości rejestracji (Köhl i in. 2011). Jest to ważny etap, często pomijany lub pozostawiany na koniec badań. Jednak ocena możliwości i kosztów masowej produkcji mikroorganizmów powinna być jednym z czynników warunkujących podjęcie dalszych badań w warunkach polowych, a następnie w skali półtechnicznej. Ostatnim i również bardzo ważnym etapem jest testowanie opracowanej formy użytkowej preparatu w różnych lokalizacjach i przez kilka sezonów wegetacyjnych w integracji ze stosowanymi systemami i metodami uprawy.

Jeszcze inny system pozyskiwania mikroorganizmów do produkcji preparatów biologicznych przedstawili Validow i in. (2007), którzy w pierwszej kolejności przeprowadzili selekcję bakterii pod kątem ich przystosowania do przemysłowych procesów suszenia. Próby gleby przeznaczonej do izolacji mikroorganizmów najpierw suszyli lub liofilizowali i dopiero po tych zabiegach izolowali z nich antagonistyczne bakterie. Ten sposób działania jest uzasadniony, gdyż już od początku brany jest pod uwagę komercyjny aspekt uzyskanych wyników badań.

Według autorki, tak jak to przedstawili Köhl i in. (2011), prace powinny rozpocząć się od wyboru rodzaju upraw i/lub patogenów, którym dedykowany ma być preparat. Kolejny etap to wybór grup/rodzajów mikroorganizmów, które wykazują najlepsze działania w danych uprawach lub są najbardziej skuteczne w ograniczaniu określonej grupy patogenów. W wyborze docelowych grup mikroorganizmów bardzo pomocne mogą być badania składu zbiorowisk mikroorganizmów różnych gleb, które są supresyjne lub konduktywne dla patogenów. Porównania tych zbiorowisk mogą prowadzić do wyodrębnienia grup kluczowych dla zjawiska oporności gleb. Ponadto literatura na temat aktywnych mikroorganizmów jest bardzo obszerna, a na podstawie analizy przedstawionych w niej wyników można wyodrębnić grupy najbardziej obiecujących mikroorganizmów, które mogą być celem izolacji i selekcji antagonistycznych szczepów. Analiza literatury fachowej wskazuje, że badania koncentrują się zazwyczaj wokół kilku grup mikroorganizmów, w przypadku bakterii są to zazwyczaj *Pseudomonas*, *Bacillus* i *Streptomyces*, które odznaczają się dużą konkurencyjnością w środowisku, wieloma właściwościami i zdolnością do produkcji różnorodnych metabolitów skutecznych w ograniczaniu szkodliwych mikroorganizmów (De Boer 2017). Nie bez znaczenia jest to, że grupy te są łatwo izolowalne ze środowiska i można je namnażać w skali przemysłowej, dzięki ich zdolnościom do wykorzystywania szerokiej gamy źródeł pokarmowych. Ma to również ogromne znaczenie w odniesieniu do potencjału kolonizacyjnego tych bakterii, co jest istotne z punktu widzenia ich przeżywalności po wprowadzeniu do nowego środowiska. Kolejny etap, to staranny wybór źródła izolacji o parametrach zbliżonych do warunków ekosystemów docelowej aplikacji. Według Howella (2003) i Bashana i in.

(2016) najlepszą metodą uzyskania skutecznych szczepów aktywnych mikroorganizmów jest ich pozyskiwanie z obszarów, gdzie przewiduje się je stosować.

Następnie materiały stanowiące źródło pozyskania szczepów powinny być poddane działaniu czynników stresowych, które mogą wystąpić na etapach produkcji preparatów lub w środowisku docelowej aplikacji, tak jak na przykładzie Validova i in. (2007) suszenie lub liofilizacja. Ten etap pozwoli wyodrębnić najbardziej trwale mikroorganizmy, a tym samym zawęzić liczbę organizmów do kolejnych etapów selekcji. Spośród tej puli mikroorganizmów można izolować pożądane grupy do dalszych badań. W następnej kolejności można prowadzić badania właściwości antagonistyczne izolatów w warunkach kontrolowanych oraz ich interakcje z roślinami wybranego gatunku lub gatunków. Testy na antagonizm powinny być prowadzone wobec szeregu różnych izolatów organizmów patogenicznych ze względu na ich zróżnicowaną wrażliwość wobec metabolitów i środków chemicznych. Ważnym elementem selekcji powinna być klasyfikacja izolatów i diagnostyka, prowadząca do eliminacji tych, które mogą być chorobotwórcze dla człowieka i roślin. Wśród rodzajów bakterii i grzybów uznanych jako mikroorganizmy działające korzystnie w uprawach roślin są również gatunki, które mogą być patogenami. Przykładowo niektóre bakterie z rodzaju *Pseudomonas* są zaliczane do patogenów wielu roślin uprawnych, a grzyby z rodzaju *Trichoderma* mogą być patogeniczne w uprawie pieczarek lub bocznika (*T. aggressivum*, *T. pleuroticola*), natomiast wśród *T. longibrachiatum* stwierdzono wiele szczepów klinicznych, zagrażających zdrowiu człowieka (Hatvani i in. 2013). Tego typu izolaty powinny być eliminowane już we wczesnych etapach badań.

Następnym krokiem powinno być opracowanie pilotowych technik formułacji wybranych mikroorganizmów, ocena ich przeżywalności w tych formach podczas długotrwałego składowania i oszacowanie kosztów produkcji. Najbardziej obiecujące szczepy ich formułacje powinny być poddane testom polowym w różnych lokalizacjach i podczas kilku sezonów wegetacyjnych. Metody aplikacji powinny być kompatybilne z warunkami i metodami agrotechnicznymi stosowanymi w danej uprawie. Na tym etapie ważna może być informacja jak inokulant wpływa na funkcjonalność biologiczną gleby oraz jaka jest jego przeżywalność w glebie, strefie korzeniowej, a także w wewnętrznych tkankach roślin w przypadku endofitów. Niektórzy autorzy sugerują, aby na tych samych stanowiskach prowadzić aplikacje przez kilka lat (Ambrossini i in. 2016). Sukcesywne stosowanie preparatu w kolejnych sezonach wegetacyjnych lub kilkakrotnie w sezonie może wykazać ich lepszą skuteczność w porównaniu do periodycznych aplikacji. W takim układzie istnieje szansa na silniejszą kolonizację środowiska, wzmocnienie populacji inokulanta, a w rezultacie jego działania.

Aby efektem prowadzonych prac był preparat przystosowany do komercyjnego stosowania konieczna jest integracja wielu dziedzin rolnictwa, agrotechniki oraz dyscyplin naukowych. Konieczne jest kształtowanie warunków glebowych w kierunku stworzenia środowisk bardziej sprzyjających większej aktywności mikrobiologicznej. Należy również brać pod uwagę postępujące zmiany klimatyczne, które mają wpływ na uprawy, a także na migracje i zmiany cykli rozwojowych organizmów chorobotwórczych.

Opracowanie skutecznego preparatu biologicznego jest złożone dlatego finalnych rezultatów tych prac – komercyjnych preparatów na rynku jest zbyt mało, aby zaspokoić zapotrzebowanie producentów rolnych. Rynek na tego typu preparaty jest wciąż mały w porównaniu do środków chemicznych, ale zainteresowanie alternatywnymi metodami ochrony i nawożenia roślin rośnie z roku na rok (Ab Rahman i in. 2018). Główne przyczyny tego zjawiska są następujące: (i) wzrost zainteresowania opinii publicznej ochroną środowiska naturalnego, (ii) migracja patogenów i szkodników w wyniku globalizacji gospodarki i wzrost ich odporności na pestycydy, (iii) zwiększające się koszty związane z koniecznością intensywniejszej ochrony upraw oraz nakładów na nawożenie gleb ulegających degradacji w wyniku intensywnego użytkowania, (iv) zapotrzebowanie konsumentów na żywność tzw. „zdrową” - nie zawierającą szkodliwych substancji i pozostałości chemicznych środków ochrony.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.

Zakres tematyczny prac badawczych, którymi się zajmuję, obejmuje głównie zagadnienia związane z możliwością wykorzystania mikroorganizmów (bakterie, grzyby z rodzaju *Trichoderma*) oraz materii organicznej (odpady organiczne, komposty, wermikompost) do poprawy wzrostu i zdrowotności roślin warzywnych. Badania polegają na selekcji mikroorganizmów i ocenie ich przydatności w uprawach polowych i pod osłonami. Celem prac jest również opracowywanie metod formulacji aktywnych mikroorganizmów i przystosowania ich do komercyjnego wykorzystywania w uprawie roślin. Szczególnie interesuje mnie stosowanie kombinacji mikroorganizmów o różnych mechanizmach działania w celu poprawy stabilności i efektywności preparatów. Uczestniczę również w badaniach dotyczących oceny stopnia degradacji gleb intensywnie użytkowanych, szczególnie w uprawie warzyw. Jednym z celów tych badań jest opracowanie technologii poprawy aktywności biologicznej tych gleb przy użyciu mikroorganizmów oraz preparatów opartych na materiałach organicznych, głównie odpadowych.

Od roku 2009 zajmuję się także oceną poziomu skażeń mikrobiologicznych warzyw bakteriami, które mogą być chorobotwórcze dla człowieka. Prace w tym zakresie rozpoczęłam od badań warzyw z upraw ekologicznych, które ze względu na stosowanie nawozów organicznych (oborniki, komposty) oraz brak ochrony chemicznej, mogą być szczególnie narażone na skażenia. Poziom skażenia mikroorganizmami chorobotwórczymi i powodującymi psucie produktów spożywczych oceniałam również w doświadczeniach dotyczących opracowywania metod przechowywania świeżych warzyw krojonych tzw. „ready-to-eat”.

4.1. Charakterystyka dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora

W 1985 r. rozpoczęłam studia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego AR w Warszawie na Wydziale Rolniczym. W roku 1986 włączono mnie do grupy specjalizacyjnej „ochrona roślin”, utworzonej na Wydziale Rolnictwa. Studia ukończyłam w 1990 r., uzyskując stopień magistra inżyniera rolnictwa z zakresu ochrony roślin. Tytuł

mojej pracy magisterskiej brzmiał: „Niechemiczne metody zwalczania mszycy brzoskwiowo-ziemniaczanej *Myzus persicae* Sulzer”. Praca została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Elżbiety Cichockiej w Katedrze Entomologii Stosowanej. Celem badań było wykorzystanie wrogów naturalnych oraz aktywnych substancji pochodzenia roślinnego w walce z mszycą brzoskwiowo-ziemniaczaną.

W październiku 1990 r., jako stażystka, rozpoczęłam pracę w Samodzielnej Pracowni Mikrobiologii Instytutu Warzywnictwa w Skierniewicach. W początkowym okresie zapoznawałam się z metodami badawczymi stosowanymi w mikrobiologii m.in.: przygotowywanie i zastosowanie pożywek mikrobiologicznych, ogólnych i selektywnych, izolacja i identyfikacja mikroorganizmów z gleby i innych środowisk, obsługa sprzętu laboratoryjnego i inne. W tym czasie w Pracowni realizowano badania dotyczące dynamiki populacji głównych grup troficznych mikroorganizmów w glebach stale nawożonych, od lat 20-tych XX w., obornikiem lub nawozami mineralnymi. W trakcie tych badań brałam czynny udział w analizach mikrobiologicznych. Byłam również jednym z wykonawców prac dotyczących wpływu stosowania nawozów zielonych oraz trocin na mikroorganizmy glebowe i nicienie, realizowanych m.in. w ramach tematu nr 1.1 pt.: „Wpływ corocznego stosowania trocin z drzew iglastych do gleby na populacje głównych grup troficznych nicieni i grzybów glebowych”. Kierownikiem badań wykonywanych w latach 1990 – 1998, był prof. dr hab. Michał Brzeski.

Zarówno mikroorganizmy glebowe jak i nicienie są organizmami, które biorą czynny udział w mineralizacji materii organicznej. Pomimo, iż dynamiczne zmiany ich liczebności po dodaniu materii organicznej do gleby były już wcześniej udokumentowane, brakowało informacji na temat wzajemnych relacji między zagęszczeniem poszczególnych grup nicieni bakterio- i grzybożernych a mikroorganizmami po zastosowaniu łatwo rozkładanych nawozów zielonych lub po długotrwałym stosowaniu wolniej mineralizowanych trocin. Mój udział w badaniach polegał na analizie zmian liczebności bakterii, w tym promieniowców, oraz grzybów po stosowaniu różnych materiałów organicznych. Wyniki tych prac opublikowano w 1993 r. w *Nematologia Mediterranea* (Brzeski i in. 1993) oraz w pracy Brzeski i Szczech (1999).

Od roku 1992, przy merytorycznej pomocy prof. dr hab. Michała Brzeskiego, rozpoczęłam badania dotyczące ochronnych właściwości wermikompostów - kompostów przetwarzanych przez dżdżownice czerwone kalifornijskie z gatunku *Eisenia fetida* (Sav.). W latach 90-tych zainteresowanie wermikompostem było bardzo duże. Powstało wiele prywatnych wytwórni tego produktu, który propagowano jako nawóz sypki i w formie płynnej. Z różnych doniesień i obserwacji producentów wynikało, że wermikompost poprawia kondycję i zdrowotność roślin. Nie było to jednak poparte badaniami naukowymi. W związku z tym podjęłam próbę oceny ochronnych zdolności tego substratu w doświadczeniach z podłożami skażonymi grzybami patogenicznymi w uprawie pomidora: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (fuzaryjne więdnienie pomidora) i *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* (zgnilizna pierścieniowa pomidora). Uczestniczyłam również w pracach dotyczących wykorzystania wermikompostu do zwalczania kiły kapusty wywoływanej przez *Plasmodiophora brassicae* (Szczech i in. 1993).

Wstępnie wykonałam kilka serii doświadczeń kontenerowych w szklarniowych z rozsadą pomidorów, gdzie wermikompost wyprodukowany na bazie obornika bydlęcego był dodawany w dawkach od 0 - 40% do podłoża zawierającego kompost korowy, trociny roślin szpilkowych (20%) i pył węgla brunatnego (10%). Podłoże było skażone homogenizatami kultur grzybów patogenicznych. Podłoże kontrolne nie zawierało wermikompostu i nie było skażone patogenami. Do tak przygotowanych substratów wysiewane były nasiona pomidora. Obserwowana była dynamika wschodów, oceniana intensywność wzrostu roślin oraz stopień porażenia pomidorów przez dodane do podłoża patogeny. Doświadczenia wykazały, że dodatek wermikompostu do podłoża nie miał negatywnego wpływu na wschody pomidorów, a jednocześnie chronił siewki przed zgorzelą wywoływaną przez *P. nicotianae*, a w późniejszych fazach wzrostu silnie ograniczał fuzariozę. Ponadto, wermikompost istotnie wpływał na przyspieszenie wzrostu i zwiększenie masy młodych roślin pomidora. W przypadku dodatku 30% wermikompostu do podłoża nie skażonych patogenami, masa części nadziemnych roślin była większa o 22 – 30% od roślin kontrolnych, w zależności od doświadczenia. Natomiast w podłożach skażonych te różnice były jeszcze większe, ponieważ masa roślin traktowanych wermikompostem pozostawała na poziomie porównywalnym z pomidorami uprawianymi we wzbogaconym podłożu, ale bez dodatku patogena, podczas gdy masa roślin skażonych *F. oxysporum* była mniejsza nawet o 150%. Podobne zjawisko obserwowano w podłożach z *P. nicotianae*.

W 1992 r. wystąpiłam z wnioskiem o grant KBN (projekt badawczy własny) pt.: „Supresyjność humusu dżdżownicowego wobec *Phytophthora nicotianae*”, który uzyskałam w 1993 r. (nr umowy nr umowy PB 0128/S3/93/05, lata realizacji: 1993–1995). Byłam kierownikiem oraz głównym wykonawcą badań. Celem pracy było sprawdzenie czy wermikompost dodawany do podłoża komercyjnych chroni rośliny pomidora w uprawie pod osłonami przed porażeniem przez grzyb *P. nicotianae* var. *nicotianae* w czasie całego okresu wegetacji oraz na czym polega mechanizm jego ochronnego działania. W doświadczeniach używałam wermikomposty wyprodukowane na bazie obornika bydlęcego, pochodzące z różnych firm. Badania te poszerzyłam realizując w 1994 r. temat badawczy nr 1.2 pt. „Antagonistyczne właściwości mikroorganizmów wyizolowanych z wermikompostu wobec patogenów pochodzenia glebowego”, gdzie w testach laboratoryjnych oceniałam aktywność antagonistyczną drobnoustrojów wyizolowanych z wermikompostu wobec trzech, groźnych w uprawach pomidora patogenów: *F. oxysporum*, *P. nicotianae* i *Pythium ultimum*. Stwierdziłam, że zarówno liczebność jak i aktywność antagonistycznych mikroorganizmów w wermikompoście znacznie przekracza te parametry oceniane dla konwencjonalnego podłoża ogrodniczego. Ponadto uzyskane wyniki potwierdziły biologiczną naturę ochronnego działania wermikompostu.

Badania ochronnych właściwości wermikompostów, prowadzone do roku 1995, były podstawą mojej pracy doktorskiej. Część z nich była prezentowana podczas konferencji naukowych (Szczech i Brzeski 1994, Szczech i in. 1994, Szczech 1995, Szczech i in. 1995).

W maju 1994 r. uczestniczyłam w 6-tygodniowym międzynarodowym kursie szkoleniowym pt.: „International Scientific Instrument Technology Workshop on Agricultural Chemistry”, który odbył się na Tajwanie. Kurs został zorganizowany przez Centrum Rozwoju Instrumentów Precyzyjnych (PIDC). Celem szkolenia było podniesienie umiejętności pracowników naukowych w zakresie obsługi i konserwacji nowoczesnego, analitycznego sprzętu laboratoryjnego, a także prowadzenia prac badawczych w dziedzinie gleboznawstwa i fitopatologii roślin. Koszty kursu zostały pokryte z Funduszu Rozwoju Międzynarodowej Współpracy Ekonomicznej Republiki Chińskiej. W szkoleniu brało udział 27 uczestników z 19 krajów.

W 1995 r. otrzymałam stypendium naukowe IAC i rozpoczęłam 6-miesięczny staż naukowy na Uniwersytecie Rolniczym w Wageningen, w Katedrze Fitopatologii pod kierunkiem prof. Gerrita Bollena (1.11.1995 – 30.04.1996). Stypendium było ufundowane przez holenderskie Ministerstwo Rolnictwa, Gospodarki Naturalnej i Rybołówstwa. W czasie pobytu miałam możliwość pogłębić wiadomości z zakresu fitopatologii oraz biologicznych metod ochrony roślin. Tematem mojej pracy była oporność kompostu z domowych odpadów organicznych w stosunku do zgorzeli na ogórkach wywoływanej przez grzyb *Rhizoctonia solani*. Kompost pochodził z jednej z holenderskich firm zajmujących się komercyjnie kompostowaniem odpadów organicznych. Badałam ochronne właściwości kompostu w zależności od stopnia jego dojrzałości, a także zmiany populacji mikroorganizmów w kompoście oraz podłożach z jego dodatkiem. Badania wykazały, że oporność kompostu zmieniała się w czasie dojrzewania. Świeży lub krótko dojrzewający (4 tyg.) kompost dodawany do podłoża nie ograniczał, a nawet stymulował porażenie roślin ogórka. W miarę dojrzewania wzrastały jego ochronne właściwości. Zmiany były m.in. związane z różnicowaniem ilościowym i jakościowym mikroflory rozwijającej się w kompoście w czasie rozkładu materii organicznej. Uzyskane rezultaty zostały przedstawione w publikacji naukowej (Tuitert i in. 1998) opublikowanej w indeksowanym czasopiśmie *Phytopathology*.

4.2. Praca doktorska

W grudniu 1995 r., na Wydziale Ogrodniczym Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego AR w Warszawie odbyła się obrona mojej pracy doktorskiej pt.: „Oporność wermikompostu w stosunku do patogenów grzybowych w uprawie pomidorów”. Promotorem pracy prof. dr hab. Michał W. Brzeski. Praca była wynikiem kilkuletnich doświadczeń prowadzonych w Pracowni Mikrobiologii Instytutu Warzywnictwa w Skierniewicach. Jej celem była ocena ochronnych właściwości wermikompostu w stosunku do odglebowych patogenów grzybowych, szczególnie w uprawie pomidora, a także określenie mechanizmu jego działania i możliwości zastosowania w biologicznej ochronie roślin.

Wermikompost, występujący również pod nazwą biohumus lub humus koprolitowy, jest produktem przerobu różnych odpadów organicznych (oborniki, odpady z gospodarstw domowych i rolnych, osady ściekowe) przez dżdżownice czerwone kalifornijskie z gatunku *Eisenia fetida* (Sav.). Produkt ten odznacza się charakterystyczną, gruzelkową

strukturą, oraz wysoką zawartością składników pokarmowych, zwłaszcza dostępnych form fosforu, potasu i azotu. Stwierdzono, że posiada on również znacząco zawartość węgla organicznego, kwasów fulwowych i huminowych oraz substancji biologicznie czynnych jak: enzymy, regulatory wzrostu roślin, witaminy. Ponadto wermikomposty są zasiedlone przez niezwykle liczne i aktywne mikroorganizmy.

W pracy przeprowadziłam eksperymenty zmierzające do sprawdzenia czy wermikompost dodawany do podłoża chroni rośliny pomidora przed porażeniem przez patogenicznego grzyba *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* wywołującego zgniliznę pierścieniową i *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* wywołującego fuzaryjne więdnienie. W pierwszym etapie wykonałam doświadczenia szklarniowe z rozsądą roślin pomidora, w których oceniałam ochronne działanie wermikompostu dodawanego do podłoża w różnych dawkach (10% – 50% obj.) wobec obu patogenów grzybowych. W następnym etapie, w pełnym cyklu uprawy pomidorów w szklarni, określałam wpływ wermikompostu na zdrowotność i plonowanie pomidorów uprawianych w skażonych i nie skażonych patogenami podłożach z dodatkiem tego materiału. Aby ocenić rolę mikroorganizmów w oporności badałam ochronne działanie wermikompostu po jego sterylizacji oraz wpływ filtrowanych, wodnych wyciągów z tego substratu, dodawanych do pożywek agarowych, na wzrost patogenicznych grzybów *in vitro*. W testach laboratoryjnych oceniałam także zdolności antagonistyczne mikroorganizmów wyizolowanych z wermikompostu lub ryzosfery roślin uprawianych w podłożu z jego dodatkiem, wobec grzybów patogenicznych.

Wermikompost zmieszany z podłożem istotnie ograniczał nasilenie występowania obu chorób w uprawie pomidorów pod osłonami. Skuteczność wermikompostu wzrastała w miarę zwiększania jego udziału w podłożu. Wermikompost pozytywnie wpływał na wzrost i plonowanie roślin nawet w podłożach silnie skażonych patogenami. W podłożach nie skażonych, dodatek 50% wermikompostu powodował zwiększenie plonu o 12% w porównaniu do roślin, które rosły w podłożu torfowym. Różnice w plonowaniu były znacznie wyraźniejsze, gdy pomidory uprawiano w podłożach skażonych grzybami chorobotwórczymi. Zarówno w podłożach z *P. nicotianae* jak i z *F. oxysporum* dodatek wermikompostu zwiększał plonowanie roślin o ok. 40% w porównaniu do kontroli (podłoże skażone patogenami bez wermikompostu). Ponadto analizy biochemiczne pomidorów wykazały, że dodatek tego materiału do podłoża wpływał korzystnie na jakość owoców powodując zwiększenie zawartości cukrów ogółem i kwasu askorbinowego. Z kolei obniżeniu ulegały koncentracje azotu ogólnego i azotanów, a także kwasowość ogólna.

Sterylizacja opornych podłoży z wermikompostem powodowała utratę ich ochronnych właściwości. Dowodzi to istotnej roli mikroorganizmów zasiedlających wermikompost i rozwijających się w podłożach po jego aplikacji w zjawisku oporności. Analizy ogólnej liczebności bakterii i grzybów w dwóch wermikompostach użytych do doświadczeń wykazały, że liczebność tych mikroorganizmów w badanych substratach była trzykrotnie większa niż w komercyjnych podłożach torfowych. W pracy podjęłam również próby określenia potencjału antagonistycznego mikroorganizmów wyizolowanych z samego wermikompostu lub ryzosfery roślin uprawianych w podłożach z dodatkiem tego

substratu. Okazało się, że zarówno mikroflora z wermikompostu jak i ryzosferowa odznaczała się znacznie większym udziałem antagonistów w stosunku do testowych grzybów patogenicznych (*P. nicotianae*, *F. oxysporum*, *Pythium ultimum*) niż populacja mikroorganizmów pozyskanych z substratu torfowego i ryzosfery roślin w nim uprawianych. Stwierdziłam jednak, że po długotrwałym przechowywaniu liczba mikroorganizmów w wermikompoście zmniejszała się znacząco, co istotnie ograniczało jego właściwości ochronne.

Uzyskane wyniki po raz pierwszy dowiodły, że wermikomposty posiadają ochronne właściwości wobec patogenów roślin, a ich oporność ma naturę biologiczną i jest zależna od mikroorganizmów zasiedlających te substraty. Na podstawie tej pracy uzyskałam stopień doktora nauk ogrodniczych ze specjalnością ochrona roślin. Część wyników przedstawionych w pracy została opublikowana w *Journal of Phytopathology* (Szczech 1999).

4.3. Charakterystyka dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora

Badania dotyczące wermikompostu kontynuowałam do 1999 r. Celem tych prac było m.in. porównanie ochronnych właściwości wermikompostów wyprodukowanych z różnych materiałów organicznych, a także ocena ich działania w innych uprawach warzyw niż dotychczas badane i w stosunku do szerszej gamy patogenów.

W roku 1997 uzyskałam grant KBN pt. „Ochronne właściwości wermikompostów wyprodukowanych z różnych materiałów odpadowych w stosunku do *Phytophthora nicotianae*” (projekt badawczy własny nr PB506/P06/97/17). Celem badań zaplanowanych w tym projekcie było określenie oporności wermikompostów wyprodukowanych z obornika bydlęcego, końskiego lub owczego oraz z osadów ściekowych z komunalnych oczyszczalni ścieków, wobec testowego grzyba *P. nicotianae*. Została opracowana charakterystyka chemiczna tych substratów, a także ich cechy biologiczne (liczebność i aktywność mikroorganizmów). Oceniałam wpływ różnych wermikompostów na wzrost pomidorów i ich porażenie przez patogena, a także populację *P. nicotianae* w podłożach.

Stwierdziłam, że działanie wermikompostów jest ściśle zależne od materiałów z jakich zostały wyprodukowane. Wermikomposty z osadów ściekowych, pomimo właściwej dla roślin zawartości składników pokarmowych i pH, oddziaływały niekorzystnie na ich wzrost i nie chroniły przed patogenem. Powodem tego była wysoka zawartość cynku jaką obserwowano we wszystkich substratach wytworzonych z osadów ściekowych (Szczech i Smolińska 2001). Z kolei wermikomposty wyprodukowane z oborników skutecznie chroniły rośliny pomidora przed *P. nicotianae*, pomimo zwiększenia liczebności jednostek propagacyjnych patogena w podłożu, a także wyraźnie stymulowały wzrost. Prawdopodobnie było to związane z aktywnością mikroflory wywołującej m.in. zjawisko generalnej oporności w podłożach z wermikompostem oraz z ich zasobnością w składniki odżywcze, które pobudzając wzrost roślin czyniły je bardziej odpornymi na porażenie (Szczech i Smolińska 1998, Szczech i Smolińska 2001).

Pomimo, że dodatek wermikompostów nie miał istotnego wpływu na ogólną liczebność mikroorganizmów w podłożach, to wyraźnie zmieniał strukturę populacji.

Odnotowano zwiększoną liczbę promieniowców oraz fluoryzujących bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Podobny wzrost następował w ryzosferze roślin. Zjawisko to było obserwowane szczególnie w podłożach inkubowanych z wermikompostem przez kilka tygodni przed wysiewem lub wysadzeniem roślin (Szczech 2002). *Pseudomonas* sp. znane są jako bakterie antagonistyczne wobec patogenów, a także jako posiadające zdolności do indukowania mechanizmów odporności w roślinach. Zdolność bakterii *Pseudomonas*, rozwijających się w podłożu po dodaniu wermikompostu, do indukowania odporności systemicznej wykazano w testach z rzodkiewką, wysiewaną do podłoży torfowych inkubowanych z wermikompostem, której liścienie były zakażane bakteriami *Xanthomonas campestris*. Stwierdzono, że rzodkiewka rosnąca w podłożach z wermikompostem wykazywała znacznie mniejszą wrażliwość na porażenie przez *X. campestris* (Szczech i in. 2002). Najsilniejszą odporność wykazywały rośliny w podłożu, które było inkubowane z wermikompostem przez 8 tygodni przed wysiewem nasion. Korzenie tych roślin były również najliczniej zasiedlone przez *Pseudomonas*. Zespoły tych bakterii izolowane z ryzosfery, a następnie aplikowane na korzenie siewek istotnie obniżały ich porażenie przez *X. campestris* w testach *in vitro*. Te wyniki potwierdziły teorię, że jednym z mechanizmów ochronnego działania wermikompostu może być indukcja odporności w roślinach.

W kolejnych badaniach udowodniłam, że wermikompost zmieszany z podłożami może mieć szerokie zastosowanie w uprawie warzyw pod osłonami, jako organiczny nawóz stymulujący wzrost roślin oraz chroniący je przed szkodliwymi czynnikami jakimi są organizmy chorobotwórcze, gdyż w uprawie szklarniowej ogórka istotnie ograniczał porażenie roślin przez *R. solani*, a sałaty przez *P. ultimum*. Wermikompost nie chronił jednak roślin przed *Sclerotinia sclerotiorum* - patogenem wytwarzającym przetrwalniki. Nie uzyskano również pozytywnych wyników w doświadczeniu polowym z fasolą szparagową.

Następnym zagadnieniem, którym zajmowałam się w latach 1995-1998, była biologiczna ochrona pomidorów przed mączniakiem prawdziwym za pomocą ekstraktów z odpadów browarnianych w ramach tematu statutowego pt. „Ochronne właściwości wysłodzin z ekstraktów browarnianych w stosunku do mączniaka prawdziwego pomidora” (kierownik tematu). Prace były realizowane w zespole przy współpracy z Pracownią Nawożenia i Pracownią Fitopatologii Instytutu Warzywnictwa. Celem badań było ograniczenie mączniaka prawdziwego wywoływanego przez *Oidium lycopersicum*, w uprawie szklarniowej pomidorów za pomocą oprysków wodnymi wyciągami z wysłodzin browarnianych. Badano wpływ wyciągów na porażenie roślin w zależności od czasu ekstrakcji i stężeń stosowanych preparatów. Oceniano także działanie ekstraktów na kiełkowanie zarodników patogena na liściach opryskiwanych pomidorów.

Wyciągi okazały się skutecznie ograniczać mączniaka tylko w początkowych fazach wzrostu roślin pomidora i rozwoju choroby. Obserwacje mikroskopowe grzybni i zarodników patogena na liściach opryskiwanych roślin wykazały, że ulegały one zniszczeniu, co wskazywało na kontaktowe działanie ekstraktów. Jednak zarodniki, które nie miały bezpośredniej styczności z ekstraktem były zdolne do dalszego rozwoju. Takie działanie ekstraktów było przyczyną zmniejszania się ich skuteczności wraz z wiekiem i

rozwojem roślin. Opryskiwanie młodych roślin, o niewielkiej jeszcze powierzchni liści i małym ich zagęszczeniu, było bardzo skuteczne, gdyż było możliwe pokrycie preparatem całej rośliny. W trakcie wzrostu roślin, ze względu na duże zagęszczenie liści, coraz trudniej było wykonać zabieg na tyle dokładnie, żeby opryskać wszystkie powierzchnie. Dlatego grzybnia i zarodniki, które nie miały bezpośredniego kontaktu z ekstraktem rozwijały się normalnie i były wtórnym źródłem rozprzestrzeniania choroby. Przy silnej infekcji roślin skuteczność ekstraktów była słaba. Wyniki tych badań zostały opisane w publikacjach Brzeski i in. (1995) oraz Szczech i in. (2000).

W marcu 1999 r. rozpoczęłam roczny staż naukowy w Narodowym Uniwersytecie Kyungpook w Taegu, w Korei Pd. Prace badawcze prowadziłam w Laboratorium Bakteriologii Roślin (Katedra Biologii Rolniczej) pod kierunkiem profesora Jae-Youl Uhm. Stypendium było finansowane przez Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF). W czasie pobytu opracowałam i wykonałam dwa projekty badawcze związane z możliwością zwalczania metodami biologicznymi grzyba patogenicznego *Phytophthora cactorum*. Patogen ten wywołuje zgniliznę korzeniową oraz pierścieniową jabłoni i stanowi poważne zagrożenie w uprawach sadowniczych na całym świecie, a jego zwalczanie jest bardzo trudne. Pierwszy z wykonywanych przeze mnie projektów dotyczył ograniczania *P. cactorum* w glebie oraz porażenia roślin przy użyciu kompostów produkowanych w kompostowniach na terenie Korei Pd. Doświadczenia prowadziłam w warunkach szklarniowych, gdzie oceniałam wpływ dodatku różnych kompostów do gleby piaszczystej na stopień porażenia siewek jabłoni. Ponadto badałam oddziaływanie kompostów na formowanie i przeżywalność spor patogena w podłożu oraz ogólny rozwój mikroflory. Liczebność żywotnych zoospor w glebie określałam za pomocą posiewów próbek zawiesiny glebowej na selektywne podłoże. Natomiast zagęszczenie form przetrwanych grzyba określałam za pomocą techniki SADAMCAP opracowanej przez Horner'a i Wicox'a (1995). Wyniki badań wykazały, że komposty ograniczały porażenie siewek jabłoni, jednak tylko dwa z nich istotnie obniżały populację *P. cactorum* w glebie. Ponadto stwierdziłam, że niektóre komposty, pomimo ograniczenia infekcji roślin, powodowały podwyższenie zagęszczenia jednostek propagacyjnych patogena. Była to ważna obserwacja, wskazująca na to, że zastosowanie pewnych kompostów może stwarzać zagrożenie wzrostu populacji *P. cactorum* w glebie i niebezpieczeństwo infekcji roślin.

Tematem kolejnego projektu było badanie możliwości ograniczenia populacji *P. cactorum* w glebie za pomocą odpowiednio dobranych roślin okrywowych. Niektóre rośliny posiadają zdolność do wydzielania związków biologicznie czynnych lub stymulacji rozwoju mikroflory antagonistycznej wobec organizmów chorobotwórczych. W pracy badałam działanie takich roślin okrywowych jak: wiechlina łąkowa (*Poa pratensis* L.), kupkówka pospolita (*Dactylis glomerata* L.), kostrzewa trzcinowa (*Festuca arundinacea* Schreb.), życica trwała (*Lolium perenne* L.) i koniczyna biała (*Trifolium repens* L.). Badania prowadziłam w komorze vegetacyjnej oraz w doświadczeniu kontenerowym w warunkach polowych, z ziemią sztucznie skażoną zawiesiną zoospor *P. cactorum*. Glebę obsiewałam nasionami wymienionych powyżej roślin i w comiesięcznych odstępach czasu badałam zagęszczenie form propagacyjnych patogena. Jako kontrola służyła gleba odchwaszczana podczas całego okresu eksperymentalnego. Wyniki wykazały, że w obu

układach doświadczalnych wiechlina łąkowa i kostrzewa trzciniowa istotnie zmniejszyły zagęszczenie populacji *P. cactorum* w glebie. Z kolei koniczyna biała powodowała znaczne podwyższenie zagęszczenia patogena. Rośliny okrywowe nie miały istotnego wpływu na ogólną liczebność badanych grup mikroorganizmów. Jednak z gleby obsianej wiechliną łąkową wyizolowano istotnie więcej bakterii antagonistycznych wobec *P. cactorum* niż z gleb w pozostałych wariantach. Wyniki tych badań opublikowano w *Vegetable Crops Research Bulletin* (Szczeczek i Uhm 2004).

W czasie pobytu w Korei Pd. uczestniczyłam w trzech konferencjach naukowych, organizowanych przez Koreańskie Towarzystwo Fitopatologiczne oraz Koreańskie Towarzystwo Entomologiczne. Na jednej z konferencji (konferencja fitopatologiczna w Andong, 29-30 października 1999) przedstawiłam poster prezentujący część wyników moich badań.

W latach 2001-2003 odbyłam dwuletni staż naukowy w Japonii, w Chemical Resources Laboratory w Tokyo Institute of Technology, pod kierunkiem profesora Makoto Shoda. Stypendium było finansowane przez JSPS Postdoctoral Fellowship for Foreign Researchers. Tematem moich badań była ocena możliwości wykorzystania antagonistycznej bakterii *Bacillus subtilis* izolat RB14-C w biologicznej ochronie roślin. We wcześniejszych badaniach prowadzonych przez Asakę i Shodę (1996) stwierdzono, że bakteria ta jest producentem antybiotyków iturinu A i surfaktyny oraz ma zdolność do ograniczania rizoktoniozy pomidora. Celem mojej pracy było określenie optymalnej techniki aplikacji tej bakterii oraz określenie zdolności izolatu RB14-C do kolonizacji strefy korzeniowej testowych roślin pomidora w zależności od zastosowanej metody inokulacji. Badałam również wpływ RB14-C na inne mikroorganizmy zasiedlające glebę. Obszerniejszy opis tych badań jest zamieszczony w części „Syntetyczne omówienie rozprawy habilitacyjnej” ze względu na to, iż prace te włączyłam do mojej rozprawy habilitacyjnej.

W czasie badań nad *B. subtilis* RB14-C wyizolowałam intensywnie produkujący antybiotyki szczep bakterii oznaczony jako BY, który został zaklasyfikowany do gatunku *Burkholderia cepacia*. Szczep ten zastosowałam w kombinacji z RB14-C w celu zwiększenia efektywności działania bakterii w ochronie pomidorów przed *R. solani*. Badania wykazały, że efekt ochronny po zastosowaniu obu bakterii był ściśle zależny od metody ich aplikacji. Wynikiem tych prac są trzy publikacje w indeksowanych czasopismach: *Canadian Journal of Microbiology* i *Journal of Phytopathology* (Szczeczek i Shoda 2004, 2005 i 2006). Prace zostały włączone do mojej rozprawy habilitacyjnej.

Od powrotu z Japonii kontynuowałam badania nad zastosowaniem kombinacji mikroorganizmów w celu opracowania biologicznych preparatów efektywnych w uprawach warzyw. Część z tych badań została ujęta w mojej pracy habilitacyjnej.

Stosowanie pojedynczych szczepów aktywnych mikroorganizmów często nie daje satysfakcjonujących rezultatów ze względu na niską skuteczność i małą stabilność działania w zróżnicowanych warunkach środowiska naturalnego. Kombinacja kilku mikroorganizmów o różnych mechanizmach działania może poprawić ten wynik. Aktywność jednych mikroorganizmów może kompensować brak działania innych w zależności od zaistniałych warunków. Ponadto grupa mikroorganizmów może chronić

rośliny wobec szerszej gamy patogenów niż pojedynczy szczep (praca przeglądowa, Szczech 2008).

W ramach prac statutowych (temat 15.4) wyizolowałam szereg bakterii wykazujących antagonistyczne właściwości wobec grzybów chorobotwórczych lub wspomagających wzrost roślin. Bakterie izolowałam ze strefy korzeniowej roślin warzywnych oraz z supresyjnych podłoży z dodatkiem wermikompostu. Powstała w ten sposób kolekcja aktywnych organizmów o różnych mechanizmach działania. Mikroorganizmy te zostały użyte w dalszych badaniach do komponowania mieszanek zastosowanych w doświadczeniach szklarniowych i polowych, wykonywanych w ramach tematu badawczego 15.2 pt. „Wykorzystanie bakterii PGPR do produkcji rozsady o zwiększonej odporności na choroby” (2005 – 2007, kierownik tematu) oraz grantu KBN pt. „Biologiczna ochrona roślin warzywnych przy użyciu mieszanek aktywnych mikroorganizmów” (projekt badawczy własny MNiSzW nr 2P06R08430, lata realizacji 2006-2009, kierownik projektu i główny wykonawca). Interdyscyplinarne badania były prowadzone z udziałem specjalistów z Zakładu Agrotechniki, Zakładu Przechowalnictwa i Przetwórstwa oraz Zakładu Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Instytutu Warzywnictwa. Celem badań było opracowanie mieszanek aktywnych mikroorganizmów o wysokiej skuteczności i stabilności działania w ochronie roślin warzywnych przed kompleksem patogenów grzybowych. Planowane było poznanie mechanizmów działania mieszanek, a także ich wpływ na populacje patogenów w strefie korzeniowej roślin.

Badania te zostały opisane dokładniej w części „Syntetyczne omówienie rozprawy habilitacyjnej”. W skrócie, w doświadczeniach szklarniowych i polowych badano oddziaływanie mieszanek i pojedynczych izolatów na wzrost oraz plonowanie roślin pomidora ogórka i sałaty. Skuteczność mikroorganizmów była badana wobec kompleksu patogenów z rodzaju *Rhizoctonia* sp. i *Fusarium* sp. Oceniano wpływ pojedynczych izolatów i mieszanek na zagęszczenie patogenów w ryzosferze roślin. Prowadzono badania histologiczne dotyczące zdolności do budowania ochronnych barier strukturalnych w roślinach oraz biochemiczne, polegające na ocenie wrażliwości roślin na infekcję na podstawie poziomu generowania nadtlenu wodoru.

W doświadczeniach szklarniowych z roślinami pomidora zastosowanie aktywnych bakterii oddziaływało pozytywnie na wzrost roślin oraz na ich plonowanie. W podłożu nie skażonym patogenami, niektóre mieszanki powodowały nawet ok. 30% wzrost plonu pomidorów w porównaniu do kontroli. Pojedyncze izolaty nie były tak efektywne. Pozytywny wpływ na plonowanie roślin pomidora odnotowano również w podłożach skażonych *F. oxysporum*. Było to związane głównie z opóźnieniem wystąpienia objawów fuzaryjnego wędnięcia. W uprawie gruntowej pomidora efekt działania bakterii był słabszy (Szczech i Dyśko 2008). Zaprawianie nasion oraz inokulacja korzeni roślin pozytywnie wpływały również na plonowanie ogórków. W podłożu skażonym wszystkie mieszanki mikroorganizmów działały ochronnie, a plon był porównywalny do uzyskiwanego w kontroli.

Badane zespoły mikroorganizmów tylko w małym stopniu chroniły siewki roślin testowych przed chorobami zgorzelowymi. Jednak inokulacja nasion wpływała korzystnie na wzrost rozsady. Stwierdzono, że mikroorganizmy, a szczególnie ich mieszanki,

powodują lepszy rozwój systemu korzeniowego roślin. Zastosowane mikroorganizmy nie miały istotnego wpływu na zasiedlenie korzeni pomidora i ogórka przez patogeny. Stwierdzono jednak wyraźne reakcje nadwrażliwości na korzeniach inokulowanych roślin oraz silną lignifikację tkanek, szczególnie w wariantach, gdzie rośliny traktowano mieszankami. Nastąpił również wyraźny wzrost zawartości związków fenolowych w korzeniach (Szczech i Dyki 2007, Szczech i in. 2009). Mikroorganizmy, wskazujące najlepsze predyspozycje do użycia w mieszankach były klasyfikowane do gatunku na podstawie testów biochemicznych i molekularnych.

W uprawie ekologicznej i konwencjonalnej sałaty kruchej, pozytywne działanie mieszanek bakterii potwierdzono na etapie produkcji rozsady. Uzyskano lepsze wschody i istotnie większą biomasę młodych roślin traktowanych bakteriami. Jednak po posadzeniu traktowanej bakteriami rozsady do gruntu w polu ten efekt zanikał. Zarówno masa główek jak i plon ogólny, a także zdrowotność i jakość handlowa sałaty traktowanej bakteriami nie różniła się istotnie w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Analizy chemiczne i biochemiczne materiału roślinnego z uprawy ekologicznej wykazały pogorszenie cech jakościowych sałaty traktowanej bakteriami. Przy tendencji do wzrostu zawartości azotu ogólnego w tkankach inokulowanych roślin, stwierdzono obniżenie koncentracji żelaza. Bakterie powodowały również zmniejszenie suchej masy roślin i zawartości witaminy C (Szczech i in. 2016). W przypadku uprawy gruntowej ogórków, gdzie bakterie aplikowano kilkukrotnie w czasie wegetacji, stwierdzono wyraźne opóźnienie oraz ograniczenie nasilenia wystąpienia mączniaka, co miało istotny wpływ na wczesny plon ogórka (Szczech i in. 2016).

W ramach tematu 16.5, realizowanego przy współpracy z Pracownią Przechowalnictwa i Fizjologii Pozbiorczej w latach 2006-2008, badalam również możliwości wykorzystania bakterii antagonistycznych do zahamowania rozwoju chorób infekcyjnych w czasie przechowywania marchwi. Do badań wybrano szczepy bakterii posiadające zdolność do hamowania wzrostu grzybni patogenów *Botrytis cinerea* i *Sclerotinia sclerotiorum*. Korzenie marchwi moczono w zawiesinach komórek bakterii lub ich mieszanek i przechowywano w temp. 5 °C przez 16 tygodni w woreczkach z folii perforowanej. Aby wywołać infekcję przez *B. cinerea* lub *S. sclerotiorum* do woreczków wkładano fragment grzybni patogenów. W doświadczeniach tych nie uzyskano efektu ochronnego.

Opisane powyżej rezultaty badań wskazują, że w przypadku stosowania bakterii w celu poprawy wzrostu, plonowania i zdrowotności roślin najlepsze efekty uzyskiwane były w warunkach szklarniowych, szczególnie we wczesnych etapach wzrostu roślin. Wyniki te sugerują, że najbardziej efektywnie „szczepionki” bakteryjne mogą być wykorzystywane przy produkcji i ochronie rozsad oraz w uprawie roślin szklarniowych.

W dotychczasowych eksperymentach z mikroorganizmami, do inokulacji roślin stosowana była wodna zawiesina komórek. Ten system aplikacji nie nadaje się jednak do użycia w komercyjnej uprawie roślin, m.in. ze względu na to, że: (i) producent nie jest w stanie wyprodukować tego typu inokulum, (ii) zawiesiny komórek nie są formą przystosowaną do handlu i przechowywania. Dlatego od 2009 r. prowadzę badania, których celem jest wytworzenie komercyjnej formy preparatu zawierającego

mikroorganizmy, przystosowanej do aplikacji w polu i długotrwałego przechowywania. Pierwsze badania w tym kierunku były wykonane w ramach projektu badawczego nr NN310119037 pt. "Opracowanie metody formulacji aktywnych mikroorganizmów do zastosowania w biologicznej ochronie roślin" (lata realizacji 2009-2013, kierownik projektu i główny wykonawca). Opracowywana metoda formulacji pożytecznych bakterii i grzybów polegała na wytwarzaniu mikrokapsuł zawierających we wnętrzu żywe komórki mikroorganizmów. Jako główny materiał nośnikowy został zastosowany alginian sodu, który ma zapewnić stabilizację oraz żywotność mikroorganizmów podczas przechowywania i aplikacji. Przy produkcji mikrokapsuł były również używane substancje wspomagające, których zadaniem było zwiększenie przeżywalności mikroorganizmów w trakcie procesu kapsulacji. Spośród tych materiałów najlepszy efekt uzyskano z użyciem torfu. Stwierdzono, również w mikrokapsułach lepiej przechowują się zarodniki grzybów niż komórki bakterii. Szerszy opis tych badań przedstawiono w części „Syntetyczne omówienie rozprawy habilitacyjnej”.

Od 2005 r. rozpoczęłam badania związane działaniem grzybów z rodzaju *Trichoderma* spp. Moją pracą z tymi grzybami zapoczątkował temat pt.: „Epidemiologia, identyfikacja, etiologia i zwalczanie grzybów z rodzaju *Trichoderma* w uprawie pieczarki” (temat 11.3, lata realizacji 2005-2007, kontynuowany do 2009 r.), w którym byłam wykonawcą (współpraca z Pracownią Grzybów Uprawnych i Pracownią Hodowli i Biotechnologii w Zakładzie Genetyki). Moim zadaniem było zgromadzenie kolekcji oraz klasyfikacja grzybów z rodzaju *Trichoderma*, izolowanych z upraw pieczarek. Badania były prowadzone pod kątem wyodrębnienia oraz scharakteryzowania grzybów *Trichoderma* wywołujących chorobę zwaną „zieloną pleśnią”, która powodowała poważne straty w pieczarkarniach. Pozyskane w terenie izolaty klasyfikowałam do gatunku na podstawie rozwoju kolonii grzybów na specjalnie dobranych pożywkach agarowych oraz przy pomocy mikroskopowych obserwacji cech morfologicznych z wykorzystaniem dostępnych kluczy do identyfikacji grzybów *Trichoderma*. W ten sposób skatalogowanych zostało ponad 350 izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Kilkadziesiąt izolatów z kolekcji, zaklasyfikowałam do gatunku *T. aggressivum*. Według literatury gatunek ten uznano za sprawcę „zielonej pleśni” w uprawach grzybów. Wybrane izolaty poddano dalszym analizom, m.in. potwierdzono ich przynależność gatunkową do *T. aggressivum* f. *europeanum* za pomocą metod molekularnych. Następnym etapem mojej pracy było porównanie cech szczepów *T. aggressivum* występujących na terenie Polski ze szczepami wzorcowymi z terenów Europy zachodniej, gdyż wstępne obserwacje wskazywały, że polskie biotypy tego grzyba mogą być odmienne od izolowanych w innych krajach. Wykonałam szczegółowe pomiary cech morfologicznych grzybni oraz cech fenotypowych przy użyciu mikroskopu świetlnego i programu do mikrofotografii. Stwierdziłam, że badane izolaty w wielu przypadkach różniły się pod względem cech morfologicznych kolonii od szczepów wzorcowych. Natomiast pomiary elementów grzybni pod mikroskopem pokazały, że zarodniki izolatów krajowych generalnie odznaczały się mniejszym stosunkiem długości do szerokości niż wzorcowe, co wskazuje na kształt bardziej zbliżony do kulistego. Prowadzono również analizy zróżnicowania genetycznego grzybów z gatunku *T. aggressivum* przy zastosowaniu metody PCR-RAPD.

W trakcie badań brałam również udział w ocenie patogeniczności wybranych izolatów *T. aggressivum*, których działanie porównywano z wzorcowymi izolatami *T. aggressivum* f. *europaeum* oraz *T. aggressivum* f. *aggressivum*, a także izolatami *Trichoderma* zaklasyfikowanymi do innych gatunków, np. *T. atroviride* i *T. harzianum*. Stwierdzona została duża szkodliwość rodzimych izolatów *T. aggressivum*, które hamowały rozwój pieczarek silniej niż szczepy wzorcowe. Szczepy z gatunków *T. atroviride* i *T. harzianum* nie wykazywały agresywności w stosunku do grzybni pieczarki. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Vegetable Crops Research Bulletin* (Szczech i in. 2008) oraz *HortScience* (Staniaszek i in. 2010).

Powstała, w związku z badaniami nad *T. aggressivum*, kolekcja *Trichoderma*, była podstawą do dalszych badań nad tym rodzajem grzybów. Możliwość wykorzystania grzybów z rodzaju *Trichoderma* jako mikroorganizmów wspomagających wzrost i chroniących rośliny przed czynnikami stresowymi, głównie organizmami chorobotwórczymi, budzi duże zainteresowanie wśród naukowców, rolników i firm wytwarzających środki do produkcji rolniczej. Mikroorganizmy te znajdują zastosowanie nie tylko w rolnictwie, ale także w przemyśle spożywczym, tekstylnym, papierniczym itp. Grzyby *Trichoderma*, niezwykle powszechne w naturze, są dobrymi kolonizatorami bardzo zróżnicowanych środowisk i posiadają zdolności do korzystnego oddziaływania na wzrost i kondycje roślin uprawnych, czego dowodem są bardzo liczne doniesienia w literaturze. Potencjał tych grzybów, jako czynników w biologicznej ochronie roślin, został opisany już w latach 30-tych XX-tego wieku. Ich aktywność często zależy od kilku mechanizmów, które działają synergistycznie lub mogą być uruchamiane w różnych warunkach. Według doniesień ok. 90% antagonistycznych grzybów używanych obecnie w rolnictwie należy do rodzaju *Trichoderma*. Na polskim rynku również rośnie zainteresowanie tego typu produktami. Dlatego opracowano interdyscyplinarny projekt mający na celu przygotowanie preparatów na bazie rodzimych szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma*, przystosowanych do polskich warunków, które będą mogły być stosowane integrowanej uprawie roślin warzywnych, jako alternatywa dla wycofywanych środków chemicznych.

We wrześniu 2009 r. podpisano umowę o dofinansowaniu projektu badawczego pt. „Polskie szczepy *Trichoderma* w ochronie roślin i zagospodarowaniu odpadów organicznych”, nr UDA-POIG.01.03.01-00-129/09-05, którego byłam kierownikiem. Projekt był współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Działania 1.3 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.3.1. Lata realizacji 2009-2015. Projekt był realizowany w latach 2010-2015 w konsorcjum z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu, Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu i Uniwersytetem Łódzkim. W projekcie było zatrudnionych ok. 70 osób, w tym 30 pracowników naukowych oraz liczni studenci.

Celem projektu było wytworzenie biopreparatów zawierających zespoły wyselekcjonowanych szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma* do kompleksowego wykorzystania w integrowanych uprawach warzyw, dla poprawy ich wzrostu i zdrowotności. Kolejnym celem była utylizacja odpadów organicznych z gospodarstw

rolnych oraz zakładów przemysłu przetwórstwa rolno-spożywczego, gdyż preparaty z grzybami *Trichoderma* mają być produkowane na bazie organicznych odpadów.

W projekcie zaplanowano 12 zadań, w tym 11 badawczych. Zadania te obejmowały m.in.: selekcję izolatów *Trichoderma*, opracowanie technologii ich namnażania na odpowiednio skomponowanych materiałach organicznych, opracowanie technologii masowego wytwarzania zarodników konidialnych *Trichoderma*, ustalenie metod aplikacji w różnych uprawach roślin warzywnych w doświadczeniach polowych, ocenę wpływu preparatów z *Trichoderma* na: środowisko glebowe, zdolność pobierania składników pokarmowych przez rośliny, porażenie roślin przez patogeny, wielkość i jakość uzyskanych plonów oraz ich cechy jakościowe i trwałość pozbiorną, badanie populacji *Trichoderma* po wprowadzeniu preparatów do środowiska glebowego, opracowanie technologii kompostowania z udziałem wyselekcjonowanych grzybów *Trichoderma*.

Oprócz zarządzania i ogólnej koordynacji prac badawczych w projekcie w latach 2010-2015, w 2010 i 2011 r. byłam kierownikiem zadania ZB3, które dotyczyło typowania szczepów *Trichoderma* o określonych właściwościach biologicznych do produkcji biomasy i zastosowania w integrowanej produkcji warzyw. Badania zaplanowane w zadaniu były prowadzone w Pracowni Mikrobiologii Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach, w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Katedrze Fizjologii i Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego. Celem zadania była selekcja szczepów *Trichoderma* pod względem obecności cech wskazujących na korzystne działanie na wzrost i zdrowotność roślin warzywnych, zdolność do kolonizacji strefy korzeniowej oraz rozkładu materiałów organicznych. W pierwszym etapie wybrano do badań izolaty *Trichoderma* z kolekcji Pracowni Mikrobiologii, opisanej powyżej, a także prowadzono izolacje grzybów z gleb uprawnych i ryzosfery roślin. Selekcję aktywnych izolatów prowadzono za pomocą innowacyjnego, opracowanego dla potrzeb projektu, systemu selekcji A.M.O.R. (skrót od Antagonizm, Mykopasożytnictwo, Odporność, wpływ na Roślinę). System A.M.O.R. został przeze mnie opracowany w oparciu o dotychczasową światową wiedzę z zakresu etiologii, metabolizmu, genetyki oraz właściwości biologicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma*. W systemie A.M.O.R. zaplanowałam określony układ szybkich testów laboratoryjnych i biochemicznych mający na celu ocenę m.in. właściwości antybiotycznych, zdolności do mykopasożytnictwa, do produkcji enzymów litycznych, indukcji odporności w roślinach, kolonizacji korzeni, stymulacji kiełkowania i wzrostu roślin. Dzięki systemowi A.M.O.R., w krótkim czasie, możliwe było poznanie mechanizmów działania ponad 100 izolatów *Trichoderma* spp. System A.M.O.R. został zgłoszony do opatentowania: zgłoszenie nr P-397659 pt. „Sposób selekcji aktywnych izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma*”, autorzy M. Szczech, D. Witkowska, U. Małolepsza.

Wszystkie badane szczepy zostały sklasyfikowane do gatunku na podstawie badań molekularnych, a ich sekwencje zostały zdeponowane w GenBank (Oskiera i in. 2015). Opracowano markery molekularne, które pozwoliły na określenie dynamiki rozwoju wprowadzonych do środowiska grzybów oraz ich wpływ na inne grupy mikroorganizmów w glebie. Równoległe z selekcją i identyfikacją *Trichoderma* pracowano nad doбором odpadowych materiałów do produkcji nośników dla tych grzybów. Opracowano technikę

wytwarzania nośników organicznych oraz ich inokulacji zarodnikami *Trichoderma* w celu namnażania tych grzybów do doglebowego stosowania w warunkach polowych. Opracowano także technikę produkcji i utrwalania zarodników konidialnych do zastosowania jako zaprawy nasienne, do opryskiwania i podlewania roślin. Badano żywotność utrwalonych *Trichoderma* podczas długotrwałego przechowywania w różnych temperaturach. Badane izolaty *Trichoderma* testowano również pod względem odporności na powszechnie stosowane w rolnictwie fungicydy. Stwierdzono, że grzyby te wykazują odporność na azoksystrobinę i propamokarb+fosetyl glinu.

Na podstawie danych opracowanych tabelarycznie w systemie A.M.O.R. zostało wyłonione kilkanaście szczepów *Trichoderma* spp., których działanie było badane w warunkach polowych, w ciągu trzech sezonów wegetacyjnych (2012-2014). Przeprowadzono doświadczenia w uprawie gruntowej sałaty, marchwi, cebuli, ogórków i ziemniaków, w uprawie gruntowej papryki w tunelach oraz w uprawie bezglebowej pomidorów w szklarni. Doświadczenia prowadzono na polach doświadczalnych Instytutu Ogrodnictwa, a także jako eksperymenty produkcyjne, w komercyjnej uprawie u indywidualnych producentów. Oceniono działanie opracowanych preparatów z wybranymi szczepami *Trichoderma* na plonowanie oraz parametry wzrostowe roślin. Monitorowano stopień porażenia roślin przez patogeny najczęściej występujące w danych uprawach. Badano stan odżywienia roślin oraz zawartości składników pokarmowych w glebie. Oceniano wartości odżywcze i profil sensoryczny traktowanych preparatami warzyw, a także sprawdzano ich przydatność do przechowywania. Grzyby *Trichoderma* zastosowano również podczas kompostowania resztek posprzętnych z produkcji rolniczej. W doświadczeniach polowych badano wpływ wzbogaconych kompostów na wzrost i plonowanie roślin uprawnych oraz stan sanitarny gleby.

Na podstawie kilkuletnich doświadczeń polowych potwierdzono korzystne działanie kilku z wyselekcjonowanych do doświadczeń polowych szczepów *Trichoderma* w uprawie roślin warzywnych. Kompleksowe badania cech wzrostowych i jakościowych roślin wyraźnie wskazują na pozytywne działanie preparatów szczególnie w uprawie warzyw z rodziny psiankowatych: pomidor, papryka i ziemniak. Stwierdzono nie tylko wzrost plonowania tych roślin, ale przede wszystkim poprawę struktury plonu w kierunku zwiększenia udziału plonu I klasy w plonie ogólnym. W owocach papryki i ziemniaka stwierdzono wzrost zawartości witaminy C, a w owocach pomidorów istotny wzrost zawartości likopenu. Dobre wyniki po zastosowaniu preparatów z *Trichoderma* uzyskiwano w uprawie sałaty, gdzie obserwowano przyspieszenie zawiązywania główek i zwiększenie plonu. W uprawie ziemniaków obserwowano opóźnienie i ograniczenie rozwoju zarazy ziemniaczanej. Ochronne właściwości preparaty z *Trichoderma* wykazywały również w uprawie marchwi, gdzie ograniczały zgorzel siewek i porażenie roślin przez grzyby z rodzaju *Alternaria*. Z kolei w uprawie ogórków, zaprawianie nasion *T. atroviride* TRS25 istotnie ograniczało nasilenie mączniaka na roślinach. Wnikliwie przeprowadzone badania biochemiczne wskaźników odporności w roślinach ogórka i pomidora wykazały zdolność niektórych z użytych w badaniach szczepów *Trichoderma* do wzbudzania reakcji odpornościowych w tych roślinach, których efektem było ograniczone porażenie przez grzyby patogeniczne (Małolepsza i in. 2016, Szczech i in. 2017, Nawrocka

i in. 2017). Na podstawie tych badań zasugerowano, że w grzyby *Trichoderma* posiadają zdolność do wywoływania odporności mieszanej w roślinach indukowanej odporności systemicznej i systemicznej odporności nabytej (ISR/SAR), łączącej szlaki aktywacyjne obu rodzajów odporności. Taki typ odporności indukowanej przez *Trichoderma* określany jest jako TISR (Nawrocka i in. 2018).

W ramach projektu opracowano skład preparatów z wyselekcjonowanymi szczepami *Trichoderma* i technologię ich produkcji, włączając w to nową technologię jednorazowej aplikacji do zastosowania w uprawach szklarniowych. Część opracowanych technologii została opatentowana (Witkowska i in. 2017, tytuł patentu: „Biopreparat do zaprawiania nasion roślin warzywnych, sposób wytwarzania biopreparatu oraz kompozycja”; Smolińska i in. 2017, tytuł patentu: „Podłoże, sposób przygotowania podłoża oraz zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma* i ograniczania populacji grzybów patogenicznych *Sclerotinia sclerotiorum*”; Smolińska i in. 2017, tytuł patentu: „Podłoże do uprawy roślin, sposób przygotowania podłoża oraz zastosowanie podłoża do namnażania grzyba z rodzaju *Trichoderma*”).

Obecnie prowadzone są działania w kierunku wdrażania i komercjalizacji opracowanych preparatów i technologii. Do tej pory przeprowadzono 8 wdrożeń i sprzedano licencje na wykorzystanie szczepu *Trichoderma*. W przygotowaniu są kolejne wdrożenia i prowadzone są rozmowy dotyczące zakresu umów na zakup szczepów grzybów i technologii ich produkcji. Wyniki badań realizowanych w projekcie były prezentowane na licznych konferencjach naukowych, a także w publikacjach naukowych i popularnonaukowych.

W trakcie realizacji projektu koordynowałam i czuwałam nad właściwym wykonaniem zaplanowanych prac. Razem z zespołem pracowników naukowych ustalaliśmy merytoryczny zakres prowadzonych doświadczeń oraz dyskutowaliśmy nad uzyskanymi wynikami w celu ustalania kolejnych kierunków badań. Wykonywałam również prace związane z administracją projektu i czuwałam nad właściwym wykorzystaniem funduszy zaplanowanych w harmonogramie rzeczowo-finansowym. Byłam również odpowiedzialna za organizowanie spotkań wykonawców projektu, konferencji naukowych (zorganizowano cztery konferencje naukowe związane z projektem, podczas których pełniłam funkcję przewodniczącej komitetu organizacyjnego) oraz za kontakty z przedsiębiorcami. Byłam także opiekunem studentów odbywających staże w ramach projektu oraz promotorem pracy magisterskiej, a w kolejnych latach opiekunem i promotorem pomocniczym prac doktorskich.

Kolejnym zagadnieniem, którym zajmuję się od 2009 r., jest badanie potencjalnych skażeń mikrobiologicznych w warzywach przeznaczonych do konsumpcji. Badania w tym zakresie prowadziłam i prowadzę w ramach kilku projektów. Pierwszym z nich był temat PW4.7 w Programie Wieloletnim, finansowany przez MRiRW, pt. „Monitoring skażeń mikrobiologicznych i mikotoksycznych warzyw produkowanych w gospodarstwach ekologicznych” (lata realizacji 2009-2014). W programie tym byłam kierownikiem zadania PW 4.7. Celem prac był monitoring skażeń mikrobiologicznych żywności produkowanej w gospodarstwach ekologicznych w porównaniu do żywności produkowanej w uprawach konwencjonalnych. Warzywa uzyskane z gospodarstw ekologicznych powszechnie

uznawane są za zdrowsze niż te wyprodukowane w gospodarstwach konwencjonalnych. Jednak ze względu na system uprawy tzn. używanie nawozów organicznych i brak stosowania chemicznej ochrony, istnieje możliwość większego skażenia produktów roślinnych przez mikroorganizmy chorobotwórcze oraz grzyby wytwarzające mykotoksyny.

W programie przeprowadzono analizy kilkuset prób warzyw pochodzących z gospodarstw ekologicznych i konwencjonalnych, położonych na terenie całej Polski, wyznaczonych przez Ośrodki Doradztwa Rolniczego. Przeprowadzono monitoring skażeń warzyw w 85 gospodarstwach ekologicznych i 93 gospodarstwach konwencjonalnych. Próby materiału roślinnego do badań były pobierane w okresie wiosennym (sałata, rzodkiewka) oraz jesienią (kukurydza, marchew i burak ćwikłowy). Materiał roślinny był analizowany pod względem liczebności drożdży i pleśni, bakterii (ogólna liczebność), bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, z grupy coli, a także bakterii *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. i *Listeria monocytogenes*. Do określania liczebności wymienionych grup mikroorganizmów były stosowane metody zgodne z zaleceniami zamieszczonymi w Polskich Normach. W korzeniach marchwi, buraków i ziarnie kukurydzy określano zawartości mykotoksyn: aflatoksyny ogółem, zearalenonu i ochratoksyny A. Te analizy były wykonywane przy współpracy z Pracownią Przetwórstwa i Oceny Jakości Warzyw. Podczas pobierania prób, w każdym z gospodarstw była przeprowadzana opracowana przez mnie ankieta, w której odnotowywano informacje na temat powierzchni upraw, rodzaju uprawianych warzyw, a przede wszystkim stosowanego nawożenia, ochrony i płodozmianu.

W żadnej z badanych prób roślin nie stwierdzono obecności bakterii *Salmonella* i *L. monocytogenes*. W próbach warzyw ekologicznych wykrywano istotnie więcej bakterii *E. coli* niż w warzywach z upraw konwencjonalnych. Najbardziej na skażenia narażone były warzywa badane w okresie wiosennym, o krótkiej wegetacji, głównie sałata. Na podstawie analiz statystycznych stwierdzono, że większe skażenie warzyw ekologicznych tymi bakteriami jest związane z niewłaściwym stosowaniem nawożenia organicznego, opartego na nawozach naturalnych. Zazwyczaj przyczyną podwyższonej liczebności *E. coli* było stosowanie nieprzekompostowanych oborników, w niewłaściwych terminach, lub pogłówne dokarmienie roślin roztworami zawierającymi odchody zwierząt. Najczęściej *E. coli* wykrywano w uprawach sałaty, buraka i marchwi. W uprawie sałaty było najwięcej prób, gdzie liczebność *E. coli* była znacznie wyższa niż dopuszczalne normy. Drugim w kolejności gatunkiem zagrożonym skażeniami była marchew. W materiale roślinnym z upraw konwencjonalnych generalnie poziom *E. coli* był niski lub bakterie te nie były wykrywane. Dla pozostałych grup bakterii, z wyjątkiem *Enterobacteriaceae*, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy obydwojoma systemami uprawy.

W próbach warzyw korzeniowych (marchew, burak ćwikłowy) badano obecność wybranych mykotoksyn. Analizując wyniki uzyskane we wszystkich latach badań stwierdzono, że w świeżym materiale roślinnym zawartość mykotoksyn była niska. Nie było różnic pomiędzy obydwojoma systemami uprawy. Koncentracja aflatoksyn i ochratoksyny A wzrastała kilkukrotnie po sześciu miesiącach przechowywania w temperaturze ok. 0°C. Więcej miko toksyn kumulowało się w korzeniach buraka niż w

marchwi, ale ilości te nie przekraczały dopuszczalnych norm. Po przechowywaniu również nie było różnic pomiędzy próbami z upraw ekologicznych i konwencjonalnych. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w Journal of Food Microbiology (Szezech i in. 2018).

Badania dotyczące potencjalnych skażeń mikrobiologicznych w produktach roślinnych (szczególnie typu ready-to-eat) prowadziłam również w ramach tematu W10.2 pt. „Wpływ pozbiornego traktowania gorącą wodą na trwałość w czasie krótkotrwałego składowania oraz na wartość odżywczą papryki krojonej” (lata realizacji 2010-2012, wykonawca) oraz w projekcie QAFETY, realizowanym w ramach 7 Programu Ramowego Unii Europejskiej, temat pt. ”Comprehensive approach to enhance quality and safety of ready-to-eat fresh products: Effect of postharvest heat treatment on nutritive and sensory quality and on safety of fresh cut vegetable” (lata realizacji 2012-2014, wykonawca w projekcie).

Popularność spożycia warzyw minimalnie przetworzonych wzrasta na całym świecie. Jednocześnie jednak rośnie liczba odnotowanych przypadków zatruc pokarmowych związanych ze spożyciem świeżych produktów (Castro-Ibáñez i in. 2016). Najczęściej tego typu zatrucia są związane z obecnością bakterii *Salmonella*, *Escherichia coli* lub *Listeria monocytogenes*, które mogą przeżyć na warzywach i owocach przez dłuższy czas nawet w niskich temperaturach, tworząc skupiska ściśle przylegające do powierzchni organów roślin zwane biofilmem, a także mogą przenikać do wewnętrznych tkanek roślin (Ryser i in. 2009, Olaimat i Holley 2012). Takie bakterie mogą być trudne do usunięcia nawet przy użyciu środków odkażających. Ponadto, przygotowanie do sprzedaży świeżych warzyw wymaga kilku etapów technologicznych, co zwiększa ryzyko krzyżowych zanieczyszczeń. Największe ryzyko jest związane z warzywami, które nie są poddawane żadnym procesom prowadzącym do inaktywacji mikroorganizmów, jak gotowanie czy pasteryzacja. Dlatego intensywnie poszukiwane są metody ograniczania rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych oraz powodujących szybkie psucie tych produktów.

Zarówno w projekcie QAFETY jak i w temacie W10.2 badano możliwość przedłużenia trwałości warzyw i owoców minimalnie przetworzonych (papryka krojona, rukola, krojona kapusta pekińska) za pomocą płukania w wodzie o podwyższonej temperaturze. Traktowanie gorącą wodą lub para wodną (HWT) jest jedną z fizycznych metod przedłużania trwałości przechowywanych warzyw (Przerwa 2015). Celem krótkotrwałego płukania w wodzie o podwyższonej temperaturze jest ograniczenie liczebności mikroorganizmów na powierzchni materiału roślinnego i zabezpieczenie przed przebarwieniami oraz innymi niekorzystnymi zmianami zachodzącymi w materiale roślinnym podczas przechowywania. Oprócz oceny trwałości w czasie krótkotrwałego składowania warzyw krojonych, prowadzono także ocenę ich wartości odżywczych i sensorycznych. Moim zadaniem była ocena tempa rozwoju mikroorganizmów podczas przechowywania traktowanych warzyw oraz ich jakości sanitarnej.

Traktowanie warzyw minimalnie przetworzonych gorącą wodą prowadzone było przez zanurzenie porcji warzyw w kąpeli wodnej o określonej temperaturze (w przedziale 38-60°C) przez określony czas w granicach kilku sekund. Po potraktowaniu warzywa były schładzane do jednakowej temperatury (5-6°C) i przechowywane w temperaturze 0°C, 5°C

lub 18-20° od dwóch do dziesięciu dni, w zależności od gatunku badanej rośliny. Analizy mikrobiologiczne wykonywano po 24 godzinach, po potraktowaniu gorącą wodą, a następnie po przechowywaniu produktów roślinnych. Jako kontrola służyły rośliny nie krojone oraz krojone, nie płukane w wodzie. Analizowano liczebność wybranych grup mikroorganizmów, świadczących o stanie sanitarnym badanych prób warzyw krojonych: drożdży i pleśni, bakterii mezofilnych, *Lactobacillus*, fluoryzujących bakterie *Pseudomonas*, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, bakterii z grupy coli, *Escherichia coli*. Badano również obecność chorobotwórczych bakterii *Salmonella* oraz *Listeria monocytogenes*. Do określenia liczebności wymienionych grup mikroorganizmów stosowano metody zgodne z zaleceniami zamieszczonymi w Polskich Normach.

Stwierdzono, iż pomimo pozytywnego wpływu traktowania niektórych warzyw gorącą wodą (kapusta pekińska, papryka) na ich jakość oraz wartości sensoryczne podczas krótkotrwałego przechowywania, to zabieg ten nie wpływał istotnie na zmniejszenie ilości mikroorganizmów. Już samo krojenie warzyw miało wpływ na zwiększenie liczebności mikroorganizmów w przechowywanych próbach. W przypadku rukoli płukanie w podgrzanej wodzie powodowało wzrost liczebności bakterii i grzybów. Niekorzystny wpływ krojenia i płukania, związany z gwałtownym wzrostem liczebności mikroorganizmów, był najbardziej widoczny w próbach przechowywanych w temperaturze 18 °C. Natomiast temperatura 0 °C spowalniała rozwój mikroorganizmów. W żadnej z badanych prób warzyw i owoców nie wykryto chorobotwórczych bakterii *Listeria monocytogenes* i *Salmonella*, a także bakterii *E. coli*. Natomiast w kapuście pekińskiej krojenie i płukanie roślin powodowało istotny wzrost zagęszczenia bakterii z grupy coli.

Wyniki tych badań wskazują, że w przypadku warzyw krojonych, płukanie w wodzie nie zabezpiecza tych produktów przed nadmiernym rozwojem mikroorganizmów podczas przechowywania w warunkach handlowych. Stwarza to ryzyko znacznego pogorszenia jakości i stanu sanitarnego warzyw świeżych, minimalnie przetworzonych. Potwierdzają to wyniki badań prowadzonych obecnie w ramach tematu statutowego 5.1.3 pt. „Opracowanie metod ograniczających występowanie skażeń mikrobiologicznych owoców i warzyw przeznaczonych do bezpośredniego spożycia”. Aktualny mój udział w tych badaniach polega na analizowaniu stopnia zasiedlenia świeżych warzyw, przeznaczonych do bezpośredniego spożycia, które są dostępne w sieciach handlowych i na targowiskach, a także identyfikacja grzybów pleśniowych pod kątem obecności grzybów szkodliwych dla zdrowia i mykotoksyno-twórczych. Badana jest liczebność wskaźnikowych grup mikroorganizmów jak: drożdże i pleśnie, bakterii mezofilne, bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, bakterie z grupy coli i *Escherichia coli*. Do badań pozyskiwane są próby: liści szpinaku, rukola, roszonek, sałata lodowa, nacie pietruszki i selera, szczypior oraz mieszanki sałat. Badane są tylko produkty z aktualnym terminem przydatności do spożycia. Na podstawie dotychczasowych badań stwierdzono wysokie liczebności bakterii oraz drożdży i pleśni szczególnie w rukoli i szpinaku. Poziom bakterii jest zbliżony do poziomu tych mikroorganizmów w glebie (10^6 - 10^7 jtk/g), pomimo deklaracji na opakowaniach, że towar był myty i jest przeznaczony do bezpośredniego spożycia. Wysoki jest również poziom grzybów pleśniowych, szczególnie w rukoli (10^4 - 10^5 jtk/g). W niektórych próbach rukoli i szpinaku odnotowano również

obecność bakterii z grupy coli i *E. coli*. Stwierdzono również wysoki poziom mikroorganizmów w mieszankach sałat do bezpośredniego spożycia. Odznaczają się one dużą zawartością bakterii i drożdży. Do tej pory przebadano kilkadziesiąt prób materiału roślinnego. Badania są kontynuowane. Jednak już na tym etapie wyniki pokazują, że producenci i dystrybutorzy powinni zwrócić szczególną uwagę na zachowanie higieny na liniach technologicznych i w czasie przygotowywania do handlu, a także przechowywać towar w warunkach ograniczających rozwój mikroorganizmów w produktach.

Pomimo różnych technik zachowania jakości świeżych warzyw podczas przechowywania, cały czas aktualne jest poszukiwanie metod, które poprawią stan sanitarny produktów roślinnych i ograniczą ryzyko rozwoju mikroorganizmów chorobotwórczych i psucia tych produktów. W tym celu, w 2018 roku, rozpoczęto badania dotyczące możliwości zastosowania ziół oraz roślin przyprawowych o właściwościach antybakteryjnych, jako dodatków do sałat krojonych.

Antybakteryjne działanie związków zawartych w ziołach i roślinach przyprawowych znane jest od wieków. W badaniach *in vitro* wykazano, że olejki eteryczne z różnych roślin wykazują antybakteryjne działanie wobec *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli*, *Shigella* czy *Spaphylococcus aureus* (Burt 2004). Najczęściej badano działanie związków zawartych w roślinach takich jak: tymianek, oregano, rozmaryn i bazylika. Olejki eteryczne tych roślin zawierają tymol i karwakrol, które są wymieniane jako substancje o silnym działaniu antybakteryjnym, a także fungitoksycznym (Bagamboula i in. 2004, Farzaneh i in. 2015). Prace nad możliwością zastosowania ziół jako dodatków do warzyw krojonych rozpoczęto jako temat statutowy nr 6.1.4. pt. „Opracowanie metod zwiększania bezpieczeństwa sanitarnego i wydłużania trwałości warzyw krojonych”. W ramach badań planowane jest zastosowanie rozdrobnionych ziół, zawierających związki antybakteryjne, jako dodatków do sałat i mieszanek warzyw krojonych w celu ograniczenia rozwoju mikroorganizmów lub zastosowanie ekstraktów/olejków z tych roślin, jako czynników sanityzujących podczas płukania warzyw. Mój udział w tych badaniach polega na ocenie przydatności wybranych ziół do ograniczenia rozwoju mikroorganizmów w warzywach krojonych podczas przechowywania. Badania rozpoczęłam od określenia bakteriobójczego działania wyciągów ze świeżych ziół oraz naparów z roślin suszonych, wobec nie enteropatogenicznego szczepu *E. coli* O157 w warunkach *in vitro*. Badana jest efektywność działania wyciągów w zależności od ich stężenia. Równocześnie prowadzone są badania sensoryczne oceniające walory smakowe warzyw krojonych z dodatkiem ziół. W kolejnym etapie będzie określana jakość przechowalnicza mieszanek z ziołami i tempo rozwoju mikroorganizmów, w tym testowej bakterii *E. coli*. Celem tych badań jest opracowanie nowej technologii poprawiającej jakość świeżych warzyw krojonych, przy jednoczesnym podniesieniu ich walorów smakowych i prozdrowotnych.

Na jakość produktów roślinnych na rynku duży wpływ ma nie tylko przestrzeganie zasad higieny i bezpieczeństwa podczas przygotowywania żywności do sprzedaży, ale także dbałość o środowisko glebowe i stan sanitarny upraw. W wyniku stosowania intensywnych metod produkcji w wielu rejonach postępuje degradacja gleb użytkowanych rolniczo. Ten stan jest rezultatem wieloletniego stosowania nawozów mineralnych bez dostarczania materii organicznej do gleby, ograniczone zmienianie lub wieloletnia

uprawa w monokulturze, co przyczynia się do nadmiernej mineralizacji warstwy próchnicznej. Zjawiska te nasilają się jeszcze wskutek wzrostu temperatury w okresie wegetacji, zmniejszania opadów i przesuszania gleb w wyniku obniżania poziomu wód gruntowych. Konsekwencją są niekorzystne zmiany mikrobiologiczne zachodzące w środowisku glebowym, które prowadzą do zubożenia bioróżnorodności i ograniczenia aktywności mikroorganizmów. Skutkuje to spadkiem produktywności gleb i selekcją w kierunku rozwoju organizmów szkodliwych dla roślin. Z kolei reakcją na straty w plonach jest intensyfikacja produkcji i chemizacji rolnictwa, a to pogłębia ten niekorzystny proces. Kontakty z rolnikami wskazują, że w wielu przypadkach wiedza na temat życia biologicznego gleby i znaczenia funkcjonowania mikroorganizmów dla jej produktywności jest wciąż ograniczona. Dlatego podjęto działania edukacyjne w kierunku ochrony gleb użytkowanych rolniczo ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych oraz ich udziału w poprawie jakości i żyzności gleb. Działania te są prowadzone od 2018 r. w ramach projektu pt. „Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń” nr POIS.02.04.00-00-0082/16-00 (lata realizacji 2018-2019). Projekt jest współfinansowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Spójności w ramach Programu Operacyjnego Infrastruktura i Środowisko oraz dofinansowany ze środków Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej. W ramach projektu prowadzone są szkolenia dla rolników i doradców rolniczych m.in. w zakresie: (i) podniesienia ich świadomości na temat istotnej roli mikroorganizmów glebowych w procesach glebotwórczych, z uwzględnieniem ich wpływu na zawartość próchnicy w glebie, (ii) utylizacji odpadów organicznych poprzez ich kompostowanie oraz wskazanie pozytywnej roli kompostów w zachowaniu prawidłowej jakości gleby, (iii) pokazania roli mikroorganizmów glebowych w ochronie roślin przed patogenami, (iv) znaczenia mikroorganizmów ryzosferowych, w tym mikoryzy dla wzrostu roślin, (v) przekazania praktycznych wskazówek mających na celu poprawę jakości gleby, poprzez stosowania właściwych zabiegów agrotechnicznych, nawożenia i utrzymanie prawidłowej bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. Szkolenia prowadzone są przez wykwalifikowanych ekspertów – pracowników naukowych posiadających doświadczenie w dziedzinie mikrobiologii gleby, gleboznawstwa, zagospodarowania odpadów organicznych, nawożenia, ochrony roślin.

Jestem współtwórcą merytorycznym tego projektu, a także zastępcą koordynatora. Moja rola w projekcie polega na udziale w merytorycznym i organizacyjnym przygotowywaniu szkoleń, w opracowywaniu materiałów szkoleniowych, współpracy z ekspertami, gromadzeniu i analizie informacji dotyczących problemów jakie mają rolnicy z jakością gleb w swoich gospodarstwach. Jestem również jednym z wykładowców podczas szkoleń, a tematem mojego wykładu są zagrożenia mikrobiologiczne w produkcji żywności, ich skutki oraz sposoby zapobiegania.

W ramach projektu zostanie opracowana obszerna monografia na temat roli mikroorganizmów w żyzności gleb oraz działań w kierunku ochrony gleb użytkowanych rolniczo przed ich degradacją. W 2019 r. będzie zorganizowana konferencja naukowa pt. „Ochrona bioróżnorodności gleby warunkiem zdrowia obecnych i przyszłych pokoleń”, która będzie poświęcona ochronie gleb użytkowanych rolniczo. Celem konferencji jest

dyskusja na temat stanu zasobów glebowych w Polsce i integracja interdyscyplinarnych badań w kierunku ograniczania utraty i zwiększania zawartości substancji organicznej w glebach, poprawy ich struktury i aktywności biologicznej, a także polepszenia stanu sanitarnego gleb. Jestem jednym z współtwórców monografii oraz biorę czynny udział w organizacji konferencji, jako członek komitetu organizacyjnego.

Od 2014 r. jestem współwykonawcą Programu Wieloletniego 2014-2020, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Biorę udział w realizacji zadania 3.2 pt. „Rozwój zrównoważonego nawożenia roślin ogrodnich i zapobieganie degradacji gleby i skażenia wód gruntowych”, podzadanie nr 6 pt. „Ocena stanu degradacji gleb w rejonach intensywnej produkcji warzyw na podstawie analiz mikrobiologicznych, nematologicznych, analiz makro- i mikroskładników, zawartości materii organicznej oraz właściwości fizycznych gleb (rejonów intensywnej uprawy cebuli, papryki, warzyw kapustnych)”. Celem badań ocena stanu gleb w produkcji warzyw (papryki, cebuli i kapusty), gdzie stosowana jest bardzo intensywna uprawa z ograniczonym zmianowaniem. Wykonywane są badania porównawcze dla gleb intensywnie użytkowanych oraz sąsiadujących z nimi gleb ugorowanych. Ocena jest prowadzona na podstawie wskaźników mikrobiologicznych (aktywność enzymu dehydrogenazy, ogólna liczebność bakterii i grzybów, bakterii fluorozujących z rodzaju *Pseudomonas*, bakterii przetrwalnikujących, bakterii *Azotobacter*, liczebność koptotrofów i oligotrofów), chemicznych (pH i zasolenie gleby, zawartość materii organicznej i poziom węgla organicznego w glebie, koncentracja makro- i mikroskładników), fizycznych (gęstość objętościowa, porowatość gleby i połowa pojemność wodna). Moja rola w zadaniu polega na ustalaniu stanowisk, gdzie pobierane są próby do badań, prowadzeniu wywiadów z rolnikami, biorę udział w wykonywaniu analiz mikrobiologicznych oraz zbieram dane, a także opracowuję wyniki i raporty.

Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań, stwierdzono postępujący proces degradacji gleb obszarach intensywnej produkcji roślin warzywnych. Szczególnie niekorzystne zmiany zachodzą w warstwie próchnicznej gleby, gdzie stosowane metody uprawy prowadzą do mineralizacji próchnicy i niszczą strukturę gleby (obniżona porowatość i połowa pojemność wodna). Konsekwencją są niekorzystne zmiany mikrobiologiczne zachodzące w glebie, stwierdzone na podstawie pomiarów aktywności enzymatycznej mikroorganizmów. W glebach, gdzie uprawiane są od wielu lat warzywa (cebula, kapusta) aktywność mikroorganizmów jest istotnie niższa niż w glebach ugorowanych.

Następnym etapem prac zaplanowanych w zadaniu, w którym biorę udział, jest przeprowadzenie doświadczeń, w których wykonywane będą zabiegi mające na celu powstrzymanie tych niekorzystnych zmian. Biorę czynny udział w opracowywaniu i w zakładaniu doświadczeń polowych, które są prowadzone od 2018 r. w dwóch gospodarstwach ogrodnich. Do tej pory wykonano wstępne analizy mikrobiologiczne oraz określono parametry fizyczno-chemiczne gleb. Na wytypowanych obszarach zastosowano preparaty organiczne, które będą stosowane w tych samych miejscach przez co najmniej trzy sezony wegetacyjne. Prowadzone będą obserwacje długofalowego oddziaływania użytych preparatów na jakość i aktywność mikrobiologiczną gleb.

W kolejnych latach mojej pracy zawodowej planuję kontynuację prowadzonych obecnie badań. Istotnym kierunkiem tych badań będzie również poznanie możliwości wtórnego wykorzystywania rolniczych odpadów organicznych, w połączeniu z zastosowaniem mikroorganizmów, w celu aktywizacji biologicznej gleb, w kierunku poprawy ich produktywności.

Spis literatury

- Ab Rahman S.F.S., Singh E., Pieterse C.M.J., Schenk P.M., 2018. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267: 102 – 111.
- Ambrosini A., de Souza R., Passaglia L.M.P., 2016. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. *Plant Soil*, 400: 193 – 207.
- Asaka O., Shoda M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 4081 – 4085.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21: 33 – 42.
- Bardin S.D., Huang H.C., Moyer J.R., 2004. Control of *Pythium* damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a biocontrol agent. *Biol. Contr.*, 29: 453–460.
- Bashan Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(5):1089 – 1098.
- Bashan Y., Gonzales L.E. 1999. Long-term survival of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 262 – 266.
- Bashan Y., Hernandez J.P., Leyva-Macario Bacilio L.A. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, 35: 359 – 368.
- Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., Hernandez J.P., 2014. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998 – 2013). *Plant Soil*, 378: 1 – 33.
- Bashan Y., de-Bashan L.E., Prabhu S.R., 2016. Superior polymeric formulations and emerging innovative products of bacterial inoculants for sustainable agriculture and the environment. W: *Agriculturally important microorganisms*. H.B. Singh, B.K. Sarma, Ch. Keswani (eds). Springer Science+Business Media, Singapur: 15 – 46.
- Baudoin E., Nazaret S., Mougel C., Ranjard L., Moëgne-Locco Y., 2009. Impact of inoculation with the phytostimulatory PGPB *Azospirillum lipoferum* CRT1 on the genetic structure of rhizobacterial community of field-grown maize. *Soil Biology Biochemistry*, 41 (2): 409 – 413.
- Brzeski M.W., Smolińska U., Szczech M., Paul M., Ostrzycka J., 1993. Short term effect of green manuring on soil inhabiting microorganisms. *Nematologia mediterranea*, 21: 169 – 176.
- Brzeski M., Dyki B., Sobolewski J., Szczech M., Rondonański W., Kowalczyk W., 1995. Control of powdery mildew of tomato with vermicompost and brewery refuse extracts. VI Conference of the Polish Phytopathological Society “Biological control of soil-borne and post-harvest pathogens”. Skierniewice, 20 – 21 kwietnia 1995.

- Brzeski M.W., Szczech M., 1999. Effect of continuous soil amendments with coniferous sawdust on nematodes and microorganisms. *Nematologia mediterranea*, 27: 159 – 166.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223 – 253.
- Calvo P., Nelson L., Kloepper J.W., 2014. Agricultural use of plant stimulants. *Plant Soil*, 383: 3 – 41.
- Castellano G., 2012. Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia oceanica* (L.) Delile. *Commun. Math. Comput. Chem.*, 67: 231 – 250.
- Castro-Ibáñez I., Gil M.I., Allende A., 2016. Ready-to-eat vegetables: current problems and potential solutions to reduce microbial risk in the production chain. *LWT – Food Science and Technology* xxx: 1 – 9.
- Chaparro J.M., Bardi D.V., Bakker M.G., Sugiyama A., Manter D.K., Vivanco J.M., 2013. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. *PLoS ONE* 8 (2): e55731.
- Chung Y.R., Hoitink H.A.J., Dick W.A., Herr L.J., 1988. Effects of organic matter decomposition level and cellulose amendment on the inoculum potential of *Rhizoctonia solani* in hardwood bark media. *Phytopathology*, 78: 836-840.
- Cook R.J., Baker K.F., 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press, St. Paul, Minnesota: 539 pp.
- De Boer M., van der Sliuis I., van Loon L.C., Bakker P.A.H.M., 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 201 – 210.
- De Boer W., 2017. Upscaling of fungal-bacterial interactions: from the lab to the field. *Current Opinion in Microbiology*, 37: 35 – 41.
- de Salamone I.E.G., Di Salvo L.P., Ortega J.S.E., Sorte P.M.F.B., Urquiaga S., Teixeira K.R.S., 2010. Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil*, 336 (1-2): 351 – 362.
- del Carmen Orozco-Mosqueda M., del Carmen Rocha-Grandos M., Glick B.R., Santoyo GG., 2018. Microbiome engineering to improve biocontrol and growth-promoting mechanisms. *Microbiol. Res.* (manuskrypt zaakceptowany do publikacji).
- Duffy B., Schouten A., Raaijmakers J.M., 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 501 – 538.
- Eisenhauer N., Schultz W., Scheu S., Jousset A., 2013. Niche dimensionality links biodiversity and invisibility of microbial communities. *Functional Ecology*, 27: 282 – 288.
- Farzaneh M., Kiani H., Sharifi R., Reisi M., Hadian J., 2015. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 109: 145 – 151.
- Felici C., Vettori L., Giraldi E., Forino L.M.C., Toffanin A., Tagliasacchi A.M., Nuti M., 2008. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on

- Lycopersicon esculentum*: effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40 (2): 260 – 270.
- Fira D., Dimkić I., Berić T., Ilozo J., Stanković S., 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285: 44 – 55.
- Fry W.E., Goodwin S.R., Matuszak J.M., Spielman L.J., Milgroom M.G., 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30: 107 – 129.
- Garrette S.D., 1965. Towards the biological control of soil-borne plant pathogens. W: "Ecology of soil-borne plant pathogens", ed.: Baker K.F. I Snyder W.C., Los Angeles Univ. Calif. Press: 571.
- Gomiero T., 2016. Soil degradation, land scarcity and food security: reviewing a complex challenge. *Sustainability* 8 (281).
- Guetsky R., Shtienberg D., Elad Y., Fisher E., Dinoor A., 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology*, 92: 976 – 985.
- Haas D., Keel C., 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp., and relevance for biological control of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 41: 117 - 153
- Hatvani L., Manczinger L., Vágvölgyi C., Kredics L., 2013. *Trichoderma* as a human pathogen. W: *Trichoderma: biology and applications*. Eds. P.K. Mukherjee i wsp., CAB International: 296 – 317.
- Herencia J.F., García-Galavía P.A., Ruiz Dorado J.A., Maqueda C., 2011. Comparison of nutritional quality of the crops grown in organic and conventional fertilized soil. *Scientia Horticulture*, 129: 882 – 888.
- Horner I.J., Wilcox W.F., 1995. SADAMCAP, a technique for quantifying populations of *Phytophthora cactorum* in apple orchard soils. *Phytopathology*, 85: 1400 – 1408.
- Howell C.R., 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.*, 87: 4 – 10.
- Hückelhoven R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 101 – 127.
- Hillocks R.J., 2012. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection*, 31: 85 – 93.
- Keiluweit M., Bougoure J.J., Nico P.S., Pett-Ridge J., Weber P.K., Kleber M., 2015. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nat. Clim. Chang.*, 5: 588 – 595.
- Kloepper J.W., Lifshitz R., Zablotowicz R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.*, 7: 39–43.
- Kowalska B., Szczech M., 2005. Znaczenie bakterii *Burkholderia cepacia* dla rolnictwa i ochrony środowiska naturalnego. *Postępy Nauk Rolniczych*, 6: 25 – 37.
- Köhl J., Postma J., Nicot P., Ruocco M., Blum B., 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57: 1 – 12.
- Lamichhane J.R., 2017. Pesticide use and risk reduction in European farming system with IPM: an introduction to the special issue. *Crop Protection*, 97: 1 – 6. .

- Lange M., Habekost M., Eisenhauer N. i in, 2015. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS ONE*, 9 (5): e96182.
- Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. W: *Advances in research*. India Phytochem. Ed.: F. Imperator. ISBN 81-308-0034-9: 23 – 67.
- Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M., Chapeland F., 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 58: 876 – 888.
- Lescourret F., 2017. Toward a reduced use of pesticides in European farming systems: an introduction to the PURE project. *Crop Protection*, 97: 7 – 9.
- Mallon C.A., van Elsas J.D., Falcão Salles J., 2015. Microbial invasions: the process, patterns, and mechanisms. *Trends in Microbiology*, 23 (11): 719 – 729.
- Małolepsza U., Nawrocka J., Szczech M., 2016. *Trichoderma virens* 106 inoculation stimulates defence enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered *Rhizoctonia solani* infection. *Biocon. Sci. Technol.*, 27 (2): 180 – 199.
- Matyjaszczak E., 2008. Więcej wycofanych niż dozwolonych. *Now. Upr.*: 49 – 51.
- McDonald B.A., Miles A.J., Nelson N.R., Pettway R.E., 1994. Genetic variability in nuclear DNA in field populations of *Stagnospora nodorum*. *Phytopathol.*, 84: 250 – 255.
- McLeod A., Masimba T., Jensen T., Serfontein K., 2017. Evaluating spray programs for managing copper resistant *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* populations on tomato in the Limpopo region of South Africa. *Crop Protection*, 102: 32 – 42.
- McSpadden Gardener B.B., Fravel D.R., 2002. Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. *Plant Health Prog.*: <http://www.plantmanagementwork.org/pub/php/review/biocontrol>.
- Meena V.S., Meena S.K., Verma J.P., Kumar A., Aeron A., Mishra P.K., Bisht J.K., Pattanayak A., Naveed M., Dotaniya M.L., 2017. Plant beneficial rhizospheric microorganisms (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review. *Ecological Engineering*, 107: 8 – 32. .
- Morrissey J.P., Osbourn A.E., 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63 (3):708 – 724.
- Nawrocka J, Szczech M, Małolepsza U. 2017. *Trichoderma atroviride* enhances phenolic synthesis and cucumber protection against *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection Science*, 53: 1 – 7.
- Nawrocka J., Małolepsza U., Szymczak K., Szczech M., 2018. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma*, 255 (1): 359 – 373.
- Newton A.C., Begg G.S., Swanston J.S., 2009. Deployment of diversity for enhanced crop function. *Annals of Applied Biology*, 154: 309 – 322.
- Ohno A., Ano T., Shoda M., 1992. Production of lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.*, 14: 1165 – 1168.

- Olaimat A.N., Holley R.A., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology* 32: 1 – 19.
- Ollivier J., Töwe S., Bannert A. i in., 2011. Nitrogen turnover in soil and global change. *FEMS Microbial. Ecol.*, 78 (1): 3 – 16.
- Ongena M., Jacques P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiol.*, 16 (3): 115 – 125.
- Oskiera M., Szczech M., Bartoszewski G. 2015. Molecular identification of *Trichoderma* strains collected to develop plant growth-promoting and biocontrol agents. *Journal of Horticultural Research*, 23(1): 75 – 86.
- Parke J.L., Gurian-Sherman D., 2001. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 225 – 258.
- Patel J.S., Singh A., Singh H.B., Sarma B.K., 2015. Plant genotype, microbial recruitment and nutritional security. *Front. Plant Sci.*, 6: 1 – 3.
- Podile A.R., 1994. Survival of *Bacillus subtilis* AF1 in the bacterized peanut rhizosphere and its influence on native microflora and seedling growth. *World J. Microbiol. Biotech.*, 10: 700 – 703.
- Probanza A., Mateos J.L., Lucas Garcia J.A., Ramos B., de Felipe M.R., 2001. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorium* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. *Microb. Ecol.*, 41: 140 – 148.
- Probanza A., Lucas Garcia J.A., Ruiz Palomino M., Ramos B., Gutierrez Mareno F.J., 2002. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105). *Appl. Soil Ecol.*, 20: 75 – 84.
- Przerwa M., 2015. Innowacyjne metody przechowywania warzyw. CDR w Brwinowie, oddział w Radomiu, 2015.
- Ramos B., Lucas Garcia J.A., Probanza A., Barrientos M.L., Gutierrez Mareno F.J., 2003. Alterations in the rhizobacterial community associated with European alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis*. *Environ. Exp. Bot.*, 49: 61 – 68.
- Rapauch G.S., Kloepper J.W., 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathol.*, 88: 1158 – 1164.
- Rojas Solís D., Zetter-Salmon E., Conteras-Pérez M., del Carmen Rocha-Grandos M., Macías-Rodriguez L., Santoyo G., 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant-growth promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13: 46 – 52.
- Ruzicka S., Edgerton D., Norman M., Hill T., 2000. The utility of ergosterol as a bioindicator of fungi in temperate soils. *Soil Biol. Biochem.*, 32: 989 – 1005.
- Ryser, E.T., Hao, J., Yan, Z., 2009. Internalization of pathogens in produce. In: Fan, X., Niemira, B.A., Doona, C.J., Feeherry, F.E., Gravani R.B. (Eds.), *Microbial safety of fresh produce*. Wiley-Blackwell Publisher, pp. 55 – 80.

- Salete Mota M., Bauer Gomes C., Souza Júnior I.T., Bittencourt Moura A., 2017. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48: 62 – 70.
- Santoyo G., del Carmen Orozco-Mosqueda, Govindappa M., 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22 (8): 885 – 872.
- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen Orozco-Mosqueda, Glick B.R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183: 92 – 99.
- Sarma B.K., Yadav S.K., Singh S., Singh H.B., 2015. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology Biochemistry*, 87: 25 – 33.
- Schoina C., Stringlis I.A., Pantelides I.S., Tjamos S.E., Paplomatas E.J., 2011. Evaluation of application methods and biocontrol efficacy of *Paenibacillus alvei* strain K-165, against the cotton black root rot pathogen *Thielaviopsis basicola*. *Biol. Contr.*, 58: 68–73.
- Shoda M., 2000. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 89:515–521
- Singh J.S., 2015. Microbes: the chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystem. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 203: 80 – 82.
- Sivasakthi S., Usharani G., Saranraj P., 2014. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) – *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 9 (16): 1265 – 1277.
- Staniaszek M., Szajko K., Uliński Z., Szczech M., Marczewski W., 2010. BseGI restriction of the polymerase chain re action amplicon Th₄₄₄ is registered to distinguish biotypes of *Trichoderma aggressivum* causing serious losses in mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *HortScience*, 45: 1910 – 1911.
- Szczech M., 1995. Suppressiveness of potting medium with vermicompost toward *Phytophthora nicotianae*. VI Conference of the Polish Phytopathological Society “Biological control of soil-borne and post-harvest pathogens”. Skierniewice, 20 – 21 kwietnia 1995.
- Szczech M.M., 1999. Suppressiveness of vermicompost against Fusarium wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, 147: 155 – 161.
- Szczech M., 2002. Changes of microbial populations in peat substrate amended with vermicompost, and in the rhizosphere of cucumber and lettuce plants. *Phytopatologica Polonica*, 25: 13 – 26.
- Szczech M., 2008. Mixtures of microorganisms in biocontrol. W: *Progress in Environmental Microbiology*. Ed.: M.B. Kim. Nova Science Publishers, INC: 69 – 110. (ISBN:978-60021-940-5)
- Szczech M., Rondomański W., Brzeski M.W., Smolińska U., Kotowski J.F., 1993. Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root infecting pathogens of cabbage and tomato. *Biological Agriculture and Horticulture*, 10: 47 – 52.
- Szczech M., Brzeski M.W., 1994. Wermikompost – nawóz czy biologiczny środek ochrony roślin? *Zeszyty Naukowe AR im. H. Kołłątaja w Krakowie*, 292: 77 – 83.

- Szczecz M., Brzeski M., 1994. Vermikompost – środek ochrony roślin czy nawóz? Krajowa Konferencja „Ekologiczne i gospodarcze znaczenie dżdżownic”. Rzeszów, 13 – 14 maja 1994.
- Szczecz M., Rondański W., Brzeski M.W., 1994. Vermikompost jako biologiczny fungicyd. Sympozjum z Okazji XXX-lecia Instytutu Warzywnictwa. Skierniewice 1993.
- Szczecz M., Ostrzycka J., Kowalczyk W., 1995. Wpływ wermikompostu dodawanego do podłoża skażonego grzybami patogenicznymi na plonowanie pomidorów i skład chemiczny owoców. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka praktyce ogrodniczej”. AR Lublin, 1995.
- Szczecz M., Dyki B., Sobolewski J., 2000. Efficacy of brewery refuse extract against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersicum*). Vegetable Crops Research Bulletin, 53: 65 – 73.
- Szczecz M., Smolińska U., 2001. Comparison of suppressiveness of vermicompost produced from animal manures and sewage sludge against *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan var. *nicotianae*. Journal of Phytopathology, 149: 77 – 82.
- Szczecz M., Kowalska B., Smolińska U., 2002. Induction of systemic resistance in radish by *Pseudomonas* developing in vermicompost-amended substrate. Phytopatologica Polonica, 24: 57 – 66.
- Szczecz M., Uhm J.Y., 2004. The possibility of the use of plants to reduce *Phytophthora cactorum* in soil. Vegetable Crops Research Bulletin, 61: 109 – 119.
- Szczecz M., Shoda M., 2004. Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. Journal of Phytopathology, 152: 549 – 556.
- Szczecz M., Shoda M., 2005. The influence of *Bacillus subtilis* RB14-C on the development of *Rhizoctonia solani* and indigenous microorganisms in the soil. Canadian Journal of Microbiology, 51: 405 – 411.
- Szczecz M., Shoda M., 2006. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. Journal of Phytopathology, 154: 370 – 377.
- Szczecz M., Dyki B., 2007. Combination of microbial biocontrol agents to control of damping-off and fusarium wilt of tomato. IOBC/WPRS Bulletin, 30: 415 – 418.
- Szczecz M., Dyśko J., 2008. The possibility to use selected mixtures of PGPR bacteria in tomato cultivation. Vegetable Crops Research Bulletin, 68: 47 – 56.
- Szczecz M., Staniaszek M., Habdas H., Uliński Z., Szymański J., 2008. *Trichoderma* spp. – the cause of the green mould in Polish mushroom farms. Vegetable Crops Research Bulletin, 69: 105 – 114.
- Szczecz M., Kowalska B., Dyki B., Horbowicz M., Kowalczyk W., 2009. Microbial mixtures enhancing plant resistance to pathogen stress. IOBC/WPRS Bulletin, 43: 89 – 94.
- Szczecz M., Maciorowski R., 2016. Microencapsulation technique with organic additives for biocontrol agents. Journal of Horticultural Research 24 (1): 111 – 122.
- Szczecz M., Szafirowska A., Kowalczyk W., Szwejd-Grzybowska J., Włodarek A., Maciorowski R. 2016 a. The effect of plant growth promoting bacteria on transplants growth and lettuce yield in organic production. Journal of Horticultural Research 24 (2): 101 – 107.

- Szczeczek M., Kowalska B., Sobolewski J., 2016 b. Wpływ wybranych bakterii PGPB na plonowanie oraz zdrowotność sałaty i ogórka w uprawie polowej. *Progress in Plant Protection* 56 (3): 354 – 359.
- Szczeczek M., Nawrocka J., Felczyński K., Małolepsza U., Sobolewski J., Kowalska B., Maciorowski R., Jas K., Kancelista A., 2017. *Trichoderma atroviridae* TRS25 isolate reduces downy mildew and induces systemic defence responses in cucumber in field conditions. *Scientia Horticulturae*, 224: 17 – 26.
- Szczeczek M., Kowalska B., Smolińska U., Maciorowski R., Oskiera M., Michalska A., 2018. Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *International Journal of Food Microbiology*, 286: 155 – 161.
- Tuitert G., Szczeczek M., Bollen J.G., 1998. Suppression of *Rhizoctonia solani* in potting mixtures amended with compost made of organic household waste. *Phytopathology*, 88: 764 – 773.
- Validov S.Z., Kamilova F., Qi S., Stephan D., Wang J.J., Makarova N., Lugtenberg B., 2007. Selection of bacteria able to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in stonewool substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 461 – 471.
- Velivelli S.L.S., Sessitsch A., Doyle Prestwich A., 2014. The role of microbial inoculants in integrated crop management systems. *Potato Research*, 57: 291 – 309.
- Vimal S.R., Singh J.S., Arora N.K., Singh S., 2017. Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: a review. *Pedosphere*, 27 (2): 177 – 192.
- Wang X., Pan Q., Chen F., Yan X., Liao H., 2011. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. *Mycorrhiza* 21 (3): 173 – 181.
- Wang T., Liang Y., Wu M., Chen Z., Lin J., Yang L., 2015. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23: 744 – 754.
- Winder R.S., Wheeler J.J., Conder N., Otvos I.S., Nevill R., Duan L. 2003. Microencapsulation: a strategy for formulation of inoculum. *Bioc. Sc. Techn.* 13: 155 – 169.
- Xavier L.J.C., Germida J.J., 2002. Response of lentil under controlled conditions to co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia varying in efficacy. *Soil Biology Biochemistry*, 34 (2): 181 – 188.
- Xavier L.J.C., Germida J.J., 2003. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* enhance pea yield and nutrition. *Biology and Fertility of Soils*, 37 (5): 181 – 188.
- Xu X.-M., Jeffries P., Pautasso M., Jeger M.J., 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytophol. Rev.*, 101 (9): 1024 – 1031.
- Yabur R., Bashan Y., Hernández-Carmona G., 2007. Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *J. Appl. Phycol.* 19: 43 – 53.
- Zheng X.Y., Sinclair J.B., 2000. The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. *BioControl*, 45: 223 – 243.

Zestawienie ważniejszych osiągnięć

Wykaz osiągnięć	Liczba prac	Liczba cytowań	Sumaryczny Impact factor ^a	Sumaryczna liczba punktów MNiSW ^b
Prace opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie JCR wchodzące w skład osiągnięcia	3	76	2,542	114
Pozostałe prace opublikowane w czasopismach znajdujących się w bazie JCR	18	328	23,852	470
Razem	21	404	26,394	584
Indeks Hirsha wg bazy Web of Science	9			
Udział w projektach badawczych	11			
Kierowanie projektami badawczymi	5			
Referaty wygłoszone na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych	17			
Nagrody za działalność naukową	2			

^a – wartości IF wg JCR podano zgodnie z rokiem ich opublikowania.

^b – punktację MNiSW podano wg wykazu uaktualnionego w 2017 r.

Magdalena Raś