

**PATOGENICZNOŚĆ IZOLATÓW *PSEUDOMONAS TOLAASII*
I *PSEUDOMONAS GINGERI* ORAZ ICH WRAŻLIWOŚĆ
NA WYBRANE ŚRODKI DEZYNFEKCYJNE**

**PATHOGENICITY OF *PSEUDOMONAS TOLAASII*
AND *PSEUDOMONAS GINGERI* ISOLATES
AND THEIR SENSITIVITY TO SELECTED DISINFECTANTS**

Joanna Szumigaj-Tarnowska, Zbigniew Uliński, Piotr Szafranek

Instytut Ogrodnictwa

Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

joanna.tarnowska@inhort.pl

Abstract

The aim of the research was to investigate the pathogenicity of *Pseudomonas tolaasii* and *P. gingeri* isolates against the white button mushrooms, *Agaricus bisporus*, and the effectiveness of disinfectants in the control of pathogenic bacteria. Bacterial isolates were derived from diseased mushroom caps. Mushroom crop was infected with bacteria suspension with different number of cells during phase called “shock”. The various pathogenicity of tested isolates was stated. *P. gingeri* isolates caused greater crop losses in the first flush of fruiting bodies, while *P. tolaasii* isolates – in the second flush. Disease symptoms were observed in the first flush of fruiting bodies after inoculation with 2.6×10^7 cfu per m² of casing and the yield loss was significantly lower than in the control sample. The yield of healthy fruiting in the both flushes was highly correlated with the severity of the bacterial disease. The sensitivity of the pathogenic bacteria to five disinfectants of different chemical composition, i.e. chloride dioxide, hydrogen peroxide, peracetic acid and quaternary ammonium compounds, was assessed *in vitro* conditions. The tested disinfectants revealed a high effectiveness in controlling bacteria. *P. tolaasii* isolates were more resistant to the tested agents than *P. gingeri*.

Key words: mushroom, *Agaricus bisporus*, *Pseudomonas tolaasii*, *Pseudomonas gingeri*, pathogenicity, disinfectants

WSTĘP

Warunki panujące w hali uprawowej, tj. wysoka wilgotność i temperatura, sprzyjają rozwojowi patogennych grzybów, bakterii i wirusów. Bakterie chorobotwórcze w uprawie pieczarki dwuzarodnikowej *Agaricus bisporus* powodują znaczne obniżenie plonów od 10 do 40%. Straty te dotyczą zarówno ilości zbieranych grzybów, jak i ich jakości. Po raz pierwszy chorobę bakteryjną pieczarki, określoną jako plamistość brunatną, opisał Tolaas w 1915 roku. Objawy chorobowe mogą pojawić się w każdym stadium rozwojowym grzybów. Choroba rozpoczyna się od ciemnobrązowych bądź brunatnych, wklęsłych plam na kapeluszach grzybów. Zmiany mogą pojawić się również na trzonkach.

W miarę rozwoju infekcji owocnik staje się miękki i śliski (Soler-Rivas i in. 1999). Przyczyną opisanych symptomów jest bakteria *Pseudomonas tolaasii* Paine (Paine 1919). Drugą ważną gospodarczo chorobą bakteryjną pieczarki jest plamistość imbirowa, wywoływana przez *P. gingeri*, która pojawiła się w latach 80. XX wieku (Wong i in. 1982). Choroba objawia się żółtobrazowymi plamami, które w miarę rozwoju zmieniają barwę na ciemnorudą. Zmiany na kapeluszach są powierzchniowe, przeważnie na ich obrzeżach i nie tworzą wgłębień. W przypadku ostrej infekcji pokrywają całą ich powierzchnię, a owocnik w miejscu dużych zmian może ulec popękaniu (Wong i in. 1982). Za wystąpienie i nasilenie plam bakteryjnych na powierzchni owocników bezpośrednio odpowiedzialna jest toksyna wydzielana przez bakterie. Chorobę może wywołać niewielka liczba komórek bakterii, które w sprzyjających warunkach szybko namnażają się i powodują plamy na owocnikach. Zmiany te mogą pojawić się również na pieczarkach w chłodni (Soler-Rivas i in. 1999; Iacobellis 2011).

W ochronie pieczarki przed chorobami bakteryjnymi zalecano stosowanie wody chlorowanej podchlorynem sodu o stężeniu aktywnego chloru 50–250 mg·dm⁻³ (Royse i Wuest 1980; Szymański i in. 2000). Obecnie dąży się do ograniczenia stosowania środków chemicznych w trakcie uprawy i przechowywania pieczarki, a jedyną metodą ochrony upraw grzybów przed bakteryjnymi patogenami jest profilaktyka – higiena i dezynfekcja zakładu. W zapobieganiu chorobom bakteryjnych ma także znaczenie zapewnienie odpowiedniego mikroklimatu w hali uprawowej oraz odpowiednie postępowanie podczas zabiegów podlewania. Do najczęściej stosowanych środków dezynfekcyjnych zalicza się te, które zawierają nadtlenek wodoru, podchloryn sodu, dwutlenek chloru i czwartorzędowe sole amoniowe (Uliński 2015).

Celem pracy była ocena patogeniczności sześciu izolatów bakteryjnych z gatunków *P. tolaasii* i *P. gingeri* w stosunku do pieczarki dwuzarodnikowej *Agaricus bisporus*. Oceniano również skuteczność wybranych preparatów dezynfekcyjnych w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych w warunkach laboratoryjnych.

MATERIAŁY I METODY

Izolaty

W badaniach wykorzystano patogeniczne dla pieczarki izolaty bakteryjne zdeponowane w Pracowni Grzybów Uprawnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Wybrano sześć izolatów bakteryjnych: *Pseudomonas tolaasii* oznaczonych jako Pt-MG, Pt-BO, Pt-BI oraz *Pseudomonas gingeri* – Pg-MO, Pg-3A, Pg-3B. Izolaty pochodziły z pieczarek z objawami choroby bakteryjnej. Przynależność gatunkową bakterii potwierdzono na podstawie badań biochemicznych oraz molekularnych, a patogeniczność na podstawie spełnionych postulatów Kocha (Szumigaj-Tarnowska i in. 2010; Szymański 2010).

Test patogeniczności

Patogeniczność izolatów badano w warunkach uprawowych – w donicach wypełnionych podłożem fazy III w ilości 1,7 kg, które było przerośnięte grzybnią pieczarki odmiany A15. Na kompost pieczarkowy nanoszono warstwę ziemi okrywowej o grubości 4 cm. Pole powierzchni okrywy wynosiło 0,038 m². Uprawę prowadzono w klimatyzowanych halach. Podczas przerostu okrywy przez grzybnię pieczarki zapewniono temperaturę 22–23 °C, stężenie dwutlenku węgla na poziomie 3000 mg·dm⁻³ i względną wilgotność powietrza 93–96%. Do dnia przeprowadzania szoku (tj. obniżenia temperatury do 17–18 °C, stężenia dwutlenku węgla 600–800 mg·dm⁻³ i wilgotności do poziomu 89–92%) uprawę codziennie podlewano wodą, zapewniając 1,5 dm³ na metr kwadratowy okrywy, co w efekcie dało 10,5 dm³ wody na metr kwadratowy okrywy. Uprawę zainfekowano w czasie szoku zawiesiną bakterii o różnej liczbie komórek, tj. 1×10^5 jtk·ml⁻¹ i 1×10^6 jtk·ml⁻¹ w ilości 10 ml na doniczkę, co warunkowało uzyskanie około $2,6 \times 10^7$ oraz $2,6 \times 10^8$ komórek bakterii na metr kwadratowy okrywy. Sporządzono wyjściową zawiesinę komórek bakterii o gęstości 0,5 wg skali McFarlanda, co odpowiadało ok. $1,5 \times 10^8$ jtk·ml⁻¹. Do przygotowania zawiesiny komórek użyto 24-godzinną hodowlę bakterii w pożywce płynnej.

Doświadczenie o charakterze dwuczynnikowym, w którym pierwszym czynnikiem była liczba bakterii, a drugim – izolat bakteryjny, przeprowadzono dwukrotnie. W pierwszym i drugim rzucie owocników obliczano plon grzybów zdrowych. Uzyskane wyniki opracowano metodą analizy wariancji. Różnice między średnimi z prób kontrolnych i badanych porównywano testem Newmana-Keulsa przy $p = 0,05$. 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: $NC (\%) = (Poc/Pc) \times 100\%$, gdzie: Poc – plon owocników chorych; Pc – plon całkowity (plon owocników zdrowych i chorych).

Skuteczność bakteriobójcza preparatów dezynfekcyjnych

Skuteczność bakteriobójczą środków dezynfekcyjnych badano metodą zawiesinową według Normy PN-EN 1276:2000, z modyfikacjami. Wykaz środków wykorzystanych w pracy zawarto w tabeli 1. Badania rozpoczęto od przygotowania serii stężeń badanych preparatów w probówkach zawierających po 9 ml wody destylowanej. Do przygotowanych roztworów preparatów w odstępach kilku sekundowych dodawano 0,5 ml przygotowanej zawiesiny bakterii o gęstości 1×10^7 jtk·ml⁻¹, a następnie probówki mieszano na wstrząsarce typu Vortex. Po 5, 10 i 15 minutach ekspozycji bakterii w roztworach środków z każdego stężenia 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.

WYNIKI

Patogeniczność bakterii

W pierwszym rzucie objawy chorobowe w postaci plam i przebarwień na owocnikach stwierdzono we wszystkich badanych próbach. Plon owocników w zależności od izolatu kształtował się na poziomie 187,7–259,4 g·0,038 m⁻² w przypadku *P. gingeri* i 184,7–401,2 g·0,038 m⁻² dla *P. tolaasii*. Liczba komórek bakterii wynosiła $2,6 \times 10^7$ na metr kwadratowy okrywy. Uzyskany plon owocników był istotnie niższy niż w próbie kontrolnej, nieinfekowanej. Ponadto przy tej liczbie komórek w kombinacjach z izolatami *P. tolaasii* MG i BO uzyskano statystycznie większy plon owocników niż dla pozostałych izolatów (tab. 2).

Plon owocników przy zastosowaniu $2,6 \times 10^8$ komórek na metr kwadratowy okrywy wahał się od 76,1 do 111,2 g·0,038 m⁻² dla izolatów *P. gingeri* oraz od 45,6 do 121,1 g·0,038 m⁻² dla *P. tolaasii*. W tym przypadku nie wykazano istotnych różnic między uzyskanymi plonami (tab. 2). Ponadto plon owocników w próbach, gdzie zastosowano bakterie w ilości $2,6 \times 10^8$ komórek na metr kwadratowy był istotnie niższy od plonu owocników, gdy uprawę zainfekowano niższą liczbą komórek bakterii. Średni plon owocników w próbach z izolatami *P. tolaasii* MG i BO był statystycznie wyższy niż w pozostałych kombinacjach. Badania wykazały także, że plon owocników zdrowych pierwszego rzutu był wysoko skorelowany z nasileniem objawów choroby bakteryjnej, $r = 0,9493$ (rys. 1).

W drugim rzucie owocników plon mieścił się w zakresie 170,7–215,8 g·0,038 m⁻² okrywy dla izolatów *P. gingeri* i 106,4–173,8 g·0,038 m⁻² dla *P. tolaasii*, przy liczbie komórek bakterii $2,6 \times 10^7$ na metr kwadratowy okrywy (tab. 3). Różnice między plonami w poszczególnych kombinacjach, z wyjątkiem próby z *P. tolaasii* MG, były nieistotne statystycznie. Różnice w plonach między próbami infekowanymi a próbą kontrolną również były nieistotne statystycznie, z wyjątkiem kombinacji z izolatem *P. tolaasii* MG.

Porażenie uprawy większą liczbą komórek ($2,6 \times 10^8$ na metr kwadratowy okrywy) skutkowało istotnym obniżeniem plonu we wszystkich kombinacjach w stosunku do próby nieinfekowanej. Dla izolatów *P. gingeri* plon mieścił się w zakresie 134,7 – 148,8 g·0,038 m⁻² okrywy, przy czym jedynie izolat MO spowodował istotne obniżenie plonu w stosunku do plonu uzyskanego, gdy uprawa była infekowana liczbą bakterii $2,6 \times 10^7$ na metr kwadratowy. W przypadku izolatów *P. tolaasii* plon wynosił 58,7–74,7 g·0,038 m⁻². Plon w kombinacjach z izolatami BO i BI był istotnie niższy od plonu, który uzyskano przy zastosowaniu liczby komórek $2,6 \times 10^7$ na metr kwadratowy.

Analizując średni plon owocników badanych kombinacji stwierdzono, że plon w próbach z izolatami *P. tolaasii* był istotnie niższy niż z *P. gingeri* (tab. 3). Zależność plonu owocników zdrowych od nasilenia choroby bakteryjnej dla drugiego rzutu wykazała również wysoką korelację, $r = 0,9318$ (rys. 2).

Tabela 1. Badane środki dezynfekcyjne
Table 1. Tested disinfectants

Preparat dezynfekcyjny Chemical product	Substancja aktywna i jej zawartość w preparacie Active substance and its contents in the product	Stężenie rekomendowane Recommended concentration (%)
Armex 5	5% dwutlenek chloru; chloride dioxide	2,5–5,0
Systematic	580 g·dm ⁻³ nadtlenuk wodoru; hydrogen peroxide	4,0
Mycetox Extra	9,5% chlorek didecyldimetyloamonu; didecyldimethylammonium chloride	4,0
Divosan Activ	5% kwas nadoctowy; peracetic acid	0,15
Aldekol DES FF	10–20% glutaral; glutaraldehyde 5–10% chlorki benzylodimetyloalkiloamoniowe; alkyl dimethylbenzylammonium chloride <5% chlorek didecyldimetyloamonu; didecyldimethylammonium chloride < 2,5% izopropanol; isopropanol	1,0

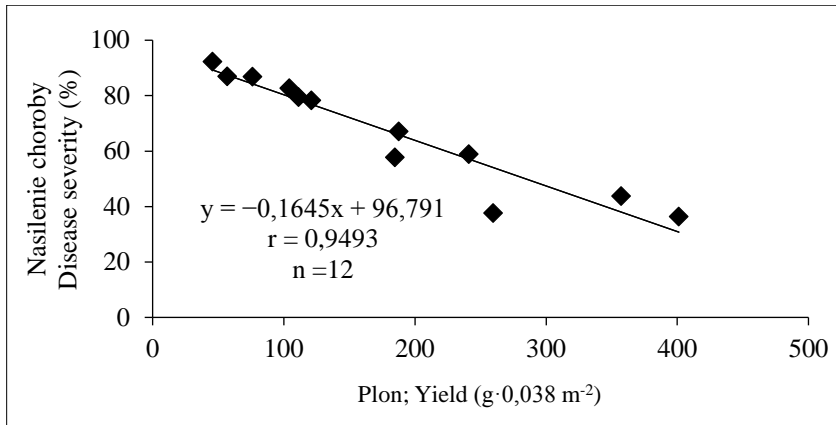
Tabela 2. Plon pieczarek w I rzucie (g·0,038 m⁻²) w zależności od liczby komórek izolatów *P. tolaasii* i *P. gingeri* (średni plon z dwóch doświadczeń)
Table 2. Yield of mushrooms in the first flush (g·0.038 m⁻²) depending on the cells number of *P. tolaasii* and *P. gingeri* isolates (mean yield from the two experiments)

Izolaty Isolates	Liczba komórek na m ² okrywy Number of cells per m ² of casing			średnia mean
	0	2,6 × 10 ⁷	2,6 × 10 ⁸	
Pg* – MO	620,5 Aa	241,0 Ba	104,2 Ca	321,9 b
Pg – 3A	634,4 Aa	187,7 Ba	76,1 Ca	299,4 b
Pg – 3B	614,7 Aa	259,4 Ba	111,2 Ca	326,6 b
Pt – MG	672,6 Aa	401,2 Bb	45,6 Ca	373,1 a
Pt – BO	637,4 Aa	357,2 Bb	121,1 Ca	373,6 a
Pt – BI	642,4 Aa	184,7 Ba	56,9 Ca	287,9 b
średnia; mean	642,5 A	271,9 B	85,9 C	

*Pg – *P. gingeri*, Pt – *P. tolaasii*

A, B, C – średnie w rzędach, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie według testu Newman-Keulsa (p = 0,01); means in rows followed by the same letter do not differ significantly (p = 0.01) according to Newman-Keuls test

a, b, c – średnie w kolumnach, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie według testu Newman-Keulsa (p = 0,01); means in columns followed by the same letter do not differ significantly (p = 0.01) according to Newman-Keuls test



Rys. 1. Zależność plonu od nasilenia choroby w I rzucie owocników
 Fig. 1. Relationship between mushroom yield and disease incidence in the first flush

Tabela 3. Plon pieczarek w II rzucie (g·0,038 m⁻²) w zależności od liczby komórek izolatów *P. tolaasii* i *P. gingeri* (średni plon z dwóch doświadczeń)
 Table 3. Yield of mushrooms in the seconds flush (g·0.038 m⁻²) depending on the cells number of *P. tolaasii* and *P. gingeri* isolates (mean yield from the two experiments)

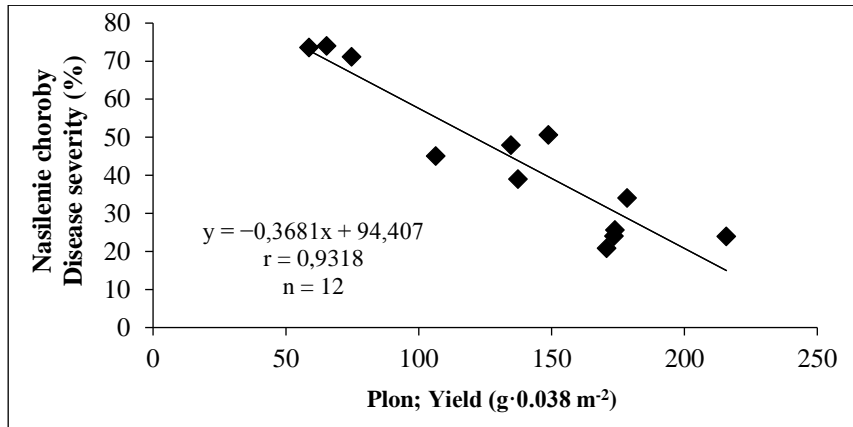
Izolaty Isolates	Liczba komórek na m ² okrywy Number of cells per m ² of casing			średnia mean
	0	2,6 × 10 ⁷	2,6 × 10 ⁸	
Pg* – MO	226,8 Aa	215,8 Aa	148,8 Ba	197,1 a
Pg – 3A	213,5 Aa	178,4 ABa	137,4 Ba	176,4 a
Pg – 3B	210,9 Aa	170,7 ABa	134,7 Bab	173,9 a
Pt** – MG	189,9 Aa	106,4 Bb	58,7 Bc	118,3 b
Pt – BO	197,0 Aa	173,5 Aa	74,7 Bbc	148,4 b
Pt – BI	200,5 Aa	173,8 Aa	65,3 Bc	142,3 b
średnia; mean	206,8 A	168,5 B	104,9 C	

*Pg – *P. gingeri*

**Pt – *P. tolaasii*

A, B, C – średnie w rzędach, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie według testu Newmana-Keulsa (p = 0,01); means in rows followed by the same letter do not differ significantly (p = 0.01) according to Newman-Keuls test

a, b, c – średnie w kolumnach, oznaczone tymi samymi literami nie różnią się statystycznie według testu Newmana-Keulsa (p = 0,01); means in columns followed by the same letter do not differ significantly (p = 0.01) according to Newman-Keuls test



Rys. 2. Zależność plonu od nasilenia choroby w II rzucie owocników

Fig. 2. Relationship between mushroom yield and disease incidence in the second flush

Tabela 4. Skuteczność preparatów dezynfekcyjnych w hamowaniu rozwoju *P. tolaasii*

Table 4. Effectiveness of disinfectants in the control of *P. tolaasii* development

Preparat Agent	Stężenie preparatu Product con- centration (%)	Czas ekspozycji (min); Exposition time (min.)					
		5		10		15	
		BO	MG	BO	MG	BO	MG
Armex 5	1,0	+	+	+	+	+	+
	2,0	+	+	+	+	+	+
	2,5	+	+	+	+	+	+
	5	+	-	+	-	-	-
	7,5	-	-	-	-	-	-
Systematic	0,1	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	-
	0,3	+	+	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-
Mycetox Extra	0,2	+	+	+	+	+	+
	0,3	+	+	+	+	+	+
	0,4	-	+	-	+	-	+
	0,5	-	+	-	-	-	-
	0,6	-	-	-	-	-	-
Divosan Activ	0,1	+	+	+	+	+	+
	0,15	+	+	-	+	-	+
	0,2	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-
Aldekol DES FF	0,1	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	+
	0,3	-	-	-	-	-	-
	0,4	-	-	-	-	-	-

+ wzrost; growth; - brak wzrostu; no growth

Skuteczność preparatów dezynfekcyjnych

Badane preparaty skutecznie hamowały rozwój bakterii w stężeniach niższych niż stężenia rekomendowane przez producentów, z wyjątkiem preparatu Divosan Activ (tab. 4 i 5). Izolaty *P. tolaasii* i *P. gingeri* nieznacznie różniły się wrażliwością na testowane środki. W przypadku preparatu Armex 5 wzrost izolatów *P. gingeri* był zahamowany już przy stężeniu 2% po 10 minutach ekspozycji, natomiast wzrost *P. tolaasii* – przy stężeniu 5% po 15 minutach. Preparat Systematic działał bakteriobójczo w stężeniu 0,3% po 10 minutach w przypadku *P. tolaasii*, natomiast w przypadku *P. gingeri* w stężeniu 0,5%. Wrażliwość bakterii na preparat Mycetox Extra była różna w zależności od izolatu i czasu działania środka.

Tabela 5. Skuteczność preparatów dezynfekcyjnych w hamowaniu rozwoju *P. gingeri*
Table 5. Effectiveness of disinfectants in the control of *P. gingeri* development

Preparat Agent	Stężenie pre- paratu Product con- centration (%)	Czas ekspozycji (min) Exposition time (min.)					
		5		10		15	
		MO	3A	MO	3A	MO	3A
Armex 5	0,5	+	+	+	+	+	+
	1,0	+	+	+	+	+	+
	2,0	+	-	-	-	-	-
	2,5	-	-	-	-	-	-
	5,0	-	-	-	-	-	-
Systematic	0,1	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	+
	0,3	+	+	+	+	+	-
	0,5	-	-	-	-	-	-
Mycetox Extra	0,1	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	-	+	-
	0,3	+	-	+	-	+	-
	0,4	+	-	+	-	+	-
	0,5	+	-	-	-	-	-
	0,6	-	-	-	-	-	-
Divosan Activ	0,1	+	+	+	+	+	+
	0,15	+	-	+	-	-	-
	0,2	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-
Aldekol DES FF	0,1	+	+	+	-	-	-
	0,2	+	-	+	-	-	-
	0,3	-	-	-	-	-	-
	0,4	-	-	-	-	-	-

+ wzrost; growth; – brak wzrostu; no growth

Wśród badanych izolatów występowały bardziej wrażliwe, których wzrost był hamowany już przy stężeniu 0,2% po 10 minutach (izolat *P. gingeri* 3A), jak i bardziej odporne (*P. tolaasii* MG i *P. gingeri* MO), których rozwój był hamowany dopiero przy stężeniu 0,5% po 10 minutach. Środek Aldekol DES FF przy stężeniu 0,3% po 5 minutach ekspozycji hamował wzrost izolatów *P. tolaasii*, a przy stężeniu 0,2% po 10 minutach – *P. gingeri*. Preparat Divosan Activ zwalczał badane izolaty przy stężeniu 0,15% po 15 minutach, z wyjątkiem *P. tolaasii* MG, który przy tym stężeniu wykazywał wzrost (tab. 4 i 5). Bakteriobójczość preparatów Systematic, Mycetox Extra i Aldekol DES w zastosowanych stężeniach wskazuje na ich bardzo dużą aktywność, gdyż stężenia rekomendowane przez producentów wynoszą odpowiednio 4%; 4% i 1%. Aktywność preparatu Divosan Activ jest niezadowalająca, gdyż przy stężeniu rekomendowanym 0,15% jeden z izolatów bakteryjnych wykazywał wzrost.

DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że zainfekowanie uprawy komórkami bakterii w fazie szoku skutkuje pojawieniem się objawów chorobowych w postaci plam w I rzucie owocników. W przypadku *P. tolaasii* były to ciemne, brązowe, wklęsłe plamy na kapeluszach grzybów, a w przypadku *P. gingeri* plamy były powierzchniowe, jasno- bądź ciemnorude. Objawy te były zgodne z opisywanymi w literaturze (Gill 1995; Soler-Rivas i in. 1999; Todorović i in. 2012; Milijašević-Marčić i in. 2012). W prezentowanej pracy w I rzucie owocników nasilenie choroby wynosiło od 35 do ponad 90%, natomiast w drugim od 20 do 70%, w zależności od izolatu i zastosowanego inokulum infekcyjnego, tj. 1×10^5 jtk·ml⁻¹ bądź 1×10^6 jtk·ml⁻¹. Uzyskane wyniki są podobne do wyników innych autorów. Geels i in. (1994) po zainfekowaniu uprawy pieczarki bakterią *P. agarici* w I i II rzucie uzyskał 70% grzybów porażonych, stosując inokulum infekcyjne rzędu 2×10^7 jtk·ml⁻¹. Badania Wong i Preece (1982) wykazały, że porażenie uprawy przez bakterie *P. tolaasii* wywołuje bakteriozę u blisko 100% owocników, przy inokulum infekcyjnym wynoszącym ponad 6×10^7 jtk·ml⁻¹. Gandy (1967) oraz Nair i Fahy (1972) podali, że plamistość bakteryjna pojawia się przy stężeniu komórek bakterii poniżej 1×10^5 jtk·ml⁻¹. Według Abou-Zeid (2012) w zależności od liczby komórek bakterii wywołujących chorobę, a także izolatu nasilenie objawów chorobowych może być różne.

Ponadto badania Rainey i in. (1992), Geels i in. (1994) oraz Szumigaj-Tarnowska i in. (2010) wykazały, że skala objawów chorobowych zależy od warunków uprawy i fazy rozwojowej owocników. Odmienne wnioski wyciągnęli Wong i Preece (1982), którzy stwierdzili, że sposób podlewania uprawy i wilgotność panująca w hali uprawowej nie wpływały na rozwój objawów

chorobowych wywołanych przez *P. tolaasii*. Uzyskane wyniki w ramach prowadzonych badań wykazały, że ubytek plonu w kombinacjach, gdy uprawę infekowano liczbą komórek 1×10^5 jtk·ml⁻¹ był statystycznie istotny tylko w I rzucie owocników. W II rzucie natomiast stwierdzono mniejsze nasilenie choroby bakteryjnej, ubytek plonu nie był istotny statystycznie w porównaniu do próby kontrolnej. Podobne wyniki uzyskał Olivier i in. (1997) po zainfekowaniu uprawy izolatami *P. tolaasii*.

W pracy badano skuteczność preparatów zawierających dwutlenek chloru, nadtlenek wodoru, chlorek didecyldimetyloamoni i kwas nadoctowy, które są najczęściej wykorzystywane do dezynfekcji zakładów pieczarkarskich (Uliński 2015). Badania wykazały, że izolaty bakteryjne *Pseudomonas* sp. były wrażliwe na badane preparaty chemiczne w niskim przedziale ich stężeń, z wyjątkiem środka Divosan Activ (kwas nadoctowy), gdyż przy stężeniu rekomendowanym (0,15%) wzrost *P. tolaasii* MG nie został zahamowany. Niską skuteczność kwasu nadoctowego w hamowaniu rozwoju bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wykazali również Spoering i Lewis (2001).

Prezentowane badania wykazały wysoką aktywność bakteriobójczą preparatów Armex 5 (dwutlenek chloru) oraz Systematic (nadtlenek wodoru). Skuteczność dwutlenku chloru oraz nadtlenu wodoru w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych dla pieczarki potwierdzili również Solomon i in. (1991) oraz Todorović i in. (2012). Badane izolaty były wrażliwe na czwartorzędowe związki amoniowe, tj. chlorek didecyldimetyloamoniowy. Wong i Preece (1985) wykazali także wysoką skuteczność tej substancji w warunkach *in vitro* w stosunku do izolatów *P. tolaasii*, a jednocześnie stwierdzili, że nie była ona skuteczna, gdy komórki bakterii zostały umieszczone w 10% roztworze ziemi okrywowej.

Skuteczne stężenie preparatów bakteriobójczych zależy od metody dezynfekcji (Szumigaj-Tarnowska i in. 2012) oraz rodzaju powierzchni (Maćkowiak-Sochacka i Krawczyk 2010). Badania prezentowane w pracy były prowadzone w warunkach laboratoryjnych, więc skuteczność testowanych preparatów była wysoka. Jednakże, ze względu na zróżnicowaną oporność bakterii chorobotwórczych, a także rodzaj powierzchni oraz metodę dezynfekcji, istnieje potrzeba sprawdzania skuteczności preparatów chemicznych.

PODSUMOWANIE

Zainfekowanie uprawy pieczarki liczbą komórek bakterii $2,6 \times 10^7$ na metr kwadratowy okrywy spowodowało statystycznie istotny spadek plonu owocników w pierwszym rzucie w stosunku do próby kontrolnej, przy czym izolaty *P. gingeri* powodowały większe straty plonu niż *P. tolaasii*.

W drugim rzucie przy liczbie komórek bakterii wynoszącej $2,6 \times 10^7$ na metr kwadratowy różnice w plonach między próbami infekowanymi a próbą kontrolną były nieistotne statystycznie, z wyjątkiem kombinacji z izolatem *P. tolaasii* MG.

Porażenie uprawy liczbą komórek $2,6 \times 10^8$ na metr kwadratowy okrywy w drugim rzucie skutkowało istotnym obniżeniem plonu we wszystkich badanych kombinacjach w stosunku do próby nieinfekowanej.

Plon owocników zdrowych w obu rzutach był wysoko skorelowany z nasileniem choroby bakteryjnej.

Rozwój badanych bakterii był hamowany już w niskich stężeniach preparatów dezynfekcyjnych, z wyjątkiem preparatu Divosan Activ, gdyż izolat *P. tolaasii* MG wykazywał wzrost przy stężeniu rekomendowanym przez producenta.

Izolaty *P. tolaasii* były bardziej wrażliwe na preparaty Armex 5, Divosan Activ oraz Aldekol DES niż *P. gingeri*, natomiast wrażliwość badanych gatunków bakterii na działanie środków Mycetox Extra i Systematic była porównywalna.

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. DOI: 10.1590/s1517-83822012000300041.
- Gandy D.G. 1967. The epidemiology of bacterial blotch of the cultivated mushroom. Report of the Glasshouse Crops Research Institute, s. 150–154.
- Geels F.P., Heslen L.P.W., van Griensven L.J.L.D. 1994. Brown discolouration of mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. *Journal of Phytopathology* 140: 249–259. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1994.tb04814.x.
- Gill W.M. 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. Reports of the Tottori Mycological Institute 33: 34–55.
- Iacobellis N.S. 2011. Recent advances on bacterial diseases of cultivated mushrooms. W: Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Arcachon, Francja, 4–7 października, s. 452–460.
- Maćkowiak-Sochacka A., Krawczyk K. 2010. Bakteriobójcza aktywność wybranych preparatów dezynfekcyjnych na różnych powierzchniach skażonych bakteriami *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 50(4): 1806–1811.
- Milijašević-Marčić S., Todorović B., Potočnik I., Stepanović M., Rekanović E. 2012. First report of *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus* in Serbia. *Phytoparasitica* 40: 299–303. DOI: 10.1007/s12600-011-0215-z.
- Nair N.G., Fahy P.C. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Bacteriology* 35: 439–442. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1972.tb03720.x.

- 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. DOI: 10.1080/07060669709500569.
- Paine S.G. 1919. Studies in bacteriosis II. A brown blotch disease of cultivated mushrooms. Annals of Applied Biology 5: 206–219. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1919.tb05291.x.
- PN-EN 1276:2000. Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Metoda badania i wymagania.
- Rainey P.B., Brodey C.L., Johnstone K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. Advances in Plant Pathology 8: 95–117.
- Royse D.J., Wuest P.J. 1980. Mushroom brown blotch: effects of chlorinated water on disease intensity and bacterial populations in casing soil and on pilei. Phytopathology 70(9): 902–905. DOI: 10.1094/phyto-70-902.
- Soler-Rivas C., Jolivet S., Arpin N., Olivier J.M., Wichers H.J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiology Reviews 23: 591–614. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00415.x.
- Solomon J.M., Beelman R.B., Bartley C.E. 1991. Addition of calcium chloride and stabilized chlorine dioxide to irrigation water to improve quality and shelf life of *Agaricus bisporus*. W: Proceedings of the 13th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Dublin, 1–6 września, 880 s.
- Spoering A.L., Lewis K. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. Journal of Bacteriology 183(23): 6746–6751. DOI: 10.1128/jb.183.23.6746–6751.2001.
- Szumigaj-Tarnowska J., Uliński Z., Ślusarski C. 2012. Skuteczność wybranych preparatów dezynfekcyjnych w zwalczaniu patogenicznej bakterii *Pseudomonas tolaasii*. Progress in Plant Protection/Postępy w ochronie roślin 52(3): 701–706.
- Szumigaj-Tarnowska J., Szymański J. 2010. Nowe aspekty badań nad plamistością bakteryjną pieczarki (*Agaricus bisporus*). Nowości Warzywnicze 50: 75–85.
- Szumigaj-Tarnowska J., Oskiera M., Szymański J. 2010. ‘*Pseudomonas gingeri*’ – sprawca plamistości bakteryjnej pieczarki. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 554: 239–244.
- Szymański J. 2010. Sprawozdanie końcowe. Projekt badawczy „Zastosowanie integrowanych metod profilaktyki i zwalczania chorób bakteryjnych wywołanych przez *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas tolaasii* i *Janthinobacterium agaricidamnosum* w uprawie *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach” (2008–2010).
- Szymański J., Savage D., Głowacki J. 2000. Chlorine dioxide as new form chlorine for prophylaxis and controlling bacterial diseases and general disinfection at cultivated mushroom house. 15th Czech and Slovak Plant Protection Conference, s. 255–256.

- Todorović B., Milijašević-Marčić S., Potočnik I., Stepanović M., Rekanović E., Nikolić-Bujanović L., Čekerevac M. 2012. *In vitro* activity of antimicrobial agents against *Pseudomonas tolaasii*, pathogen of cultivated button mushroom. *Journal of Environmental Science and Health, B* 47(3): 175–179. DOI: 10.1080/03601234.2012.632282.
- Uliński Z. 2015. Substancje aktywne dezynfektantów stosowanych w krajowych pieczarkarniach. *Pieczarki – Biuletyn Producenta Pieczarek* 4: 41–45.
- Wong W.C., Fletcher J.T., Unsworth B.A., Preece T.F. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Bacteriology* 52: 43–48. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1982.tb04371.x.
- 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. *Journal of Applied Bacteriology* 53: 87–96. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1982.tb04737.x.
- Wong W.C., Preece T.F. 1985. *Pseudomonas tolaasii* on mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: bactericidal effects of six disinfectants and their toxicity to mushrooms. *Journal of Applied Bacteriology* 58: 269–273. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1985.tb01460.x.

Badania wykonane w ramach tematu statutowego nr 4.4.1. Instytutu Ogrodnictwa, finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.