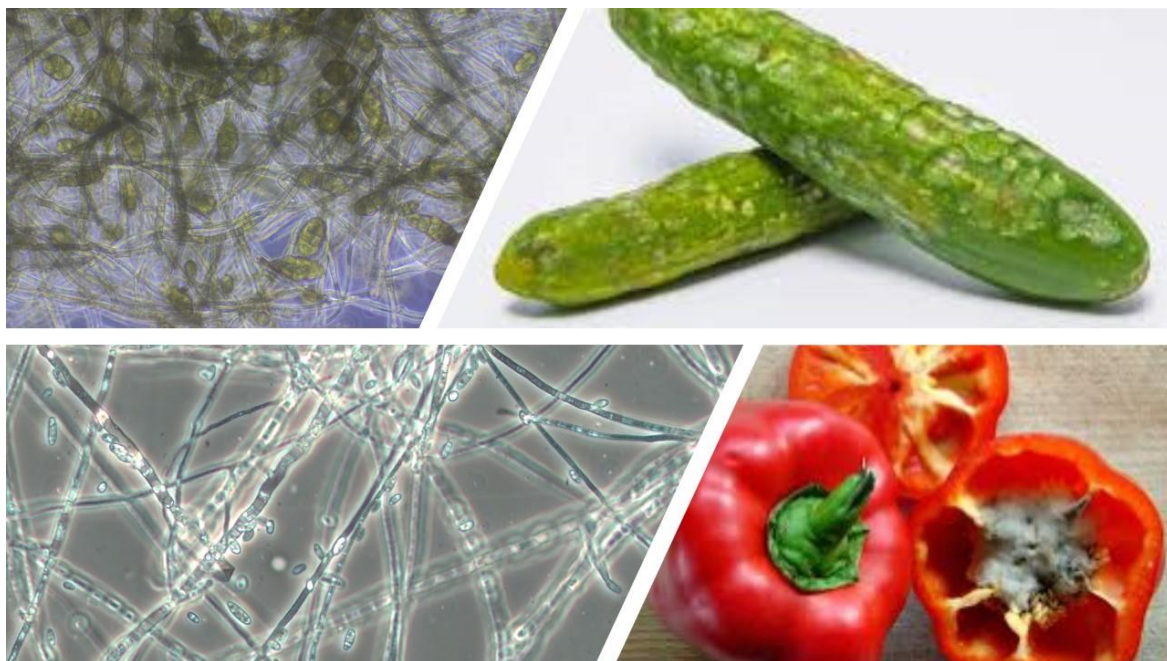


INSTYTUT BIOTECHNOLOGII
PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

***Ocena skuteczności biotechnologicznych
metod utrwalania w przedłużaniu trwałości
wybranych produktów roślinnych***



Badania zrealizowane w ramach Zadania 16: Ocena skuteczności biotechnologicznych metod utrwalania w przedłużaniu trwałości wybranych produktów roślinnych na zlecenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi na podstawie umowy nr DRE.prz.070.1.2025.

Opracowanie:

dr inż. Justyna Nasiłowska

dr inż. Izabela Porębska

mgr inż. Katarzyna Cybulska

mgr inż. Ewelina Kiełek

inż. Klaudia Kamińska

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława
Dąbrowskiego Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Mikrobiologii

Wstęp

Ograniczanie strat przechowalniczych świeżych produktów roślinnych jest jednym z kluczowych wyzwań dla sektora rolno-spożywczego. W przypadku warzyw o krótkiej trwałości (m.in. papryki i ogórka) znacząca część strat jakości i masy wynika z rozwoju mikroflory psującej oraz patogenów powodujących porażenia po zbiorze. Zjawisko to przekłada się bezpośrednio na straty ekonomiczne, skrócenie okresu przydatności do obrotu oraz ograniczenie możliwości dystrybucji w dłuższym łańcuchu dostaw. Przeglądy poświęcone biokontroli podkreślają, że straty po zbiorze mogą być istotne, a działania ograniczające rozwój patogenów i mikroorganizmów psujących mają realny potencjał w poprawie trwałości i jakości produktów świeżych (Linares-Morales i in., 2018).

Równolegle obserwuje się rosnące oczekiwania rynku i konsumentów dotyczące ograniczania stosowania chemicznych środków konserwujących oraz rozwoju rozwiązań przyjaznych środowisku, zgodnych z kierunkami zrównoważonej produkcji żywności. W tym kontekście coraz większego znaczenia nabiera bioprezerwacja i biokontrola – wykorzystanie mikroorganizmów oraz ich metabolitów jako naturalnych czynników ograniczających rozwój mikroflory niepożądaney. Szczególnie istotną grupę stanowią bakterie kwasu mlekowego (LAB), których rola w utrwalaniu i poprawie bezpieczeństwa żywności jest szeroko opisana, m.in. poprzez zakwaszanie środowiska, konkurencję o składniki odżywcze i przestrzeń oraz wytwarzanie związków przeciwdrobnoustrojowych (Zapaśnik i in., 2022). Prace aplikacyjne pokazują, że LAB mogą być wykorzystywane jako naturalny element ochrony świeżych produktów – zarówno w postaci komórek, jak i metabolitów obecnych w supernatantach – z korzyścią dla trwałości przechowalniczej i ograniczenia rozwoju mikroorganizmów psujących (Islam i in., 2023).

W obszarze biotechnologicznych metod utrwalania istotne miejsce zajmują również bakterie z rodzaju *Bacillus* oraz inne mikroorganizmy środowiskowe, które wykazują właściwości antagonistyczne wobec patogenów roślinnych i mikroflory psującej. Badania prowadzone na owocach i warzywach po zbiorze wskazują, że wybrane szczepy bakterii mogą ograniczać rozwój takich patogenów jak *Botrytis cinerea* czy *Alternaria alternata*, a efekty te są obserwowane bezpośrednio w doświadczeniach na materiale roślinnym, co ma kluczowe znaczenie dla oceny potencjału praktycznego (Luo i in., 2019). Jednocześnie wykazano, że skuteczność oddziaływań biologicznych zależy od wielu czynników, w tym od rodzaju produktu (matrycy roślinnej), zastosowanego patogenu, sposobu aplikacji oraz warunków

przechowywania (Linares-Morales i in., 2018; Zapaśnik i in., 2022). W konsekwencji, choć testy *in vitro* (np. na podłożach mikrobiologicznych) są użyteczne jako narzędzie przesiewowe, nie stanowią wystarczającej podstawy do wnioskowania o przydatności rozwiązania w warunkach zbliżonych do rzeczywistych. Prace z zakresu biokontroli po zbiorze podkreślają konieczność weryfikacji efektów w doświadczeniach na owocach/warzywach, ponieważ skuteczność obserwowana w warunkach laboratoryjnych nie zawsze przekłada się bezpośrednio na rezultaty uzyskiwane w modelach przechowalniczych (Chaouachi i in., 2021; Luo i in., 2019).

Zadanie 16 wpisuje się w powyższe kierunki rozwoju nowoczesnych, ekologicznych technologii produkcji i utrwalania żywności oraz w działania ukierunkowane na ograniczanie strat przechowalniczych. Celem zadania była ocena potencjału biotechnologicznych metod utrwalania świeżych produktów roślinnych w kontekście ograniczania rozwoju mikroflory powodującej ich psucie oraz poprawy trwałości przechowalniczej wybranych warzyw. W ramach zadania przeprowadzono badania laboratoryjne dotyczące wykorzystania wybranych mikroorganizmów – w szczególności bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Lactobacillus* oraz drożdży – jako naturalnych czynników ochronnych ograniczających rozwój patogenów istotnych z punktu widzenia strat przechowalniczych. Zastosowano modelowy układ doświadczalny umożliwiający ocenę zmian zachodzących w materiale roślinnym po zastosowaniu mikroorganizmów w porównaniu do prób kontrolnych, w oparciu o obserwacje wizualne w trakcie przechowywania. Równolegle wykonano testy przesiewowe *in vitro* jako uzupełniające narzędzie oceny oddziaływań antagonistycznych.

Przyjęta logika realizacji zadania odpowiada podejściu rekomendowanemu w literaturze: badania nad bioprezerwacją i biokontrolą powinny obejmować zarówno etap ujawniający potencjał antagonistyczny szczepów, jak i etap weryfikujący skuteczność w warunkach zbliżonych do praktycznych, tj. bezpośrednio na produkcie roślinnym (Chaouachi i in., 2021; Luo i in., 2019). Uzyskane wyniki stanowią podstawę do oceny przydatności badanych mikroorganizmów w ograniczaniu rozwoju patogenów oraz do sformułowania wniosków aplikacyjnych i rekomendacji dotyczących dalszych prac badawczo-rozwojowych, w szczególności w zakresie dopracowania parametrów aplikacji i docelowego wykorzystania rozwiązań biologicznych w łańcuchu produkcji i dystrybucji świeżych warzyw (Linares-Morales i in., 2018; Zapaśnik i in., 2022).

Metodyka

Materiały wykorzystane w badaniach

W badaniach wykorzystano wybrane szczepy bakterii, drożdży, szczepy patogenów roślinnych oraz świeży materiał roślinny, dobrane zgodnie z zakresem i celami zadania.

Mikroorganizmy badane

Wszystkie szczepy mikroorganizmów zastosowane w doświadczeniach pochodziły z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych (KKP). Do badań zakwalifikowano szczepy bakterii oraz drożdży, obejmujące mikroorganizmy o potencjale aplikacyjnym w kontekście biotechnologicznych metod utrwalania żywności oraz ograniczania rozwoju mikroflory powodującej psucie produktów roślinnych.

W doświadczeniach wykorzystano następujące szczepy:

Bakterie:

- *Lactilactobacillus curvatus* KKP 3578
- *Lactiplantibacillus backii* KKP 3566
- *Bacillus subtilis* KKP 3897
- *Bacillus pumilus* KKP 3902

Drożdże:

- *Solicoccozyma terricola* KKP 3026
- *Candida vartiovaarae* KKP 3051
- *Hanseniaspora uvarum* KKP 3025
- *Cryptococcus* sp. KKP 3027

Patogeny roślinne

W doświadczeniach zastosowano szczepy patogenów roślinnych, pełniące rolę czynników testowych w modelowym układzie doświadczalnym, umożliwiającym ocenę skuteczności badanych rozwiązań biologicznych.

W badaniach wykorzystano następujące patogeny:

- *Alternaria alternata* KKP 4022
- *Fusarium oxysporum* KKP 458

Zastosowane patogeny są powszechnie wykorzystywane jako organizmy testowe w badaniach nad stratami przechowalniczymi warzyw oraz w ocenie skuteczności metod biologicznego ograniczania rozwoju mikroflory powodującej psucie produktów roślinnych.

Szczepki przechowywano i namnażano zgodnie ze standardami KKP, w warunkach odpowiednich dla danego mikroorganizmu, przed ich wykorzystaniem w doświadczeniach.

Materiał roślinny

Materiał roślinny w postaci owoców papryki oraz ogórka zakupiono w lokalnym obrocie handlowym i wykorzystano do badań bezpośrednio po zakupie. Do doświadczeń wybierano owoce zdrowe, bez widocznych uszkodzeń mechanicznych oraz objawów porażenia, o zbliżonym stopniu dojrzałości, co pozwalało na ograniczenie zmienności wyników wynikającej z jakości surowca.

Przed rozpoczęciem doświadczeń owoce poddawano procedurze przygotowania opisanej w części metodycznej, obejmującej oczyszczenie powierzchni oraz dezynfekcję, w celu ograniczenia wpływu naturalnej mikroflory powierzchniowej na przebieg badań.

Metodyka badań na materiale roślinnym (in vivo)

Badania nad skutecznością biotechnologicznych metod utrwalania prowadzono z wykorzystaniem zmodyfikowanego modelu doświadczeń na materiale roślinnym, opartego na podejściach stosowanych w badaniach nad biokontrolą po zbiorze, opisanych w literaturze przedmiotu (m.in. Luo i in., 2019). Model ten umożliwia ocenę oddziaływań biologicznych bezpośrednio na produkcie roślinnym, w warunkach zbliżonych do przechowalniczych, co ma kluczowe znaczenie dla oceny potencjału aplikacyjnego badanych rozwiązań.

Doświadczenia prowadzono na owocach papryki oraz ogórka. Przed rozpoczęciem badań materiał roślinny poddawano standardowej procedurze przygotowania, obejmującej mycie pod bieżącą wodą, osuszanie, powierzchniową dezynfekcję oraz płukanie w jałowej wodzie. Po przygotowaniu owoce pozostawiano do wyschnięcia w warunkach laboratoryjnych, a następnie wykonywano na ich powierzchni standaryzowane uszkodzenia mechaniczne (rany inokulacyjne), stanowiące miejsca aplikacji mikroorganizmów i patogenów.

Zgodnie ze zmodyfikowanym schematem inokulacji, do wykonanych ran najpierw aplikowano zawiesinę badanego mikroorganizmu, a następnie zawiesinę patogenu. Zastosowanie sekwencyjnej inokulacji stanowiło modyfikację procedur opisywanych w literaturze i miało na celu ocenę potencjału ochronnego mikroorganizmów w warunkach symulujących ich wcześniejsze zastosowanie na materiale roślinnym. Dla każdego wariantu

doświadczalnego uwzględniono odpowiednie próby kontrolne, obejmujące inokulację patogenu bez aplikacji mikroorganizmów ochronnych.

Po inokulacji owoce inkubowano w stałej temperaturze 25 °C przez okres do 7 dni. W trakcie inkubacji prowadzono codzienne obserwacje wizualne, rozpoczynając od trzeciego dnia doświadczenia, co pozwalało na rejestrację pojawienia się i rozwoju objawów porażenia.

Efekt zastosowania badanych mikroorganizmów oceniano na podstawie częstości porażień, definiowanej jako liczba miejsc inokulacji wykazujących objawy chorobowe w odniesieniu do całkowitej liczby ocenianych miejsc ($x/10$). Ocena ta miała charakter jakościowo-ilościowy i umożliwiała porównanie skuteczności poszczególnych wariantów doświadczalnych względem prób kontrolnych. Przyjęty sposób oceny stanowi uproszczoną, lecz powszechnie stosowaną w badaniach aplikacyjnych formę oceny skuteczności biokontroli po zbiorze, adekwatną do celów niniejszego zadania.

Metodyka badań in vitro

Testy przesiewowe in vitro przeprowadzono metodą dyfuzji studzienkowej w agarze, zgodnie z klasycznym opisem tej techniki stosowanej do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej (Pérez Rodríguez i in., 1990). Metoda ta pozwala na jakościową ocenę oddziaływań antagonistycznych badanych mikroorganizmów wobec patogenów testowych poprzez obserwację stref zahamowania wzrostu.

Do badań wykorzystano te same szczepy bakterii i drożdży, które oceniano w doświadczeniach prowadzonych na materiale roślinnym, co zapewniało spójność układu badawczego i umożliwiało porównanie wyników uzyskanych w warunkach laboratoryjnych z efektami obserwowanymi w doświadczeniach aplikacyjnych. Jako organizmy testowe zastosowano patogeny roślinne wykorzystywane również w badaniach in vivo.

Testy przesiewowe przeprowadzono na podłożu PDA, stanowiącym standardową matrycę agarową wykorzystywaną w badaniach nad oddziaływaniami antagonistycznymi pomiędzy mikroorganizmami a patogenami grzybowymi. Zastosowanie jednolitego podłoża umożliwiało porównawczą ocenę aktywności badanych szczepów w jednakowych warunkach laboratoryjnych.

Po przygotowaniu podłoży wykonywano studzienki, do których aplikowano zawiesiny badanych mikroorganizmów, a następnie płytki inkubowano w warunkach optymalnych dla

wzrostu patogenów testowych. Po zakończeniu inkubacji oceniano obecność oraz wielkość stref zahamowania wzrostu patogenów wokół studzienek. Wyniki rejestrowano w formie opisowej, klasyfikując obserwowany efekt jako brak hamowania, efekt słabo zaznaczony lub wyraźne hamowanie wzrostu o różnym nasileniu.

Testy *in vitro* miały charakter przesiewowy i stanowiły uzupełnienie badań prowadzonych na materiale roślinnym. Ich celem była wstępna identyfikacja potencjalnych oddziaływań antagonistycznych oraz wsparcie interpretacji wyników uzyskanych w doświadczeniach *in vivo*, prowadzonych w warunkach zbliżonych do przechowalniczych.

Wyniki i ich omówienie

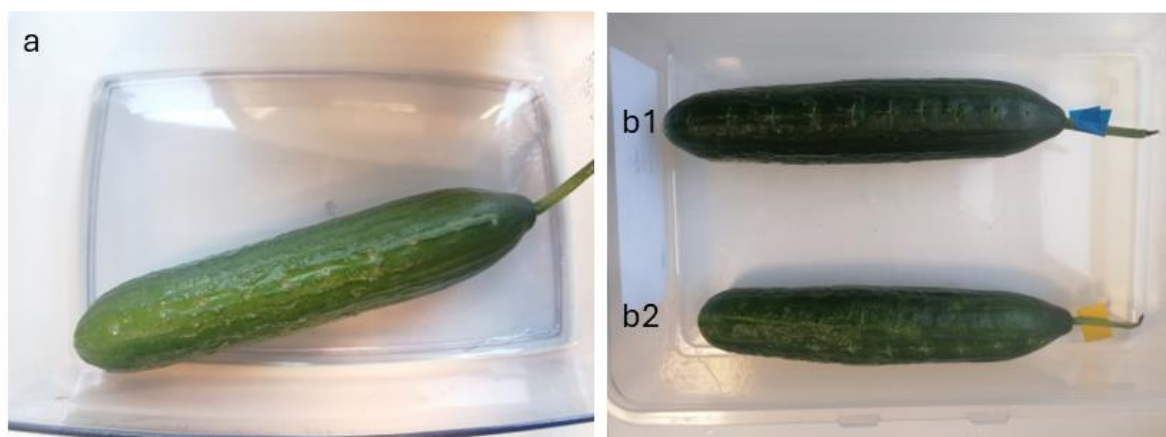
Wyniki doświadczeń na materiale roślinnym

W ramach realizacji zadania przeprowadzono doświadczenia na materiale roślinnym, których celem była ocena skuteczności wybranych szczepów mikroorganizmów w ograniczaniu rozwoju patogenów odpowiedzialnych za psucie świeżych warzyw. Badania prowadzono na owocach papryki i ogórka z wykorzystaniem modelu doświadczalnego opartego na sztucznej inokulacji patogenów oraz aplikacji mikroorganizmów o potencjale ochronnym.

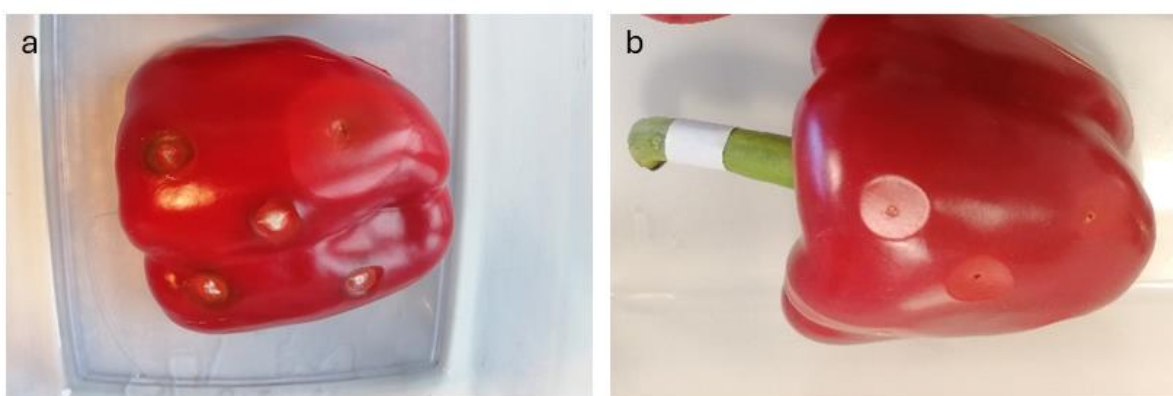
W wariantach kontrolnych, obejmujących inokulację patogenów bez zastosowania mikroorganizmów ochronnych, w każdym badanym układzie stwierdzono wystąpienie objawów porażenia we wszystkich miejscach inokulacji (10/10). Potwierdza to prawidłowe funkcjonowanie zastosowanego modelu doświadczalnego oraz jego przydatność do oceny skuteczności badanych rozwiązań biologicznych. Częstość porażen obserwowaną w doświadczeniach na owocach papryki i ogórka po inokulacji patogenów oraz zastosowaniu badanych szczepów mikroorganizmów przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Częstość porażen (x/10) w doświadczeniach na owocach papryki i ogórka po inokulacji patogenów oraz zastosowaniu badanych szczepów mikroorganizmów. (Kontrola: patogen bez aplikacji mikroorganizmów ochronnych.)

		ogórek		papryka	
		<i>Alternaria alternata</i> KKP 4022	<i>Fusarium oxysporum</i> KKP 458	<i>Alternaria alternata</i> KKP 4022	<i>Fusarium oxysporum</i> KKP 458
bakterie	<i>Lactilactobacillus curvatus</i> KKP 3578	7/10	9/10	4/10	10/10
	<i>Lactiplantibacillus backii</i> KKP 3566	9/10	10/10	0/10	10/10
	<i>Bacillus subtilis</i> KKP 3897	5/10	10/10	0/10	10/10
	<i>Bacillus pumilus</i> KKP 3902	1/10	10/10	0/10	10/10
	Kontrola dla bakterii	10/10	10/10	10/10	10/10
drożdże	<i>Solicoccozyma terricola</i> KKP 3026	0/10	1/10	6/10	1/10
	<i>Candida vartiovaarae</i> KKP 3051	6/10	0/10	6/10	0/10
	<i>Hanseniaspora uvarum</i> KKP 3025	9/10	10/10	9/10	0/10
	<i>Cryptococcus</i> sp. KKP 3027	0/10	10/10	10/10	0/10
	Kontrola dla drożdży	10/10	10/10	10/10	10/10



Rys. 1. Przykładowe objawy porażenia owoców ogórka przez *Alternaria alternata* w wariancie kontrolnym (a) oraz po zastosowaniu mikroorganizmu ochronnego *Cryptococcus* sp. KKP 3027 (b1) i *Solicoccozyma terricola* KKP 3026 (b2).



Rys. 2. Przykładowe objawy porażenia owoców papryki przez *Fusarium oxysporum* w wariancie kontrolnym (a) oraz po zastosowaniu mikroorganizmu ochronnego *Hanseniaspora uvarum* KKP 3025 (b).

W przypadku infekcji wywołanej przez *Alternaria alternata* odnotowano wyraźne ograniczenie częstości porażień w porównaniu do wariantów kontrolnych, przy czym skuteczność badanych mikroorganizmów była zależna od rodzaju warzywa. Na owocach papryki najsilniejszy efekt ochronny uzyskano po zastosowaniu szczepów bakteryjnych *Lactiplantibacillus backii* KKP 3566, *Bacillus subtilis* KKP 3897 oraz *Bacillus pumilis* KKP 3902, dla których nie stwierdzono objawów porażenia (0/10 wobec 10/10 w kontroli). Dla *Lactilactobacillus curvatus* KKP 3578 efekt ochronny miał charakter częściowy.

Na ogórku najwyższą skuteczność wobec *A. alternata* wykazywały drożdże *Solicoccozyma terricola* KKP 3026 oraz *Cryptococcus* sp. KKP 3027, a także *Bacillus pumilis* KKP 3902, który istotnie ograniczał rozwój patogenu. Pozostałe warianty charakteryzowały się niewielkim lub umiarkowanym ograniczeniem częstości porażień.

W przypadku infekcji wywołanej przez *Fusarium oxysporum* skuteczność badanych mikroorganizmów była zróżnicowana i w większym stopniu zależna od rodzaju zastosowanego szczepu drożdżowego. Na owocach papryki najsilniejszy efekt ochronny uzyskano po zastosowaniu *Candida vartiovaarae* KKP 3051, *Hanseniaspora uvarum* KKP

3025 oraz *Cryptococcus* sp. KKP 3027, dla których nie obserwowano objawów porażenia. Wysoką, choć niepełną skuteczność wykazywała również *Solicoccozyma terricola* KKP 3026.

Na ogórku ograniczenie porażen *F. oxysporum* stwierdzono jedynie dla *C. vartiovaarae* KKP 3051 oraz *S. terricola* KKP 3026, natomiast pozostałe szczepy nie wykazywały efektu ochronnego. Zastosowane szczepy bakteryjne nie ograniczały rozwoju *F. oxysporum* w badanych warunkach, niezależnie od rodzaju materiału roślinnego.

Wyniki testów przesiewowych in vitro

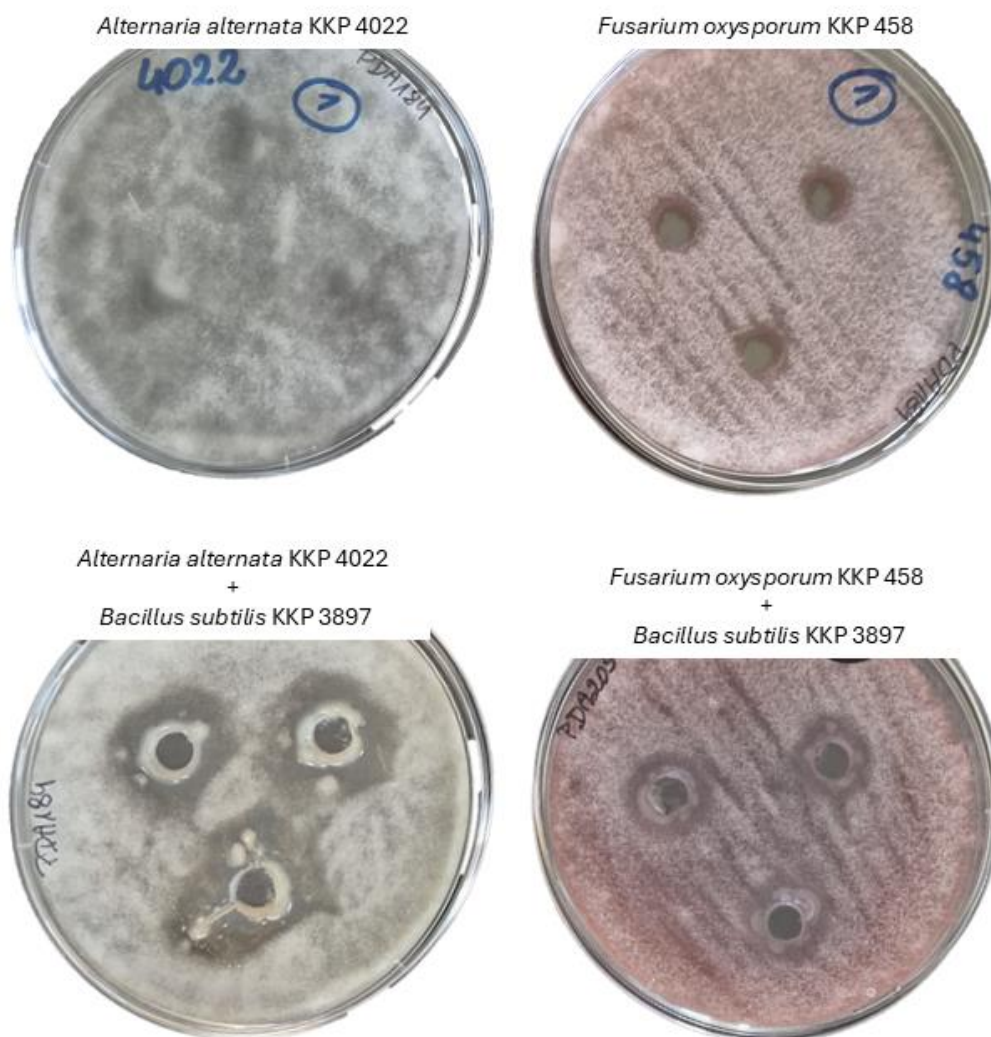
Równoległe z doświadczeniami prowadzonymi na materiale roślinnym wykonano testy przesiewowe in vitro, których celem była ocena potencjału antagonistycznego badanych szczepów mikroorganizmów wobec patogenów testowych w warunkach laboratoryjnych. Badania te miały charakter uzupełniający i pozwalały na ocenę oddziaływań pomiędzy mikroorganizmami a patogenami.

Testy przeprowadzono metodą dyfuzji studzienkowej w agarze, a uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 2, prezentując obecność oraz względną intensywność stref zahamowania wzrostu patogenów.

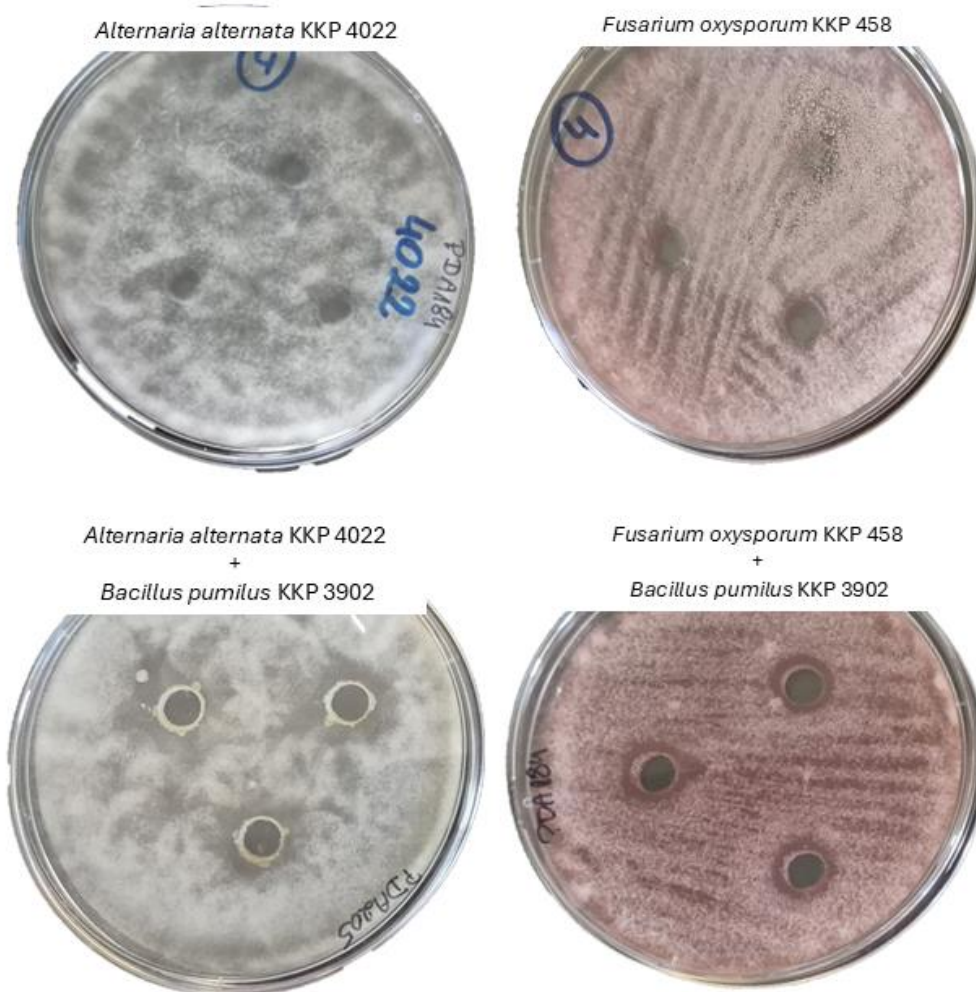
Tab. 2. Ocena aktywności antagonistycznej badanych szczepów wobec patogenów metodą studzienkową na PDA.

Szczep	<i>Alternaria alternata</i> KKP 4022	<i>Fusarium oxysporum</i> KKP 458
<i>Lactilactobacillus curvatus</i> KKP 3578	+	+
<i>Lactiplantibacillus backii</i> KKP 3566	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> KKP 3897	++	+
<i>Bacillus pumilus</i> KKP 3902	++	+
<i>Solicoccozyma terricola</i> KKP 3026	+/-	-
<i>Candida vartiovaarae</i> KKP 3025	-	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i> KKP 3051	+/-	+
<i>Cryptococcus</i> sp. KKP 3027	+/-	-

Legenda: – brak hamowania; +/- efekt słabo zaznaczony/trudny do jednoznacznej oceny; + wyraźna strefa zahamowania; ++ duża strefa.



Rys. 3. Ocena aktywności antagonistycznej *Bacillus subtilis* KKP 3897 względem *Alternaria alternata* KKP 4022 i *Fusarium oxysporum* KKP 458.



Rys. 4. Ocena aktywności antagonistycznej *Bacillus pumilus* KKP 3902 względem *Alternaria alternata* KKP 4022 i *Fusarium oxysporum* KKP 458.

W testach in vitro najwyższą aktywność antagonistyczną wobec *Alternaria alternata* wykazywały szczepy z rodzaju *Bacillus*. Szczególnie wyraźny efekt obserwowano dla *Bacillus subtilis* KKP 3897, dla którego stwierdzono dużą strefę zahamowania wzrostu patogenu, oraz dla *Bacillus pumilus* KKP 3902, który również charakteryzował się znaczącym działaniem antagonistycznym. Wyniki te są spójne z efektami uzyskanymi w doświadczeniach na materiale roślinnym, zwłaszcza w przypadku papryki, gdzie szczepy te skutecznie ograniczały porażenia wywołane przez *A. alternata*.

W odniesieniu do *Fusarium oxysporum* w testach in vitro obserwowano hamowanie wzrostu patogenu dla części szczepów bakteryjnych, w tym szczególnie dla *Bacillus pumilus* KKP 3902. Jednocześnie nie stwierdzono wyraźnej aktywności antagonistycznej większości

szczepów drożdżowych w warunkach laboratoryjnych. Uzyskane wyniki nie przekładały się jednak bezpośrednio na skuteczność obserwowaną w doświadczeniach na materiale roślinnym, gdzie wybrane drożdże wykazywały istotny efekt ochronny wobec *F. oxysporum*.

Zaobserwowane różnice pomiędzy wynikami testów in vitro i doświadczeń prowadzonych na owocach wskazują, że skuteczność mikroorganizmów w ograniczaniu rozwoju patogenów zależy od rodzaju podłoża i warunków środowiskowych na których wzrastają (in vitro - sztuczne pożywki laboratoryjne, in vivo - materiał roślinny). Testy laboratoryjne stanowią użyteczne narzędzie przesiewowe, jednak pełna ocena potencjału aplikacyjnego badanych szczepów wymaga badań prowadzonych bezpośrednio na materiale roślinnym, w warunkach zbliżonych do rzeczywistych warunków przechowywania.

Zestawienie i interpretacja wyników

Łączna analiza wyników uzyskanych w doświadczeniach na materiale roślinnym oraz w testach przesiewowych in vitro wskazuje na wyraźne zróżnicowanie skuteczności badanych mikroorganizmów w zależności od patogenu oraz rodzaju warzywa. Wyniki potwierdzają, że efektywność biologicznych metod utrwalania świeżych produktów roślinnych nie ma charakteru uniwersalnego i wymaga indywidualnego doboru mikroorganizmów do konkretnego zastosowania.

Szczepy z rodzaju *Bacillus* wykazywały najwyższą skuteczność w ograniczaniu rozwoju *Alternaria alternata*, szczególnie na papryce, co było spójne zarówno w testach in vitro, jak i w doświadczeniach aplikacyjnych. Z kolei wybrane szczepy drożdży charakteryzowały się wysoką skutecznością w ograniczaniu porażen wywołanych przez *Fusarium oxysporum*, zwłaszcza na papryce, mimo słabego lub niejednoznacznego efektu obserwowanego w testach laboratoryjnych.

Zaobserwowane różnice pomiędzy papryką a ogórkiem wskazują na istotny wpływ właściwości matrycy roślinnej na skuteczność badanych rozwiązań biologicznych. Wyniki te potwierdzają zasadność prowadzenia badań bezpośrednio na materiale roślinnym oraz wykorzystania testów in vitro wyłącznie jako narzędzia pomocniczego na etapie przesiewowym.

Całość uzyskanych wyników wskazuje, że skuteczność badanych mikroorganizmów w ograniczaniu rozwoju patogenów roślinnych jest silnie uzależniona od warunków środowiskowych oraz rodzaju materiału roślinnego. Zastosowane podejście badawcze

umożliwiło identyfikację szczepów o najwyższym potencjale aplikacyjnym oraz potwierdziło zasadność prowadzenia dalszych prac ukierunkowanych na rozwój biologicznych metod utrwalania świeżych produktów roślinnych.

Podsumowanie

W ramach realizacji zadania przeprowadzono kompleksowe badania laboratoryjne umożliwiające ocenę potencjału wybranych mikroorganizmów w ograniczaniu rozwoju patogenów odpowiedzialnych za psucie świeżych produktów roślinnych o krótkiej trwałości przechowalniczej. Zastosowane podejście badawcze, obejmujące zarówno doświadczenia na materiale roślinnym, jak i testy przesiewowe *in vitro*, pozwoliło na ocenę skuteczności badanych rozwiązań biologicznych w różnych układach doświadczalnych.

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że wybrane szczepy bakterii i drożdży mogą skutecznie ograniczać rozwój patogenów roślinnych, przy czym efektywność ta była zależna od rodzaju mikroorganizmu, patogenu oraz matrycy roślinnej. Szczepy z rodzaju *Bacillus* wykazywały wysoką skuteczność w ograniczaniu porażeń wywołanych przez *Alternaria alternata*, szczególnie w przypadku papryki, natomiast wybrane szczepy drożdżowe charakteryzowały się istotnym potencjałem w ograniczaniu rozwoju *Fusarium oxysporum*, zwłaszcza na tym samym materiale roślinnym.

Przeprowadzone badania wykazały również, że testy przesiewowe *in vitro* stanowią użyteczne narzędzie pomocnicze na etapie wstępnej oceny aktywności antagonistycznej mikroorganizmów, jednak pełna i wiarygodna ocena ich potencjału aplikacyjnego wymaga badań prowadzonych bezpośrednio na materiale roślinnym, w warunkach zbliżonych do rzeczywistych warunków przechowywania.

Całość uzyskanych wyników potwierdza zasadność podjęcia i realizacji badań nad biotechnologicznymi metodami utrwalania świeżych produktów roślinnych z wykorzystaniem mikroorganizmów. Prace przeprowadzone w ramach zadania dostarczyły wartościowych danych umożliwiających identyfikację najbardziej obiecujących szczepów oraz stanowią solidną podstawę do dalszych badań ukierunkowanych na rozwój biologicznych metod ograniczania strat przechowalniczych i poprawy jakości świeżych warzyw.

Znaczenie praktyczne wyników

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie wybranych mikroorganizmów może stanowić skuteczne narzędzie ograniczania rozwoju patogenów odpowiedzialnych za psucie świeżych warzyw o krótkiej trwałości przechowalniczej, takich jak papryka i ogórek. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość wykorzystania biologicznych metod ochrony jako alternatywy lub uzupełnienia dla konwencjonalnych rozwiązań opartych na środkach chemicznych.

Zidentyfikowane w trakcie realizacji zadania szczepy wykazujące najwyższą skuteczność w ograniczaniu rozwoju *Alternaria alternata* oraz *Fusarium oxysporum* stanowią wartościowy materiał wyjściowy do dalszych prac badawczo-rozwojowych. Wyniki te mogą zostać wykorzystane przy opracowywaniu biopreparatów przeznaczonych do ochrony świeżych produktów roślinnych w trakcie przechowywania i dystrybucji, a także w działaniach mających na celu ograniczenie strat przechowalniczych w sektorze rolno-spożywczym.

Praktyczne znaczenie uzyskanych rezultatów wynika również z faktu, że skuteczność badanych mikroorganizmów oceniano bezpośrednio na materiale roślinnym, w warunkach zbliżonych do rzeczywistych warunków przechowywania. Pozwala to na bardziej wiarygodną ocenę ich potencjału aplikacyjnego niż w przypadku badań ograniczonych wyłącznie do testów laboratoryjnych.

Realizacja zadania wpisuje się w aktualne kierunki rozwoju zrównoważonej produkcji żywności, w tym w założenia Europejskiego Zielonego Ładu, poprzez poszukiwanie rozwiązań umożliwiających redukcję stosowania chemicznych środków ochrony roślin i konserwantów. Uzyskane wyniki stanowią solidną podstawę do kontynuacji prac nad biologicznymi metodami utrwalania świeżych produktów roślinnych oraz do oceny możliwości ich praktycznego wdrożenia w przyszłości.

Bibliografia:

1. Chaouachi, M., Marzouk, T., Jallouli, S., Elkahoui, S., Gentzbittel, L., Ben, C., & Djébali, N. (2021). Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 172, 111389. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111389>
2. Islam, S., Biswas, S., Jabin, T., Moniruzzaman, M., Biswas, J., Uddin, M. S., ... Zaman, S. (2023). Probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* DMR14 for preserving and extending shelf life of fruits and fruit juice. *Heliyon*, 9, e17382. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17382>
3. Linares-Morales, J. R., Gutiérrez-Méndez, N., Rivera-Chavira, B. E., Pérez-Vega, S. B., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). Biocontrol processes in fruits and fresh produce, the use of lactic acid bacteria as a sustainable option. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 50. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00050>
4. Luo, M., Purdy, H., & Avis, T. J. (2019). Compost bacteria provide antifungal activity against grey mold and *Alternaria* rot on bell pepper fruit. *Botany*, 97(4), 221–230. <https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0180>
5. Pérez Rodríguez, C., Pauli, W. M., & Bazevque, P. (1990). An antibiotic assay by the agar well diffusion method. *Acta Biotechnologica*, 10(2), 113–115.
6. Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*, 11(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>



**INSTYTUT BIOTECHNOLOGII
PRZEMYSŁU ROLNO-SPOŻYWCZEGO
im. prof. Wacława Dąbrowskiego
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**

ZM

**Zakład
Mikrobiologii**

Kierownik Zakładu

dr inż. Justyna Nasilowska

telefon: 22 606 36 74

e-mail: justyna.nasilowska@ibprs.pl