

**OCENA ANTYBAKTERYJNEGO POTENCJAŁU  
EKOLOGICZNYCH SUBSTANCJI PODSTAWOWYCH  
W UPRAWIE PIECZARKI**

**EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL POTENTIAL  
OF ECOLOGICAL BASIC SUBSTANCES  
IN MUSHROOM CULTIVATION**

**Joanna Szumigaj-Tarnowska, Joanna Augustyniak, Zbigniew Uliński**

Instytut Ogrodnictwa – PIB

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

e-mail: joanna.tarnowska@inhort.pl

**Abstract**

White button mushrooms, *Agaricus bisporus*, is susceptible to several pathogenic microorganisms, including *Pseudomonas tolaasii*, which causes brown blotch disease. The disease is devastating and results in severe loss of cultivated mushrooms. For this reason, the study was undertaken of the effect of two biological basic substances (EC 1107/2009) – hydrogen peroxide and wine vinegar, on the reduction of brown bacterial blotch. The preparations were evaluated in laboratory and cultivation conditions. High bactericidal and bacteriostatic activity of the tested basic substances was demonstrated in laboratory conditions. In a crop experiment, the basic substances showed varying efficacy in reducing brown blotch depending on the inoculum concentration and the substances concentrations. The limiting effect of hydrogen peroxide and wine vinegar on the development of brown bacterial blotch in the second flush of fruiting bodies was shown. It can be concluded that the use of hydrogen peroxide and wine vinegar to reduce bacterial diseases of mushrooms can be an alternative to other chemical protection methods.

**Key words:** *Agaricus bisporus*, brown blotch disease, hydrogen peroxide, *Pseudomonas tolaasii*, wine vinegar

**WSTĘP**

Polska od kilku dekad wiodzie prym na rynku europejskim w produkcji pieczarek (ok. 350 tys. ton grzybów na rok). Zapotrzebowanie na ten surowiec ma nadal tendencję rosnącą. Zwiększenie świadomości konsumentów dotyczącej wpływu pestycydów na ludzkie zdrowie narzuciło konieczność wprowadzenia na rynek pieczarek pochodzących z upraw ekologicznych.

Pieczarka wymaga specyficznych warunków uprawowych w halach wyposażonych w wysoko zaawansowaną aparaturę, która stymuluje zmiany temperatur oraz wilgotności. Hale uprawowe są doskonałym siedliskiem dla wielu patogenicznych mikroorganizmów, odpowiadających za choroby upraw i znaczne obniżenie plonu (Soler-Rivas i in. 1999). Z tego względu podjęto poszukiwania substancji naturalnych, tzw. substancji podstawowych (zgodnie z regulacją EC 1107/2009), których zastosowanie będzie ograniczało choroby występujące w uprawach pieczarki.

Jedną z częściej spotykanych patogenicznych bakterii w uprawie pieczarki jest *Pseudomonas tolaasii* Paine (Tolaas 1915; Paine 1919). Bakteria wywołuje chorobę zwaną brunatną plamistością, która objawia się ciemnobrązowymi, wklęsłymi plamami na kapeluszach, a niekiedy także na trzonkach grzybów (Fletcher i Gaze 2008; Soler-Rivas i in. 1999). W wyniku choroby plon owocników jest niższy, a ich jakość obniżona ze względu na właściwości organoleptyczne i morfologiczne. Ochrona przed chorobami bakteryjnymi ma więc duże znaczenie ekonomiczne (Fletcher 1979; Gill 1995).

Celem pracy była ocena przydatności substancji podstawowych, takich jak ocet winny i nadtlenek wodoru, w hamowaniu rozwoju bakterii *Pseudomonas tolaasii* w warunkach laboratoryjnych oraz uprawowych.

#### MATERIAŁ I METODY

Substancje podstawowe zostały wybrane na podstawie wykazu zatwierdzonych substancji do stosowania w rolnictwie ekologicznym w Unii Europejskiej zamieszczonego na stronie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi: [www.gov.pl/web/rolnictwo/wykaz-zatwierdzonych-w-ue-substancji-podstawowych](http://www.gov.pl/web/rolnictwo/wykaz-zatwierdzonych-w-ue-substancji-podstawowych).

Materiał biologiczny do badań pozyskiwany był z owocników porażonych brunatną plamistością. Próbki pieczarek pobierano z pieczarkarni z regionu łódzkiego i mazowieckiego. Porażoną tkankę pieczarki umieszczono na agarze odżywczym (Difco™ Nutrient Agar) i inkubowano w temperaturze 24 °C przez 24 godziny. Po wyrośnięciu kolonii bakterii przeprowadzono posiew redukcyjny w celu wyizolowania czystych kultur bakteryjnych. Pojedynczą kolonię bakterii przeszczepiano na skosy agarowe i przetrzymywano w warunkach chłodniczych w celu dalszej diagnostyki. Stopień wirulencji bakterii względem pieczarki ustalono na podstawie testów patogeniczności, a izolaty, które wywoływały objawy plamistości, poddawano dalszym testom biochemicznym. Testy te obejmowały: barwienie bakterii metodą Grama (Beveridge 2001), zdolność do wytwarzania fluoryzującego pigmentu (King i in. 1954) oraz rodzaj metabolizmu glukozy (Hugh

i Leifson 1953). Ponadto sprawdzano aktywność oksydazy, katalazy, zdolność bakterii do hydrolizy żelatyny i skrobi, rozkładu azotanów, pobierania węgla z cytrynianu (Lelliott i in. 1966). Według klucza do identyfikacji bakterii (Buchanan i Gibbons 1974) izolaty zakwalifikowano do odpowiedniego rodzaju. Przeprowadzono również tzw. test białej linii, który wykorzystywany jest do identyfikacji bakterii *P. tolaasii* (Wong i Preece 1979), a w ostatnim etapie identyfikacji izolatów wykonano komercyjne testy API 20NE. Przeprowadzone testy pozwoliły wytypować do badań siedem izolatów *P. tolaasii*: MG, HA, LE, BO, BI, H4, B23.

Skuteczność substancji podstawowych w hamowaniu wzrostu bakterii w warunkach *in vitro* badano metodą rozcieńczeń w celu wyznaczenia minimalnego stężenia hamującego rozwój bakterii (MIC, ang. *minimal inhibitory concentration*), przy którym wzrost drobnoustrojów ulega zahamowaniu. Dobór stężeń substancji opierał się na danych literaturowych oraz na podstawie wcześniejszych doświadczeń (Cortesia i in. 2014; Szumigaj-Tarnowska i in. 2012). Substancje podstawowe badano w następującym przedziale stężeń: nadtlenuk wodoru 0,01–0,05%, ocet winny 0,25–1%, w dwóch powtórzeniach. Do pożywek płynnych zawierających odpowiednie stężenia substancji dodawano 100  $\mu$ l zawiesiny bakterii, a następnie inkubowano je w temperaturze 24–25 °C. Po 24 i 48 godzinach inkubacji oceniano wzrost bakterii na podstawie zmętnienia podłoża. Kultury, w których nie stwierdzano wzrostu bakterii, wysiewano na stałą pożywkę odżywczą metodą rozcieńczeń w celu wyznaczenia wartości MBC (ang. *minimal bactericidal concentration*), czyli minimalnego stężenia bakteriobójczego substancji, przy którym ginie 99,9% bakterii w warunkach *in vitro*. Wzrost bakterii na pożywce stałej oraz liczbę kolonii oceniano po 48 godzinach inkubacji. Na tej podstawie określano stopień zahamowania rozwoju bakterii.

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu substancji podstawowych na występowanie brunatnej plamistości w uprawie doniczkowej. Doświadczenie wykonano w specjalistycznej hali uprawowej, która zapewnia grzybom odpowiednie warunki wzrostu, takie jak temperatura, wilgotność i stężenie dwutlenku węgla. Infekcję podłoża III fazy i okrywy wykonano zawiesiną bakterii o gęstości  $1 \times 10^4$  i  $1 \times 10^6$  jtk·ml<sup>-1</sup> w ilości 10 ml w piątym dniu po nałożeniu okrywy. Następnie uprawa została podlana wodnymi zawiesinami substancji podstawowych: nadtlenuk wodoru w stężeniu 0,05 i 0,5% oraz ocet winny w stężeniu 2% i 4%. Powyższe stężenia wybrano na podstawie wcześniejszych wyników. Substancje były aplikowane jednokrotnie oraz dwukrotnie.

Doświadczenie powyższe o charakterze dwuczynnikowym przeprowadzono dwukrotnie. Czynnikiem pierwszym były różne stężenia liczby bakterii, zaś drugim były stosowane substancje podstawowe. Każda kombinacja obejmowała 4 powtórzenia. Skuteczność antybakteryjną substancji badano na podstawie wielkości plonu owocników zdrowych i porażonych, obliczono również nasilenie choroby w pierwszym i drugim rzucie owocników. Wyniki opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji dwuczynnikowej i testu Newmana–Keulsa ( $p = 0,05$ ).

## WYNIKI I Dyskusja

### Badania laboratoryjne

W tabeli 1 przedstawiono wpływ nadtlenu wodoru na wzrost i liczbę komórek bakterii *P. tolaasii*. Wykazano, że minimalne stężenie nadtlenu wodoru hamujące rozwój wszystkich izolatów wyniosło 0,02%, a minimalne stężenie bakteriobójcze dla wszystkich testowanych bakterii było dwukrotnie większe. Nadtlenek wodoru w stężeniu 0,02% obniżył liczbę komórek bakterii średnio o dwa rzędy wielkości (tab. 1).

Tabela 1. Wzrost i liczba komórek bakterii *P. tolaasii* w pożywce zawierającej nadtlenek wodoru oraz stężenia MIC i MBC

Table 1. Growth and number of bacteria cells of *P. tolaasii* in a medium containing hydrogen peroxide and concentrations of MIC and MBC

| Izolat;<br>Isolate<br>(n = 4)* | Rodzaj<br>pożywki;<br>Type<br>of medium | Stężenie nadtlenu wodoru; Concentration of hydrogen peroxide (%) |                   |                   |                   |      |      |           |
|--------------------------------|---|--|-------------------|-------------------|-------------------|------|------|-----------|
|                                |   | 0,0  | 0,01              | 0,02              | 0,03              | 0,04 | 0,05 | MIC/MBC   |
| MG                             | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,03 |
|                                | stała; solid                            | $2,5 \times 10^8$  | $1,2 \times 10^8$ | $3,2 \times 10^6$ | -                 | -    | -    |           |
| B23                            | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,03 |
|                                | stała; solid                            | $4,4 \times 10^8$  | $2,4 \times 10^7$ | $3,1 \times 10^6$ | -                 | -    | -    |           |
| BO                             | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,03 |
|                                | stała; solid                            | $5,3 \times 10^8$  | $3,2 \times 10^7$ | $2,1 \times 10^6$ | -                 | -    | -    |           |
| BI                             | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,03 |
|                                | stała; solid                            | $5,5 \times 10^8$  | $1,9 \times 10^8$ | $2,8 \times 10^6$ | -                 | -    | -    |           |
| HA                             | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,04 |
|                                | stała; solid                            | $3,5 \times 10^8$  | $2,5 \times 10^7$ | $3,8 \times 10^6$ | $1,8 \times 10^5$ | -    | -    |           |
| LE                             | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,03 |
|                                | stała; solid                            | $3,5 \times 10^8$  | $3,3 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^6$ | -                 | -    | -    |           |
| H.4                            | płynna; liquid                          | +  | +                 | -                 | -                 | -    | -    | 0,02/0,04 |
|                                | stała; solid                            | $2,2 \times 10^8$  | $1,3 \times 10^7$ | $9,3 \times 10^5$ | $3,8 \times 10^5$ | -    | -    |           |

\*wartości liczby komórek są średnią z czterech powtórzeń; cell number values are the mean of four replicates

Todorović i in. (2012) także wykazali wysoką aktywność bakteriobójczą w stosunku do *P. tolaasii* preparatu zawierającego nadtlenek wodoru oraz koloidalne srebro. W badaniach Brennan i in. (2000) oraz Sapersa i in. (2001) wykazano skuteczność nadtlenu wodoru w przeciwdziałaniu brązowieniu grzybów wywołanego rozwojem bakterii chorobotwórczych na powierzchni owocników w trakcie ich przechowywania.

W tabeli 2 przedstawiono wpływ octu winnego na wzrost i liczbę komórek badanych bakterii. Rozwój bakterii *P. tolaasii* w pożywce płynnej z dodatkiem octu winnego uległ zahamowaniu przy stężeniu 0,5% (MIC), a liczba bakterii obniżyła się o dwa rzędy wielkości. Minimalne stężenie bakteriobójcze octu winnego w stosunku do wszystkich izolatów było równe 1%. Skuteczność octu winnego w ograniczaniu rozwoju bakterii patogenicznych dla grzybów jadalnych w naszych badaniach potwierdziła wyniki Bruna i in. (2013, 2015) oraz Entaniego i in. (1998).

Tabela 2. Wzrost i liczba komórek bakterii *Pseudomonas tolaasii* w pożywce zawierającej ocet winny oraz stężenia MIC i MBC

Table 2. Growth and number of bacteria cells of *Pseudomonas tolaasii* in a medium containing wine vinegar and concentrations of MIC and MBC

| Izolat;<br>Isolate<br>(n = 4)* | Rodzaj<br>pożywki;<br>Type<br>of medium | Stężenie octu winnego; Concentration of wine vinegar (%) |                        |                        |                        |     |          |
|--------------------------------|---|--|------------------------|------------------------|------------------------|-----|----------|
|                                |   | 0,0  | 0,25                   | 0,5                    | 0,75                   | 1,0 | MIC/MBC  |
| MG                             | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$2,5 \times 10^8$                                   | +<br>$2,2 \times 10^8$ | -<br>$3,9 \times 10^6$ | -<br>$2,2 \times 10^6$ | -   | 0,5/1,0  |
| B23                            | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$4,4 \times 10^8$                                   | +<br>$8,5 \times 10^7$ | -<br>$3,1 \times 10^5$ | -<br>$1,1 \times 10^5$ | -   | 0,5/1,0  |
| BO                             | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$5,3 \times 10^8$                                   | +<br>$8,2 \times 10^7$ | -<br>$1,3 \times 10^6$ | -                      | -   | 0,5/0,75 |
| BI                             | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$5,5 \times 10^8$                                   | +<br>$4,0 \times 10^6$ | -<br>$2,3 \times 10^4$ | -                      | -   | 0,5/0,75 |
| HA                             | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$3,5 \times 10^8$                                   | +<br>$3,4 \times 10^8$ | -<br>$3,6 \times 10^6$ | -<br>$2,3 \times 10^4$ | -   | 0,5/1,0  |
| LE                             | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$3,5 \times 10^8$                                   | +<br>$3,3 \times 10^7$ | -<br>$2,6 \times 10^6$ | -                      | -   | 0,5/0,75 |
| H.4                            | płynna; liquid<br>stała; solid          | +<br>$2,2 \times 10^8$                                   | +<br>$1,4 \times 10^7$ | -<br>$7,4 \times 10^5$ | -<br>$1,8 \times 10^4$ | -   | 0,5/1,0  |

\*Uwaga: patrz Tabela 1; Note: see Table 1

## Badania uprawowe

Plon owocników zdrowych zebranych w pierwszym rzucie przedstawiono w tabeli 3. Zainfekowanie uprawy komórkami bakterii w ilości  $2,6 \times 10^6$  na  $m^2$  nie obniżyło istotnie plonu owocników, tj. w próbie kontrolnej uzyskano 417,7 g, podczas gdy w infekowanej 359,3 g na  $0,038 m^2$ . Zastosowanie badanych substancji nie miało istotnego wpływu na wzrost plonu. Jednak w donicach, w których nadtlenek wodoru był aplikowany dwukrotnie, uzyskano wyższy plon niż po jednokrotnej aplikacji. W kombinacjach z octem winnym w stężeniu 4% plon był wyższy niż po zastosowaniu preparatu w niższym stężeniu. Uzyskane różnice między średnimi z kontroli i kombinacji infekowanych i z użyciem substancji podstawowych nie były istotne statystycznie. W uprawie infekowanej zawiesiną komórek w ilości  $2,6 \times 10^8$  na  $m^2$  okrywy plon owocników zdrowych był istotnie niższy (228,7 g) od plonu uzyskanego w nieinfekowanej kontroli. Po zastosowaniu substancji podstawowych plon w badanych kombinacjach nie uległ istotnemu zwiększeniu w porównaniu do kontroli.

Tabela 3. Plon owocników zdrowych (g na  $0,038 m^2$ ) w pierwszym rzucie po porażeniu przez *Pseudomonas tolaasii* (MG) w zależności od substancji podstawowej i liczby dawek

Table 3. Yield of healthy mushrooms (g per  $0,038 m^2$ ) in the first flush after *Pseudomonas tolaasii* (MG) infection depending on the basic substances and doses number

| Liczba komórek (jtk na $m^2$ );<br>Number of cells (cfu per $m^2$ ) | Kontrola;<br>Control | Nadtlenek wodoru<br>Hydrogen peroxide |                    |                   |                    | Ocet winny<br>Wine vinegar |                    |                   |                    | średnia;<br>mean |
|---|----------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|
|   |                      | 0,1%                                  |                    | 0,5%              |                    | 2%                         |                    | 4%                |                    |                  |
|   |                      | 1 dawka<br>1 dose                     | 2 dawki<br>2 doses | 1 dawka<br>1 dose | 2 dawki<br>2 doses | 1 dawka<br>1 dose          | 2 dawki<br>2 doses | 1 dawka<br>1 dose | 2 dawki<br>2 doses |                  |
| 0 (n = 9)   |                      | 417,7 a**                             |                    |                   |                    |                            |                    |                   |                    |                  |
| $2,6 \times 10^6$<br>(n = 4)  | 359,3                | 285,8                                 | 335,2              | 316,5             | 373,7              | 365,3                      | 323,3              | 424,2             | 429,5              | 357,0 a          |
| $2,6 \times 10^8$<br>(n = 4)  | 228,7                | 191,2                                 | 179,2              | 226,3             | 240,3              | 201,5                      | 209,0              | 283,7             | 273,7              | 224,9 a          |
| średnia;<br>mean  | 335,2 A*             | 298,2 A                               | 310,7 A            | 320,2 A           | 343,9 A            | 328,2 A                    | 316,7 A            | 375,2 A           | 370,6 A            | -                |

\* średnie w wierszach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie ( $p = 0,05$ ); means in rows followed by the same letter are not significantly different ( $p = 0.05$ )

\*\* średnie w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie ( $p = 0,05$ ); means in columns followed by the same letter are not significantly different ( $p = 0.05$ )

Plon owocników uzyskany w drugim rzucie przedstawiono w tabeli 4. W uprawie zainfekowanej komórkami bakterii w ilości  $2,6 \times 10^6$  na  $m^2$  uzyskano istotnie niższy plon owocników (189,5 g) niż w nieinfekowanej kontroli (252,5 g na  $0,038 m^2$ ). Po zastosowaniu substancji podstawowych nie obserwowano istotnego zwiększenia plonu owocników zdrowych. W uprawie infekowanej zawiesiną komórek w ilości  $2,6 \times 10^8$  na  $m^2$  okrywy plon owocników zdrowych był istotnie niższy (164,2 g) od plonu uzyskanego w uprawie kontrolnej nieinfekowanej. Zastosowanie substancji podstawowych spowodowało nieznaczny wzrost plonu owocników zdrowych w tych kombinacjach. Średni plon ze wszystkich kombinacji przy liczbie komórek  $2,6 \times 10^6$  był istotnie większy niż plon przy liczbie komórek  $2,6 \times 10^8$ .

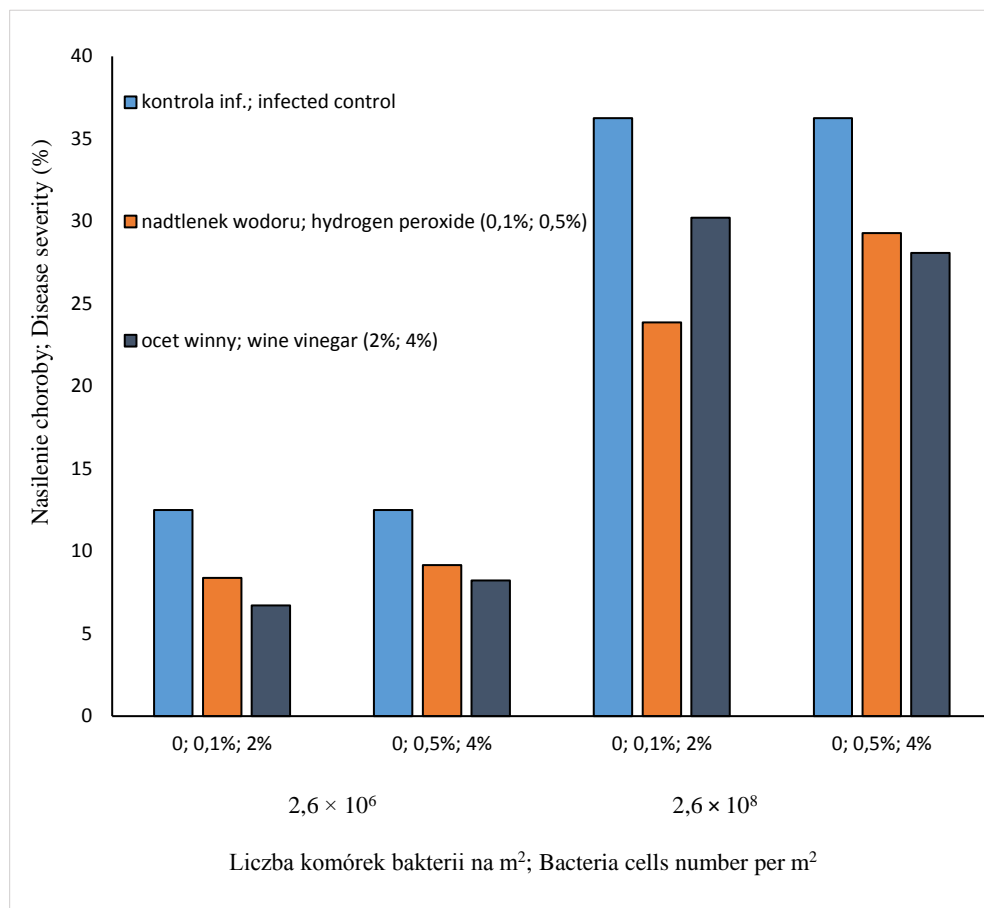
Tabela 4. Plon owocników (g na  $0,038 m^2$ ) w drugim rzucie uprawy porażonej bakteriami *Pseudomonas tolaasii* (MG) w zależności od zastosowanej substancji podstawowej i liczby dawek

Table 4. Yield of healthy mushrooms (g per  $0,038 m^2$ ) in the second flush after *Pseudomonas tolaasii* infection depending on the basic substances and doses number

| Liczba komórek (gk na $m^2$ );<br>Number of cells (cfu per $m^2$ ) | Kontrola;<br>Control | Nadtlenek wodoru<br>Hydrogen peroxide |                    |                   |                    | Ocet winny<br>Wine vinegar |                    |                   |                    | średnia;<br>mean |
|--|----------------------|---------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|------------------|
|  |                      | 0,1%                                  |                    | 0,5%              |                    | 2%                         |                    | 4%                |                    |                  |
|  |                      | 1 dawka<br>1 dose                     | 2 dawki<br>2 doses | 1 dawka<br>1 dose | 2 dawki<br>2 doses | 1 dawka<br>1 dose          | 2 dawki<br>2 doses | 1 dawka<br>1 dose | 2 dawki<br>2 doses |                  |
| 0 (n = 9)  |                      | 252,5 a**                             |                    |                   |                    |                            |                    |                   |                    |                  |
| $2,6 \times 10^6$<br>(n = 4)                                       | 189,5                | 194,7                                 | 251,0              | 192,0             | 216,3              | 227,7                      | 211,7              | 248,2             | 204,7              | 215,1 b          |
| $2,6 \times 10^8$<br>(n = 4)                                       | 164,2                | 201,7                                 | 195,0              | 228,0             | 198,3              | 179,0                      | 127,7              | 189,0             | 197,5              | 186,1 c          |
| Średnia;<br>Mean   | 202,1 A*             | 216,3 A                               | 232,8 A            | 224,2 A           | 222,4 A            | 219,7 A                    | 197,3 A            | 232,7 A           | 215,4 A            | -                |

\* Uwaga: patrz Tabela 3; Note: see Table 3

Na wykresach przedstawiono nasilenie choroby bakteryjnej w pierwszym i drugim rzucie w zależności od zastosowanej substancji podstawowej i jej stężenia. Uzyskane dane dla liczby stosowanych dawek w obrębie substancji zostały uśrednione. W pierwszym rzucie nasilenie choroby w kontroli infekowanej zawiesiną komórek w stężeniu  $2,6 \times 10^6$  na  $m^2$  wyniosło 10%, a w kombinacjach gdzie zastosowano substancje podstawowe było nieznacznie niższe. Wyższe stężenie komórek bakteryjnych spowodowało nasilenie plamistości do 35%, a zastosowane substancje podstawowe nie wpłynęły istotnie na zahamowanie rozwoju choroby (rys. 1).



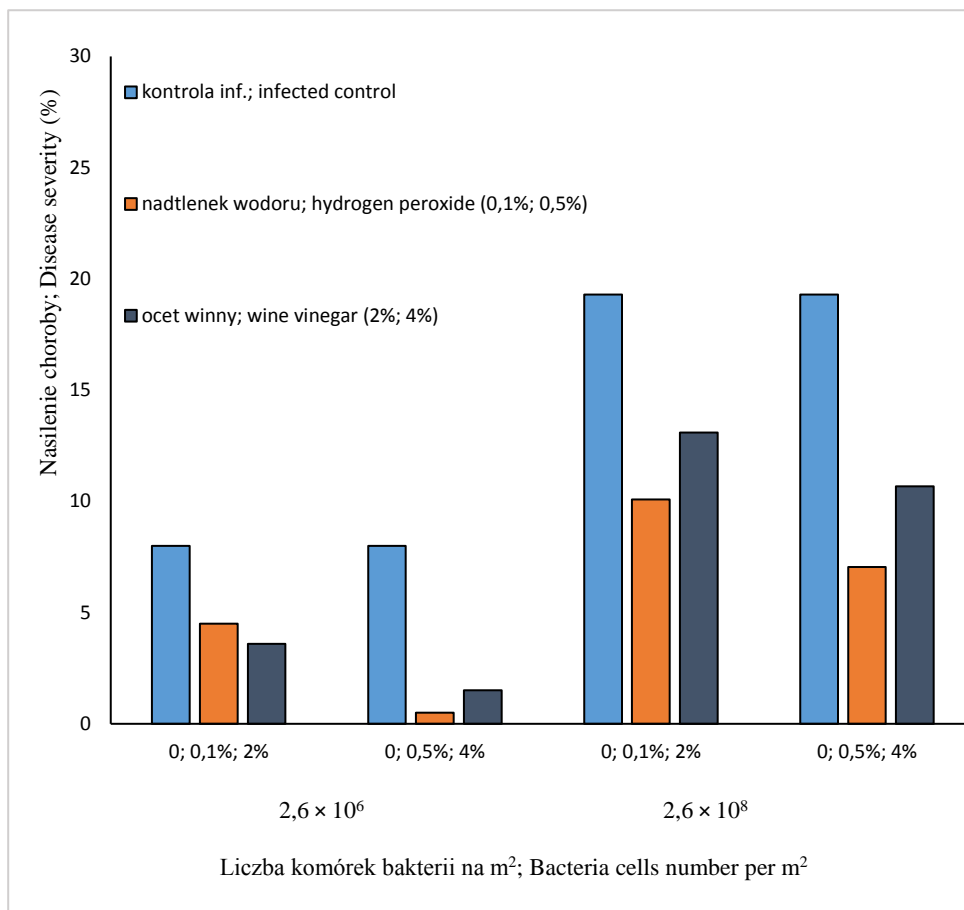
Przedstawione wartości są średnimi dla danego stężenia substancji bez podziału na liczbę jej dawek dodawanych do okrywy; The presented values are averages for a concentration of the substance without dividing it into the number of its doses added to the casing soil

Rysunek 1. Średnie nasilenie choroby bakteryjnej (%) wywoływanej przez *P. tolaasii* w pierwszym rzucie po zastosowaniu substancji podstawowych

Figure 1. Mean severity of bacterial disease (%) caused by *P. tolaasii* in the first flush after application of basic substances

W drugim rzucie nasilenie choroby w kontroli infekowanej zawiesiną bakterii w stężeniu  $2,6 \times 10^6$  na m<sup>2</sup> wynosiło 9%. Badane substancje podstawowe wyraźnie ograniczyły rozwój plamistości, a w kombinacjach, w których substancje były stosowane w wyższych stężeniach, owocniki z objawami choroby praktycznie nie wystąpiły. W przypadku infekowania zawiesiną o wyższym stężeniu komórek bakterii nasilenie choroby wynosiło 20%. Badane substancje podstawowe istotnie ograniczyły rozwój choroby, zwłaszcza w wyższych stężeniach (rys. 2).





Przedstawione wartości są średnimi dla danego stężenia substancji bez podziału na liczbę jej dawek dodawanych do okrywy; The presented values are averages for a concentration of the substance without dividing it into the number of its doses added to the casing soil

Rysunek 2. Średnie nasilenie choroby bakteryjnej (%) wywoływanej przez *P. tolaasii* w drugim rzucie po zastosowaniu substancji podstawowych

Figure 2. Mean severity of bacterial disease (%) caused by *P. tolaasii* in the second flush after application of basic substances

Nasilenie chorób bakteryjnych w uprawie pieczarki badali również Navarro i in. (2018), którzy wykazali, że stopień nasilenia plamistości w pierwszym rzucie wynosił od 5 do 15%, zaś w drugim wzrósł do ponad 25%. Według Oliviera i in. (1997) po zainfekowaniu uprawy bakterią *P. tolaasii* objawy były najsilniejsze w pierwszym rzucie, a w drugim i trzecim nasilenie choroby było znikome. Wyniki sugerują zatem, że na rozwój chorób bakteryjnych wpływ mają też warunki panujące w hali uprawowej, a zapewne także genotyp pieczarki (Navarro i in. 2018; Wong i Preece 1982).

W ochronie przed chorobami bakteryjnymi najczęściej stosuje się związki chlorowe, np. woda chlorowana podchlorynem sodu i dwutlenkiem chloru, kwas nadoctowy (Wong i Preece 1985a) lub czwartorzędowe związki amoniowe (Wong i Preece 1985b). Skuteczność nadtlenu wodoru w ochronie przed rozwojem plamistości bakteryjnej w ochronie badali też Szumigaj-Tarnowska i in. (2012). Ten preparat wykazał się niższą skutecznością niż preparat na bazie podchlorynu sodu. W prezentowanej pracy skuteczność ochronna substancji podstawowych była istotna w drugim rzucie.

### WNIOSKI

W warunkach laboratoryjnych wykazano wysoką aktywność bakterioobójczą i bakteriostatyczną nadtlenu wodoru i octu winnego względem bakterii *Pseudomonas tolaasii*. W warunkach uprawowych substancje podstawowe wykazały zróżnicowaną skuteczność w ograniczeniu brunatnej plamistości, zależną od rzutu owocników, stężenia komórek bakterii w zawiesinie i stosowanych stężeń substancji podstawowych. Ograniczający wpływ nadtlenu wodoru i octu winnego na rozwój plamistości bakteryjnej wykazano w drugim rzucie owocników. Skuteczność badanych substancji w ochronie pieczarki przed chorobami bakteryjnymi wymaga prowadzenia dalszych badań. Należy między innymi ocenić wpływ zwielokrotnienia liczby aplikacji substancji i zastosowania ich w wyższych stężeniach. Wydaje się bowiem, iż zastosowanie nadtlenu wodoru i octu winnego do ograniczenia plamistości bakteryjnej pieczarki może być alternatywą dla innych chemicznych metod ochrony, a przede wszystkim może być wykorzystane w ekologicznej uprawie pieczarki.

### Literatura

- Beveridge T.J. 2001. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry* 76(3): 111–118. DOI: 10.1080/bih.76.3.111.118.
- Brennan M., Le Port G., Gormley R. 2000. Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms. *LWT – Food Science and Technology* 33(4): 285–289. DOI: 10.1006/fstl.2000.0657.
- Bruno G.L., Rana G.L., Sermani S., Scarola L., Cariddi C. 2013. Control of bacterial yellowing of cardoncello mushroom *Pleurotus eryngii* using acetic or hydrochloric acid solutions. *Crop Protection* 50: 24–29. DOI: 10.1016/j.cropro.2013.03.010.
- Bruno G.L., De Corato U., Rana G.L., De Luca P., Pipoli V., Lops R. i in. 2015. Suppressiveness of white vinegar and steam-exploded liquid waste against the causal agents of *Pleurotus eryngii* yellowing. *Crop Protection* 70: 61–69. DOI: 10.1016/j.cropro.2015.01.006.

- Buchanan R.E., Gibbons N.E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 1246 s.
- Cortesia C., Vilchèze C., Bernut A., Contreras W., Gómez K., de Waard J. i in. 2014. Acetic acid, the active component of vinegar, is an effective tuberculocidal disinfectant. *mBIO* 5(2); e00013-14. DOI: 10.1128/mbio.00013-14.
- Entani E., Asai M., Tsujihata S., Tsukamoto Y., Ohta M. 1998. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 61(8): 953–959. DOI: 10.4315/0362-028x-61.8.953.
- Fletcher J.T. 1979. Bacteria and mushrooms. *Mushroom Journal* 82: 451–457.
- Fletcher J.T., Gaze R.H. 2008. *Mushroom Pest and Disease Control: A Color Handbook*. Manson Publishing, London, UK, 192 s. DOI: 10.1201/b15139.
- Gill W.M. 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. *Reports of the Tottori Mycological Institute* 33: 34–55.
- Hugh R., Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66(1): 24–26. DOI: 10.1128/jb.66.1.24-26.1953.
- King E.O., Ward M.K., Raney D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301–307.
- Lelliott R.A., Billing E., Hayward A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology* 29(3): 470–489. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1966.tb03499.x.
- Navarro M.J., Gea F.J., González A.J. 2018. Identification, incidence and control of bacterial blotch disease in mushroom crops by management of environmental conditions. *Scientia Horticulturae* 229: 10–18. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.10.023.
- Olivier J.M., Mamoun M., Munsch P. 1997. Standardization of a method to assess mushroom blotch resistance in cultivated and wild *Agaricus bisporus* strains. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19(1): 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.
- Sapers G.M., Miller R.L., Pilizota V., Kamp F. 2001. Shelf life extension of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) by application of hydrogen peroxide and browning inhibitors. *Journal of Food Science* 66(2): 362–366. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb11347.x.
- Soler-Rivas C., Jolivet S., Arpin N., Oliver J.M., Wichers H.J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Reviews* 23(5): 591–614. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00415.x.
- 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. DOI: 10.14199/ppp-2012-122.

- Todorović B., Miličević-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, Part B* 47(3): 175–179. DOI: 10.1080/03601234.2012.632282.
- Tolaas A.G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5: 51–54.
- Wong W.C., Preece T.F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *Journal of Applied Bacteriology* 47(3): 401–407. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1979.tb01200.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. 1985a. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: effects of sodium hypochlorite on the bacterium and on blotch disease severity. *Journal of Applied Bacteriology* 58: 259–267. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1985.tb01459.x.
- Wong W.C., Preece T.F. 1985b. *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 zostały wykonane w ramach zadania nr JPR.re.027.1.2020 realizowanego w roku 2020, finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi.