

SPRAWOZDANIE

z badań podstawowych prowadzonych w 2019 roku
na rzecz rolnictwa ekologicznego

Kierownik Projektu: dr inż. Piotr Szafranek

Warzywnictwo ekologiczne, w tym uprawa ziół: badania w zakresie możliwości wykorzystywania substancji podstawowych w ochronie warzyw i ziół w uprawie ekologicznej. Możliwości wykorzystywania substancji podstawowych do ograniczania szkodliwości najgroźniejszych agrofagów i patogenów w ekologicznych uprawach pieczarki.

na podstawie § 8 ust.1 pkt 2, ust.2 pkt 2 i ust.10 rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. *w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa* (Dz. U. poz. 1170, z 2016 r. poz. 1614, z 2017 r. poz.1470)

decyzja Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi
z dnia 24.04.2019 r., nr PJ.re.027.5.2019

DYREKTOR
INSTYTUTU OGRODNICTWA

.....
dr hab. Dorota Konopacka, prof. IO

Wykonawcy: dr Piotr Szafranek, dr Joanna Szumigaj-Tarnowska, mgr Zbigniew Uliński,
techn. Alina Lichman, techn. Halina Łągiewska

Skierniewice, 2019

WSTĘP

Polska od kilku lat jest liderem w produkcji pieczarek w Europie. Rocznie produkuje się w naszym kraju około 350 tys. ton tych grzybów. Produkcja ekologiczna pieczarki, podobnie jak w przypadku pozostałych upraw warzyw, stanowi jedynie niewielki procent całości produkcji. Rynek ten jednak stale się rozwija.

Jednym z głównych problemów prowadzenia uprawy pieczarek metodami ekologicznymi jest ochrona przed szkodnikami i chorobami, z powodu braku dostępności środków zwalczających lub ograniczających patogeny i szkodniki w tych uprawach (Motała 2018). Tym samym, aby wspierać gospodarstwa ekologiczne należy intensywnie poszukiwać nowych metod i związków naturalnych, które mogłyby skutecznie ograniczać występujące w uprawach choroby i szkodniki. Badania tego typu są prowadzone od wielu lat w różnych rejonach świata, niestety w ujęciu ogólnym nie są zbyt liczne (Szafranek i Lewandowski 2018).

W projekcie badano możliwości ograniczania w uprawie pieczarki występowania szkodliwych agrofagów, poprzez sterowanie zachowaniem owadów przy użyciu tablic lepowych i lamp owadobójczych oraz substancji podstawowych, tj. między innymi sacharoza, fruktoza, piwo, olej cebulowy, ocet winny, olej z mięty pieprzowej. W ramach tematu oceniano także przydatność czterech substancji podstawowych, tj. wyciąg ze skrzypu polnego, ocet winny, chlorowodorek chitozanu oraz nadtlenek wodoru w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych dla pieczarki. Substancje podstawowe zostały wybrane na podstawie wykazu zatwierdzonych substancji w Unii Europejskiej umieszczonego na stronie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi - <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/wykaz-zatwierdzonych-w-ue-substancji-podstawowych>.

Tematyka badawcza realizowanego w Instytucie Ogródnictwa w Skierniewicach projektu obejmowała zatem dwa podzadania:

PODZADANIE 1.

Wpływ wybranych substancji podstawowych na ograniczanie populacji najważniejszych szkodników w uprawie pieczarki.

PODZADANIE 2.

Wpływ wybranych substancji podstawowych na ograniczanie najważniejszych chorób bakteryjnych w uprawie pieczarki.

PODZADANIE 1.

Wpływ wybranych substancji podstawowych na ograniczanie populacji najważniejszych szkodników w uprawie pieczarki.

Spośród szkodników powszechnie występujących w uprawach pieczarki, jednymi z ważniejszych są muchówki z rodziny ziemiorkowatych. Ich biologia i szkodliwość są już dość dobrze poznane, gdyż na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci wielokrotnie badano ich wpływ na produkcję pieczarek. Wiadomo, że szkodliwe są zarówno larwy jak i osobniki dorosłe. Larwy żerując w podłożu zjadają oraz niszczą grzybnię, a także niszczą strukturę kompostu, co w konsekwencji powoduje, że jest on słabiej przerośnięty. Z danych literaturowych wynika, że zdecydowanie rzadziej obserwuje się natomiast żerowanie larw w owocnikach. Osobniki dorosłe ziemiórek pomimo, iż nie żywią się grzybnią pieczarek mogą powodować w uprawie tzw. szkody pośrednie, które wynikają z możliwości przenoszenia przez dorosłe muchówki na swoich ciałach szkodliwych dla pieczarek roztoczy, nicieni oraz zarodników

grzybów patogenicznych, między innymi *Lecanicillium fungicola*, powodującego jedną z najczęściej występujących chorób, tj. suchą zgniliznę (Fletcher and Gaze 2008). O tym, że powodujący tę chorobę grzyb *Lecanicillium fungicola* jest roznoszony przez ziemiórki pisano już w latach 60-tych ubiegłego wieku. W ostatnim czasie pojawiły się również informacje o związku ziemiórek z grzybami z rodzaju *Trichoderma* występującymi w uprawie pieczarek. Zielone pleśnie stanowią również duży problem w uprawach, a infekują przede wszystkim kompost pieczarkowy. Ochrona przed zielonymi pleśniami, może mieć jedynie charakter profilaktyczny, czyli zapobieganie jej występowaniu poprzez zachowanie szczególnej higieny podczas produkcji kompostu oraz zwalczanie muchówek i ograniczanie do minimum ich nalotów do kompostowni i zakładów pieczarkarskich.

Substancje pochodzenia naturalnego można badać nie tylko pod kątem ich toksyczności w stosunku do szkodników, ale również pod kątem możliwości ich wykorzystania do sterowania zachowaniem owadów (Górski 2004, 2005). Ciekawe w tym zakresie dane uzyskano niedawno w Szwecji. W celu zmniejszenia populacji ziemiórek występującej w uprawie szklarniowej badacze postanowili jednocześnie w obiekcie zastosować metodę odstraszącą i przywabiającą szkodnika. Czynnikiem wabiącym były żółte tablice lepowe, natomiast odstraszącym olejek eteryczny z mięty pieprzowej (Diderot 2016). Uzyskane wyniki były bardzo zadowalające, dlatego metodę tą, po dokonaniu odpowiednich zmian warto jest przebadać również w pieczarkarni.

CEL BADAŃ

Celem podzadania jest określenie przydatności substancji podstawowych, tj. sacharoza, fruktoza, piwo, olej cebulowy, ocet winny, do ograniczania populacji szkodliwych muchówek występujących w uprawie pieczarki oraz poszukiwanie nowatorskich rozwiązań i innych substancji do stosowania w tych uprawach. Badania te przyczynią się skutecznie do przygotowania dossier nowych środków do ubiegania się o wprowadzenie ich do stosowania w uprawach ekologicznych. Podjęto także próbę równoczesnego zastosowania innych niechemicznych metod poprzez wykorzystanie pułapek lepowych i świetlnych, które mogłyby być wykorzystane do masowych odłowów muchówek.

METODY BADAŃ

1. Pozyskanie szkodliwych muchówek

Szkodliwe muchówki były pobierane przy pomocy ekshaustora entomologicznego z obiektów uprawowych zlokalizowanych w 5 województwach (Łódzkim, Mazowieckim, Podkarpackim, Wielkopolskim oraz Opolskim). Jednorazowo do próbki typu „Falcon” pobierano około 50 szt. muchówek. Oznaczania pozyskanych osobników do gatunku dokonywano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego. W celu prawidłowej identyfikacji szkodników korzystano z opracowania naukowego: *Dmoch. J. 1984. Fauna pieczarkarni w Polsce. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa*. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że pozyskane osobniki należą do bardzo często występującego w pieczarkarniach gatunku *Lycoriella ingenua* (Dufour, 1839).

2. Hodowla szkodliwych muchówek

Po przetransportowaniu muchówek do Pracowni Grzybów Uprawnych, wpuszczano je do wcześniej przygotowanych pojemników hodowlanych. Pojemniki o objętości 5 litrów wypełniano do około 1/3 ich pojemności kompostem do uprawy pieczarek oraz 2-3 cm warstwą okrywy torfowej. Pojemniki były przykryte przykrywkami z otworami zasłoniętymi materiałem w celu umożliwienia wymiany gazowej między wnętrzem pojemnika i jego otoczeniem. Wnętrze pojemników regularnie przeglądano i w razie potrzeby zwilżano wodą, aby zapobiec przesuszeniu podłoża.

3. Prowadzenie uprawy pieczarki

Badania zostały przeprowadzone w klimatyzowanych halach, przystosowanych do uprawy pieczarki, zapewniając temperaturę, stężenie dwutlenku węgla i względną wilgotność powietrza na poziomie optymalnym dla danej fazy uprawy. Na początku prowadzenia uprawy do hal uprawowych wprowadzane były ziemiórki pochodzące z hodowli laboratoryjnej.

Doświadczenia uprawowe w klimatyzowanych halach Pracowni Grzybów Uprawnych IO w Skierniewicach rozpoczęto w maju 2019 roku, które prowadzono w celu namnożenia większej ilości muchówek w uprawie, a w okresie od 10. lipca 2019 roku do 31. października 2019 roku prowadzono doświadczenia uprawowe z zastosowaniem substancji podstawowych. Przeprowadzono pięć cykli uprawowych, według przedstawionego w tabeli 1 harmonogramu prac.

Tabela 1. Harmonogram upraw pieczarki w ramach podzadania 1.

Wykonywana czynność	Uprawa 1	Uprawa 2	Uprawa 3	Uprawa 4	Uprawa 5
Nakładanie podłoża	10.07	07.08	04.09	19.09	25.09
Nakładanie okrywy	11.07	08.08	05.09	20.09	26.09
Wykonanie kakingu	12.07	09.09	06.09	20.09	27.09
Rozpoczęcie szoku	19.07	16.08	13.09	27.09	04.10
I rzut owocników	29-31.07	26.08-29.08	23-26.09	07-10.10	14-16.10
II rzut owocników	05-08.08	02-05.09	30.09-3.10	14-17.10	21-24.10
III rzut owocników	12-14.08	09-11.09	07-09.10	21-23.10	28-30.10
Likwidacja uprawy	15-16.08	12-14.09	08-09.10	24-25.10	31.10-01.11

W uprawach stosowano po 93 kg ekologicznego podłoża kompostowego (pakowanego w folie na m² powierzchni uprawowej (półki). Po nałożeniu kostek na regały uprawowe odcinano z ich górnej powierzchni folię, a wierzchnią warstwę podłoża wzruszano i wyrównywano na całej powierzchni półek.

Następnie na podłoża nakładano okrywę torfową z firmy Torfan w ilości 50 l/m² uprawy, co dawało warstwę o grubości 5 cm, Po rozgarnięciu i wyrównaniu okrywy przystępowano do stopniowego nawadniania upraw. Następnego dnia na powierzchnię okrywy rozsypywano przerośnięte grzybnia podłoże (kaking) w ilości 50 dag/m² uprawy, które następnie wymieszano ręcznie z okrywą. Zabieg ten miał na celu zapewnienie równomiernego przerośnięcia okrywy grzybnia oraz skrócenie okresu przerastania. Następnie uprawy poddawano dalszej, siedmiodniowej inkubacji, podczas której w halach utrzymywano warunki optymalne dla wzrostu grzybni w okrywie. Podczas przerastania okrywy uprawy nawadniano, stosując w poszczególnych z nich do 20 litrów wody na m² uprawy. Zabieg wykonywano ręcznie z wykorzystaniem lancy z sitem.

Po przerośnięciu okrywy w uprawach wykonywano zabieg zwany „szokiem”. Polegał on na kontrolowanym obniżeniu w halach temperatury powietrza i podłoża, stężenia CO₂ oraz wilgotności, w celu powstrzymania wzrostu wegetatywnego grzybni i spowodowania przejścia uprawy w fazę plonowania (generatywną). Z upraw zbierano po trzy rzuty owocników.

Pomiędzy zbiorami kolejnych rzutów uprawy ponownie nawadniano. W końcowej fazie pierwszych rzutów i po ich zakończeniu zastosowano do 12 litrów wody na m² uprawy, a w końcowej fazie drugich rzutów i po ich zakończeniu stosowano ponownie do 7 litrów wody na m². Sumaryczne dawki wody użytej do nawadniania upraw wynosiły do 36 do 55 l/m² półki. Dawki te zależały od wilgotności i aktywności podłoża, wielkości zbiorów oraz wilgotności okrywy w okresie plonowania.

4. Stosowanie badanych substancji i lamp owadobójczych

W prowadzonych uprawach umieszczano lampy owadobójcze, przy których umieszczano pojemniki zawierające badane substancje. Kontrolę stanowiły lampy bez badanych substancji. Testowane substancje zamieszczono w tabeli nr 2. Lampy umieszczano w hali uprawowej na okres 8 godzin. Po tym okresie lampy usuwano z hali i zliczano schwyte muchówki. Badania przeprowadzono czterokrotnie, zmieniając za każdym razem położenie lampy z pojemnikiem zawierającym badaną substancję i lampy kontrolnej, aby wykluczyć przypadkowy odłów owadów zależny od umiejscowienia lampy.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczano stosunek muchówek odłowionych w obecności substancji L_s do liczby muchówek odłowionych na kontroli L_k , pomnożony razy 100% i zapisywano, jako:

$$P = (L_s / L_k) \times 100\%,$$

następnie obliczano współczynnik dla danej substancji, według wzoru $W = P - 100$, określający przydatność do ograniczania muchówek w uprawie poprzez zwabianie owadów (wartości współczynnika dodatnie, określające o ile procent uzyskana liczba muchówek w obecności substancji jest wyższa od liczby muchówek na kontroli) bądź odstraszanie (wartości współczynnika ujemne, określające o ile procent uzyskana liczba muchówek w obecności substancji jest niższa od liczby muchówek na kontroli).

Uzyskane średnie dla danej substancji i kontroli porównywano według statystycznie przy $\alpha = 0,05$ na podstawie testu t Studenta dla par wiązanych.



Stosowanie lamp owadobójczych wraz z olejkami eterycznymi w uprawie pieczarki

Tabela 2. Substancje podstawowe stosowane wraz z lampami owadobójczymi

Lp.	Badana substancja podstawowa	Uwagi
1	Sacharoza	Uprawa 1 i 2
2	Fruktoza	Uprawa 1 i 2
3	Piwo: jasne, ciemne	Uprawa 2 i 3
4	Olej cebulowy	Uprawa 3 i 4
5	Ocet winny: biały, czerwony	Uprawa 4 i 5

5. Stosowanie badanych substancji podstawowych i tablic lepowych

W prowadzonych uprawach umieszczano tablice lepowe, przy których umieszczano pojemniki zawierające badane substancje. Kontrolę stanowiły tablice lepowe bez substancji. Przetestowane substancje i ich wykorzystywanie w poszczególnych uprawach zamieszczono w tabeli nr 3. Tablice umieszczano w hali uprawowej na okres 8 godzin przy zapalonym świetle. Po tym okresie tablice usuwano z hali i zliczano schwytane muchówki. Badania przeprowadzono czterokrotnie, zmieniając za każdym razem położenie tablicy z pojemnikiem zawierającym badaną substancję i tablicy kontrolnej, aby wykluczyć przypadkowy odlów owadów zależny od umiejscowienia tablicy.

Tabela 3. Substancje podstawowe stosowane wraz z tablicami lepowymi

Lp.	Badania substancja podstawowa	Uwagi
1	Olejek z mięty pieprzowej	Uprawa 1 i 2
2	Produkt zawierający sacharozę, fruktozę i glukozę, o nazwie Attracker	Uprawa 2, 3 i 4



Stosowanie tablicy lepowej wraz z olejkiem eterycznym w uprawie pieczarki

6. Stosowanie substancji podstawowych i innych potencjalnie substancji podstawowych,

tj. substancji biologicznych i olejków roślinnych wraz z tablicami bądź lampami owadobójczymi

W ramach podzadania przeprowadzono także wstępne badania przydatności innych substancji biologicznie czynnych do ograniczania muchówek w uprawie pieczarki. W uprawach przymocowywano tablice lepowe z pojemnikami zawierającymi odpowiednie substancje. Badania przeprowadzono analogicznie jak dla substancji podstawowych, a wykaz badanych substancji przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Substancje podstawowe stosowane wraz z tablicami lepowymi

Lp.	Badania substancja	Uwagi
1	Olejek pomarańczowy, eukaliptusowy, waniliowy, cebulowy	Uprawa 4
2	Obornik bydlęcy, rozwór z sacharozy i fruktozy	Uprawa 4
3	Olejek bergamotowy, majerankowy, lawendowy, tymiankowy, sosnowy	Uprawa 5
4	Ocet winny, piwo jasne i ciemne	Uprawa 5

WYNIKI

1. Stosowanie badanych substancji i lamp owadobójczych

Spośród badanych substancji podstawowych stosowanych wraz z lampami owadobójczymi najlepsze właściwości wabiące stwierdzono dla piwa ciemnego (aż o blisko 160% muchówek stwierdzono w obecności tej substancji niż na kontroli), octu winnego czerwonego (o prawie 50% muchówek więcej) oraz roztworu fruktozy w obecności, którego było o 35% więcej ziemiórek niż na kontroli (tabela 5). Liczba odłowionych muchówek na lampach z tymi substancjami była istotnie wyższa niż na kontroli bez substancji wabiących (tabela 6). W przypadku olejka cebulowego obserwowano właściwości odstrasżające, średnio o 15,7% muchówek było mniej na tablicach z tą substancją. Wyniki te jednak nie były istotne statystycznie. Można, więc stwierdzić, że cebula może nieznacznie pomóc odstraszać niepożądane muchówki. Rozwór sacharozy, a także piwo jasne pasteryzowane były neutralne względem muchówek. Wyniki wskazują, że piwo w zależności od zawartości ekstraktów słodowych bądź zawartości alkoholu, może być substancją wabiącą muchówki lub nie.

Tabela 5. Liczba odłowionych muchówek z wykorzystaniem lamp owadobójczych i badanych substancji podstawowych

Substancja podstawowa	Liczba muchówek		P (%)	W (%)
	kontrola	substancja		
Ocet winny czerwony	281	436	155,2	+ 55,2
	233	318	136,4	+ 36,4
	212	302	142,4	+ 42,4
	158	247	156,3	+ 56,3
			średnia	+ 47,7
Olejek cebulowy	506	454	89,7	- 10,3
	294	270	91,8	- 8,2
	810	615	75,9	- 24,1
	1108	885	79,9	- 20,1
			średnia	- 15,7
Piwo ciemne refermentowane 10%	386	830	215,0	+ 115,0
	84	210	250,0	+ 150,0
	208	547	262,9	+ 162,9
	265	814	307,1	+ 207,1
			średnia	+ 158,8
Roztw. fruktozy (100 g/100 ml)	192	319	166,1	+ 66,1
	724	874	120,7	+ 20,7
	664	723	108,8	+ 8,8
	486	705	145,0	+ 45,0
			średnia	+ 35,2
Roztw. sacharozy (100 g/100 ml)	214	202	94,0	- 6,0
	757	844	111,0	+ 11,0
	456	409	89,0	- 11,0
	670	706	105,0	+ 5,0
			średnia	- 1,0
Piwo jasne pasteryzowane	246	276	112,2	+ 12,2
	302	284	94,0	- 6,0
	471	502	106,0	+ 6,0
	323	295	91,0	- 9,0
			średnia	+ 3,0

Tabela 6. Analiza statystyczna uzyskanych wyników, analiza wariancji

Substancja	Średnia z kontroli	Średnia z substancji	Wariancja	Statystyka t	t krytyczne
Ocet winny czerwony	221,0 A*	325,8 B	1126,91	6,24	3,182
Olejek cebulowy	679,5 A	556,0 A	29729,5	2,02	3,182
Piwo ciemne refermentowane 10%	235,8 A	600,2 B	32631,0	4,04	3,182
Roztw. fruktozy (100 g/100 ml)	516,5 A	655,2 B	4354,92	4,20	3,182
Roztw. sacharozy (100 g/100 ml)	524,2 A	540,2 A	3398,0	0,55	3,182
Piwo jasne pasteryzowane	335,5 A	339,2 A	970,92	0,24	3,182

* średnie w kolumnach, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się statystycznie przy $\alpha = 0,05$

2. Stosowanie badanych substancji i tablic lepowych

Wyniki uzyskane dla liczby muchówek odłowionych za pomocą tablic lepowych z substancjami podstawowymi zawarto w tabeli 7. W ramach projektu badano wpływ olejku z mięty pieprzowej oraz gotowego produktu z glukozy, sacharozy i fruktozy (Attracker) przeznaczonego do wabienia wciornastków, owadów żerujących na roślinach ozdobnych, zbożach i warzywach, na ograniczenia populacji muchówek w uprawie grzybów. Dodatkowo sprawdzano przydatność olejków roślinnych oraz obornika bydlęcego do ograniczania występowania w halach uprawowych tych owadów.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że olejek z mięty pieprzowej miał istotne właściwości odstrasżające muchówki. Na tablicach, gdzie stosowano olejek obserwowano średnio o 27% mniej muchówek niż na tablicach kontrolnych. Gotowy produkt Attracker zastosowany w obecności tablic lepowych był neutralny wobec muchówek w hali uprawowej.

W trakcie trwania badań zdecydowano o włączeniu do badań większej ilości substancji celem wstępnego określenia stosowanie jakich olejków eterycznych bądź innych naturalnych produktów mogłyby wpłynąć na ograniczenie występowania muchówek w ekologicznej uprawie pieczarki. Potwierdzono przydatność do wabienia owadów występujących w hali pieczarkarskiej piwa ciemnego, octu winnego białego oraz czerwonego. Nieznacznie większą ilość muchówek stwierdzono także na tablicy stosowanej wraz olejkiem tymiankowym oraz obornikiem bydlęcym. Jednak w tych przypadkach uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie (tabela 7 i 8). Właściwości odstrasżające oprócz olejku z mięty pieprzowej stwierdzono także dla olejków pomarańczowego i lawendowego. Uzyskane wyniki były istotne statystycznie (tabela 8).

Tabela 7. Liczba odłowionych muchówek w zależności od badanej substancji podstawowej stosowanej wraz z tablicami lepowymi

Substancja podstawowa	Liczba muchówek		P (%)	W (%)
	kontrola	substancja		
Olejek z mięty pieprzowej	250	143	57,2	- 62,8
	200	150	75,0	- 25,0
	364	340	93,4	- 6,6
	465	403	86,6	- 13,4
			średnia	- 27,0
Attracker	390	323	82,8	- 17,2
	285	275	96,5	- 3,5
	168	190	113,0	+ 13,0
	175	203	116,0	+ 16,0
	146	130	89,0	- 11,0
	189	165	87,3	- 12,7
			średnia	- 3,8
Piwo ciemne refermentowane 10%	52	130	250	+ 150,0
	140	210	150	+ 50,0
	128	256	200,0	+ 100,0
	187	301	160,9	+ 60,9
			średnia	+ 90,2
Piwo ciemne Pasteryzowane 8%	86	122	141,9	+ 41,9
	250	332	132,8	+ 32,8
	174	258	148,2	+ 48,2
	167	206	123,3	+ 23,3
			średnia	+ 36,6
Ocet winny czerwony	72	113	156,9	+ 56,9
	298	400	135,1	+ 35,1
	169	324	191,7	+ 91,7
	241	340	141,0	+ 41,0
			średnia	+ 56,2
Ocet winny biały	35	109	311,4	+ 211,4
	33	65	197,0	+ 97,0
	87	163	187,3	+ 87,3
	152	240	157,8	+ 57,8
			średnia	+ 133,4
Roztw. fruktozy (100 g/100 ml)	118	85	72,0	- 28,0
	107	102	95,3	- 4,7
	196	201	102,5	+ 2,5
	264	255	96,5	- 3,5
			średnia	- 8,4
Roztw. sacharozy (100 g/100 ml)	179	88	49,2	- 50,8
	151	263	174,2	+ 74,2
	125	146	119,2	+ 19,2
	95	107	112,6	+ 12,6
			średnia	+ 13,8
Obornik bydłęcy	207	112	54,1	- 45,9
	294	436	149,3	+ 49,3
	286	367	128,3	+ 28,3
	159	203	127,7	+ 27,7
			średnia	+ 14,8
	429	257	60,0	- 40,0
	312	211	67,6	- 32,3

Olejek pomarańczowy	354	304	85,8	- 14,2
	297	247	83,1	- 16,9
			średnia	- 25,8
Olejek majerankowy	484	546	112,8	+ 12,8
	104	143	137,5	+ 37,5
	182	105	57,6	- 42,4
	258	284	110,0	+ 10,0
			średnia	+ 4,5
Olejek eukaliptusowy	100	113	113,0	+ 13,0
	128	97	75,7	- 24,3
	187	190	101,6	+ 1,6
	210	195	92,8	- 7,2
			średnia	- 4,2
Olejek waniliowy	87	124	142,5	+ 42,5
	173	142	82,0	- 18,0
	132	135	102,2	+ 2,2
	179	190	106,1	+ 6,1
			średnia	+ 8,2
Olejek lawendowy	130	95	73,0	- 27,0
	175	110	62,8	- 37,2
	142	105	73,9	- 26,1
	139	125	89,9	- 10,1
			średnia	- 25,1
Olejek cebulowy	184	113	61,4	- 38,6
	167	160	95,8	- 4,2
	155	161	103,9	+ 3,9
	187	174	93,0	- 7,0
			średnia	- 11,5
Olejek tymiankowy	94	149	158,5	+ 58,5
	120	155	129,2	+ 29,2
	145	160	110,3	+ 10,3
	111	120	108,1	+ 8,1
			średnia	+ 36,5
Olejek sosnowy	266	307	115,4	+ 15,4
	156	149	95,5	- 4,5
	127	139	109,4	+ 9,4
	106	143	134,9	+ 34,9
			średnia	+ 13,8
Olejek bergamotowy	104	93	89,4	- 10,6
	140	136	97,1	- 2,9
	120	114	95,0	- 5,0
	158	164	103,8	+ 3,8
			średnia	- 3,7

Tabela 8. Analiza statystyczna uzyskanych wyników, analiza wariancji

Substancja	Średnia z kontroli	Średnia z substancji	Wariancja	Statystyka t	t krytyczne
Olejek z mięty pieprzowej	319,8 A	259,0 B	1202,12	5,31	3,182
Attracker	225,5 A	214,3 A	1188,67	0,65	2,571
Piwo ciemne refermentowane 10%	126,8 A	224,2 B	779,77	6,98	3,182
Piwo ciemne pasteryzowane 8%	169,2 A	229,5 B	692,25	4,58	3,182
Ocet winny czerwony	195,0 A	294,2 B	2169,58	4,26	3,182
Ocet winny biały	76,8 A	144,2 B	598,33	5,51	3,182
Roztw. fruktozy (100 g/100 ml)	171,2 A	160,7 A	6893,67	0,32	3,182
Roztw. sacharozy (100 g/100 ml)	137,5 A	151,0 A	364,5	0,11	3,182
Olejek pomarańczowy	348,0 A	254,7 B	3334,67	0,41	3,182
Olejek majerankowy	257,0 A	269,5 A	3782,5	0,16	3,182
Olejek eukaliptusowy	156,2 A	148,7 A	376,67	0,77	3,182
Olejek waniliowy	142,8 A	147,8 A	786,67	0,36	3,182
Olejek lawendowy	146,5 A	108,8 B	438,25	3,61	3,182
Olejek cebulowy	173,2 A	152,0 A	1162,92	1,25	3,182
Olejek tymiankowy	117,5 A	146,0 A	1624,5	7,46	3,182
Olejek sosnowy	163,8 A	184,5 A	506,92	1,84	3,182
Olejek bergamotowy	130,5 A	126,8 A	50,92	1,05	3,182
Obornik bydlęcy	236,5 A	279,5 A	10096,67	0,82	3,182

* średnie w kolumnach, oznaczone tymi samymi literami, nie różnią się statystycznie przy $\alpha = 0,05$



Przykładowe tablice lepowe, po lewej tablica stosowana w obecności olejku z mięty pieprzowej, po prawej kontrola



Przykładowe tablice lepowe, po lewej tablica stosowna w obecności octu winnego czerwonego, po prawej kontrola

Podsumowanie i wnioski

1. Na podstawie badań przydatności substancji podstawowych stosowanych wraz z lampami owadobójczymi, a także tablicami lepowymi do ograniczenia występowania bądź zmniejszenia populacji muchówek w uprawie pieczarki stwierdzono, że najlepsze właściwości wabiące miało piwo ciemne oraz ocet winny czerwony i biały.
2. Olejek cebulowy stosowany z lampami owadobójczymi wykazał nieistotny statystycznie efekt odstraszający.
3. Olejek z mięty pieprzowej stosowany wraz tablicami lepowymi miał statystycznie istotne właściwości odstraszające muchówki.
4. Gotowy produkt Attracter okazał się nieprzydatny w uprawie pieczarki, był neutralny wobec muchówek występujących w hali uprawowej.
5. Ocena przydatności olejków eterycznych do ograniczania ziemiówek w pieczarkarni wykazała, że olejek tymiankowy oraz obornik bydlęcy mogą działać wabiąco, a olejek pomarańczowy oraz lawendowy odstraszająco.

PODZADANIE 2.

Wpływ wybranych substancji podstawowych na ograniczanie najważniejszych chorób bakteryjnych w uprawie pieczarki.

Wstęp

Najczęściej pojawiającymi się chorobami bakteryjnymi pieczarki są plamistość brunatna wywoływana przez *Pseudomonas tolaasii* (Tolass, 1915; Paine 1919; Gill, 1995) i plamistość imbirowa wywoływana przez *Pseudomonas gingeri* (Soler-Rivas i wsp. 1999). W Polsce choroby te pojawiają się stosunkowo często, zwłaszcza w okresie jesienno-zimowym, gdy wilgotność powietrza jest wysoka. Objawami chorób bakteryjnych pieczarki są plamy na owocnikach o różnej barwie i nasileniu. W zależności od źródła infekcji, objawy i czas rozwoju choroby mogą być różne. Źródłem występowania bakterii może być okrywa torfowa, ale bakterie są też przenoszone na rękach, butach i sprzęcie używanym przez pracowników.

Plamistość brunatna objawia się pojawianiem się ciemno-brązowych, wklęsłych plam na kapeluszach, a w przypadku ostrego porażenia również na trzonkach grzybów (Largeteau i Savoie 2010; Wong i Preece 1980). Objawy chorobowe mogą pojawić się w każdym stadium rozwojowym grzybów uprawnych. Porażone owocniki stają się lepkie i często ulegają zniekształceniom. W przypadku zainfekowania młodych owocników, grzyby nie rozwijają się prawidłowo (Soler-Rivas i wsp. 1999; Soler-Rivas i wsp. 2000).

Plamistość imbirowa objawia się żółtobrązowymi plamami, które w miarę rozwoju zmieniają barwę na czerwono-rudą. Zmiany te są powierzchniowe, nie tworzą wgłębień na kapeluszach, jak to jest w przypadku plamistości brunatnej. Plamy rozwijają się przeważnie na obrzeżach kapeluszy, jednak w przypadku ostrej infekcji pokrywają również całą ich powierzchnię. Chorobę może wywołać niewielka liczba komórek bakterii, które w sprzyjających warunkach szybko namnażają się i powodują typowe objawy chorobowe (Wong i Preece 1982). Objawy plamistości często ujawniają się dopiero w warunkach chłodniczych, w trakcie przechowywania, przez co pieczarki tracą na jakości i wartości handlowej.



Pieczarki wyjęte z warunków chłodniczych po 3 dniach przechowywania.

Ochrona upraw pieczarki przed chorobami bakteryjnymi polega między innymi na przeprowadzaniu dezynfekcji w zakładzie pieczarkarskim, a na najpowszechniej stosowane są związki chlorowe, np. chlorowana woda podchlorynem sodu i dwutlenkiem chloru, kwas nadoctowy, a także związki czwartorzędowych soli amoniowych. Ważne jest umiejętne dawkowanie środków chlorowych, gdyż nadmiar chloru jest dla uprawy zdecydowanie niekorzystny i przyczynia się do uszkodzenia owocników. Natomiast zbyt małe stężenie preparatu nie działa dezynfekująco, a ponadto istnieje duże prawdopodobieństwo, że patogen uodporni się na środki chemiczne (Szymański i in., 2000; Szymański i Szudyga, 2004). Obecnie dąży się do ograniczenia stosowania środków chemicznych w trakcie wegetacji i przechowywania pieczarki, a jedyną metodą ochrony upraw grzybów przed bakteryjnymi patogenami jest profilaktyka i wysoka higiena w pieczarkarni przy zakładaniu uprawy, w trakcie rzutów oraz po zakończonym cyklu uprawowym.



Pieczarki porażone przez *P. tolaasii*.



Pieczarki porażone przez *P. gingeri*

W literaturze pojawiają się doniesienia o skuteczności olejków eterycznych i wyciągów roślinnych w ochronie pieczarki przed patogenami bakteryjnymi (Dawoud i Eweis 2006; Wang i wsp. 2016). Badania takie prowadzili również Soler-Rivas i in. (2006), którzy wykazali, że dodatek oleju z oliwek w ilości 10% do uprawy bocznika łyżkowatego *Pleurotus pulmonarius* hamuje rozwój objawów wywoływanych przez *P. tolaasii*. Stwierdzono, że właściwości bakteriobójcze miał 4-metylokatechol oraz katechol (związki obecne w wodzie otrzymanej podczas produkcji oleju z oliwek), natomiast Sokovic i Griensven (2006) przebadali olejki z rumianku pospolitego, mięty pieprzowej, lebidki pospolitej, bazylii pospolitej, tymianku właściwego, szałwii lekarskiej oraz ich składników jako inhibitory wzrostu bakterii patogenicznych. Największą aktywność bakteriobójczą wykazał olejek z lebidki pospolitej (oregano) oraz tymianku. Według Dawoud i Eweis (2006) wyciągi z szałwii czerwonokorzeniowej oraz cytryny zwyczajnej mogą również przyczynić się do zwalczania bakterii chorobotwórczych w uprawie pieczarki. Skuteczność wyciągów roślinnych w ograniczaniu innych patogenów grzybów uprawnych jest potwierdzana również w badaniach Górskiego i wsp. (2010), Regnier i Combrinck (2010) oraz Wang i wsp. (2016). Aktywność przeciwdrobnoustrojową potwierdzono również w przypadku chitozanu i jego pochodnych (Xing i wsp. 2014), natomiast ocet winny ma zastosowanie w ochronie roślin ozdobnych przed plamistością bakteryjną wywoływaną przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* oraz wykazano jego skuteczność w hamowaniu rozwoju *Pseudomonas tolaasii* w uprawie bocznika (Bruno i wsp. 2015). Wykorzystanie biologicznie czynnych ekstraktów roślinnych wydaje się być optymistyczną alternatywą do ochrony ekologicznych upraw pieczarki.

Cel badań

Badania miały na celu ocenę skuteczności substancji podstawowych, tj. wyciąg ze skrzypu polnego, chlorowodorek chitozanu, ocet winny oraz nadtlenek wodoru, w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych w uprawie ekologicznej pieczarki. Celem zadania było także zwrócenie uwagi na możliwość wykorzystania substancji biologicznie czynnych do ochrony upraw pieczarki przed patogenami bakteryjnymi.

Metody badań

1. Badania *in vitro*

1.1. Badania prowadzono w laboratorium mikrobiologicznym, wyposażonym w komorę laminarną, cieplarkę inkubacyjną, badawczy mikroskop świetlny.

1.2. Namnażanie i pozyskiwanie izolatów bakteryjnych

Pieczarki z objawami chorób bakteryjnych pozyskano z pieczarkarni z rejonu łódzkiego, opolskiego, poznańskiego oraz rzeszowskiego. Porażoną tkankę owocnika wykładano na agarową pożywkę odżywczą, odpowiednią dla bakterii, i inkubowano w temperaturze 24°C przez 24 godziny. Następnie z namnożonej biomasy bakteryjnej wykonywano posiew redukcijny i otrzymywano pojedyncze kolonie bakterii, które namnażano na skosach agarowych. Czyste kultury bakteryjne przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C i wykorzystywano do dalszych badań. Na podstawie testów mikrobiologicznych i biochemicznych, a także testów patogeniczności bakterie identyfikowano, jako chorobotwórcze wobec pieczarki.

Przed przystąpieniem do doświadczeń bakterie namnażano w odżywczej pożywce płynnej (Nutrient Agar), odpowiedniej dla wzrostu bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i inkubowano w temperaturze 24°C

przez 24 godziny. Aktywne izolaty bakteryjne wykorzystywano do badań skuteczności substancji podstawowych.

Do badań wykorzystywano następujące izolaty bakterii:

- *Pseudomonas tolaasii*: MG, HA, LE, BO, BI

- *Pseudomonas gingeri*: MO, 3A, B5, B12, P1, które pochodziły z kolekcji własnej Pracowni Grzybów Uprawnych lub zostały pozyskane z porażonych pieczarek, a następnie poddane identyfikacji.

1.3. Ocena skuteczności substancji podstawowych w badaniach *in vitro*

Skuteczność czterech substancji podstawowych, tj. chlorowodorek chitozanu, ekstrakt ze skrzypu polnego, ocet winny oraz nadtlenek wodoru, badano metodą rozcieńczeń w próbkach z podłożem płynnym, w którym przygotowano odpowiednie stężenia badanych substancji (tabela 9). Dobór stężeń substancji opierał się na danych literaturowych i etykietach produktów.

Do próbek następnie dodawano 100 μ l zawiesiny bakterii o gęstości $1,0 \times 10^7$ jtk/ml. Próby inkubowano przez 48 h w temperaturze 24-25°C. Wzrost bakterii, na podstawie zmętnienia podłoża, określano po 24 i 48 godzinach inkubacji. Próby, w których nie stwierdzano wzrostu bakterii wysiewano na stałą odżywcę pożywkę (agar odżywczy). Po 48 h inkubacji w 24-25°C oceniano wzrost bakterii na pożywce stałej, licząc wyrosnięte kolonie bakteryjne. Najmniejsze stężenie preparatu hamujące wzrost bakterii w hodowli płynnej (drobnoustroj wykazuje wzrost na pożywce stałej) określa się jako wartość MIC. Najmniejsze stężenie środka, przy którym bakteria nie wykazywała wzrostu na pożywce zestalonej, określano jako MBC (najmniejsze stężenie bójcze) (Krzywicka i in. 1982). Skuteczność badanych substancji przebadano względem 10 izolatów bakteryjnych

Skuteczność bakteriobójczą substancji badano również metodą zawiesinową według Normy PN-EN 1276:2000, z modyfikacjami. Badania rozpoczęto od przygotowania serii stężeń badanych preparatów w próbkach zawierających po 9 ml destylowanej wody sterylnej. Do przygotowanych roztworów preparatów, w odstępach kilku sekundowych, dodawano 0,5 ml przygotowanej zawiesiny bakterii, o gęstości $1 \cdot 10^7$ jtk \cdot ml $^{-1}$, a następnie próbki mieszano na wytrząsarce typu Vortex. Po 5, 10, 15 (nadtlenek wodoru) i 30 minutach (ocet winny) ekspozycji bakterii w roztworach substancji o badanych stężeniach wykonywano posiew zawiesiny w ilości 0,1 ml do nowej płynnej pożywki mikrobiologicznej. Próby inkubowano w temperaturze 24°C przez 48 – 72 godziny, po czym odczytywano wyniki. Za próbę dodatnią określającą wzrost drobnoustrojów, czyli brak aktywności bakteriobójczej preparatu, uznawano próbę, w której obserwowano zmętnienie. Skuteczność badanych substancji przebadano względem 4 izolatów bakteryjnych.

W ramach zadania badano również skuteczność olejków roślinnych, będących substancjami biologicznymi i ekologicznymi. Były to olejek majerankowy, tymiankowy, sosnowy oraz z drzewa herbacianego (tabela 9). Skuteczność tych substancji badano na pożywkach stałych, do których dodawano badane olejki w odpowiednich stężeniach, a następnie na pożywkę wysiewano kultury bakteryjne.

Skuteczność badanych substancji przebadano względem 10 izolatów bakteryjnych.

Tabela 9. Badane substancje podstawowe oraz stosowane w badaniach stężenia

Substancja	Stężenie (%)	Metoda badania
Chlorowodorek chitozanu	0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0	Rozcieńczeń; płytkowa
Ekstrakt ze skrzypu polnego	2; 4; 6; 8; 10	rozcieńczeń
Ocet winny	0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,7; 0,8; 1,0; 2,0	rozcieńczeń
Nadtlenek wodoru	0,01; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1	rozcieńczeń
Olejek majerankowy	0,5; 1,0	płytkowa
Olejek z drzewa herbacianego	0,1; 0,25; 0,5; 1,0;	płytkowa
Olejek tymiankowy	0,025; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0;	płytkowa
Olejek sosnowy	0,1; 0,25; 0,5; 1,0;	płytkowa

2. Badania uprawowe *in vivo*

2.1. Ocena skuteczności substancji podstawowych w warunkach uprawowych

Badania przeprowadzono w klimatyzowanych halach, przystosowanych do uprawy pieczarki, zapewniając temperaturę 22-23°C, stężenie dwutlenku węgla na poziomie 3000 mg·dm⁻³ i względną wilgotność powietrza 90-92%. Doświadczenie przeprowadzono w doniczkach wypełnionych podłożem ekologicznym III fazy przerośniętym grzybnią pieczarki A15 w ilości 1,7 kg i ziemią okrywową o grubości 4 cm (pole powierzchni okrywy wynosiło 0,038 m²). Jednocześnie dla zapewnienia warunków optymalnych do wzrostu pieczarek, czyli zapewnienia właściwego stężenia dwutlenku węgla i utrzymania wysokiej wilgotności powietrza w obecności doniczek w tej samej hali na dolnych półkach uprawiano pieczarki.



Doświadczenie doniczkowe w Pracowni Grzybów Uprawnych.

Do badań wykorzystano, dwa izolaty bakteryjne z gatunku *P. tolaasii* i *P. gingeri*, wytypowane w badaniach laboratoryjnych. Przygotowane doniczki z podłożem pieczarkowym III fazy i okrywą,

zainfekowano zawiesiną bakterii o gęstości 1×10^4 i 1×10^6 jtk/ml w ilości 10 ml w piątym dniu po nałożeniu okrywy, co warunkowało uzyskanie około $2,6 \times 10^6$ i $2,6 \times 10^8$ komórek na m^2 okrywy.

Po zainfekowaniu okrywy, uprawa została podlana wodnymi zawiesinami substancji podstawowych w odpowiednich stężeniach, tj. nadtlenuk wodoru w stężeniu 0,05 i 0,5% oraz ocet winny w stężeniu 1,0 i 2,0%.

W pierwszym i drugim rzucie owocników określano przebieg rozwoju choroby bakteryjnej, na podstawie stopnia nasilenia objawów (ilość i jakość plam na owocnikach), szybkość pojawienia się pierwszych objawów oraz plon owocników zdrowych i porażonych. Obserwacje prowadzono codziennie od momentu pojawienia się zawiązków grzybów, aż do końca trwania rzutu owocników.

Ponadto obliczono nasilenie występowania objawów chorobowych w pierwszym i drugim rzucie pieczarki jako stosunek plonu owocników porażonych do całkowitego plonu uzyskanego w danej kombinacji według wzoru: $NC (\%) = (P_{oc} / P_c) \cdot 100\%$, gdzie: P_{oc} – plon owocników chorych; P_c – plon całkowity (plon owocników zdrowych i chorych).

Doświadczenie miało charakter dwuczynnikowy. Czynnikiem pierwszym stanowiły różne koncentracje liczby bakterii, zaś drugim były stosowane substancje podstawowe. Uprawę przeprowadzono dwukrotnie, a każda kombinacja obejmowała 4 powtórzenia. Uzyskane wyniki poddano analizie wariacji dwuczynnikowej przy poziomie istotności $p = 0,05$.

Wyniki

1. Skuteczność substancji podstawowych w warunkach *in vitro*

Skuteczność bakteriobójczą chlorowodoru chitozanu w stężeniach 1,0; 2,0 i 5,0% oraz ekstraktu ze skrzypu polnego w stężeniach 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 i 10,0% badano metodą płytkową oraz rozcieńczeń w podłożu płynnym w stosunku do 3 bakterii z gatunku *Pseudomonas tolaasii* i 3 bakterii z gatunku *Pseudomonas gingeri*. Wykazano brak wrażliwości bakterii patogenicznych pieczarki na badane substancje w badanych stężeniach (tabela 10). Stwierdzono, że badane substancje nie ograniczają rozwoju bakterii patogenicznych pieczarki, stąd uznano je za nieprzydatne do ochrony upraw pieczarki przed patogenami bakteryjnymi. Dalsze zwiększanie stężeń badanych substancji nie byłoby ekonomiczne, gdyż preparaty ekologiczne na bazie tych substancji mają zastosowanie do ochrony ekologicznych upraw ogrodnich przed chorobami grzybowymi w stężeniu 1%.

Tabela 10. Ocena wzrostu izolatów *P. tolaasii* i *P. gingeri*

Izolat	Stężenie (%) chlorowodoru chitozanu w pożywce płynnej	Stężenie (%) chlorowodoru chitozanu w pożywce stałej	Stężenie ekstraktu ze skrzypu polnego (%) w pożywce płynnej
	0,5; 1,0;	2,0; 5,0	2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0
MG	+	+	+
BO	+	+	+
BI	+	+	+
MO	+	+	+
3A	+	+	+
B5	+	+	+

* + bakterie wykazały wzrost w pożywce płynnej i na pożywce stałej

W kolejnym etapie w warunkach laboratoryjnych badano skuteczność nadtlenuku wodoru oraz octu winnego w hamowaniu rozwoju bakterii chorobotwórczych. Na podstawie uzyskanych wyników określono stężenie hamujące wzrost bakterii w pożywce płynnej (MIC) oraz stężenie bakteriobójcze

(MBC), które oznaczano na pożywce stałej. W tabeli 11 i 12 przedstawiono wyniki skuteczności bakteriobójczej badanych substancji.

Bakterie patogeniczne wykazały zróżnicowaną wrażliwość na nadtlenek wodoru w stężeniach 0,02 – 0,05%. Rozwój izolatów z gatunku *P. tolaasii* był zahamowany przy stężeniu 0,02% tej substancji, a stężeniem bakteriobójczym było 0,03%. W przypadku gatunku *P. gingeri* stężeniem hamującym ich wzrost było 0,02 – 0,04 %, a bakteriobójczym 0,04 – 0,05% w zależności od izolatu (Tabela 11). Można więc stwierdzić, że stężeniem bakteriobójczym dla wszystkich badanych bakterii patogenicznych pieczarki jest 0,05%.

Tabela 11. Wartości stężeń MIC i MBC dla nadtlenu wodoru względem badanych bakterii

Izolat	Stężenie nadtlenu wodoru (%)							MIC	MBC
	0,0	0,005	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05		
MG	+	+	+	-	-	-	-	0,02	0,03
BO	+	+	+	-	-	-	-	0,02	0,03
BI	+	+	+	-	-	-	-	0,02	0,03
HA	+	+	+	-	-	-	-	0,02	0,04
LE	+	+	+	-	-	-	-	0,02	0,03
	średnia							0,02	0,03
MO	+	+	+	-	-	-	-	0,02	0,04
3A	+	+	+	+	+	-	-	0,04	0,05
P1	+	+	+	+	-	-	-	0,03	0,04
B5	+	+	+	+	+	-	-	0,04	0,05
B12	+	+	+	+	+	-	-	0,04	0,05
	średnia							0,03	0,04

Przeprowadzone badania wykazały również aktywność bakteriobójczą octu winnego. W zależności od izolatu bakteryjnego obserwowano różną skuteczność badanej substancji. Rozwój bakterii był hamowany przy stężeniu 0,4% w przypadku *P. tolaasii* (4 izolaty) i 0,3% w przypadku *P. gingeri* (4 izolaty). Średnie stężenie bakteriobójcze dla octu winnego wynosiło 0,7% (izolaty *P. tolaasii*) i 0,64% (izolaty *P. gingeri*), natomiast dla poszczególnych bakterii było w szerokim zakresie, tj. od 0,5 do 1,0% w zależności od izolatu (tabela 12). Należy, więc przyjąć, że w warunkach laboratoryjnych według zastosowanej metody stężeniem bakteriobójczym dla octu winnego jest 1%.

Tabela 12. Wartości stężeń MIC i MBC dla octu winnego względem badanych bakterii

Izolat	Stężenie octu winnego (%)									MIC	MBC
	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	1,0		
MG	+	+	+	+	-	-	-	-	-	0,5	1,0
BO	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0,4	0,7
BI	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,5
HA	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0,4	0,7
LE	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0,4	0,7
	średnia									0,4	0,7
MO	+	+	+	-	-	-	-	-	-	0,4	0,5
3A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,5
P1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,7
B5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0
B12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,5
	średnia									0,3	0,64

Bardziej restrykcyjne wyniki oceny skuteczności biobójczej substancji uzyskano na podstawie badań według normy PN-EN 1276:2010, określające skuteczność bakteriostatyczną środków w ciągu 5, 10 i 15 minut. Wyniki te informują czy roztwór substancji w danym stężeniu w ciągu ustalonego czasu ma działanie hamujące rozwój bakterii, a uzyskane stężenia można przyjąć za użytkowe lub dezynfekcyjne. Wyniki wzrostu bakterii uzyskane według zastosowanej metody normatywnej zawarto w tabeli 13 i 14. Wzrost bakterii określano po 24 i 48 godzinach inkubacji. Wykazano, że ekspozycja bakterii patogenicznych pieczarki w roztworze octu w stężeniach 0,5-2,0% przez 5–30 minut nie wpłynęła na zahamowanie rozwoju bakterii. Rozwój bakterii w pożywce płynnej był obserwowany już 24 godzinach. Stężenia biobójcze uzyskane tą metodą różnią się znacząco od ustalonego stężenia metodą rozcieńczeń, czyli w przypadku, gdy dane stężenie substancji ma kontakt z drobnoustrojem cały czas podczas trwania hodowli.

Wyniki uzyskane dla nadtlenu wodoru były bardziej zróżnicowane w zależności od izolatu i czasu inkubacji.

Po 24 godzinach inkubacji stwierdzono, że bakterie przy stężeniu 0,075% nie wykazują wzrostu, z wyjątkiem izolatu *P. tolaasii* (MG), już po 5 minutowym kontakcie z substancją. Izolat MG został zahamowany przy stężeniu 0,05% po 5 minutach ekspozycji i po 0,025% po 15 minutach. Obserwacje wzrostu bakterii po 48 godzinach wykazały, że stężeniem hamującym jest 0,2%. Jedynie izolat *P. gingeri* 3A wykazał wzrost przy tym stężeniu po 5 i 10 minutowej ekspozycji na substancję. Na podstawie uzyskanych wyników można przyjąć, że stężenie 0,2% jest stężeniem hamującym wzrost bakterii, ale zależnym od czasu kontaktu bakterii z substancją. W warunkach laboratoryjnych obserwowano wzrost jednego izolatu przy tym stężeniu, jednak należy zaznaczyć, że pożywka mikrobiologiczna to warunki optymalne do rozwoju bakterii. W warunkach niesprzyjających rozwój bakterii jest utrudniony, co może wpłynąć na zalecaną wartość użytkową stężenia substancji.

Tabela 13. Wzrost bakterii patogenicznych pieczarki po 24 godzinach inkubacji w zależności od stężenia substancji podstawowej

Substancja	Stężenie (%)	Czas ekspozycji (min)											
		5				15				30			
Ocet winny		MG	BO	MO	3A	MG	BO	MO	3A	MG	BO	MO	3A
	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nadtlenek wodoru		5				10				15			
	0,025	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	0,05	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	0,075	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

*+ wzrost bakterii; – brak wzrostu

Tabela 14. Wzrost bakterii patogenicznych pieczarki po 48 godzinach inkubacji w zależności od stężenia substancji podstawowej

Substancja	Stężenie (%)	Czas ekspozycji (min)												
		5				15				30				
Ocet winny		MG	BO	MO	3A	MG	BO	MO	3A	MG	BO	MO	3A	
	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nadtlenek wodoru		5				10				15				
	0,025	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,075	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	0,1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
0,2	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	

+ wzrost bakterii; – brak wzrostu

W ramach podzadania sprawdzono również przydatność czterech olejków roślinnych w hamowaniu rozwoju bakterii. Wykazano wysoką aktywność bakteriobójczą olejka tymiankowego i z drzewa herbacianego. Większość izolatów była wrażliwa na stężenie 0,25%, a stężenie 0,5% było bakteriobójcze dla wszystkich izolatów. Dwa izolaty *P. tolaasii*, tj. HA i LE, oraz trzy spośród *P. gingerii*, tj. 3A, P1 i B5 wyróżniały się największą odpornością na badane olejki. Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejków w tak niskich stężeniach powinna być dokładniej zbadana, celem wykorzystania ich w ochronie pieczarki przed bakteriami patogenicznymi. Olejek majerankowy oraz sosnowy nie hamowały rozwoju bakterii przy stężeniu 1%. W ramach tego projektu nie badano wyższych stężeń olejków, ze względów ekonomicznych, tj. brak możliwości wykorzystania wyższych stężeń w praktyce. Stwierdzono, zatem brak przydatności tych substancji do ograniczania występowania patogenów bakteryjnych w uprawie pieczarki.

Tabela 15. Stężenia (%) bakteriobójcze olejków roślinnych w stosunku do bakterii patogenicznych

Izolat	Olejek z drzewa herbacianego			Olejek tymiankowy			Olejek majerankowy	Olejek sosnowy
	0,25	0,5	0,75	0,25	0,5	0,75	1,0	1,0
MG	-*	-	-	-	-	-	+	+
BO	-	-	-	+	-	-	+	+
BI	-	-	-	-	-	-	+	+
HA	+	-	-	+	-	-	+	+
LE	+	-	-	+	-	-	+	+
MO	-	-	-	-	-	-	+	+
3A	+	-	-	+	-	-	+	+
P1	+	-	-	+	-	-	+	+
B5	+	-	-	+	-	-	+	+
B12	-	-	-	-	-	-	+	+

*- brak wzrostu

+ wzrost bakterii

2. Skuteczność substancji podstawowych w warunkach uprawowych

Na podstawie badań laboratoryjnych oceny skuteczności środków bakteriobójczych do badań uprawowych wybrano nadtlenek wodoru oraz ocet winny, które wykazywały ograniczenie lub zahamowanie rozwoju badanych bakterii, tj. odpowiednio, w stężeniach 0,05% i 0,5% oraz 1 i 2%.

Po zainfekowaniu uprawy pieczarki komórkami bakterii z gatunku *P. tolaasii* i *P. gingeri* w ilości około $2,6 \times 10^6$ i $2,6 \times 10^8$ komórek na m^2 okrywy objawy chorobowe w postaci plam i przebarwień na owocnikach obserwowano w pierwszym rzucie we wszystkich badanych próbach.

W pierwszym rzucie plon owocników zdrowych wynosił 421,3 i 438,8 g·0,038 m^{-2} odpowiednio dla prób infekowanych izolatami MG i MO, przy liczbie komórek $2,6 \cdot 10^6$ na m^2 okrywy. Uzyskany plon owocników nie różnił się od plonu w próbach kontrolnych, nieinfekowanych (tabela 16). Nasilenie choroby było na poziomie 10% dla badanych izolatów (wykres 1). Zastosowanie substancji podstawowych nie wpłynęło istotnie na ograniczenie rozwoju choroby. W przypadku obydwu substancji w uprawie obserwowano podobne wartości owocników zdrowych i porażonych.

Plon owocników przy porażeniu uprawy liczbą komórek $2,6 \cdot 10^8$ na m^2 okrywy równał się 120,6 i 196,3 g·0,038 m^{-2} , odpowiednio, dla MG i MO, i był istotnie niższy od plonu uzyskanego w próbach kontrolnych. Nasilenie choroby wynosiło około 70% w przypadku infekcji przez *P. tolaasii* i około 55% w przypadku infekcji przez *P. gingeri* (wykres 1). Po zastosowaniu nadtlenu wodoru nie stwierdzono zwiększenia plonu owocników zdrowych w próbach infekowanych izolatami MG. W przypadku izolatu MO obserwowano zmniejszenie objawów choroby i istotne zwiększenie plonu owocników zdrowych, po zastosowaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 0,5%. Nasilenie choroby również uległo istotnemu zmniejszeniu, tj. z 55% na niecałe 33% (wykres 1). Zastosowanie octu winnego w stężeniu 1 i 2% miało także wyraźny wpływ na zwiększenie plonu owocników zdrowych i zmniejszenie nasilenia infekcji spowodowanej również przez izolat MO, a w stężeniu 2% zmniejszenie nasilenia objawów spowodowanych przez MG (tabela 16, wykres 1).

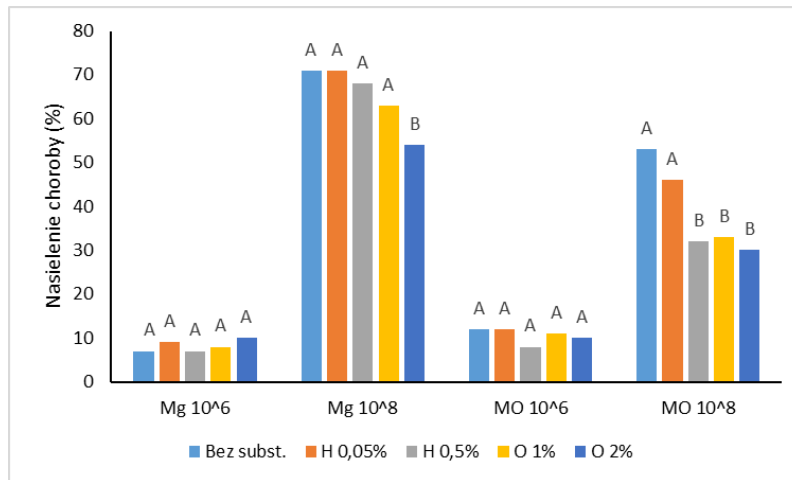
Na podstawie uzyskanych danych wykazano, że plon owocników zdrowych pierwszego rzutu był wysoko skorelowany z nasileniem objawów choroby bakteryjnej, $r = 0,9849$ (wykres 2).

Tabela 16. Plon owocników (kg/ m^2) w pierwszym rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) i *Pseudomonas gingeri* (MO) w zależności o zastosowanej substancji podstawowej

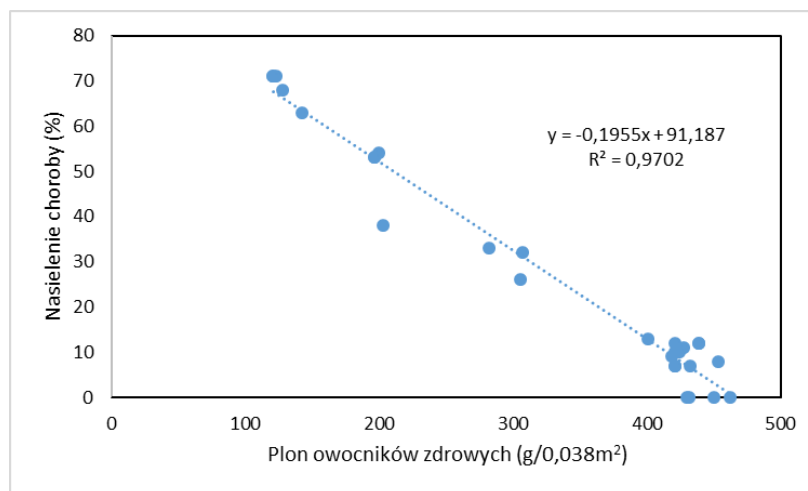
Liczba komórek (jtk/ m^2 okrywy)	Stan owocników	Preparat			
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny	
		MG	MO	MG	MO
Kontrola bez infekcji		430,1 a*	450,4 a	432,0 a	462,3 a
$2,6 \times 10^6$	zdrowe	421,3 a	438,8 a	421,3 a	438,8 a
	porażone	32,4 d	63,2 d	32,4 e	63,2 f
$2,6 \times 10^6$ + preparat (0,05%; 1%)	zdrowe	418,6 a	421,5 a	400,7 a	428,0 a
	porażone	41,5 d	59,5 d	62,1 e	58,2 f
$2,6 \times 10^6$ + preparat (0,5%; 2%)	zdrowe	432,7 a	453,3 a	421,5 a	424,3 a
	porażone	37,2 d	41,3 d	50,2 e	52,3 f
$2,6 \times 10^8$	zdrowe	120,6 c	196,3 c	120,6 d	196,3 b
	porażone	300,3 b	224,5 c	300,3 b	224,5 bc
$2,6 \times 10^8$ + preparat (0,05%; 1%)	zdrowe	122,6 c	203,3 c	142,0 d	282,0 cd
	porażone	313,7 b	179,6 cd	247,5 c	141,5 e
$2,6 \times 10^8$ + preparat (0,5%; 2%)	zdrowe	127,6 c	307,3 b	199,8 d	305,3 d
	porażone	276,5 b	151,3 d	241,0 c	118,5 e

* średnie w kolumnach, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

Objaśnienia: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,05% i 0,5%; ocet winny stosowany w stężeniach 1% i 2%



Wykres 1. Nasilenie chorób bakteryjnych w zależności od porażenia przez *P. tolaasii* i *P. gingeri* oraz zastosowanej substancji podstawowej w I rzucie



Wykres 2. Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby w I rzucie

W drugim rzucie plon owocników zdrowych wynosił 209,5 i 246,2 g·0,038 m⁻² okrywy, odpowiednio, dla *P. tolaasii* MG i *P. gingeri* MO, przy liczbie komórek bakterii wynoszącej 2,6·10⁶ na m² okrywy (tabela 17) i był istotnie niższy od plonu w próbach kontrolnych. Nasilenie choroby było na poziomie około 25% dla dwóch badanych izolatów. Plon owocników zdrowych w przypadku obydwu izolatów wzrósł istotnie po zastosowaniu nadtlenu wodoru w stężeniu 0,5%. Ponadto zmniejszeniu uległo nasilenie chorób w uprawach infekowanych obydwoma badanymi bakteriami (wykres 3). Zastosowanie octu winnego w stężeniu 2% spowodowało istotne zwiększenie plonu owocników zdrowych w uprawie infekowanej izolatem MG, a zmniejszenie nasilenia objawów obserwowano także przy 1% stężeniu octu. W przypadku upraw z izolatem MO nie wykazano istotnych różnic w ograniczeniu infekcji przez roztwór octu, jednakże obserwowano mniejszy plon owocników porażonych (tabela 17).

Porażenie uprawy większą liczbą komórek (2,6·10⁸ na m² okrywy) przyczyniło się do nasilenia choroby do poziomu 50% w przypadku MG i 35% w przypadku MO. Plon owocników zdrowych kształtował się na poziomie 153,8 oraz 242,1 g na 0,038 m² okrywy i był istotnie niższy niż plon w próbach kontrolnych.

Zastosowanie nadtlenu wodoru i octu w stężeniach, odpowiednio 0,5% i 2%, spowodowało zmniejszenie nasilenia choroby w uprawie infekowanej przez izolat MG. W przypadku izolatu MO nie obserwowano istotnego zmniejszenia liczby porażonych grzybów (wykres 3).

Obliczona dla drugiego rzutu zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby bakteryjnej wskazała również na wysoką korelację, $r = 0,9247$ (wykres 4).

Z przeprowadzonych badań wynika, że infekcja wywoływana izolatem z gatunku *P. tolaasii* (MG) powodowała większe nasilenie choroby, zarówno w I, jak i w II rzucie, w porównaniu do gatunku *P. gingeri* (MO).

Badane substancje wykazały zróżnicowaną skuteczność w hamowaniu rozwoju plamistości bakteryjnej pieczarki, w zależności od rzutu owocników, izolatu i liczby komórek bakterii. W I rzucie przy wyższej liczbie komórek bakterii wywołującej infekcję uzyskano istotne zmniejszenie plonu owocników porażonych w próbach z MO, po zastosowaniu obu badanych substancji. W przypadku MG istotnie niższe porażenie owocników uzyskano jedynie po zastosowaniu octu winnego w stężeniu 2%. W II rzucie przy niższej liczbie bakterii obserwowano zmniejszenie porażenia przez MG po zastosowaniu, zarówno nadtlenu wodoru, jak i octu winnego. W przypadku izolatu MO, uzyskano podobną zależność, ale istotny wynik stwierdzono tylko dla nadtlenu wodoru w stężeniu 0,5%. Przy wyższej liczbie komórek zauważalne zmniejszenie nasilenia choroby obserwowano po traktowaniu uprawy wyższymi stężeniami badanych substancji, tj. 0,5% - nadtlenek wodoru i 2% - ocet winny.

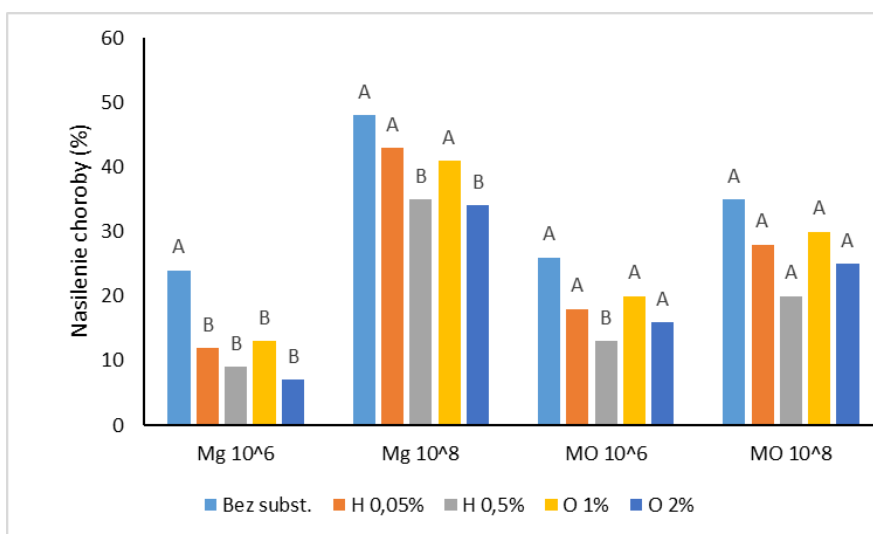
Uważa się, że wyniki uzyskane w projekcie przyczyniły się do poznania nowych możliwości kontrolowania chorób bakteryjnych w uprawie pieczarki. Zastosowanie octu winnego do ograniczenia plamistości bakteryjnej pieczarki wydaje się być dobrą alternatywą do innych chemicznych metod ochrony, a przede wszystkim mieć wykorzystanie w ekologicznej uprawie pieczarki. Wydaje się być uzasadnione dalsze badanie przydatności tej substancji i jej wpływ na nasilenie chorób bakteryjnych z uwzględnieniem np. terminu porażenia uprawy, stosując inne stężenia bądź częstotliwość podawania tej substancji.

Tabela 17. Plon owocników (kg/m²) w drugim rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) i *Pseudomonas gingeri* (MO) w zależności od zastosowanej substancji podstawowej

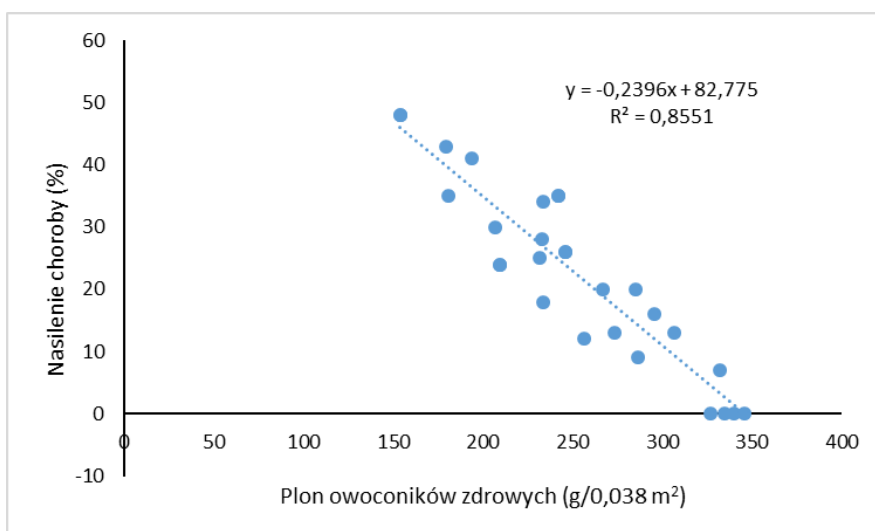
Liczba komórek [jtk/m ² okrywy]	Stan owocników	Preparat			
		Nadtlenek wodoru		Ocet winny	
		MG	MO	MG	MO
Kontrola bez infekcji		326,6 a*	339,6 a	345,8 a	334,4 a
2,6 x 10 ⁶	zdrowe	209,5 b	246,2 b	209,5 b	246,2 b
	porażone	51,3 c	64,4 c	51,3 d	64,4 c
2,6 x 10 ⁶ + preparat (0,05%; 1%)	zdrowe	256,3 b	233,5 b	273,5 b	285,3 b
	porażone	37,5 c	43,1 c	42,0 d	58,3 c
2,6 x 10 ⁶ + preparat (0,5%; 2%)	zdrowe	286,8 a	306,5 c	332,3 a	295,3 b
	porażone	28,2 c	45,9 c	26,0 d	63,8 c
2,6 x 10 ⁸	zdrowe	153,8 b	242,1 b	153,8 bc	242,1 b
	porażone	145,5 b	84,8 c	145,5 bc	84,8 c
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,05%; 1%)	zdrowe	179,5 b	232,9 b	194,0 bc	206,8 b
	porażone	140,9 b	95,0 c	136,6 c	88,9 c
2,6 x 10 ⁸ + preparat (0,5%; 2%)	zdrowe	181,0 b	266,5 b	233,7 b	231,8 b
	porażone	97,5 c	67,8 c	122,3 c	79,2 c

* średnie w kolumnach w obrębie poszczególnych kombinacji, oznaczone tą samą literą, nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$

Objaśnienia: nadtlenek wodoru stosowany w stężeniach 0,05% i 0,5%; ocet winny stosowany w stężeniach 1% i 2%



Wykres 3. Nasilenie chorób bakteryjnych w zależności od izolatu i zastosowanej substancji podstawowej w II rzucie



Wykres 4. Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby w II rzucie

W ramach tematu dodatkowo zbadano skuteczność testowanych substancji podstawowych w hamowaniu rozwoju plamistości bakteryjnej bezpośrednio na owocnikach.

Owocniki pieczarki inokulowano punktowo zawiesiną zawierającą 10^6 komórek bakterii w ilości 100 μ l, a następnie w te same miejsca w ilości 100 μ l nanoszono badane substancje w odpowiednim stężeniu, tj. nadtlenek wodoru w stężeniu 0,05% oraz ocet w stężeniu 0,5%. Kontrole stanowiły owocniki, na które punktowo naniesiono sterylną wodę. Grzyby w pojemnikach przechowywano w lodówce przez 72 godzinach, a następnie dokonano obserwacji zmian powierzchniowych na kapeluszach grzybów. Wyniki obserwacji przedstawiono na fotografiach.

Stwierdzono, że owocniki inokulowane sterylną wodą pozostały niezmienione, nie obserwowano na nich żadnych przebarwień.

Infekcja owocników zawiesiną bakterii, wywołała plamy na powierzchni charakterystyczne dla danego gatunku. W przypadku *P. gingeri* były to jasno pomarańczowe plamy, nietworzące wgłębień, w przypadku *P. tolaasii* obserwowano ciemne brązowe plamy.

Owocniki potraktowane dodatkowo roztworem octu miały także objawy chorobowe. Ocet winny nie wykazał w tych warunkach aktywności bakteriostatycznej. Na owocnikach, na które наносzono dodatkowo roztwór nadtlenu wodoru nie obserwowano plamistości, bądź plamy te były o mniejszym nasileniu, tak jak w przypadku owocników, które infekowano izolatem 3A. Należy zaznaczyć, że izolat ten był najbardziej odporny na działanie roztworu nadtlenu wodoru, w warunkach laboratoryjnych określonych według normy PN-EN 1276:2010.



Objawy plamistości imbirowej – *P. gingeri* MO



Objawy plamistości imbirowej – *P. gingeri* 3A



Objawy plamistości rdzawej – *P. tolaasii* MG

Owocniki traktowane zawiesiną bakterii (I rząd), zawiesiną bakterii i roztworem octu w stężeniu 0,05% (II rząd) oraz zawiesiną bakterii i nadtlakiem wodoru w stężeniu 0,5%

Podsumowanie i wnioski

1. Badano skuteczność czterech substancji podstawowych, chlorowodoru chitozanu, ekstraktu ze skrzypu polnego, nadtlenu wodoru i octu winnego w hamowaniu rozwoju bakterii patogenicznych pieczarki, tj. *Pseudomonas tolaasii* i *Pseudomonas gingeri*.
2. Nie wykazano aktywności bakteriobójczej chlorowodoru chitozanu i ekstraktu ze skrzypu polnego w stężeniu 1%.

3. Określono aktywność bakteriobójczą i bakteriostatyczną nadtlenu wodoru w stężeniach 0,02 – 0,05%. Badane bakterie wykazały zróżnicowaną wrażliwość na tą substancję, a stężeniem bakteriobójczym w warunkach *in vitro* było 0,05%.
4. Badania wykazały aktywność bakteriobójczą octu winnego i w zależności od wrażliwości izolatów określono stężenia bakteriobójcze i bakteriostatyczne. W przypadku *P. tolaasii* stężeniem hamującym wzrost bakterii było 0,4%, a w przypadku *P. gingeri* – 0,3%. Stężenie bakteriobójcze określono na 1% w warunkach *in vitro*.
5. Ocena skuteczności biobójczej nadtlenu wodoru i octu winnego według normy PN-EN 1276:2010, określająca skuteczność bakteriostatyczną substancji w ciągu 5, 10 i 15 minut, wykazała, że ekspozycja bakterii w roztworze octu w stężeniu 2,0% przez 30 minut nie wpłynęła na zahamowanie ich rozwoju. Nadtlenek wodoru w badanej metodzie zahamował rozwój bakterii w stężeniu 0,2%.
6. Wykazano aktywność bakteriobójczą olejku tymiankowego i z drzewa herbacianego w stężeniu 0,5% względem wszystkich badanych izolatów.
7. W warunkach uprawowych nadtlenek wodoru oraz ocet winny wykazały zróżnicowaną skuteczność w ograniczaniu bakteryjnej plamistości w zależności od stężenia substancji, rzutu owocników oraz izolatu bakteryjnego i liczby komórek wywołujących infekcję.
8. Nadtlenek wodoru w stężeniu 0,05% i 2% ograniczył nasilenie choroby wywołanej przez *P. tolaasii* w II rzucie, gdy plamistość wystąpiła na poziomie 25% i większym.
9. Nadtlenek wodoru w stężeniu 2% ograniczył istotnie występowanie plamistości wywoływanej przez *P. gingerii* w I i II rzucie.
10. Zastosowanie octu winnego wpłynęło na zmniejszenie nasilenia plamistości wywoływanej przez *P. tolaasii* i *P. gingeri* w I rzucie, przy czym ocet w stężeniu 2% wykazał większą skuteczność. W II rzucie istotne zmniejszenie plonu owocników porażonych obserwowano jedynie dla izolatu *P. tolaasii*.
11. Zastosowanie nadtlenu wodoru i octu winnego do ograniczenia plamistości bakteryjnej pieczarki jest alternatywą dla innych chemicznych metod ochrony, a przede wszystkim może być wykorzystane w ekologicznej uprawie pieczarki.

LITERATURA

- Abou-Zeid M.A. 2012. Pathogenic variation in isolates of *Pseudomonas* causing the brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(3): 1137–1146.
- Bruno G.L., Corato U.D., Rana G.L., Luca P.D., Pipoli V., Lops R., Scarola L., Manneruccia F., Piscitelli L., Cariddi C. 2015. Suppressiveness of white vinegar and steam-exploded liquid waste against the causal agents of *Pleurotus eryngii* yellowing. *Crop Protection*, 70: 61-69.
- Dawoud M.E.A., Eweis M. 2006. Phytochemical control of edible mushrooms pathogenic bacteria. *J. Food Agr. Environ.* 4(1): 321-324.
- Diderot T. 2016. Evaluation of a push-pull strategy against fungus gnats (Diptera: Sciaridae). <https://stud.epsilon.slu.se/9700/>
- Fermor T.R., Lynch J.M. 1988. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*: Screening, isolation and characterization of bacteria antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). *J. Appl. Microbiol.* 65: 179-187.
- Fletcher J. T., Gaze R. H. 2008. Mushroom Pest and Disease Control: A Colour Handbook. Manson Publishing LTD, London, 192 pp.
- Gill W.M. 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. *Rep. Tottori Mycol. Ins.* 33: 34-55
- Górski, R. 2004. Effectiveness of natural essential oils added to yellow sticky traps in the monitoring of sciarid flies [Sciaridae]. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Ogrodnictwo*, 38: 43-48.

- Górski, R. 2005. Effectiveness of natural essential oils added to blue sticky traps in the monitoring of the occurrence of sciarid flies (Sciaridae). *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Ogrodnictwo*, 39: 27-32.
- Górski R., Sobieralski K., Siwulski M., Góra K. 2010. Effect of selected natural essential oils on in vitro development of fungi *Trichoderma harzianum* found in common mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 17 (2): 177-185.
- Krzywicka H., Bielicka A., Janowska J., Jaszczuk E., Tadeusiak B. 1982. Metody badania aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych. Wydawnictwo metodyczne PZH
- Lewandowski M. 1999. Muchówki (Diptera) w: Ochrona pieczarki (red. Maszkiewicz J.) Hortpress, Warszawa, 111-123
- Motała R. 2018. Wykaz środków ochrony roślin do produkcji ekologicznej. <https://www.ior.poznan.pl/19,wykaz-srodkow-ochrony-roslin-do-produkcji-ekologicznej>
- Olivier J.M., Mamoun M., Munsch P. 1997. Standardization of the a method to assess mushroom blotch resistance in cultivated and wild *Agaricus bisporus* strains. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19: 36–42
- Paine S.G. 1919. Studies in bacteriosis. II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Ann. Appl. Biol.* 5: 206-219.
- Regnier T., Combrinck S. 2010. In vitro and in vivo screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. *South African Journal of Botany*, 76 (4): 681-685.
- Soković M., Van Griensven L.J.L.D. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 116(3): 211-224.
- Soler–Rivas C., Arpin N., Oliver J.-M., Wichers H.J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (5): 591-614.
- Soler–Rivas C., Arpin N., Oliver J.-M., Wichers H.J. 2000. Discoloration and tyrosinase activity in *Agaricus bisporus* fruit bodies infected with various pathogens. *Mycol. Res.* 104: 351-356.
- Soler–Rivas C., Garcia-Rosado A., Polonia I., Junca-Blanch G., Marin F.R., Wichers H.J. 2006. Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 57(1): 37-44.
- Szafranek P., Lewandowski M. 2018. Zwalczenie muchówek w uprawie pieczarki metodą integrowaną – kierunki badań. *Biuletyn Producenta Pieczarek Pieczarki* 1: 48-51.
- Szumigaj-Tarnowska J., Uliński Z., Ślusarski C. 2012. Skuteczność wybranych preparatów dezynfekcyjnych w zwalczaniu patogenicznej bakterii *Pseudomonas tolaasii*. *Postępy w ochronie roślin/Progress in Plant Protection*, 52 (3): 701-706.
- Szymański J., Savage D.K., Głowacki J. 2000. Chlorine dioxide as new form chlorine for prophylaxis and controlling bacterial diseases and general disinfection AT cultivated mushroom house. *Proceedings of the XVth Czech and Slovak Plant Protection Conference*. Brno. 12-14.09.2000.
- Szymański J., Szudyga K. 2004. Wpływ niektórych preparatów dezynfekcyjnych na bakterie powodujące miękką zgniliznę pieczarki. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 497: 735-742.
- Tolaas A.G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5: 5.
- Wang G., Gong Y., Huang Z., Bian Y. 2016. Identification of and antimicrobial activity of plant extracts against *Pseudomonas putida* from rot fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. *Scientia Horticulturae*, 212 (22): 235-239
- Wong W.C., Preece T.F. 1980. *Pseudomonas tolaasi* in Mushroom Crops: A note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. *J. Appl. Bacteriol.* 49: 305-314.
- Wong W.C., Preece T.F. 1982. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: numbers of the bacterium and symptom development on mushrooms grown in various environments after artificial inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 87-96.
- Xing K., Zhu X., Peng X., Qin S. 2014. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(2):569-588

Zalecenia dla warzywnictwa ekologicznego

Zadania wykonane w ramach projektu przyczyniły się do określenia przydatności substancji podstawowych do ograniczania populacji szkodliwych muchówek występujących w uprawie pieczarki oraz w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych w uprawie ekologicznej pieczarki. Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące zalecenia:

1. Spośród badanych substancji podstawowych najlepsze właściwości wabiące ziemniórki ma piwo o wysokiej zawartości ekstraktu słodowego (piwo ciemne) oraz ocet winny. Zastosowanie tych substancji w obecności lampach owadobójczych bądź tablic lepowych, przyczynić się może do odławiania większej ilości muchówek na tych pułapkach, a więc ograniczenia ich populacji w uprawie pieczarki.
2. Celem odstraszenia owadów należy zastosować olejek cebulowy, z mięty pieprzowej bądź olejek lawendowy. Jednym ze sposobów jest ustawienie pojemników z tymi olejkami przed pieczarkarnią bądź wysmarowanie drzwi, co powinno skutecznie zadziałać odstrasżająco.
3. Celem ograniczenia chorób bakteryjnych w ekologicznej uprawie pieczarki można zalecić zastosowanie z ostatnią wodą podlewającą nadtlenek wodoru w stężeniu 0,05% bądź ocet winny w stężeniu 1-2%.
4. Nieodłączną zasadą ochrony ekologicznej uprawy pieczarki przed chorobami bakteryjnymi są także następujące metody agrotechniczne, na które składają się m.in.:
 - używanie sprawdzonych, wolnych od patogenów okryw pieczarkowych,
 - wyposażenie fal uprawowych w odpowiednie, sterylne filtry,
 - codzienna lustracja upraw, w celu szybkiego wykrycia infekcji i szybkiego reagowania,
 - zachowanie odpowiednich parametrów uprawowych (mikroklimatu) w halach, aby nie stwarzać warunków sprzyjających rozwojowi infekcji.
5. Za rozwój chorób bakteryjnych najczęściej odpowiadają nieodpowiednie warunki uprawowe, tj. zbyt wysoka wilgotność powietrza i temperatura w hali. Zaburzenia równowagi między temperaturą powietrza a temperaturą owocników, prowadzą do wzrostu ich wilgotności, a to jest przyczyną szybkiego namnażania się bakterii patogenicznych na powierzchni grzybów. Woda na owocnikach skrapla się, gdy temperatura punktu rosy (temperatura, w której para wodna w powietrzu przy określonym ciśnieniu staje się nasycona, a poniżej której staje się przesycona i skrapla się) jest wyższa niż temperatura powierzchni owocnika. W wilgotnych pomieszczeniach, ogrzewanie temperatury powietrza powoduje wzrost temperatury punktu rosy. Podgrzewanie temperatury pomieszczenia, należy rozpocząć jeszcze przed zabiegiem podlewania uprawy, w warunkach średniej wilgotności względnej, co ułatwia potem proces parowania wody z owocników bez kondensacji pary wodnej na grzybach.
6. Ponadto należy przestrzegać higieny w całym obiekcie oraz jego otoczeniu. Używać zdezynfekowanego sprzętu do zbierania grzybów, czystych skrzynek, pojemników, wózków i innych urządzeń używanych w pieczarkarni. Informować pracowników o konieczności zmian fartuchów, rękawiczek oraz butów w zależności od miejsca zbierania grzybów. Usuwać brudny sprzęt oraz trzonki grzybów z hal i korytarzy po zakończonym zbiorze.