



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódzki



Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych
i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego

Aleksandra Anna Walaszczyk

NUMER ALBUMU: 6246

Praca doktorska
wykonana w Katedrze
Mikrobiologii Przemysłowej
i Biotechnologii
Instytutu Mikrobiologii,
Biotechnologii i Immunologii

pod kierunkiem
dr. hab. Katarzyny
Paraszkiewicz, prof. UŁ

**Szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas*
zdolne do produkcji
biosurfaktantów – charakterystyka
mechanizmów aktywności
przeciwgrzybowej i ocena
potencjału aplikacyjnego
w obecności wybranych
zanieczyszczeń antropogennych**

Bacillus and *Pseudomonas* strains capable
of producing biosurfactants – characterization
of antifungal activity mechanisms and assessment
of application potential in the presence of selected
anthropogenic pollutants

Łódź, 2024

Wykaz skrótów

2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (syntetyczny herbicyd);

AB113 – Acid Blue 113 (barwnik azowy);

ACN – acetonitryl;

AMR – Amaranth (barwnik azowy);

AZ – azoksystrobina (syntetyczny fungicyd);

AzoR – azoreduktaza;

BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) – narzędzie bioinformatyczne służące do porównywania sekwencji aminokwasów, białek lub nukleotydów;

cLP – cykliczne lipopeptydy;

cLP-Bc – cykliczne lipopeptydy produkowane przez szczepy *Bacillus*;

cLP-Ps – cykliczne lipopeptydy produkowane przez szczepy *Pseudomonas*;

CMC (ang. *Critical Micelle Concentration*) – krytyczne stężenie micelarne;

DCT (ang. *Drop Collapse Test*) – test zapadającej się kropli;

HAA (ang. 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoate) – kwas 3-(3-hydroksyalkanoyloksy) alkanowy (prekursor RL);

ISR (ang. *Induced Systemic Resistance*) – indukowana odporność systemiczna;

KMPiB UŁ – Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego;

LB – podłoże mikrobiologiczne Luria-Bertani;

LC-MS/MS (ang. *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) – chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas;

LDPE (ang. *Low-density polyethylene*) – polietylen niskiej gęstości (mikroplastik);

LPSN (ang. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) – lista nazw organizmów prokariotycznych prowadzona przez Instytut Leibniza DSMZ (niem. *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*);

MALDI-TOF/TOF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation – tandem time of flight*) – desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą laserową z tandemową analizą czasu przelotu;

MET – metolachlor (syntetyczny herbicyd);

MP – mikroplastik;

MS – podłoże Murashige and Skoog;

NADH (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen*) – forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;

NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej;

OD (ang. *Optical Density*) – gęstość optyczna;

PBS (ang. *Phosphate-Buffered Saline*) – sól fizjologiczna buforowana fosforanem;

PC – fosfatydylocholina;

PDA (ang. *Potato Dextrose Agar*) – agar glukozowo-ziemniaczany (podłoże mikrobiologiczne);

PE – fosfatydyloetanolamina;

PG – fosfatydyloglicerol;

PGPF (ang. *Plant Growth Promoting Fungi*) – grzyby promujące wzrost roślin;

PGPM (ang. *Plant Growth Promoting Microorganisms*) – drobnoustroje promujące wzrost roślin;

PGPR (ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) – bakterie ryzosferowe promujące wzrost roślin;

PR – propamokarb HCl (syntetyczny fungicyd w postaci kompleksu z kwasem solnym);

QuEChERS (ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) – szybka, łatwa, tania, skuteczna, wytrzymała, bezpieczna (metoda ekstrakcji);

RB5 – Reactive Black 5 (barwnik azowy);

RL – ramnolipidy;

RO16 – Reactive Orange 16 (barwnik azowy);

ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu;

SDS (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate*) – dodecylosiarczan sodu;

SY – Sunset Yellow FCF (barwnik azowy);

VOCs (ang. *Volatile Organic Compounds*) – organiczne związki lotne.

SPIS TREŚCI

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	4
I. WPROWADZENIE.....	5
I.1. SYNTETYCZNE I BIOLOGICZNE FUNGICYDY	6
I.2. DROBNOUSTROJE WSPOMAGAJĄCE WZROST I ZDROWOTNOŚĆ ROŚLIN	8
I.3. BAKTERIE Z RODZAJU <i>BACILLUS</i>	10
I.4. BAKTERIE Z RODZAJU <i>PSEUDOMONAS</i>	12
I.5. BIOSURFAKTANTY	12
I.6. BIOSURFAKTANTY <i>BACILLUS</i>	14
I.7. BIOSURFAKTANTY <i>PSEUDOMONAS</i>	16
I.8. BIEŻĄCE WYZWANIA	18
II. CELE PRACY	20
III. MATERIAŁY.....	21
III.1. DROBNOUSTROJE	21
III.1.1. Szczepy <i>Bacillus</i> i <i>Pseudomonas</i>	21
III.1.2. Grzyby <i>Fusarium</i>	22
III.2. PODŁOŻA.....	23
III.2.1. Podłoże bulionowe zestalone agarem	23
III.2.2. Podłoże brzeczkowe zestalone agarem	23
III.2.3. Podłoże PDA (ang. Potato Dextrose Agar) (f. Difco).....	23
III.2.4. Podłoże Murashige and Skoog (MS) (f. Sigma-Aldrich).....	24
III.2.5. Podłoże Luria-Bertani (LB) (f. Sigma-Aldrich)	24
III.2.6. Płynne podłoże wzrostowe zawierające odpady przemysłu spożywczego	25
III.3. ZANIECZYSZCZENIA ANTROPOGENICZNE	25
III.3.1. Barwniki azowe	25
III.3.2. Mikroplastik	25
III.3.3. Syntetyczne pestycydy	26
IV. METODY	27
IV.1. IZOLACJA BAKTERII PRODUKUJĄCYCH BIOSURFAKTANTY	27
IV.2. GENETYCZNA IDENTYFIKACJA BAKTERII	28
IV.3. HODOWLE W PODŁOŻU PŁYNNYM	29
IV.3.1. Wstępna i właściwa hodowla bakteryjna w podłożu płynnym	29
IV.3.2. Płynna hodowla mieszana zawierająca komórki dwóch różnych szczepów bakteryjnych.....	30
IV.3.3. Wstępna i właściwa hodowla grzybni w podłożu płynnym	30
IV.3.4. Płynna hodowla mieszana zawierająca komórki bakterii i grzybów	30
IV.4. OCENA INTENSYWNOŚCI WZROSTU BAKTERII W HODOWLI.....	30
IV.4.1. Wyznaczenie gęstości optycznej (ang. Optic Dencity, OD) hodowli bakteryjnej	30
IV.4.2. Ocena intensywności wzrostu bakterii w hodowli z użyciem podłoża stałego	31
IV.5. ANALIZA BIOSURFAKTANTÓW.....	31
IV.5.1. Wstępna ocena obecności biosurfaktantów w hodowli płynnej.....	31
IV.5.2. Ekstrakcja biosurfaktantów z hodowli płynnej	31
IV.5.3. Analiza biosurfaktantów	32
IV.6. OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWGRZYBOWEJ BAKTERII	33

IV.6.1. Hodowla typu dual culture na podłożu zestalonym agarem.....	33
IV.6.2. Hodowla typu dual culture prowadzona w podłożu LB	34
IV.6.3. Analiza przepuszczalności błon grzybni.....	34
IV.6.4. Oznaczanie zawartości fosfolipidów komórkowych	34
IV.6.5. Ocena kiełkowania zarodników	35
IV.7. EKSTRAKCJA I ANALIZA HERBICYDÓW.....	35
IV.8. DEKOLORYZACJA BARWNIKÓW AZOWYCH	36
IV.9. AKTYWNOŚĆ AZOREDUKTAZY (AZOR)	36
IV.10. TECHNIKI MIKROSKOPOWE.....	37
IV.11. OCENA WPŁYWU DROBNOUSTROJÓW NA KIEŁKOWANIE NASION I WZROST SIEWEK OGÓRKA SIEWNEGO.....	38
IV.12. ANALIZA STATYSTYCZNA	39
V. WYNIKI	40
V.1. CHARAKTERYSTYKA PROFILU PRODUKCJI CYKLICZNYCH LIPOPEPTYDÓW SZCZEPÓW <i>BACILLUS</i> I <i>PSEUDOMONAS</i>	40
V.2. CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW <i>BACILLUS</i> I <i>PSEUDOMONAS</i> POD KĄTEM AKTYWNOŚCI PRZECIWGRZYBOWEJ WOBEC WYBRANYCH SZCZEPÓW <i>FUSARIUM</i>	44
V.2.1. Hodowle na podłożu stałym	44
V.2.2. Hodowle w podłożu płynnym.....	53
V.3. OCENA WPŁYWU SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH NA WZROST KORZENI SIEWEK OGÓRKA SIEWNEGO	55
V.4. IDENTYFIKACJA WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH	59
V.5. OCENA PRODUKCJI CLP-BC W PŁYNNYCH HODOWLACH BAKTERYJNO-GRZYBOWYCH.....	66
V.6. OCENA WZROSTU, PRODUKCJI BIOSURFAKTANTÓW I AKTYWNOŚCI PRZECIWGRZYBOWEJ BAKTERII <i>BACILLUS</i> I <i>PSEUDOMONAS</i> W OBECNOŚCI ZANIECZYSZCZEŃ ANTROPOGENICZNYCH.....	69
V.6.1. Barwniki azowe	69
V.6.2. Mikroplastik.....	78
V.6.3. Herbicydy	80
V.6.4. Artykuł naukowy 1	95
V.6.5. Suplement do artykułu naukowego 1	108
V.6.6. Fungicydy	112
V.6.7. Artykuł naukowy 2	121
V.6.8. Suplement do artykułu naukowego 2	138
V.7. PRODUKCJA CLP I AKTYWNOŚĆ PRZECIWGRZYBOWA W HODOWLACH MIESZANYCH ZAWIERAJĄCYCH DWA SZCZEPY <i>BACILLUS</i> , PROWADZONYCH W OBECNOŚCI SYNTETYCZNYCH FUNGICYDÓW	140
V.8. WPŁYW BAKTERII ORAZ ICH METABOLITÓW NA PRZEPUSZCZALNOŚĆ BŁON, ZMIANY W LIPIDOMIE GRZYBNI ORAZ KIEŁKOWANIE ZARODNIKÓW	149
V.8.1. Przepuszczalność błon grzybni <i>Fusarium</i>	149
V.8.2. Zmiany w lipidomie grzybni <i>Fusarium</i>	150
V.8.3. Kiełkowanie zarodników <i>Fusarium</i>	154
V.9. OCENA AKTYWNOŚCI PRZECIWGRZYBOWEJ WYBRANYCH SZCZEPÓW <i>BACILLUS</i> WOBEC GRZYBÓW <i>FUSARIUM</i> Z WYKORZYSTANIEM NASION OGÓRKA SIEWNEGO.....	158
V.10. OPRACOWANIE PODŁOŻA WZROSTOWEGO DO HODOWLI BAKTERII <i>BACILLUS</i> Z WYKORZYSTANIEM PRODUKTÓW UBOCZNYCH PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO	164
VI. DYSKUSJA.....	166

VII. WNIOSKI I STWIERDZENIA KOŃCOWE	196
VIII. STRESZCZENIE	200
IX. ABSTRACT	204
X. OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW.....	207
XI. CAŁKOWITY DOROBK NAUKOWY.....	217
XI.1. PUBLIKACJE.....	217
XI.2. DONIESIENIA KONFERENCYJNE	218
<i>XI.2.1. O zasięgu międzynarodowym</i>	<i>218</i>
<i>XI.2.2. O zasięgu krajowym</i>	<i>218</i>
XI.3. AKTYWNOŚĆ ORGANIZACYJNA	220
XI.4. SZKOLENIA.....	220
XII. LITERATURA	222

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Artykuł naukowy 1

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Płaza G, Paraszkiwicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618.

DOI: [10.1038/s41598-023-41210-5](https://doi.org/10.1038/s41598-023-41210-5)

5-letni Impact Factor: 4.3; punkty MNiSW: 140

Artykuł naukowy 2

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszkiwicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175.

DOI: [10.3390/ijms25084175](https://doi.org/10.3390/ijms25084175)

5-letni Impact Factor: 5.6; punkty MNiSW: 140

I. Wprowadzenie

Ochrona środowiska i zrównoważone rolnictwo stają się coraz bardziej kluczowe dla zapewnienia długoterminowego bezpieczeństwa żywnościowego na świecie. Wyniki badań podstawowych oraz prace ukierunkowane na komercjalizację pomagają chronić zasoby naturalne oraz ograniczać użycie związków wytwarzanych przez przemysł chemiczny. To z kolei przyczynia się do zapewnienia bioróżnorodności ekosystemów oraz zdrowia zwierząt i ludzi.

Szacunkowe dane podają, że ponad 70% chorób roślin (w tym roślin uprawnych) powodowane jest przez fitopatogenne grzyby (Tian i in. 2020). Rozwój tej grupy szkodników obniża plony, a w konsekwencji prowadzi do znaczących strat ekonomicznych i osłabienia bezpieczeństwa żywnościowego (Ekwomadu i in. 2023; Savary i in. 2019). Dane przedstawione przez Savary i in. (2019) wskazują, że światowe straty plonów dla pięciu podstawowych roślin uprawnych (ziemniaków, soi, pszenicy, kukurydzy oraz ryżu), powodowane przez szkodniki, mieszczą się w przedziale od 17 do 30%.

Szczepki zaliczane do rodzaju *Fusarium* należą do grupy dziesięciu najważniejszych grzybów fitopatogennych, stanowiących poważne zagrożenie dla światowego rolnictwa (Dean i in. 2012). Drobnoustroje te mają wysoką zdolność adaptacyjną, co pozwala im dostosować się do różnych siedlisk i warunków klimatycznych oraz zakażać wiele różnych roślin uprawnych (Nikitin i in. 2023). Mają one również zdolność do długotrwałego utrzymywania się w glebie i na szczątkach zakażonych roślin (Ekwomadu i in. 2023). Na infekcję fitopatogennymi szczepami *Fusarium* szczególnie podatne są pszenica, jęczmień, kukurydza, bawełna czy banany (Burgess i Bryden 2012). Patogeny te mogą wywołać tak zwaną fuzariozę, objawiającą się zgnilizną korzeni i łodyg, więdnieniem naczyniowym i/lub zgnilizną owoców u chorych roślin (Nikitin i in. 2023). Wiele szczepów z rodzaju *Fusarium* wykazuje również zdolność do produkcji mykotoksyn, które mogą akumulować się w tkankach roślin (również w nasionach). W efekcie dochodzi do znaczącego spadku zbiorów oraz do wzrostu zagrożenia zdrowia zwierząt i ludzi (Rampersad 2020). W zależności od położenia geograficznego i klimatu danego obszaru, fuzarioza może być powodowana przez szczepki różnych gatunków z rodzaju *Fusarium* (Nikitin i in. 2023).

I.1. Syntetyczne i biologiczne fungicydy

W celu ochrony roślin uprawnych przed rozwojem fitopatogennych grzybów, powszechnie stosowane są fungicydy. Od zakończenia II Wojny Światowej fungicydy, produkowane przez przemysł chemiczny, odgrywają istotną rolę w zapobieganiu różnym infekcjom grzybowym. Jednak w ostatnich latach użycie powyższej grupy związków budzi coraz większe obawy ze względu na ich niekorzystny wpływ na środowisko oraz rozpowszechnianie się szczepów opornych (Rampersad 2020). Mimo to w większości krajów dominuje rolnictwo konwencjonalne, wykorzystujące syntetyczne pestycydy do zwalczania szkodników (Savary i in. 2019). Wynika to z faktu, że syntetyczne związki działają szybko, są skuteczne, charakteryzują się niskim kosztem produkcji oraz dużą trwałością. Niemniej jednak, większość syntetycznych pestycydów długo utrzymuje się w środowisku oraz jest toksyczna wobec organizmów innych niż docelowa grupa szkodników (Ruomeng i in. 2023). Dane literaturowe wskazują, że powyższe związki mogą zmieniać aktywność mikroorganizmów glebowych, także takich, których obecność jest korzystna dla wzrostu roślin (Ali i in. 2020; Prashar i in. 2016).

Wdrożenie skutecznych metod ograniczania rozwoju chorób roślin powodowanych przez grzyby nie jest łatwym wyzwaniem, ponieważ wiele fitopatogenów (również grzybów z rodzaju *Fusarium*) szybko rozwija oporność na używane przez rolników syntetyczne preparaty (Ekwomadu i in. 2023). Na przykład, po około 50 latach stosowania fungicydów należących do metylobenzyloimidazolowych karbamatów, opisano szczepy należące niemal do 100 gatunków fitopatogennych drobnoustrojów odporne na tę grupę związków (Hawkins i Fraaije 2016, Corkley i in. 2021). Dane literaturowe donoszą, że w niektórych przypadkach, nawet po roku stosowania syntetycznego fungicydu, można wyizolować szczepy odporne (Grimmer i in. 2014). W związku z tym, z roku na rok coraz bardziej zyskuje na popularności kontrola fitopatogennych grzybów za pomocą metod biologicznych (Tian i in. 2020).

Ekologiczną alternatywą dla syntetycznych fungicydów są drobnoustrojowe biofungicydy. Powyższym terminem opisywane są środki ochrony roślin, wykorzystujące komórki drobnoustrojów i/lub ich metabolity, przeznaczone do zwalczania chorób wywoływanych przez fitopatogenne grzyby. Biofungicydy, podobnie jak inne biopestycydy, oferują szereg korzyści, które przyczyniają się do ich rosnącej popularności w praktykach ochrony roślin (Ojuederie i in. 2021, Ayilara i in. 2022). W odróżnieniu od chemicznych preparatów, biofungicydy są mniej toksyczne dla ludzi, zwierząt oraz środowiska, co przyczynia się do ochrony ekosystemów i zachowania bioróżnorodności (Güven i in. 2020). Wysoka specyficzność działania oraz podatność na rozkład biologiczny zmniejsza ryzyko rozwoju oporności u szkodników

oraz bioakumulacji w środowisku (Kumar i in. 2021a). W porównaniu do syntetycznych odpowiedników, stosowanie biopestycydów skutkuje także niższą emisją gazów cieplarnianych (Ayilara i in. 2023). Dodatkowo, rosnąca świadomość ekologiczna społeczeństw, regulacje prawne, a także postęp technologiczny sprzyjają opracowaniu rozwiązań, które są skuteczne, dostosowane do lokalnych warunków oraz korzystne zarówno dla zdrowia ludzi, jak i długoterminowego rozwoju rolnictwa.

Fungicydy pochodzenia biologicznego i syntetycznego różnią się pod względem mechanizmu działania. Podczas gdy syntetyczne fungicydy najczęściej działają poprzez inhibicję oddychania komórkowego i/lub biosyntezy steroli, biofungicydy mogą działać na wiele różnych sposobów, w zależności od tego, czy w ich składzie znajdują się komórki drobnoustrojów, czy tylko ich metabolity (Gikas i in. 2022; Fenta i Mekonnen 2024). Wśród zróżnicowanych mechanizmów działania mikrobiologicznych fungicydów znajdują się: konkurencja o przestrzeń i składniki odżywcze, produkcja substancji hamujących wzrost fitopatogenów (m.in. antybiotyków i enzymów litycznych), czy też indukcja naturalnych mechanizmów obronnych roślin, np. indukowanej odporności systemicznej (ang. *Induced Systemic Resistance*; ISR) (Fenta i in. 2023, Fenta i Mekonnen 2024).

Pomimo, że biofungicydy pochodzenia mikrobiologicznego mają wiele zalet, powszechne ich stosowanie wciąż wiąże się z poważnymi wyzwaniami. Duża efektywność działania takich preparatów, wyznaczana w warunkach laboratoryjnych, często ulega ograniczeniu w warunkach polowych (Fenta i Mekonnen 2024). Co więcej, często takie biopreparaty wymagają specjalnego sposobu przechowywania i transportu, a także, w porównaniu do fungicydów syntetycznych, charakteryzują się większą wrażliwością na czynniki fizykochemiczne oraz biologiczne (Fenta i Mekonnen 2024). Niektóre badania wskazują, że zintegrowane podejście do kontroli fitopatogenów, polegające na połączeniu mikrobiologicznych biofungicydów ze zmniejszonymi dawkami syntetycznych fungicydów, może zapewniać lepszy efekt działania (Ons i in. 2020).

Wśród popularnych modeli badawczych, często stosowanych w opracowywaniu biofungicydów pochodzenia mikrobiologicznego, znajdują się szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas* (Fenta i Mekonnen 2024).

I.2. Drobnoustroje wspomagające wzrost i zdrowotność roślin

Do drobnoustrojów promujących wzrost roślin (PGPM – ang. *Plant Growth Promoting Microorganisms*) należą zarówno szczepy różnych bakterii ryzosferowych (PGPR – ang. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), jak i grzybów (PGPF – ang. *Plant Growth Promoting Fungi*). Mikroorganizmy stymulują rozwój i zdrowotność roślin poprzez szereg różnych mechanizmów. Badania nad drobnoustrojami PGP, koncentrujące się na zrozumieniu mechanizmów ich działania, pozwalają wyznaczyć odpowiednie warunki niezbędne do optymalizacji efektywności biofungicydów opartych na tych drobnoustrojach. Co więcej, wiele szczepów PGPM posiada zdolność do rozkładu i usuwania zanieczyszczeń z gleby, co pośrednio również przyczynia się do poprawy wzrostu i zdrowotności roślin. Powyższe zagadnienie jest szerzej omawiane w pracach poświęconych mikrobiologicznej remediacji gleb oraz ryzofitoremediacji (Ma i in. 2019; Arantza i in. 2022; Veerapagu i in. 2023).

Drobnoustroje PGP wspomagają wzrost roślin zarówno poprzez mechanizmy bezpośrednie, które bezpośrednio oddziałują na roślinę, jak i mechanizmy pośrednie, które np. hamują rozwój fitopatogenów (**Tabela 1**) (Olanrewaju i in. 2017). Działanie poszczególnych szczepów PGPM może opierać się na jednym lub kilku mechanizmach promujących wzrost roślin, przy czym ich efektywność zależy od warunków środowiskowych. Co więcej, ten sam szczep może wykazywać różne mechanizmy w zależności od warunków w jakich się znajduje (Olanrewaju i in. 2017).

Tabela 1. Mechanizmy działania drobnoustrojów PGP sprzyjające wzrostowi i zdrowotności roślin. Opracowano w oparciu o Jeyanthi i Kanimozhi (2018) i Kumar i in. (2021b).

Mechanizmy bezpośrednie	Mechanizmy pośrednie
1. Zwiększanie dostępności składników odżywczych np. jonów amonowych, fosforanowych, potasu, cynku. 2. Ułatwianie pobierania jonów żelaza przez rośliny przy udziale drobnoustrojowych sideroforów. 3. Wiązanie azotu atmosferycznego zwiększające dostępność przyswajalnych dla rośliny form azotu. 4. Wpływ na poziom fitohormonów poprzez: A. syntezę hormonów roślinnych zaliczanych np. do giberelin, cytokinin, auksyn; B. syntezę prekursorów fitohormonów; C. syntezę enzymów regulujących poziom fitohormonów np. deaminazy ACC (ang. <i>1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid</i> – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy) powodującej obniżenie zawartości etylenu.	1. Ochrona przed szkodnikami poprzez: A. konkurencję z fitopatogenami o miejsce na powierzchni korzeni (zdolność do szybkiego przemieszczania się oraz formowania biofilmu); B. ograniczenie dostępności jonów żelaza dla fitopatogennych drobnoustrojów; C. syntezę metabolitów ograniczających wzrost i/lub żywotność fitopatogenów (produkcję antybiotyków, enzymów litycznych oraz organicznych związków lotnych (ang. <i>Volatile Organic Compounds</i>; VOCs)); D. stymulację ISR. 2. Ochrona przed stresem abiotycznym poprzez: A. syntezę egzopolisacharydów zdolnych do wiązania wody (ochrona przed negatywnym wpływem ograniczonej dostępności wody); B. syntezę polimerów zdolnych do wiązania jonów sodu (ochrona przed negatywnym wpływem podwyższonej zawartości jonów sodu w glebie); C. wiązanie, akumulację i/lub przekształcanie toksycznych związków pochodzenia antropogenicznego / antropogennego (ochrona przed niekorzystnym działaniem zanieczyszczeń środowiskowych).

I.3. Bakterie z rodzaju *Bacillus*

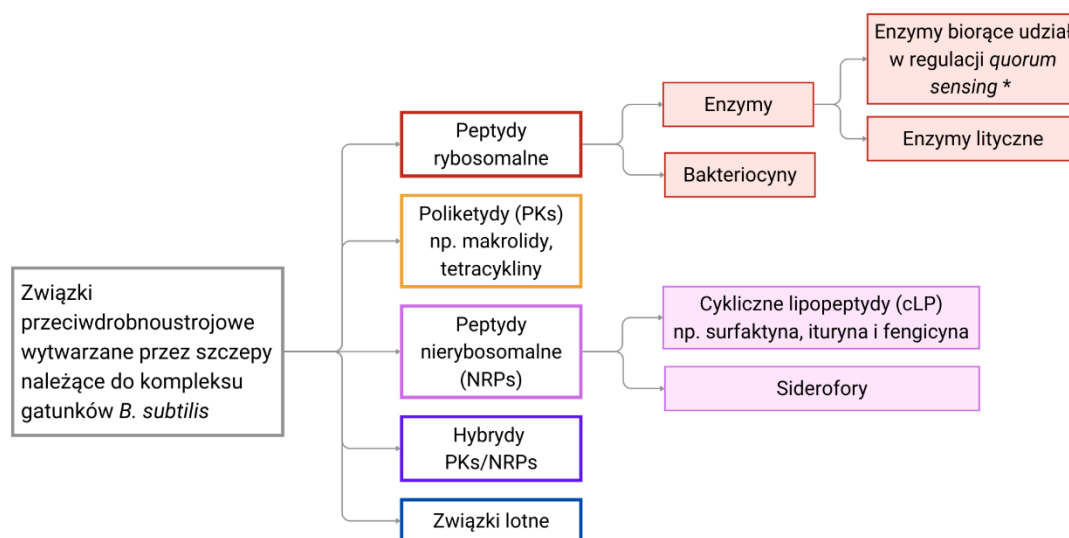
Bakterie z rodzaju *Bacillus* to Gram-dodatnie, tlenowe lub względnie beztlenowe laseczki, zdolne do wytwarzania przetrwalników. Drobnoustroje te są szeroko rozpowszechnione w środowisku. Występują zarówno w wodach słonych jak i słodkich, w glebie, żywności, w układzie pokarmowym różnych zwierząt oraz we wnętrzu roślin (jako endofity) (Schultz i in. 2017; Lopes i in. 2018).

Według bazy danych LPSN (ang. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/Bacillus>), z dnia 12.09.2024, rodzaj *Bacillus* obejmuje 634 gatunki. Ze względu na filogenetyczne i fenetyczne podobieństwo, gatunki *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* i *Bacillus pumilus* zostały połączone w tzw. kompleks gatunków *B. subtilis* (ang. *B. subtilis species complex*) (Berkeley i in. 1984; Fritze 2004; Rooney i in. 2009). W ostatnich latach z tego kompleksu wyodrębniono dodatkowo tzw. „operacyjną grupę *B. amyloliquefaciens*” (ang. *operational group B. amyloliquefaciens*), która obejmuje cztery gatunki bakterii: *B. amyloliquefaciens*, *B. siamensis*, *B. velezensis* oraz *B. nakamurai* (Fan i in. 2017). Klasyfikacja genetyczna szczepów należących do kompleksu *B. subtilis* wciąż się zmienia i jest oparta na wielu różnych metodach, obejmujących między innymi: 1) hybrydyzację DNA-DNA (ang. *DNA-DNA hybridization*) wzbogaconą o analizę bioinformatyczną; 2) analizę profili kwasów tłuszczowych; 3) sekwencjonowanie całego genomu (ang. *Whole Genome Sequencing*) oraz 4) techniki pozwalające określić uśrednioną zawartość poszczególnych aminokwasów (ang. *Average Amino Acid Identity*) i nukleotydów (ang. *Average Nucleotide Identity*) (Auch i in. 2010; Fan i in. 2017).

Szczególnym atrybutem bakterii z rodzaju *Bacillus* jest zdolność przetrwania w środowiskach charakteryzujących się ekstremalnymi dla organizmów wartościami temperatury, pH i promieniowania, niską dostępnością wody i/lub obecnością toksyn. Cechę tę zawdzięczają umiejętności wytwarzania endospor/przetrwalników. W zależności od gatunku i szczepu bakterie *Bacillus* zaliczane są do psychrofilii, mezofili lub termofili. W większości powyższe drobnoustroje dobrze tolerują podwyższone do 10% stężenie NaCl w środowisku. Komórki wegetatywne mają niewielkie wymagania pokarmowe, dzięki czemu hodowle *Bacillus* mogą być prowadzone z użyciem podłoży zawierających tylko jeden związek organiczny.

Dzięki bardzo wydajnemu systemowi sekrecji i syntezy białek oraz zdolności do produkcji różnych metabolitów o znaczeniu komercyjnym (m.in. antybiotyków, enzymów, biosurfaktantów), szczepy *Bacillus* mają szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Zdolność bakterii z rodzaju *Bacillus* do syntezy związków o działaniu

przeciwgrzybowym powoduje, że drobnoustroje te są obiecującym modelem badawczym wykorzystywanych w badaniach mających na celu opracowanie wysoce skutecznych biofungicydów (**Rycina 1**).



Rycina 1. Podział związków przeciwdrobnoustrojowych, wytwarzanych przez szczepy należące do kompleksu gatunków *B. subtilis*, z uwagi na ich budowę chemiczną i mechanizm biosyntezy. Opracowano w oparciu o Caulier i in. (2019). * *Quorum sensing* – chemiczne porozumiewanie się komórek na poziomie populacji.

Szczepki z rodzaju *Bacillus* są częstym modelem badawczym wykorzystywanym do opracowania rolniczych biopreparatów, mających na celu zarówno wspomaganie wzrostu roślin, zwalczanie szkodników, a także przyspieszanie bioremediacji gleby (Olanrewaju i in. 2017). Na przykład biopreparaty zawierające *Bacillus thuringiensis* są powszechnie wykorzystane jako biopestycydy (m.in. insektycydy, nematocydy, fungicydy) oraz jako środki wspomagające wzrost roślin (Jouzani i in. 2017).

Szczególną uwagę wśród metabolitów wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Bacillus* przyciągają cykliczne lipopeptydy (cLP), które charakteryzują się zarówno wysoką aktywnością powierzchniową, jak i przeciwdrobnoustrojową. Z tego względu zaliczane są jednocześnie do związków powierzchniowo czynnych/ biosurfaktantów oraz antybiotyków.

I.4. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*

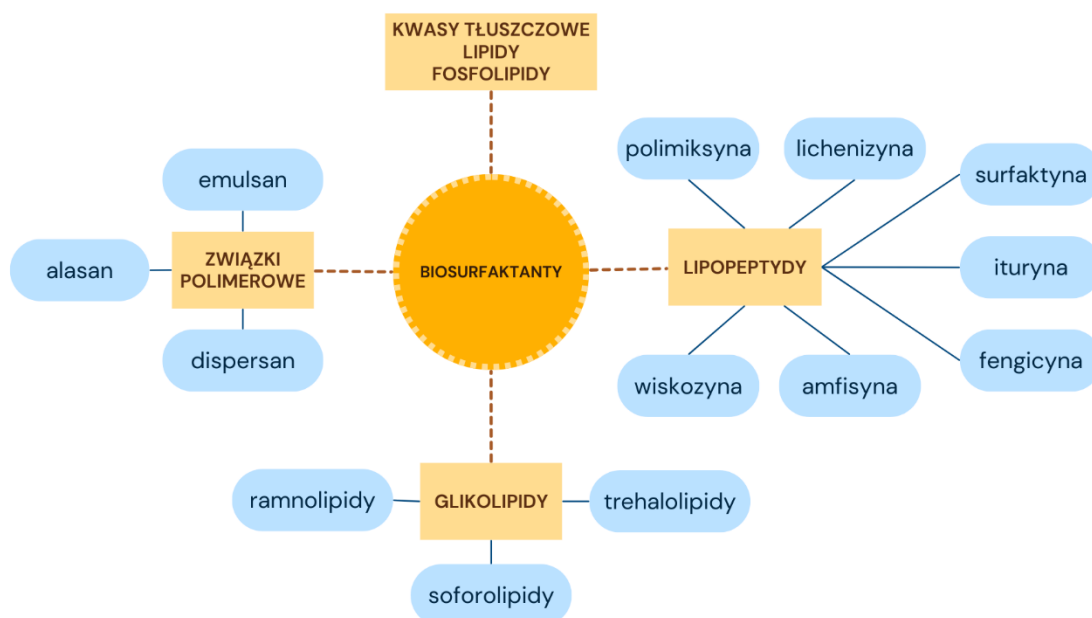
Wśród kluczowych drobnoustrojów PGPM znajdują się również bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Drobnoustroje te, to Gram-ujemne, nieprzetrawiające i w większości względnie beztlenowe pałeczki. Podobnie jak szczepy *Bacillus*, bakterie *Pseudomonas* powszechnie występują w ryzosferze oraz wewnątrz wielu różnych gatunków roślin. Charakteryzują się zdolnością do produkcji szerokiego zakresu metabolitów, w tym również biosurfaktantów, zaliczanych do ramnolipidów (RL) i cLP (Raaijmakers i in. 2010; Geudens i in. 2018). Ponadto, bakterie *Pseudomonas* często wykazują zróżnicowane mechanizmy promocji wzrostu i zdrowotności roślin oraz zdolność do rozkładu różnego rodzaju zanieczyszczeń środowiskowych. W związku z tym, są wskazywane jako potencjalne modele używane w badaniach nad działaniem i produkcją biopestycydów oraz stymulatorów wzrostu roślin (Meliani 2015; Singh i in. 2022).

I.5. Biosurfaktanty

Biosurfaktanty są to związki powierzchniowo czynne (surfaktanty) pochodzenia biologicznego. Związki te mają amfifilową (amfipatyczną) strukturę cząsteczek, co oznacza, że zawierają one zarówno część hydrofilową jak i hydrofobową. Taka budowa umożliwia biosurfaktantom gromadzenie się na granicy faz o przeciwnym powinowactwie do wody. Dzięki temu dochodzi do spadku energii swobodnej, co przejawia się spadkiem wartości napięcia międzyfazowego. Dodatkowo, powyższe związki mogą stabilizować lub destabilizować układy dwufazowe (piany i emulsje). Jednym z ważnych parametrów charakteryzujących biosurfaktanty jest krytyczne stężenie micelarne (ang. *Critical Micelle Concentration*, CMC), oznaczające minimalne stężenie biosurfaktanta, w którym zaczynają formować się różnego rodzaju ugrupowania (np. micelle, pęcherzyki, rurki czy dwuwarstwy) (Paraszkiewicz i in. 2019). Biosurfaktanty mogą mieć charakter jonowy (kationowy, anionowy, amfoteryczny) lub niejonowy. Większość syntetycznych surfaktantów jest kationowa, co powoduje, że są one bardzo toksyczne. Z kolei biosurfaktanty zazwyczaj mają charakter anionowy lub neutralny (Santos i in. 2016).

Biosurfaktanty mogą być produkowane zarówno przez rośliny (np. saponiny mydlnicy lekarskiej, *Saponaria officinalis* L.), niektóre zwierzęta (np. surfaktant płucny), jak i drobnoustroje, które wytwarzają najwięcej tego typu związków (Parra i Pérez-Gila 2015, Smulek i in. 2017). Biosurfaktanty klasyfikowane są według różnych kryteriów, np. na podstawie wielkości cząsteczek, budowy chemicznej, ładunku części hydrofilowej, a także w oparciu o przynależność taksonomiczną organizmów

(Santos i in. 2016; Paraszkievicz 2016, Roy 2017). Podział drobnoustrojowych biosurfaktantów uwzględniający różnicę w budowie chemicznej cząsteczek najczęściej obejmuje cztery klasy: 1) glikolipidy; 2) lipopeptydy i lipoproteiny; 3) kwasy tłuszczowe, lipidy, fosfolipidy; oraz 4) związki polimerowe (**Rycina 2**) (Paraszkievicz i in. 2019; Sharma i in. 2021).



Rycina 2. Klasyfikacja biosurfaktantów ze względu na budowę chemiczną cząsteczek oraz przykłady związków. Opracowano w oparciu o Sharma i in. 2021.

Drobnoustrojowe biosurfaktanty mogą pełnić różne funkcje biologiczne, zarówno w odniesieniu do pojedynczych komórek, jak i do całych populacji (Sharma i in. 2021). Do działania zewnątrzkomórkowego biosurfaktantów należy na przykład ułatwianie pobierania hydrofobowych związków odżywczych przez komórki oraz ochrona komórek przed toksynami, w tym jonami metali ciężkich. W zakresie funkcji wewnątrzkomórkowych wskazywane są hipotezy o możliwości modyfikacji aktywności enzymów oraz przepuszczalności osłon komórkowych, co w konsekwencji może mieć wpływ na szereg procesów metabolicznych. Międzykomórkowe działanie biosurfaktantów wobec populacji obejmuje między innymi wspomaganie ruchu ślizgowego (ang. *sliding / swarming motility*), udział w chemicznym porozumiewaniu się komórek na poziomie populacji (ang. *quorum sensing*) oraz udział w różnych etapach funkcjonowania biofilmu. Powyższe procesy są kluczowe dla utrzymywania się populacji bakterii w środowisku (Sharma i in. 2021).

Mikrobiologiczne surfaktanty to związki o dużym potencjale komercyjnym, które często znajdują zastosowanie w rolnictwie, produkcji żywności, medycynie,

farmacji oraz w różnych technikach wykorzystywanych do bioremediacji skażonych środowisk. W porównaniu do syntetycznych odpowiedników, biosurfaktanty charakteryzują się niższą toksycznością, większą podatnością na biodegradację, a ich produkcja zazwyczaj przebiega w podłożach zawierających związki będące odnawialnymi źródłami węgla i energii. W celu obniżenia kosztów produkcji biosurfaktantów do przygotowania podłoży hodowlanych zazwyczaj wykorzystywane są odpady przemysłu rolno-spożywczego (Nurfarahin i in. 2018). Co więcej, omawiana grupa związków wykazuje zarówno wysoką aktywność powierzchniową (osiąganą przy niskich wartościach CMC), jak i zróżnicowaną aktywność biologiczną (Paraszkiewicz i in. 2019). Duża różnorodność budowy chemicznej pozwala dobrać rodzaj biosurfaktanta do wymaganych w danym procesie warunków fizykochemicznych (np. poziomów zasolenia, wartości pH czy temperatury). Pomimo wielu zalet, biosurfaktanty posiadają również wady, takie jak wysoka cena i duża zmienność strukturalna. Ponieważ biosurfaktanty najczęściej wytwarzane są w postaci mieszaniny kilku bardzo podobnych strukturalnie związków, zmienna może być także aktywność powierzchniowa oraz biologiczna takiego biopreparatu (Santos i in. 2016; Jahan i in. 2020).

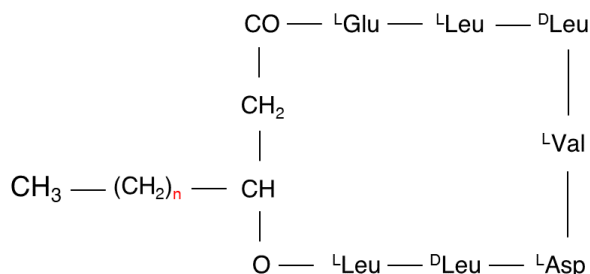
I.6. Biosurfaktanty *Bacillus*

CLP produkowane przez bakterie z rodzaju *Bacillus* (cLP-Bc) są jednymi z najlepiej poznanych biosurfaktantów mikrobiologicznych. Klasyfikacja powyższych związków przebiega w oparciu o skład aminokwasowy części peptydowej (w skład której mogą wchodzić zarówno izomery L- jak i D-aminokwasów), rodzaj kwasu tłuszczowego, jak również typ wiązania łączącego część peptydową i lipidową. Do cLP-Bc zaliczane są trzy grupy związków, opisywane jako: 1) rodzina surfaktyny, 2) rodzina ituryny oraz 3) rodzina fengicyny (Mnif i Ghribi 2015; Ma i in. 2016a, Sharma 2018).

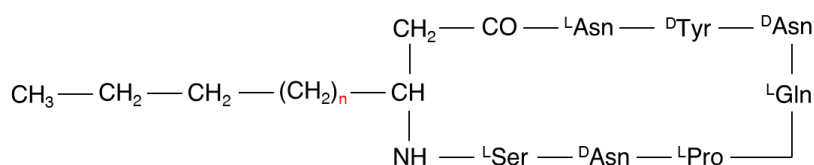
Do pierwszej grupy, poza surfaktyną, należą również pumilacydyna, lichenzyna oraz esperylna. Powyższe związki składają się z cyklicznego heptapeptydu połączonego wiązaniem laktonowym z resztą β -hydroksy kwasu tłuszczowego, w skład którego wchodzi od 13 do 17 atomów węgla (**Rycina 3A**). Do rodziny ituryny należą bacillomycyna, mykosubtilina i ituryna. Powyższe biosurfaktanty również zawierają heptapeptyd, ale jest on połączony z resztą β -amino kwasu tłuszczowego (zawierającą od 14 do 17 atomów węgla) wiązaniem amidowym (**Rycina 3B**). Z kolei w rodzinie fengicyny wyróżniane są plipastatyna oraz fengicyna. W ich skład wchodzi cykliczny decapeptyd połączony wiązaniem laktonowym z β -aminokwasem tłuszczowym zbudowanym z od 13 do 21 atomów węgla (**Rycina 3C**). Do cyklizacji części peptydowej

dochodzi w wyniku utworzenia wiązania laktonowego między resztą ósmego i dziesiątego aminokwasu.

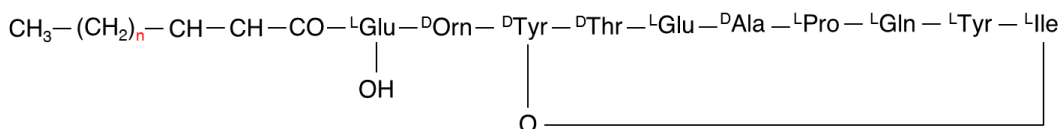
A)



B)



C)



Rycina 3. Wzory strukturalne A) surfaktyny; „n” może się mieścić w przedziale od 9 do 13; B) ituryny; „n” może się mieścić w przedziale od 9 do 12; C) fengicyny; „n” może się mieścić w przedziale od 9 do 17. Zmodyfikowano na podstawie Mnif i Ghribi (2015).

Synteza cLP-Bc jest katalizowana przy udziale syntetaz peptydów nierybosomalnych, co skutkuje znaczną zmiennością strukturalną tych związków. Pecci i in. (2010) zaproponowali, aby warianty cząsteczek cLP-Bc opisywać jako homologi (różniące się długością łańcucha kwasu tłuszczowego) lub izoformy (charakteryzujące się odmienną sekwencją aminokwasów w części peptydowej). Dane literaturowe wskazują, że środowiskowe szczepy *Bacillus* zazwyczaj wydzielają biosurfaktanty w postaci mieszaniny różnych homologów i/lub izomerów cLP. Różnorodność i skład procentowy różnych wariantów cLP produkowanych przez szczepy *Bacillus* zależy między innymi od warunków hodowli oraz składu zastosowanych podłoży mikrobiologicznych (Huang i in. 2015; Bartal i in. 2018;

Nurfarahin i in. 2018; Paraszkievicz i in. 2018; Nazareth i in. 2021; Moreno-Velandia i in. 2021).

CLP-Bc wykazują aktywność biologiczną wobec wielu różnych drobnoustrojów i są zaliczane do antybiotyków. Mechanizm ich działania opiera się na zakłócaniu struktury i funkcjonowania błon biologicznych. W obecności cLP dochodzi do destabilizacji struktury błon, wzrostu ich przepuszczalności, a w konsekwencji nawet do zniszczenia komórek (Raaijmakers i in. 2010; Bernat i in. 2016). Biosurfaktanty te mogą wykazywać działanie zarówno przeciwko bakteriom, wirusom, jak i grzybom (Mnif i Ghribi 2015; Wang i in. 2024). Szczególnie związki należące do grupy ituryny i fengicyny mają silne właściwości przeciwwgrzybowe (Mnif i Ghribi 2015, Kulimushi i in. 2017).

Dane literaturowe wskazują, że różne biosurfaktanty mogą działać synergistycznie, wzajemnie wzmacniając zarówno właściwości przeciwdrobnoustrojowe jak i inne rodzaje aktywności biologicznej. Jest to jeden z powodów, dla których są one interesującymi modelami badawczymi oraz potencjalnie efektywnymi środkami biologicznej kontroli fitopatogennych grzybów (Mihalache i in. 2018; Wang i in. 2020; Datta i in. 2024).

I.7. Biosurfaktanty *Pseudomonas*

Wiele szczepów *Pseudomonas* jest zdolne do produkcji biosurfaktantów, które ze względu na swoją budowę chemiczną klasyfikowane są głównie do cLP oraz RL. Cykliczne lipopeptydy produkowane przez szczepy *Pseudomonas* (cLP-Ps) składają się z reszty kwasu tłuszczowego połączonej z oligopeptydem. Podobnie jak w przypadku cLP-Bc, cLP-Ps różnią się między sobą pod względem długości i składu reszty kwasu tłuszczowego oraz liczby, typu i konfiguracji aminokwasów w części peptydowej. Jednak różnorodność budowy cLP-Ps jest o wiele wyższa niż w przypadku biosurfaktantów *Bacillus*. Z tego powodu dotąd nie ma ujednoliconej klasyfikacji tej grupy związków. Raaijmakers i in. (2006) podzielili cLP-Ps na cztery główne klasy obejmujące grupę: 1) wiskozyny, 2) amfisyny, 3) tolaasyny i 4) syringomycyny. Natomiast Geudens i Martins (2018) podzielili cLP-Ps na 14 grup (**Tabela 2**).

Tabela 2. Klasyfikacja cLP-Ps na podstawie budowy chemicznej. Zmodyfikowano na podstawie Geudens i Martins (2018).

Grupa	Kwas tłuszczowy *	Liczba aminokwasów w części peptydowej	Literatura
wiskozyzny	3-OH C10:0	9	Groupé i in. 1951
orfamidy	3-OH C14:0	10	Gross i in. 2007; Ma i in. 2016b
amfisyny	3-OH C10:0	11	Sørensen i in. 2001
syringomycyny	3-OH C10:0	9	Segre i in. 1989
syringopeptyny 1	3-OH C10:0	22	Ballio i in. 1991
syringopeptyny 2	3-OH C10:0	25	Ballio i in. 1991
tolaasyny	3-OH C10:0	18	Rainey i in. 1991; Bassarello i in. 2004
bananamidy	3-OH C12:0	8	Nguyen i in. 2016
ksantolizyny	3-OH C10:0	14	Li i in. 2013
entolizyny	3-OH C10:0	14	Vallet-Gely i in. 2010
putisolwiny	C6:0	12	Kuiper i in. 2003
pseudofaktyny	C16:0	8	Janek i in. 2010
korpeptyny	3-OH C10:0	21	Emanuele i in. 1998
fuskoptyny	3-OH C10:0	19	Ballio i in. 1996

* Kwas tłuszczowy zawierający trzy grupy hydroksylowe, 10 węgli bez wiązań podwójnych.

Podobnie jak inne biosurfaktanty, cLP-Ps poza aktywnością powierzchniową często wykazują również właściwości przeciwdrobnoustrojowe, obejmujące między innymi zdolność do hamowania wzrostu grzybów. Biorą także udział w takich procesach jak przemieszczanie się populacji, kolonizacja powierzchni i formowanie biofilmów.

Poza cLP-Ps, szczepy *Pseudomonas* mogą wytwarzać także biosurfaktanty opisywane jako RL. RL składają się z jednego lub dwóch kwasów β -hydroksytłuszczowych połączonych wiązaniem O-glikozydowym z jedną lub dwoma resztami ramnozy. RL klasyfikowane są jako mono-ramnolipidy (mono-RL) lub di-ramnolipidy (di-RL) (El-Housseiny i in. 2020; Zhou i in. 2019a). Liczba węgli w reszcie kwasu tłuszczowego jest zróżnicowana i zwykle wynosi od ośmiu do szesnastu atomów węgla (El-Housseiny i in. 2020; Behrens i in. 2016; Gunther i in. 2005).

Wysoce zróżnicowana struktura RL jest silnie zależna od uzdolnień metabolicznych szczepów, które je produkują oraz od zastosowanych warunków hodowli (El-Housseiny i in. 2020; Rahman i in. 2010). Różnice w budowie strukturalnej RL wpływają na ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne, co z kolei decyduje o ich potencjalnym zastosowaniu (El-Housseiny i in. 2020; Zhao i in. 2018).

RL używane są przede wszystkim do przyspieszania procesu bioremediacji środowisk zanieczyszczonych hydrofobowymi ksenobiotykami, do wspomagania wydobywania ropy naftowej oraz jako środki przeciwdrobnoustrojowe (Guzmán i in. 2024). Podobnie jak cLP, pełnią rolę w przemieszczaniu się populacji bakterii i formowaniu biofilmów. W przypadku chorobotwórczych szczepów *P. aeruginosa*, RL mogą odgrywać również rolę w patogenezie (Xu i in. 2024).

1.8. Bieżące wyzwania

Jednym z kluczowych wyzwań w stosowaniu biologicznych środków ochrony roślin są ich interakcje z zanieczyszczeniami środowiskowymi, takimi jak pozostałości syntetycznych pestycydów, mikroplastik (MP), czy też barwniki przemysłowe, np. barwniki azowe.

Pomimo zmieniających się rozporządzeń dotyczących ochrony środowiska, rosnącej wiedzy na temat biopestycydów oraz zwiększającej się dostępności alternatywnych środków ochrony roślin, syntetyczne pestycydy nadal dominują w zwalczaniu szkodników. W 2021 roku światowe zużycie pestycydów wyniosło 3,53 miliona ton kwadratowych, z największym udziałem Brazylii oraz Stanów Zjednoczonych Ameryki, gdzie wynosiło ono odpowiednio 719,53 oraz 457,39 tysięcy ton (Fernández 2021). Obecność syntetycznych pestycydów w środowisku, ze względu na ich długą trwałość w glebie, może prowadzić m.in. do przyswajania ich przez rośliny podczas wzrostu, a co za tym idzie działać, na niekorzyść upraw (Łozowicka i in. 2015; Yadav i in. 2015; Tudi i in. 2021; Pathak i in. 2022; Ansari i in. 2024).

MP (wielkość cząstek < 5 mm) może być pierwotny (wyprodukowany celowo, stosowany np. w kosmetykach) lub wtórny (powstały w wyniku fragmentacji przedmiotów wykonanych z tworzyw sztucznych). MP jest powszechnie obecny zarówno w środowiskach wodnych, jak i lądowych i zazwyczaj powstaje w wyniku fragmentacji np. plastikowych opakowań, ubrań zawierających tworzywa sztuczne czy opon samochodowych (Duis i Coors 2016; Kole i in. 2017; Zhou i in. 2019b; Ghosh i in. 2023). W glebie uprawnej MP może się znaleźć ze względu na stosowanie osadów ściekowych jako nawozu (Corradini i in. 2019; Gui i in. 2019).

Do zanieczyszczeń środowiska należą również barwniki azowe, używane przede wszystkim w procesach barwienia tkanin. Wiele barwników azowych i produktów ich rozkładu wykazuje wysoką toksyczność zarówno wobec zwierząt, roślin, jak i ludzi (Pinheiro i in. 2022). W krajach rozwijających się, w których ścieki tekstylne mogą być wykorzystywane do nawadniania upraw, barwniki mogą zanieczyszczać glebę uprawną, zmieniając jej właściwości biologiczne, zmniejszając produktywność rolnictwa i zagrażając bezpieczeństwu żywności (Topač i in 2009; Jasińska i in. 2024).

Powyższe zanieczyszczenia mogą znacząco wpływać na mikrobiotę glebową, w tym na korzystne dla roślin mikroorganizmy oraz wprowadzane do gleby biologiczne środki ochrony roślin.

Biofungicydy, mimo że oferują ekologiczną alternatywę dla syntetycznych fungicydów, mają swoje ograniczenia. Należy do nich zmienna skuteczność, wynikająca przede wszystkim z silnej zależności od biotycznych i abiotycznych warunków środowiskowych. Dlatego ważne jest pogłębianie wiedzy na temat sposobu działania tej grupy biopestycydów, ich interakcji z syntetycznymi odpowiednikami oraz wpływu zanieczyszczeń środowiskowych na aktywność przeciwgrzybową.

II. Cele pracy

Nadrzędnym celem niniejszej pracy była ocena wpływu zanieczyszczeń antropogenicznych (wybranych herbicydów, fungicydów, barwników azowych a także mikroplastiku) na aktywność przeciwgrzybową ryzosferowych szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas*, zdolnych do produkcji cyklicznych lipopeptydów, i pochodzących ze środowisk o potencjalnie zróżnicowanym poziomie zanieczyszczeń antropogenicznych.

Ogólny cel badawczy realizowano za pomocą **celów szczegółowych** wskazanych poniżej.

- [1] Identyfikacja / analiza poziomu produkcji biosurfaktantów wydzielanych przez szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas*.
- [2] Ocena aktywności przeciwgrzybowej i wskazanie mechanizmów ograniczania wzrostu szczepów *Fusarium* przez bakterie *Bacillus* i *Pseudomonas*.
- [3] Charakterystyka wybranych szczepów bakteryjnych pod kątem wpływu na kiełkowanie nasion i wzrost siewek ogórka siewnego.
- [4] Analiza produkcji biosurfaktantów w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych oraz w hodowlach zawierających komórki dwóch różnych szczepów *Bacillus*.
- [5] Ocena wzrostu bakterii, produkcji biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej w hodowlach *Bacillus* i *Pseudomonas* prowadzonych w obecności zanieczyszczeń środowiskowych.
- [6] Opracowanie efektywnego podłoża wzrostowego dla wybranego szczepu bakteryjnego charakteryzującego się wysoką i stabilną (także w obecności zanieczyszczeń) aktywnością przeciwgrzybową oraz pozytywnym wpływem na kiełkowanie i wzrost siewek ogórka siewnego.

III. Materiały

W tej części opisano materiały zastosowane w nieopublikowanej części pracy. Metody używane wyłącznie w badaniach opisanych w publikacjach zostały omówione w podrozdziałach V.6.4 (Artykuł naukowy 1) oraz V.6.7 (Artykuł naukowy 2).

III.1. Drobnoustroje

III.1.1. Szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas*

W badaniach wykorzystywano 80 szczepów bakteryjnych (77 z rodzaju *Bacillus* oraz trzy z rodzaju *Pseudomonas*). W obrębie tej grupy, 79 szczepów pochodziło z sześciu różnych środowisk (o potencjalnie zróżnicowanym poziomie zanieczyszczeń antropogenicznych) zlokalizowanych terenie Polski (**Tabela 3**). Jeden szczep (*B. subtilis* DSM 3257, wyizolowany z Natto) pochodził z niemieckiej kolekcji szczepów DSMZ (niem. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*).

Wszystkie wykorzystywane w pracy szczepy bakteryjne przechowywane są w kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego (KMPiB UŁ).

Tabela 3. Miejsca izolacji ryzosferowych szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas* zdolnych do produkcji biosurfaktantów.

Miejsce poboru gleby ryzosferowej	Symbol szczepu
Składowisko Odpadów Niebezpiecznych, Zgierz, województwo łódzkie	Skrót „Zg” oraz numer próby gleby i nadany numer szczepu (np. Zg 1.3)
Tereny miejskie i zanieczyszczone	Aleja Klonów Srebrzystych stanowiąca fragment ul. Ogólnej w gminie Zgierz, województwo łódzkie
	Skrót „ASK” oraz nadany numer szczepu (np. ASK 10)
	Rafineria Ropy Naftowej, Czechowice-Dziedzice, województwo śląskie
	I'-1a (Płaza i in. 2015)
	Park Helenów, Łódź, województwo łódzkie
	IM 8 (w pracy Płaza i in. 2015 opisany jako KP8); IM 13 (Paraszkiewicz i in. 2017); IM 14 (Paraszkiewicz i in. 2017)
Tereny leśne i wiejskie	Kaszubski Park Krajobrazowy, województwo pomorskie
	Skrót „KAS” oraz numer próby gleby i nadany numer szczepu
	Wieś Kolnica, województwo wielkopolskie
	Skrót „Kol” oraz skróty dokładniej opisujące miejsce pobrania próby gleby („B” – ryzosfera barwinka pospolitego, <i>Vinica minor</i> L.; „D” – gleba przy drodze; „L” – ryzosfera lipy, <i>Tilia</i> ; „S” – ryzosfera sosny, <i>Pinus</i> L.; „Si” – ryzosfera świerku, <i>Picea</i> A. Dietrich) i numer szczepu (np. Kol B1)

III.1.2. Grzyby *Fusarium*

W pracy wykorzystano cztery szczepy z rodzaju *Fusarium*:

- *Fusarium sambucinum* IM 6525 – wyizolowany z korzeni zainfekowanej maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) i udostępniony do badań przez dr hab. Lidię Sas-Paszt, prof. Instytutu Ogródnictwa w Skierniewicach (IO);
- *Fusarium culmorum* DSM 1094 – pochodzący z niemieckiej kolekcji szczepów DSMZ, wyizolowany z pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.);
- *Fusarium oxysporum* KKP 458 – pochodzący z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie;
- *Fusarium solani* IM 450 – pochodzący z kolekcji szczepów KMPiB UŁ.

Wszystkie wykorzystywane w pracy szczepy grzybowe przechowywane są w kolekcji szczepów KMPiB UŁ.

III.2. Podłoża

III.2.1. Podłoże bulionowe zestalone agarem

Bulion wzbogacony (f. Mapol)	15 g
Agar (f. Biocorp)	20 g
Woda destylowana	uzupełniano do 1000 mL
pH	7,5

Sterylizacja w autoklawie w temp. 115 °C przez 20 min. Podłoże w postaci skosów wykorzystywano do przechowywania szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas*.

III.2.2. Podłoże brzezkowe zestalone agarem

Podłoże brzezkowe zestalone agarem zawierało:

Agar (f. Biocorp)	20 g
Brzeczka 12°Blg	uzupełniano do 1000 mL
pH	6,5

Sterylizacja w autoklawie w temp. 115 °C przez 20 min. Podłoże w postaci skosów wykorzystywano do przechowywania szczepów *Fusarium*.

III.2.3. Podłoże PDA (ang. *Potato Dextrose Agar*) (f. Difco)

D-glukoza	20 g
Agar	15 g
Skrobia ziemniaczana	4 g
Woda destylowana	uzupełniano do 1000 mL
pH	6,5

Sterylizacja w autoklawie w temp. 115 °C przez 20 min. Podłoże w postaci płytek było wykorzystywane do analizy aktywności przeciwgrzybowej szczepów bakteryjnych wobec szczepów *Fusarium*.

III.2.4. Podłoże Murashige and Skoog (MS) (f. Sigma-Aldrich)

Składnik	Zawartość w podłożu (mg L ⁻¹)
Azotan amonu	1650
Kwas borowy	6,2
Bezwodny chlorek wapnia	332,2
Chlorek kobaltu • 6H ₂ O	0,025
Siarczan miedzi • 5H ₂ O	0,025
Na ₂ -EDTA	37,26
Siarczan żelazawy • 7H ₂ O	27,8
Siarczan magnezu	180,7
Siarczan magnezu • H ₂ O	16,9
Kwas molibdenowy (sól sodowa) • 2H ₂ O	0,25
Jodek potasu	0,83
Azotan potasu	1900
Jednozasadowy fosforan potasu	170
Siarczan cynku • 7H ₂ O	8,6
Agar	8000
Glicyna (wolna zasada)	2
mio-inozytol	100
Kwas nikotynowy (wolny kwas)	0,5
Pirydoksyna • HCl	0,5
Sukroza	30 000
Tiamina • HCl	0,1
pH	6,5

Sterylizacja w autoklawie w temp. 115 °C przez 20 min. Podłoże wykorzystywano w badaniach z użyciem nasion ogórka siewnego.

III.2.5. Podłoże Luria-Bertani (LB) (f. Sigma-Aldrich)

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
Woda destylowana	uzupełniano do 1000 mL
pH	6,5

Sterylizacja w autoklawie w temp. 115 °C przez 20 min. Podłoże LB wykorzystywano do przygotowania hodowli płynnych (wstępnych i właściwych), szczepów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Fusarium* stosowanych w niniejszej pracy.

III.2.6. Płynne podłoże wzrostowe zawierające odpady przemysłu spożywczego

W badaniach opisanych w podrozdziale V.10 opracowano warianty płynnego podłoża wzrostowego zawierające różne objętości:

- wodnej zawiesiny drożdży odpadowych (0,1; 1; 2 lub 5% v/v);
- wodnego ekstraktu ze skórek marchwi (0,2; 0,5 lub 1% v/v);
- 10% wodnego roztworu tryptonu (f. Sigma-Aldrich) (0; 0,1 lub 1% v/v).

Po uzupełnieniu podłoża wodą destylowaną, pH doprowadzano do wartości 7, a następnie poddawano dwukrotnej sterylizacji w autoklawie (temp. 115 °C przez 20 min).

Drożdże odpadowe (f. Fermentis W34/70, nr partii 2201427 KB) pochodziły z dolnej fermentacji piwa i zostały pozyskane z Browaru Rzemieślniczego Olbracht w Piotrkowie Trybunalskim w Polsce. Do przygotowywania podłoża odpadowego stosowano wodną zawiesinę drożdży odpadowych o gęstości $875 \pm 40 \text{ mg mL}^{-1}$.

W celu uzyskania wodnego ekstraktu ze skórek marchwi, skórki zawieszano w wodzie destylowanej stosując proporcje 2:1 (w/v), a następnie sterylizowano w autoklawie (temp. 115 °C przez 20 min).

III.3. Zanieczyszczenia antropogeniczne

III.3.1. Barwniki azowe

W badaniach wykorzystano pięć barwników azowych: Acid Blue 113 (AB113; nr CAS: 3351-05-1), Reactive Black 5 (RB5; nr CAS: 17095-24-8), Amaranth (AMR; nr CAS: 915-67-3), Reactive Orange 16 (RO16; nr CAS: 12225-83-1) oraz Sunset Yellow FCF (SY; nr CAS: 2783-94-0). Barwniki zostały zakupione od f. Sigma-Aldrich. Roztwory wyjściowe barwników azowych o stężeniu 10 mg mL^{-1} przygotowane w wodzie destylowanej, sterylizowano w autoklawie (temp. 121 °C przez 20 min).

III.3.2. Mikroplastik

W badaniach wykorzystano MP w postaci proszku LDPE (ang. *Low-density polyethylene* – polietylen niskiej gęstości) o wielkości ziarna 100-500 μm (f. Abifor). W celu przygotowania wyjściowej zawiesiny MP, niesterylny LDPE (1,5 g) zawieszono w 5 mL 96% etanolu i inkubowano przez godzinę. Podczas inkubacji próbę kilkakrotnie wstrząsano. Następnie dodawano 10 mL sterylnej wody dejonizowanej, aby uzyskać w próbce końcowy poziom MP wynoszący 100 mg mL^{-1} . Procedurę przeprowadzano

w warunkach sterylnych. Zawiesinę MP sterylizowano w autoklawie (temp. 121 °C przez 20 min).

III.3.3. Syntetyczne pestycydy

W badaniach wykorzystano:

- herbicyd kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) (f. Sigma-Aldrich);
- herbicyd metolachlor (MET) (f. Sigma-Aldrich);
- fungicyd azoksystrobinę (AZ; nazwa handlowa Amistar® 250 S.C.; 250 mg L⁻¹ substancji czynnej) (f. Target S.A.);
- fungicyd propamokarb w postaci kompleksu z kwasem solnym (PR; nazwa handlowa Proplant 722SL; 722 g L⁻¹ substancji czynnej) (f. Target S.A.).

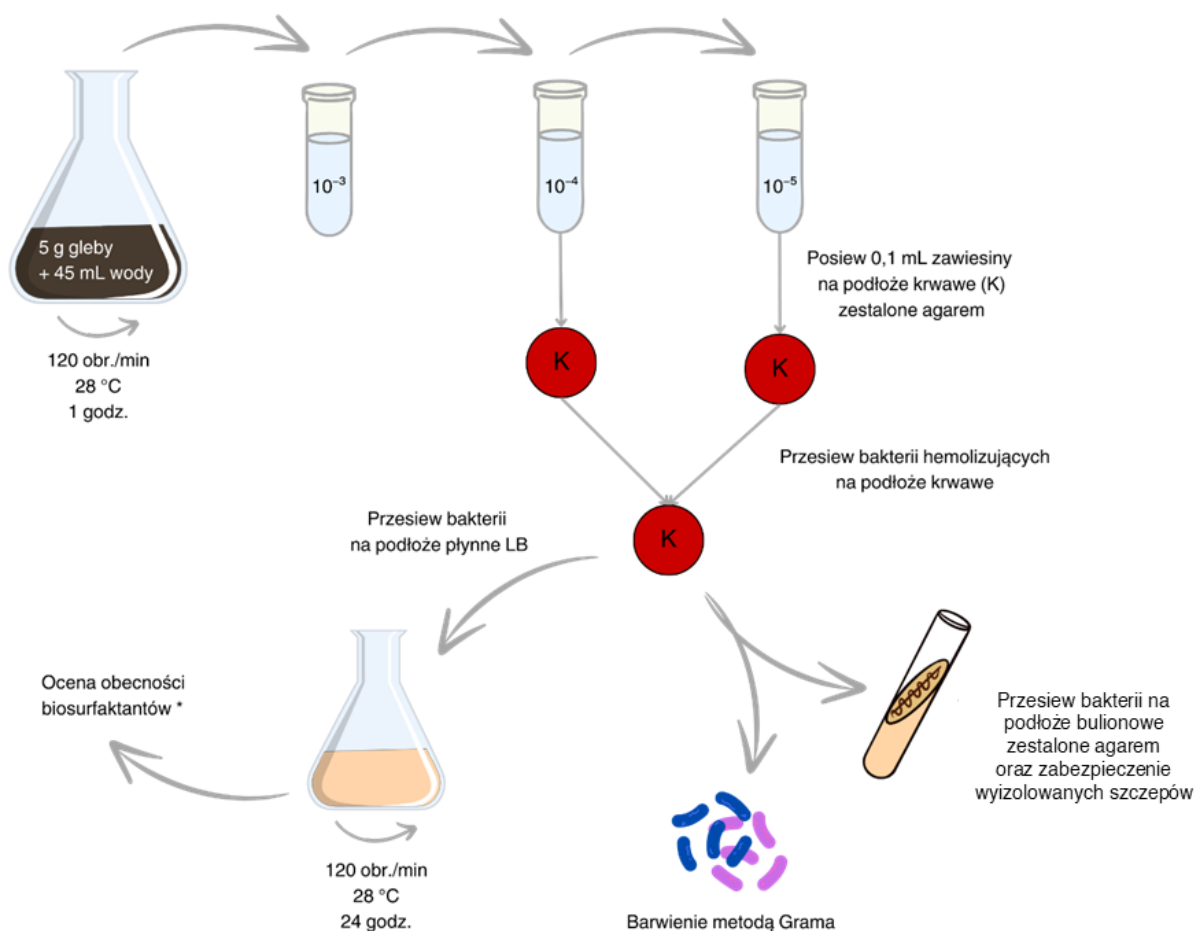
Roztwory wyjściowe wszystkich używanych w pracy pestycydów zostały przygotowane w 96% etanolu (f. Avantor Performance Materials Poland S.A.) i wysterylizowane w autoklawie (temp. 121 °C przez 20 min).

IV. Metody

W tej części opisano metody zastosowane w nieopublikowanej części pracy. Metody używane wyłącznie w badaniach opisanych w publikacjach zostały omówione w podrozdziałach V.6.4 (Artykuł naukowy 1) oraz V.6.7 (Artykuł naukowy 2).

IV.1. Izolacja bakterii produkujących biosurfaktanty

Wykorzystane w pracy szczepy bakteryjne zostały wyizolowane z prób gleby zgodnie ze schematem przedstawionym na **Rycinie 4**.



Rycina 4. Schemat izolacji bakterii produkujących biosurfaktanty. * Ocena obecności biosurfaktantów prowadzona była testem zapadającej się kropli (DCT – ang. *Drop Collapse Test*; opisanym dokładniej w podrozdziale IV.5.1).

W celu zabezpieczenia wyizolowanych szczepów, do jałowych probówek typu eppendorf dodawano 0,5 mL jałowego glicerolu oraz 0,5 mL 24-godz. hodowli bakteryjnej (otrzymanej w podłożu LB). Próby przechowywano w temp. -72 °C.

IV.2. Genetyczna identyfikacja bakterii

W pracy stosowano szczep *P. koreensis* ASK 10 (GenBank: MZ707723.1) oraz szczep *P. fluorescens* ASK 68, które zostały poddane sekwencjonowaniu w firmie Genomed S.A. i zostały zidentyfikowane przez prof. dr hab. Grażynę Płazę w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach.

Identyfikacja genetyczna 20 wybranych szczepów *Bacillus* oraz szczepu *Pseudomonas* sp. Zg 9.3 została przeprowadzona podczas stażu naukowego w Zakładzie Mikrobiologii i Ryzosfery w IO w Skierniewicach pod opieką dr hab. Lidii Sas-Paszt, prof. IO oraz dr Anny Lisek.

Ekstrakcję DNA z komórek bakteryjnych prowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (f. EURx). Zawartość DNA w próbach mierzono za pomocą spektrofotometru przy długości fali równej 260 nm. Do dalszych analiz próby rozcieńczano tak aby uzyskać końcowe stężenie DNA 10 ng μl^{-1} . Proces amplifikacji genu 16S rRNA oraz genów warunkujących podstawowe funkcje komórki prowadzono stosując 10 starterów opisanych w **Tabeli 4** zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Sekwencjonowanie wykonała firma Genomed S.A. Identyfikacja szczepu bakteryjnego opierała się na porównaniu uzyskanych sekwencji z danymi NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) za pomocą narzędzia BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*).

Tabela 4. Startery zastosowane do identyfikacji izolatów bakteryjnych.

Nazwa startera	Sekwencja (5' – 3')	Wielkość produktu [liczba nukleotydów]	Literatura
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1492	Lane 1991
1492R	TACGGHTACCTTGTTACGACTT		
tufGPF	ACGTTGACTGCCCAGGACAC	750	Caamaño-Antelo i in. 2015
tufGPR	GATACCAGTTACGTCAGTTGTACGGA		
rpoBF	AGGTCAACTAGTTCAGTATGGAC	600	Xiao i in. 2009
rpoBR	AAGAACCATAACCGGCAACTT		
recAF	TGAGTGATCGTCAGGCAGCCTTAG	900	Kwon i in. 2009
recAR	CYTBRGATAAGARTACCAWGMACCGC		
gyrA47F	CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT	1000	Thorsen i in. 2011
gyrA1066R	CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT		

IV.3. Hodowle w podłożu płynnym

IV.3.1. Wstępna i właściwa hodowla bakteryjna w podłożu płynnym

W celu uzyskania hodowli wstępnej (inokulum) zaszczerpiano podłoże LB bakteriami pobranymi z hodowli prowadzonej na podłożu bulionowym zestalonym agarem. Hodowlę prowadzono w kolbie stożkowej przez 24 godz. w warunkach wytrząsania (120 obr./min), w temp. 28 °C. Następnie, do kolejnej porcji podłoża płynnego dodawano 1% (v/v) uzyskanego inokulum. Hodowlę właściwą prowadzono w kolbie stożkowej przez 24-72 godz. w warunkach opisanych powyżej.

W zależności od etapu badań, do hodowli właściwych dodawano barwniki azowe, MP lub syntetyczne pestycydy.

IV.3.2. Płynna hodowla mieszana zawierająca komórki dwóch różnych szczepów bakteryjnych

W celu otrzymania hodowli właściwej zawierającej dwa różne szczepy bakteryjne do podłoża LB dodawano po 1% (v/v) hodowli wstępnej każdego z dwóch wybranych szczepów bakteryjnych. Następnie, hodowlę inkubowano w warunkach opisanych w punkcie IV.3.1.

IV.3.3. Wstępna i właściwa hodowla grzybni w podłożu płynnym

Hodowla wstępna grzyba z rodzaju *Fusarium* była przygotowywana w dwóch etapach w celu uzyskania jednolitej zawiesiny grzybni. W pierwszym etapie, podłoże LB zaszczipiano strzępkami grzybni zmytymi z dwóch hodowli na podłożu brzezkowym zestalonym agarem. Hodowlę prowadzono przez 24 godz. w warunkach wytrząsania (120 obr./min, temp. 28 °C). W drugim etapie, kolejną porcję podłoża LB zaszczipiano stosując 10% (v/v) uzyskanej wcześniej hodowli i inkubowano w w.w. warunkach. Tak uzyskaną hodowlę wstępną wykorzystywano do przygotowania hodowli właściwych.

Hodowlę właściwą uzyskiwano poprzez zaszczipienie podłoża LB 10% (v/v) hodowli wstępnej. Inkubację prowadzono przez 72 godz. w temp. 28 °C, 120 obr./min.

IV.3.4. Płynna hodowla mieszana zawierająca komórki bakterii i grzybów

Podłoże LB zaszczipiano stosując 1% (v/v) bakteryjnej hodowli wstępnej oraz 10% (v/v) grzybowej hodowli wstępnej. Inkubację prowadzono przez 72 godz. w temp. 28 °C, przy 120 obr./min.

IV.4. Ocena intensywności wzrostu bakterii w hodowli

IV.4.1. Wyznaczenie gęstości optycznej (ang. *Optic Dencity*, OD) hodowli bakteryjnej

Hodowlę bakteryjną rozcieńczano 10-krotnie wodą destylowaną i mierzono OD za pomocą czytnika płytek Multiskan FC Microplate Photometer (f. ThermoFisher Scientific) przy długości fali równej 630 nm. Wynik odnoszono do wyniku uzyskanego dla 10-krotnie rozcieńczonego podłoża LB.

IV.4.2. Ocena intensywności wzrostu bakterii w hodowli z użyciem podłoża stałego

Oznaczenie liczby bakterii obecnych w hodowli prowadzonej w płynnym podłożu wzrostowym zawierającym produkty uboczne przemysłu spożywczego prowadzano z użyciem szalek Petriego zawierających podłoże bulionowe zestalone agarem. Na powierzchnię podłoża nanoszono 100 μ L hodowli właściwej rozcieńczonej uprzednio jałową wodą destylowaną. Próby równomiernie rozprowadzano za pomocą sterylnej gładzeczki. Tak przygotowaną hodowlę inkubowano przez 48 godz. w temp. 22°C. W oparciu o otrzymaną liczbę kolonii bakteryjnych wyznaczano gęstość komórek bakteryjnych obecnych w wyjściowej hodowli płynnej.

IV.5. Analiza biosurfaktantów

IV.5.1. Wstępna ocena obecności biosurfaktantów w hodowli płynnej

Aktywność powierzchniową biosurfaktantów oceniano za pomocą zmodyfikowanego testu DCT (Jain i in. 1991). W tym celu, 10 μ L płynu pohodowlanego uzyskanego po zwirowaniu hodowli płynnej (10 000 obr./min, 10 min) umieszczano na polipropylenowej powierzchni i po godzinie mierzono średnicę kropli. Jako kontrolę negatywną oraz pozytywną używano 10 μ L odpowiednio podłoża LB oraz 5% wodnego roztworu dodecylsulfianu sodu (SDS; f. Chempur).

IV.5.2. Ekstrakcja biosurfaktantów z hodowli płynnej

A) Ekstrakcja cLP

Izolację cLP-Bc i cLP-Ps prowadzono stosując ekstrakcję zmodyfikowaną metodą QuEChERS (Paraszkiewicz i in. 2017). Do ekstrakcji wykorzystywano płyn pohodowlany otrzymany po zwirowaniu hodowli (10 000 obr./min, 15 min). Proces obejmował sześć etapów: 1) 5 mL supernatantu hodowli oraz 5 mL wody destylowanej umieszczano w probówce typu falkon o objętości 50 mL; 2) do mieszaniny dodawano 10 mL acetonitrylu (ACN, f. Chempur) i wytrząsano energicznie przez 2 min; 3) do probówki dodawano mieszaninę czterech soli: (2 g MgSO_4 (f. Sigma-Aldrich), 0,5 g NaCl (f. Poch), 0,5 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (f. Biomus) i 0,25 g $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$ (f. Biomus)) i ponownie wytrząsano przez 5 min; 4) próbę pozostawiano na 20 min; 5) odbierano fazę organiczną (górną) do analizy; 6) do próby wprowadzono kolejną porcję 10 mL ACN i powtarzano procedurę ekstrakcji.

B) Ekstrakcja RL

W celu ekstrakcji RL, płyn pochodzący z hodowli (10 000 obr./min, 15 min) doprowadzano do pH 3 poprzez dodanie 2N HCl (f. Chempur). Próbę inkubowano w temp. 4 °C przez noc (George i Jayachandran 2013; Bernat i in. 2019). RL ekstrahowano za pomocą octanu etylu (f. Poch), a następnie rozpuszczalnik odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany osad rozpuszczano w 1 mL ACN i analizowano za pomocą technik MALDI–TOF/TOF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation – tandem time of flight* – desorpcja/ionizacja wspomagana matrycą laserową z tandemową analizą czasu przelotu) oraz LC–MS/MS (ang. *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* – chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas).

IV.5.3. Analiza biosurfaktantów

A) Analiza cLP

CLP-Bc oraz cLP-Ps analizowano przy użyciu LC–MS/MS (LC 1200 sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas Sciex QTRAP 3200, f. Agilent) wyposażonym w źródło ESI. Separację związków przeprowadzano na kolumnie Kinetex C18 (50 mm × 2,1 mm, wielkość cząstek: 5 µm) (f. Phenomenex) utrzymywanej w temp. 40 °C. Do separacji związków stosowano fazę ruchomą składającą się z wody (A) i metanolu (B) (f. Sigma-Aldrich), uzupełnionych 5 mM mrówczanem amonu (f. Sigma-Aldrich). Stosowana szybkość przepływu wynosiła 600 µL min⁻¹. Czas analizy wynosił 6 min. Gradient rozpuszczalnika rozpoczynano od 40% B, po 0,5 min zwiększając do 100% B w ciągu 1,5 min, który był następnie utrzymywany przez 2,5 min. Do początkowego składu rozpuszczalnika powracano w ciągu 2 min. Źródło jonów spektrometru masowego działało w trybie dodatnim. Dane analizowano z użyciem oprogramowania Analyst™ v1.5.3 (f. Sciex). W badaniach wykorzystano standardy surfaktyny i ituryny (f. Sigma-Aldrich). Dla sodowych cząsteczek (M + Na)⁺ homologów surfaktyny C13, C14, C15 i C16 monitorowane pary MRM wynosiły *m/z* 1030–391, 1044–391, 1058–391 oraz 1072–391. Dla sodowych jonów homologów ituryny A C13, C14, C15 i C16, monitorowane pary MRM wynosiły *m/z* 1051.5/1051, 1065.5/1065, 1079.5/1079 oraz 1093.5/1093.

Obecność fengicyny potwierdzano przy użyciu MALDI–TOF/TOF 5800 (f. Sciex). Mieszaninę 0,5 µL ekstraktu cLP-Bc (rozcieńczonego w 2 mL metanolu) i 0,5 µL roztworu zawierającego 10 mg mL⁻¹ DHB (ang. 2,5-dihydroxybenzoic acid – kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy; f. Sigma-Aldrich) rozpuszczonego w ACN nanoszono na płytkę MALDI. Analizy MALDI–TOF/TOF prowadzono w trybie jonizacji dodatniej w zakresie

m/z 900–2000 przy stałej intensywności lasera wynoszącej 3500. Dziesięć najbardziej intensywnych sygnałów wybierano do automatycznego pomiaru MS/MS przy stałej intensywności lasera wynoszącej 5000.

B) Analiza RL

RL analizowano według metody opisanej przez Bernata i in. (2019) przy użyciu LC–MS/MS (LC 1200 sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas Sciex QTRAP 4500, f. Agilent). Separację związków przeprowadzono na kolumnie Kinetex C18 (50 mm × 4,6 mm, wielkość cząstek: 4,6 μm) (f. Phenomenex) utrzymywanej w temp. 37 °C. Do separacji związków stosowano fazę ruchomą składającą się z wody (A) i ACN (B) uzupełnioną 5 mmol L⁻¹ mrówczanem amonu (f. Sigma-Aldrich). Stosowana szybkość przepływu wynosiła 500 mL min⁻¹. Czas analizy wynosił 25 min. Gradient rozpuszczalnika rozpoczynano od 40% B, zwiększając do 95% B w ciągu 2 min i utrzymując 95% B przez następne 12 min. Do początkowego składu fazy ruchomej powracano w czasie 2 min. Źródło jonów spektrometru masowego działało w trybie ujemnym.

IV.6. Ocena aktywności przeciwgrzybowej bakterii

Aktywność przeciwgrzybową bakterii oceniano stosując hodowle stałe typu *dual culture* prowadzone na podłożu PDA w jednokomorowych oraz dwukomorowych szalkach Petriego, a także hodowle płynne prowadzone w podłożu LB.

IV.6.1. Hodowla typu *dual culture* na podłożu zestalonym agarem

Na środek podłoża PDA umieszczonego w jednokomorowej szalce Petriego nanoszono fragment grzybni o średnicy ok. 1 cm. Następnie, w odległości 3 cm od grzybni, posiewano punktowo bakterie pobrane z 24-godz. hodowli prowadzonej na podłożu bulionowym zestalonym agarem. Układem kontrolnym była grzybnia hodowana w nieobecności bakterii.

W celu oceny zdolności bakterii do produkcji przeciwgrzybowych VOCs wykorzystano dwukomorowe szalki Petriego. W jednej komorze szalki umieszczano podłoże uniwersalne zestalone agarem, w drugiej komorze umieszczano podłoże PDA. Na środek podłoża PDA nanoszono fragment grzybni o średnicy ok. 1 cm, natomiast bakterie posiewano liniowo na części zawierającej podłoże uniwersalne. Układem odniesienia była hodowla grzybni prowadzona w nieobecności bakterii.

Próby inkubowano w ciemności, w temp. 22-24 °C do czasu pokrycia przez rosnącą grzybní kontrolną całej powierzchni podłoża PDA. W celu wyznaczenia pola powierzchni zajmowanego przez grzybní stosowano oprogramowanie

SketchAndCalc™, a następnie obliczano procent zahamowania wzrostu grzybni inkubowanej w obecności bakterii w odniesieniu do wzrostu grzybni kontrolnej (przyjętego za 100%).

IV.6.2. Hodowla typu *dual culture* prowadzona w podłożu LB

Aktywność przeciwgrzybowa w hodowlach płynnych była oceniana na podstawie biomasy grzybni i wyrażana jako procent biomasy hodowli kontrolnej, przyjętej za 100%. Strzępki grzybni oddzielano od płynu pohodowlanego stosując filtrację próżniową. Osad grzybni suszono w temp. 60 °C, aż do uzyskania stałej masy.

IV.6.3. Analiza przepuszczalności błon grzybni

Do oceny przepuszczalności błon komórek grzybowych rosnących w obecności bakterii wykorzystano metodę opisaną przez Litwin i in. (2021). W tym celu, 1 mL hodowli płynnej wirowano (12 000 obr./min, 10 min). Następnie, płyn pohodowlany usuwano i do osadu dodawano 1 mL buforu PBS (ang. *Phosphate-Buffered Saline*, f. BioShop) o pH 7,4 oraz 2 µL wodnego roztworu jodku propidyny (f. Sigma-Aldrich) o stężeniu 0,1 mg mL⁻¹. Kolejne etapy przygotowania próby obejmowały: 1) intensywne mieszanie przez 30 s.; 2) inkubację w ciemności przez 5 min; 3) wirowanie (12 000 obr./min; 10 min); oraz 4) usunięcie supernatantu i dodanie 1 mL PBS do osadu. Po dwukrotnym przemyciu osadu roztworem PBS, do próby dodawano 1 mL PBS. Tak przygotowaną próbę umieszczono w studzience 24-dołkowej płytki titracyjnej i prowadzono pomiar fluorescencji na spektrofotometrze SPECORD 200, stosując długość fali wzbudzenia równą 540 nm i długość fali emisji równą 630 nm. Uzyskane wyniki odnoszono do fluorescencji supernatantu otrzymanego po zwirowaniu próby badanej (12 000 obr./min, 10 min). Biomasa grzybni obecna w próbce była następnie filtrowana, suszona do stałej masy i ważona. Uzyskane wyniki wyrażane w jednostkach fluorescencji (U) na miligram suchej biomasy przedstawiano w procentach, przyjmując za 100% wynik uzyskany dla układu kontrolnego.

IV.6.4. Oznaczanie zawartości fosfolipidów komórkowych

Do 100 mg mokrej biomasy uzyskanej z hodowli właściwej prowadzonej w podłożu LB dodawano kulki szklane (o średnicy 1 mm) oraz 1 mL mieszaniny eteru tert-butyloowo-metylowego (f. Poch) i metanolu (f. Poch) (3:1 v/v). Tak przygotowaną próbę umieszczano w młynie kulowym MM400 (f. Retsch) stosując warunki wytrząsania 30 drgań/s przez 8 min. Po przeprowadzonej jednocześnie dezintegracji komórek oraz ekstrakcji fosfolipidów dodano 0,2 mL H₂O i próbę wirowano przez przy 7200 obr./min

przez 3 min. Następnie górną warstwę przenoszono, odparowywano, a uzyskany osad rozpuszczano w 1 mL metanolu (f. Sigma-Aldrich) i analizowano techniką LC–MS/MS przy użyciu LC Agilent 1200 sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas Sciex QTRAP 4500. Do analizy stosowano kolumnę Kinetex C18 (50 mm × 2,1 mm, wielkość cząsteczek: 5 µm) oraz następujące warunki: temp. 40 °C, prędkość przepływu fazy ruchomej 500 µL min⁻¹. Źródło jonów spektrometru masowego działało w trybie ujemnym.

IV.6.5. Ocena kiełkowania zarodników

W celu uzyskania zawiesiny zarodników *Fusarium* powierzchnię hodowli grzybowej (prowadzonej na podłożu brzezkowym zestalonym agarem) zmywano jałową wodą destylowaną zawierającą 0,005% (v/v) Tween 20 (f. Koch-Light Laboratories). Uzyskaną zawiesinę sączono przez jałową watę szklaną w celu usunięcia strzępek grzybni. Zarodniki liczone stosując komorę Thoma i wyznaczano zawartość zarodników w 1 mL próby.

W celu określenia wpływu metabolitów *Bacillus* i *Pseudomonas* na kiełkowanie zarodników supernatant otrzymany po zwirowaniu (10 000 obr./min, 15 min) 72-godz. hodowli bakteryjnej dodatkowo sączono przez membranowy filtr strzykawkowy (średnica por 0,2 µm; f. Bionovo). Do tak przygotowanego supernatantu dodawano wodną zawiesinę zarodników (o wcześniej ustalonej gęstości komórek) stosując proporcje 1:1 (v/v). Próbę inkubowano przez 48 godz. w warunkach statycznych w temp. 22-24 °C.

Morfologię zarodników i strzępek obserwowano za pomocą mikroskopu świetlnego. Uzyskane wyniki wyrażano jako intensywność kiełkowania zarodników i odnoszono do liczby zarodników obecnych w próbce kontrolnej, którą przygotowano mieszając wodną zawiesinę zarodników z podłożem LB (1:1, v/v). Do pomiaru długości strzępek stosowano oprogramowanie SketchAndCalc™.

IV.7. Ekstrakcja i analiza herbicydów

Herbicydy 2,4-D i MET ekstrahowano metodą QuEChERS, a następnie analizowano techniką LC–MS/MS zgodnie z metodami opisanymi odpowiednio przez Nykiel-Szymańska i in. (2017) oraz Jasińską i in. (2022).

Próbę hodowli prowadzaną w obecności herbicydu homogenizowano dwukrotnie z kulkami szklanymi (o średnicy 1 mm) w młynie kulowym MM400 (f. Retsch) stosując warunki wytrzęsania 25 drgań/s przez 4 min. Następnie do otrzymanych homogenatów dodawano 10 mL ACN oraz sole (2 g MgSO₄; 0,5 g NaCl; 0,5 g C₆H₅NaO₇ × 2H₂O i 0,25 g C₆H₆Na₂O₇ × 1,5 H₂O) i prowadzono ekstrakcję metodą QuEChERS. Do dalszej

analizy wykorzystywano uzyskany w wyniku zwirowania supernatant (10 000 obr./min, 10 min).

Herbicydy analizowano przez przy użyciu HPLC Agilent 1200 (f. Agilent) i spektrometru mas 3200 Q-TRAP (f. Sciex). Ekstrakt rozcieńczano w mieszaninie wody i metanolu (80:20, v/v). Separację związków prowadzono na kolumnie Kinetex C18 (50 mm × 2.1 mm, wielkość cząstek: 5 µm) (f. Phenomenex) utrzymywanej w temp. 37 °C. Do separacji związków stosowano fazę ruchomą składającą się z wody (A) i metanolu (B) uzupełnionych 5 mM mrówczanem amonu. Stosowana szybkość przepływu wynosiła 500 µL min⁻¹. Gradient rozpuszczalnika rozpoczynano od 20% B, i po 1 min zwiększano do 90% B w ciągu 1 min, a następnie utrzymywano przez 2,5 min. Do początkowego składu rozpuszczalnika powracano w czasie 2 min. Podczas analizy 2,4-D źródło jonów spektrometru masowego działało w trybie ujemnym, natomiast w przypadku MET – w trybie dodatnim. Pary MRM dla 2,4-D wynosiły *m/z* 219.9-160.9 i 220.9-162.9, natomiast dla MET wynosiły *m/z* 284.09-252.2 i 284.09-176.3.

IV.8. Dekoloryzacja barwników azowych

Właściwą hodowlę płynną prowadzoną w podłożu LB z dodatkiem barwnika azowego odwirowywano (10 000 obr./min, 10 min). Następnie mierzono absorbancję supernatantu za pomocą spektrofotometru SPECORD 200 stosując odpowiednią dla poszczególnych barwników długość fali: 546 nm (AB113); 598 nm (RB5); 529 nm (AMR); 493 nm (RO16); 482 nm (SY).

Poziom dekoloryzacji (D [%]), wyznaczano według następującego wzoru:

$$D[\%] = \frac{(A-B) \cdot 100\%}{(C-D)}, \text{ gdzie:}$$

A – absorbancja próby;

B – absorbancja supernatantu hodowli bakteryjnej bez dodatku barwnika (kontrola biotyczna);

C – absorbancja podłoża z dodatkiem barwnika (kontrola abiotyczna);

D – absorbancja podłoża.

IV.9. Aktywność azoreduktazy (AzoR)

Aktywność AzoR była oznaczana metodą opisaną przez Zimmermanna i in. (1982) z użyciem jako substratu barwnika RB5. W pierwszym etapie, 1 mL hodowli płynnej wirowano (10 000 obr./min, 10 min) po czym płyn pohodowlany usuwano i do osadu dodawano kulki szklane (o średnicy 1 mm) i bufor fosforanowy o pH równym 7,2 (przygotowany z użyciem KH₂PO₄ oraz K₂HPO₄; f. Poch). Tak przygotowaną próbę

poddawano dezintegracji na młynie kulowym (stosując warunki wytrząsania 25 drgań/s przez 4 min), a następnie wirowano stosując warunki uzyskane powyżej.

Do 200 μL uzyskanego supernatantu dodawano mieszaninę reakcyjną, która zawierała: 400 μL buforu fosforanowego oraz 200 μL roztworu barwnika RB5 (125 μM). Próbę inkubowano przez 4 min. Następnie dodawano do próby 200 μL wodnego roztworu NADH (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen* – forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; f. Sigma-Aldrich) o stężeniu 10 mg mL^{-1} i monitorowano proces odbarwiania przy długości fali 597 nm w czasie 2 min, stosując spektrofotometr FLUOstar® Omega (f. BMG Labtech). Wyznaczoną zmianę wartości absorbancji używano do obliczenia aktywności AzoR, wg. następującego wzoru:

$$U_{\text{AzoR}} = \frac{(\Delta\text{Abs} \cdot V_{\text{cal}} \cdot 10^6)}{(\epsilon \cdot V_{\text{pr}} \cdot \Delta t)}; \text{ gdzie:}$$

ΔAbs – różnica absorbancji w czasie (wyznaczona w 0 i 120 sekundzie pomiaru);

V_{cal} – objętość całkowita próby (mL);

$\epsilon = 39850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

V_{pr} – objętość supernatantu w próbce (mL);

Δt – czas pomiędzy pomiarami (min).

Jednostka (U) AzoR była definiowana jako ilość enzymu potrzebna do zredukowania 1 μmol barwnika RB5 w czasie 1 min.

Stężenie białka w próbce oznaczano zgodnie z protokołem zestawu BCA (ang. *Bicinchoninic acid* – kwas bincyncholiny) Protein Assay Kit (f. Thermo Scientific™ Pierce). Aktywność AzoR wyrażano w U/mg białka.

IV.10. Techniki mikroskopowe

Analizy mikroskopowe prowadzono stosując mikroskop świetlny (Nikon Eclipse 50i z kamerą Nikon DS-Fi3 wraz z oprogramowaniem NIS-Elements D 5.11.01). Obserwacje prowadzono stosując niebarwione preparaty przyżyciowe oraz preparaty utrwalone, wybarwione roztworem fioletu krystalicznego używanym do barwienia drobnoustrojów metodą Grama (12,5% roztwór fioletu krystalicznego w 96% etanolu rozcieńczony do stężenia 0,8% (v/v) przy użyciu 1% (w/v) wodnego roztworu fenolu).

IV.11. Ocena wpływu drobnoustrojów na kiełkowanie nasion i wzrost siewek ogórka siewnego

Nasiona ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.; odmiana ogórek śremski F1; f. Legutko) umieszczano w 5% wodnym roztworze NaClO (f. Warchem). Po 5 min inkubacji w temp. pokojowej nasiona wielokrotnie płukano wodą destylowaną w celu dokładnego usunięcia NaClO. Tak przygotowane nasiona używano do dalszych badań. W zależności od celu badania wstępnie przygotowane nasiona ogórka inkubowano w wodnej zawieszynie komórek wybranego szczepu bakterii lub w wodzie, a następnie umieszczano na powierzchni podłoża MP, na wilgotnej bibule lub w glebie.

A) Ocena wzrostu siewek na podłożu MS

Na powierzchnię podłoża MS umieszczonego w szalce Petriego nanoszono 10 sztuk nasion (w dwóch rzędach po pięć sztuk). Następnie, bakterie pobrane z 24-godz. hodowli prowadzonej na podłożu bulionowym zestalonym agarem posiewano liniowo tak, aby każde nasiono było w równej odległości od bakterii. Próbę inkubowano w ciemności przez 24 godz. w temp. 22-24 °C, a następnie w warunkach rozproszonego światła słonecznego przez 96 godz.

Oddzielone od łodyg korzenie suszono do stałej masy. Obliczano średnią masę korzeni jednej siewki, a następnie uzyskane wyniki porównywano z układem kontrolnym (przyjętym za 100%), w których nasiona były inkubowane na podłożu MS w nieobecności bakterii.

B) Ocena wzrostu siewek na wilgotnej bibule

24-godz. przesiewową hodowlę bakteryjną odwirowywano (10 000 obr./min, 15 min). Supernatant usuwano, a do osadu komórek dodawano jałową wodę destylowaną w objętości stanowiącej połowę objętości usuniętego płynu pohodowlanego. W tak przygotowanej zawieszynie inkubowano nasiona ogórka przez 15 min w temp. 22-24 °C, w warunkach statycznych. Następnie, próbę zawierającą nasiona oraz zawiesinę bakteryjną umieszczano na jałowej, zwilżonej jałową wodą destylowaną, bibule, umieszczonej w szalce Petriego. Próbę inkubowano w ciemności przez 24 godz. w temp. 22-24 °C, a następnie w warunkach rozproszonego światła słonecznego przez 96 godz.

Oddzielone od łodyg korzenie suszono do stałej masy. Obliczano średnią masę korzeni jednej siewki a następnie uzyskane wyniki porównywano z układem kontrolnym (przyjętym za 100%), w których nasiona były inkubowane na wilgotnej bibule w nieobecności bakterii.

C) Ocena kiełkowania nasion i wzrostu siewek w glebie

Wstępnie przygotowane nasiona ogórka inkubowano w zawiesinie bakterii (przygotowanej zgodnie z opisem części B niniejszego rozdziału) przez 3 godz. w warunkach wytrząsania (90 obr./min) w temp. 22 °C. Równolegle przygotowano układ kontrolny, w którym nasiona inkubowano w nieobecności bakterii. Następnie, zawiesinę bakterii usuwano, a nasiona umieszczano na suchej jałowej bibule filtracyjnej umieszczonej w szalce Petriego. Inkubację prowadzono w ciemności przez 24 godz. w temp. 22-24 °C.

Glebę (zawierającą: torf wysoki, kompost, węglan wapnia, guano, mączkę rogową; wartość pH 5,0-7,0; f. Compo Bio) umieszczano w doniczkach. Do gleby dodawano wodę destylowaną lub wodną zawiesinę zarodników *Fusarium* (przygotowaną wg metody opisanej w punkcie IV.6.5) w takiej objętości, aby stanowiła ona 1% objętości gleby. Następnie, do gleby wprowadzono nasiona ogórka na głębokość ok. 2 cm. W każdym układzie badanym znalazło się po 60 nasion ogórka siewnego (sześć powtórzeń po 10 nasion).

Próby inkubowano w przez 120 godz. w temp. 22-24 °C, w warunkach rozproszonego światła słonecznego. Następnie, oddzielone od łodyg korzenie suszono do stałej masy. Obliczano średnią masę korzeni jednej siewki a następnie uzyskane wyniki porównywano z układem kontrolnym (przyjętym za 100%), w których nasiona były inkubowane w glebie w nieobecności drobnoustrojów.

IV.12. Analiza statystyczna

Wszystkie układy badane przygotowywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki przedstawiano jako wartości średnie i obliczano średnie odchylenie standardowe. Korelację oraz jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) przeprowadzono przy użyciu Microsoft Excel® (f. Microsoft Corporation). Różnice przy wartości $p < 0,05$ uznawano za istotne statystycznie. Różnice statystyczne na rycinach oznaczano symbolem gwiazdki (*) lub małymi literami alfabetu łacińskiego.

V. Wyniki

V.1. Charakterystyka profilu produkcji cyklicznych lipopeptydów szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas*

W pierwszej części badań scharakteryzowano 80 ryzosferowych szczepów bakteryjnych (77 szczepów *Bacillus* oraz trzy szczepy *Pseudomonas*) pod kątem profilu produkowanych przez nie biosurfaktantów (**Tabela 5**). Wstępnie, aktywność powierzchniową biosurfaktantów oceniono metodą DCT (IV.5.1). W celu izolacji cLP stosowano metodę ekstrakcji QuEChERS (IV.5.2A). Analizę RL prowadzono metodą opisaną przez Bernata i in. (2019) (IV.5.2B). Uzyskane próby analizowano technikami LC–MS/MS oraz MALDI–TOF/TOF (IV.5.3).

Spośród 77 szczepów *Bacillus* wybranych do niniejszych badań (przyjętych za 100%) 40 szczepów *Bacillus* (51,9%) produkuje surfaktynę, iturynę i fengicynę (**Rycina 5**). Zdolność do produkcji tylko surfaktyny i ituryny wykazuje 20 szczepów *Bacillus* (26,0%), przy czym pięć z nich produkuje surfaktynę na bardzo niskim poziomie ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$). Dziewięć szczepów *Bacillus* (11,7%) produkuje tylko iturynę, z czego jeden z nich na bardzo niskim poziomie ($< 2 \text{ mg L}^{-1}$). Pięć szczepów *Bacillus* (6,5%) produkuje tylko surfaktynę, z czego trzy z nich na bardzo niskim poziomie ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$). Dwa szczepy *Bacillus* (2,6%) nie produkują ani surfaktyny ani ituryny ani fengicyny. Jeden szczep (Kol L2; 1,3%) produkuje tylko surfaktynę i fengicynę.

Wśród izolatów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wybrano do badań jeden szczep produkujący folipeptynę (ASK 10); jeden szczep produkujący wiskozynę oraz kwas 3-(3-hydroksyalkanoyloksy)alkanowy (HAA) będący prekursorem biosurfaktantów z grupy RL (ASK 68) oraz jeden szczep produkujący milkisynę C (Zg 9.3) (**Tabela 6**). Nie stwierdzono produkcji RL przez analizowane szczepy z rodzaju *Pseudomonas*.

Tabela 5. Produkcja biosurfaktantów przez ryzosferowe szczepy *Bacillus*: A) wyizolowane z prób pochodzących z Kolnicy; B) wyizolowane z prób pochodzących z Kaszubskiego Parku Narodowego; C) wyizolowane z prób pochodzących ze Składowiska Odpadów Niebezpiecznych w Zgierzu oraz D) wykorzystane we wcześniej opublikowanych pracach KMPiB UŁ. Kolorem zielonym oznaczono nadprodukcję ($> 15 \text{ mg L}^{-1}$) surfaktyny lub ituryny lub produkcję [+] fengicyny.

* Wyniki DCT dla podłoża LB (kontrola negatywna) oraz wodnego 5% roztworu SDS (kontrola pozytywna) wynosiły odpowiednio 3 oraz 8 mm. Odchylenie standardowe dla wyniku DCT układów badanych to 1,5 mm

A)

Lp.	Szczep	DCT [mm]*	cLP		
			Surfaktyna [mg L ⁻¹]	Ituryna [mg L ⁻¹]	Fengicyna [+/-]
1.	Kol B1	8,0	109,2 ± 14,3	258,3 ± 39,0	-
2.	Kol B2	8,0	94,8 ± 16,5	289,7 ± 43,8	+
3.	Kol B3	8,0	29,3 ± 4,4	65,8 ± 9,9	+
4.	Kol B6	8,0	56,2 ± 8,5	224,2 ± 33,9	+
5.	Kol B8	8,0	65,6 ± 9,9	252,8 ± 38,2	+
6.	Kol B9	9,0	39,5 ± 6,0	205,1 ± 31,0	+
7.	Kol D2	8,0	75,5 ± 11,4	176,3 ± 26,6	+
8.	Kol D3	9,0	71,3 ± 10,8	172,5 ± 26,0	+
9.	Kol D4	9,0	88,7 ± 10,1	190,2 ± 28,8	+
10.	Kol D5	7,0	85,7 ± 12,9	161,5 ± 24,4	+
11.	Kol D7	4,0	0,0 ± 0,0	6,8 ± 1,1	-
12.	Kol D8	9,5	92,4 ± 13,9	236,0 ± 35,7	+
13.	Kol D9	9,5	84,8 ± 13,8	217,7 ± 32,9	+
14.	Kol D10	3,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
15.	Kol L1	8,0	46,6 ± 7,0	133,3 ± 20,2	+
16.	Kol L2	5,0	18,0 ± 2,7	0,0 ± 0,0	+
17.	Kol L3	8,0	49,0 ± 7,4	181,1 ± 27,4	+
18.	Kol L4	8,5	30,0 ± 4,5	156,1 ± 23,6	+
19.	Kol L5	5,0	8,5 ± 0,0	18,6 ± 2,8	+
20.	Kol L6	8,5	31,4 ± 4,7	175,3 ± 26,5	-
21.	Kol L8	8,0	15,2 ± 2,3	46,9 ± 7,0	+
22.	Kol S1	8,0	59,6 ± 9,0	362,3 ± 54,8	+
23.	Kol S2	7,5	59,3 ± 6,9	359,8 ± 54,1	+
24.	Kol S3	10,0	10,2 ± 0,9	51,2 ± 7,1	+
25.	Kol S5	6,0	25,2 ± 3,8	0,0 ± 0,0	-
26.	Kol S7	8,0	29,4 ± 3,9	230,8 ± 34,9	+
27.	Kol S8	9,5	32,2 ± 4,1	169,3 ± 25,6	+
28.	Kol S9	8,0	24,1 ± 3,6	243,8 ± 36,8	+
29.	Kol S10	4,0	0,0 ± 0,0	25,9 ± 3,9	-
30.	Kol S11	8,5	45,7 ± 6,9	517,1 ± 78,2	+
31.	Kol Si1	3,0	0,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	-
32.	Kol Si3	8,0	38,3 ± 5,7	264,7 ± 40,0	+
33.	Kol Si4	8,0	36,8 ± 5,5	420,1 ± 63,5	+
34.	Kol Si5	8,0	39,1 ± 5,9	94,9 ± 14,3	+
35.	Kol Si6	8,0	22,7 ± 3,4	379,3 ± 57,3	-

B)

Lp.	Szczep	DCT [mm]*	cLP		
			Surfaktyna [mg L ⁻¹]	Ituryna [mg L ⁻¹]	Fengicyna [+/-]
1.	KAS 1.1	5,0	0,0 ± 0,0	34,5 ± 5,2	-
2.	KAS 1.2	6,0	24,7 ± 3,7	12,8 ± 1,4	-
3.	KAS 1.3	11,0	22,8 ± 3,4	105,6 ± 15,7	-
4.	KAS 1.4	4,0	0,0 ± 0,0	6,8 ± 0,9	-
5.	KAS 1.5	6,5	31,4 ± 4,7	29,9 ± 4,5	-
6.	KAS 1.6	6,0	0,9 ± 0,3	10,1 ± 1,5	-
7.	KAS 1.7	11,0	21,6 ± 3,2	185,2 ± 28,0	+
8.	KAS 1.8	4,0	0,0 ± 0,0	5,4 ± 0,8	-
9.	KAS 1.9	5,0	0,0 ± 0,0	13,8 ± 2,0	-
10.	KAS 1.10	5,0	0,0 ± 0,0	22,7 ± 3,4	-
11.	KAS 1.11	6,5	84,0 ± 9,9	58,9 ± 8,9	-
12.	KAS 2.1	8,0	13,7 ± 2,8	58,3 ± 8,8	-
13.	KAS 2.2	9,0	52,7 ± 7,9	241,7 ± 36,5	-
14.	KAS 2.3	6,0	74,1 ± 11,0	41,5 ± 6,2	-
15.	KAS 2.4	10,0	35,3 ± 5,3	267,4 ± 40,3	+
16.	KAS 2.5	10,0	41,1 ± 6,2	29,1 ± 4,4	+
17.	KAS 2.6	10,0	30,6 ± 4,6	24,8 ± 3,7	-
18.	KAS 2.7	4,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
19.	KAS 2.8	6,0	42,8 ± 6,4	71,0 ± 10,7	-
20.	KAS 2.9	5,5	0,9 ± 0,5	5,4 ± 0,6	-
21.	KAS 2.10	6,0	13,5 ± 2,5	45,1 ± 6,8	-
22.	KAS 3.1	5,0	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,5	-
23.	KAS 3.2	6,5	11,9 ± 2,0	48,1 ± 7,2	-
24.	KAS 3.3	8,0	50,4 ± 7,6	291,7 ± 44,1	+
25.	KAS 4.1	5,0	0,9 ± 0,4	13,1 ± 2,0	-
26.	KAS 4.2	5,0	0,0 ± 0,0	8,9 ± 1,0	-
27.	KAS 4.3	5,0	0,2 ± 0,1	2,0 ± 0,7	-
28.	KAS 4.4	8,0	44,4 ± 6,7	10,9 ± 1,1	+
29.	KAS 4.5	4,0	0,3 ± 0,1	1,9 ± 0,9	-
30.	KAS 4.6	9,0	19,1 ± 2,8	48,5 ± 7,3	+

C)

Lp.	Szczep	DCT [mm]*	cLP		
			Surfaktyna [mg L ⁻¹]	Ituryna [mg L ⁻¹]	Fengicyna [+/-]
1.	Zg 1.3	8,5	65,0 ± 6,5	130,1 ± 15,6	+
2.	Zg 1.4	8,0	15,9 ± 3,3	45,8 ± 4,9	+
3.	Zg 3.7	8,5	11,2 ± 3,2	32,7 ± 4,9	+
4.	Zg 3.8	8,5	20,9 ± 2,9	0,0 ± 0,0	-
5.	Zg 7.6	7,5	7,9 ± 1,2	17,9 ± 2,7	-
6.	Zg 8.6	9,0	12,1 ± 1,8	36,4 ± 5,5	+
7.	Zg 8.8	8,0	4,9 ± 0,9	24,7 ± 3,7	+

D)

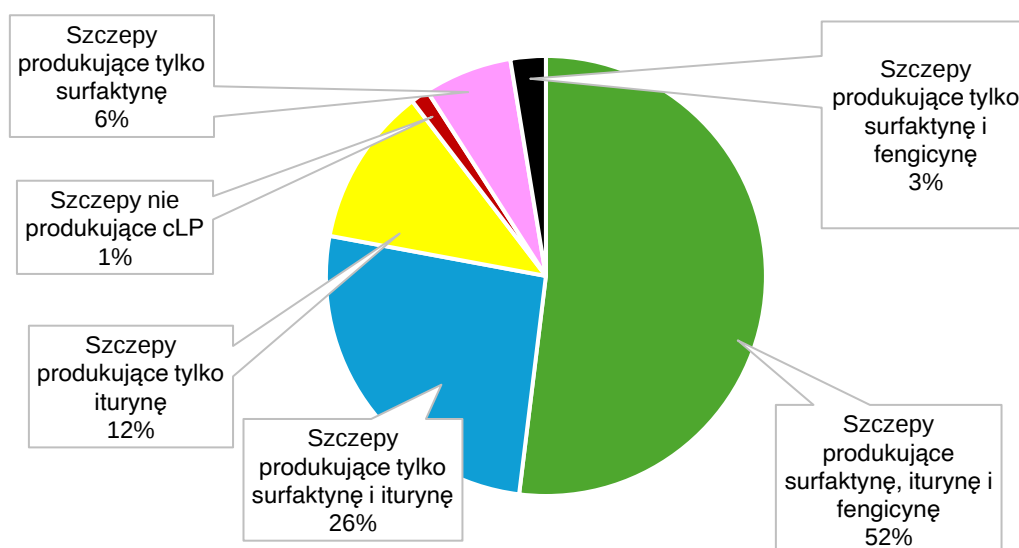
Lp.	Szczep	DCT [mm]*	cLP		
			Surfaktyna [mg L ⁻¹]	Ituryna [mg L ⁻¹]	Fengicyna [+/-]
1.	DSM 3257	4,0	0,7 ± 0,4	0,0 ± 0,0	-
2.	IM 8	4,0	0,5 ± 0,3	0,0 ± 0,0	-
3.	IM 13	8,0	65,5 ± 9,9	142,4 ± 21,5	+
4.	IM 14	7,0	19,6 ± 2,9	7,2 ± 1,2	+
5.	I'-1a	7,5	8,32 ± 2,3	52,0 ± 7,8	+

Tabela 6. Biosurfaktanty produkowane przez ryzosferowe szczepy *Pseudomonas*.

* Wyniki DCT dla podłoża LB (kontrola negatywna) oraz wodnego 5% roztworu SDS (kontrola pozytywna) wynosiły odpowiednio 3 oraz 8 mm. Odchylenie standardowe dla wyniku układów badanych DCT to 1,5 mm

Lp.	Szczep	DCT [mm] *	Biosurfaktat
1.	ASK 10	7,0	folipeptyna
2.	ASK 68	7,0	wiskozyna oraz HAA
3.	Zg 9.3	7,5	milkisyna C

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spośród wybranych do analizy 77 ryzosferowych szczepów *Bacillus* 62 szczepy (80,5%) zdolne są do wydzielania dwóch lub trzech biosurfaktantów o budowie cLP-Bc (**Rycina 5**). W puli szczepów znalazło się też kilka szczepów produkujących tylko jeden biosurfaktant *Bacillus* lub też nie produkujących cLP wcale.



Rycina 5. Procentowy podział szczepów *Bacillus* (będących modelami badawczymi w niniejszej pracy) ze względu na profil produkcji cLP-Bc. Całkowita liczba analizowanych szczepów, przyjęta za 100%, wynosiła 77. Opracowano na podstawie wyników przedstawionych w **Tabeli 5**. Brano pod uwagę produkcję cLP wyższą niż 0 mg L⁻¹.

V.2. Charakterystyka szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas* pod kątem aktywności przeciwgrzybowej wobec wybranych szczepów *Fusarium*

Po przeprowadzeniu charakterystyki szczepów bakteryjnych pod kątem produkcji biosurfaktantów, dokonano oceny aktywności przeciwgrzybowej wybranych szczepów bakteryjnych wobec dwóch szczepów grzybowych – *F. sambucinum* IM 6525 oraz *F. culmorum* DSM 1094. W tym celu wykorzystano hodowle typu *dual culture* na podłożu zestalonym agarem (umieszczonym w jednokomorowych lub dwukomorowych szalkach Petriego; IV.6.1) oraz w podłożu płynnym (IV.3.4; IV.6.2).

V.2.1. Hodowle na podłożu stałym

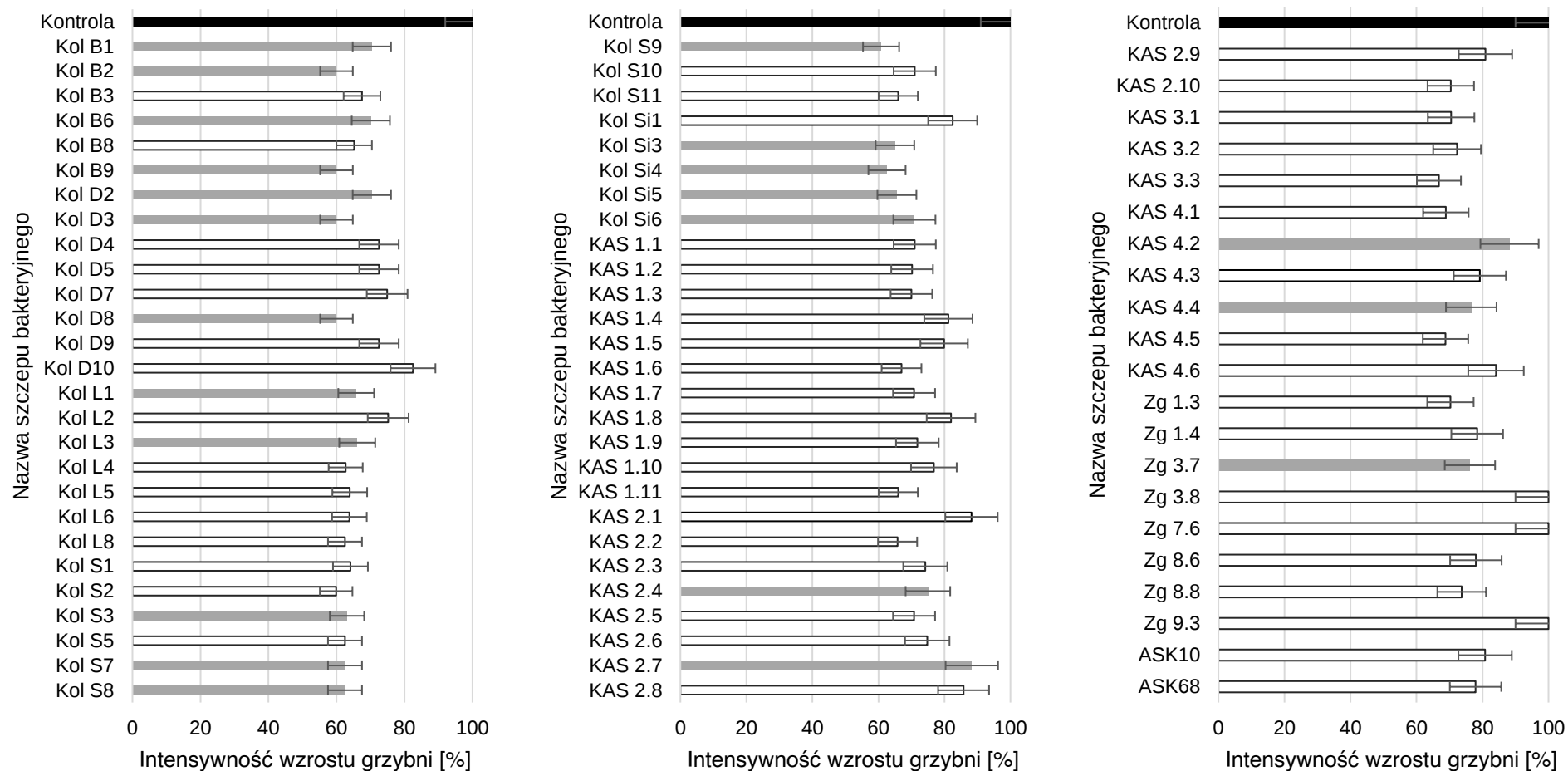
A. Aktywność przeciwgrzybowa bakterii wobec *F. sambucinum* IM 6525

Oceniono aktywność przeciwgrzybową 75 bakteryjnych szczepów ryzosferowych (w tym 72 należących do rodzaju *Bacillus* i trzech do rodzaju *Pseudomonas*), które wcześniej nie były modelami badawczymi w pracach KMPiB UŁ (**Tabela 5A,B,C; Tabela 6**). W tym celu wykorzystano hodowle na podłożu PDA umieszczonym w jednokomorowych szalkach Petriego (IV.6.1). W badaniach zastosowano szczep *F. sambucinum* IM 6525, wybrany na podstawie wyników wstępnych wskazujących na jego wysoką oporność na działanie bakterii *Bacillus*.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że analizowane szczepy bakteryjne charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością przeciwgrzybową (**Rycina 6**). Niektóre szczepy znacząco hamowały wzrost grzybni IM 6525, podczas gdy inne miały jedynie niewielki wpływ na rozwój strzępek. Najwyższą zdolność do ograniczania wzrostu powyższej grzybni (o ok. 40%) stwierdzono dla szczepów *Bacillus* sp. Kol B2, *Bacillus* sp. Kol B9, *Bacillus* sp. Kol D3 oraz *Bacillus* sp. Kol D8, natomiast najniższą (0%) dla szczepów *Bacillus* sp. Zg 3.8, *Bacillus* sp. Zg 7.6 oraz *Pseudomonas* sp. Zg 9.3. Stwierdzono słabą ujemną korelację (-0,40) oraz umiarkowaną ujemną korelację (-0,52) pomiędzy wysoką produkcją odpowiednio surfaktyny i ituryny przez szczepy *Bacillus*, a intensywnością wzrostu grzybni.

W przypadku 22 układów badanych zawierających bakterie *Bacillus* zaobserwowano intensywny, dendrytyczny wzrost populacji bakteryjnej w kierunku macierzystej kolonii bakteryjnej. Proces ten skutecznie uniemożliwił dalszą kolonizację powierzchni podłoża przez strzępki (**Rycina 7**). Analiza mikroskopowa grzybni brzegowej pozwoliła zaobserwować przyleganie bakterii do powierzchni strzępek. Stwierdzono również, że powyższe 22 szczepy bakteryjne, charakteryzują się statystycznie wyższą aktywnością przeciwgrzybową ($p < 0,05$) niż te, u których nie obserwowano kolonizacji strzępek grzybni IM 6525. Porównując uzyskane wyniki

z danymi dotyczącymi produkcji surfaktyny i ituryny (**Tabela 5**) przez badane szczepy zauważono, że bakterie, dla których odnotowano zdolność do kolonizacji strzępek grzybni IM 6525 częściej produkują iturynę w ilości większej niż 200 mg L⁻¹ oraz częściej wykazują zdolność do produkcji fengicyny niż bakterie, dla których nie odnotowano obecności tego zjawiska.

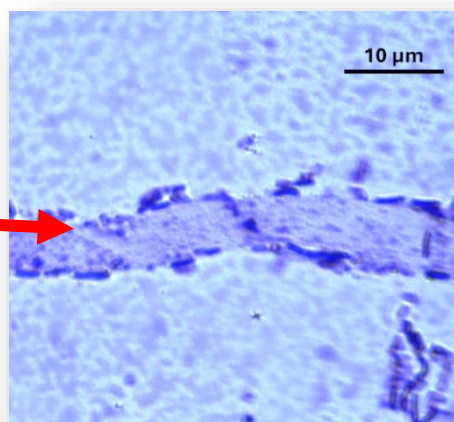


Rycina 6. Intensywność wzrostu grzybnia *F. sambucinum* IM 6525 hodowanej **na podłożu stałym** w obecności bakterii z rodzaju *Bacillus* lub *Pseudomonas* (hodowle typu *dual culture*) przez 120 godz. Kolorem czarnym oznaczono intensywność wzrostu grzybnia kontrolnej hodowanej w nieobecności bakterii, przyjętą za 100%. Kolorem szarym oznaczono szczepy bakterii zdolne do kolonizacji strzępek.

A)



B)

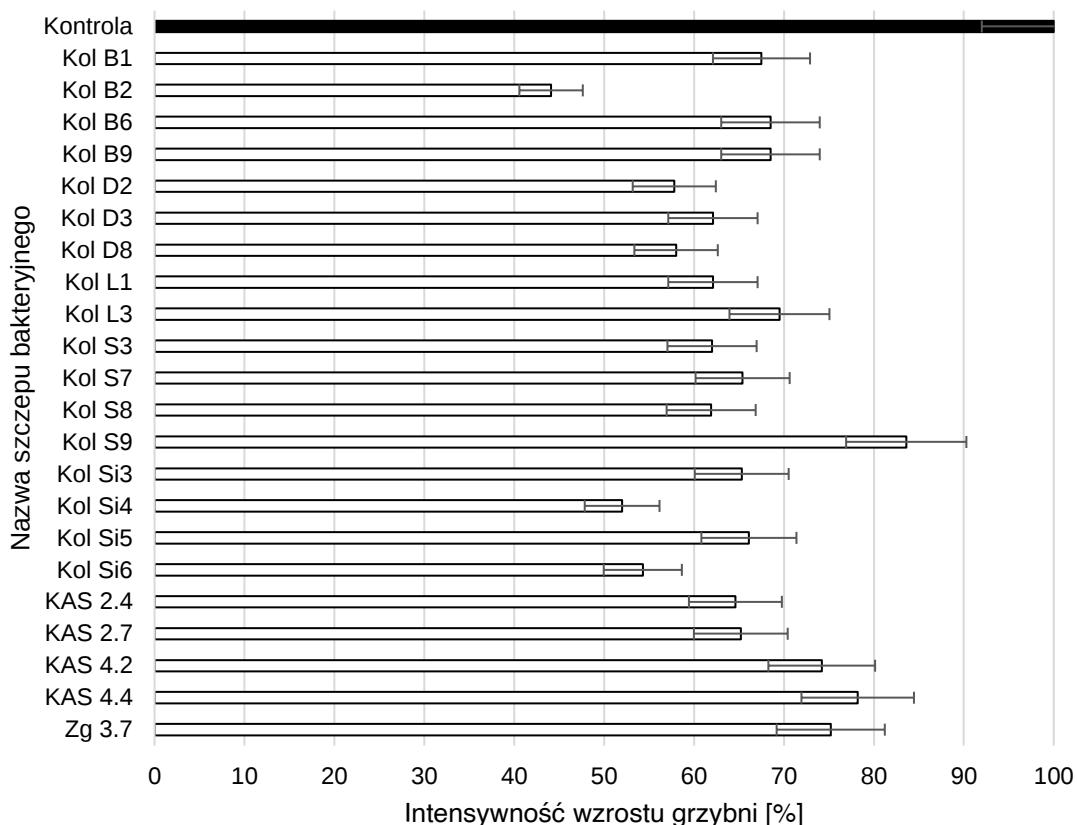


Rycina 7. Hodowla typu *dual culture* grzybni *F. sambucinum* IM 6525 oraz bakterii *Bacillus* sp. Kol B9 prowadzona na podłożu stałym PDA przez 120 godz. inkubacji. A) ocena makroskopowa; oraz B) obraz mikroskopowy preparatu barwionego fioletem krystalicznym zawierającego grzybnię brzegową.

B. Aktywność przeciwgrzybowa bakterii wobec *F. culmorum* DSM 1094

Oceniono aktywność przeciwgrzybową 22 szczepów *Bacillus* (które w poprzednim etapie wykazały zdolność do kolonizacji strzępek grzybni) wobec szczepu *F. culmorum* DSM 1094. W tym celu ponownie wykorzystano hodowle typu *dual culture* na podłożu stałym umieszczonym w jednokomorowych szalkach Petriego (IV.6.1).

Nie stwierdzono kolonizacji strzępek *F. culmorum* DSM 1094 przez badane bakterie (**Rycina 8**). Najwyższą aktywność przeciwgrzybową (55,9% zahamowania wzrostu grzybni) wyznaczono dla szczepu *Bacillus* sp. Kol B2, który również w poprzednim etapie badań wykazywał wysoką skuteczność przeciwgrzybową. Z kolei najniższą aktywność (16,4% zahamowania wzrostu grzybni) wykazał szczep *Bacillus* sp. Kol S9, charakteryzujący się największą różnicą w skuteczności wobec obu badanych grzybni *Fusarium*. Nie zaobserwowano istotnych różnic we wrażliwości grzybni *F. sambucinum* IM 6525 i *F. culmorum* DSM 1094 wobec badanych 22 szczepów *Bacillus*.



Rycina 8. Intensywność wzrostu grzybni *F. culmorum* DSM 1094 hodowanej **na podłożu stałym** w obecności bakterii z rodzaju *Bacillus* (hodowle typu *dual culture*) przez 72 godz. Za 100% przyjęto intensywność wzrostu grzybni kontrolnej hodowanej w nieobecności bakterii.

Na podstawie zróżnicowanych profili produkcji cLP oraz aktywności przeciwgrzybowej wobec *F. sambucinum* IM 6525 oraz *F. culmorum* DSM 1094 zawężono pulę badanych szczepów bakteryjnych przeznaczoną do dalszych badań. Grupa ta objęła:

- 14 szczepów *Bacillus* produkujących surfaktynę, iturynę i fengicynę (Kol B2, Kol B3, Kol B9, Kol D3, Kol D4, Kol D8, Kol S1, Kol S2, Kol S8, Kol L8, Kol Si4, Zg 1.3, KAS 2.4, KAS 2.5);
- pięć szczepów *Bacillus* produkujących surfaktynę i iturynę (Kol B1, Kol L6, Kol Si6, KAS 2.2, Zg 7.6);
- jeden szczep *Bacillus* produkujący iturynę oraz bardzo niewielkie ilości surfaktyny ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$, szczep KAS 4.1);
- dwa szczepy produkujące tylko iturynę (Kol S10 oraz KAS 1.10);
- jeden szczep *Bacillus* produkujący tylko surfaktynę (Kol S5);
- jeden szczep *Bacillus* produkujący surfaktynę i fengicynę (Kol L2);

- oraz trzy szczepy z rodzaju *Pseudomonas* – ASK 10, ASK 68 oraz Zg 9.3, produkujące kolejno folipeptynę, wiskozyne oraz milkisyne C.

Wśród wybranych szczepów, dziewięć (Kol B1, Kol B2, Kol B9, Kol D3, Kol D8, Kol S8, Kol Si4, Kol Si6, KAS 2.4) wykazało zdolność do kolonizowania powierzchni strzępek *F. sambucinum* IM 6525.

Dodatkowo do dalszych badań wybrano pięć szczepów *Bacillus* stosowanych w wcześniejszych pracach KMPIB UŁ:

- *B. subtilis* DSM 3257 – produkujący tylko surfaktynę na niskim poziomie ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) (Płaza i in. 2015; Bernat i in. 2016);
- *Bacillus* sp. IM 8 (wcześniej opisywany jako KP8) – produkujący tylko surfaktynę na niskim poziomie ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$) (Płaza i in. 2015);
- *Bacillus* sp. I'-1a, *B. subtilis* IM 13 oraz *B. subtilis* IM 14 produkujące wszystkie trzy cLP-Bc (Płaza i in. 2015; Bernat i in. 2016; Paraszkievicz i in. 2017; Paraszkievicz i in. 2018).

C. Aktywność przeciwgrzybowa bakteryjnych VOCs wobec szczepów *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525

W poprzednich etapach pracy głównymi czynnikami hamującymi rozwój grzybni były metabolity bakteryjne wydzielane do podłoża, jednak istnieje możliwość, że w aktywność przeciwgrzybową były również zaangażowane bakteryjne VOCs. Aby to zbadać, zastosowano dwukomorowe szalki Petriego, co uniemożliwiło migrację metabolitów takich jak cLP w podłożu wzrostowym, pozwalając jednocześnie ocenić wpływ VOCs na wzrost grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. W badaniach wykorzystano szczepy bakteryjne wytypowane na końcu poprzedniej sekcji tego podrozdziału (V.2.1B). Oceniano aktywność przeciwgrzybową bakteryjnych VOCs na podstawie intensywności wzrostu (IV.6.1) i morfologii grzybni powierzchniowej i powietrznej.

Najsilniejsze zahamowanie wzrostu powierzchniowego grzybni *F. culmorum* DSM 1094 wyznaczono w obecności bakterii trzech szczepów – Kol B3, Kol S10 oraz KAS 2.2, z intensywnością wzrostu grzybni wynoszącą kolejno 75,3; 74,9 oraz 71,0% (**Tabela 7**). Dla siedmiu szczepów nie stwierdzono produkcji związków hamujących wzrost grzybni powierzchniowej (intensywność wzrostu grzybni $\geq 95\%$). W pozostałych układach wzrost powierzchniowy grzybni mieścił się w przedziale od 79,8 do 93,6% powierzchni w odniesieniu do kontroli (grzybni inkubowanej w nieobecności bakterii). W przypadku grzybni *F. sambucinum* IM 6525 nie stwierdzono ograniczenia wzrostu powierzchniowego przez żaden z badanych szczepów bakteryjnych.

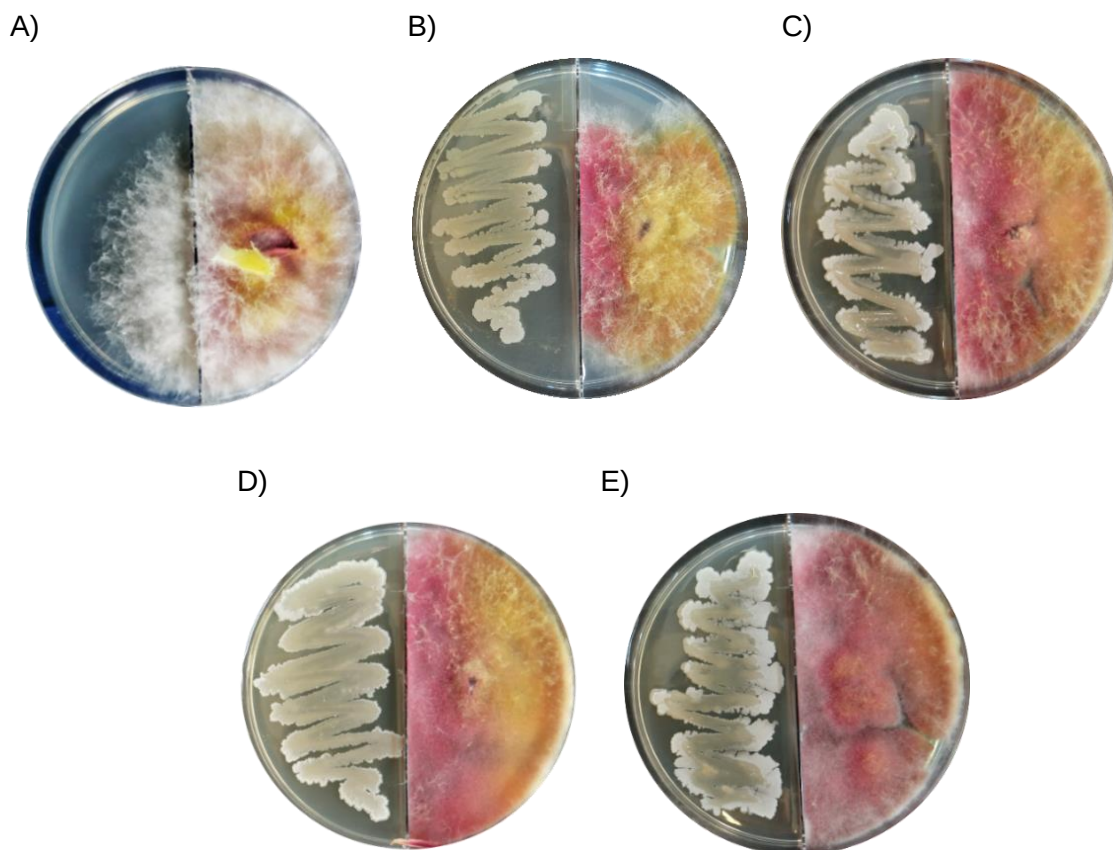
Obserwowano wpływ bakteryjnych VOCs na grzybnię powietrzną *F. culmorum* DSM 1094 (**Rycina 9**). Na podstawie zmian w intensywności wzrostu grzybni powietrznej stwierdzono, że wszystkie badane bakterie wykazują zdolność do produkcji VOCs wpływających na morfologię grzybni powietrznej powyższego szczepu (**Tabela 7**). Podobnie jak w przypadku grzybni powierzchniowej, nie stwierdzono wpływu bakteryjnych VOCs na grzybnię powietrzną IM 6525.

Stwierdzono, że choć wszystkie badane bakterie ryzosferowe wykazują zdolność do produkcji VOCs, w przeważającej większości aktywność powyższych metabolitów nie jest wystarczająca do zahamowania wzrostu grzybni powierzchniowej.

Tabela 7. Wpływ VOCs produkowanych przez szczepy bakteryjne na grzybnię powierzchniową i powietrzną szczepów *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525 po 120 godz. inkubacji.

Lp.	Nazwa szczepu	Intensywność wzrostu grzybni DSM 1094		Intensywność wzrostu grzybni IM 6525	
		powierzchniowej * [%]	powietrznej ** [+/–]	powierzchniowej [%]	powietrznej [+/–]
1.	Kol B1	93,0 ± 5,2	+++	100,0	–
2.	Kol B2	89,6 ± 4,3	++	100,0	–
3.	Kol B3	74,9 ± 2,9	+++	100,0	–
4.	Kol B9	98,6 ± 3,5	++	100,0	–
5.	Kol D3	87,6 ± 2,8	+++	100,0	–
6.	Kol D4	96,0 ± 3,8	++++	100,0	–
7.	Kol D8	79,8 ± 2,8	++	100,0	–
8.	Kol L2	85,7 ± 2,4	++	100,0	–
9.	Kol L6	88,8 ± 3,9	++	100,0	–
10.	Kol L8	97,9 ± 2,0	+++	100,0	–
11.	Kol S1	85,7 ± 3,4	++	100,0	–
12.	Kol S2	90,8 ± 5,5	+	100,0	–
13.	Kol S5	88,8 ± 4,3	+	100,0	–
14.	Kol S8	80,8 ± 4,9	+	100,0	–
15.	Kol S10	75,3 ± 3,8	+	100,0	–
16.	Kol Si4	82,3 ± 2,9	++	100,0	–
17.	Kol Si6	86,9 ± 3,4	+++	100,0	–
18.	KAS 1.10	93,6 ± 6,2	+++	100,0	–
19.	KAS 2.2	71,0 ± 4,6	++	100,0	–
20.	KAS 2.4	97,4 ± 2,9	+++	100,0	–
21.	KAS 2.5	98,4 ± 1,8	++	100,0	–
22.	KAS 4.1	82,4 ± 2,4	+	100,0	–
23.	Zg 1.3	89,4 ± 3,3	+	100,0	–
24.	Zg 7.6	91,1 ± 2,1	+	100,0	–
25.	Zg 9.3	88,8 ± 4,4	+	100,0	–
26.	ASK 10	87,1 ± 5,7	+	100,0	–
27.	ASK 68	92,9 ± 3,8	+	100,0	–
28.	DSM 3257	99,0 ± 1,9	+++	100,0	–
29.	I'-1a	83,0 ± 3,3	+++	100,0	–
30.	IM 8	91,7 ± 4,2	++	100,0	–
31.	IM 13	92,3 ± 6,5	++	100,0	–
32.	IM 14	95,4 ± 5,7	++	100,0	–

* Wynik uzyskany dla grzybni inkubowanej w nieobecności bakterii stanowił kontrolę przyjętą za 100%; ** Przykładowe wyniki dla każdego oznaczenia przedstawiono na **Rycinie 9**.



Rycina 9. Przykładowy wzrost grzybni *F. culmorum* DSM 1094 na podłożu zestalonym agarom umieszczonym w dwukomorowych szalkach Petriego po 120 godz. inkubacji w: A) nieobecności bakterii; oraz w obecności bakterii szczepów *Bacillus* B) Kol S10; C) Kol B9; D) Kol L8 oraz E) Kol D4. Wzrost grzybni **powietrznej** w próbach B-E stanowi przykład dla przyjętych w **Tabeli 7** oznaczeń (+), (++) , (+++), (++++).

V.2.2. Hodowle w podłożu płynnym

Oceniono aktywność przeciwgrzybową bakterii z użyciem hodowli w podłożu płynnym. Ocenie poddano 32 szczepy bakteryjne wybrane do badań pod koniec podrozdziału V.2.1B i badane w podrozdziale V.2.1C oraz dwa szczepy grzybowe – *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Hodowle prowadzono zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.3.4, a aktywność przeciwgrzybową wyznaczano zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.6.2.

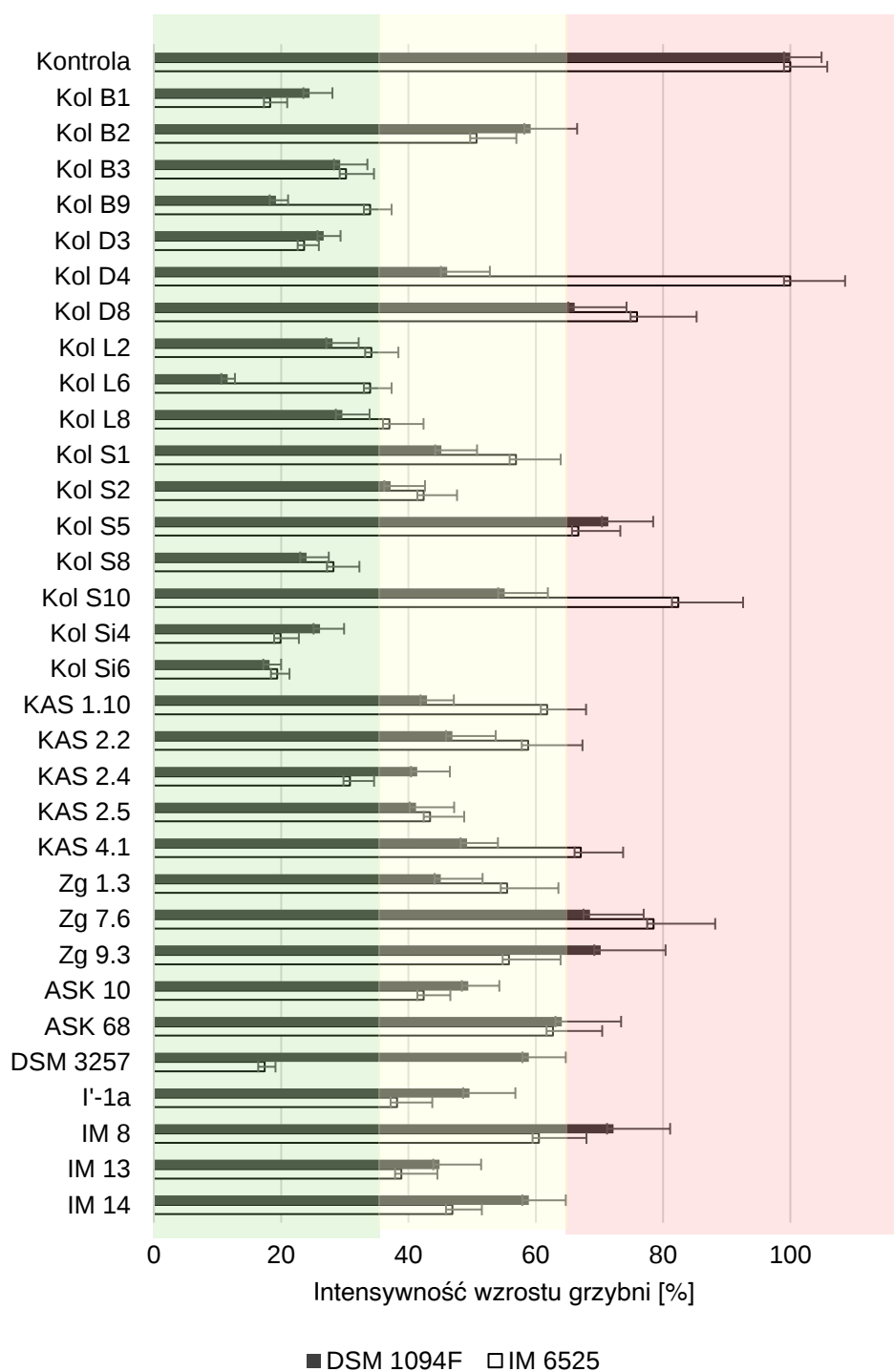
Stwierdzono, że szczep Kol Si6 wykazuje najwyższą aktywność przeciwgrzybową wobec obu badanych szczepów *Fusarium*, powodując spadek intensywności wzrostu grzybni DSM 1094 do 18,2%, a grzybni IM 6525 do 19,4% (**Rycina 10**). Natomiast szczep Zg 7.6 wykazuje najniższą aktywność przeciwgrzybową wobec obu szczepów grzybni – obniżając intensywność wzrostu grzybni DSM 1094 oraz IM 6525 do kolejno 68,5 oraz 75,5%.

Stwierdzono również, że:

- wysoka aktywność przeciwgrzybowa (powodująca spadek intensywności wzrostu grzybni do $\leq 35\%$) wobec obu szczepów *Fusarium* charakterystyczna jest dla dziewięciu z 32 badanych szczepów bakteryjnych (Kol B1, Kol B3, Kol B9, Kol D3, Kol L2, Kol L6, Kol S8, Kol Si4, Kol Si6);
- średnia aktywność przeciwgrzybowa (powodująca spadek intensywności wzrostu grzybni do od 35 do 65%) wobec obu szczepów *Fusarium* wyznaczana jest dla jedenastu szczepów bakteryjnych (ASK 10, I'-1a, IM 13, IM 14, Kol B2, Kol S1, Kol S2, KAS 2.2, KAS 2.5, KAS 1.10, Zg 1.3);
- niska aktywność przeciwgrzybowa (powodująca spadek intensywności wzrostu grzybni do $\geq 65\%$) wyznaczana jest dla trzech szczepów bakteryjnych (Kol S5, Kol D8, Zg 7.6).

Pozostałe dziewięć badanych szczepów (Kol L8, KAS 2.4, DSM 3257, IM 8, ASK 68, Kol D4, Kol D10, KAS 4.1, Zg 9.3) wykazywało zróżnicowany wpływ na wzrost grzybni *Fusarium*, zależny od użytego w badaniu szczepu grzybowego.

Ustalono, że bakterie zdolne do kolonizacji strzępek *F. sambucinum* IM 6525 (V.2.1A) częściej wykazywały wysoką aktywność przeciwgrzybową w hodowlach płynnych wobec obu badanych szczepów *Fusarium*, w porównaniu do tych, dla których nie stwierdzono takiej zdolności ($p < 0,05$). Ponadto, wyznaczono umiarkowaną negatywną korelację (-0,46) pomiędzy poziomem produkcji ituryiny a intensywnością wzrostu grzybni *F. culmorum* DSM 1094. Taka zależność nie występowała natomiast w przypadku drugiego szczepu grzybni ani w przypadku poziomu produkcji surfaktyny.



Rycina 10. Intensywność wzrostu grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525 hodowanej w podłożu płynnym LB w obecności bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas* przez 72 godz. Kontrolę (przyjętą za 100%) stanowił wynik uzyskany dla grzybni inkubowanej w nieobecności bakterii. Kolorami na rycinie oznaczono przyjęte przedziały aktywności przeciwwgrzybowej: wysoką – kolor zielony, intensywność wzrostu grzybni $\leq 35\%$; średnią – kolor żółty, ograniczenie wzrostu grzybni do od 35 do 65%; oraz niską – kolor czerwony, ograniczenie wzrostu grzybni $\geq 65\%$.

V.3. Ocena wpływu szczepów bakteryjnych na wzrost korzeni siewek ogórka siewnego

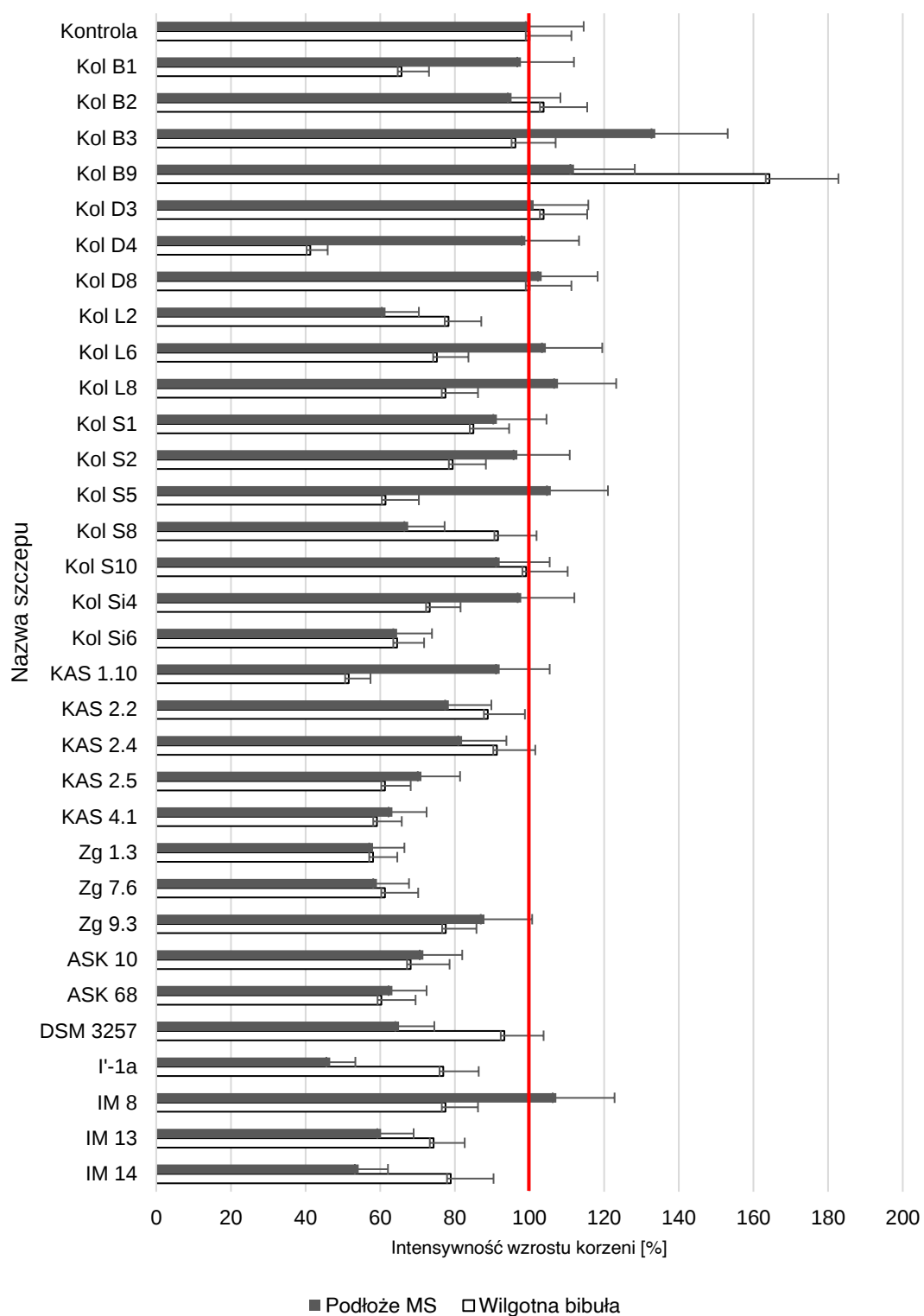
W kolejnym etapie badań oceniono wpływ 32 bakteryjnych szczepów ryzosferowych (wybranych w końcowej części podrozdziału V.2.1B) na wzrost korzeni siewek ogórka siewnego. Badania prowadzono w warunkach jałowych z użyciem podłoża MS oraz wilgotnej bibuły stosując metody opisane w podrozdziale IV.11. Układami kontrolnymi (których wyniki przyjęto za 100%) były nasiona inkubowane w nieobecności bakterii.

W oparciu o wyniki przedstawione na **Rycinie 11** stwierdzono, że korzenie siewek ogórka siewnego inkubowane w obecności bakterii na podłożu MS wykazują wyższą intensywność wzrostu w porównaniu do tych inkubowanych na wilgotnej bibule.

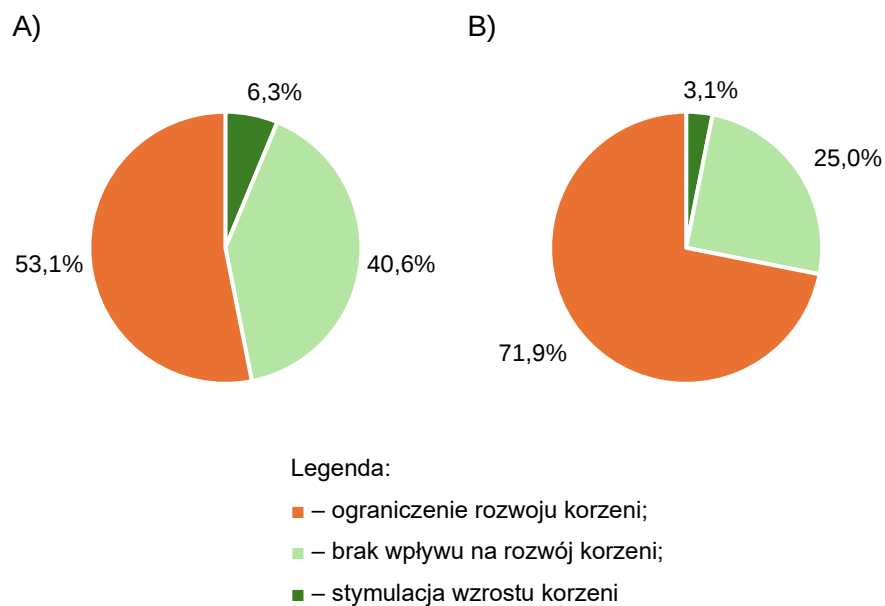
Analizując wpływ szczepów bakteryjnych na wzrost korzeni ogórka stwierdzano wzrost ($\geq 110\%$), spadek ($\leq 90\%$) lub brak wpływu (91-109%) na intensywność wzrostu korzeni. Stwierdzono, że niezależnie od zastosowanej metody:

1. bakterie 10, spośród 29, analizowanych szczepów *Bacillus* ograniczają wzrost korzeni siewek ogórka;
2. wszystkie trzy użyte w badaniu szczepy *Pseudomonas* powodują ograniczenie wzrostu korzeni siewek ogórka;
3. szczep *Bacillus* sp. Kol B9 jako jedyny spośród analizowanych szczepów stymuluje wzrost korzeni siewek ogórka;
4. sześć szczepów bakteryjnych (Kol B2, Kol B3, Kol B9, Kol D3, Kol D8 oraz Kol S10), nie ma negatywnego wpływu na rozwój korzeni siewek ogórka.

Uzyskane wyniki wskazały, że zastosowane w badaniu szczepy bakteryjne wykazują zróżnicowany, ale zazwyczaj negatywny, wpływ na intensywność wzrostu korzeni siewek ogórka siewnego (**Rycina 12**). Jedynie szczep *Bacillus* sp. Kol B9 stymulował wzrost korzeni ogórka siewnego niezależnie od zastosowanej w badaniu metody.



Rycina 11. Intensywność wzrostu korzeni siewek ogórka siewnego inkubowanych w obecności bakterii na podłożu MS lub na wilgotnej bibule umieszczonej w szalkach Petriego. Kontrolę (przyjętą za 100% i oznaczoną czerwoną linią) stanowiły wyniki uzyskane dla siewek rosnących bez dodatku bakterii.



Rycina 12. Procentowy podział szczepów bakteryjnych ze względu na wpływ wywierany na wzrost korzeni ogórka siewnego oceniany przy użyciu A) podłoża MS; B) wilgotnej bibuły.

Na koniec tego etapu pracy ponownie zawężono pulę badanych szczepów bakteryjnych (**Tabela 8**). Do planowanej identyfikacji genetycznej wybrano szczepy różniące się pod względem profilu wytwarzanych biosurfaktantów, mechanizmów aktywności przeciwgrzybowej wobec szczepów z rodzaju *Fusarium* oraz wpływu na wzrost korzeni siewek ogórka siewnego. Wśród wybranych szczepów znalazły się m.in. *Bacillus* sp. Kol B3, *Bacillus* sp. Kol S10 oraz *Bacillus* sp. KAS 2.2, które jako jedyne wykazywały zdolność do produkcji VOCs hamujących wzrost grzybni powierzchniowej w około 25-30% (podrozdział V.2.1C; **Tabela 7**). Do puli włączono również sześć szczepów, które nie miały negatywnego wpływu na wzrost siewek ogórka (Kol B2; Kol B3, Kol B9, Kol D3, Kol D8 oraz Kol S10) (**Rycina 11**). W skład wybranych szczepów weszły także wszystkie trzy szczepy *Pseudomonas*. W procesie selekcji do identyfikacji genetycznej pominięto szczepy *Bacillus*, które nie wykazały zdolności do produkcji biosurfaktantów oraz te, które zostały wcześniej zidentyfikowane.

Tabela 8. Podsumowanie wyników dotyczących analizy produkcji biosurfaktantów, aktywności przeciwwgrzybowej oraz wpływu na rozwój korzeni ogórka przez wybrane do kolejnych etapów badań szczepy bakteryjne.

Lp.	Szczep	Produkcja cLP [+ / –]			AP ⁽¹⁾ wobec szczepu		Kolonizacja strzępek IM 6525	VOCs ⁽²⁾	Wpływ na rozwój korzeni ogórka siewnego ⁽³⁾
		Surf.	Itur.	Feng.	DSM 1094	IM 6525			
1.	Kol B1	+	+	–	wysoka	wysoka	+	+/-	–
2.	Kol B2	+	+	+	średnia	średnia	+	+/-	0
3.	Kol B3	+	+	+	wysoka	wysoka	–	++	++
4.	Kol B9	+	+	+	wysoka	wysoka	+	+/-	+++
5.	Kol D3	+	+	+	wysoka	wysoka	+	+	0
6.	Kol D4	+	+	+	średnia	niska	–	+/-	–
7.	Kol D8	+	+	+	niska	niska	+	+	0
8.	Kol L2	+	–	+	wysoka	średnia	–	+	– –
9.	Kol L6	+	+	–	wysoka	wysoka	–	+/-	–
10.	Kol L8	+	+	+	wysoka	średnia	–	+/-	–
11.	Kol S1	+	+	+	średnia	średnia	–	+	–
12.	Kol S2	+	+	+	średnia	średnia	–	+/-	–
13.	Kol S8	+	+	+	wysoka	wysoka	+	+/-	–
14.	Kol S10	–	+	–	średnia	niska	–	++	0
15.	Kol Si4	+	+	+	wysoka	wysoka	+	+/-	–
16.	Kol Si6	+	+	–	wysoka	wysoka	+	+/-	– –
17.	KAS 1.10	–	+	–	średnia	średnia	–	+/-	–
18.	KAS 2.2	+	+	–	średnia	średnia	–	++	–
19.	KAS 2.4	+	+	+	średnia	wysoka	+	+/-	–
20.	Zg 7.6	+	+	–	niska	niska	–	+	– –
21.	Zg 9.3	milkisyne C			niska	średnia	–	+	–
22.	ASK 10	folipeptyna			średnia	średnia	–	+	– –
23.	ASK 68	wiskozyna			średnia	średnia	–	+/-	– –

⁽¹⁾ AP – aktywność przeciwwgrzybowa (niska – intensywność wzrostu grzybni wyższa niż 65%; średnia – mieszcząca się w przedziale 35-65%; oraz wysoka – intensywność wzrostu grzybni niższa niż 35%, w odniesieniu do kontroli);

⁽²⁾ (+/-) produkcja VOCs mających wpływ tylko na grzybnię powietrzną DSM 1094; (+) słabe (< 20%) ograniczenie wzrostu grzybni powierzchniowej DSM 1094; (++) ograniczenie wzrostu grzybni powierzchniowej DSM 1094 mieszczące się w przedziale 20-30%;

⁽³⁾ (+++) pozytywny w przypadku obu użytych w pracy metod; (++) pozytywny w przypadku jednej metody; (–) negatywny w przypadku jednej metody; (– –) negatywny w przypadku obu metod; (0) – brak wpływu.

V.4. Identyfikacja wybranych szczepów bakteryjnych

Dla 20 wybranych szczepów *Bacillus* oraz trzech szczepów *Pseudomonas* przeprowadzono wstępną identyfikację genetyczną. Identyfikację szczepów ASK 10 i ASK 68 wykonano w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyna Płazy. Identyfikację pozostałych szczepów przeprowadzono podczas stażu naukowego w Zakładzie Mikrobiologii i Ryzosfery IO w Skierniewicach pod opieką prof. dr hab. Lidii Sas-Paszt oraz dr Anny Lisek posługując się metodą opisaną w podrozdziale IV.2.

Uzyskane w wyniku analizy sekwencje nukleotydów umieszczono w **Tabeli 10**.

Na podstawie analizy wyników stwierdzono, że 19 z badanych szczepów *Bacillus* należy do kompleksu gatunków *B. subtilis*, a dziewięć z nich należy do operacyjnej grupy *B. amyloliquefaciens*, będącej częścią kompleksu gatunków *B. subtilis* (**Tabela 9**). Analizując dane dotyczące procentowego podobieństwa genetycznego badanych szczepów, stwierdzono, że najprawdopodobniej osiem z nich należy do gatunku *B. subtilis*, pięć do *B. amyloliquefaciens* oraz pięć do *B. velezensis*. Szczep Kol B3 z równym prawdopodobieństwem może należeć do gatunków *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* lub *B. methylotrophicus*. Szczep Kol Si4 najprawdopodobniej należy do gatunku *B. subtilis* lub *B. halotolerans*, natomiast szczep Zg 7.6 do gatunku *B. pumilus*.

Stwierdzono także, że szczep Zg 9.3 należy do rodzaju *Pseudomonas*, jednak na podstawie uzyskanych wyników nie możliwe było ustalenie przynależności do gatunku. Z kolei szczep ASK 10 zakwalifikowano do gatunku *P. koreensis* (GenBank: MZ707723.1), a szczep ASK 68 do gatunku *P. fluorescens*.

Tabela 9. Wyniki analizy genetycznej wybranych szczepów ryzosferowych.

Lp.	Nazwa szczepu	Startery wykorzystane do uzyskania sekwencji nukleotydów	Liczba nukleotydów w uzyskanej sekwencji	Wyznaczone podobieństwo genetyczne *
1.	Kol B1	27F/1492R	698	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. amyloliquefaciens</i>
2.	Kol B2	gyrA47F/gyrA1066R	568	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
3.	Kol B3	tufGPF/tufGPR	720	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. velezensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> lub <i>B. methylotrophicus</i>

4.	Kol B9	27F/1492R	527	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
5.	Kol D3	27F/1492R	560	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. amyloliquefaciens</i>
6.	Kol D4	27F/1492R	512	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
7.	Kol D8	27F/1492R	634	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. velezensis</i>
8.	Kol L2	purH70F/purH1013R	847	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
9.	Kol L6	27F/1492R	744	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. amyloliquefaciens</i>
10.	Kol L8	27F/1492R	572	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. amyloliquefaciens</i>
11.	Kol S1	27F/1492R	794	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
12.	Kol S2	gyrA47F/gyrA1066R	789	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
13.	Kol S8	27F/1492R	685	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
14.	Kol S10	27F/1492R	572	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. amyloliquefaciens</i>
15.	Kol Si4	27F/1492R	525	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i> lub <i>B. halotolerans</i>
16.	Kol Si6	gyrA47F/gyrA1066R	784	Grupa <i>B. subtilis</i> , najprawdopodobniej <i>B. subtilis</i>
17.	KAS 1.10	purH70F/purH1013R	797	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. velezensis</i>
18.	KAS 2.2	purH70F/purH1013R	839	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. velezensis</i>
19.	KAS 2.4	gyrA47F/gyrA1066R	917	Grupa <i>B. amyloliquefaciens</i> , najprawdopodobniej <i>B. velezensis</i>
20.	Zg 7.6	purH70F/purH1013R	782	<i>Bacillus</i> sp., najprawdopodobniej <i>B. pumilus</i>
21.	Zg 9.3	gyrB01F/gyrB02R	876	<i>Pseudomonas</i> sp.
22.	ASK 10	27F/1492R	1455	<i>P. koreensis</i>
23.	ASK 68	27F/1492R	1520	<i>P. fluorescens</i>

* Uzyskane sekwencje nukleotydów porównywano z danymi NCBI za pomocą narzędzia BLAST.

Tabela 10. Uzyskane sekwencje analizowanych izolatów bakteryjnych.

Kol B1
ACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAA GAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG CGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGG GAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG GTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGG TGGTGCATGGTTGTTTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA
Kol B2
AAAGAGAACCTGTCGTTATGCCTTCAAGGTTCCCGAATCTGCTCGTGAACGGTGCTGCCGG CATTGCGGTAGGTATGGCAACAAACATTCTCCGCACCAGCTGGGAGAAATCATTGACGGT GTACTTGCTGTCAGTGAGAATCCGGACATTACAATTCCAGAGCTTATGGAAGTCATTCCAGG ACCTGATTTCCCGACTGCGGGTCAAATCTTGGGACGCAGCGGTATCCGGAAAGCATACGAA TCAGGCCGAGGCTCTATCACGATCCGGGCAAAAAGCTGAGATCGAACAAACATCTTCGGGTA AAGAAAGAATTATCGTTACAGAGTTGCCTTACCAAGTAAATAAGGCGAAATTAATTGAGAAA ATTGCTGATCTCGTAAGGGACAAAAAGATAGAGGGTATCACAGATCTGCGTGATGAGTCAG ATCGTACAGGTATGAGAATTGTCATTGAAATCAGACGCGATGCCAATGCAAATGTCATCTTA AACAATCTGTACAAACAACTGCTCTACAAACATCTTTTGGCATCAACCTGCTTGCACTTGTT GATGGACAGCCGAA
Kol B3
TGATCACTGGTGCTGCGCAAATGGATGGAGCTATCCTTGATGATCTGCTGCTGATGGCCC AATGCCACAACTCGTGAGCACATCCTTCTTTCTAAAAACGTTGGTGTACCATACATCGTAG TATTCCTTAACAAATGCGACATGGTAGACGACGAAGAGCTTCTTGAGCTTGTTGAAATGGAA GTTTCGCGATCTTCTTAGCGAATACGACTTCCCTGGTGATGATGTACCAGTTGTTAAAGGTTT TGCTCTTAAAGCTCTTGAAGGCGATGCTGAGTACGAAGAAAAAATTCTTGAACCTATGGCTG CAGTTGATGAGTACATCCCAACTCCAGAACGCGACACTGAAAAACCATTCATGATGCCAGTT GAGGACGTATTCTCAATCACTGGTCTGTTGACAGTTGCTACTGGCCGTGTAGAACGCGGAC AAGTTAAAGTCCGTGACGAAGTTGAAATCATCGGTCTTCAAGAAGAAAACAGCAAAACAACT GTTACAGGTGTTGAAATGTTCCGTAAGCTTCTTGACTACGCTGAAGCTGGAGACAACATCG GTGCACTTCTTCGCGGTGTAGCTCGTGAAGATATCCAACGTGGACAAGTACTTGCTAAACC AGGTACAATCACTCCACACAGCAAAATCAAAGCTGAAGTTTACGTTCTTTCTAAAGAAGAGG GTGGACGTCACTCCATTCTTCTAACTACCGTCCTCAGT
Kol B9
AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCT CAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC TGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTTCGTGTCGTGAGAT
Kol D3
GGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAA GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAA

CACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGG
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG
GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGT
CGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCG

Kol D4

ATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAG
GCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACT
GGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA
GATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC
GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT
GCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGT
GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA

Kol D8

AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCA
ACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCT
ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTA

Kol L2

AAACGGTGTGGATGTGATCGGAATTTGGAAGTGACAGGCTTCCCTGAAATTATGGACGGC
CGGTTAAAAACCTTCACCCGAATATTCACGGCGGCCTTCTGGCGGTTCCGCGGCAATGAAG
AGCATATGGCGCAGATCAATGAACACGGGATTACGCCGATTGACCTCGTTGTCGTCAACCT
CTATCCATTTAAAGAAACGATTTCTAAGGAAGACGTCACATATGAAGAAGCGATCGAAAATA
TCGACATCGGCGGACCGGGCATGCTGCGTGCGGCATCAAAGAACCATCAGGATGTCACGG
TTATCGTCGATCCGGCCGATTACAGCCCAGTGCTAAATCAAATCAAAGAAGGAAGGACGCT
ATCTCTTCAGAAAAAACGCGAGCTCGCGGCAAAGGTATTCCGTCACTACTGCGGCATATGAT
GCACTGATCGCTGACTATCTGACAAATGTTGTGCGGTGAAAAAGAACCAGAGCAATTCAGTGT
GACATTTGAGAAAAACAATCGCTTCGCTATGGAGAAAAACCGCATCAGGAAGCAACTTTCT
ATCAAACAGCTCTTCTGTCAAAGGCTCCATTGCGCAAGCAGAACAGCTTCACGGAAAAAGA
GCTTTCTTACAACAACATTAAAGACGCGGATGCGGCAGTTCAAATCGTTCTGTAATTCAGT
AACCGGCTGCGGTTGCCGTGAAGCATATGAACCCGTGCGGCGTGGGAACAGGAAAAACGA
TCGCCGAAGCGTTTGACAGAGCGTTTGAAGCGGATAAAACATCTATCTTCGGCGGCATTAT
CGCGCTGAACCGTGAAGTGGACAAGGCAACTGCCGAAGCGCTTCACAACATT

Kol L6

AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
TAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAA
TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCA
ACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAAGTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCA
CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCT
ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTTCGGGGGCAGAGTG
ACAGGTGGTGCATGGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCCTTGATCT

Kol L8

TGAGTGATGAAGRTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAA
ATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGG
CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTG
GGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG
ATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCG
AAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGA

Kol S1

ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTG
TTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAA
AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
AATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCT
CAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGG
TGACAA

Kol S2

TTATSKTAATCCCGGGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAAGCCGGTTCACAGACGGA
TTTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGT
ATCGTCGGTGAAATTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGACTCAGCGGTTTACGAATCAA
TGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGACACGGCAACTT
CGGTTCCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAA
AATCGCAATGGAAATTCTGCGTGACATTACGAAAGACACGATTGACTATCAAGATAACTATG
ACGGTTCAGAAAGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGG
GGCTGCCGGTATTGCGGTGCGAATGGCGACAAACATTCCCCCGCATCAGCTTGGGGAAAGT
CATTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAA
TACATCCCGGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGTCAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGC
AAGGCATATGAATCCGGACGGGGATCAATCACGATCCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAGAG
ACTTCATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTCACGGAACTTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAG
ATTAATTGAAAAAATCGCGGATCTTGTCGGGACAAAAAATCGAAGGAATTACCGAT

Kol S8

TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCT
GATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCA
GAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACC
AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC
GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG
TTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCA
AGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT
CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGAC
GTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGA
TGTTGGGTTA

Kol S10

GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCA
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTGA
GTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGA
ACACCACTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
GAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
GGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGAAGCAACGCGA

Kol Si4

GGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAAT
TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTC
TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGG
AATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGCA
GAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGA

Kol Si6

ATGCAATGAGCGTTATCGTATCCCGGGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAAGCCGG
TTCACAGACGGATTTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAA
AAATCTGCCCCGTATCGTCGGTGAAGTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGACTCAGCGG
TTTACGAATCAATGGTCAGAATGGCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTTGACGGA
CACGGCAACTTCGGTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCG
AGAATGTCAAAAATCGCAATGGAAATTCGCGTGACATTACGAAAGACACGATTGACTATCA
AGATAACTATGACGGTTCAGAAAGAGAGCCTGCCGTGCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTG
CTCGTAAACGGGGCTGCCGGTATTGCGGTGCGAATGGCGACAAACATTCCCCCGCATCAG
CTTGGGGAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCCGTAAAGTGAAGTCTGAGATTACAAACCAGG
AGCTGATGGAATACATCCCGGGCCCGGATTTTCCGACTGCAGGTGAGATTTTGGGCCGGA
GCGGCATCCGCAAGGCATATGAATCCGGACGGGGATCAATCACGATCCGGGCTAAGGCTG
AAATCGAAGAGACTTCATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTCACGGAACCTTCCTATCAGGTG
AACAAAGCGAGATTAATTGAAAAAATCGCGGATCTTGTCGGGACAAAAAAT

KAS 1.10

AACTTCTTCAGGAAAACGGTGTGGATGTCATCGGCATTTTCAAGTGACCGGATTTCTGA
AATTATGGACGGACGGTTAAAAACACTCCATCCAAATATTCACGGCGGTCTGCTTGCCGTAA
GAGACAATAAAGAGCATATGGCGCAGATCAATGAACACGGCATTGCACCGATTGACCTTGT
GGTCGTCAACCTTTATCCGTTTAAAGAAACGATTTCAAAGAAGACGTAACATACGATGAAG
CGATAGAAAACATTGATATCGGCGGTCCCGGCATGCTGCGCGCCGCATCGAAAAACCATCA
GGATGTGACGGTCATCACAGATCCGGCCGATTACAGCTCCGTGCTCAATGAGATGAAAGAA
CACGGCGGCGTTTTGCTCAAAAGAAAACGCGAGCTTGCGGCCAAAGTATTCCGCCATACC
GCGGCATACGACGCATTAATCGCTGATTACTTAACACGCGAGGCCGGTGAGAAAGACCCTG
AGCAATTCATGTTACTTTTGAGAAAAAACAGTCTGCTCCGCTACGGTGAAAACCCTCACCAA
GAGGCGGTTTTCTACCAAAGCGCACTTCCTGTCTCCGGTTCCATCGCAGCGGCAAAACAGC
TTCACGGCAAAGAGCTTTCTTATAACAATATTAAGGACGCGGATGCGGCCGTTCAAATCGTC
CGGGAATTTACAGAACCCGCAGCTGTTGCCGTTAAACATATGAATCCATGCGGAGTCGGTA
CGGGAGCTTCAATTGAGGAAGCATTCAATAAAGCGTATGAAGCTGATAAACCTCCATTTT

KAS 2.2

AACAAAMMAACTTCTTCAGGAAAACGGTGTGGATGTCATCGGCATTTTCAAGTGACCGGA
TTTCTGAAATTATGGACGGACGGTTAAAAACACTCCATCCAAATATTCACGGCGGTCTGCT
TGCCGTAAAGAGACAATAAAGAGCATATGGCGCAGATCAATGAACACGGCATTGCACCGATT
GACCTTGTGGTCGTCAACCTTTATCCGTTTAAAGAAACGATTTCAAAGAAGACGTAACATA
CGATGAAGCGATAGAAAACATTGATATCGGCGGTCCCGGCATGCTGCGCGCCGCATCGAA
AAACCATCAGGATGTGACGGTCATCACAGATCCGGCCGATTACAGCTCCGTGCTCAATGAG
ATGAAAGAACACGGCGGCGTTTTGCTCAAAAGAAAACGCGAGCTTGCGGCCAAAGTATTCC
GCCATACCGCGGCATACGACGCATTAATCGCTGATTACTTAACACGCGAGGCCGGTGAGAA

AGACCCTGAGCAATTCAGTGTACTTTTGAGAAAAACAGTCGCTCCGCTACGGTGAAAACC
CTCACCAAGAGGCGGTTTTCTACCAAAGCGCACTTCCTGTCTCCGTTCCATCGCAGCGGC
AAAACAGCTTCACGGCAAAGAGCTTTCTTATAACAATATTAAGGACGCGGATGCGGCCGTT
CAAATCGTCCGGGAATTTACAGAACCCGCAGCTGTTGCCGTTAAACATATGAATCCATGCG
GAGTCGGTACGGGAGCTTCAATTGAGGAAGCATTCAATAAAGCGTATGAAGCTGATAAAAC
CTCCATTTTCGGCGGCATCATCGCGCTGAACCGTGAAGTTGATC

KAS 2.4

CGGGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGTCTGAAGCCGGTTCACAGACGGATTTTGTACGCA
ATGAATGATTTAGGCATGACCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCGGTGA
AGTTATCGGTAAGTACCACCCGCACGGTGAAGTCAAGTCAATGGTCAGAATG
GCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTGACGGACACGGCAACTTCGGTTCGGTTG
ACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAATGTCAAAAATCGCAATGG
AAATTCTGCGTGACATTACGAAAGACACGATTGACTATCAAGATAACTATGACGGTTCAGAA
AGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAGATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGGGCTGCCGGTA
TTGCCGTCCGAATGGCGACAAACATTCCCCCGCATCAGCTTGGGGAAGTCATTGAAGGCG
TGCTTGCCGTAAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACATCCCGGG
CCCGGATTTTCCGACTGCAGGTGAGATTTTGGGCCGGAGCGGCATCCGCAAGGCATATGA
ATCCGGACGGGGATCAATCACGATCCGGGCTAAGGCTGAAATCGAAGAGACTTCATCGGG
AAAAGAAAGAATTATTGTACGGAACCTCCTTATCAGGTGAACAAAGCGAGATTAATTGAAA
AAATCGCGGATCTTGTCCGGGACAAAAAATCGAAGGAATTACCGATCTGCGAGACGAATC
CGACCGTAACGGAATGAGAATCGTCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATGCTCACGTCATT
TTGAATAACCTGTACAAACAAACGGCCCTGCAGACGTCTTTCGGAATCAACCTGCTGGCGC
TCGT

Zg 7.6

ATTCCCAGAAATCATGGACGGACGACTCAAAACGCTTCACCCGAACATTCATGGTGGATTAT
TGGCAGTGAGAGAAAACGATGAGCATATGGCACAGATTGAAAAGCATGGCATTTCAGCCGAT
TGATCTTGTGTCGTGAATCTCTATCCTTTCAAAGAGACGATCTCAAAGACGATGTAACGT
ATGAAGAAGCAATTGAAAACATTGATATTGGCGGACCGGGAATGCTTCGTGCGGCATCGAA
AAACCACCAAGACGTCACAGTGATTGTGATCCTCGTGATTATGATACAGTCGTTTCAGCAAA
TCAAAGAAGGCGGCGTGTCACTTGAGAAAAACGTGAGCTTGCGGCGAAGGTATTCCGTCA
TACAGCTGCTTACGATGCCCTCATTGCAGATTATTTAACGAACCTTGTGCGGAAACAGAGC
CAGAGCAGTTTCACCGTCACGTTTGAGAAAAACAATCCCTTCGCTATGGAGAAAACCCGCA
CCAAGCGGCGACTTTCTATGAAAATGCTCTTCCAAGCAAAGGCTCTTTGGCAACAGCTACA
CAGTTACATGGAAAAGAGCTTTCTACAACAATATTAAGATGCAGATGCAGCTCTTCAAATT
GTACGTGAATTTACGGAGCCAGCGGCTGTAGCTGTAAAACATATGAACCCATGCGGCGTTG
GTACAGGAGAAACGATTGCAGAAGCGTTTGATCGTGCTTCAAAGCAGATGAAACCTCTATT
TTTGGCGGCATTGTGGCGCTGAACCGTGAAGTAGACAAGCAAA

Zg 9.3

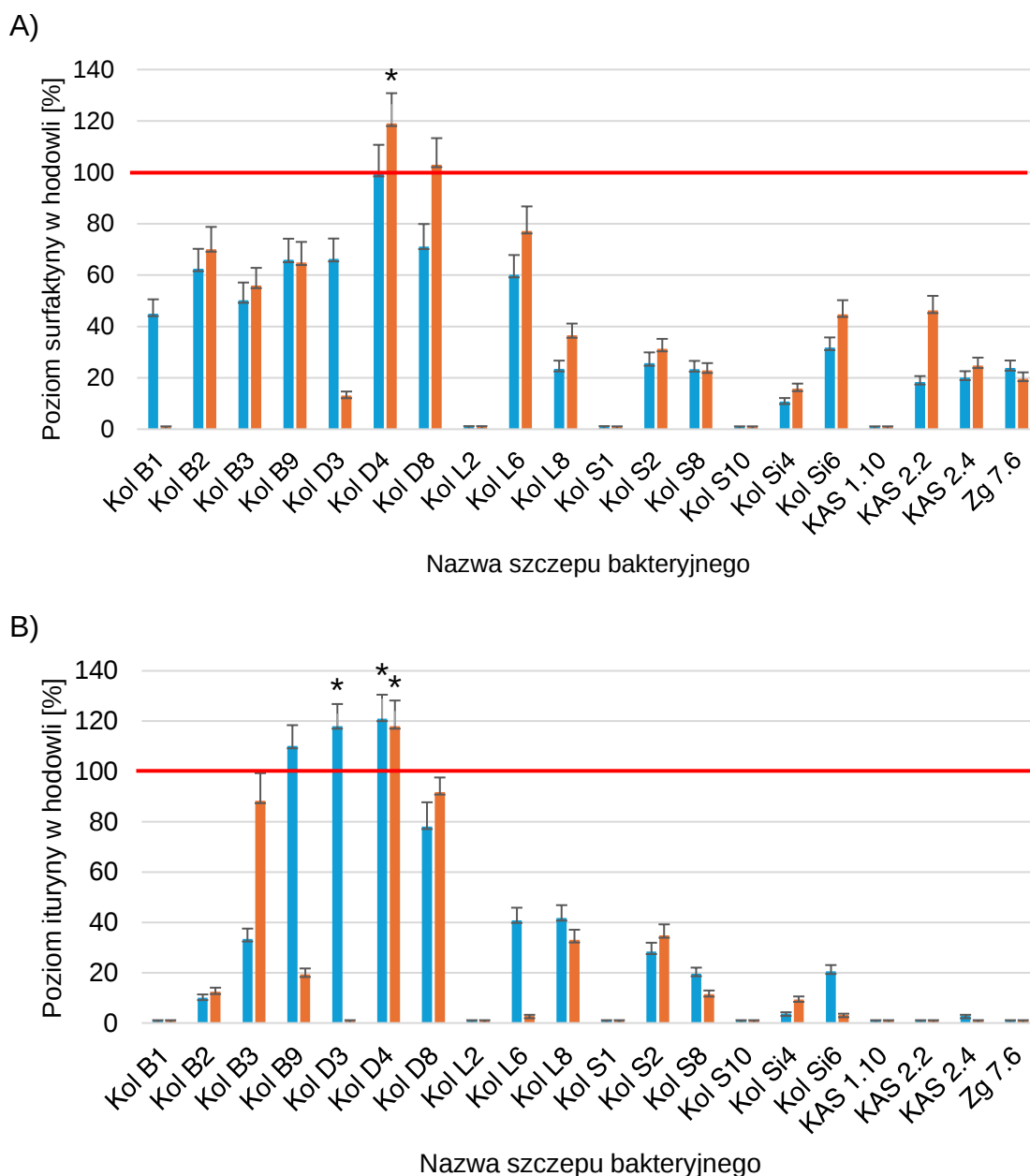
GGTGTTGGTGTTCGGTAGTGAACGCGCTGTCCGAAGAACTGGTACTGACCGTTCGCCGC
AGCGGCAAGATCTGGGAACAGACCTACGTCCACGGCGTGCTCAGGCACCGATGGCCATC
GTTGGCGACAGCGAAACCACCGGCACCCAGATTCACTTCAAGCCATCGGCTGACACCTTCA
AGAATATTCATTCAGCTGGGACATCCTGGCCAAGCGTATTTCGTGAGCTGTCCTTCCTCAAC
TCCGGTGTGCGCATCGTCCTCAAGGATGAGCGCAGCGCAAGGAAGAGCTGTTCAAGTAC
GAAGGCGGCCTGCGTGCGTTTCGTTGAATACCTGAACACCAACAAGACTGCGGTCAATCAG
GTGTTCCACTTCAACATTCAGCGTGAAGACGGCATCGGCGTGGAATCGCCCTGCATGGAA
ATGACAGCTTCAACGAGAACCTGTTGTGCTTACCAACAACATTCCACAGCGCGACGGCGG
CACTCACCTGGTGGGCTTCCGTTCCGCACTGACGCGTAACCTGAACACCTACATCGAAGCC
GAAGGCCTGGCGAAGAAGCACAAAGTCGCCACCACCGGTGACGATGCCCGTGAAGGCCT
GACCGCGATCATTTCCGGTGAAGTGCCGGATCCGAAGTTCAGCTCGCAGACCAAAGACAA
GCTGGTCTCTTCCGAAGTGAAGACCGCGGTGCAACAGGAAATGGGCAAGTACTTCTCCGA
CTTCTCTGGAACCCGAACGAAGCCAAGCTGGTCGTCGGCAAGATGATCGACGCTGC
CCGTGCCCCGTGAAGCCGCGCGTAAAGCCCGTGAGATGACCCGCCGCAAGGCGCGCTGG
ACATCGCCGGTCTGCCAGGCAAGCTCGCTGAC

V.5. Ocena produkcji cLP-Bc w płynnych hodowlach bakteryjno-grzybowych

Dla wybranych w poprzednich etapach badań 20 szczepów *Bacillus* (**Tabela 8**, **Tabela 9**) wykonano analizę produkcji surfaktyny i ituryny w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Hodowle prowadzono według metody opisanej w podrozdziale IV.3.4. W celu izolacji i analizy cLP-Bc z płynów pohodowlanych stosowano metodę ekstrakcji QuEChERS (IV.5.2) oraz technikę LC–MS/MS (IV.5.3).

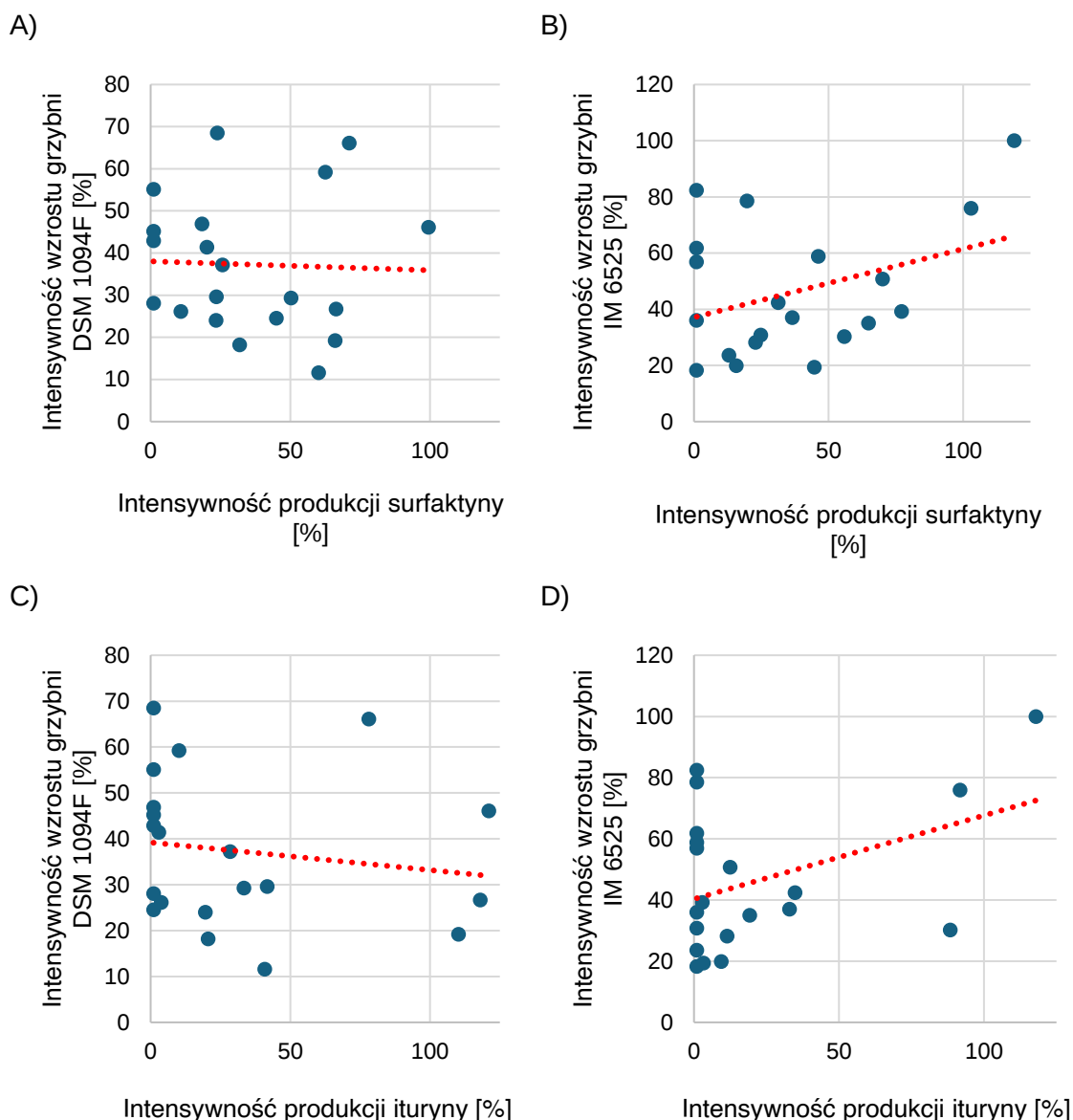
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w większości hodowli obecność grzybni powoduje znaczący (> 50%) spadek poziomu izolowanych biosurfaktantów (**Rycina 13**). W obrębie ocenianych 20 szczepów, tylko w hodowlach szczepu *Bacillus* sp. Kol D3 oraz *Bacillus* sp. Kol D4 wyznaczono wzrost poziomu przynajmniej jednego biosurfaktanta pod wpływem obecności przynajmniej jednego ocenianego szczepu z rodzaju *Fusarium*.

Stwierdzono, że w żadnej hodowli *Bacillus* zawierającej strzępki *F. culmorum* DSM 1094 obecność grzybni nie zwiększa poziomu izolowanej surfaktyny. Jedynie w hodowli szczepu Kol D4 poziom surfaktyny był porównywalny do poziomu wyznaczonego dla kontroli (monokultury bakteryjnej). W hodowlach mieszanych szczepów Kol D3 i Kol D4, prowadzonych w obecności grzybni szczepu *F. culmorum* DSM 1094, zaobserwowano wyższą zawartość ituryny w porównaniu do kontroli bez dodatku grzybni. W przypadku hodowli mieszanych z drugą badaną grzybną – *F. sambucinum* IM 6525 – zwiększoną zawartość surfaktyny i ituryny odnotowano tylko w hodowlach szczepu *Bacillus* sp. Kol D4.



Rycina 13. Poziom A) surfaktyny i B) ituryny wyznaczony w 72-godz. hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych zawierających grzybnie *F. culmorum* DSM 1094 (dane oznaczone kolorem niebieskim – ■) lub zawierających grzybnie *F. sambucinum* IM 6525 (dane oznaczone kolorem pomarańczowym – ■). Czerwoną linią oznaczono poziom produkcji biosurfaktanta w hodowlach kontrolnych (prowadzonych w nieobecności grzybni) przyjęty za 100%. Symbolem gwiazdki (*) oznaczono wyniki analizy produkcji cLP-Bc znacząco ($p < 0,05$) wyższe od poziomu wyznaczonego w układach kontrolnych.

Wykonano analizę korelacji pomiędzy poziomem surfaktyny i ituryny wyznaczanym w hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej a intensywnością wzrostu badanych grzybn *Fusarium*. Stwierdzono słabą dodatnią korelację (0,36) pomiędzy poziomem surfaktyny wyznaczanym w hodowlach mieszanych zawierających grzybnę *F. sambucinum* IM 6525 a wzrostem grzybn (**Rycina 14B**). Podobną, nieznacznie wyższą zależność (0,41), stwierdzono analizując poziom ituryny w tych samych hodowlach (**Rycina 14D**).



Rycina 14. Korelacja pomiędzy poziomem surfaktyny (A,B) lub ituryny (C,D) w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych a intensywnością wzrostu grzybn *F. culmorum* DSM 1094 (A,C) lub *F. sambucinum* IM 6525 (B,D).

V.6. Ocena wzrostu, produkcji biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej bakterii *Bacillus* i *Pseudomonas* w obecności zanieczyszczeń antropogenicznych

Wśród zanieczyszczeń antropogenicznych wykorzystanych do badań opisanych w tej części pracy znalazły się barwniki azowe, syntetyczne pestycydy oraz MP (III.3).

Do badań z użyciem barwników wybrano szczepy wyizolowane z ryzosfery pobranej ze środowisk o potencjalnie wysokim zanieczyszczeniu antropogenicznym (Składowisko Odpadów Niebezpiecznych w Zgierzu oraz Aleja Klonów Srebrzystych). Z kolei do badań z użyciem MP i syntetycznych pestycydów wybrano bakterie wyizolowane ze środowisk wiejskich i leśnych, charakteryzujące się wysoką aktywnością przeciwgrzybową i zróżnicowanym profilem produkcji cLP.

V.6.1. Barwniki azowe

A) Ocena poziomu dekoloryzacji barwników azowych przez bakterie *Bacillus* i *Pseudomonas* oraz wpływu barwników na wzrost bakterii i aktywność powierzchniową płynów pohodowlanych

Badaniu z użyciem barwników azowych poddano siedem szczepów *Bacillus* (Zg 1.3, Zg 1.4, Zg 3.3, Zg 3.8, Zg 7.6, Zg 8.6, Zg 8.8) oraz trzy szczepy *Pseudomonas* (Zg 9.3, ASK 10 i ASK 68). W pierwszym etapie oceniano wpływ pięciu barwników azowych (AB113, RB5, AMR, RO16 oraz SY) na wzrost bakterii (na podstawie wartości OD; IV.4.1) oraz na aktywność powierzchniową wydzielanych biosurfaktantów (na podstawie wyników testu DCT; IV.5.1). Wyznaczono także poziom dekoloryzacji powyższych barwników w hodowlach bakteryjnych (IV.8). Hodowle prowadzono zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.3.1.

Nie stwierdzono znaczącego zahamowania wzrostu bakterii w obecności badanych barwników azowych użytych w stężeniu 50 mg L^{-1} (**Tabela 11**). Wykazano, że barwnik AB113 był najsilniej dekoloryzowany przez wszystkie oceniane szczepy bakteryjne. Z kolei w hodowlach z dodatkiem barwnika SY wyznaczono najniższy poziom dekoloryzacji. Ustalono, że wszystkie badane szczepy były zdolne do bioakumulacji / biosorpcji barwnika AB113, co objawiało się zabarwieniem biomasy bakteryjnej. Zjawiska tego nie zaobserwowano w przypadku pozostałych barwników. Ponadto, w hodowlach z barwnikiem AB113 aktywność powierzchniowa płynów pohodowlanych była niższa niż w próbach kontrolnych (bez dodatku barwnika).

W hodowlach z dodatkiem barwników AMR i RO16 odnotowano wzrost aktywności powierzchniowej płynów pohodowlanych w porównaniu do kontroli biotycznej, z wyjątkiem czterech z dziesięciu badanych szczepów: *Bacillus* sp. Zg 3.7, *Bacillus* sp. Zg 7.6,

P. koreensis ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68. Zaobserwowano również korelację (0,59) pomiędzy wzrostem dekoloryzacji barwnika a spadkiem aktywności powierzchniowej płynów pochodzących (Rycina 15).

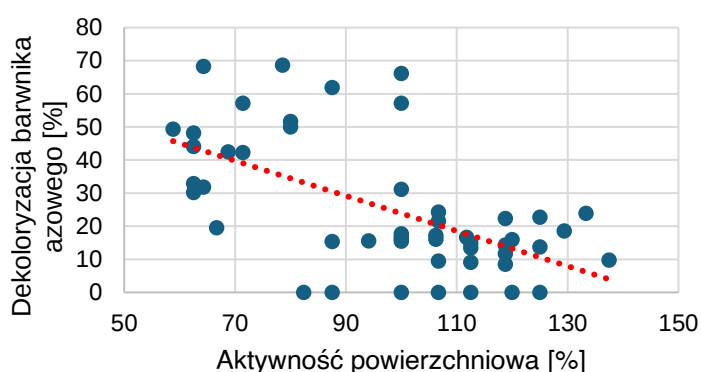
Najwyższą zdolność dekoloryzacji wykazały szczepy *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68, dlatego zostały one wybrane do dalszych badań. Niemniej jednak w powyższych hodowlach obecność każdego barwnika azowego powodowała spadek aktywności powierzchniowej płynów pochodzących, co wskazuje na ograniczenie produkcji lub aktywności wydzielanych surfaktantów.

Tabela 11. Intensywność wzrostu bakterii w obecności barwników azowych, poziom dekoloryzacji dodawanego do hodowli barwnika oraz aktywność powierzchniowa biosurfaktantów oceniana testem DCT w 72-godz. hodowlach prowadzonych w warunkach wytrząsania (120 obr./min). Wyjściowe stężenie barwnika w hodowli wynosiło 50 mg L⁻¹. Procent dekoloryzacji obliczono na podstawie absorbancji płynów pochodzących w odniesieniu do wyników uzyskanych dla kontroli abiotycznej (przyjętych za 100%).

Szczep	Barwnik azowy	Intensywność wzrostu bakterii [%]	Dekoloryzacja [%]	DCT * [mm] w hodowli	
				bez barwnika	z barwnikiem
<i>Bacillus</i> sp. Zg 1.3	AB113	92,9 ± 9,2	44,1 ± 6,9		5,0
	RB5	101,1 ± 8,0	16,1 ± 5,2		8,5
	AMR	112,9 ± 8,9	13,4 ± 4,6	8,0	9,0
	RO16	100,2 ± 9,2	9,1 ± 5,9		9,0
	SY	112,7 ± 8,6	0,0 ± 0,0		7,0
<i>Bacillus</i> sp. Zg 1.4	AB113	109,1 ± 10,9	49,3 ± 5,4		5,0
	RB5	113,5 ± 10,2	15,6 ± 3,9		8,0
	AMR	106,7 ± 9,2	18,6 ± 4,8	8,5	11,0
	RO16	101,1 ± 9,1	16,6 ± 5,9		9,5
	SY	93,4 ± 11,3	0,0 ± 0,0		7,0
<i>Bacillus</i> sp. Zg 3.7	AB113	96,5 ± 11,4	48,2 ± 6,8		5,0
	RB5	98,2 ± 9,3	15,8 ± 3,9		8,0
	AMR	109,0 ± 10,7	17,7 ± 4,5	8,0	8,0
	RO16	103,7 ± 11,5	16,7 ± 4,9		8,0
	SY	93,3 ± 9,6	0,0 ± 0,0		10,0
<i>Bacillus</i> sp. Zg 3.8	AB113	104,3 ± 9,3	30,2 ± 5,2		5,0
	RB5	106, ± 10,2	14,9 ± 4,2		9,0
	AMR	95,0 ± 11,7	8,5 ± 4,2	8,0	9,5
	RO16	98,1 ± 11,2	11,7 ± 3,9		9,5
	SY	99,1 ± 10,1	0,0 ± 0,0		8,0
<i>Bacillus</i> sp. Zg 7.6	AB113	110,4 ± 9,9	51,6 ± 7,9		6,0
	RB5	92,3 ± 9,3	21,6 ± 6,3	7,5	8,0
	AMR	114,0 ± 11,3	19,5 ± 5,2		5,0
	RO16	102,8 ± 10,8	9,5 ± 2,9		8,0

	SY	98,9 ± 11,4	0,0 ± 0,0	8,0
<i>Bacillus</i> sp. Zg 8.6	AB113	101,4 ± 9,2	42,5 ± 4,3	5,5
	RB5	101,4 ± 9,8	17,2 ± 2,9	8,5
	AMR	97,9 ± 10,2	22,7 ± 3,8	8,0
	RO16	102,9 ± 7,4	13,7 ± 3,7	10,0
	SY	113,1 ± 10,3	9,8 ± 2,1	11,0
<i>Bacillus</i> sp. Zg 8.8	AB113	114,1 ± 10,4	32,9 ± 5,7	5,0
	RB5	112,2 ± 11,3	16,1 ± 2,1	8,0
	AMR	103,3 ± 9,8	22,3 ± 1,9	8,0
	RO16	105,4 ± 9,0	14,3 ± 2,3	9,5
	SY	105,2 ± 10,2	0,0 ± 0,0	9,0
<i>Pseudomonas</i> sp. Zg 9.3	AB113	117,4 ± 9,7	50,0 ± 7,1	6,0
	RB5	111,5 ± 10,3	24,3 ± 5,9	8,0
	AMR	116,7 ± 9,5	23,9 ± 4,7	7,5
	RO16	99,2 ± 7,7	16,0 ± 3,1	9,0
	SY	95,0 ± 11,4	0,0 ± 0,0	9,0
<i>P. koreensis</i> ASK 10	AB113	90,3 ± 16,3	68,7 ± 9,9	5,0
	RB5	141,5 ± 12,8	68,3 ± 10,1	5,0
	AMR	113,8 ± 10,9	57,2 ± 7,9	7,0
	RO16	90,5 ± 10,2	42,3 ± 5,9	5,0
	SY	107,7 ± 13,2	31,8 ± 2,9	5,0
<i>P. fluorescens</i> ASK 68	AB113	123,1 ± 19,2	66,1 ± 8,0	8,0
	RB5	138,0 ± 21,2	57,2 ± 6,2	8,0
	AMR	108,4 ± 13,2	61,9 ± 7,0	8,0
	RO16	115,9 ± 10,9	31,1 ± 2,9	7,0
	SY	102,4 ± 9,8	15,4 ± 1,3	8,0

* Wynik DCT dla kontroli abiotycznej wynosił to 3 mm. Dla wszystkich prób badanych odchylenie standardowe wynosiło 1,5 mm.

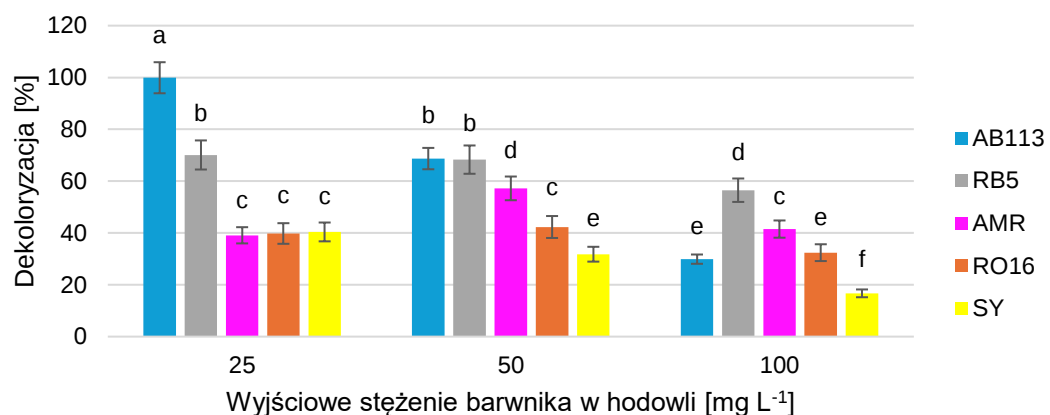


Rycina 15. Korelacja pomiędzy intensywnością dekoloryzacji barwnika azowego w hodowli bakteryjnej a aktywnością powierzchniową płynu pohodowlanego wyznaczoną w procentach (gdzie za 100% przyjęto wynik uzyskany dla płynów pohodowlanych pochodzących z hodowli bakteryjnych prowadzonych w nieobecności barwników).

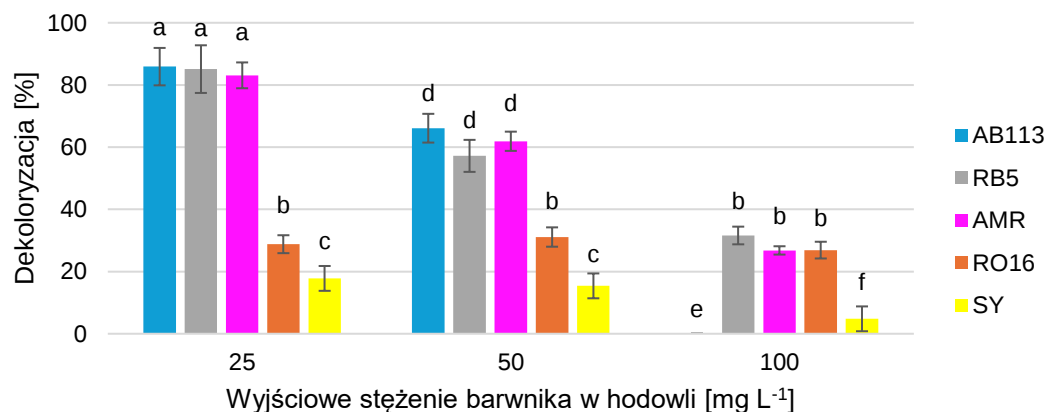
B) Ocena wpływu stężenia barwnika azowego na poziom dekoloryzacji przez szczepy *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68

Następnie oceniono wpływ początkowego stężenia barwnika w hodowli (25, 50 lub 100 mg L⁻¹) na efektywność dekoloryzacji przez szczepy *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68. Wykazano, że wzrost wyjściowego stężenia barwnika AB113 w hodowli szczepu ASK 10 powodował obniżenie poziomu dekoloryzacji (**Rycina 16A**). Natomiast w przypadku barwników RB5, RO16 i SY, zastosowane stężenia początkowe nie miały istotnego wpływu na skuteczność dekoloryzacji. Najwyższą efektywność (około 60%) dla barwnika AMR uzyskano przy stężeniu 50 mg L⁻¹.

A)



B)



Rycina 16. Wpływ wyjściowego stężenia barwnika azowego na poziom dekoloryzacji wyznaczony w 72-godz. hodowlach szczepów A) *P. koreensis* ASK 10 oraz B) *P. fluorescens* ASK 68. Kontrolę abiotyczną (przyjętą za 100%) stanowił wynik uzyskany dla roztworu barwnika azowego w podłożu LB. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łąńskiego. Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Porównanie wyników dla szczepów ASK 10 i ASK 68 wykazało podobną zależność pomiędzy poziomem dekoloryzacji a początkowym stężeniem barwnika w przypadku barwników AB113, RO16 i SY (**Rycina 16B**). W odróżnieniu od szczepu ASK 10, w przypadku szczepu ASK 68 odnotowano stopniowy spadek dekoloryzacji barwnika RB5 przy wzrastającym stężeniu oraz znaczne obniżenie dekoloryzacji barwnika AMR przy stężeniu 100 mg L⁻¹.

C) Ocena wpływu warunków wytrząsania na efektywność dekoloryzacji barwników azowych przez bakterie *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68

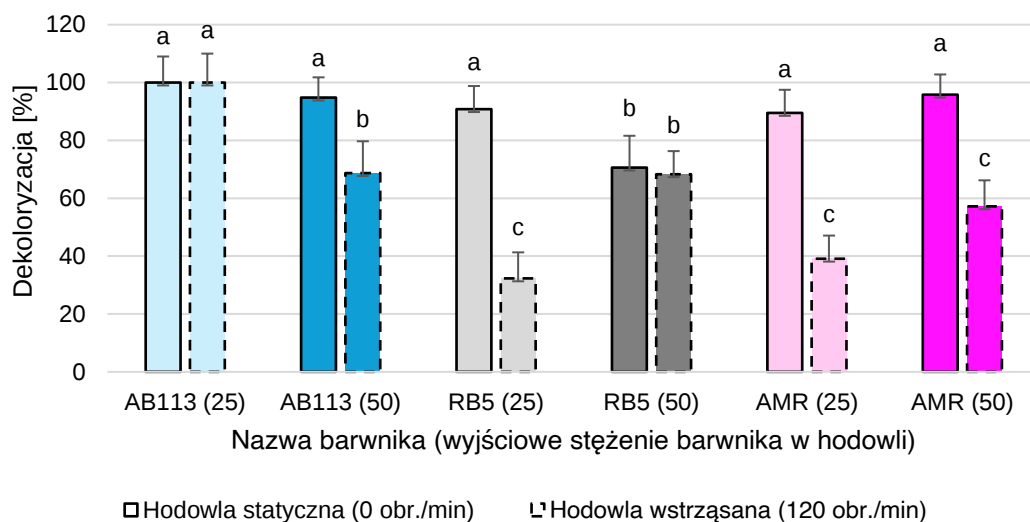
Przeprowadzono analizę wpływu warunków wytrząsania hodowli na efektywność dekoloryzacji trzech barwników azowych: AB113, RB5 oraz AMR, stosowanych w stężeniach początkowych 25 i 50 mg L⁻¹. Stwierdzono, że oba szczepy, *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68, hodowane w warunkach statycznych (0 obr./min), efektywnie dekoloryzują barwnik **AB113** (na poziomie 93,3 ± 7,6%) (**Rycina 17**). W przypadku hodowli bakteryjnych zawierających AB113 w stężeniu 50 mg L⁻¹, wytrząsanie hodowli (120 obr./min) nieznacznie obniżyło poziom dekoloryzacji tego barwnika.

W przypadku barwnika **RB5** dodawanego do hodowli szczepu ASK 10 w stężeniu 25 mg L⁻¹, warunki wytrząsane znacząco zmniejszały poziom dekoloryzacji, podczas gdy dla wyższego stężenia RB5 oraz w hodowlach szczepu ASK 68 z tym barwnikiem nie odnotowano podobnych efektów.

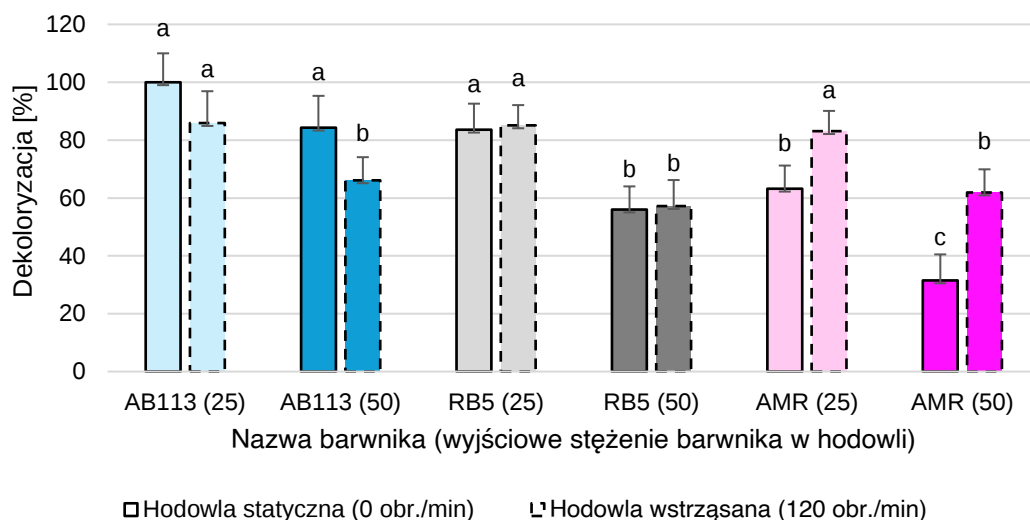
Warunki wytrząsania miały także istotny, ale odmienny wpływ na dekoloryzację barwnika **AMR**. Szczep ASK 10 wykazywał wyższą efektywność dekoloryzacji AMR w warunkach statycznych, niezależnie od początkowego stężenia barwnika. Natomiast szczep ASK 68 silniej dekoloryzował AMR w warunkach wytrząsanych (120 obr./min), gdzie dostępność tlenu była większa.

Stwierdzono, że efektywność dekoloryzacji barwników azowych zależy zarówno od zdolności metabolicznych szczepów, jak i od dostępności tlenu. Otrzymane wyniki sugerują, że zastosowane w badaniu szczepy *Pseudomonas* prawdopodobnie mają odmienne mechanizmy dekoloryzacji, zależne od dostępności tlenu.

A)



B)



Rycina 17. Wpływ warunków hodowli i stężenia barwnika azowego na **poziom dekoloryzacji** wyznaczany w 72-godz. hodowlach A) *P. koreensis* ASK 10 oraz B) *P. fluorescens* ASK 68. Liczbami 25 i 50 zaznaczono wyjściowe stężenie barwnika w hodowli wynoszące odpowiednio 25 oraz 50 mg L⁻¹. Kolorami oznaczono barwniki: niebieskim – AB113; szarym – RB5; różowym – AMR. Kontrolę (przyjętą za 100%) stanowił wynik uzyskany dla roztworu barwnika azowego w podłożu LB. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łąńskiego. Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

D) Aktywność AzoR produkowanej przez bakterie *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68 w obecności barwników azowych

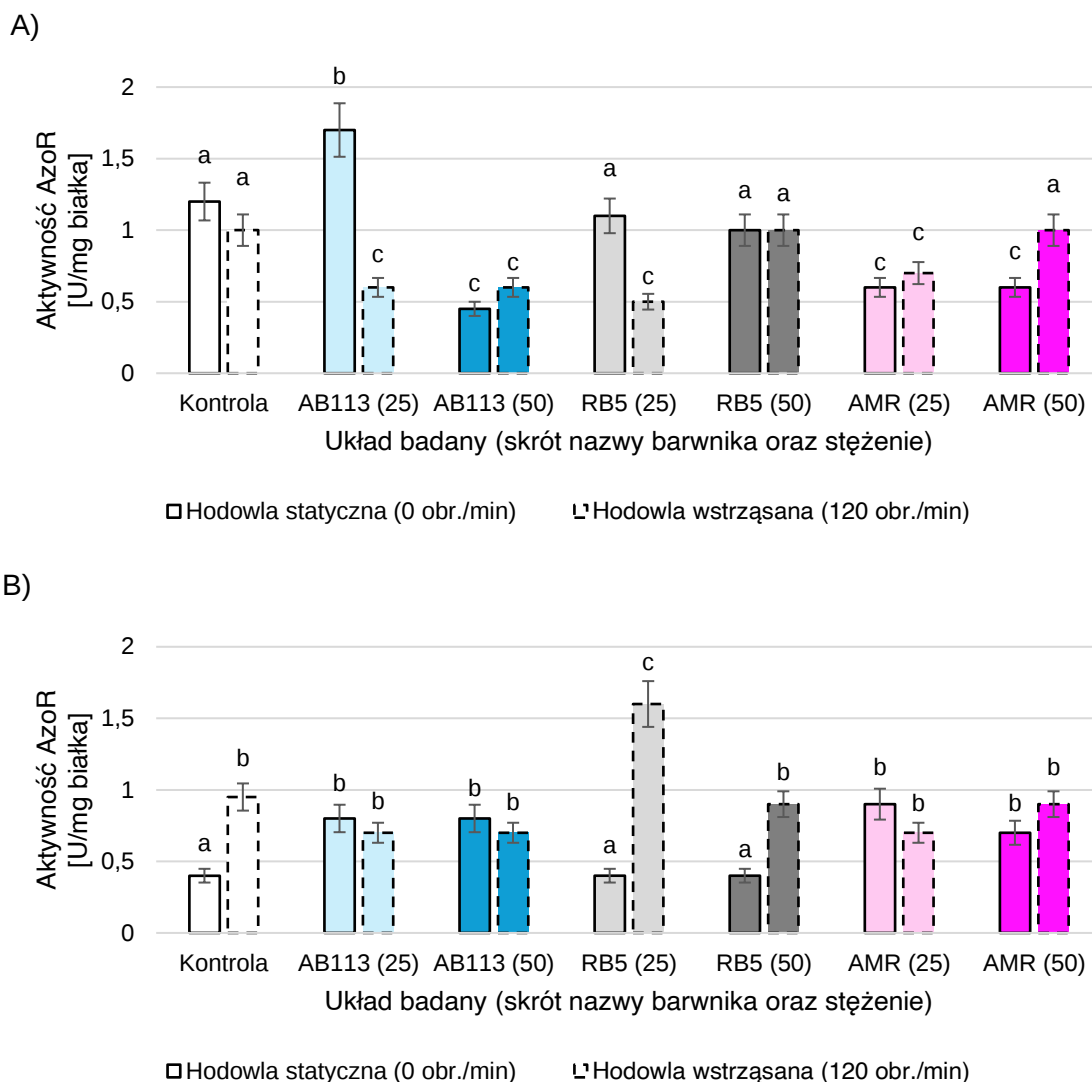
W kolejnym etapie zbadano aktywność enzymatyczną wewnątrzkomórkowej AzoR, produkowanej przez bakterie szczepów *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68 w obecności barwników azowych. Hodowle przygotowano zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.3.1, a analizę aktywności AzoR przeprowadzono według procedury opisanej w podrozdziale IV.9. Wykorzystana do analizy biomasa bakteryjna pochodziła z hodowli prowadzonych zarówno w warunkach statycznych, jak i wytrząsanych. W tej części badań ponownie wykorzystano trzy barwniki azowe (AB113, RB5, AMR) w stężeniach początkowych 25 lub 50 mg L⁻¹.

Stwierdzono, że oba badane szczepy *Pseudomonas* są zdolne do produkcji AzoR (**Rycina 18**), jednak wpływ dodatku barwników oraz warunków wytrząsania na aktywność tego enzymu jest zróżnicowany. W hodowlach kontrolnych (bez barwników) szczepu ASK 10 nie zaobserwowano wpływu wytrząsania na aktywność AzoR, natomiast dla szczepu ASK 68 wytrząsanie znacząco zwiększało aktywność ocenianego enzymu w porównaniu do warunków statycznych.

Porównano aktywność AzoR w hodowlach statycznych i wytrząsanych zawierających poszczególne barwniki azowe. W przypadku hodowli szczepu *P. koreensis* **ASK 10** stwierdzono wzrost aktywności AzoR w hodowlach statycznych w porównaniu do hodowli wytrząsanych zawierających barwnik AB113 lub barwnik RB5 (użyte w stężeniu 25 mg L⁻¹) oraz w hodowli wytrząsanej w porównaniu do statycznej zawierającej barwnik AMR (użyty w stężeniu 50 mg L⁻¹). W przypadku hodowli szczepu *P. fluorescens* **ASK 68** stwierdzono wzrost aktywności AzoR w hodowlach wytrząsanych w porównaniu do statycznych zawierających barwnik RB5 (w obu zastosowanych w badaniu stężeniach). W pozostałych układach badanych aktywność AzoR w hodowli statycznej i wytrząsanej była porównywalna.

Uzyskane wyniki dotyczące aktywności AzoR porównano również z poziomem dekoloryzacji barwników w poszczególnych układach badanych. Zależność pomiędzy wyższym poziomem dekoloryzacji barwnika a wyższym poziomem aktywności AzoR stwierdzono jedynie w przypadku hodowli szczepu ASK 10 prowadzonej w obecności barwnika RB5 w stężeniu 25 mg L⁻¹.

Uzyskane wyniki sugerują, że szczepy *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68 różnią się między sobą mechanizmami dekoloryzacji barwników azowych, co może wynikać z ich odmiennych zdolności enzymatycznych i odpowiedzi na warunki hodowli.

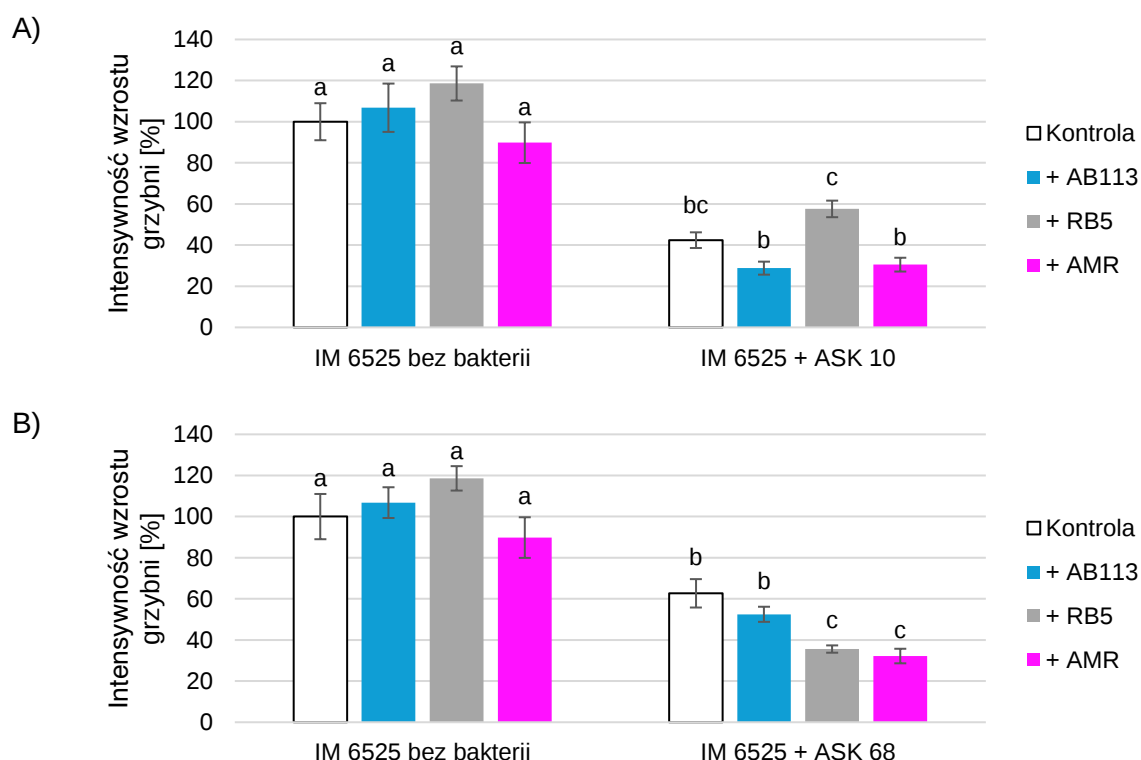


Rycina 18. Aktywność enzymu AzoR produkowanego przez bakterie A) *P. koreensis* ASK 10 i B) *P. fluorescens* ASK 68 w 72-godz. hodowlach płynnych prowadzonych w obecności barwników azowych (użytych w dwóch stężeniach wyjściowych: 25 oraz 50 mg L⁻¹) w warunkach statycznych lub wstrząsanych (0 lub 120 obr./min). Kolorami oznaczono barwniki: niebieskim – AB113, szarym – RB5, różowym – AMR. Dane wyrażono w jednostce U (definiowanej jako ilość enzymu potrzebną do redukcji 1 μmol barwnika RB5 przez 1 min) w przeliczeniu na mg białka. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

E) Ocena wpływu barwników azowych na aktywność przeciwgrzybową bakterii *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68 wobec *F. sambucinum* IM 6525

Oceniono aktywność przeciwgrzybową szczepów *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68 wobec grzybni *F. sambucinum* IM 6525 w obecności barwników azowych. W tym celu przygotowano 72-godz. wytrząsane hodowle bakteryjno-grzybowe (IV.3.4) z dodatkiem barwnika azowego (w stężeniu wyjściowym 50 mg L⁻¹) oraz hodowle kontrolne (bez dodatku barwnika i/lub bez dodatku bakterii) (IV.3.3). Aktywność przeciwgrzybową oceniono na podstawie suchej biomasy grzybni (IV.6.2).

Stwierdzono, że zastosowane w badaniu barwniki azowe nie mają istotnego wpływu na wzrost grzybni *F. sambucinum* IM 6525 (**Rycina 19**). Szczepy ASK 10 i ASK 68 ograniczały rozwój grzybni odpowiednio do 42% i 63%. Obecność barwników nie wpływała istotnie na aktywność przeciwgrzybową szczepu ASK 10, ale w przypadku hodowli mieszanej zawierającej bakterie szczepu ASK 68 dodatek barwników RB5 i AMR dodatkowo ograniczał wzrost grzybni do około 35% w porównaniu do hodowli bez barwnika (63%).

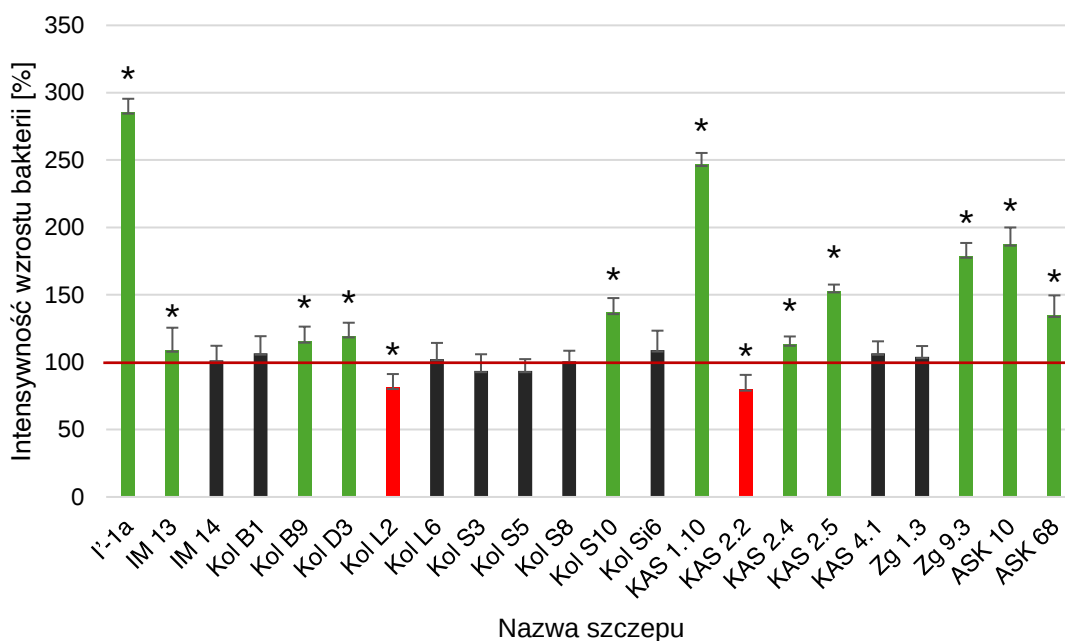


Rycina 19. Wpływ barwników azowych (stężenie barwnika w hodowli 50 mg L⁻¹) na aktywność przeciwgrzybową szczepów A) *P. koreensis* ASK 10 i B) *P. fluorescens* ASK 68 wobec *F. sambucinum* IM 6525. Kontrolę (przyjętą za 100%) stanowiła intensywność wzrostu grzybni w nieobecności bakterii i barwników. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

V.6.2. Mikroplastik

W kolejnym etapie badań przeanalizowano wpływ MP na wzrost wybranych szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas* oraz na poziom surfaktyny i ituryny produkowanych przez szczepy *Bacillus*. W badaniu użyto 23 szczepy bakteryjne (20 szczepów *Bacillus* i trzy szczepy *Pseudomonas*). Hodowle prowadzono zgodnie z opisem podanym w podrozdziale IV.3.1, intensywność wzrostu bakterii oceniano na podstawie wartości OD (IV.4.1), natomiast ekstrakcję i analizę chromatograficzną biosurfaktantów wykonywano według metod opisanych w podrozdziałach IV.5.2 oraz IV.5.3.

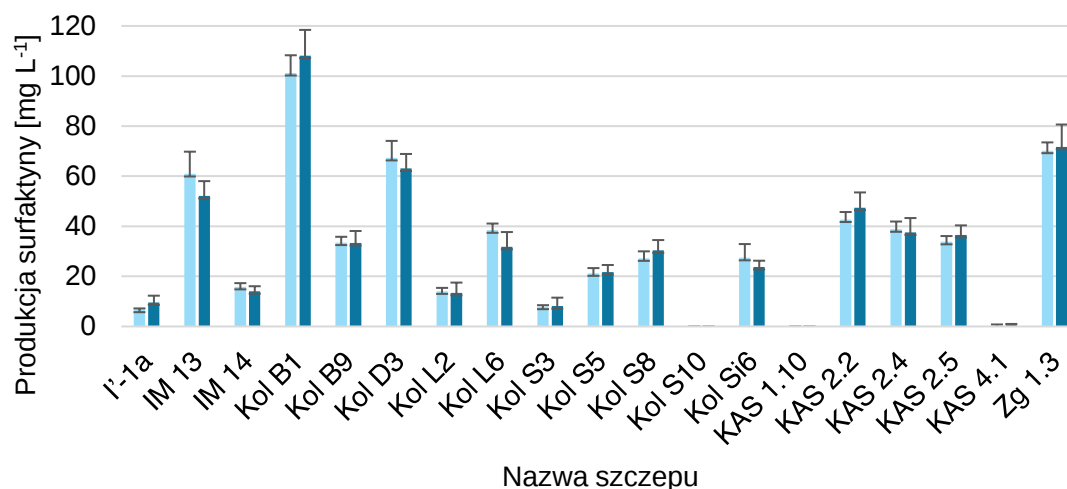
Stwierdzono, że dodatek MP do hodowli istotnie wpływa na intensywność wzrostu 13 spośród 23 badanych szczepów bakterii (**Rycina 20**). Jedynie dla szczepów Kol L2 i KAS 2.2 odnotowano statystycznie istotne zahamowanie wzrostu w obecności MP. Natomiast w przypadku pozostałych 11 szczepów, największy wzrost OD odnotowano dla szczepów I'-1a i KAS 1.10, które osiągnęły odpowiednio 285,5% i 246,6% w porównaniu do kontroli (100%). Wyniki te sugerują, że MP może znacząco wpływać na intensywność wzrostu bakterii w hodowlach płynnych.



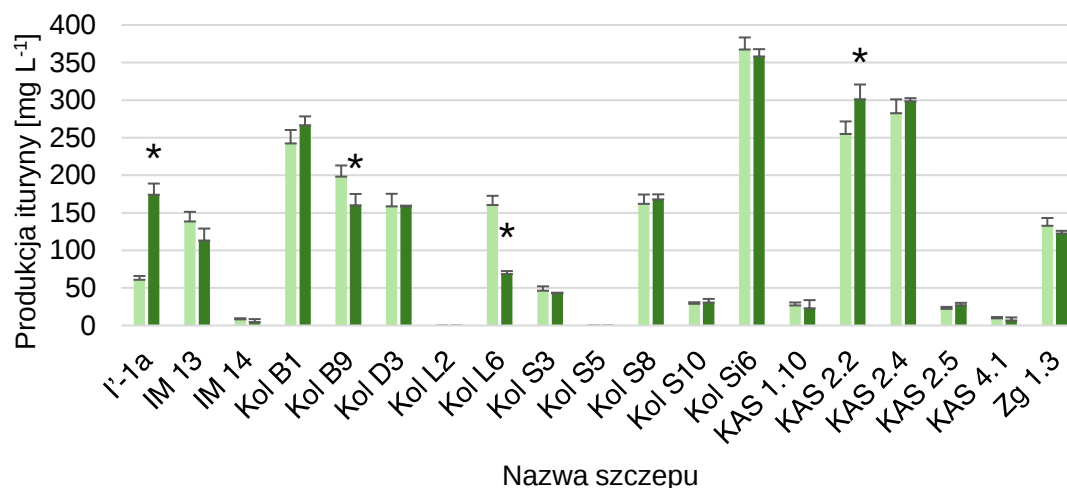
Rycina 20. Intensywność wzrostu bakterii w obecności MP po 72 godz. hodowli w podłożu LB. Czerwoną linią oznaczono poziom 100% przyjęty dla hodowli kontrolnych (hodowli bakteryjnych bez dodatku MP). Symbolem gwiazdki (*) oznaczono wyniki różne statystycznie od danych kontrolnych ($p < 0,05$). Wyniki statystycznie wyższe lub niższe od kontroli oznaczono odpowiednio na zielono lub czerwono.

Następnie oceniono wpływ dodatku MP do hodowli na produkcję surfaktyny i ituryny przez bakterie *Bacillus*. Większość szczepów wykorzystana w badaniu była zdolna do jednoczesnej produkcji obu powyższych związków. Wyjątek stanowiły trzy szczepy niewytwarzające surfaktyny (Kol S10, KAS 1.10, KAS 4.1) oraz dwa nieprodukujące ituryny (Kol L2, Kol S5) (**Tabela 5**). W żadnym z układów badanych nie stwierdzono znaczącego wpływu MP na produkcję surfaktyny (**Rycina 21A**). Natomiast w przypadku ituryny, takie różnice wyznaczono w próbach czterech szczepów (**Rycina 21B**). Dodatek MP pozytywnie wpłynął na produkcję ituryny przez bakterie I'-1a i KAS 2.2, natomiast zmniejszył poziom wydzielania tego związku przez bakterie szczepów Kol B9 i Kol L6.

A)



B)

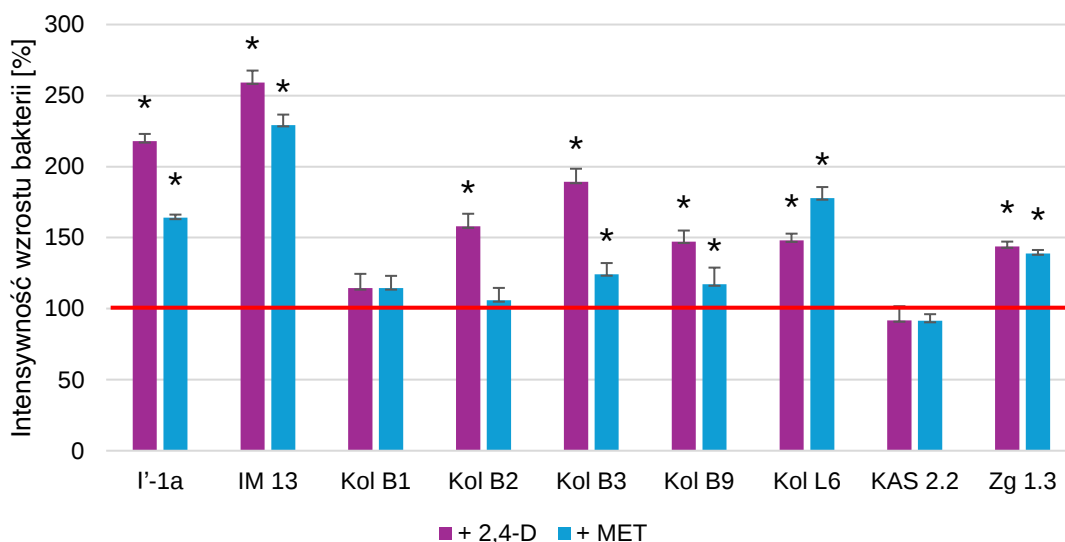


Rycina 21. Produkcja A) surfaktyny i B) ituryny przez bakterie ryzosferowe z rodzaju *Bacillus* w obecności MP po 72 godz. hodowli. Symbolem gwiazdki (*) oznaczono wynik różniący się istotnie od kontroli (hodowli bakteryjnej bez dodatku MP) przy $p < 0,05$. Jaśniejszym odcieniem oznaczono wyniki uzyskane dla hodowli kontrolnych, natomiast ciemniejszym – wyniki uzyskane dla hodowli zawierających MP.

V.6.3. Herbicydy

W pierwszym etapie tej części pracy stosowano dziewięć szczepów z rodzaju *Bacillus*. Oceniono wpływ herbicydów 2,4-D oraz MET na intensywność wzrostu bakterii (na podstawie gęstości optycznej hodowli, IV.4.1), produkcję surfaktyny i ituryny (IV.5.2; IV.5.3) oraz zdolność bakterii do degradacji użytych w badaniu herbicydów (IV.7). Po uzyskaniu wyników wstępnych badaną grupę bakterii ograniczono do czterech szczepów *Bacillus*. W drugiej części badań oceniono wpływ herbicydów na aktywność przeciwgrzybową badanych szczepów bakteryjnych wobec *F. culmorum* DSM 1094 lub *F. sambucinum* IM 6525 (IV.6.2) oraz na produkcję surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych (IV.5.2 oraz IV.5.3).

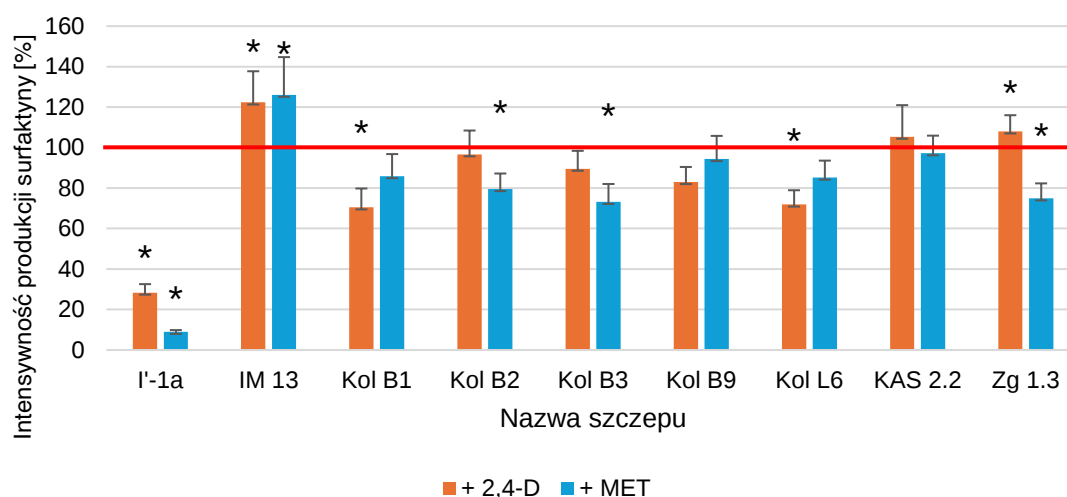
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zróżnicowany wpływ herbicydów na wzrost bakterii z rodzaju *Bacillus* (**Rycina 22**). Obecność 2,4-D znacząco zwiększała intensywność wzrostu siedmiu szczepów bakteryjnych (oznaczonych symbolami I'-1a, IM 13, Kol B2, Kol B3, Kol B9, Kol L6 oraz Zg 1.3), przy czym największy wzrost (wynoszący odpowiednio 259, 218 oraz 190% w porównaniu do hodowli kontrolnych przyjętych dla 100%) wyznaczono dla szczepu IM 13, I'-1a i Kol B3. Z kolei obecność MET znacząco zwiększyła intensywność wzrostu sześciu szczepów bakterii (I'-1a, IM 13, Kol B3, Kol B9, Kol L6, Zg 1.3). Największy wzrost stwierdzono w hodowlach szczepów IM 13, Kol L6 oraz I'-1a (wynoszący odpowiednio 230, 178 oraz 164%).



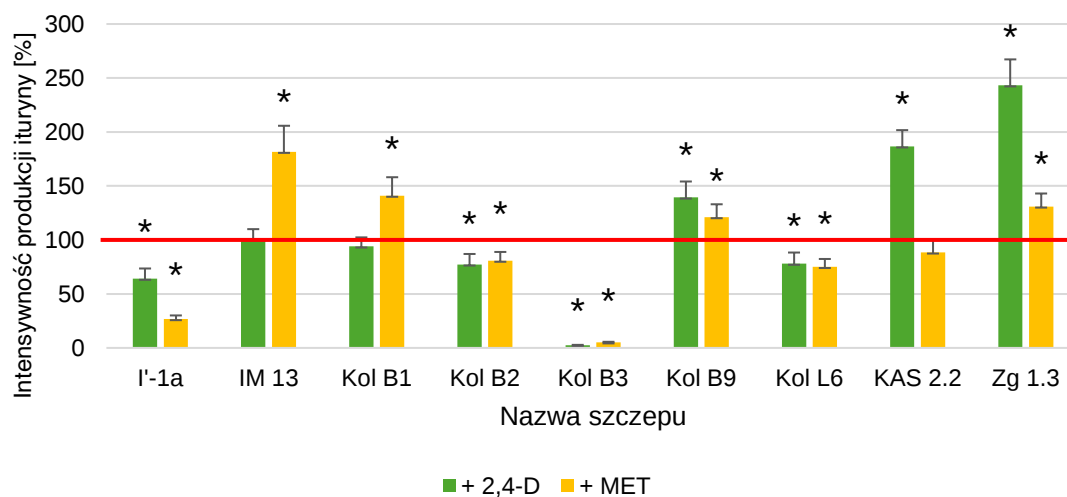
Rycina 22. Intensywność wzrostu bakterii *Bacillus* w obecności 2,4-D lub MET (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę (wynik uzyskany dla hodowli bakteryjnej bez dodatku herbicydów; przyjęty za 100%) oznaczono poziomą linią. Symbolem gwiazdki (*) oznaczono próby różne statystycznie od kontroli ($p < 0,05$).

Analiza przeprowadzona techniką LC–MS/MS wykazała zróżnicowany wpływ herbicydów na produkcję cLP-Bc przez bakterie (**Rycina 23**). Największe ograniczenie produkcji surfaktyny, zarówno w obecności 2,4-D jak i MET (odpowiednio do 28 i 9%), wyznaczono w hodowlach szczepu I'-1a. Stwierdzono, że oba stosowane w pracy herbicydy znacząco (o ok 25%) zwiększają produkcję surfaktyny w hodowli szczepu *B. subtilis* IM 13. W hodowlach pozostałych szczepów intensywność produkcji surfaktyny w obecności 2,4-D oraz MET mieściła się odpowiednio w przedziałach 70-108 oraz 73-97%.

A)



B)



Rycina 23. Intensywność produkcji A) surfaktyny i B) ituryny przez bakterie *Bacillus* w obecności 2,4-D lub MET (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę (wynik uzyskany dla hodowli bakteryjnej bez dodatku herbicydów; przyjęty za 100%) oznaczona poziomą linią. Symbolem gwiazdki (*) oznaczono wynik różniący się istotnie statystycznie od kontroli ($p < 0,05$).

Produkcja ituryiny została najsilniej ograniczona w hodowli szczepu I'-1a oraz Kol B3 zarówno w obecności 2,4-D jak i MET. Z kolei największy wzrost produkcji ituryiny wyznaczono w hodowlach szczepów KAS 2.2 i Zg 1.3 w obecności 2,4-D oraz IM 13 i Kol B2 w obecności MET. Uzyskane wyniki wskazują, że herbicydy obecne w środowisku wzrostu bakterii mogą modulować produkcję biosurfaktantów, a tym samym wpływać na aktywność przeciwgrzybową bakterii.

Wyniki badań nad zdolnością bakterii *Bacillus* do degradacji herbicydów 2,4-D i MET zamieszczono w **Tabela 12**. Stwierdzono, że badane szczepy różnią się zdolnością do degradacji herbicydów. Szczep Kol L6 degradował oba herbicydy na najwyższym poziomie (kolejno 46,8 oraz 52,6% dla 2,4-D i MET), natomiast szczep Kol B2 na najniższym (0,0 oraz 2,1%).

Tabela 12. Degradacja herbicydów 2,4-D oraz MET (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹) przez szczepy *Bacillus* po 72 godz. prowadzenia hodowli w podłożu płynnym LB. Stężenie wyjściowe herbicydów wynosiło 50 mg L⁻¹. Kontrolę (przyjętą za 100%) stanowiły wyniki uzyskane dla roztworów herbicydów w podłożu LB.

Lp.	Szczep <i>Bacillus</i>	Poziom degradacji [%]	
		2,4-D	MET
1.	I'-1a	5,4 ± 1,1	40,9 ± 5,2
2.	IM 13	27,3 ± 2,9	27,4 ± 3,3
3.	Kol B1	30,0 ± 3,3	26,6 ± 5,8
4.	Kol B2	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,4
5.	Kol B3	0,0 ± 0,0	38,5 ± 4,9
6.	Kol B9	37,5 ± 4,1	36,9 ± 4,4
7.	Kol L6	46,8 ± 5,0	52,6 ± 6,0
8.	KAS 2.2	40,6 ± 3,9	14,1 ± 1,9
9.	Zg 1.3	43,8 ± 4,5	8,1 ± 1,3

Do dalszych etapów badań (mających na celu ocenę wpływu herbicydów na aktywność przeciwgrzybową bakterii *Bacillus* oraz na produkcję surfaktyny i ituryny) wybrano cztery szczepy *Bacillus*: Kol B2, Kol B3, Kol B9 oraz Kol L6. Szczepy wybrano tak, aby w tej grupie znalazły się bakterie różniące się zdolnością do degradacji badanych herbicydów, wykazywaną aktywnością przeciwgrzybową i wykazywanym wpływem na wzrost korzeni ogórka siewnego (**Tabela 8, Tabela 12**).

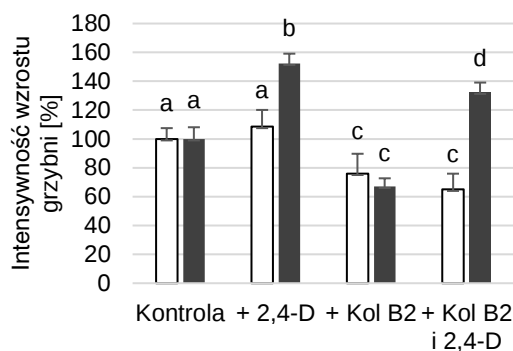
Najpierw oceniono wpływ 2,4-D oraz MET na intensywność wzrostu grzybni szczepów *F. culmorum* DSM 1049 i *F. sambucinum* IM 6525 hodowanych w monokulturach. Stwierdzono, że dodatek herbicydów do hodowli powyższych grzybów nie wpływa na intensywność wzrostu grzybni DSM 1094, ale stymuluje wzrost grzybni IM 6525 (**Rycina 24**).

Następnie oceniono wpływ herbicydów na aktywność przeciwgrzybową czterech szczepów z rodzaju *Bacillus*. Stwierdzono, że herbicydy 2,4-D i MET nie zwiększają aktywności przeciwgrzybowej bakterii wobec badanych szczepów *Fusarium*. Wręcz przeciwnie, w kilku przypadkach obecność herbicydów ograniczała aktywność przeciwgrzybową szczepów *Bacillus*.

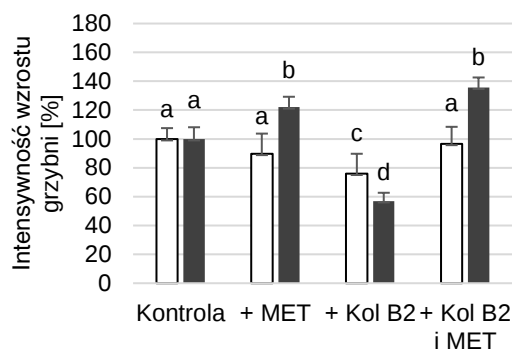
Stwierdzono, że obecność 2,4-D w hodowlach mieszanych zawierających grzybnię IM 6525 oraz bakterie Kol B2 lub Kol B3 niweluje aktywność przeciwgrzybową bakterii. Natomiast obecność MET w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych wpływa negatywnie na aktywność przeciwgrzybową powyższych szczepów bakteryjnych wobec obu badanych szczepów grzybowych.

Stwierdzono, że bakterie szczepów Kol B9 oraz Kol L6 utrzymują silną aktywność przeciwgrzybową niezależnie od zastosowanego szczepu *Fusarium* lub dodanego do hodowli herbicydu.

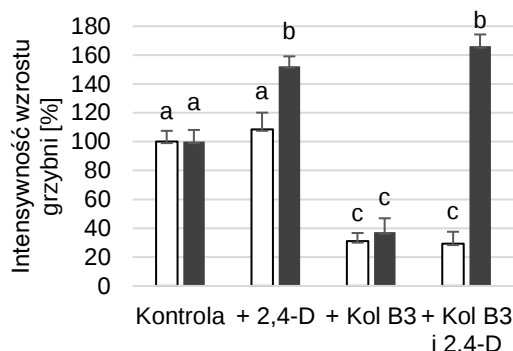
A) *Bacillus* sp. Kol B2 oraz 2,4-D



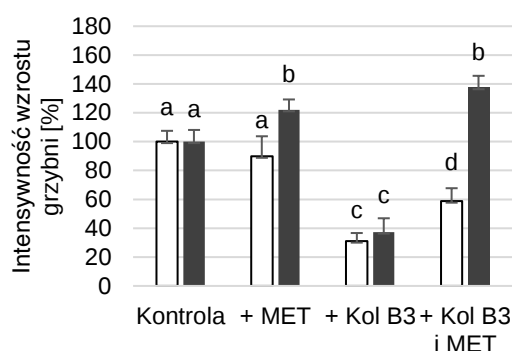
B) *Bacillus* sp. Kol B2 oraz MET



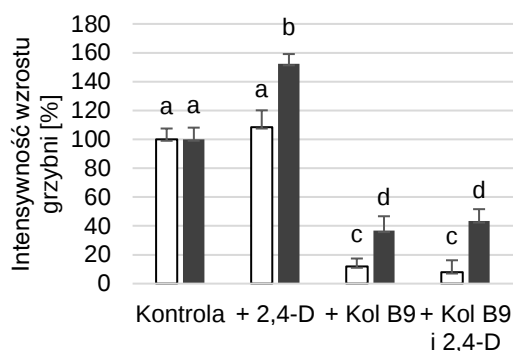
C) *Bacillus* sp. Kol B3 oraz 2,4-D



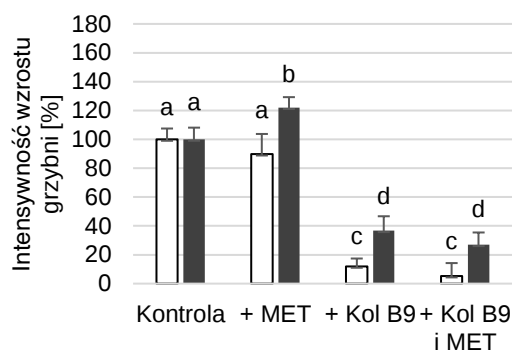
D) *Bacillus* sp. Kol B3 oraz MET



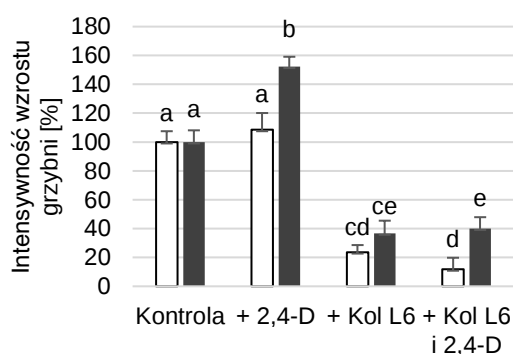
E) *Bacillus* sp. Kol B9 oraz 2,4-D



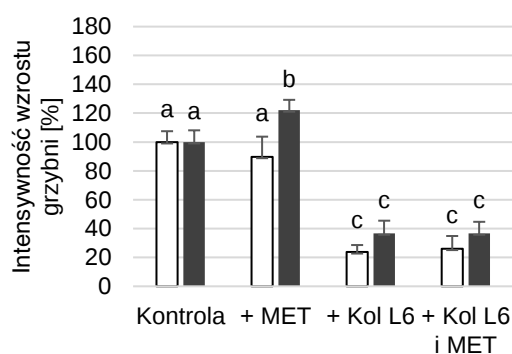
F) *Bacillus* sp. Kol B9 oraz MET



G) *Bacillus* sp. Kol L6 oraz 2,4-D



H) *Bacillus* sp. Kol L6 oraz MET



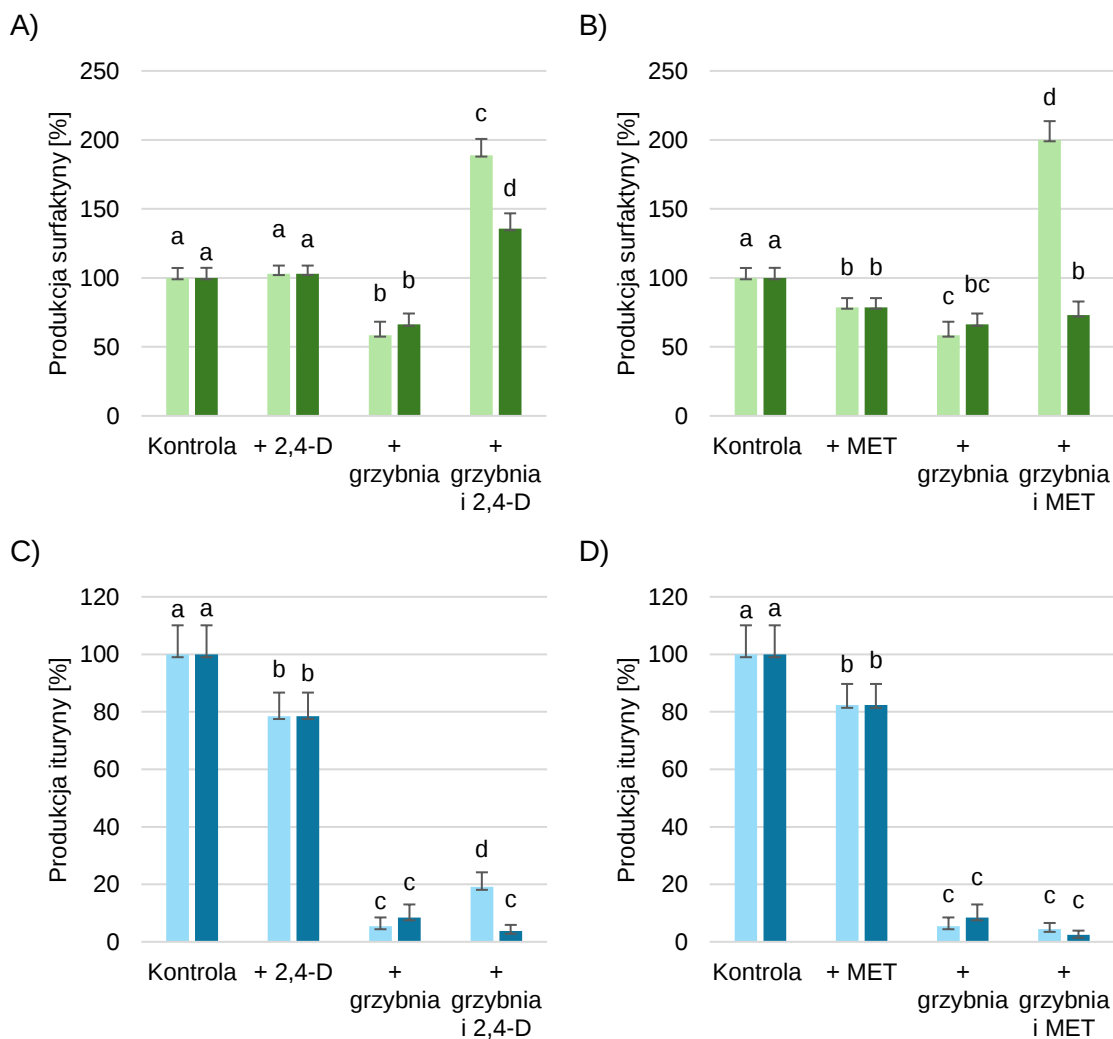
Rycina 24. Intensywność wzrostu grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (oznaczona kolorem białym) oraz *F. sambucinum* IM 6525 (oznaczona kolorem czarnym) w obecności bakterii Kol B2 (A,B), Kol B3 (C,D), Kol B9 (E,F) lub Kol L6 (G,H) w połączeniu z 2,4-D (A,C,E,G) lub MET (B,D,F,H) (użytymi w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki otrzymane dla monokultury grzybni hodowanej w nieobecności bakterii i herbicydów.

Następnie zbadano wpływ 2,4-D i MET na produkcję surfaktyny i ituryny przez badane szczepy *Bacillus*.

Stwierdzono, że w monokulturze szczepu *Bacillus* sp. Kol B2 dodatek 2,4-D nie wpływa na produkcję surfaktyny, natomiast zmniejsza produkcję ituryny o około 20% (**Rycina 25A,C**). Ustalono, że obecność MET w hodowli ogranicza o ok. 20% zarówno produkcję surfaktyny, jak i ituryny (**Rycina 25B,D**).

Oceniono wpływ herbicydów na produkcję surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych (bakteryjno-grzybowych), zawierających bakterie Kol B2 oraz grzybnię DSM 1094 lub IM 6525. Obecność 2,4-D w obu hodowlach mieszanych znacząco zwiększała poziom surfaktyny w porównaniu zarówno do monokultur bakteryjnych jak i hodowli mieszanych niezawierających 2,4-D (**Rycina 25A**). Jednocześnie, nie stwierdzono istotnego wpływu 2,4-D na produkcję ituryny w hodowlach mieszanych (**Rycina 25C**).

W przypadku MET wyznaczono wyraźny wzrost produkcji surfaktyny w hodowli mieszanej zawierającej bakterie Kol B2 oraz grzybnię DSM 1094 w porównaniu do zarówno monokultury bakteryjnej jak i hodowli mieszanej do których nie dodano MET (**Rycina 25B**). Natomiast w hodowli mieszanej z grzybnią IM 6525 taki efekt nie wystąpił. Dodatkowo, stwierdzono, że MET nie wpływa na produkcję ituryny w hodowlach mieszanych (**Rycina 25D**).

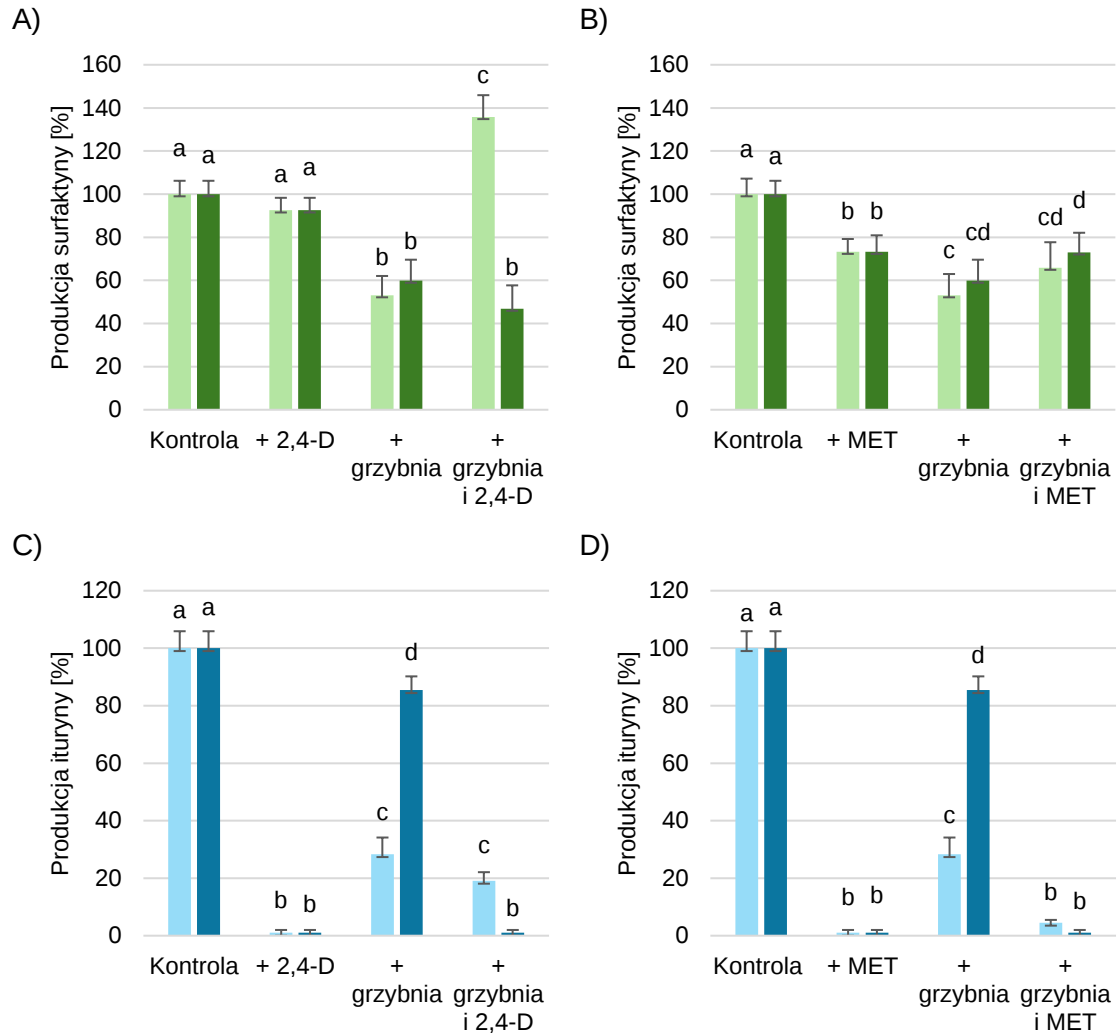


Rycina 25. Intensywność produkcji **surfaktyny** (A,B) i **ituryny** (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. **K01 B2** w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz herbicydów 2,4-D (A,C) lub MET (B,D) (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku herbicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Oceniono wpływ herbicydów 2,4-D i MET na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu *Bacillus* sp. Kol B3. Stwierdzono, że 2,4-D nie wpływa na produkcję surfaktyny przez bakterie tego szczepu, natomiast niemal całkowicie hamuje wydzielanie ituryny (**Rycina 26A,C**). Z kolei MET zmniejsza produkcję surfaktyny o 26,7% i, podobnie jak 2,4-D, niemal całkowicie ogranicza wydzielanie ituryny w monokulturze (**Rycina 26B,D**).

Stwierdzono, że obecność 2,4-D w hodowli mieszanej zawierającej grzybnię szczepu DSM 1094 powoduje znaczny wzrost poziomu surfaktyny (**Rycina 26A**). Nie wyznaczono pozytywnego wpływu 2,4-D na produkcję surfaktyny w hodowli mieszanej zawierającej grzybnię IM 6525. Nie stwierdzono także wzrostu poziomu izolowanej ituryny z hodowli mieszanych bakteryjno-grzybowych prowadzonych w obecności 2,4-D (**Rycina 26A,C**).

Ustalono, że obecność MET w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych nie wpływa znacząco na produkcję surfaktyny, a podobnie jak w monokulturze *Bacillus* sp. Kol B3 z dodatkiem MET, niemal całkowicie hamuje produkcję ituryny (**Rycina 26B,D**).



Rycina 26. Intensywność produkcji surfaktyny (A,B) i ituryny (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. **Koi B3** w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz herbicydów 2,4-D (A,C) lub MET (B,D) (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku herbicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

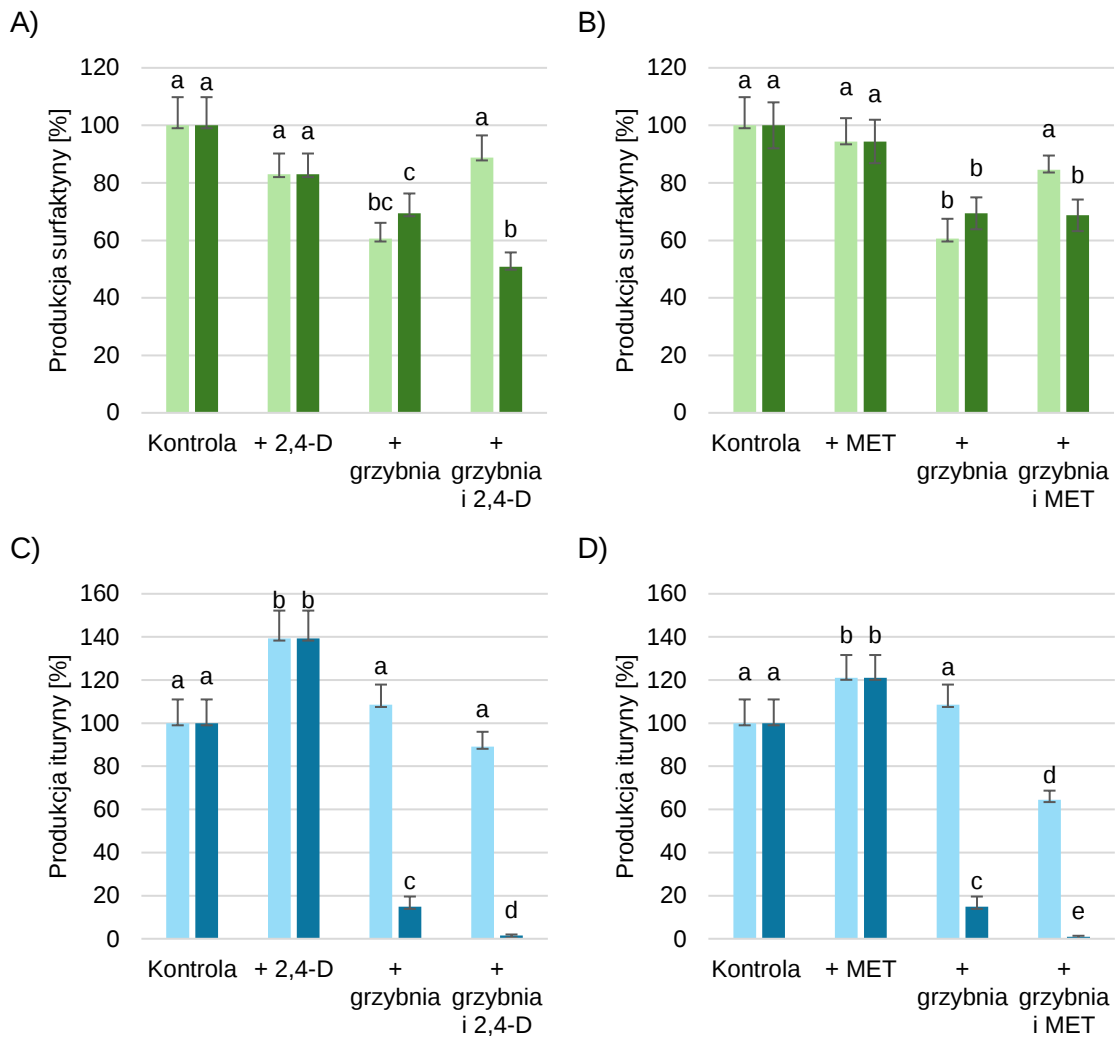
Następnie zbadano wpływ herbicydów na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu *Bacillus* sp. Kol B9. Stwierdzono, że oba herbicydy nie wpływają na produkcję surfaktyny, natomiast stymulują wydzielanie ituryny. 2,4-D i MET zwiększyły poziom ituryny odpowiednio do 140% i 120% (**Rycina 27**).

Oceniono również wpływ powyższych herbicydów na produkcję surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych. Obecność 2,4-D wykazywała zróżnicowany wpływ na poziom badanych biosurfaktantów, w zależności od obecnego w hodowli szczepu grzybni. Stwierdzono:

- 1) wzrost poziomu surfaktyny w hodowli mieszanej z grzybnią DSM 1094 do poziomu porównywalnego z monokulturą *Bacillus* sp. Kol B9 (**Rycina 27A**);
- 2) brak wpływu na produkcję ituryny w tej samej hodowli (**Rycina 27C**);
- 3) obniżenie poziomu surfaktyny i ituryny w hodowli mieszanej z grzybnią IM 6525 (**Rycina 27A**).

W przypadku MET również zaobserwowano, że wpływ tego związku na produkcję lipopeptydów jest zależny od użytego szczepu grzybni. Stwierdzono:

- 1) wzrost poziomu surfaktyny w hodowli mieszanej z grzybnią DSM 1094 do poziomu porównywalnego z monokulturą *Bacillus* sp. Kol B9 (**Rycina 27B**);
- 2) brak wpływu na produkcję surfaktyny w hodowli mieszanej z grzybnią IM 6525 (**Rycina 27B**) oraz
- 3) spadek produkcji ituryny w obu badanych hodowlach mieszanych (**Rycina 27D**).

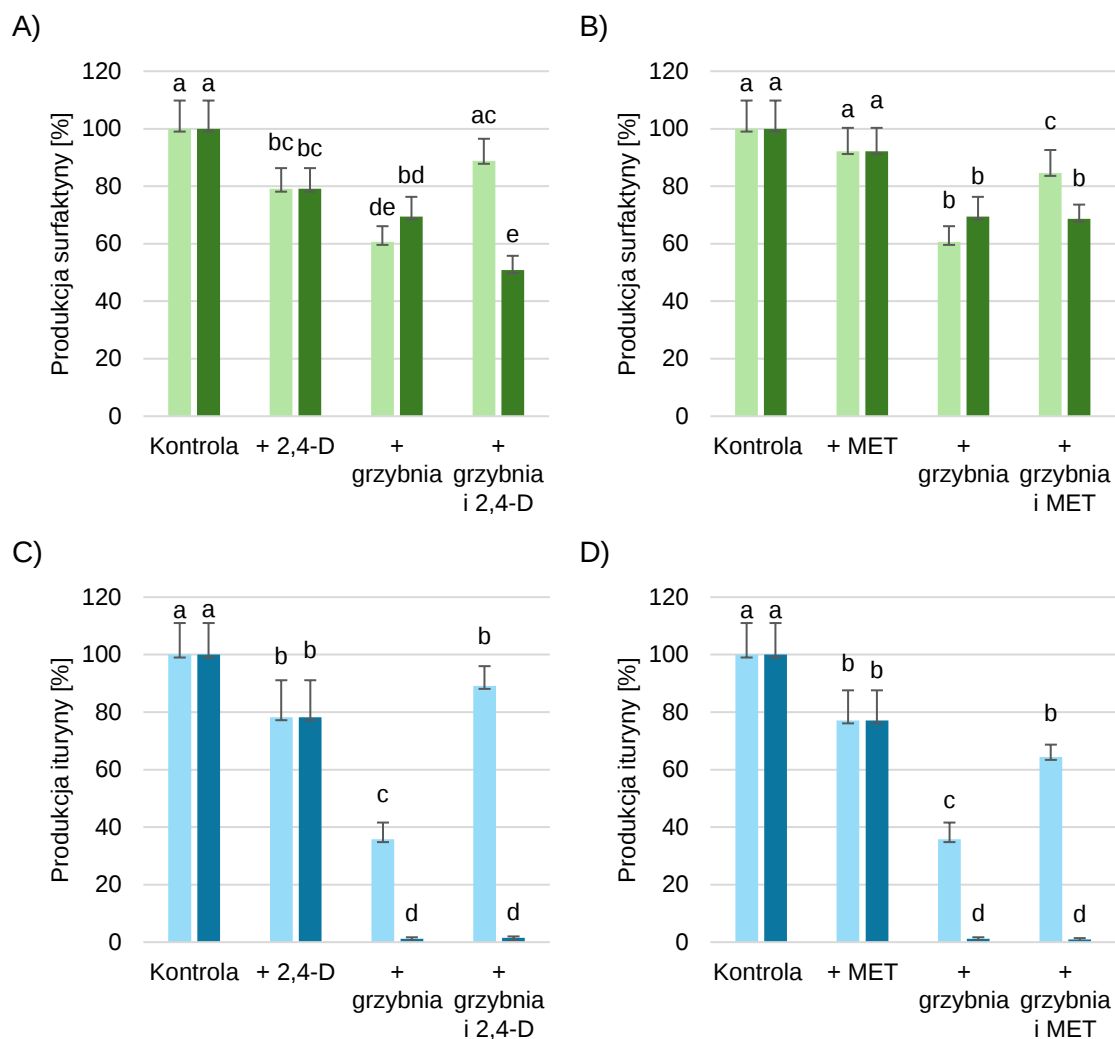


Rycina 27. Intensywność produkcji surfaktyny (A,B) i ituryny (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. **Kol B9** w obecności grzybnia *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz herbicydów 2,4-D (A,C) lub MET (B,D) (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku herbicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Oceniono wpływ herbicydów 2,4-D i MET na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu ***Bacillus sp. Kol L6***. Stwierdzono, że 2,4-D ogranicza produkcję obu badanych lipopeptydów w monokulturze szczepu Kol L6 (**Rycina 28A,C**), natomiast MET nie wpływa na produkcję surfaktyny, jednocześnie redukując wydzielanie ituryny o 22,9% (**Rycina 28B,D**).

Badania nad wpływem 2,4-D i MET na produkcję surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych wykazały, że obecność 2,4-D w hodowli bakterii Kol L6 z grzybnią DSM 1094 prowadzi do wzrostu poziomu zarówno surfaktyny, jak i ituryny w porównaniu do hodowli mieszanej bez dodatku tego herbicydu (**Rycina 28A,C**). Natomiast w przypadku hodowli mieszanej zawierającej grzybnię IM 6525, obecność 2,4-D powodowała spadek poziomu surfaktyny, ale nie miała wpływu na poziom ituryny (w porównaniu do odpowiednich układów kontrolnych).

Podobne efekty zaobserwowano dla MET, tzn. w hodowli z grzybnią DSM 1094 nastąpił wzrost poziomu surfaktyny (**Rycina 28B**) i ituryny (**Rycina 28D**), natomiast w hodowli z grzybnią IM 6525 nie stwierdzono wpływu tego herbicydu na poziom badanych lipopeptydów.



Rycina 28. Intensywność produkcji surfaktyny (A,B) i ituryny (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. **Kol L6** w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz herbicydów 2,4-D (A,C) lub MET (B,D) (użytych w stężeniu 50 mg L⁻¹). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku herbicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Podsumowując wyniki badań dotyczące wpływu herbicydów (2,4-D i MET) na wzrost grzybów *Fusarium* oraz na aktywność przeciwgrzybową i produkcję biosurfaktantów czterech szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*, stwierdzono, że:

- 1) herbicydy 2,4-D i MET wykazują zróżnicowany wpływ na wzrost grzybni dwóch badanych szczepów *Fusarium* – stymulują wzrost *F. sambucinum* IM 6525, natomiast nie wywierają znaczącego wpływu na wzrost *F. culmorum* DSM 1094;
- 2) obecność herbicydów w hodowli obniża lub nie wpływa na aktywność przeciwgrzybową szczepów *Bacillus* wobec grzybów *Fusarium*. Szczepy Kol B2 i Kol B3 tracą część swojej skuteczności w obecności herbicydów, podczas gdy szczepy Kol B9 i Kol L6 zachowują swoją aktywność przeciwgrzybową bez względu na obecność herbicydów;
- 3) w monokulturach bakteryjnych:
 - a) obecność 2,4-D zazwyczaj nie wpływa na produkcję surfaktyny, z wyjątkiem szczepu *Bacillus* sp. Kol L6, gdzie stwierdzono niewielki (ok. 20%) spadek jej produkcji;
 - b) obecność MET powoduje ograniczenie produkcji surfaktyny przez szczepy Kol B2 i Kol B3 i nie ma wpływu na produkcję surfaktyny przez szczepy Kol B9 i Kol L6;
 - c) obecność herbicydów powoduje ograniczenie produkcji ituryny w przypadku trzech z czterech zbadanych szczepów. Wyjątek stanowi szczep Kol B9, dla którego obecność herbicydów stymulowała wzrost produkcji ituryny;
- 4) w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych wpływ herbicydów na produkcję surfaktyny i ituryny jest zróżnicowany i zależny od użytego w badaniu szczepu *Bacillus*, szczepu *Fusarium* oraz rodzaju herbicydu. Niemniej jednak wskazano, że:
 - a) w hodowlach mieszanych zawierających grzybnię *F. culmorum* DSM 1094 i herbicyd 2,4-D, poziom produkcji surfaktyny jest wyższy niż w analogicznych hodowlach bez tego herbicydu;
 - b) w hodowlach mieszanych zawierających grzybnię *F. sambucinum* IM 6525 i herbicyd MET, obecność herbicydu nie ma wpływu na produkcję surfaktyny;
 - c) herbicyd MET negatywnie wpływa na produkcję ituryny przez bakterie szczepu *Bacillus* sp. Kol B3, zarówno hodowane w monokulturze, jak i namnażane w obecności grzybni DSM 1094 lub IM 6525.

Wyniki uwzględniające wpływ herbicydów oraz MP na produkcję biosurfaktantów przez szczep *Bacillus* sp. Kol L6 oraz na jego aktywność przeciwgrzybową wobec *F. culmorum* DSM 1094 zostały rozszerzone i opublikowane w pracy:

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Płaza G, Paraszkievicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618.

DOI: 10.1038/s41598-023-41210-5

V.6.4. Artykuł naukowy 1

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Płaza G, Paraszkievicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618.

DOI: [10.1038/s41598-023-41210-5](https://doi.org/10.1038/s41598-023-41210-5)



OPEN Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*

Aleksandra Walaszczyk¹, Anna Jasińska², Przemysław Bernat², Grażyna Płaza³ & Katarzyna Paraszkievicz²✉

The amounts of anthropogenic pollutants, e.g., microplastics (MPs) and pesticides, in terrestrial and aquatic ecosystems have been increasing. The aim of this study was to assess the influence of MPs on the removal of herbicides (metolachlor, MET; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) and the production of biosurfactants (surfactin and iturin) by *Bacillus* sp. Kol L6 active against *Fusarium culmorum*. The results showed that Kol L6 eliminated 40–55% MET and 2,4-D from liquid cultures, but this process was inhibited in the presence of MPs. Although the pollutants did not strongly limit the production of surfactin, iturin secretion was found to decrease by more than 70% in the presence of all three pollutants. Interestingly, the strongest modification in the profile of iturin homologues was calculated for the cultures containing MET + MP and 2,4-D + MET + MP. The bacteria significantly limited the growth of the phytopathogenic *F. culmorum* DSM1094F in the presence of individual pollutants and their two-component mixtures. However, in the presence of all three tested pollutants, the growth of the fungus was limited only partially (by no more than 40%). The presented results are a starting point for further research on bacteria-fungi-plants interactions in the soil environment in the presence of multiple pollutants.

Chemical pesticides are produced synthetically and applied as a main method for pest removal, especially in agriculture. In 2020, pesticide consumption was 2.66 million metric tons, with the United States being the largest pesticide-consuming country worldwide with 407.8 thousand metric tons of pesticides used, and Brazil coming in second with 377.2 thousand tons consumed. From 1990 to 2010, the global consumption of pesticides increased by more than 50%¹. According to Soloneski et al.², more than 99.9% of pesticides applied to crops worldwide become toxic residues in the environment, never reaching their specific targets. These compounds are usually toxic and persist in both terrestrial and aquatic ecosystems³. The usage of pesticides results in their accumulation in the environment and, subsequently, a modification of the metabolic activity of various organisms and interactions between them⁴. The residues of pesticides can affect not only environmental biodiversity but also human health^{3,5}. Among the various techniques used for pesticide removal, microbial bioremediation stands out as an eco-friendly, cost-effective and efficient method. Some microorganisms, primarily bacteria⁶ and fungi⁷, have been proven to be able to mineralize or transform (partially degrade and/or detoxicate) anthropogenic pollutants, including synthetic pesticides^{3,8}.

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), an herbicide containing phenoxyacetic acid, has been widely used for decades to control broadleaf weeds in several crops, including rice, wheat, sorghum, sugar cane, and corn⁹. According to Islam et al.¹⁰, over 1500 commercial herbicide products contain 2,4-D as an active ingredient. This herbicide has often been detected in surface and ground water and therefore poses an important environmental issue and health hazard. Importantly, approximately 91.7% of 2,4-D ends up in water. Among the phenoxyacetic

¹Doctoral School of Exact and Natural Sciences, Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland. ²Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Lodz, Poland. ³Faculty of Organization and Management, Silesian University of Technology, Zabrze, Poland. ✉email: katarzyna.paraszkievicz@biol.uni.lodz.pl

acid herbicides, 2,4-D is one of the most easily broken-down compounds, and it has been discovered that microbial communities worldwide have a high prevalence of 2,4-D mineralization¹¹.

Another widely used herbicide is MET (2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-((1S)-2-methoxy-1-methylethyl) acetamide), which accounts for approximately 4.2% of herbicide usage worldwide. This compound is a commonly used, highly selective chloroacetamide pesticide. MET has a moderate level of toxicity, an ability to block the enzymes involved in the gibberellin pathway and can exert negative effects on human liver cells¹².

Environmental pollution arising from plastic waste is a major global concern and one of the greatest threats to global aquatic and terrestrial biodiversity. Plastic pollution has been recognized as one of the most critical challenges of modern societies worldwide^{13–16}. Plastic can be categorized based on several different qualities, e.g., chemical composition, particle size, application possibilities, and physicochemical properties. MPs are defined as small particles of synthetic organic polymers with a diameter between 1 µm and 5 mm¹¹. According to Nizzetto et al.¹⁷, up to 700,000 tons of MP is input into agricultural land in Europe and North America annually. Weithmann et al.¹⁸ estimated that 35 billion to 2.2 trillion pieces of MP enter cropped soils via compost application in Germany annually. Based on their origin, MPs can be divided into two categories: primary (manufactured intentionally and used especially as an ingredient of various personal care products) and secondary (generated through the fragmentation of plastic litter).

Because of its hydrophobic properties, large molecular weight, and lack of functional groups that microbes can identify, polyethylene (the most popular petroleum-based plastic) persists in the environment¹⁹. Low-density polyethylene (LDPE) is difficult to degrade after disposal, which results in environmental pollution and ecosystem disruption. This type of MP also poses an increasing threat to terrestrial and aqueous wildlife. According to Sen and Rout²⁰, there are many reports suggesting that polyethylene causes blockages in the intestines of birds and various aqueous animals.

Bacteria from the genus *Bacillus* are gram-positive, spore-producing rod-shaped, aerobes or facultative aerobes, mostly isolated from soil. According to Caulier et al.²¹, more than 370 *Bacillus* species have been described thus far. Members of the genus *Bacillus* are known to secrete a wide variety of metabolites, including enzymes, cyclic lipopeptide (cLP) biosurfactants belonging to the surfactin, iturin or fengycin families, polyketides, hybrids of polyketides and nonribosomal compounds and volatile compounds^{21,22}. *Bacillus* cLPs are synthesized via non-ribosomal peptide synthetases, which causes a significant amount of structural variability in these compounds, resulting in the production of a mixture of homologues (varying in the length of the fatty acid chain) and/or isoforms (differing in the amino acid sequence of the peptide)²³. Many published data indicate that environmental *Bacillus* strains usually secrete biosurfactants as mixtures of various isomers and/or homologues. For example, while testing 25 *Bacillus* strains isolated from vegetable rhizospheres, Bartal et al.²⁴ distinguished as many as 158 surfactin variants present in the ferment broths. The percentage content of different isoforms and homologues of *Bacillus* cLP biosurfactants can be affected by various factors, such as culture conditions and medium composition^{25,26}.

Some of these metabolites produced by rhizospheric *Bacillus* bacteria exhibit antimicrobial properties, act as surfactants or play a role in improving plant health and growth; therefore, many of those species are described as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). The mechanisms used by rhizobacteria (including PGPR) for the bioremediation of contaminated soils include biosorption/degradation/transformation of pollutants and production of various metabolites, e.g., polymeric substances, siderophores or biosurfactants²⁷. Biosurfactant-producing *Bacillus* strains are one of the most promising PGPR, among others, due to the synergistic effect of surfactin, iturin and fengycin on bacterial motility leading to biofilm formation and root colonization, induced systemic resistance (ISR) in plants and antimicrobial activity against phytopathogens. In particular, bacterial biofilm presence as well as iturin and fengycin secretion play a significant role in plant protection against phytopathogens^{21,28–30}. Some *Bacillus* strains are known as microorganisms capable of synthetic pesticide degradation³¹.

Anthropogenic pollutants such as herbicides and plastics may influence the diversity and/or metabolic activity of soil microbiota, including PGPR. The objective of this study was to evaluate whether the presence of MPs influences the ability of *Bacillus* bacteria to remove herbicides (2,4-D and MET), produce biosurfactants (surfactin and iturin) and inhibit fungal growth. The present study provides new data on the influence of MPs and herbicides on *Bacillus* sp. The ability of Kol L6 to produce biosurfactants and degrade herbicides allows for a better understanding of the impact of some pollutants on plant growth-promoting microorganisms. Based on our literature survey, this study is the first to report on the influence of MPs on 2,4-D and MET removal as well as biosurfactant production by a *Bacillus* strain active against phytopathogenic fungi from the genus *Fusarium*.

Materials and methods

Microbial strains. All the bacterial strains used in the study are stored in the strain collection of the Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, University of Lodz, Poland. The *Fusarium culmorum* DSM 1094F strain was obtained from the Leibniz Institute DSMZ.

In this study, 18 different *Bacillus* strains isolated from rhizosphere with potentially different kinds and levels of anthropogenic pollutants were used (Table 1). Two of the strains, I'-1a and Zg 1.3, were isolated from highly polluted environments. The remaining 16 strains were isolated from nonurban areas. All of the strains secreted compounds capable of surface tension reduction (indicating their ability to produce biosurfactants), which was assessed by methods described in Materials and Methods, subsection "Biosurfactant extraction and analysis".

Chemicals. Chemicals used for surfactant and herbicide extraction by the QuEChERS method, surfactin and iturin standards, herbicides (2,4-D and MET), crystal violet solution for microscopic analysis and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma–Aldrich (Germany). A stock solution of each herbicide

Bacterial strain	Site of soil sample isolation	DCT (mm)*	Biosurfactants production mg L ⁻¹ **		
			Surfactin	Iturin	Fengycin
I'-1a	Oil refinery, Czechowice-Dziedzice, Poland (49°5'N 19°0'E)	7.5	6.7 ± 0.5	61.8 ± 4.1	+
Zg 1.3	Landfill of the former "Boruta" Dye Industry Plant in Zgierz, Poland (51°8'N 19°3'E)	8.5	70.2 ± 3.3	133.7 ± 9.36	+
IM 14	Helenów Public Park in Łódź, Poland (51°4'N 19°2'E)	7.0	15.8 ± 1.5	9.1 ± 0.5	+
KAS 1.10	Kashubian Landscape Park, Poland (54°1'N 18°3'E)	5.0	0.0 ± 0.0	27.7 ± 2.9	–
KAS 2.2		9.0	42.7 ± 3.0	255.9 ± 15.7	–
KAS 2.4		10.0	38.8 ± 3.1	283.5 ± 17.5	+
KAS 2.5		9.5	33.8 ± 2.3	23.1 ± 1.6	+
KAS 4.1		5.0	0.7 ± 0.1	10.5 ± 0.7	+
Kol B1	Kolnica village, Greater Poland Voivodeship (52°5'N 18°3'E)	8.0	101.2 ± 7.1	243.3 ± 16.9	–
Kol B9		9.0	33.5 ± 2.3	199.1 ± 13.9	+
Kol D3		9.0	67.3 ± 6.8	159.5 ± 15.8	+
Kol L2		5.0	14.0 ± 1.4	0.0 ± 0.0	+
Kol L6		8.5	38.4 ± 2.7	161.3 ± 11.3	+
Kol S3		10.0	7.9 ± 0.6	47.3 ± 4.8	+
Kol S5		6.0	21.2 ± 2.1	0.0 ± 0.0	–
Kol S8		9.5	27.2 ± 2.8	162.9 ± 11.4	+
Kol S10		4.5	0.0 ± 0.0	29.8 ± 1.4	–
Kol Si6		8.0	27.4 ± 1.9	368.3 ± 27.8	–

Table 1. Isolation site of bacterial strains and biosurfactants production by the strains cultured for 72 h in LB medium. Surface activity was assessed by the DCT. *Surface activity assessed by DCT for the negative control (LB medium) was 3 mm and for the positive control (5% water solution of SDS) it was 8 mm. The average standard deviation was lower than 10%, and therefore was not shown. **Surfactin and iturin were evaluated by LC–MS/MS using appropriate standards and fengycin presence was assessed by MALDI–TOF/TOF.

(10 mg mL⁻¹) was prepared in 96% ethanol obtained from Avantor Performance Materials Poland S.A. (Poland). Chemicals used in the analysis performed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) were purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A. (Poland).

MP preparation. In this study, LDPE powder with a grain size of 100–500 µm and a melt index of 190 °C/2.16 kg (Abifor AG, Switzerland) was used. Nonsterile LDPE (1.5 g) was suspended in 5 mL of 96% ethanol and incubated for an hour. During the incubation, the sample was vortexed several times. Then, 10 mL of sterile deionized water was added to obtain a final MP concentration of 100 mg mL⁻¹. The procedure was performed under sterile conditions. The MP stock solution was subsequently used for the preparation of submerged bacterial cultures.

Submerged bacterial cultures. Liquid Luria–Bertani (LB) medium was inoculated with a 1% 24-h-old preculture grown in the same medium, according to the method described by Plaza et al.³². Cultivation variants with the addition of 1) MP; 2) 2,4-D; 3) MET; 4) MP and 2,4-D; 5) MP and MET; and 6) MP, 2,4-D and MET were prepared. The final concentration of MP in the culture was 2000 mg L⁻¹, while the final concentration of each herbicide was 50 mg L⁻¹. To determine the antifungal activity, analogous cultures with the addition of *F. culmorum* DSM 1094F (using a 10% 24-h-old fungal preculture obtained in LB medium) were prepared. Appropriate biotic controls (bacterial or fungal culture with neither MP nor herbicide addition) and abiotic controls (with no microorganism addition) were also prepared. The results of the preliminary study confirmed that the amount of ethanol used for herbicide and MP stock preparation does not have any effect on bacteria and fungi. The cultures in the final volume of 30 mL were incubated for 72 h in 100 mL Erlenmeyer flasks. All cultures and abiotic controls were incubated on a rotary shaker (120 rpm) at 28 °C. Then, in the experiments on antifungal activity, the fungal biomass was separated from the extracellular fluid by vacuum filtration using previously weighed Whatman filter paper No. 1 (Merck, Germany). The mycelium was then dried at 60 °C to reach a constant weight.

Herbicide extraction and analysis. First, to assess the influence of MPs on herbicide recovery, abiotic controls were prepared. The data of abiotic control individual variants were assumed to be 100% to determine the level of pesticides in the appropriate cultures containing *Bacillus* sp. Kol L6 bacteria. Then, MP (2 g L⁻¹) was added to LB medium containing MET and/or 2,4-D (50 mg L⁻¹) and incubated for 72 h on a rotary shaker, followed by extraction and analysis of individual herbicide contents. Finally, 2,4-D and MET removal by *Bacillus* sp. Kol L6 cultured in the presence of individual pollutants or their mixtures was assessed.

To estimate herbicide elimination by the bacteria, a sample of the bacterial culture (20 mL) was homogenized twice with glass beads (1 mm diameter) for 4 min at 25 m s⁻¹ (Retsch, Ball Mill MM 400). To the

obtained homogenized cultures, 10 mL of acetonitrile (ACN) and four salts (2 g of MgSO_4 , 0.5 g of NaCl, 0.5 g of $\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.25 g of $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \times 1.5\text{H}_2\text{O}$) were added, and the extraction was carried out using QuEChERS techniques. After centrifugation, the top layer was collected. 2,4-D and MET contents were analysed according to the methods described by Nykiel et al.³³ and Jasińska et al.³⁴, respectively. Briefly, 2,4-D content was measured using an Agilent 1200 HPLC system (Agilent, USA) and a 3200 Q-TRAP mass spectrometer (Sciex, USA) equipped with an ESI source. The obtained extract was diluted in a mixture of water and methanol (80:20, v/v). The parameters of the chromatographic method were as follows: 10 μL of the diluted sample was injected onto a Kinetex C18 column (50 mm $\times$ 2.1 mm, particle size: 5 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) and heated at 37 °C with a flow rate of 500 $\mu\text{L min}^{-1}$. Water (A) and methanol (B) were applied as mobile phases, with both containing 5 mM ammonium formate. The solvent gradient was initiated at 80% and, after 1 min, decreased to 10% A for 1 min; then, it was maintained at 10% A for 2.5 min before returning to the initial solvent composition over 2 min. The ion source of MS was operated in negative mode at a temperature of 500 °C. The multiple reaction monitoring pairs (MRM) for 2,4-D were m/z 219.9–160.9 and 220.9–162.9. The same chromatographic parameters were applied for MET. However, the MS parameters were different. The ESI source was operated in positive mode, where the MRM pairs for MET were m/z 284.09–252.2 and 284.09–176.3.

Biosurfactant extraction and analysis. In a preliminary study, the drop collapse test (DCT) was used as a sensitive, rapid method for screening bacteria producing biosurfactants^{35,36}. Briefly, the culture was centrifuged, and 10 μL of the supernatant was placed on the surface of a polystyrene plate. After 15 min, the diameter of the drop was measured and compared to the positive and negative control drop diameters (5% water solution of SDS and LB medium, respectively).

To determine the production of cLPs, the culture was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 10 min. The supernatant was extracted by a modified QuEChERS technique according to the method previously described by Bernat et al.³⁷ and Paraszewicz et al.^{25,38}. Briefly, the process included six steps: (1) a 5 mL sample of the culture supernatant was mixed rapidly with 5 mL of distilled water in a 50 mL centrifuge tube; (2) 10 mL of ACN was added, and the sample was vortexed for 2 min; (3) the mixture of the four salts (2 g of MgSO_4 , 0.5 g of NaCl, 0.5 g of $\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.25 g of $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \times 1.5\text{H}_2\text{O}$) was added, and the sample was vortexed for five minutes; (4) the sample was left to sit for 20 min; (5) the upper organic phase was pooled; (6) another 10 mL portion of ACN was introduced to the sample, and the extraction procedure was repeated.

Surfactin and iturin analyses were performed using an Agilent 1200 LC (Santa Clara CA, USA) system with a 3200 QTRAP mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) equipped with an ESI source. Five microliters of ACN samples was injected onto a Kinetex C18 column (50 mm $\times$ 2.1 mm, particle size: 5 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) heated to 40 °C with a flow rate of 600 $\mu\text{L min}^{-1}$. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B), which were both supplemented with 5 mM ammonium formate. The run time was 6 min with the solvent gradient was initiated at 40% B. After 0.5 min, the amount of B was increased to 100% during the next 1.5 min and was maintained at 100% for 2.5 min before returning to the initial solvent composition over the next 2 min. The mass spectrometer ion source worked in positive mode, spray voltage 5.500 V and temperature 600 °C. The data analysis was performed with Analyst[™] v1.5.3 software (Sciex, Framingham, MA, USA). Quantitative lipopeptides analyses were performed for surfactin and iturin A standards (Merck). The monitored multiple reaction monitoring (MRM) pairs were m/z 1030–391, 1044–391, 1058–391 and 1072–391 for sodiated molecules $[\text{M} + \text{Na}]^+$ of the surfactin homologues C13, C14, C15 and C16, respectively. For sodiated ions of homologues C13, C14, C15 and C16 of iturin A, the MRM pairs were m/z 1051.5/1051, 1065.5/1065, 1079.5/1079 and 1093.5/1093, respectively.

Fengycin presence was confirmed using a MALDI-time of flight (TOF/TOF) mass spectrometer AB SCIEX 5800 System (AB Sciex)³⁸. Briefly, a mixture of a 0.5 μL of cLP extract (diluted in 2 mL of methanol) and 0.5 μL of a matrix solution (containing 10 mg mL^{-1} DHB dissolved in ACN) was deposited onto the MALDI target. MALDI-TOF/TOF analyses were conducted in the positive ionization and reflector mode in the range m/z 900–2000 at a fixed laser intensity of 3500 (instrument-specific units). The ten most intense signals per spot were selected for automated MS/MS measurement at a fixed laser intensity of 5000 (instrument-specific units).

Microscopy. Microscopic analysis was performed using a Nikon Eclipse 50i light microscope with a Nikon DS-Fi3 camera and NIS-Elements D 5.11.01 software.

Statistical analysis. All experiments were conducted at least in triplicate. The obtained results were presented as their mean values. An average standard deviation (SD) was calculated. One-way ANOVA analysis of variance was performed using Microsoft[®] Excel[®] (Microsoft Corporation, Washington, DC, USA). Differences at $p \leq 0.05$ were considered significant.

Results and discussion

Characterization of biosurfactant production by the bacterial strains. The results obtained from the DCT in the preliminary study revealed that all tested strains secreted compounds with surface activity. Further analysis using LC–MS/MS and MALDI-TOF/TOF techniques showed that all tested strains produced cLPs. Moreover, these strains exhibited diverse profiles of surfactin, iturin and fengycin secretion (Table 1). Exemplary LC–MS/MS chromatograms (Figure S1) and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (MS) spectra (Figure S2) of the lipopeptides extracted from *Bacillus* sp. Kol L6 cultures are presented in the supplementary material.

Most of the strains (11 isolates) simultaneously produced surfactin, iturin and fengycin. In turn, a mixture of two biosurfactants (surfactin and iturin) was produced by three strains, and the secretion of only one type of biosurfactant (surfactin or iturin) was found in four strains. Depending on the strain, the levels of secreted

surfactin and iturin varied and were in the ranges of 0.7 ± 0.1 to 101.2 ± 7.1 mg L⁻¹ and 9.1 ± 0.5 to 368.3 ± 27.8 mg L⁻¹, respectively.

Comparison of the ability of the *Bacillus* strains to remove herbicides. Of the 18 studied strains (Table 1), only four isolates showed a notable (> 40%) ability to remove at least one of the tested pesticides from the growth environment (Fig. 1). The most effective was *Bacillus* sp. Kol L6. This strain removed 2,4-D and MET with 53.2 and 47.4% efficiency, respectively; therefore, it was chosen for further analysis.

Pesticide residues present in the soil adversely affect the populations of organisms inhabiting it. They can both disrupt the functioning of individual organisms and affect the interactions between them^{39–41}. The wide use of 2,4-D in agriculture has led to the long-term persistence of its residues in agricultural soils. Many scientific works prove its adverse effect on plants and soil organisms such as earthworms, fungi and bacteria and their interrelationships⁴².

There are only a few papers showing the degradation of 2,4-D by bacteria of the genus *Bacillus*. Karami et al.⁴³ isolated bacteria from polluted wheat field soils and proved their capacity to degrade 2,4-D. The identified strains were classified as members of the genera *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Serratia* and *Staphylococcus*. Similarly, Nguyen et al.⁴⁴ demonstrated efficient degradation of 2,4-D by a population of microorganisms present in heavily contaminated soil. In addition, prolonged exposure to the herbicide resulted in the enrichment of the community in bacteria of the genera *Bacillus* and *Paenibacillus*, which may suggest an increased predisposition of these genera to tolerate and degrade 2,4-D.

To date, many MET-degrading microorganisms, including bacterial and fungal strains, have been identified^{12,45–47}. Some studies have reported the ability of *Bacillus* bacteria to mineralize or transform MET^{48,49}. Kaniserry et al.⁵⁰ used DNA-stable isotope probing to investigate microbial MET mineralization in soil. The 16S rRNA gene sequencing of aerobic MET-mineralizing microorganisms showed a close relationship to *Bacillus* spp. Nevertheless, those reports did not evaluate the ability of bacillus strains to produce biosurfactants.

Importantly, the strain chosen for further analysis in this study (*Bacillus* sp. Kol L6) was established as a very effective producer of both surfactin (38.4 ± 2.7 mg L⁻¹) and iturin (161.3 ± 11.3 mg L⁻¹) (Table 1). Similar levels of surfactin (35.0 ± 2.6 mg L⁻¹) and iturin (132.5 ± 15.6 mg L⁻¹) secretion were reported for the natural surfactin and iturin overproducer *B. subtilis* IM 13³⁸. To the best of our knowledge, there have been no reports on biosurfactant-producing *Bacillus* strains capable of 2,4-D and/or MET removal.

2,4-D and MET removal by *Bacillus* sp. Kol L6 from cultures amended with a mixture of the herbicides and/or MP.

To assess MP influence on herbicide recovery, abiotic controls were prepared (Fig. 2). It was found that in the systems containing 2,4-D or MET alone, close to 100% of the pesticides remained in the sample after incubation (Fig. 2). In the case of both 2,4-D and MET, the addition of the second herbicide used in the study did not affect the extraction efficiency. However, it was found that in the presence of MP, only approximately 80% of 2,4-D and MET remained in the sample after incubation. Moreover, in a mixture containing MET and MP, the remaining amount of 2,4-D was reduced by approximately 40%.

As shown in Fig. 3, *Bacillus* sp. Kol L6 showed the ability to eliminate 2,4-D and MET from both the cultivations containing individual pollutants or their mixtures (containing more than one pollutant). Compared to the cultures containing a single pesticide, the removal of 2,4-D and MET in the presence of MP decreased by 11.8 and 24.6% ($p \leq 0.05$), respectively. However, the addition of both herbicides as well as MP almost completely reduced the removal of both 2,4-D and MET. The effectiveness of 2,4-D and MET elimination from multicomponent systems was only 10.7 and 6.4%, respectively ($p < 0.003$).

Taking into account the previously demonstrated possibility of 2,4-D and MET sorption on the surface of MP particles, the reduced efficiency of eliminating these herbicides from the growth environment by *Bacillus* sp. Kol L6 may result from the limited bioavailability of the pesticides used. Because of the small MP particle size,

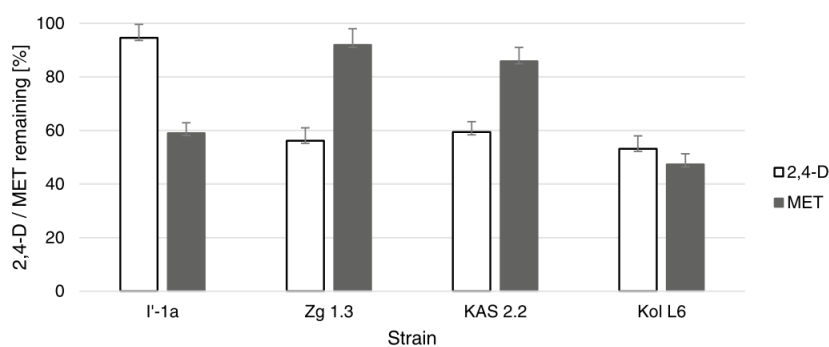


Figure 1. Percentage values of 2,4-D and MET (50 mg L⁻¹) remaining in the cultures of selected *Bacillus* strains cultivated for 72 h in LB medium on a rotary shaker (120 rpm) at 28 °C. Percentage values of the pesticide remaining in abiotic control was taken as 100%. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$).

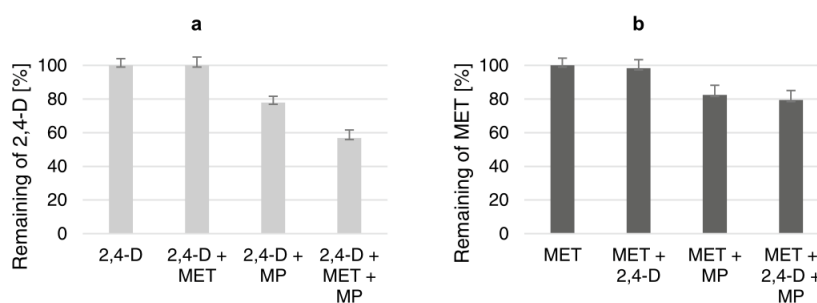


Figure 2. Abiotic controls: MP influence on the remaining percentage of (a) 2,4-D and (b) MET from LB medium after 72 h of incubation on a rotary shaker (120 rpm), at 28 °C. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$).

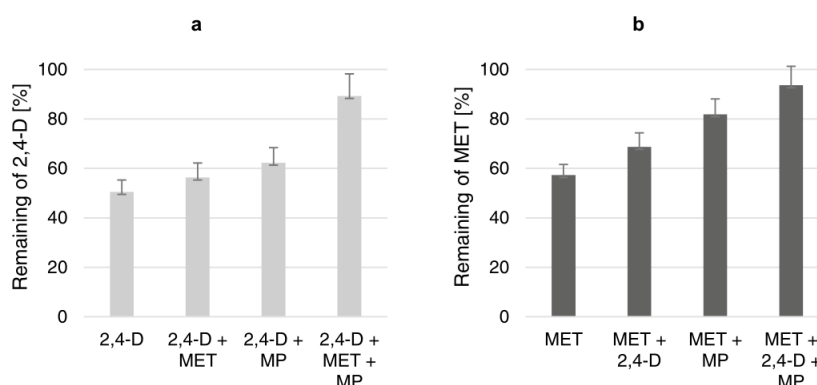


Figure 3. Influence of MP on the percentage of the remaining (a) 2,4-D and (b) MET from *Bacillus* sp. Kol L6 cultures conducted in LB medium after 72 h of cultivation on a rotary shaker (120 rpm), at 28 °C. The results are shown as a percentage of control samples (Fig. 2). The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$).

large specific surface area and strong hydrophobicity, pesticides could be easily adsorbed onto MP surfaces^{51,52}. Information about how MPs could impact microbial degradation activity towards pesticides has seldom been reported. However, there are papers describing the effect of MPs on prolonging the effective residual life of cypermethrin and modifications of some parameters of soil microbial activity in the presence of glyphosate^{53,54}.

Influence of herbicides and MP on surfactin and iturin production by *Bacillus* sp. Kol L6. Surfactin production in the presence of 2,4-D, MET and MPs (used alone or as pollutant mixtures) is shown in Fig. 4a. It was established that the pollutants do not strongly limit surfactin production, though the differences were found to be statistically significant ($p < 0.001$). The lowest level of surfactin was found in the culture containing 2,4-D or MP (71.4 ± 5.6 and $75.1 \pm 8.2\%$, respectively) compared to 100% calculated for the biotic control (without any pollutant addition). Interestingly, MET added together with MP did not negatively affect surfactin synthesis.

In contrast, the use of each pollutant alone or pollutant mixtures resulted in the reduction of iturin production by *Bacillus* sp. Kol L6 (Fig. 4b) ($p < 0.001$). The lowest iturin production was noted for cultures containing a mixture of all pollutants ($29.1 \pm 1.7\%$), a 2,4-D + MET mixture ($37.6 \pm 3.0\%$) and MP added separately ($40.3 \pm 5.2\%$).

Four homologues of surfactin (C13–16) and four homologues of iturin (C13–16) were found in the control culture (Fig. 5). In all of the examined cultures, variant C15 of surfactin was dominant, ranging between 53.9 and 57.3%. The obtained results revealed that the pollutants used in the study did not significantly influence the surfactin homologue pattern. Exemplary chromatograms of the identified surfactin homologues are available in the supplementary material in Figure S3.

Interestingly, a complete reduction in the content of iturin homologue C13 was observed for cultures containing the MET + MP mixture and the mixture of all three pollutants. On the other hand, the relative contents of C15 and C16 homologues in the same samples visibly increased from 38.3 to 47% and from 25.1 to 43%, respectively.

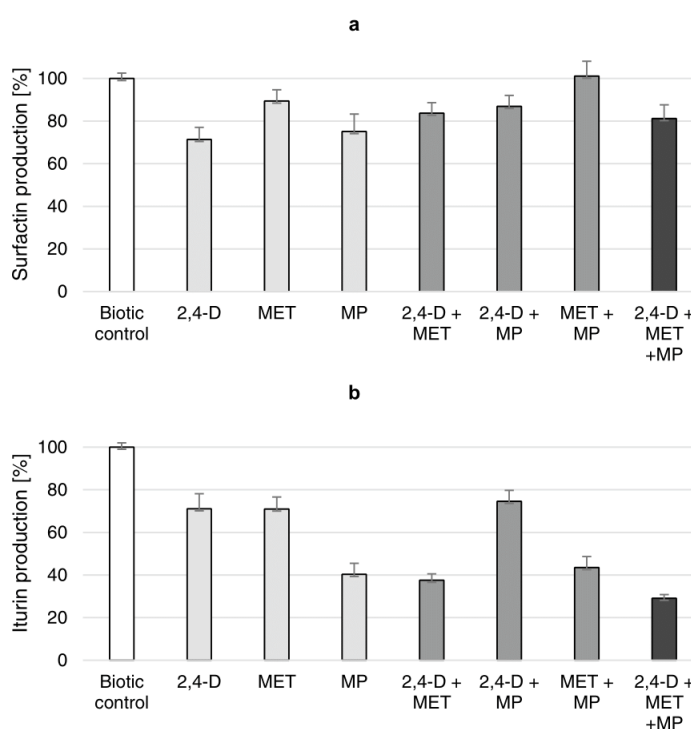


Figure 4. Surfactin (a) and iturin (b) production by *Bacillus* sp. Kol L6 in the cultivations containing individual pollutants: 2,4-D; MET or MP or pollutant mixtures. The results are shown as a percentage of biotic control data. Legend: white square—without pollutants, light grey square—addition of one pollutant, dark grey square—addition of two pollutants, black square—addition of three pollutants. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$).

The obtained data revealed that the simultaneous presence of an herbicide mixture and MP strongly disturbed *Bacillus* sp. Kol L6 iturin production and affected the structural diversity of iturin.

Many publications show that 2,4-D, MET and MP may influence the metabolic activity of microorganisms. For example, Bernat et al.⁵⁵ showed that the fungal strain *Trichoderma harzianum* IM 0961 can reduce oxidative stress in 2,4-D-affected wheat and alleviate its toxic effect. Hogan et al.⁵⁶ showed that the *tfdA* gene, which encodes 2,4-D/a-ketoglutarate dioxygenase catalysing the first step of 2,4-D degradation, is often found in soil bacteria from the genera *Bacillus*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*. Yang et al.⁵⁴ showed that in soil polluted with the pesticide glyphosate as well as MP, microbial respiration and the dynamics of some soil enzymes (β -glucosidase, urease and phosphatase) changed significantly. However, there are no previous studies on the impact of MP on *Bacillus* surfactin and iturin production.

Importantly, the subtle structural differences in biosurfactant variants (produced as a mixture of various isoforms and/or homologues) might modify the biological activity of these compounds^{57,58}. However, future research is necessary to evaluate the precise antimicrobial action of individual *Bacillus* surfactant homologues. In the presence of pollutants, the efficiency of cLP biosurfactant production by *Bacillus* strains may change. However, the effect of MPs, 2,4-D and MET on the biosynthesis of bacterial lipopeptides such as surfactin and iturin has not been reported thus far.

Influence of herbicides and MPs on the antifungal activity of *Bacillus* sp. Kol L6. To test the influence of the pollutants on *Bacillus* sp. Kol L6 antifungal activity and mycelial growth (Fig. 6a) were examined in the presence of pollutants and used as reference data in further analysis containing the addition of bacteria Kol L6 (Fig. 6b).

Pollutants (used individually or in mixtures) did not show a significant inhibitory effect on *F. culmorum* DSM 1094F growth (Fig. 6a) ($p > 0.05$). In contrast, in the mixed fungal-bacterial culture containing the fungus and *Bacillus* sp. Kol L6 bacteria, a very strong (nearly 80%) inhibitory effect was observed (Fig. 6b). Similarly, in the presence of individual pollutants and their mixtures, the bacteria also strongly inhibited the growth of the fungus (by more than 86.8%). The only exception was the culture containing all three pollutants (2,4-D, MET and MP), in which the growth of the fungus was limited only partially (by 37.2%). With the exception of the

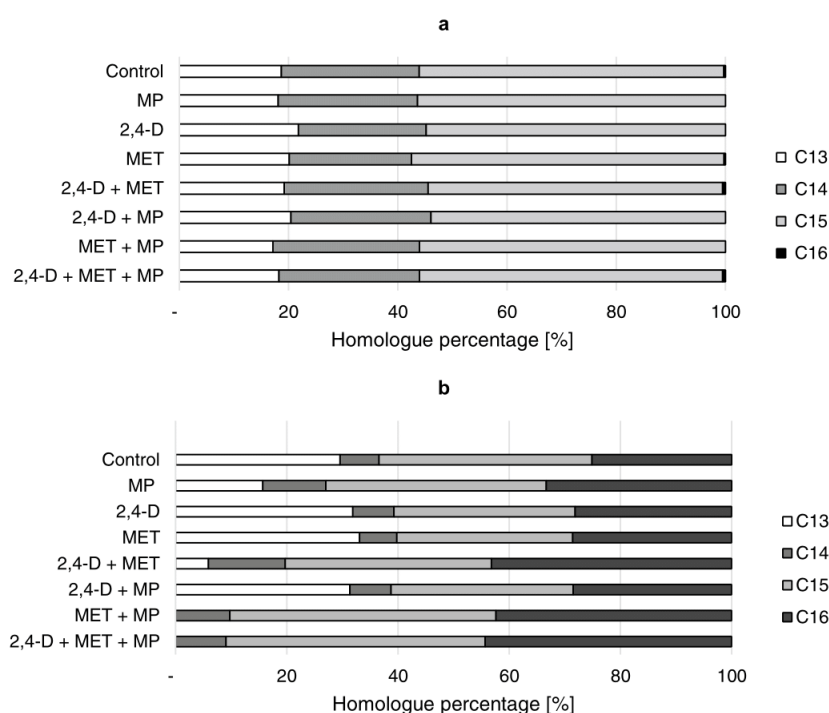


Figure 5. Surfactin (a) and iturin (b) homologues produced by *Bacillus* sp. Kol L6 in the presence of different pollutants: 2,4-D; MET or MP or their mixtures.

sample containing all three impurities, all other results showing a decrease in fungal growth were statistically significant, with a p-value lower than 0.001. The obtained results correspond with the data presented for iturin production obtained for *Bacillus* sp. Kol L6 cultured in LB medium amended with both herbicides and MPs.

Many papers emphasize the strong antifungal activity of iturin. For example, Calvo et al.⁵⁹, using the *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 strain capable of producing surfactin, iturin and fengycin, showed that iturin A is the main lipopeptide family responsible for fungal inhibition. Xiao et al.⁶⁰ examined the activity of fengycin and iturin A isolated from *B. subtilis* Z-14 on the soil-born fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. They established that iturin A induced cell wall disappearance, membrane degeneration, intracellular material shrinkage, and hyphal fragmentation, while fengycin destroyed the internal structure of fungal cells.

Microscopic analysis. Microscopic analysis showed that *F. culmorum* DSM 1094F cultivated in LB medium grew homogeneously and abundantly without pellet formation regardless of the presence of herbicides (Fig. 7a). The fungal hyphae formed loose aggregates around MP particles; however, no pellets were observed (Fig. 7b). Microscopic analysis revealed that *Bacillus* sp. Kol L6 had the ability to form biofilms on MPs (Fig. 7c). In the bacterial-fungal mixed culture, after 72 h of cultivation, a nearly complete reduction in fungal biomass occurred (Fig. 7d). The incubation of bacteria and the fungus in the same environment resulted in the formation of very short filaments with no branches. Moreover, it was observed that the majority of hyphal tips lost their integrity. When the mixed bacterial-fungal culture was amended with all of the pollutants used in the study, *Bacillus* sp. Kol L6 antifungal activity was limited, which resulted in moderate fungal growth (Fig. 7e). These results correspond well with the data presented in Figs. 4b and 6b (presenting iturin production and fungal biomass reduction, respectively).

Presently, many scientific papers have focused on the ability of various microorganisms to degrade MPs^{61–64}. However, the influence of MPs on microorganism metabolic activity (e.g., herbicide biodegradation or biosurfactant production) is rarely researched. One such paper was that of Jasińska et al.³⁴, who reported that MPs induced oxidative stress in the MET-degrading filamentous fungus *T. harzianum*.

The results obtained in this study suggest that Kol L6 bacteria have the ability to form biofilms on the surface of MP particles. Similarly, the study conducted by Tarafdar et al.⁶⁵ revealed that *Bacillus siamensis* ATKU1 formed biofilms on the MP surface after its interaction with LDPE as a sole carbon source.

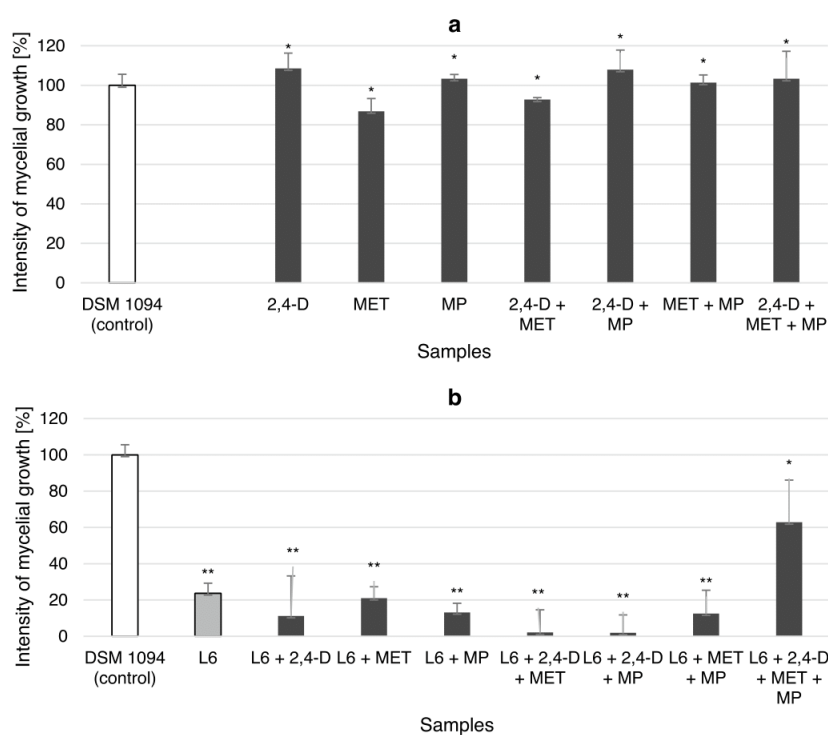


Figure 6. *F. culmorum* DSM 1094F growth intensity in LB medium amended with the pollutants: 2,4-D; MET or MP. Dry fungal biomass was obtained from (a) fungal cultures and (b) mixed bacterial-fungal cultures. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$). * no significant differences in fungal growth compared to control ($p > 0.05$); ** significant differences in fungal growth compared to control ($p < 0.001$).

Conclusion

The present work is the first to show the influence of MPs on the degradation of selected herbicides, the combined effect of these pollutants on the production of surfactin and iturin by *Bacillus* bacteria and their antifungal activity. It has been shown that *Bacillus* sp. Kol L6 is capable of eliminating 2,4-D and MET, but in the presence of plastic microparticles, this process is strongly disturbed. In addition, both herbicides and MPs had little effect on the level of surfactin produced but strongly limited the biosynthesis of iturin. This was especially noticeable in cultures containing a mixture of 2,4-D + MET or 2,4-D + MET + MPs. In addition, one of the iturin homologues was completely absent under these conditions. *Bacillus* sp. Kol L6 strongly limited the growth of the phytopathogenic fungus *F. culmorum* DSM 1094F. Moreover, the addition of a mixture of 2,4-D and MET and a mixture of 2,4-D and MP increased the antifungal activity of the bacteria. However, in cultures containing all three contaminants, fungal growth was limited by only 40%. It can therefore be concluded that in the presence of MPs and the mixture of tested herbicides, the bacteria show a weaker antifungal effect. Considering the common co-occurrence of MPs and other pollutants in the natural environment, this paper introduces new information that may be a starting point for further research, e.g., on bacterial-fungus-plant interactions in the soil environment and the influence of soil pollutants on the metabolic activity of plant growth-promoting (PGP) microorganisms.

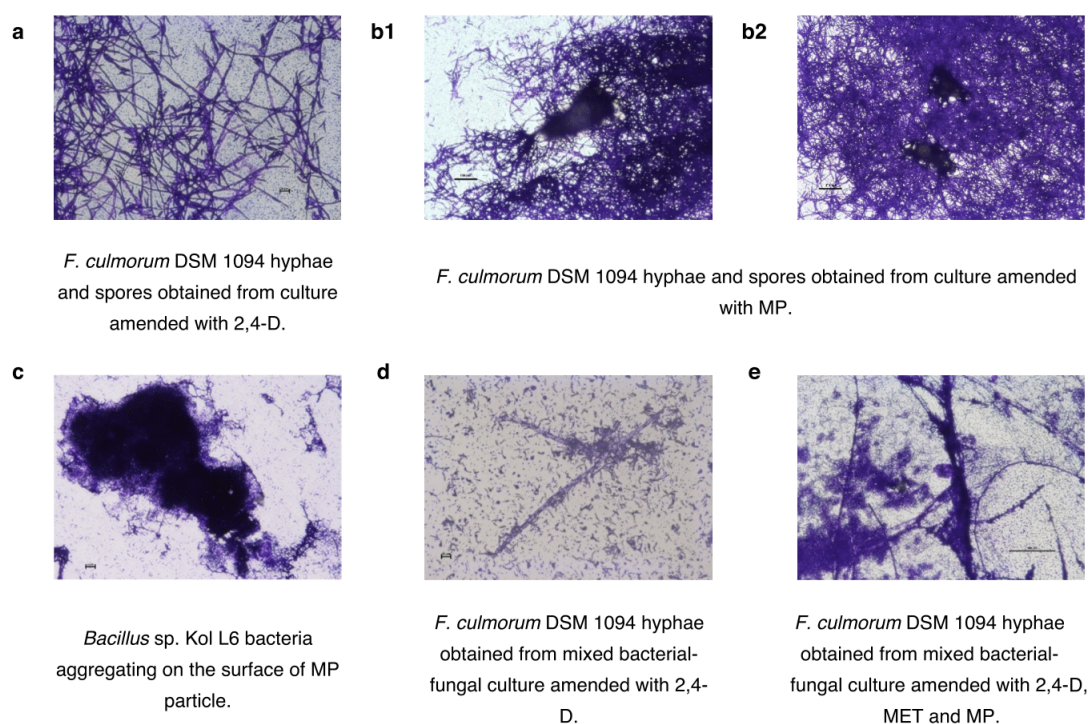


Figure 7. Microscopic analysis of selected samples withdrawn from mixed *F. culmorum* DSM 1094F and *Bacillus* sp. Kol L6 cultures amended with selected pollutants: 2,4-D; MET or MP.

Data availability

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Received: 31 March 2023; Accepted: 23 August 2023

Published online: 05 September 2023

References

1. Statista: Leading countries in agricultural consumption of pesticides worldwide in 2020. <https://www.statista.com/statistics/1263069/global-pesticide-use-by-country/>. Accessed on 13.02.2023.
2. Soloneski, S., Nikoloff, N. & Larramendy, M. L. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *MUTAGENESIS* **797**, 46–52 (2016).
3. Pathak, V. M. *et al.* Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Front. Microbiol.* **13**, 962619 (2022).
4. Lo, C. C. Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Health* **45**, 348–359 (2010).
5. Tudi, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **27**, 1112 (2021).
6. Doolotkeldieva, T., Konurbaeva, M. & Bobusheva, S. Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 31848–31862 (2018).
7. Erguven, G. O. Comparison of some soil fungi in bioremediation of herbicide acetochlor under agitated culture media. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **100**, 570–575 (2018).
8. Raffa, C. M. & Chiampo, F. Bioremediation of agricultural soils polluted with pesticides: A review. *Bioengineering* **8**, 92 (2021).
9. Qurratu, A. & Reehan, A. A review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) derivatives: 2,4-D dimethylamine salt and 2,4-D butyl ester. *Int. J. Appl. Eng.* **11**, 9946–9955 (2016).
10. Islam, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ. Int.* **111**, 332–351 (2018).
11. Stibal, M. *et al.* Microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the Greenland ice sheet. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5070–5076 (2012).
12. Chang, X. *et al.* Isolation, degradation performance and field application of the metolachlor-degrading fungus *Penicillium oxalicum* MET-F-1. *Appl. Sci.* **10**, 8556 (2020).
13. Hwang, J. *et al.* Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Sci. Rep.* **10**, 7391 (2020).
14. Chia, R. W., Lee, J. Y. & Kim, H. Microplastic pollution in soil and groundwater: A review. *Environ. Chem. Lett.* **19**, 4211–4224 (2021).
15. Koelmans, A. A., Redondo-Hasselerharm, P. E. & Nor, N. H. M. Risk assessment of microplastic particles. *Nat. Rev. Mater.* **7**, 138–152 (2022).

16. Maitlo, G. *et al.* Plastic waste recycling, applications, and future prospects for a sustainable environment. *Sustainability* **14**, 11637 (2022).
17. Nizzetto, L., Futter, M. & Langaas, S. Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin? *Environ. Sci. Technol.* **50**, 10777–10779 (2016).
18. Weithmann, N. *et al.* Organic fertilizer as a vehicle for the entry of microplastic into the environment. *Science* **4**, 8060 (2018).
19. Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J. H. & Hur, H. G. Biodegradation of polyethylene: A brief review. *Appl. Biol. Chem.* **63**, 27 (2020).
20. Sen, S. K. & Raut, S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. *J. Environ. Chem. Eng.* **3**, 462–473 (2015).
21. Caulier, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Front. Microbiol.* **10**, 302 (2019).
22. Abriouel, H., Franz, C., Omar, N. B. & Gálvez, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 201–232 (2011).
23. Pecci, Y., Rivardo, F., Martinotti, M. G. & Allegrone, G. LC/ESI-MS/MS characterization of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *J. Mass Spectrom.* **45**, 772–778 (2010).
24. Bartal, A. *et al.* Identifications of surfactin-type biosurfactants produced by *Bacillus* species isolated from rhizosphere of vegetables. *Molecules* **28**, 1172 (2023).
25. Paraszkiwicz, K., Bernat, P., Kuśmierska, A., Chojniak, J. & Plaza, G. Structural identification of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains grown on the media obtained from renewable natural resources. *J. Environ. Manag.* **209**, 65–70 (2018).
26. Koim-Puchowska, B., Klosowski, G., Drózd- Afelt, J. M., Mikulski, D. & Zielińska, A. Influence of the medium composition and the culture conditions on surfactin biosynthesis by a native *Bacillus subtilis* natto BS19 strain. *Molecules* **26**, 2985 (2021).
27. Saeed, Q. *et al.* Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10529 (2021).
28. Shafi, J., Tian, H. & Ji, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **31**, 446–459 (2017).
29. Hashem, A., Tabassum, B. & Abd Allah, E. F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* **26**, 1291–1297 (2019).
30. Mahapatra, S., Yadav, R. & Ramakrishna, W. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *J. Appl. Microbiol.* **132**, 3543–3562 (2022).
31. Jiang, J., Tang, M., Chen, J. & Yang, Y. Identification and degradation characteristics of *Bacillus cereus* strain WD-2 isolated from prochloraz-manganese-contaminated soils. *PLoS ONE* **14**, e0220975 (2019).
32. Plaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K. & Bernat, P. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. *J. Appl. Microbiol.* **4**, 1023–1034 (2015).
33. Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P. & Bernat, P. Elimination and detoxification of 2,4-D by *Umbelopsis isabellina* with the involvement of cytochrome P450. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 2738–2743 (2018).
34. Jasińska, A., Różalska, S., Rusetskaya, V., Slaba, M. & Bernat, P. Microplastic-induced oxidative stress in metolachlor-degrading filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 12978 (2022).
35. Jain, D. K., Thomson, D. K. C., Lee, H. & Trevors, J. T. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **13**, 271–279 (1991).
36. Kuiper, I. *et al.* Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**, 91–113 (2004).
37. Bernat, P. *et al.* Lipid composition in a strain of *Bacillus subtilis*, a producer of iturin A lipopeptides that are active against uropathogenic bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 157 (2016).
38. Paraszkiwicz, K. *et al.* Agricultural potential of rhizospheric *Bacillus subtilis* strains exhibiting varied efficiency of surfactin production. *Sci. Horticult.* **225**, 802–809 (2017).
39. Liess, M., Schäfer, R. B. & Schriever, C. A. The footprint of pesticide stress in communities—Species traits reveal community effects of toxicants. *Sci. Total Environ.* **406**, 484–490 (2008).
40. Fournier, B. *et al.* Impact of a synthetic fungicide (fosetyl-Al and propamocarb-hydrochloride) and a biopesticide (*Clonostachys rosea*) on soil bacterial, fungal, and protist communities. *Sci. Total Environ.* **738**, 139635 (2020).
41. Sánchez-Bayo, F. Indirect effect of pesticides on insects and other *Arthropods*. *Toxics* **9**, 177 (2021).
42. Aguiar, L. M. *et al.* Influence of 2,4-D residues on the soil microbial community and growth of tree species. *Int. J. Phytoremediat.* **22**, 69–77 (2020).
43. Karami, S., Maleki, A. & Karimi, E. Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by bacteria with highly antibiotic-resistant pattern isolated from wheat field soils in Kurdistan, Iran. *Environ. Monit. Assess.* **188**, 659 (2016).
44. Nguyen, T. L. A. *et al.* Correlating biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) to the dynamics of microbial communities originating from soil in Vietnam contaminated with herbicides. *Front. Sustain. Cities* **3**, 692012 (2021).
45. Sanyal, D. & Kulshrestha, G. Metabolism of metolachlor by fungal cultures. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 499–505 (2002).
46. Martins, P. F., Martinez, C. O., Carvalho, G. & Pileggi, M. Selection of microorganisms degrading S-Metolachlor herbicide. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **50**, 153–159 (2007).
47. Munoz, A., Koskinen, W. C., Cox, L. & Sadowsky, M. J. Biodegradation and mineralization of metolachlor and alachlor by *Candida xestobii*. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 619–627 (2011).
48. Saxena, A., Zhang, R. W. & Bollag, J. M. Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 390–396 (1987).
49. Wang, Y. S., Liu, J. C., Chen, W. C. & Yen, J. H. Characterization of acetanilide herbicides degrading bacteria isolated from tea garden soil. *Microb. Ecol.* **55**, 435–443 (2008).
50. Kanissery, R. G., Welsh, A. & Gomez, A. Identification of metolachlor mineralizing bacteria in aerobic and anaerobic soils using DNA-stable isotope probing. *Biodegradation* **29**, 117–128 (2018).
51. Wang, F. *et al.* The influence of polyethylene microplastics on pesticide residue and degradation in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **394**, 0304–3894 (2020).
52. Li, H., Wang, F., Li, J., Deng, S. & Zhang, S. Adsorption of three pesticides on polyethylene microplastics in aqueous solutions: Kinetics, isotherms, thermodynamics, and molecular dynamics simulation. *Chemosphere* **264**, 128556 (2021).
53. Helmut, F., Emden, V. & Hadley, P. Plastic films for polytunnels can prolong the effective residual life of cypermethrin to over 6 months. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **86**, 196–200 (2011).
54. Yang, X. *et al.* Influence of microplastic addition on glyphosate decay and soil microbial activities in Chinese loess soil. *Environ. Pollut.* **242**, 338–347 (2018).
55. Bernat, P., Nykiel-Szymańska, J., Gajewska, E. & Slaba, M. *Trichoderma harzianum* diminished oxidative stress caused by dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in wheat, with insights from lipidomics. *J. Plant. Physiol.* **229**, 158–163 (2018).
56. Hogan, D. A., Buckley, D. H., Nakatsu, C. H., Schmidt, T. M. & Hausinger, R. P. Distribution of the *tfdA* gene in soil bacteria that do not degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Microb. Ecol.* **34**, 90–96 (1997).
57. Aleti, G. *et al.* Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*. *Environ. Microbiol.* **18**, 2634–2645 (2016).

58. DeFilippi, S., Groulx, E. & Megalla, M. Fungal competitors affect production of antimicrobial lipopeptides in *Bacillus subtilis* strain B9–5. *J. Chem. Ecol.* **44**, 374–383 (2018).
59. Calvo, H., Marco, P., Blanco, D., Oria, R. & Venturini, M. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* **63**, 101–110 (2017).
60. Xiao, J. *et al.* Activity of fengycin and iturin A isolated from *Bacillus subtilis* Z-14 on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and soil microbial diversity. *Front. Microbiol.* **12**, 682437 (2021).
61. Aua, H. S., Emenike, C. U. & Fauziah, S. H. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. *Environ. Pollut.* **231**, 1552–1559 (2017).
62. Chandra, P., Enespa, & Singh, D. P. Microplastic degradation by bacteria in aquatic ecosystem. In *Microorganisms for Sustainable Environment and Health* (eds Chowdhary, P. *et al.*) 431–467 (Elsevier, 2020).
63. Yuan, J., Cao, J., Yu, F. & Ma, J. Microbial degradation of polystyrene microplastics by a novel isolated bacterium in aquatic ecosystem. *Sustain. Chem. Pharm.* **30**, 100873 (2022).
64. Tareen, A., Saeed, S., Iqbal, A., Batool, R. & Jamil, N. Biodeterioration of microplastics: A promising step towards plastics waste management. *Polymers* **14**, 2275 (2022).
65. Tarafdar, A. *et al.* Biofilm development of *Bacillus siamensis* ATKU1 on pristine short chain low-density polyethylene: A case study on microbe-microplastics interaction. *J. Hazard. Mater.* **409**, 124516 (2021).

Acknowledgements

The experiments using microscopic techniques were carried out with the help of Łucja Balcerzak Ph.D. at the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques of the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland.

Author contributions

A.W. wrote the main manuscript text. K.P. and A.J. advised on experimental design. A.W. prepared Figs. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; P.B. prepared Figures S1–S3. A.W. and P.B. conducted experiments. K.P. and A.J. supervised the study. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding

This research was funded by the University of Lodz Doctoral School of Exact and Natural Sciences.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41210-5>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

V.6.5. Suplement do artykułu naukowego 1

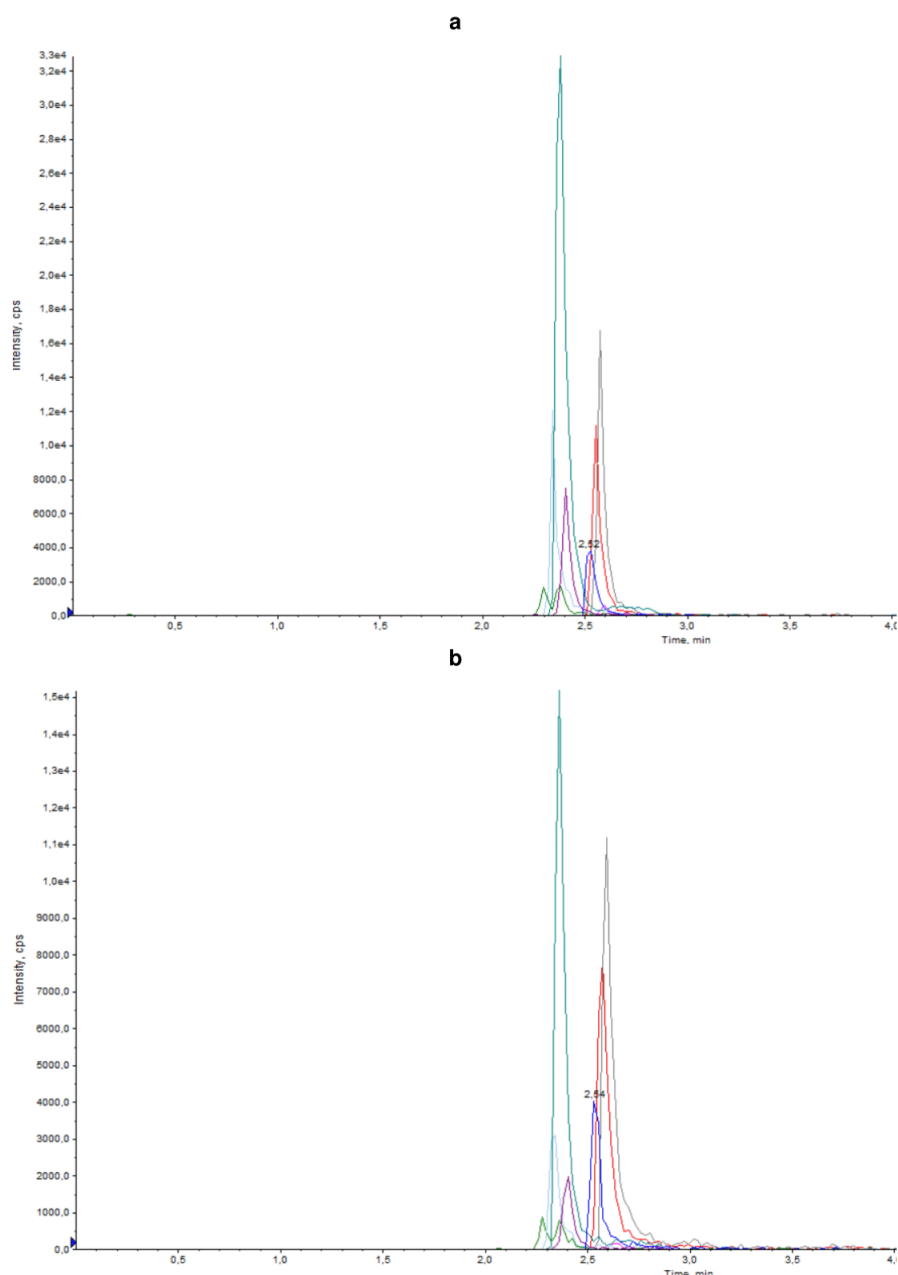


Figure S1. MRM chromatograms of surfactin (RT 2.52-2.59) and iturin (RT 2.29-2.41) (a) standards and (b) isolated from *Bacillus* sp. Kol L6.

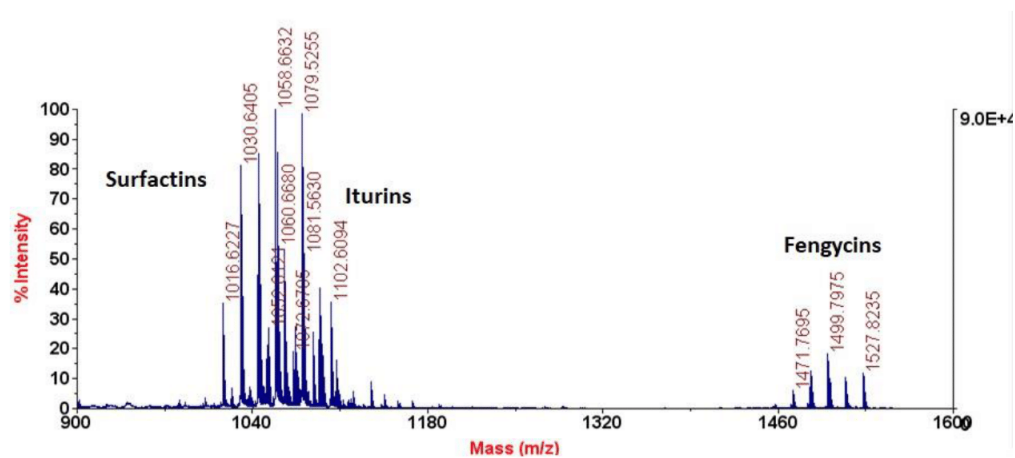


Figure S2. MALDI-TOF/TOF mass spectrum of the lipopeptide mixture presented in an extract prepared by a modified QuEChERS procedure from the culture supernatant of *Bacillus* sp. Kol L6.

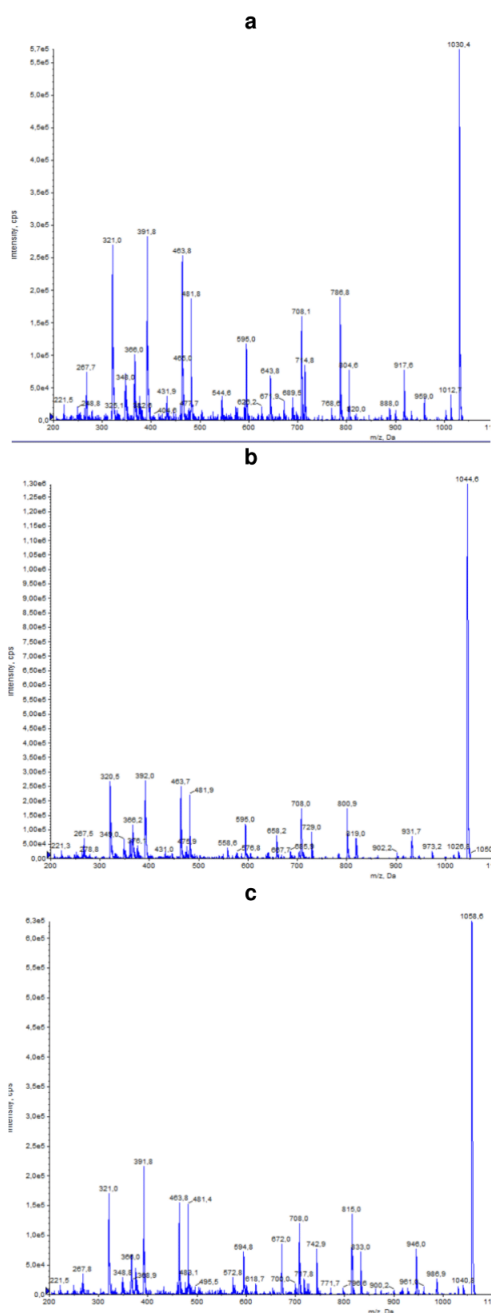


Figure S3. ESI-MS/MS spectra of surfactin homologues: (a) C13, (b) C14 and (c) C15.

V.6.6. Fungicydy

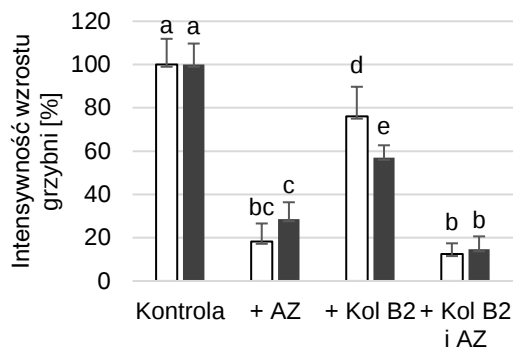
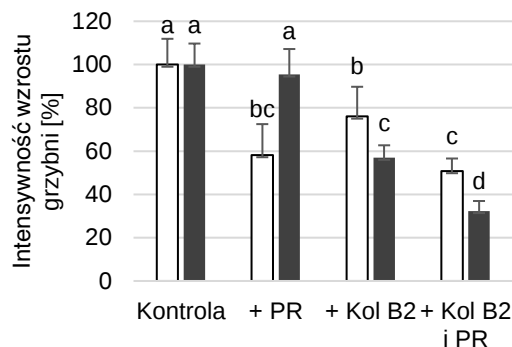
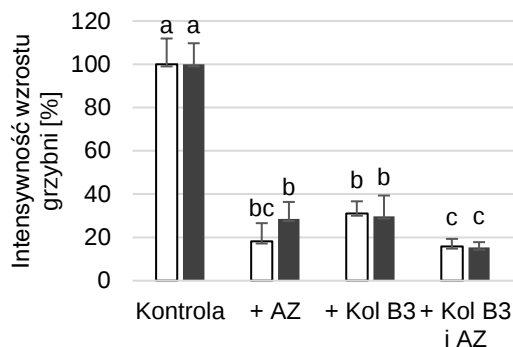
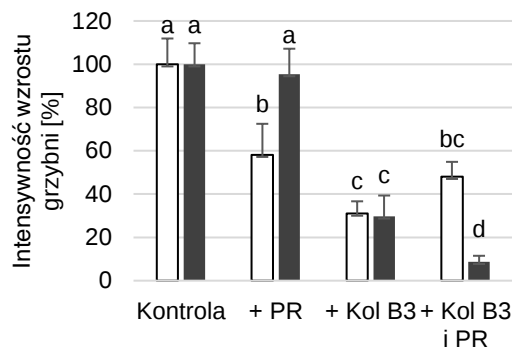
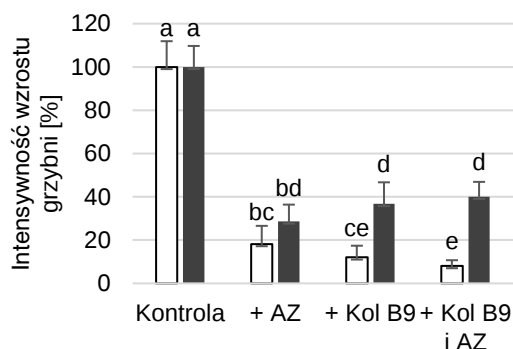
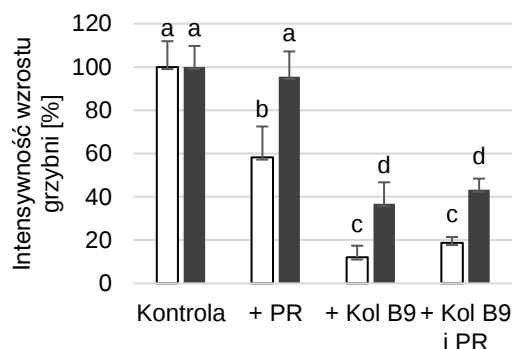
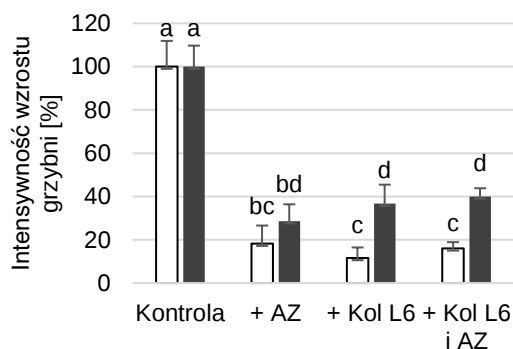
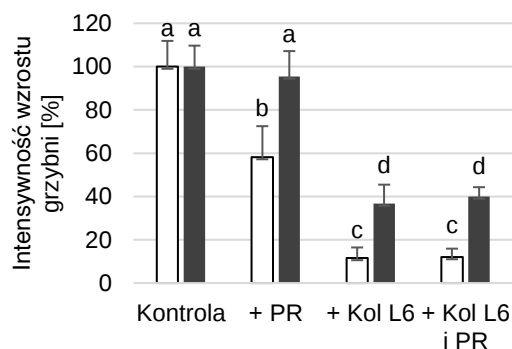
W tej części badań stosowano cztery szczepy bakteryjne z rodzaju *Bacillus*: Kol B2, Kol B3, Kol B9 i Kol L6 (używane jako modele badawcze w V.6.3) oraz dwa szczepy grzybni z rodzaju *Fusarium* – *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Oceniono wpływ fungicydów AZ oraz PR na intensywność wzrostu bakterii (na podstawie gęstości optycznej hodowli; IV.4.1), aktywność przeciwgrzybową w płynnych hodowlach bakteryjno-grzybowych (IV.6.2) oraz produkcję surfaktyny i ituryny zarówno w monokulturach jak i w hodowlach mieszanych (IV.6.2; IV.6.3).

Stwierdzono, że AZ i PR dodawane do hodowli w stężeniach wyjściowych odpowiednio 250 mg L⁻¹ oraz 2,4 g L⁻¹ nie mają negatywnego wpływu na intensywność wzrostu badanych bakterii *Bacillus* (**Tabela 13**). Dodatek fungicydu AZ do monokultury grzybni znacząco ograniczał wzrost obu badanych grzybów, natomiast PR hamował jedynie rozwój grzybni DSM 1094 (**Rycina 29**).

Tabela 13. Intensywność wzrostu bakterii *Bacillus* w hodowlach płynnych z dodatkiem syntetycznych fungicydów AZ (250 mg L⁻¹) i PR (2,4 g L⁻¹) oceniana na podstawie OD hodowli. Wynik uzyskany dla hodowli kontrolnej (bez dodatku fungicydów) przyjęto za 100%.

Lp.	Szczep <i>Bacillus</i>	Intensywność wzrostu bakterii [%] w obecności	
		AZ	PR
1.	Kol B2	99,7 ± 9,9	113,1 ± 5,7
2.	Kol B3	117,1 ± 7,8	105,5 ± 9,2
3.	Kol B9	111,3 ± 9,7	118,6 ± 11,7
4.	Kol L6	95,8 ± 5,9	116,2 ± 15,6

Wpływ AZ i PR na aktywność przeciwgrzybową szczepów *Bacillus* oceniano stosując hodowle mieszane bakteryjno-grzybowe. Stwierdzono, że fungicydy nie ograniczają aktywności przeciwgrzybowej bakterii. Ich obecność w hodowli mieszanej mogła natomiast prowadzić do wzrostu aktywności przeciwgrzybowej lub nie mieć na nią żadnego wpływu. Wzrost aktywności przeciwgrzybowej w obecności AZ stwierdzono w hodowlach mieszanych zawierających grzybnię IM 6525 oraz bakterie Kol B2 lub Kol B3. W przypadku fungicydu PR, zwiększoną aktywność przeciwgrzybową wyznaczono w hodowlach mieszanych zawierających grzybnię DSM 1094 lub IM 6525 oraz bakterie szczepu Kol B2, a także w hodowlach mieszanych zawierających grzybnię IM 6525 oraz bakterie Kol B3.

A) *Bacillus* sp. Kol B2 oraz AZB) *Bacillus* sp. Kol B2 oraz PRC) *Bacillus* sp. Kol B3 oraz AZD) *Bacillus* sp. Kol B3 oraz PRE) *Bacillus* sp. Kol B9 oraz AZF) *Bacillus* sp. Kol B9 oraz PRG) *Bacillus* sp. Kol L6 oraz AZH) *Bacillus* sp. Kol L6 oraz PR

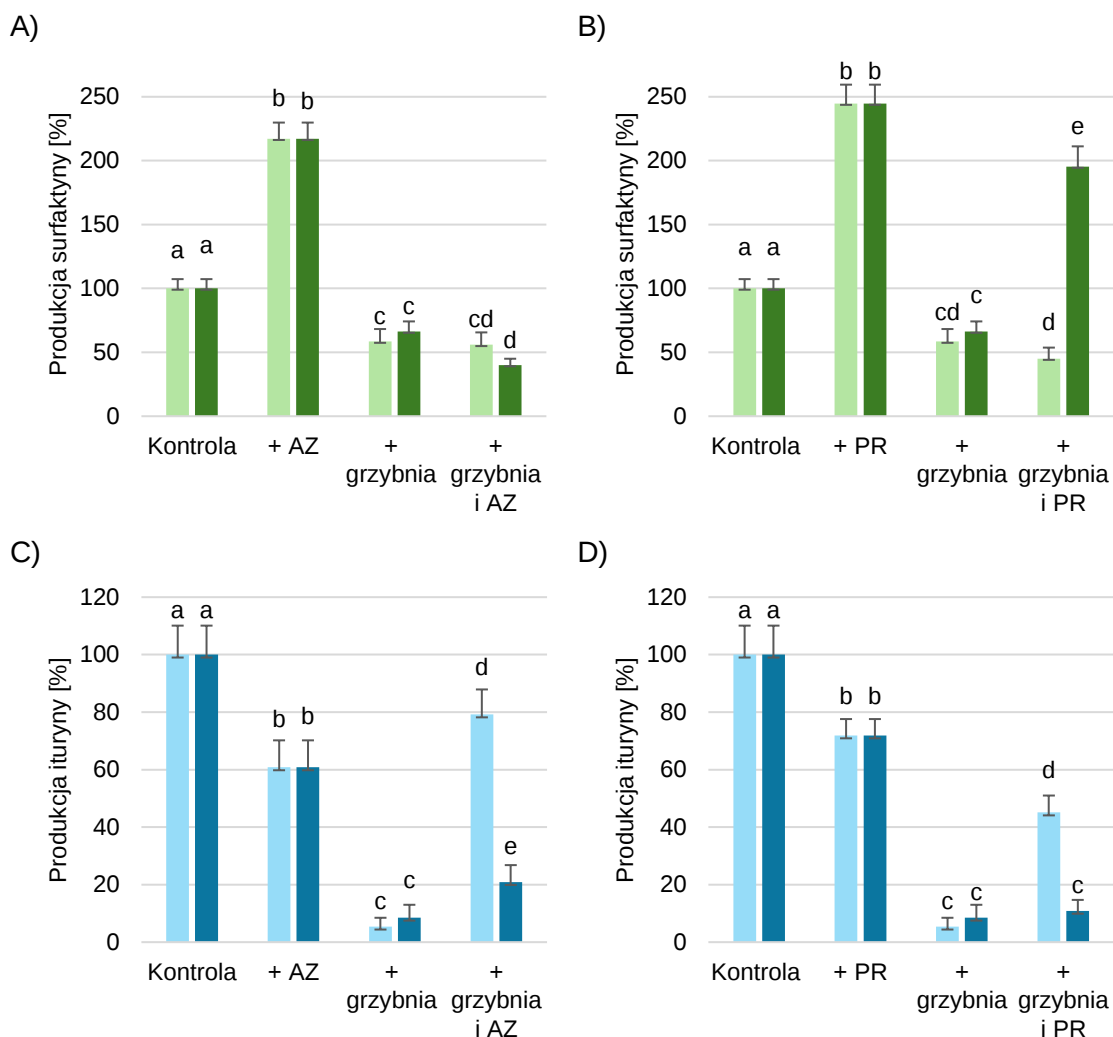
Rycina 29. Intensywność wzrostu grzybnii *F. culmorum* DSM 1094 (oznaczona kolorem białym) oraz *F. sambucinum* IM 6525 (oznaczona kolorem czarnym) w obecności bakterii Kol B2 (A, B), Kol B3 (C, D), Kol B9 (E, F) lub Kol L6 (G, H) w połączeniu z fungycydami AZ 250 mg L⁻¹ (A, C, E, G) lub PR 2,4 g L⁻¹ (B, D, F, H). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki otrzymane dla monokultury grzybnii hodowanej w nieobecności bakterii i fungycydów.

Następnie zbadano wpływ AZ i PR na produkcję surfaktyny i ituryny przez badane szczepy *Bacillus*.

Stwierdzono, że obecność fungicydów w monokulturze *Bacillus* sp. Kol B2 powoduje ponad dwukrotny wzrost produkcji surfaktyny (**Rycina 30A,B**) oraz obniża produkcję ituryny. Poziom ituryny wyznaczony w monokulturze Kol B2 był o 30% i 40% niższy w obecności odpowiednio AZ i PR niż w hodowli kontrolnej (**Rycina 30C,D**).

Oceniono również wpływ tych fungicydów na poziom surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych, zawierających szczep *Bacillus* sp. Kol B2 oraz grzybnię szczepu DSM 1094 lub IM 6525. Uzyskane wyniki porównano z danymi wyznaczonymi dla odpowiednich hodowli mieszanych bez dodatku fungicydów. Stwierdzono, że obecność AZ nie ma znaczącego wpływu na poziom izolowanej z hodowli surfaktyny (**Rycina 30A**), ale znacznie zwiększa poziom ituryny (**Rycina 30C**), zwłaszcza w hodowli zawierającej bakterie Kol B2 oraz grzybnię szczepu DSM 1094.

Z kolei obecność PR powoduje wyraźny wzrost poziomu surfaktyny w hodowli mieszanej zawierającej grzybnię IM 6525 (**Rycina 30B**) oraz istotny wzrost poziomu ituryny w hodowli z grzybnią DSM 1094 (**Rycina 30D**).

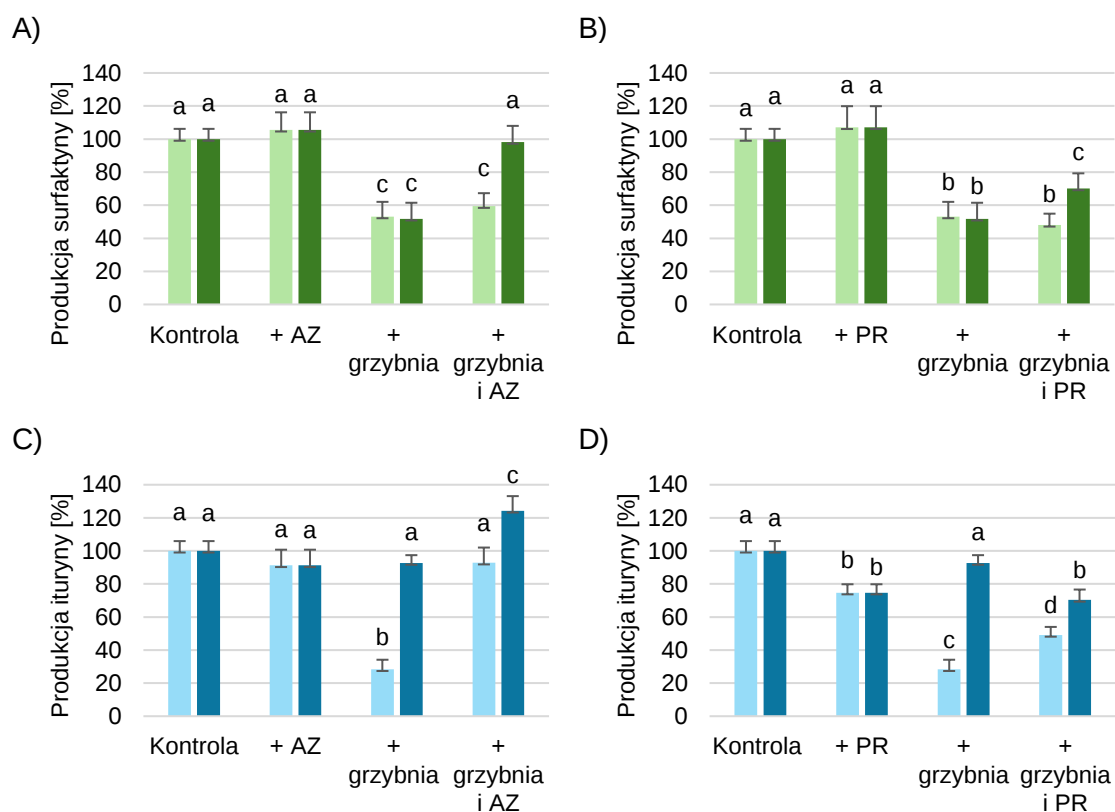


Rycina 30. Intensywność produkcji **surfaktyny** (A,B) i **ituryny** (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. **Kol B2** w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz fungicydów AZ w stężeniu 250 mg L⁻¹ (A,C) lub PR w stężeniu 2,4 g L⁻¹ (B,D). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku fungicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Oceniono wpływ fungicydów AZ i PR na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu *Bacillus* sp. Kol B3. Uzyskane wyniki wykazały, że AZ nie ma istotnego wpływu na produkcję badanych lipopeptydów, natomiast PR choć nie wpływa na poziom surfaktyny, zmniejsza produkcję ituryny o 25,3% (**Rycina 31**).

Następnie przeanalizowano wpływ fungicydów na poziom biosurfaktantów izolowany z hodowli mieszanych (bakteryjno-grzybowych), zawierających bakterie Kol B3 oraz grzybnię DSM 1094 lub IM 6525.

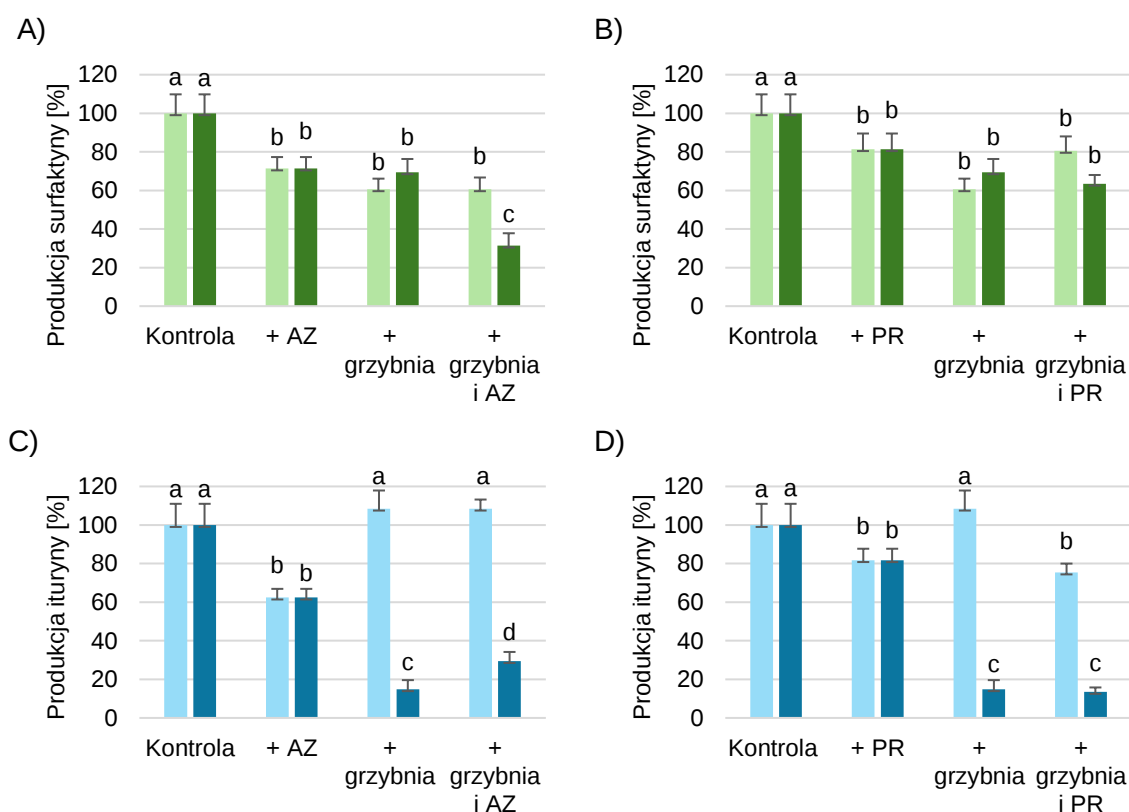
Stwierdzono, że obecność AZ w hodowli Kol B3 zawierającej grzybnię IM 6525 znacząco zwiększa poziom surfaktyny (**Rycina 31A**). Podwyższony poziom ituryny w wyniku obecności AZ stwierdzono natomiast w obu hodowlach mieszanych (**Rycina 31B**). Obecność PR w hodowli Kol B3 zawierającej grzybnię IM 6525 powodowała wzrost poziomu izolowanej z hodowli surfaktyny oraz spadek poziomu ituryny (**Rycina 31B,D**). Natomiast w hodowli Kol B3 zawierającej grzybnię DSM 1094, obecność PR zwiększała poziom izolowanej z ituryny (**Rycina 31D**).



Rycina 31. Intensywność produkcji **surfaktyny** (A,B) i **ituryny** (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. Kol B3 w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz fungicydów AZ w stężeniu 250 mg L⁻¹ (A,C) lub PR w stężeniu 2,4 g L⁻¹ (B,D). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku fungicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Oceniono wpływ fungicydów na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu *Bacillus* sp. Kol B9. Stwierdzono, że zarówno AZ, jak i PR ograniczają produkcję obu ocenianych lipopeptydów przez bakterie tego szczepu (**Rycina 32**).

Zbadano również wpływ tych fungicydów na poziom surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych, zawierających szczep *Bacillus* sp. Kol B9 oraz grzybnie DSM 1094 lub IM 6525. Stwierdzono, że obecność AZ nie miała istotnego wpływu na produkcję surfaktyny i ituryny w hodowli Kol B9 zawierającej grzybnie DSM 1094 (**Rycina 32A,C**). Natomiast w hodowli Kol B9 zawierającej grzybnie IM 6525, obecność AZ prowadziła do obniżenia poziomu surfaktyny (**Rycina 32A**), jednocześnie nieznacznie podnosząc poziom ituryny (**Rycina 32C**). W przypadku fungicydu PR ustalono istotny wpływ jedynie w hodowli mieszanej zawierającej grzybnie DSM 1094, gdzie produkcja ituryny zmniejszyła się o 25% (**Rycina 32D**).

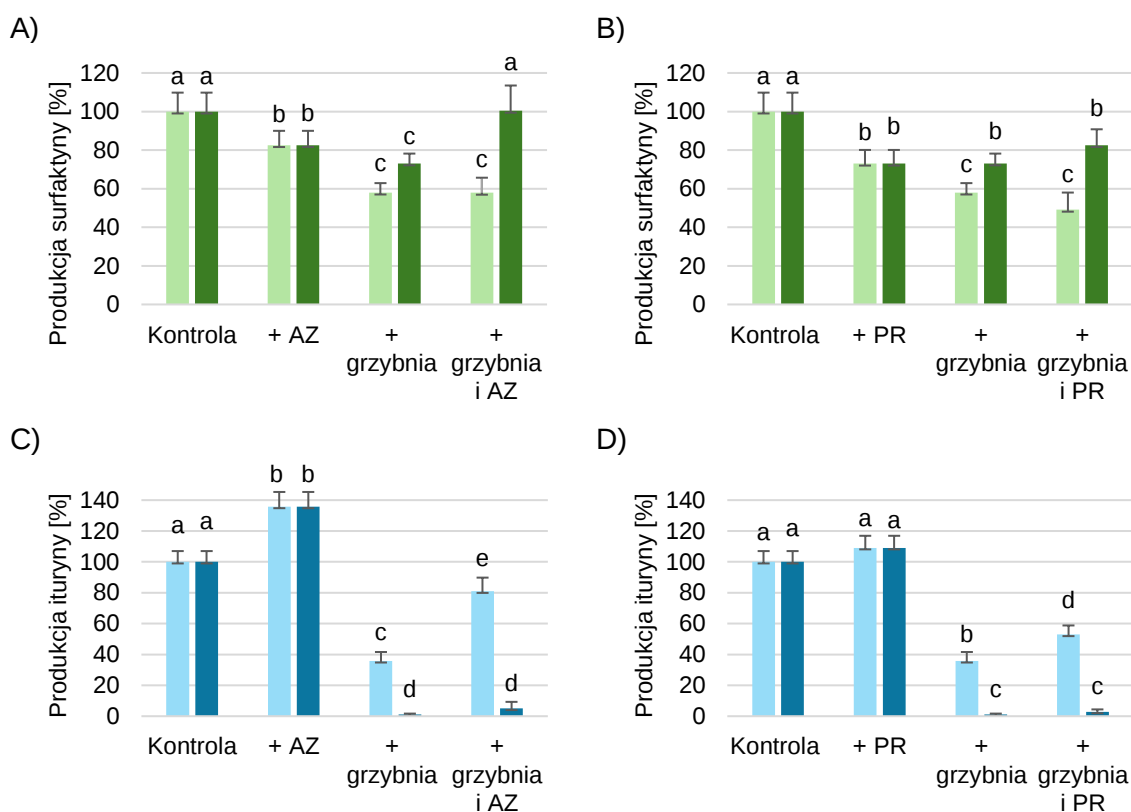


Rycina 32. Intensywność produkcji **surfaktyny** (A,B) i **ituryny** (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. Kol B9 w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz fungicydów AZ w stężeniu 250 mg L⁻¹ (A,C) lub PR w stężeniu 2,4 g L⁻¹ (B,D). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku fungicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Zbadano wpływ AM i PR na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu *Bacillus* sp. Kol L6. Stwierdzono, że dodatek AZ do monokultury Kol L6 powoduje spadek produkcji surfaktyny o 17,4% (**Rycina 33A**) jednocześnie zwiększając produkcję ituryny o 35,8% (**Rycina 33C**). Natomiast dodatek PR do hodowli Kol L6 powoduje obniżenie produkcji surfaktyny o 28% (**Rycina 33B**) nie wpływając istotnie na poziom ituryny (**Rycina 33D**).

Oceniano także wpływ fungicydów na poziom surfaktyny i ituryny wyznaczany w hodowlach mieszanych (bakteryjno-grzybowych), zawierających bakterie szczepu *Bacillus* sp. Kol L6 oraz grzybnie szczepu DSM 1094 lub IM 6525.

Stwierdzono, że obecność AZ miała pozytywny wpływ na poziom surfaktyny w hodowli Kol L6 zawierającej grzybnie IM 6525 (**Rycina 33A**), a także na poziom ituryny w hodowli Kol L6 z zawierającej grzybnie DSM 1094 (**Rycina 33C**). W przypadku fungicydu PR, jedynym stwierdzonym efektem działania tego związku było nieznaczne podniesienie poziomu ituryny w hodowli Kol L6 zawierającej grzybnie DSM 1094 (**Rycina 33D**).



Rycina 33. Intensywność produkcji **surfaktyny** (A,B) i **ituryny** (C,D) przez bakterie *Bacillus* sp. **Kol L6** w obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 (jaśniejszy odcień) lub *F. sambucinum* IM 6525 (ciemniejszy odcień) oraz fungicydów AZ w stężeniu 250 mg L⁻¹ (A,C) lub PR w stężeniu 2,4 g L⁻¹ (B,D). Kontrolę przyjętą za 100% stanowiły wyniki uzyskane dla monokultury bakterii bez dodatku fungicydów. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Podsumowano uzyskane wyniki badań dotyczące wpływu syntetycznych fungicydów na aktywność przeciwgrzybową oraz produkcję biosurfaktantów przez cztery szczepy *Bacillus*.

- 1) Fungicydy AZ i PR mogą pozytywnie wpływać na **aktywność przeciwgrzybową** wyznaczaną w hodowlach szczepów *Bacillus*. Wyznaczono zwiększoną aktywność przeciwgrzybową w obecności:
 - a) fungicydu AZ w hodowlach zawierających grzybnię szczepu IM 6525 oraz bakterie szczepów Kol B2 lub Kol B3; oraz
 - b) fungicydu PR w hodowlach zawierających grzybnię szczepu DSM 1094 lub IM 6525 oraz bakterie szczepu Kol B2, a także w hodowlach zawierających grzybnię IM 6525 i bakterie szczepu Kol B3.
- 2) Fungicydy AZ i PR wywierają różnorodny wpływ na **produkcję biosurfaktantów w monokulturach** szczepów *Bacillus*.
 - a) Wyznaczono wzrost produkcji surfaktyny przez bakterie szczepu Kol B2 pod wpływem działania obu fungicydów, a także wzrost produkcji ituryny przez bakterie szczepu Kol L6 w obecności AZ.
 - b) Wyznaczono spadek produkcji surfaktyny przez bakterie szczepów Kol B9 i Kol L6 oraz na produkcję ituryny przez szczepy Kol B2 i Kol B9 pod wpływem działania obu użytych w badaniach fungicydów. Bakterie szczepu Kol B3 zmniejszyły produkcję ituryny jedynie w obecności PR.
- 3) Fungicydy AZ i PR mają zróżnicowany wpływ na **produkcję surfaktyny i ituryny w hodowlach bakteryjno-grzybowych**, zależny od użytych szczepów bakterii i grzybów.
 - a) W większości układów badanych obecność fungicydów nie ma wpływu lub powoduje wzrost poziomu surfaktyny lub ituryny.
 - b) Wyznaczono spadek poziomu surfaktyny w hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej wyznaczono jedynie w obecności AZ w hodowlach zawierających grzybnię *F. sambucinum* IM 6525 oraz bakterie Kol B2 lub Kol B9.
 - c) Wyznaczono spadek poziomu ituryny w hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej wyznaczono jedynie w obecności PR w hodowli zawierającej grzybnię *F. culmorum* DSM 1094 i bakterie Kol B9 oraz w hodowli zawierającej grzybnię *F. sambucinum* IM 6525 i bakterie Kol B3.

W układzie badanym zawierającym bakterie szczepu *Bacillus* sp. Kol B3, grzybnię *F. sambucinum* IM 6525 oraz fungicyd AZ stwierdzono wzrost aktywności przeciwgrzybowej, wzrost poziomu surfaktyny (do poziomu porównywalnego do wyznaczonego dla monokultury bakteryjnej) oraz wzrost poziomu ituryny (do poziomu wyższego od wyznaczonego dla monokultury bakteryjnej). W związku z tym powyższy układ badany został wybrany do dalszych, poszerzonych badań opisanych w publikacji:

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszekiewicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. *International Journal of Molecular Sciences* 25: 4175.
DOI: 10.3390/ijms25084175

V.6.7. Artykuł naukowy 2

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszekiewicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175.

DOI: [10.3390/ijms25084175](https://doi.org/10.3390/ijms25084175)



Article

The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525

Aleksandra Walaszczyk ¹, Anna Jasińska ² , Przemysław Bernat ² , Sylwia Różalska ² , Lidia Sas-Paszt ³ , Anna Lisek ³ and Katarzyna Paraszkiwicz ^{2,*}

¹ Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, Doctoral School of Exact and Natural Sciences, University of Lodz, 90-136 Lodz, Poland; aleksandra.walaszczyk@edu.uni.lodz.pl

² Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-136 Lodz, Poland; anna.jasinska@biol.uni.lodz.pl (A.J.); przemyslaw.bernat@biol.uni.lodz.pl (P.B.); sylwia.rozalska@biol.uni.lodz.pl (S.R.)

³ Department of Microbiology and Rhizosphere, The National Institute of Horticultural Research, 96-100 Skierniewice, Poland; lidia.sas@inhort.pl (L.S.-P.); anna.lisek@inhort.pl (A.L.)

* Correspondence: katarzyna.paraszkiwicz@biol.uni.lodz.pl



Citation: Walaszczyk, A.; Jasińska, A.; Bernat, P.; Różalska, S.; Sas-Paszt, L.; Lisek, A.; Paraszkiwicz, K. The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 4175. <https://doi.org/10.3390/ijms25084175>

Academic Editor: Antonella Piozzi

Received: 29 February 2024

Revised: 4 April 2024

Accepted: 8 April 2024

Published: 10 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study aimed to evaluate how the combined presence of the synthetic fungicide azoxystrobin (AZ) and the biosurfactant-producing *Bacillus* sp. Kol B3 influences the growth of the phytopathogenic fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. The results showed a noticeable increase in antifungal effectiveness when biotic and abiotic agents were combined. This effect manifested across diverse parameters, including fungal growth inhibition, changes in hyphae morphology, fungal membrane permeability and levels of intracellular reactive oxygen species (ROS). In response to the presence of *Fusarium* and AZ in the culture, the bacteria changed the proportions of biosurfactants (surfactin and iturin) produced. The presence of both AZ and/or *Fusarium* resulted in an increase in iturin biosynthesis. Only in 72 h old bacterial–fungal co-culture a 20% removal of AZ was noted. In the fungal cultures (with and without the addition of the bacteria), the presence of an AZ metabolite named azoxystrobin free acid was detected in the 48th and 72nd hours of the process. The possible involvement of increased iturin and ROS content in antifungal activity of *Bacillus* sp. and AZ when used together are also discussed. Biosurfactants were analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Microscopy techniques and biochemical assays were also used.

Keywords: *Bacillus*; *Fusarium*; azoxystrobin; biosurfactants; surfactin; iturin; biofungicides; biocontrol; antifungal activity

1. Introduction

Phytopathogens, including fungi, are one of the world's most significant agricultural threats [1,2]. Those microorganisms have the capacity to cause devastating diseases in plants, resulting in significant economic losses, weakened food security and damage to the environment [1,2]. Issues such as the growing population, climate change and globalization make the interactions between pathogens, pesticides and the environment increasingly complex [1,3–5]. The understanding of phytopathogen interactions is critical for finding effective ways to reduce their impact on crop yields.

The fungal genus *Fusarium* includes many well-known, widespread, and highly adaptable plant pathogens, posing a threat to global agriculture [2,3,6,7]. These phytopathogens are known to often become resistant to synthetic fungicides, which are used to control them [7]. Therefore, *Fusarium* fungi have emerged as one of the most important contributors

to severe crop diseases, causing significant economic losses and compromising global food security [2,7].

The significant threat posed by phytopathogens demands the usage of fungicides to protect agricultural productivity. Synthetic fungicides have historically played an essential role in preventing fungal infections and reducing the financial losses caused by them. However, in recent years, the use of these chemical agents has raised concerns regarding their environmental impact and the emergence of resistant phytopathogen strains [7]. Since some of the synthetic fungicides have a long half-life, there is a danger of them persisting in the environment for extended periods of time and having a large ecological impact [8]. Moreover, they can influence and alter the activity of soil microorganisms other than phytopathogens, including plant growth-promoting microorganisms (PGPM) such as *Bacillus* bacteria [9,10]. Gram-positive bacteria from the genus *Bacillus* are characterized by their rod-shaped morphology and the ability to form endospores, which enables them to adapt to various environments (e.g., soil and water), even in extreme conditions (such as high temperatures, pH fluctuations or exposure to toxic substances) [11,12]. *Bacillus* bacteria are widely known to produce a variety of secondary metabolites of valuable biotechnological and industrial applications [11,13]. These secondary metabolites include antibiotics, enzymes, cyclic lipopeptide (cLP) biosurfactants, polyketides, and volatile compounds [14]. Their ability to synthesize antifungal compounds in particular has made them frontrunners in developing effective, environmentally friendly biofungicides—alternatives to conventional synthetic fungicides [11,13–15].

Some *Bacillus* strains are capable of producing cLP biosurfactants belonging to surfactin, iturin, and fengycin families [16,17]. Surfactin shows mainly antiviral and antibacterial properties, while iturin and fengycin exhibit mainly antifungal activity [14]. Importantly, studies have shown that biosurfactants produced by different bacilli and other antimicrobial compounds can act synergistically and enhance each other's antimicrobial properties [18–21]. The antifungal mode of action of biosurfactants involves several different mechanisms, including disruption of cell membranes, alteration of membrane permeability, induction of apoptosis, and inhibition of spore germination or antibiotic activity (inhibition of fungal growth by, for example, interfering with cell wall synthesis) [21,22].

Even though biofungicides offer an environmentally friendly alternative to synthetic fungicides, they have several limitations, such as variability in efficacy and reliance on favorable environmental conditions [15]. A possible way of improving biofungicides is harnessing the combined potential of bio- and synthetic-based approaches to the problem. The combined use of biopesticides and synthetic pesticides presents a practical approach to pest management worldwide, allowing for obtaining the advantages of each type of pesticide. There have been reports of farmers integrating both types of pesticide to address pest resistance, optimize efficacy, and meet their production objectives [23–27]. This mixed-use strategy may allow for enhanced pest control while minimizing environmental impact and preserving biodiversity.

Azoxystrobin is a fungicide belonging to the strobilurin class, which has a soil half-life of 180 days in the field and is degraded by 90% after 600 days in the field [28]. AZ operates in the fungal mitochondrion, where it prevents electron transport and energy production [29]. This fungicide is commonly applied to protect many different varieties of plants, e.g., grains, fruits, and vegetables, and shows a wide range of activities against fungal infections from all four taxonomic groups: *Oomycetes*, *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*, and *Basidiomycetes* [29]. According to Wang and co-workers' findings [30], an ongoing AZ application can impact the soil microbiome, which in turn may inhibit important soil nutrient cycling in sustaining productive croplands.

The aim of the study was to compare the impact of AZ and biosurfactant-producing *Bacillus* sp. Kol B3, as well as these two agents combined, on *Fusarium sambucinum* IM 6525 mycelium. We also assessed the effect of AZ and the fungus on *Bacillus* sp. Kol B3 biosurfactant production.

2. Results and Discussion

2.1. Antifungal Activity

The influence of the combined application of AZ and *Bacillus* sp. Kol B3 on *F. sambucinum* IM 6525 mycelial growth in liquid cultures was investigated (Figure 1). The obtained results revealed that both *Bacillus* sp. Kol B3 and AZ strongly inhibited the growth of *F. sambucinum* IM 6525. Interestingly, it was established that in the 72nd hour of cultivation in the presence of either AZ, the bacteria, or both of them used in combination, the fungal growth reached 28.6 ± 5.9 , 29.7 ± 3.6 and $15.3 \pm 2.8\%$, respectively. Thereby, AZ and bacilli used simultaneously, after 72 h of the process, resulted in significantly stronger ($p < 0.05$) antifungal activity than when they were used alone.

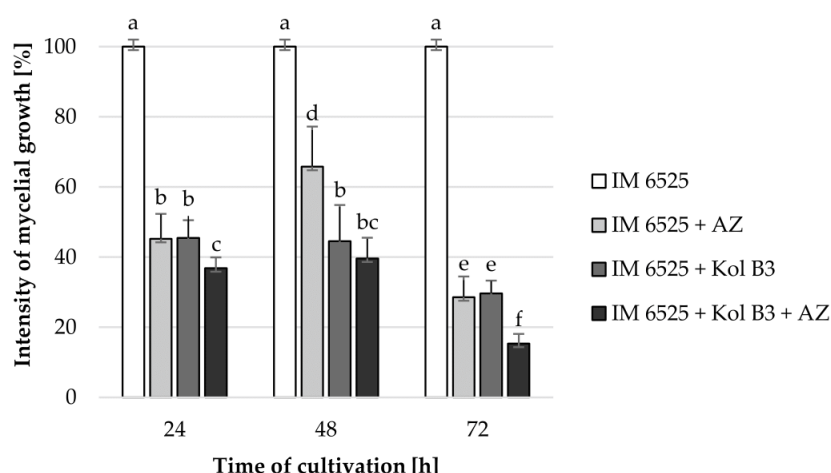


Figure 1. *F. sambucinum* IM 6525 growth intensity [%] in LB medium after 24, 48, and 72 h of cultivation. IM 6525—control fungal culture; IM 6525 + AZ—fungal culture amended with azoxystrobin; IM 6525 + Kol B3—bacterial-fungal co-culture; IM 6525 + Kol B3 + AZ—bacterial-fungal co-culture amended with azoxystrobin. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA tests ($p \leq 0.05$) and denoted by letters from “a” to “f”.

Additionally, *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria growth in the presence of AZ was assessed. It was found that AZ does not have a significant effect on bacterial growth (Table S2).

The enhanced antifungal effect of bacteria from the genus *Bacillus*, when applied in combination with some synthetic pesticides, has been reported before [31–35]. For example, Peng and co-workers [31] studied a possible synergistic effect of *B. subtilis* NJ-18 with flutolanil and difenoconazole fungicides. The obtained results showed that, when combined, the agents demonstrated superior control of wheat sharp eyespot caused by *Rhizoctonia cerealis*. In another study, Liu and co-workers [33] found that the combined application of the biological agent *B. subtilis* H158 and synthetic fungicide strobilurin demonstrated a stronger inhibitory effect of rice sheath blight compared to strobilurin alone. Similarly, Chen and co-workers [35] showed that lipopeptide extracts from *B. velezensis* SDTB038, combined with the fungicide phenamacril, exhibited strong synergistic control against *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, resulting in an 84% reduction in fungal growth.

Several possible mechanisms for the stronger antifungal effect of synthetic and biological control agents have been proposed. When combined with synthetic fungicides, biocontrol agents might be more successful in competing with the fungi for nutrients and space, which can lead to effective control of fungal phytopathogens [36]. Liu and co-workers [37] pointed out several factors that may be involved in the mechanisms of synergistic antifungal effect between the fungicide tebuconazole and *B. subtilis* H158. They suggested that the increased antifungal activity might be a result of tebuconazole stimulat-

ing *B. subtilis* H158 growth, enhancing bacterial persistence, promoting biofilm formation, regulating host defense mechanisms, and suppressing the pathogen's natural resistance. In another study conducted by Liu and co-workers [33], the authors hypothesized that the synergistic effect of strobilurins and *B. subtilis* H158 could be a result of one of two possible mechanisms: (1) the strobilurins may facilitate the formation of *B. subtilis* H158 biofilms, or (2) the fungicide may increase oxidative stress, which may damage fungal cells and result in the excretion of nutrients that promote the growth of *B. subtilis* H158.

2.2. Microscopic Analyses

Laser scanning microscopic inspection revealed a lot of long hyphae with numerous branches in the control *F. sambucinum* IM 6525 cultures (Figure 2(a1)). The addition of AZ resulted in the formation of singular distorted fungal cells (Figure 2(b1)). As shown in Figure 2(c1), the additional presence of *Bacillus* sp. Kol B3 cells in the fungal culture led to visible mycelium fragmentation, and the integrity of the tip of the hyphal cells was disrupted. The co-cultivation of both microorganisms with AZ (Figure 2(d1)) resulted in the formation of very short fungal filaments of a larger circumference than was found in the control mycelium. Compared to the control, no organelles were visible in the hyphae. The observations made during the microscopic analysis confirmed the growth intensity results.

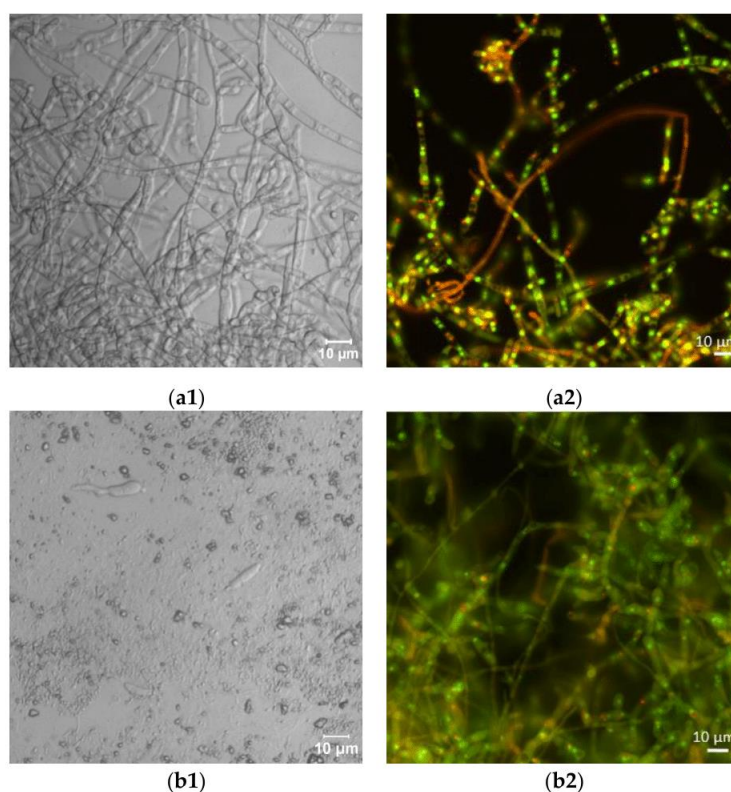


Figure 2. Cont.

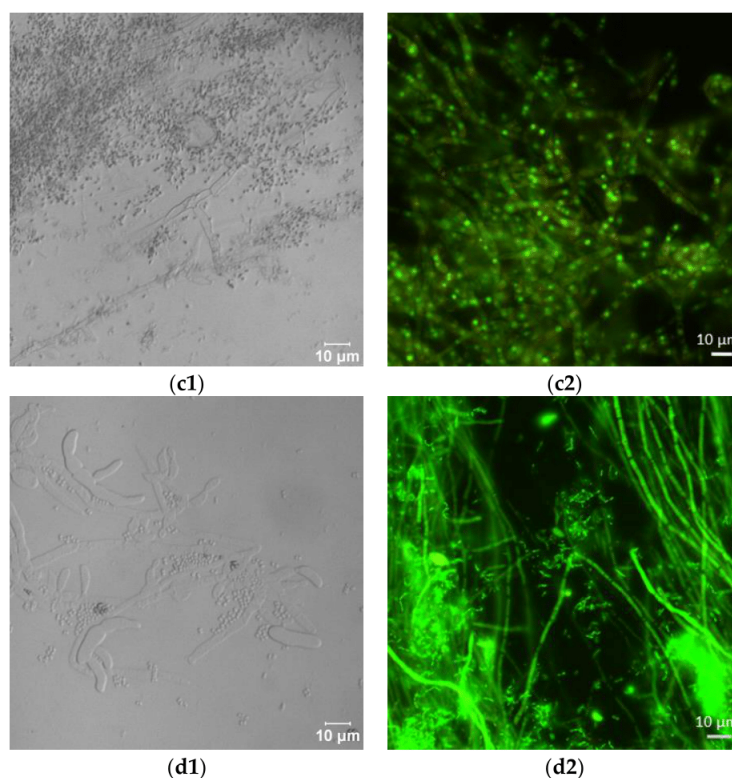


Figure 2. Antifungal activity after 72 h of cultivation. (a1,a2) *F. sambucinum* IM 6525 (control); (b1,b2) *F. sambucinum* IM 6525 + azoxystrobin; (c1,c2) *F. sambucinum* IM 6525 + *Bacillus* sp. Kol B3; and (d1,d2) *F. sambucinum* IM 6525 + *Bacillus* sp. Kol B3 + azoxystrobin. Pictures (a1–d1) were taken using a confocal laser scanning microscope. Pictures (a2–d2) were taken using a fluorescence microscope and the fungal mycelia were stained with a FUN-1 cell stain. Green stained mycelia are dead while alive cells generate red-fluorescent intravacuolar structures.

Next, the effect of the fungicide and the bacteria on *F. sambucinum* IM 6525 viability was assessed using the FUN-1 kit and the fluorescence microscope (Figure 2(a2–d2); Table 1). The viability of the mycelium in the control samples was $93.14 \pm 6.45\%$, while the addition of the fungicide resulted in a significant reduction in fungal viability to $5.03 \pm 1.49\%$. In the samples incubated with the bacteria, a further reduction in fungus viability to $0.18 \pm 0.08\%$ was observed. Of particular interest were samples to which the bacteria and the fungicide were added simultaneously. Under these conditions, all the inspected mycelia were found to be dead.

Table 1. *F. sambucinum* IM 6525 viability after 72 h of cultivation in the presence of AZ and/or *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria. Data are presented as the means $\pm$ SDs. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$). * indicates the values that differ significantly from the controls.

Cultivation Variant	<i>F. sambucinum</i> IM 6525 Viability [%]
IM 6525 (control)	93.14 ± 6.46
IM 6525 + AZ	5.03 ± 1.49 *
IM 6525 + Kol B3	0.18 ± 0.08 *
IM 6525 + AZ + Kol B3	0.00 ± 0.00 *

IM 6525—control fungal culture; IM 6525 + AZ—fungal culture amended with azoxystrobin; IM 6525 + Kol B3—bacterial–fungal co-culture; IM 6525 + Kol B3 + AZ—bacterial–fungal co-culture amended with azoxystrobin.

2.3. Effects of AZ and the Bacteria on Fungal Intracellular ROS Generation

AZ inhibits mitochondrial respiration, reducing ATP synthesis, which leads to oxidative stress in the target fungus [38]. Therefore, the intracellular level of peroxynitrate anions/hydroxyl radical anions in *F. sambucinum* IM 6525 cells exposed to the *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria and/or AZ was determined (Table 2). The H₂DCFDA assay was used as a non-specific indicator.

Table 2. Intracellular ROS generation (HO•/ONOO[−]) in *F. sambucinum* IM 6525 after 24 h exposure to AZ and/or *Bacillus* sp. Kol B3. The results are expressed as a percentage of the green fluorescence area compared to the total hyphal area. Data are presented as the means ± SDs. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$). * indicates the values that differ significantly from the control.

Cultivation Variant	HO•/ONOO [−] [%]
IM 6525 (control)	0.02 ± 0.03
IM 6525 + AZ	3.99 ± 1.38 *
IM 6525 + Kol B3	0.77 ± 0.14 *
IM 6525 + AZ + Kol B3	0.04 ± 0.10

IM 6525—control fungal culture; IM 6525 + AZ—fungal culture amended with azoxystrobin; IM 6525 + Kol B3—bacterial–fungal co-culture; IM 6525 + Kol B3 + AZ—bacterial–fungal co-culture amended with azoxystrobin.

The obtained results revealed that the exposure to AZ alone significantly ($p \leq 0.05$) increased intracellular ROS generation in the hyphae ($3.99 \pm 1.38\%$ compared to $0.02 \pm 0.03\%$ in control culture), indicating the induction of oxidative stress within the fungal cells. The exposure of *F. sambucinum* IM 6525 to the bacteria resulted in an increase in ROS generation ($0.77 \pm 0.14\%$) which was moderate in comparison to AZ. Interestingly, the combination of the bacteria and AZ resulted in a very low (similar to the control) level of intracellular ROS generation in the fungus.

These results are consistent with the microscopic observations and the analysis of fungal cell viability and confirm the thesis about different mechanisms of action of AZ and *Bacillus* sp. Kol B3 on the phytopathogenic fungus *F. sambucinum* IM 6525. The surprisingly low levels of intracellular ROS observed in bacterial–fungal co-culture amended with AZ might result from strong damage to the mycelium, lysis of cell walls, and degeneration of the energy machinery of the cells [29,39]. A similar effect was observed by Guirao-Abad and co-workers [40] when they investigated the influence of two antifungal factors (amphotericin B 43 and micafungin) on *Candida albicans* cells. Both tested factors strongly limited yeast growth; however, increased ROS production was observed only in the case of the addition of amphotericin B 43, while the addition of micafungin (despite a clear fungicidal effect) did not increase the production of intracellular ROS. This was probably due to the high toxicity of the tested agent on the *C. albicans* cells.

2.4. Permeabilization of Fungal Membranes

In order to unravel the mechanisms of combined antifungal activity of AZ and *Bacillus* sp. Kol B3, fungal membrane permeability was assessed (Figure 3).

Without the addition of either AZ or the bacteria, fungal membrane permeability was determined to be 266.8, 171.1, and 455.6 fluorescence intensity/biomass in the 24th, 48th and 72nd hours of cultivation, respectively. The presence of each additive (the bacteria and AZ used alone or in combination) to the fungal cultivation caused a significant increase in *F. sambucinum* IM 6525 membrane permeability. It was established that AZ addition to the fungal cultivations caused the fungal membranes to be 2.4 times more permeable at every investigated stage of cultivation. The *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria proved to be even more effective than AZ ($p \leq 0.05$). As soon as in the 24th hour of cultivation, the fungal membrane permeability reached 1591.1 fluorescence intensity/biomass (6.0 times more than that of control cultivation). The highest fungal membrane permeability was

noted for the 72 h fungal cultivation containing both AZ and bacteria (1957.0 fluorescence intensity/biomass).

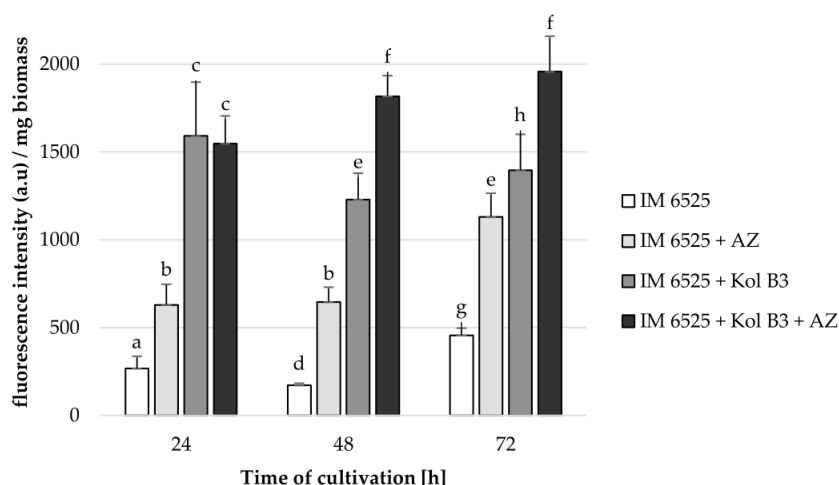


Figure 3. *F. sambucinum* IM 6525 membrane permeabilization [%] in LB medium after 24, 48 and 72 h of cultivation. IM 6525—control fungal culture; IM 6525 + AZ—fungal culture amended with azoxystrobin; IM 6525 + Kol B3—bacterial-fungal co-culture; IM 6525 + Kol B3 + AZ—bacterial-fungal co-culture amended with azoxystrobin. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA tests ($p \leq 0.05$) and denoted by letters from “a” to “h”.

Previous studies had reported changes in the fungal membrane permeability caused by different pesticides [41,42]. AZ does not, however, directly affect the permeability of fungal membranes. Its primary target is the mitochondrial respiratory chain and disruption of energy production [29]. The results presented in this study indicate that AZ also increases the permeability of fungal membranes, which might be caused by increased ROS levels, damaging cell membrane components.

Contrary to AZ, the mode of action of *Bacillus* lipopeptides such as surfactin and iturin involves the disruption of fungal membranes by forming pores or affecting the membrane fluidity [21,22,42,43]. These changes weaken the membrane’s structural integrity, which limits the fungal pathogen’s ability to survive and reproduce.

Considering that AZ operates by preventing energy production in mitochondria [29] while biosurfactants’ main antifungal mechanism of action is the disruption of cell membranes [21,22], it seems reasonable to speculate that the enhanced antifungal effect stems from both of these agents using different modes of action.

2.5. Biosurfactant Production

It was found that surfactin levels decreased with time in every cultivation variant (Figure 4a). The obtained data demonstrated that the addition of AZ to the bacterial culture had no significant effect on surfactin production. A significant ($p \leq 0.05$) decrease (at least 50%) in surfactin production was noted in the bacterial-fungal co-cultures. Interestingly, a mitigative effect of AZ on the decreased surfactin levels was observed. For example, compared to the production of surfactin in a 72 h bacterial cultivation (the control culture), the level of biosurfactant in the presence of mycelium decreased by approximately 60%; however, in the cultivation containing both the mycelium and AZ, the surfactin stayed on the same level as in the control ($p \leq 0.05$).

In the case of iturin, it was found that compared to the 24th hour of cultivation, iturin levels increased more than 3-fold in the 48th and 72nd hour, with the highest production at the 48th hour for each cultivation variant (Figure 4b). A significant ($p \leq 0.05$) influence of both the fungus and AZ on the synthesis of this lipopeptide was found. Compared to control, at the 48th hour of cultivation a 21.7% increase in iturin production was noted for the culture containing the bacteria and AZ. No negative effect of the mycelium presence on bacterial iturin production was observed. In fact, in the 48th hour of cultivation a 17 mg L⁻¹ increase (from 52.5 to 69.5 L⁻¹) in iturin levels in bacterial–fungal co-cultures was recorded. At every evaluated stage of cultivation, the highest iturin levels were noted in bacterial–fungal co-cultures with the addition of AZ (24.1, 78.1, and 68.8 mg L⁻¹ at the 24th, 48th and 72nd hour, respectively). The highest overall iturin level was noted in the bacterial–fungal co-cultures with the addition of AZ in the 48th hour of cultivation (78.1 mg L⁻¹).

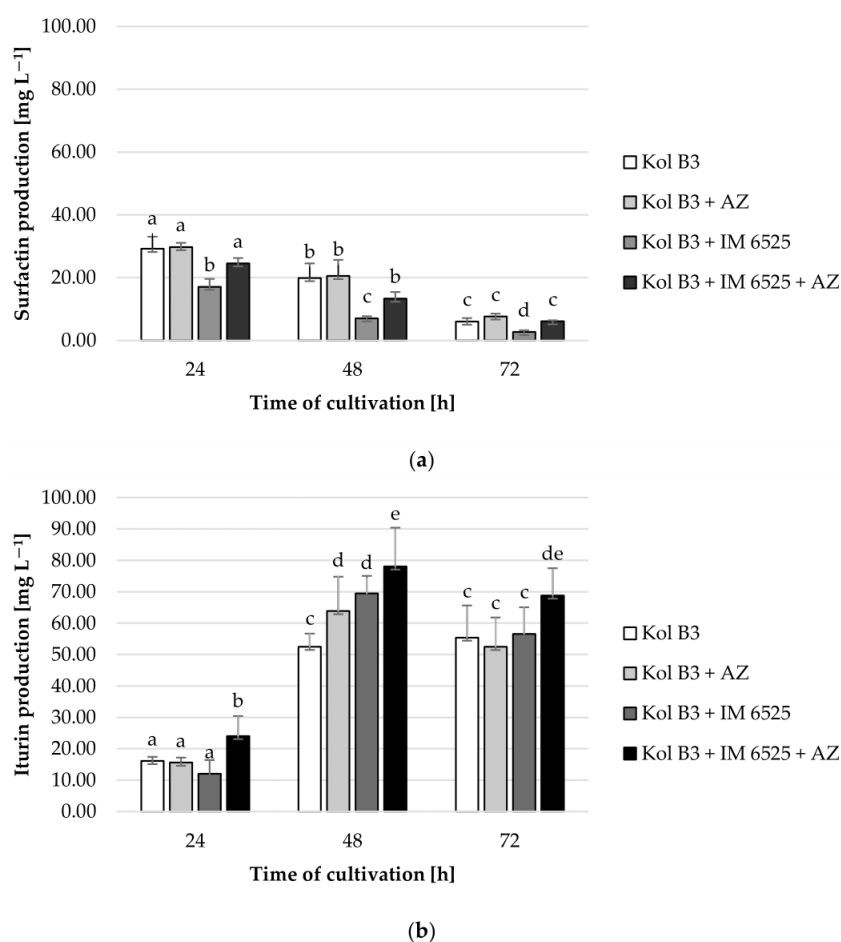


Figure 4. Surfactin (a) and iturin (b) production by *Bacillus* sp. Kol B3 in the presence of *F. sambucinum* IM 6525 and/or AZ. Kol B3—bacterial control culture; Kol B3 + AZ—bacterial culture amended with azoxystrobin; Kol B3 + IM 6525—bacterial–fungal co-culture; Kol B3 + IM 6525 + AZ—bacterial–fungal co-culture amended with azoxystrobin. The significance of the differences between the samples was determined according to ANOVA test ($p \leq 0.05$) and denoted by letters from “a” to “e”.

One of the major explanations for the combined effect of biological and synthetic anti-fungal agents is that synthetic fungicides may alter the production of lipopeptide antibiotics such as surfactin, iturin, and fengycin. There have been reports of synergistic bioactive effects of different types of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus* bacteria. In a study conducted by Wang and co-workers [44], the authors reported enhanced activity of surfactin and fengycin. They found that surfactin played an auxiliary role by improving the inhibitory effect of fengycin B against *Phytophthora infestans* mycelium growth. Similarly, Mihalache and co-workers [45] revealed an enhanced antifungal effect of mycosubtilin when it was used in combination with surfactin. Contrary to our results, Xu and co-workers [36] found that surfactin production was stimulated by the fungicide difenoconazole.

As was previously mentioned, iturin is a biosurfactant exhibiting strong antifungal activity. To the best of our knowledge, there have been no studies of AZ influence on iturin production by *Bacillus* bacteria, even though there have been several studies on improved bacilli action against phytopathogenic fungi in the presence of different synthetic fungicides, including strobilurins [31–35].

The data presented in Figure 4 might be pointing towards a potential shift in metabolic activities in *Bacillus* sp. Kol B3 when incubated together with *F. sambucinum* IM 6525. Specifically, we observed that while the presence of the fungus had a negative effect on the production of surfactin, and no effect on the production of iturin, the additional presence of AZ caused the bacteria to produce more surfactin and iturin.

Based on the obtained data, it could be suggested that the changed profile of bio-surfactant production increases the destabilization of fungal membranes and facilitates penetration of the synthetic fungicide into the hyphae, accelerating the negative effect of AZ on mitochondrial function.

2.6. Fungicide Removal

All the tested cultivation variants showed similar AZ levels ($p \leq 0.05$) compared to their respective controls (Figure 5), with one exception. A 20% decrease in AZ was noted in 72 h cultivation containing both microorganisms. In cultures containing *F. sambucinum* IM 6525 (with and without the addition of the bacteria), in the 48th and 72nd hours of the process, the AZ metabolite named azoxystrobin free acid (identified according to the MRM pair m/z 390/344) was noted. The same compound was also described by Gautam and Fomsgaard [46] as one of AZ metabolites in greenhouse grown lettuce.

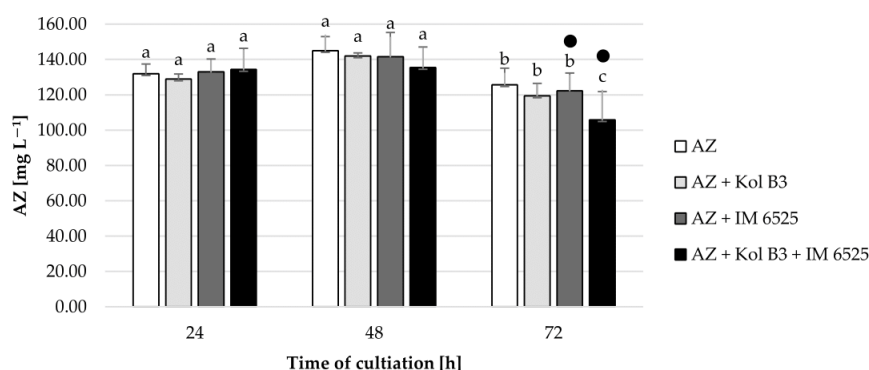


Figure 5. Fungicide AZ removal by *Bacillus* sp. Kol B3 and *F. sambucinum* IM 6525 fungi. AZ—azoxystrobin solution in LB medium, control; AZ + Kol B3—bacterial cultivation amended with azoxystrobin; AZ + IM 6525—fungal cultivation amended with azoxystrobin; AZ + Kol B3 + IM 6525—bacterial–fungal co-culture amended with azoxystrobin. The dot (•) symbol marks the cultivation variants containing AZ metabolite—azoxystrobin free acid. Letters from “a” to “c” indicate the values that differ significantly from each other at $p \leq 0.05$.

According to the review by Feng and co-workers [47], among strobilurin-degrading microbes, bacteria play the most critical role. Even though the *Bacillus* sp. Kol B3 strain examined in this study did not exhibit promising AZ degradation properties, the other strains belonging to the genus *Bacillus* had been previously reported to be able to remove strobilurin fungicides [48].

To the best of our knowledge, there are no reports on *Fusarium* strains being able to degrade or transform azoxystrobin. Considering that the *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria did not show significant ability to remove AZ ($p \leq 0.05$), it can be suggested that this bacterial strain might be used as an effective biocontrol agent in soils polluted with AZ. Moreover, those two agents might act synergistically against fungal phytopathogens.

3. Materials and Methods

3.1. Microbial Strains

The *Bacillus* sp. Kol B3 strain, isolated from *Vinca minor* L. rhizosphere in Kolnica village (Greater Poland voivodeship) in Poland, was used in the study. The strain was confirmed to be able to produce surfactin, iturin, and fengycin by using MALDI-TOF/TOF (Figure S1).

Fusarium sambucinum IM 6525, obtained kindly from Lidia Sas-Paszt (The National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland), was isolated from infected raspberry roots.

The strains are stored in the strain collection of the Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, University of Lodz, Poland.

3.2. Identification of Bacterial Strain Kol B3

Extraction of DNA from bacterial colonies was carried out by means of a commercial GeneMatrix Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit for isolating DNA from bacteria and yeast (EURx). DNA concentration in the samples was measured with a spectrophotometer at $\lambda = 260$ nm. For further analyses, the samples were diluted to a final concentration of 10 ng/ μ L.

Identification of bacterial strain Kol B3 was based on the analysis of the *tuf* gene sequence. The *tuf* gene was amplified using *tuf*GPF/*tuf*GPR primers [49]. Reaction mixtures (20 μ L) consisted of 1 $\times$ buffer for PCR, 0.2 mM of each nucleotide, 0.2 μ M of each primer, 0.5 U of DreamTaqTM polymerase (ThermoScientific[®], Waltham, MA, USA) and 20 ng of DNA. Amplification of the *tuf* gene was carried out in 35 cycles (95 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s, 55 $^{\circ}$ C $\times$ 1 min, and 72 $^{\circ}$ C $\times$ 30 s). The identification of the bacterial strain was based on comparison of the obtained sequences with NCBI data using the BLAST tool (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, ML, USA). Based on the analysis of the *tuf* gene sequence, the bacterial isolate Kol B3 was found to belong to the genus *Bacillus* (Table S1).

3.3. Chemicals

The fungicide used in the preparation of cultivations (Amistar[®] 250 SC; 250 mg L⁻¹ azoxystrobin) was obtained from Target S.A. (Kartoszyo, Poland). Surfactin, iturin and AZ standards, chemicals used for surfactants and fungicide extraction by QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) techniques, propidium iodide, sodium dodecyl sulfate (SDS), HEPES and PBS buffers, and Luria–Bertani (LB) medium were obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Chemicals used in the analysis performed by the techniques of liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A. (Gliwice, Poland). The FUNTM-1 Cell Stain used to determine fungal viability was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

3.4. Submerged Cultures Preparation

Liquid LB medium was inoculated with 1% of 24 h old *Bacillus* sp. Kol B3 and 10% of 24 h old *F. sambucinum* IM 6525 liquid precultures (prepared in LB medium). Then, Amistar® 250 SC was added to obtain the final concentration $250 \mu\text{g L}^{-1}$ of AZ. Appropriate biotic controls (bacterial or fungal cultures with and without AZ addition) and abiotic controls (with no microorganism addition) were also prepared. The cultures in the final volume of 30 mL were incubated for 24, 48, and 72 h in 100 mL Erlenmeyer flasks. All cultivations and all abiotic controls were incubated on a rotary shaker (120 rpm) at 28 °C.

3.5. Antifungal Activity Analysis

The antifungal activity was assessed based on the fungal biomass and expressed as a percentage of the fungal control culture. The biomass was separated from the extracellular fluid by vacuum filtration using previously weighed filter papers No. 1 (Sartorius, Göttingen, Germany). The mycelium was then dried at 60 °C to reach a constant weight.

3.6. Effect of AZ on *Bacillus* sp. Kol B3 Growth

The influence of AZ on *Bacillus* sp. Kol B3 growth was determined for 48 h liquid cultivations, prepared as described above. First, serial dilutions were prepared, and agar plates were inoculated with 100 μL of the final dilution. The plates were incubated for 48 h at 28 °C. Then, CFUs were counted. Additionally, the bacterial biomass was separated from the supernatant by vacuum filtration using previously weighed filter papers (Sartorius, Germany). The bacteria were then dried at 60 °C to reach a constant weight.

3.7. Biosurfactant Extraction and Analysis

Surfactin and iturin were isolated by the QueChERS technique and analysed quantitatively by LC-MS/MS, as described by Walaszczyk and co-workers [50]. Fengycin production was confirmed by MALDI-TOF/TOF techniques according to the method described by Paraszkiwicz and co-workers [51].

3.8. Fungicide Extraction and Analysis

The fungicide AZ and its metabolites were extracted using the modified QueChERS method described by Nykiel-Szymańska and co-workers [52]. Cultivations (20 mL) were transferred into 50-mL Falcon tubes. Next, glass beads and 10 mL of acetonitrile were added. The cultivations were then homogenized twice for 4 min at 25 m s^{-1} (Retsch, Ball Mill MM 400). To the obtained homogenate, four salts (2 g of MgSO_4 , 0.5 g of NaCl, 0.5 g of $\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.25 g of $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \times 1.5\text{H}_2\text{O}$) were added and the extraction was carried out using the QueChERS method. Then, the sample was centrifuged for 5 min at $2000 \times g$ and the top layer was collected for LC-MS/MS analysis. Measurement of AZ was performed using the ExionLC AC UHPLC system (Sciex, Framingham, MA, USA) and a 4500 Q-Trap mass spectrometer (Sciex, USA) with an ESI source. For reversed-phase chromatographic analysis, 5 μL of the lipid extract was injected onto a Kinetex C18 column (50 mm $\times$ 2.1 mm, particle size: 5 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of 5 mM ammonium formate in water (A) and 5 mM ammonium formate in methanol (B). The solvent gradient was initiated at 20% B, increased to 90% B in 2 min and was maintained at 90% B for 2 min, before returning to the initial solvent composition after 2 min. The column temperature was maintained at 35 °C and the flow rate was $500 \mu\text{L min}^{-1}$. Nitrogen was applied as a curtain gas, a nebulising gas, and a turbo gas. The instrumental settings for tandem mass spectrometry were as follows: spray voltage 5500 V; curtain gas (CUR) 25; nebulizer gas (GS1) 50; turbo gas (GS2) 50; and ion source temperature 500 °C. Data analysis was performed with the Analyst tm v1.6.3 software (Sciex, USA).

Tandem mass spectrometry for the identification as well as quantification of AZ species was performed using standard and multiple reaction monitoring (MRM) pairs m/z 404/372, 404/344.

3.9. Fungal Membrane Permeability Assay

To assess fungal membranes permeabilization in the presence of the *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria and the AZ fungicide, a method described previously by Litwin and co-workers [53] was used. Briefly, (1) 1 mL of liquid cultivation was added to an Eppendorf tube and centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. (2) The supernatant was removed followed by the addition of 1 mL of PBS and 2 μ L of propidium iodide (0.1 mg/mL concentration). (3) The sample was vortexed for 30 s and incubated in darkness for 5 min. (4) The sample was centrifuged again, the supernatant was removed, and 1 mL of PBS was added. The process was repeated twice. (5) The sample was placed on a 24-hole plate and fluorescence was measured at λ_{ex} = 540 nm and λ_{em} = 630 nm. The fluorescence of the supernatant was also measured in order to control for the noise in the sample. (6) The fungal biomass from the sample was filtrated, dried, and weighted. The results were expressed as fluorescence intensity divided by a milligram of dried biomass.

3.10. Microscopic Analysis

The evaluation of the microscopic morphology of the fungi was carried out after 72 h of cultivation. Cultures were harvested and spread on a microscope slide. Microscopic images were captured using an LSM 5 (Zeiss, Oberkochen, Germany) confocal laser scanning microscope equipped with a Nomarski DIC and Plan-Neofluar 40 $\times$ objective lenses.

3.11. Fungal Viability

From 72 h cultures, 1 mL was collected and centrifuged (8000 $\times$ g). The supernatant was discarded and the mycelium was resuspended in 1 mL of 10 mM HEPES buffer containing 2% glucose and centrifuged again. The mycelia were then resuspended in 0.5 mL of HEPES buffer and 1 μ L of FUN-1 dye was added. After 15 min incubation in the dark, microscopic preparations were made. Photographs of the fungal cells were taken using an Axiovert 200 M fluorescence microscope (Zeiss), excitation 485/emission 505 and 560. The viability was calculated as a ratio between red and green fluorescence multiplied by 100. The average of all images obtained for the control was taken as 100%. Also, the results were presented as microphotographs.

3.12. Measurement of Intracellular Peroxynitrate Anion/Hydroxyl Radical Anion

The measurement of the overall intracellular levels of peroxynitrate anion/hydroxyl radical anion ($\text{HO}\bullet/\text{ONOO}^-$) was conducted using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) assay, as previously described by Nykiel-Szymańska and co-workers [54]. Briefly, 1 mL of 24 h long *F. sambucinum* IM 6525 cultivations were centrifuged at 10,000 $\times$ g for 10 min. Then, the supernatant was discarded and the biomass was re-suspended in 1 mL of phosphate-buffer (PBS) containing 50 mM H_2DCFDA (previously dissolved in dimethyl sulfoxide, DMSO). The samples were left to incubate for 15 min in the dark at room temperature. Next, the mycelium was washed twice with PBS and was then placed on a microscope slide. Imaging was performed using a confocal laser scanning microscope (LSM510 Meta, Zeiss) in conjunction with an Axiovert 200 M (Zeiss, Germany) inverted fluorescence microscope equipped with a Plan Apochromat objective (63/1.25 oil). Excitation was achieved using a 488 argon laser line, and the emission spectrum was recorded using a 530 nm bandpass filter. The results were expressed as a percentage of the green fluorescence area relative to the total hyphal area.

3.13. Statistical Analysis

All experiments were conducted at least in triplicate. The obtained results were presented as their mean values. An average standard deviation (SD) was calculated. One-way ANOVA analysis of variance was performed using Microsoft[®] Excel[®] for Microsoft 365 MSO, version 2401 (Microsoft Corporation, Washington, DC, USA). Differences at $p \leq 0.05$ were considered significant.

4. Conclusions

Fusarium fungi pose a significant threat to global agriculture, causing devastating diseases in various crops. In this study, we investigated the combined antifungal effect of the commonly used fungicide azoxystrobin (AZ) in combination with biosurfactant producing *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria against the phytopathogenic *Fusarium sambucinum* IM 6525 strain. The aim of the study was to evaluate how the *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria and AZ work together against the fungus and gain deeper understanding of the mechanisms involved in antifungal activity. It has been suggested in the past that combining synthetic chemicals with biological control agents could reduce the rates of synthetic pesticide application [55,56].

The obtained results showed an increased ($p \leq 0.05$) antifungal effect when using both fungicidal agents together. This effect was evident through fungal growth inhibition, changes in hyphae morphology, increased fungal membrane permeability, and modifications of intracellular ROS levels. Interestingly, while AZ did not significantly affect surfactin production, it had a mitigative effect on the decrease in surfactin levels in the presence of mycelium. In contrast, iturin production was not negatively affected by the presence of mycelium, and the addition of AZ resulted in a notable increase in the iturin levels at subsequent cultivation stages.

The findings highlight the complex interactions between synthetic fungicides, biosurfactant producing bacteria, and fungal phytopathogens. Notably, the protective effect of AZ on the surfactin levels in the presence of fungi as well as the positive influence of AZ on iturin production provide potential avenues for optimizing biosurfactant production in the presence of both synthetic fungicides and phytopathogenic fungal strains.

The presented data revealed the potential of biosurfactant producing bacteria to improve the antifungal effect of strobilurin fungicides. Considering all of the results, it is reasonable to speculate that *Bacillus* sp. Kol B3 and AZ might enhance each other's antifungal activity against the studied fungus. However, proving that enhancement or synergism is responsible for this phenomenon requires further investigation.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms25084175/s1>.

Author Contributions: A.W. wrote the main manuscript text. K.P., A.J. and P.B. advised on experimental design. A.W. prepared Figures 1–5 and S1 and Tables 1, 2 and S2; P.B. prepared Figure S1; A.L. prepared Table S1; A.W., P.B., S.R. and A.L. conducted experiments; and K.P. and L.S.-P. supervised the study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Lodz Doctoral School of Exact and Natural Sciences.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The fungal strain used in the study was initially identified by Paweł Trzciński at the Department of Microbiology and Rhizosphere, The National Institute of Horticultural Research, Skierniewice, Poland. The experiments using microscopic techniques were carried out with the help of Łucja Balcerzak at the Laboratory of Microscopic Imaging and Specialized Biological Techniques of the Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Savary, S.; Willocquet, L.; Pethybridge, S.J.; Esker, P.; McRoberts, N.; Nelson, A. The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops. *Nat. Ecol. Evol.* **2019**, *3*, 430–439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Ekwomadu, T.I.; Mwanza, M. *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. *Agriculture* **2023**, *13*, 1810. [\[CrossRef\]](#)
3. Nikitin, D.A.; Ivanova, E.A.; Semenov, M.; Zhelezova, A.D.; Ksenofontova, N.; Tkachakhova, A.K.; Kholodov, V.A. Diversity, Ecological Characteristics and Identification of Some Problematic Phytopathogenic *Fusarium* in Soil: A Review. *Diversity* **2023**, *15*, 49. [\[CrossRef\]](#)
4. Timmusk, S.; Nevo, E.; Ayele, F.; Noe, S.; Niinemets, Ü. Fighting *Fusarium* Pathogens in the Era of Climate Change: A Conceptual Approach. *Pathogens* **2020**, *9*, 419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Singh, B.K.; Delgado-Baquerizo, M.; Egidi, E.; Guirado, E.; Leach, J.E.; Liu, H.; Trivedi, P. Climate Change Impacts on Plant Pathogens, Food Security and Paths Forward. *Nat. Rev. Microbiol.* **2023**, *21*, 640–656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Aoki, T.; O'Donnell, K.; Geiser, D.M. Systematics of Key Phytopathogenic *Fusarium* Species: Current Status and Future Challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* **2014**, *80*, 189–201. [\[CrossRef\]](#)
7. Rampersad, S. Pathogenomics and Management of *Fusarium* Diseases in Plants. *Pathogens* **2020**, *9*, 340. [\[CrossRef\]](#)
8. Ruomeng, B.; Meihao, O.; Siru, Z.; Shichen, G.; Yixian, Z.; Junhong, C.; Ruijie, M.; Yuan, L.; Gezhi, X.; Xingyu, C.; et al. Degradation Strategies of Pesticide Residue: From Chemicals to Synthetic Biology. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2023**, *8*, 302–313. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Ali, S.; Ullah, M.I.; Sajjad, A.; Shakeel, Q.; Hussain, A. Environmental and Health Effects of Pesticide Residues. *Sustain. Agric. Rev.* **2020**, *48*, 311–336. [\[CrossRef\]](#)
10. Prashar, P.; Shah, S. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. *Sustain. Agric. Rev.* **2016**, *19*, 331–361. [\[CrossRef\]](#)
11. Fira, D.; Dimkić, I.; Berić, T.; Lozo, J.; Stanković, S. Biological Control of Plant Pathogens by *Bacillus* Species. *J. Biotechnol.* **2018**, *285*, 44–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Hashem, A.; Tabassum, B.; Fathi Abd Allah, E. *Bacillus subtilis*: A Plant-Growth Promoting Rhizobacterium That Also Impacts Biotic Stress. *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 1291–1297. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Khan, M.; Salman, M.; Ahmad Jan, S.; Khan Shinwari, Z. Biological Control of Fungal Phytopathogens: A Comprehensive Review Based on *Bacillus* Species. *MOJBM* **2021**, *6*, 90–92. [\[CrossRef\]](#)
14. Caulier, S.; Nannan, C.; Gillis, A.; Licciardi, F.; Bragard, C.; Mahillon, J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 435128. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Sellitto, V.M.; Zara, S.; Fracchetti, F.; Capozzi, V.; Nardi, T. Microbial Biocontrol as an Alternative to Synthetic Fungicides: Boundaries between Pre- and Postharvest Applications on Vegetables and Fruits. *Fermentation* **2021**, *7*, 60. [\[CrossRef\]](#)
16. Jahan, R.; Bodratti, A.M.; Tsianou, M.; Alexandridis, P. Biosurfactants, Natural Alternatives to Synthetic Surfactants: Physico-chemical Properties and Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, *275*, 102061. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Markande, A.R.; Patel, D.; Varjani, S. A Review on Biosurfactants: Properties, Applications and Current Developments. *Bioresour. Technol.* **2021**, *330*, 124963. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. McKenna, P.P.; Naughton, P.J.; James, T.; Ternan, N.G.; Lemoine, P.; Banat, I.M. Microbial Biosurfactants: Antimicrobial Activity and Potential Biomedical and Therapeutic Exploits. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Naughton, P.J.; Marchant, R.; Naughton, V.; Banat, I.M. Microbial Biosurfactants: Current Trends and Applications in Agricultural and Biomedical Industries. *J. Appl. Microbiol.* **2019**, *127*, 12–28. [\[CrossRef\]](#)
20. Sana, S.; Datta, S.; Biswas, D.; Sengupta, D. Assessment of Synergistic Antibacterial Activity of Combined Biosurfactants Revealed by Bacterial Cell Envelope Damage. *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, *1860*, 579–585. [\[CrossRef\]](#)
21. Li, T.; Li, L.; Du, F.; Sun, L.; Shi, J.; Long, M.; Chen, Z. Activity and Mechanism of Action of Antifungal Peptides from Microorganisms: A Review. *Molecules* **2021**, *26*, 3438. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Zhao, H.; Shao, D.; Jiang, C.; Shi, J.; Li, Q.; Huang, Q.; Rajoka, M.S.R.; Yang, H.; Jin, M. Biological Activity of Lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 5951–5960. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Liu, K.; Qi, Z.; Tan, L.; Yang, C.; Hu, C. Mixed Use of Chemical Pesticides and Biopesticides among Rice–Crayfish Integrated System Farmers in China: A Multivariate Probit Approach. *Agriculture* **2023**, *13*, 1590. [\[CrossRef\]](#)
24. Gould, F.; Brown, Z.S.; Kuzma, J. Wicked Evolution: Can We Address the Sociobiological Dilemma of Pesticide Resistance? *Science* **2018**, *360*, 728–732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Shishir, A.; Bhowmik, A.A.; Akanda, N.R.; Al Mamun, A.; Khan, S.N.; Hoq, M.M. Efficacy of Indigenous *Bacillus Thuringiensis* Strains for Controlling Major Vegetable Pests in Bangladesh. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* **2015**, *25*, 729–734.
26. Abtew, A.; Niassy, S.; Affognon, H.; Subramanian, S.; Kreiter, S.; Garzia, G.T.; Martin, T. Farmers' Knowledge and Perception of Grain Legume Pests and Their Management in the Eastern Province of Kenya. *Crop Prot.* **2016**, *87*, 90–97. [\[CrossRef\]](#)
27. Constantine, K.L.; Kansime, M.K.; Mugambi, I.; Nunda, W.; Chacha, D.; Rware, H.M.F.; Mulema, J.; Lamontagne-Godwin, J.; Williams, F.; Edgington, S.; et al. Why Don't Smallholder Farmers in Kenya Use More Biopesticides? *Pest Manag. Sci.* **2020**, *76*, 3615–3625. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Lewis, K.A.; Tziliavakis, J.; Warner, D.J.; Green, A. An International Database for Pesticide Risk Assessments and Management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2016**, *22*, 1050–1064. [\[CrossRef\]](#)

29. Joseph, R.S.I. *Metabolism of Azoxystrobin in Plants and Animals*; Elsevier eBooks: Amsterdam, The Netherlands, 1999; pp. 265–278. [\[CrossRef\]](#)
30. Wang, X.; Lu, Z.; Miller, H.; Liu, J.; Hou, Z.; Liang, S.; Zhao, X.; Zhang, H.; Borch, T. Fungicide Azoxystrobin Induced Changes on the Soil Microbiome. *Appl. Soil Ecol.* **2020**, *145*, 103343. [\[CrossRef\]](#)
31. Peng, D.; Li, S.; Chen, C.; Zhou, M. Combined Application of *Bacillus Subtilis* NJ-18 with Fungicides for Control of Sharp Eyespot of Wheat. *Biol. Control* **2014**, *70*, 28–34. [\[CrossRef\]](#)
32. Peng, D.; Luo, K.; Jiang, H.; Deng, Y.; Bai, L.; Zhou, X. Combined Use of *Bacillus subtilis* Strain B-001 and Bactericide for the Control of Tomato Bacterial Wilt. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *73*, 1253–1257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Liu, L.; Liang, M.; Li, L.; Sun, L.; Xu, Y.; Gao, J.; Wang, L.; Hou, Y.; Huang, S. Synergistic Effects of the Combined Application of *Bacillus subtilis* H158 and Strobilurins for Rice Sheath Blight Control. *Biol. Control* **2018**, *117*, 182–187. [\[CrossRef\]](#)
34. Ji, X.; Li, J.; Meng, Z.; Zhang, S.; Dong, B.; Qiao, K. Synergistic Effect of Combined Application of a New Fungicide Fluopimomide with a Biocontrol Agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for Management of Gray Mold in Tomato. *Plant Dis.* **2019**, *103*, 1991–1997. [\[CrossRef\]](#)
35. Chen, Q.; Gao, J.; Yang, X.; Qiu, Y.; Wang, Y.; Wang, H. Synergistic Effects of *Bacillus velezensis* SDTB038 and Phenamacril on *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato. *Plant Pathol.* **2023**, *72*, 1453–1462. [\[CrossRef\]](#)
36. Xu, X.; Wang, Y.; Lei, T.; Sohail, M.A.; Wang, J.; Wang, H. Synergistic Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* SDTB009 and Difenconazole on *Fusarium* Wilt of Tomato. *Plant Dis.* **2022**, *106*, 2165–2171. [\[CrossRef\]](#)
37. Liu, L.; Zhao, K.; Cai, L.; Zhang, Y.; Fu, Q.; Huang, S. Combination Effects of Tebuconazole with *Bacillus subtilis* to Control Rice False Smut and the Related Synergistic Mechanism. *Pest Manag. Sci.* **2023**, *79*, 234–243. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Crupkin, A.C.; Fulvi, A.B.; Iturburu, F.G.; Medici, S.; Mendieta, J.; Panzeri, A.M.; Menone, M.L. Evaluation of Hematological Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage in the Cichlid *Australoheros Facetus* Exposed to the Fungicide Azoxystrobin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2021**, *207*, 111286. [\[CrossRef\]](#)
39. Guirao-Abad, J.P.; Sánchez-Fresneda, R.; Alburquerque, B.; Hernández, J.A.; Argüelles, J.-C. ROS Formation Is a Differential Contributory Factor to the Fungicidal Action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida Albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* **2017**, *307*, 241–248. [\[CrossRef\]](#)
40. Avis, T. Antifungal Compounds That Target Fungal Membranes: Applications in Plant Disease Control. *Can. J. Plant. Pathol.* **2007**, *29*, 323–329. [\[CrossRef\]](#)
41. Sant, D.G.; Tupe, S.G.; Ramana, C.V.; Deshpande, M.V. Fungal Cell Membrane-Promising Drug Target for Antifungal Therapy. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 1498–1510. [\[CrossRef\]](#)
42. Rong, S.; Xu, H.; Li, L.; Chen, R.; Gao, X.; Xu, Z. Antifungal Activity of Endophytic *Bacillus safensis* B21 and Its Potential Application as a Biopesticide to Control Rice Blast. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2020**, *162*, 69–77. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Liu, J.; Hagberg, I.; Novitsky, L.; Hadj-Moussa, H.; Avis, T.J. Interaction of Antimicrobial Cyclic Lipopeptides from *Bacillus subtilis* Influences Their Effect on Spore Germination and Membrane Permeability in Fungal Plant Pathogens. *Fungal Biol.* **2014**, *118*, 855–861. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Wang, Y.; Zhang, C.; Liang, J.; Wang, L.Y.; Gao, W.; Jiang, J.; Chang, R. Surfactin and Fengycin B Extracted from *Bacillus pumilus* W-7 Provide Protection against Potato Late Blight via Distinct and Synergistic Mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 7467–7481. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Mihalache, G.; Balaes, T.; Gostin, I.; Stefan, M.; Coutte, F.; Krier, F. Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* as New Biocontrol Products against Fusariosis in Ornamental Plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *25*, 29784–29793. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Gautam, M.; Fomsgaard, I.S. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Quantification of Azoxystrobin and Its Metabolites, Azoxystrobin Free Acid and 2-Hydroxybenzonitrile, in Greenhouse-Grown Lettuce. *Food. Addit. Contam. Part A* **2017**, *34*, 2173–2180. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Feng, Y.; Huang, Y.; Zhan, H.; Bhatt, P.; Chen, S. An Overview of Strobilurin Fungicide Degradation: Current Status and Future Perspective. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 466926. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Clinton, B.; Warden, A.C.; Haboury, S.; Easton, C.J.; Kotsonis, S.; Taylor, M.C.; Oakeshott, J.G.; Russell, R.J.; Scott, C. Bacterial Degradation of Strobilurin Fungicides: A Role for a Promiscuous Methyl Esterase Activity of the Subtilisin Proteases? *Biocatal. Biotransformation* **2011**, *29*, 119–129. [\[CrossRef\]](#)
49. Caamaño-Antelo, S.; Fernández-No, I.C.; Böhme, K.; Ezzat-Alnakip, M.; Quintela-Baluja, M.; Barros-Velázquez, J.; Calo-Mata, P. Genetic Discrimination of Foodborne Pathogenic and Spoilage *Bacillus* spp. Based on Three Housekeeping Genes. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 288–298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Walaszczyk, A.; Jasińska, A.; Bernat, P.; Płaza, G.; Paraszkiwicz, K. Microplastics Influence on Herbicides Removal and Biosurfactants Production by a *Bacillus* sp. Strain Active against *Fusarium culmorum*. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 14618. [\[CrossRef\]](#)
51. Paraszkiwicz, K.; Bernat, P.; Siewiera, P.; Moryl, M.; Sas Paszt, L.; Trzciński, P.; Jałowicki, Ł.; Płaza, G. Agricultural Potential of Rhizospheric *Bacillus subtilis* Strains Exhibiting Varied Efficiency of Surfactin Production. *Sci. Hortic.* **2017**, *225*, 802–809. [\[CrossRef\]](#)
52. Nykiel-Szymańska, J.; Stolarek, P.; Bernat, P. Elimination and Detoxification of 2,4-D by *Umbelopsis Isabellina* with the Involvement of Cytochrome P450. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *25*, 2738–2743. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Litwin, A.; Bernat, P.; Nowak, M.; Słaba, M.; Różalska, S. Lipidomic Response of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria Bassiana* to Pyrethroids. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 21319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

54. Nykiel-Szymańska, J.; Różalska, S.; Bernat, P.; Ślaba, M. Assessment of Oxidative Stress and Phospholipids Alterations in Chloroacetanilides-Degrading *Trichoderma* spp. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *184*, 109629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Peshin, R.; Bandral, R.S.; Zhang, W.; Wilson, L.; Dhawan, A.K. Integrated Pest Management: A Global Overview of History, Programs and Adoption. In *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*, 1st ed.; Peshin, R., Dhawan, A.K., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009; Volume 1, pp. 1–49. [[CrossRef](#)]
56. Ons, L.; Bylemans, D.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A. Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

V.6.8. Suplement do artykułu naukowego 2

Table S1. Identification of bacterial strain Kol B3 based on the similarity of the *tuf* gene sequence to the sequences stored in the NCBI database.

Bacterial strain	Sequence length [bp]	The genus/species of bacteria with the greatest similarity to the NCBI sequence	NCBI Sequence No.	Degree of Similarity [%]	Identification
Kol B3	720	<i>B. velezensis</i>	CP031694.1	100	<i>Bacillus</i> sp.
		<i>B. amyloliquefaciens</i>	CP014700.1	100	
		<i>B. methylotrophicus</i>	LN999829.1	100	

Table S2. The influence of AZ on *Bacillus* sp. Kol B3 bacteria growth.

Cultivation variant	Dried biomass [mg]	Bacterial CFU
Kol B3 (control)	21 ± 2	10.03 ± 5.95 × 10 ⁸
Kol B3 + AZ	22 ± 2	11.53 ± 7.01 × 10 ⁸

Kol B3 (control) – biotic control of *Bacillus* sp. Kol B3; Kol B3 + AZ – cultivation of *Bacillus* sp. Kol B3 amended with azoxystrobin.

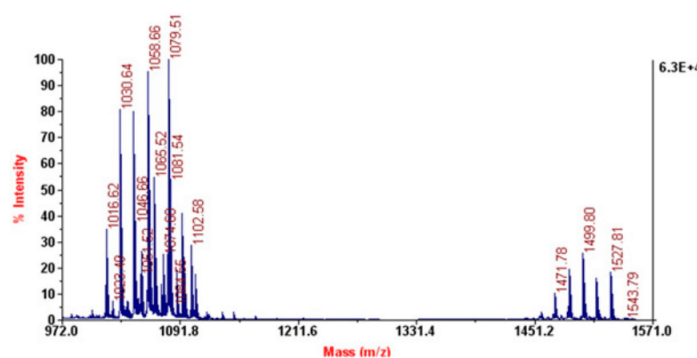


Figure S1. MALDI-TOF/TOF mass spectrum of the lipopeptide mixture presented in an extract prepared by a modified QuEChERS procedure from the culture supernatant of *Bacillus* sp. Kol B3.

V.7. Produkcja cLP i aktywność przeciwgrzybowa w hodowlach mieszanych zawierających dwa szczepy *Bacillus*, prowadzonych w obecności syntetycznych fungicydów

A) Ocena produkcji biosurfaktantów w hodowlach zawierających dwa szczepy *Bacillus*

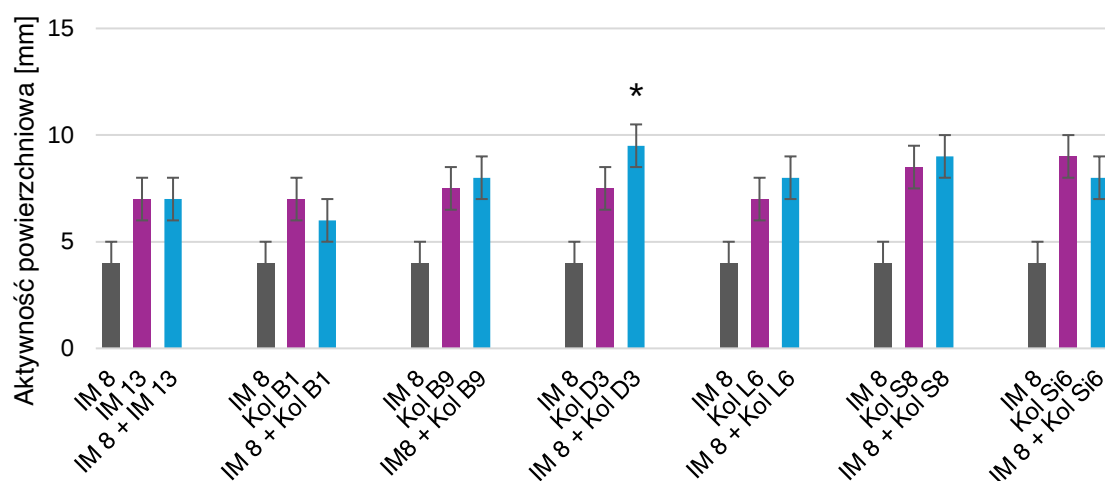
W tej części pracy jako modele badawcze stosowano 11 szczepów *Bacillus*. Analizie poddano:

- 28 hodowli *Bacillus/Bacillus* złożonych z jednego nadproducenta cLP-Bc (szczepy IM 13, Kol B1, Kol B8, Kol D3, Kol L6, Kol S8 lub Kol Si6) oraz jednego szczepu nie produkującego biosurfaktantów lub produkującego niewielkie ilości tych związków (szczepy DSM 3257, IM 8, Kol D10 lub KAS 2.7);
- oraz dziewięć hodowli *Bacillus/Bacillus* złożonych z dwóch nadproducentów cLP-Bc.

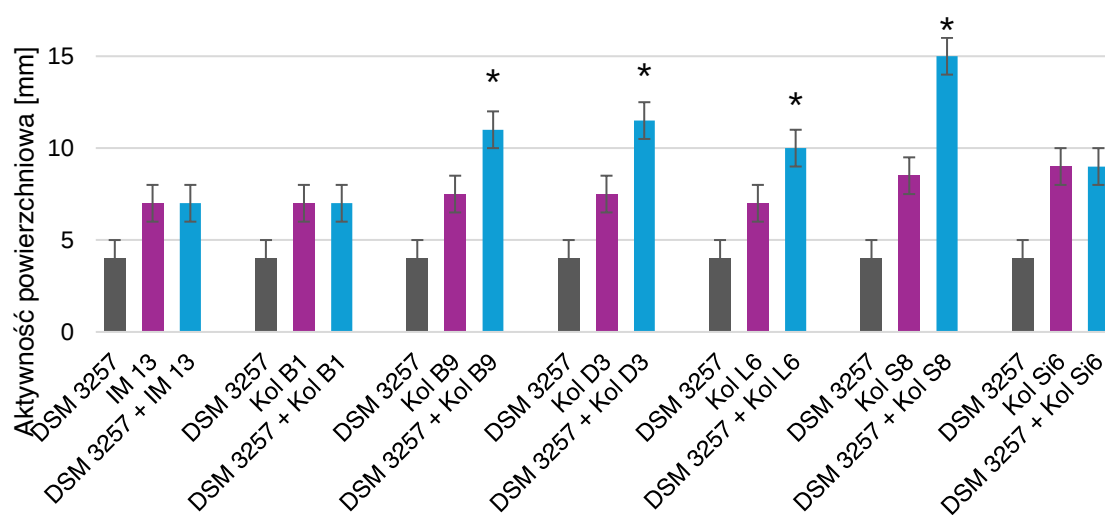
Przyjęto, że nadproducent cLP wytwarza dany biosurfaktant na poziomie równym lub większym niż 15 mg L^{-1} . Hodowle płynne *Bacillus/Bacillus* w podłożu LB przygotowano według metody opisanej w punkcie IV.3.2. Produkcję biosurfaktantów oceniano wyznaczając aktywność powierzchniową płynów pohodowlanych testem DCT (IV.5.1).

Stwierdzono, że w przypadku 10 z 37 badanych hodowli mieszanych *Bacillus/Bacillus* aktywność powierzchniowa płynów pohodowlanych jest wyższa, niż w przypadku monokultur (**Rycina 34**). Wśród nich, cztery hodowle mieszane charakteryzujące się najwyższym wzrostem aktywności powierzchniowej (w porównaniu do wyników wyznaczonych w monokulturach) zawierały bakterie szczepu *B. subtilis* DSM 3257 (**Rycina 34B**). Te cztery układy zostały wybrane do dalszych badań mających na celu ocenę aktywności przeciwgrzybowej.

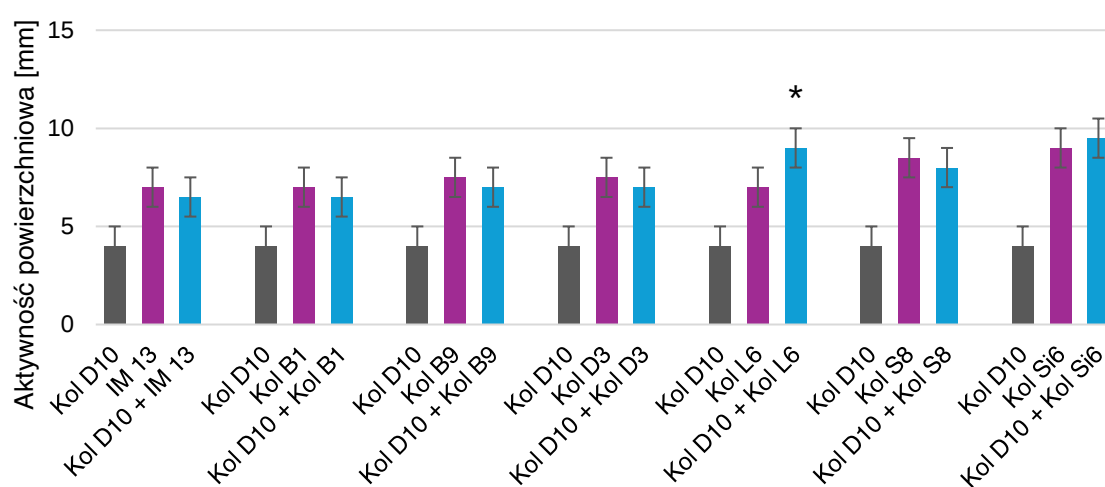
A)



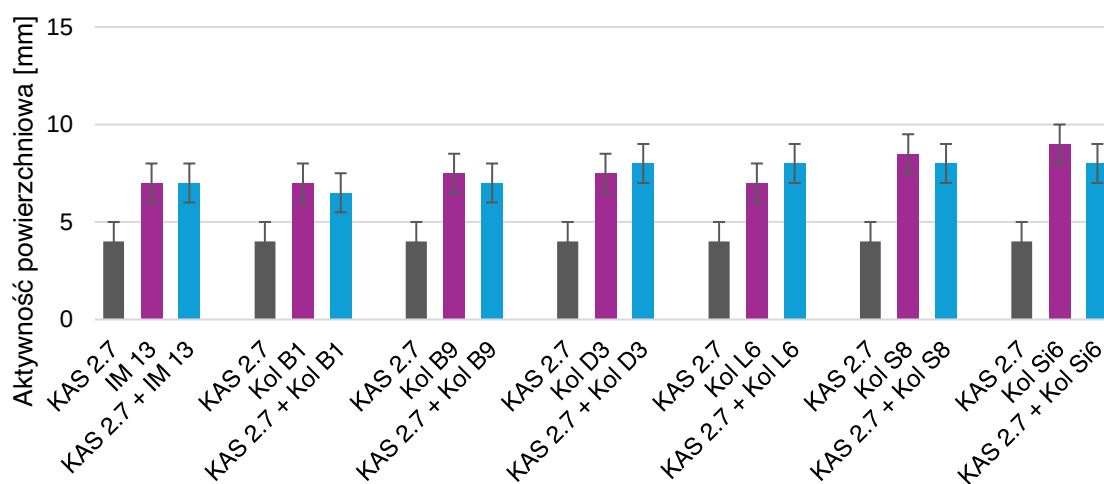
B)



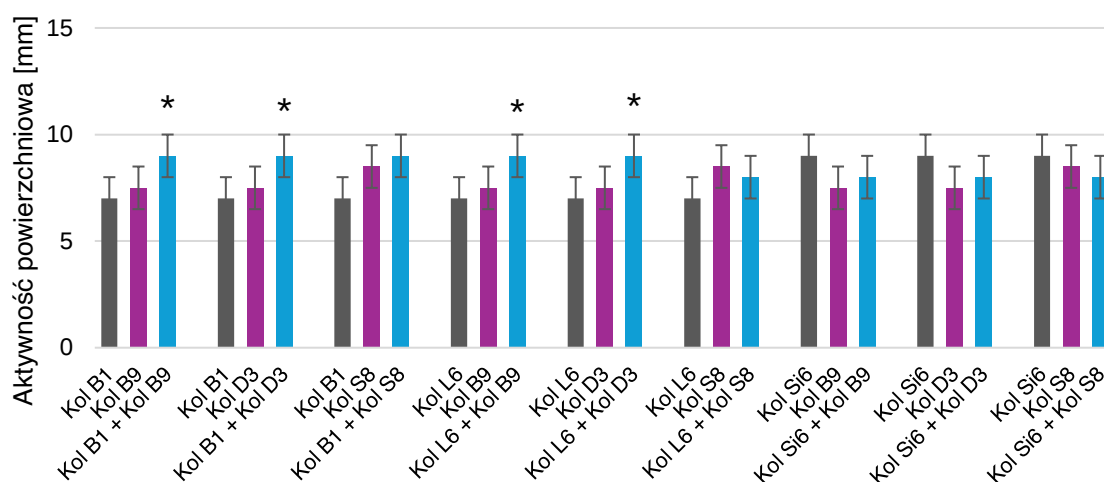
C)



D)



E)



Rycina 34. Aktywność powierzchniowa płynów pochodzących z kultur *Bacillus* i hodowli mieszanych *Bacillus/Bacillus* (zawierających bakterie dwóch szczepów *Bacillus*) uzyskanych po 72-godz. inkubacji.

A-D – hodowle złożone z jednego nadproducenta cLP oraz jednego szczepu nie produkującego biosurfaktantów lub produkującego niewielkie ilości tych związków;

E – hodowle złożone z dwóch nadproducentów cLP.

Symbolem gwiazdki (*) oznaczono hodowle mieszane wykazujące wyższą aktywność powierzchniową od odpowiednich monocult.

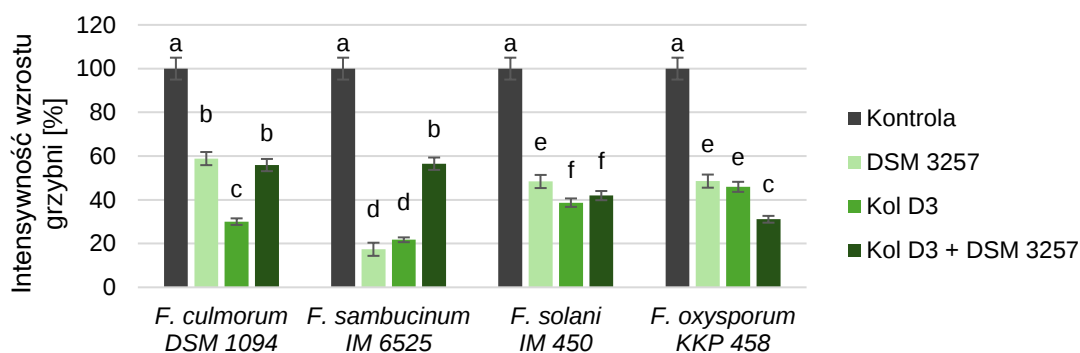
B) Ocena aktywności przeciwgrzybowej hodowli mieszanych *Bacillus/Bacillus*

Aktywność przeciwgrzybową czterech par szczepów *Bacillus* (wybranych na podstawie wyników opisanych w poprzedniej sekcji tego rozdziału) oceniono wobec czterech szczepów z rodzaju *Fusarium*: *F. culmorum* DSM 1094, *F. sambucinum* IM 6525, *F. solani* IM 450 oraz *F. oxysporum* KKP 458. W tym celu wykorzystano płynne hodowle mieszane bakteryjno-grzybowe w podłożu LB przygotowane według metody opisanej w podrozdziale IV.3 oraz dokonano analizy aktywności przeciwgrzybowej na podstawie suchej biomasy grzybni (IV.6.2).

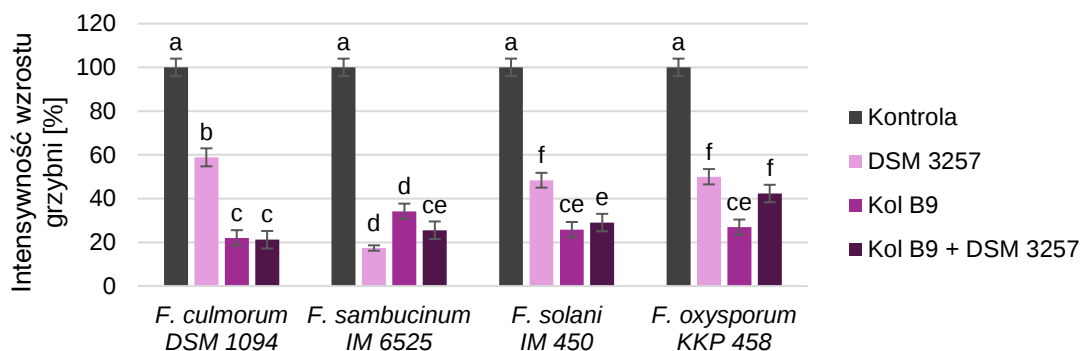
Pomimo stwierdzonej wcześniej wyższej aktywności powierzchniowej, ustalono, że w większości hodowli aktywność przeciwgrzybowa w układzie zawierającym dwa szczepy *Bacillus* nie jest istotnie wyższa niż w układach zawierających komórki tylko jednego szczepu *Bacillus* (**Rycina 35**). Wyjątek stanowiła hodowla zawierająca grzybnie *F. oxysporum* KKP 458 oraz bakterie *Bacillus* sp. Kol D3 i *B. subtilis* DSM 3257 (**Rycina 35A**). Intensywność wzrostu grzybni KKP 458 w obecności bakterii szczepu DSM 3257 lub bakterii szczepu Kol D3 wynosiła odpowiednio 48,6 oraz 45,9%. Natomiast w hodowli mieszanej zawierającej oba szczepy *Bacillus* intensywność wzrostu grzybni spadała do 31,1%.

Dlatego do następnego etapu pracy wybrano powyższy układ badany.

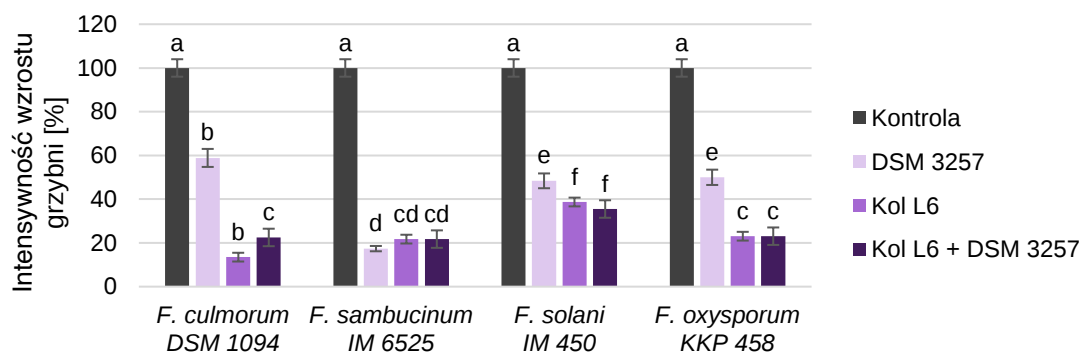
A)



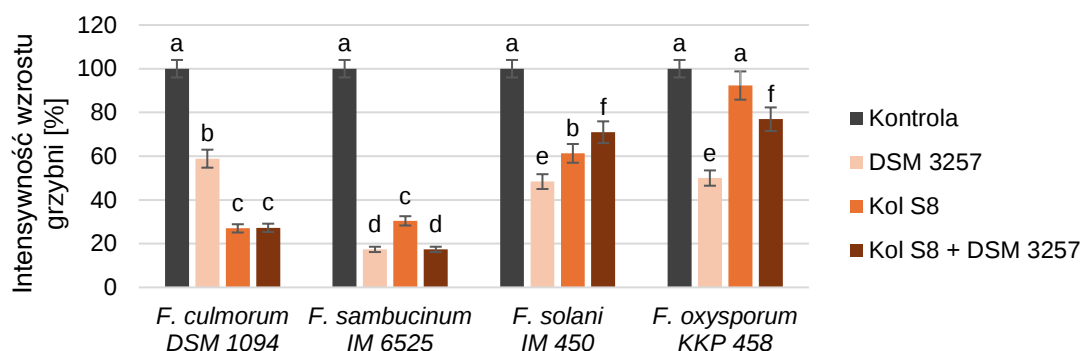
B)



C)



D)



Rycina 35. Intensywność wzrostu czterech grzybní z rodzaju *Fusarium* w obecności jednego lub dwóch szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* oceniana na podstawie suchej biomasy po 72 godz. hodowli. Kontrolę (przyjętą za 100%) stanowiła intensywność wzrostu grzybní w nieobecności bakterii.

A) Układy zawierające szczepy *B. subtilis* DSM 3257 oraz *Bacillus* sp. Kol D3.

B) Układy zawierające szczepy *B. subtilis* DSM 3257 oraz *Bacillus* sp. Kol B9.

C) Układy zawierające szczepy *B. subtilis* DSM 3257 oraz *Bacillus* sp. Kol L6.

D) Układy zawierające szczepy *B. subtilis* DSM 3257 oraz *Bacillus* sp. Kol S8.

Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego.

Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

C) Wpływ syntetycznych fungicydów AZ i PR na produkcję cLP oraz aktywność przeciwgrzybową hodowli mieszanej *Bacillus/Bacillus*

W tej części badań stosowano dwa syntetyczne fungicydy – AZ i PR. Aktywność przeciwgrzybową oraz produkcję surfaktyny i ituryny wyznaczano w hodowli zawierającej grzybnie *F. oxysporum* KKP 458 oraz bakterie *Bacillus* sp. Kol D3 i *B. subtilis* DSM 3257, prowadzonej w nieobecności fungicydów lub z dodatkiem tych związków. Przygotowano odpowiednie układy kontrolne. Hodowle przygotowano w podłożu LB według metody opisanej w punkcie IV.3. Aktywność przeciwgrzybową oceniono używając metody opisanej w punkcie IV.6.2. Ekstrakcję surfaktyny i ituryny przeprowadzono za pomocą metody opisanej w IV.5.2, natomiast ilościową analizę powyższych związków prowadzono techniką LC–MS/MS (IV.5.3).

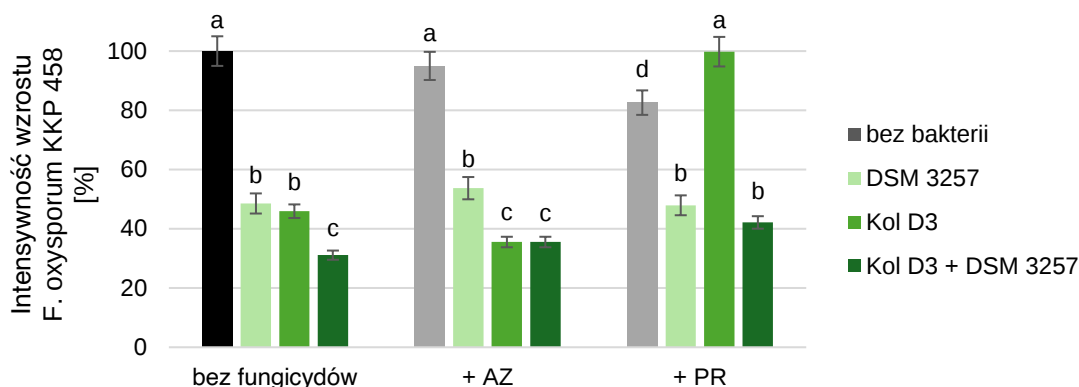
Stwierdzono, że fungicydy AZ i PR nie wykazują silnej aktywności przeciwgrzybowej wobec grzybni *F. oxysporum* KKP 458 (**Rycina 36**). Intensywność wzrostu grzybni w monokulturze zawierającej AZ lub PR wynosiła kolejno 95,0 oraz 82,6%.

Stwierdzono, że **obecność fungicydu AZ** w hodowli bakteryjno-grzybowej zawierającej bakterie:

- *B. subtilis* DSM 3257 nie ma wpływu na aktywność przeciwgrzybową;
- *Bacillus* sp. Kol D3 powoduje wzrost aktywności przeciwgrzybowej (intensywność wzrostu grzybni spada z 45,9 na 35,5%);
- DSM 3257 oraz Kol D3 nie ma wpływu na aktywność przeciwgrzybową.

Stwierdzono, że **obecność fungicydu PR** w hodowli bakteryjno-grzybowej zawierającej bakterie:

- *B. subtilis* DSM 3257 nie ma wpływu na aktywność przeciwgrzybową.
- *Bacillus* sp. Kol D3 znacząco ogranicza aktywność przeciwgrzybową bakterii (intensywność wzrostu grzybni wzrasta z 45,9 na 99,8%);
- DSM 3257 oraz Kol D3 ogranicza aktywność przeciwgrzybową bakterii (intensywność wzrostu grzybni wzrasta z 31,1 na 42,1%).



Rycina 36. Intensywność wzrostu grzybnii *F. oxysporum* KKP 458 w 72-godz. hodowlach płynnych zawierających dodatek bakterii *B. subtilis* DSM 3257 i/lub *Bacillus* sp. Kol D3 oraz fungicydów AZ (250 mg L⁻¹) lub PR (2,4 g L⁻¹). Kontrolę (której wyniki przyjęto za 100%) stanowiła intensywność wzrostu grzybnii w nieobecności bakterii i fungicydów (kolor czarny). Kolorem szarym oznaczono intensywność wzrostu grzybnii w hodowlach bez dodatku bakterii. Odcieniami koloru zielonego oznaczono intensywność wzrostu grzybnii w hodowlach bakteryjno-grzybowych. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Dla powyższego układu badanego wykonano również analizę wpływu obecności syntetycznych fungicydów AZ i PR w mieszanych hodowlach bakteryjnych oraz bakteryjno-grzybowych na produkcję surfaktyny i ituryny.

Stwierdzono, że produkcja surfaktyny i ituryny przez bakterie jest niższa w bakteryjnej hodowli mieszanej (55,9 mg L⁻¹) niż w monokulturze Kol D3 (73,9 mg L⁻¹) (**Rycina 37A,C**).

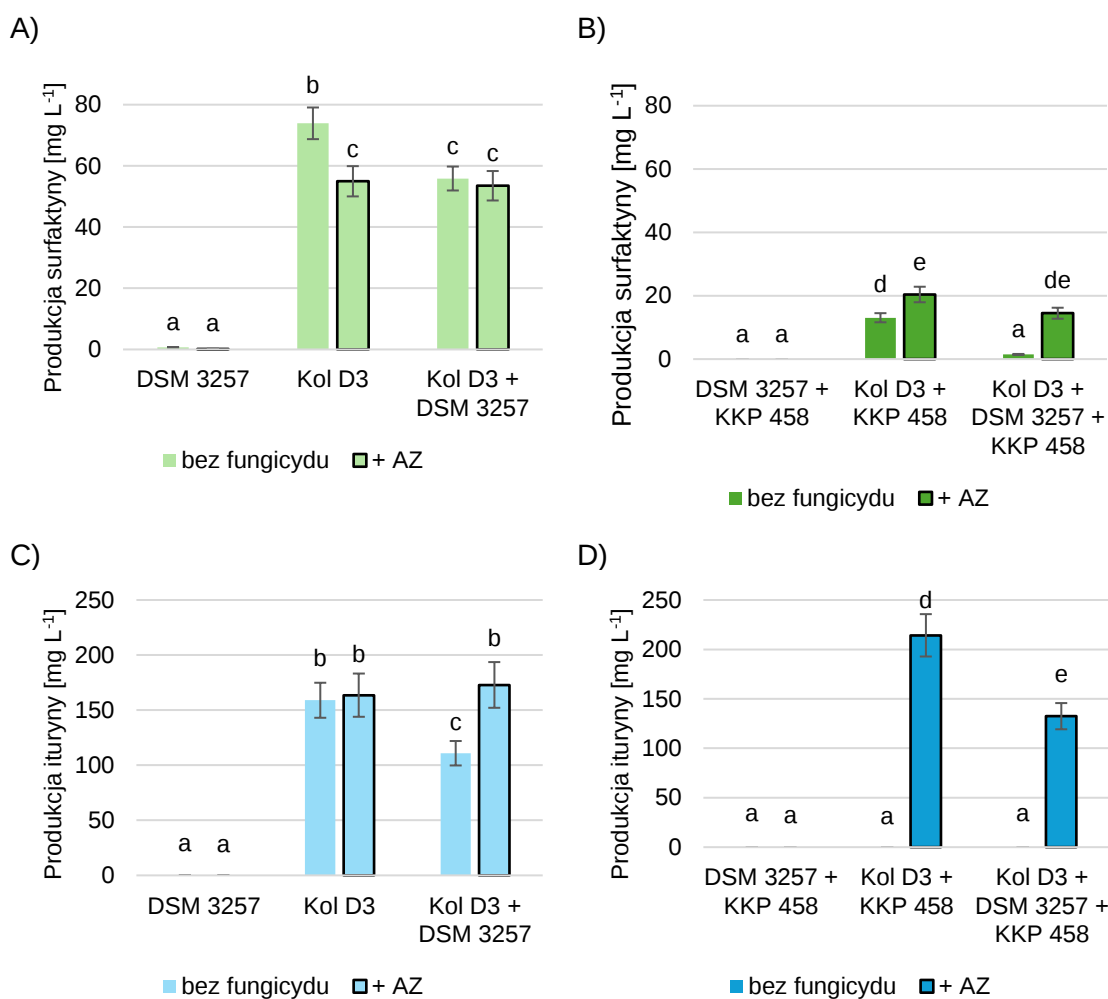
Ustalono, że obecność AZ w hodowli bakteryjnej zawierającej:

- bakterie szczepu Kol D3 powoduje spadek produkcji surfaktyny (z 73,9 na 55,0 mg L⁻¹) i nie ma wpływu na produkcję ituryny (**Rycina 37A,C**);
- bakterie szczepów Kol D3 i *B. subtilis* DSM 3257 nie ma wpływu na produkcję surfaktyny i powoduje wzrost produkcji ituryny (z 110,9 na 172,9 mg L⁻¹) (**Rycina 37A,C**).

Stwierdzono, że obecność grzybnii zarówno w hodowli zawierającej bakterie Kol D3 jak i w hodowli zawierającej bakterie Kol D3 i DSM 3257, prowadzonych w nieobecności fungicydów, powoduje znaczny spadek poziomu izolowanych biosurfaktantów (**Rycina 37B,D**).

Ustalono, że obecność AZ w hodowli bakteryjno-grzybowej zawierającej:

- bakterie szczepu Kol D3 powoduje nieznaczny wzrost poziomu izolowanej z hodowli surfaktyny (z 13,1 na 20,4 mg L⁻¹) oraz bardzo wysoki wzrost poziomu izolowanej ituryny (z 0 na 214,27 mg L⁻¹) (**Rycina 37B,D**);
- bakterie szczepów Kol D3 oraz DSM 3257 powoduje wzrost poziomu izolowanej z hodowli surfaktyny (z 1,5 na 14,5 mg L⁻¹) oraz bardzo wysoki wzrost poziomu izolowanej z hodowli ituryny (z 0 na 132,5 mg L⁻¹) (**Rycina 37B,D**).



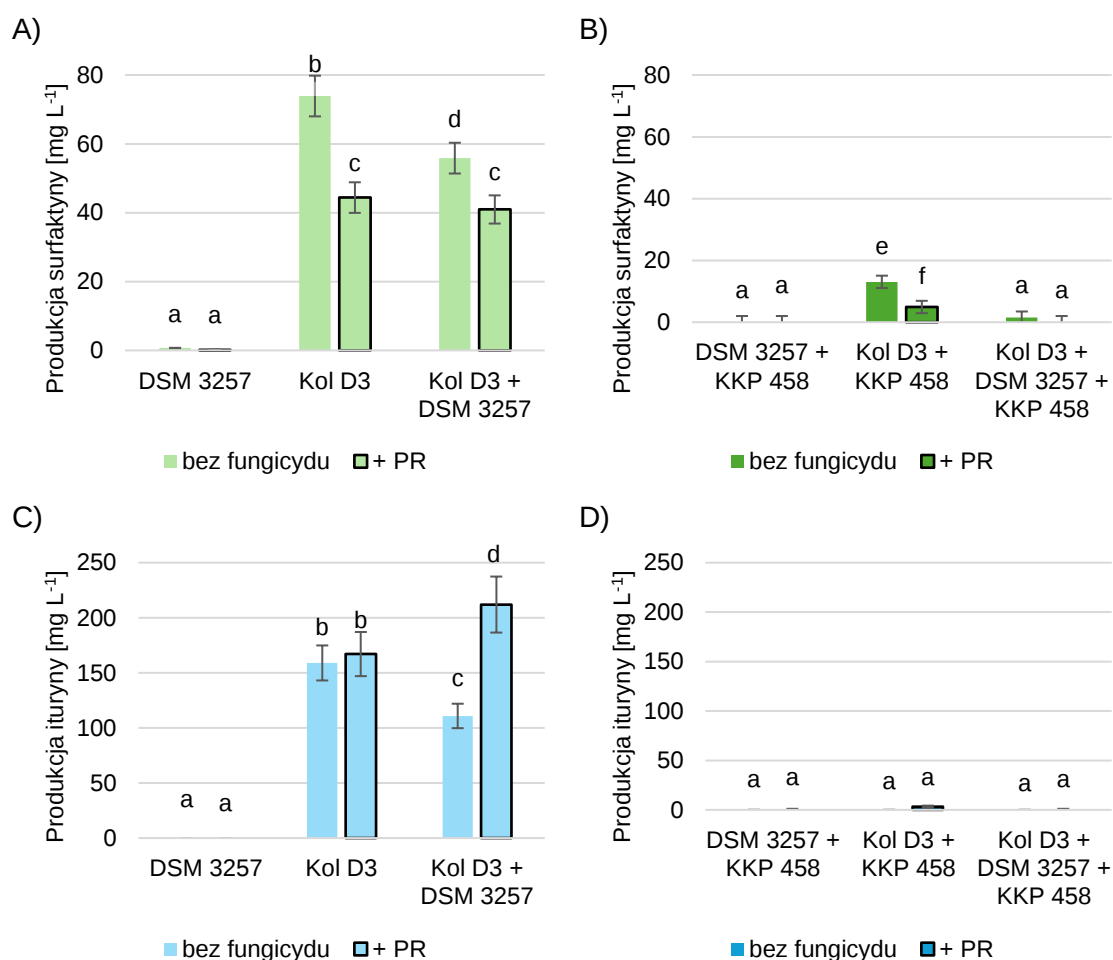
Rycina 37. Produkcja surfaktyny (A,B) i ituryny (C,D) w 72-godz. płynnych hodowlach bakteryjnych (A,C) oraz bakteryjno-grzybowych z grzybnią *F. oxysporum* KKP 458 (B,D) z dodatkiem syntetycznego **fungicydu** AZ (250 mg L⁻¹). Kolorem zielonym oznaczono produkcję surfaktyny. Kolorem niebieskim oznaczono produkcję ituryny. Jaśniejsze odcienie kolorów oznaczają hodowle bakteryjne, natomiast ciemniejsze – hodowle bakteryjno-grzybowe. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Stwierdzono, że obecność PR w hodowli bakteryjnej zawierającej:

- bakterie szczepu Kol D3 powoduje spadek produkcji surfaktyny (z 73,9 na 44,4 mg L⁻¹) i nie ma wpływu na produkcję ituryny;
- bakterie szczepów Kol D3 oraz DSM 3257 powoduje spadek produkcji surfaktyny (z 55,9 na 41,0 mg L⁻¹) oraz znaczny wzrost produkcji ituryny (z 110,9 na 212,0 mg L⁻¹) (**Rycina 38A,C**).

Ustalono, że obecność PR w hodowli bakteryjno-grzybowej zawierającej:

- bakterie szczepu Kol D3 powoduje spadek poziomu surfaktyny (13,1 na 4,9 mg L⁻¹) oraz nie ma wpływu na produkcję ituryny;
- bakterie szczepów Kol D3 oraz DSM 3257 nie ma wpływu na produkcję biosurfaktantów (**Rycina 38B,D**).



Rycina 38. Produkcja surfaktyny (A,B) i ituryny (C,D) w 72-godz. płynnych hodowlach bakteryjnych (A,C) oraz bakteryjno-grzybowych z grzybnią *F. oxysporum* KKP 458 (B,D) z dodatkiem syntetycznego **fungicydu PR** (2,4 g L⁻¹). Kolorem zielonym oznaczono produkcję surfaktyny. Kolorem niebieskim oznaczono produkcję ituryny. Jaśniejsze odcienie kolorów oznaczają hodowle bakteryjne, natomiast ciemniejsze – hodowle bakteryjno-grzybowe. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

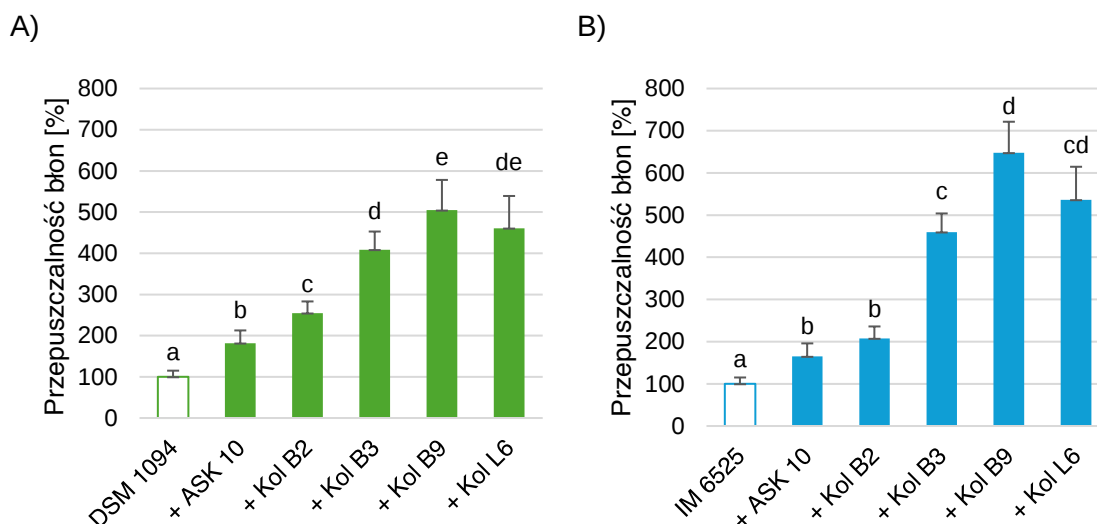
V.8. Wpływ bakterii oraz ich metabolitów na przepuszczalność błon, zmiany w lipidomie grzybni oraz kiełkowanie zarodników

W tej części pracy stosowano szczepy *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525, cztery szczepy *Bacillus* (Kol B2, Kol B3, Kol B9, Kol L6) oraz szczep *P. koreensis* ASK 10.

V.8.1. Przepuszczalność błon grzybni *Fusarium*

Hodowle w podłożu płynnym przygotowywano według metody opisanej w podrozdziale IV.3.4, natomiast analizę przepuszczalności błon wykonano zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.6.3. Układami kontrolnymi były hodowle grzybów prowadzone w nieobecności bakterii.

Stwierdzono, że grzybnie obu badanych szczepów *Fusarium* wyizolowane z hodowli prowadzonych w obecności szczepów bakteryjnych charakteryzują się podwyższoną (w porównaniu do kontroli) przepuszczalnością błon komórkowych (**Rycina 39**). Najwyższy wzrost przepuszczalności błon powodowany był przez bakterie trzech szczepów *Bacillus*: Kol B3, Kol B9 oraz Kol L6. Stwierdzono korelację powyższych wyników z wynikami dotyczącymi wyznaczonej aktywności wcześniej przeciwwrzybowej w płynnych hodowlach mieszanych (V.2.2).



Rycina 39. Przepuszczalność błon grzybni A) *F. culmorum* DSM 1094 oraz B) *F. sambucinum* IM 6525 wyizolowanej z 72-godz. hodowli płynnych prowadzonych w obecności bakterii z rodzaju *Bacillus* lub *Pseudomonas*. Kontrole (przyjęte za 100% i oznaczone kolorem białym) stanowiły wyniki uzyskane dla hodowli grzybni prowadzonych w nieobecności bakterii. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

V.8.2. Zmiany w lipidomie grzybni *Fusarium*

Zmiany w lipidomie grzybni oceniano na podstawie jakościowej i ilościowej analizy fosfolipidów, wykorzystując biomasę uzyskaną z 72-godz. hodowli płynnych (zarówno monokultur *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525, jak i hodowli mieszanych bakteryjno-grzybowych) (IV.3.3; IV.3.4). Przeanalizowano wpływ obecności bakterii czterech szczepów *Bacillus* (Kol B2, Kol B3, Kol B9 i Kol L6) i szczepu *P. koreensis* ASK 10 na lipidom grzybni szczepów DSM 1094 oraz IM 6525. Ekstrakcję i analizę fosfolipidów wykonano zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.6.4.

Analiza lipidomiczna wykazała, że w błonach grzybni obu badanych szczepów *Fusarium* dominują fosfatydylocholina (PC) i fosfatydyloetanolamina (PE) (**Tabela 14**). Stwierdzono także, że grzybnie badanych szczepów *Fusarium* różnią się stosunkiem zawartości PC do PE (który wynosi 1:0,9 oraz 1:0,6 odpowiednio dla *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525). Nie stwierdzono innych klas fosfolipidów w próbce kontrolnej grzybni szczepu DSM 1094. Natomiast w przypadku grzybni IM 6525 stwierdzono nieznaczną zawartość (0,04%) fosfatydyloglicerolu (PG) (**Rycina 40**).

Tabela 14. Stosunek zawartości PC do PE w błonach grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525 wyizolowanych z biomasy pochodzącej z 72-godz. hodowli prowadzonych w podłożu LB w nieobecności lub z dodatkiem bakterii wybranych szczepów bakteryjnych.

Hodowla grzybowa	Stosunek PC do PE *	
	<i>F. culmorum</i> DSM 1094	<i>F. sambucinum</i> IM 6525
Bez dodatku bakterii	1 : 0,9	1 : 0,6
+ <i>P. koreensis</i> ASK 10	1 : 1,4	1 : 0,8
+ <i>Bacillus</i> sp. Kol B2	1 : 1,4	1 : 0,8
+ <i>Bacillus</i> sp. Kol B3	1 : 1,6	1 : 0,9
+ <i>Bacillus</i> sp. Kol B9	1 : 0,8	1 : 0,9
+ <i>Bacillus</i> sp. Kol L6	1 : 0,7	1 : 1

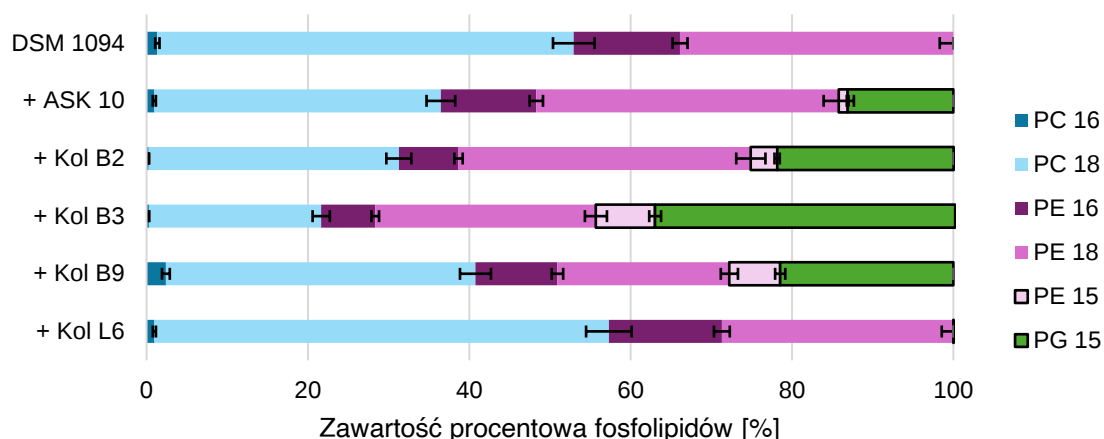
* Odchylenie standardowe wynosiło $\leq 0,13$

Stwierdzono, że obecność bakterii szczepów *P. koreensis* ASK 10, *Bacillus* sp. Kol B2 lub *Bacillus* sp. Kol B3 w hodowli *F. culmorum* DSM 1094 powoduje zmianę stosunku PC do PE w wyizolowanej biomasy z **1:0,9** do odpowiednio **1:1,4**; **1:1,4** oraz **1:1,6**. W przypadku grzybni *F. sambucinum* IM 6525 jedyny istotny wpływ bakterii

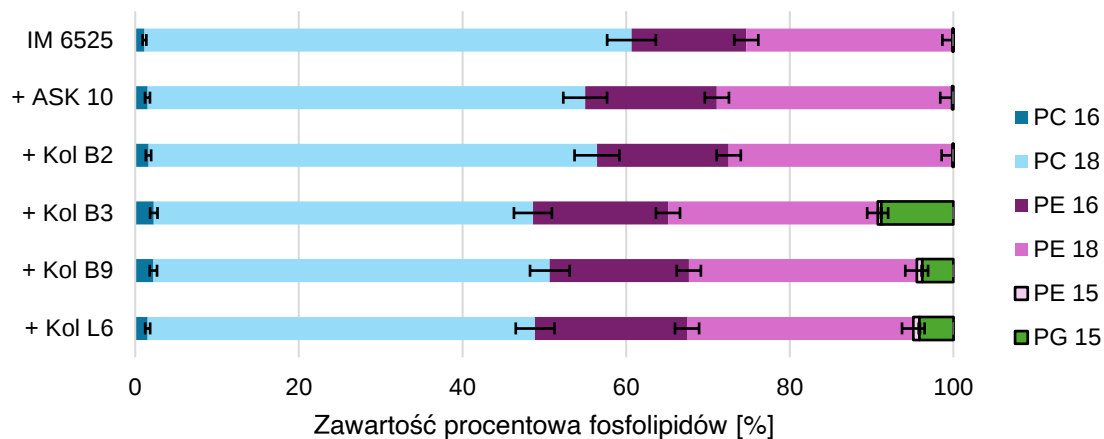
na zmianę stosunku PC do PE (z **1:0,6 na 1:1**) stwierdzono w próbach biomasy grzybni uzyskanej z hodowli mieszanej zawierającej bakterie *Bacillus* sp. Kol L6. Uzyskane wyniki wskazały, że w błonach komórkowych grzybni hodowanych w obecności niektórych szczepów bakteryjnych dochodzi do wzrostu zawartości PE w stosunku do PC.

Poza PC i PE charakterystycznymi dla grzybów, w analizowanych próbach uzyskanych z hodowli bakteryjno-grzybowych wyznaczono obecność fosfolipidów charakterystycznych dla bakterii (oznaczonych na **Rycinie 40** jako „PE 15” oraz „PG 15”). Udział procentowy bakteryjnych fosfolipidów w powyższych próbach zależał zarówno od szczepu *Fusarium* jak i szczepu bakteryjnego. W przypadku prób zawierających grzybnie *F. culmorum* DSM 1094 fosfolipidy charakterystyczne dla bakterii wyizolowano z hodowli powyższego grzyba namnażanego z dodatkiem bakterii Kol B2, Kol B3 lub Kol B9. Z kolei w próbach zawierających grzybnie *F. sambucinum* IM 6525 udział fosfolipidów bakteryjnych stwierdzono w próbach uzyskanych z hodowli mieszanych zawierających bakterie Kol B3, Kol B9 lub Kol L6. Najwyższy udział procentowy fosfolipidów bakteryjnych w próbach obu badanych grzybów wyznaczono w obecności bakterii *Bacillus* sp. Kol B3. Wynik ten może wskazywać, że bakterie Kol B3 w porównaniu do pozostałych szczepów bakteryjnych użytych w badaniu silniej zdominowały środowisko prowadzonych hodowli mieszanych.

A)



B)



Rycina 40. Porównanie zawartości procentowej fosfolipidów wyizolowanych z prób biomasy uzyskanych z 72-godz. hodowli płynnych A) *F. culmorum* DSM 1094 oraz B) *F. sambucinum* IM 6525. Grzybnie namnażano w monokulturach lub hodowlach z dodatkiem wybranych szczepów bakteryjnych. Czerwonym konturem oznaczono fosfolipidy charakterystyczne dla bakterii. Przyjęto następujące oznaczenia:

PC 16 – fosfatydylocholiny zawierające kwasy tłuszczowe (16:0 i 18:2) oraz (16:0 i 18:1);

PC 18 – fosfatydylocholiny zawierające kwasy tłuszczowe (18:3 i 18:2); (18:2 i 18:2); (18:2 i 18:1); (18:1 i 18:1) oraz (18:0 i 18:2);

PE 16 – fosfatydyloetanolaminy zawierające kwasy tłuszczowe (16:1 i 18:2); (16:0 i 18:3); (16:0 i 18:2) oraz (16:0 i 18:1);

PE 18 – fosfatydyloetanolaminy zawierające kwasy tłuszczowe (18:3 i 18:2); (18:3 i 18:1); (18:2 i 18:2); (18:2 i 18:1) oraz (18:1 i 18:1);

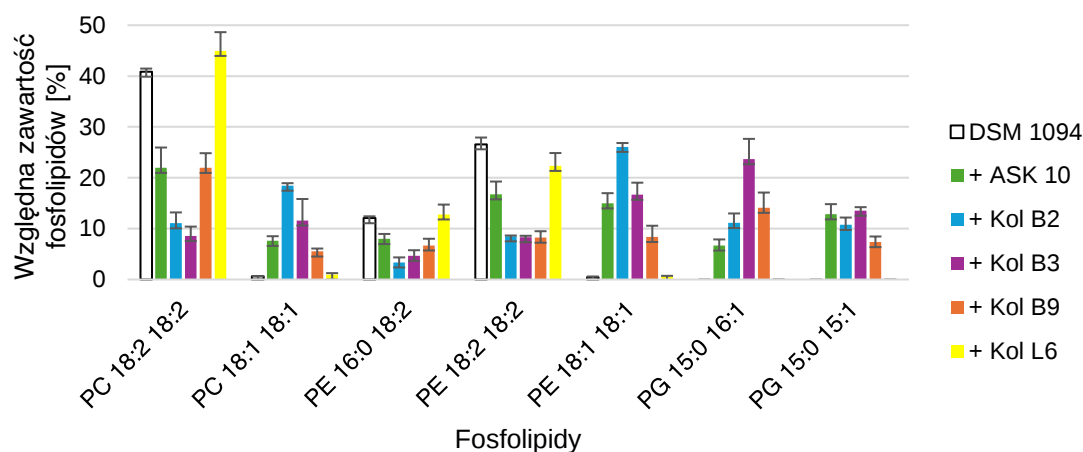
PE 15 – fosfatydyloetanolaminy zawierające kwasy tłuszczowe (15:0 i 16:0) oraz (15:0 i 16:1);

PG 15 – fosfatydyloglicerole zawierające kwasy tłuszczowe (15:0 i 16:1) oraz (15:0 i 15:1).

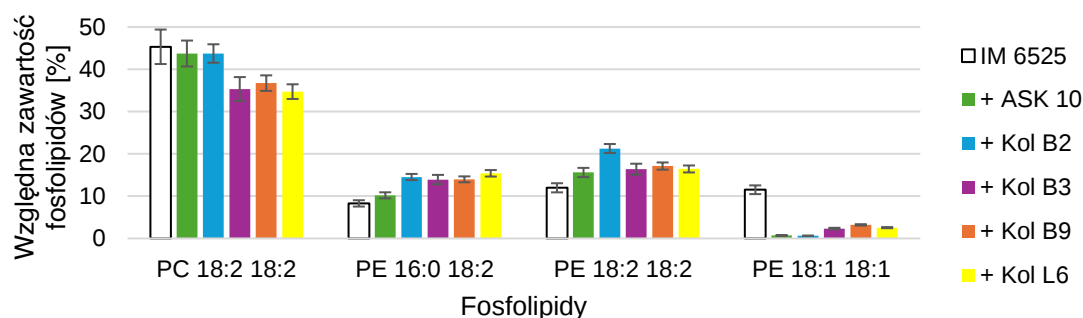
Analiza wyników wykazała zróżnicowany wpływ badanych szczepów bakteryjnych na zawartość poszczególnych fosfolipidów w próbach. W przypadku hodowli zawierających grzybnie *F. culmorum* DSM 1094, obecność bakterii Kol L6 najmniej wpływała na zawartości poszczególnych fosfolipidów charakterystycznych dla grzybów (**Rycina 41A**). Z kolei obecność bakterii szczepu Kol B2 w hodowli powyższego grzyba znacząco zmieniała poziom identyfikowanych fosfolipidów PC 18:1 18:1; PE 16:0 18:2 oraz PE 18:1 18:1, podczas gdy szczep Kol B3 wykazywał największy wpływ na zawartość PC 18:2 18:2 oraz PG 15:0 16:1.

W przypadku prób zawierających grzybnie *F. sambucinum* IM 6525 odnotowano jedynie niewielkie różnice względnej zawartości fosfolipidów pomiędzy próbami wyizolowanymi z poszczególnych hodowli mieszanych (**Rycina 41B**). Stwierdzono, że wszystkie wykorzystane w badaniu szczepy bakteryjne najsilniej wpływają na względną zawartość fosfolipidu PE 18:1 18:1 w próbach zawierających *F. sambucinum* IM 6525.

A)



B)



Rycina 41. Porównanie zawartości fosfolipidów wyizolowanych biomasy otrzymanej z hodowli A) *F. culmorum* DSM 1094 i B) *F. sambucinum* IM 6525 prowadzonej w postaci monokultury lub w postaci hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej. Na rycinie ograniczono liczbę przedstawionych fosfolipidów do tych, których zawartość procentowa była wyższa niż 10%.

V.8.3. Kielkowanie zarodników *Fusarium*

Oceniono wpływ metabolitów produkowanych przez szczep *P. koreensis* ASK 10 oraz cztery szczepy *Bacillus* (Kol B2, Kol B3, Kol B9 oraz Kol L6) na kielkowanie zarodników *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525. W tym celu wykorzystano płyny pohodowlane uzyskane z bakteryjnych hodowli płynnych przygotowanych według metody opisanej w podrozdziale IV.3.4. Kielkowanie zarodników badano zgodnie z metodą opisaną w punkcie IV.6.5. W próbach kontrolnych jako środowisko kielkowania zarodników stosowano mieszaninę podłoża LB i wody (1:1 v/v), natomiast w próbach badanych używano mieszaniny supernatantów oraz wody (1:1 v/v).

Obserwacje mikroskopowe wskazały, że:

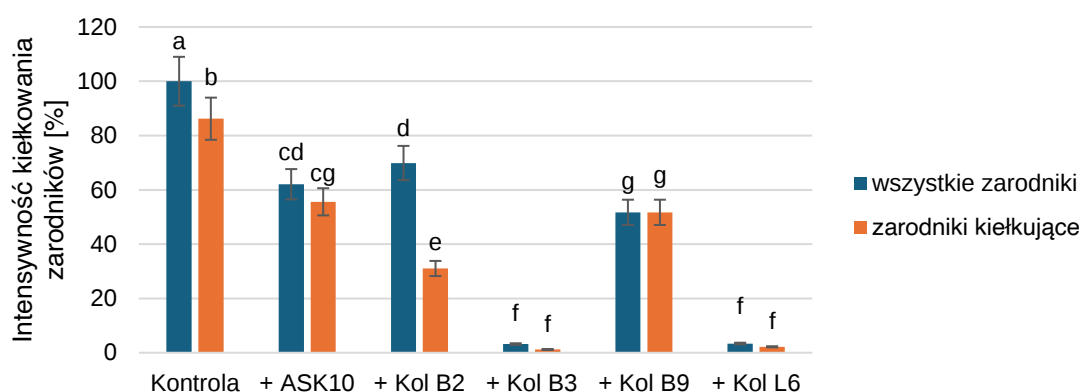
- grzybnia szczepu *F. culmorum* DSM 1094 wytwarza zarodniki makrokonidialne, natomiast grzybnia szczepu *F. sambucinum* IM 6525 produkuje zarodniki mikrokonidialne;
- gęstość zarodników szczepu IM 6525 w próbach otrzymanych po zmyciu powierzchni grzybni hodowanej na podłożu zestalonym agarem jest około 100 razy wyższa niż w przypadku gęstości zarodników szczepu DSM 1094;
- zgodnie z obserwacją wykonaną po 24 godz. inkubacji, zarodniki szczepu IM 6525 kielkują w próbach kontrolnych (w nieobecności bakteryjnych metabolitów) wolniej niż zarodniki szczepu DSM 1094.

Uzyskane wyniki wykazały, że metabolity bakteryjne obecne w supernatantach mają wpływ zarówno na liczbę zarodników obecnych w próbce jak i na przebieg ich kielkowania (**Rycina 42**). Stwierdzono, że metabolity produkowane przez bakterie *P. koreensis* ASK 10 nie hamują kielkowania zarodników *F. culmorum* DSM 1094, a jedynie ograniczają liczbę i rozwój strzępek w środowisku wzrostu. Analiza mikroskopowa powyższej próby wykazała obecność długich, rozgałęzionych strzępek (**Rycina 43B**; **Rycina 44**). Ustalono, że metabolity produkowane przez bakterie *Bacillus* sp. Kol B2 silniej hamują kielkowanie zarodników DSM 1094 w porównaniu do prób zawierających płyn pohodowlany szczepu ASK 10. W obrazie mikroskopowym powyższej próby zaobserwowano pojedyncze krótkie strzępki o nielicznych rozgałęzieniach (**Rycina 43C**; **Rycina 44**). Najbardziej interesujące wyniki uzyskano w przypadku prób zawierających metabolity bakterii *Bacillus* sp. Kol B3 lub *Bacillus* sp. Kol L6, gdzie stwierdzono całkowitą eliminację zarodników szczepu DSM 1094. Z kolei metabolity produkowane przez bakterie *Bacillus* sp. Kol B9, choć nie hamowały

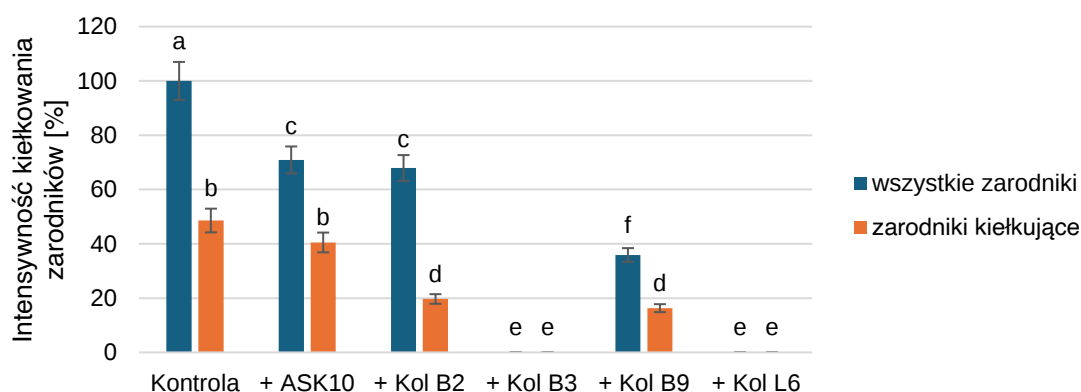
kiełkowania zarodników grzybni DSM 1094, to znacząco hamowały rozwój strzępek (**Rycina 43D; Rycina 44**).

Podobne wyniki uzyskano w oparciu o obserwacje kiełkowania zarodników szczepu *F. sambucinum* IM 6525. Największe ograniczenie kiełkowania zarodników odnotowano w obecności metabolitów szczepów *Bacillus* sp. Kol B3 lub *Bacillus* sp. Kol L6. Z kolei najmniejszy wpływ na przebieg tego procesu wyznaczono stosując supernatanty uzyskane z hodowli szczepów *P. koreensis* ASK 10 (**Rycina 45B; Rycina 46**) i *Bacillus* sp. Kol B2 (**Rycina 45C; Rycina 46**).

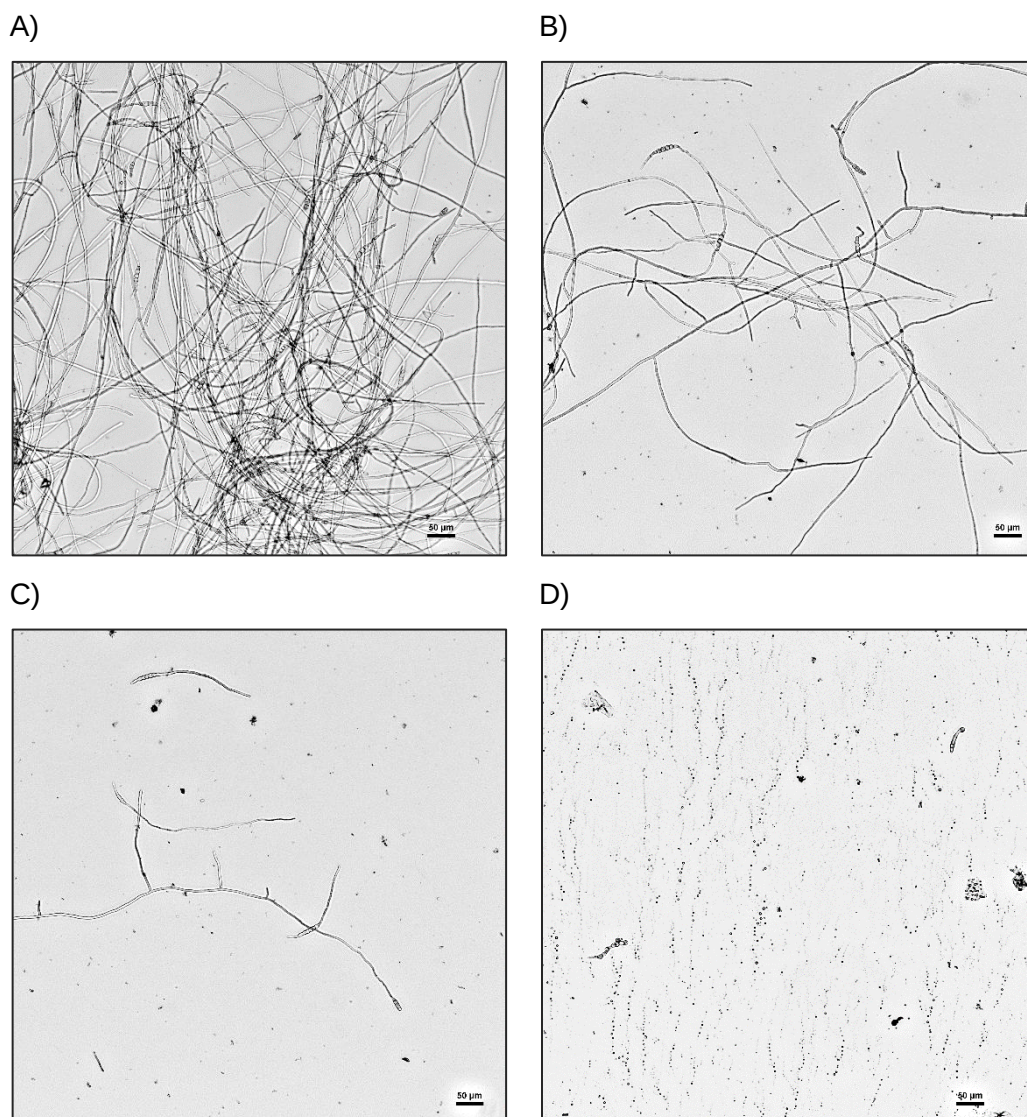
A)



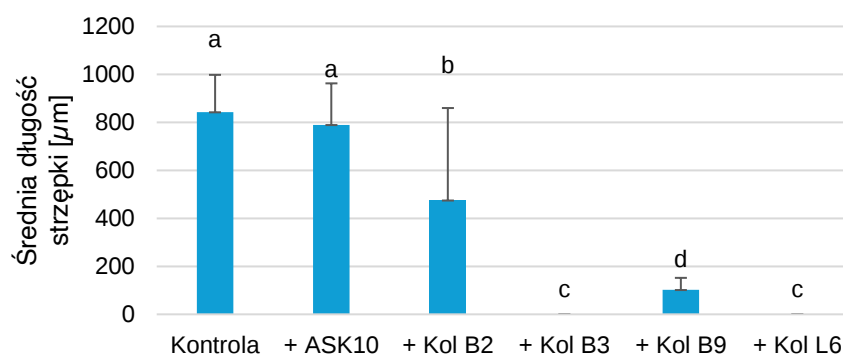
B)



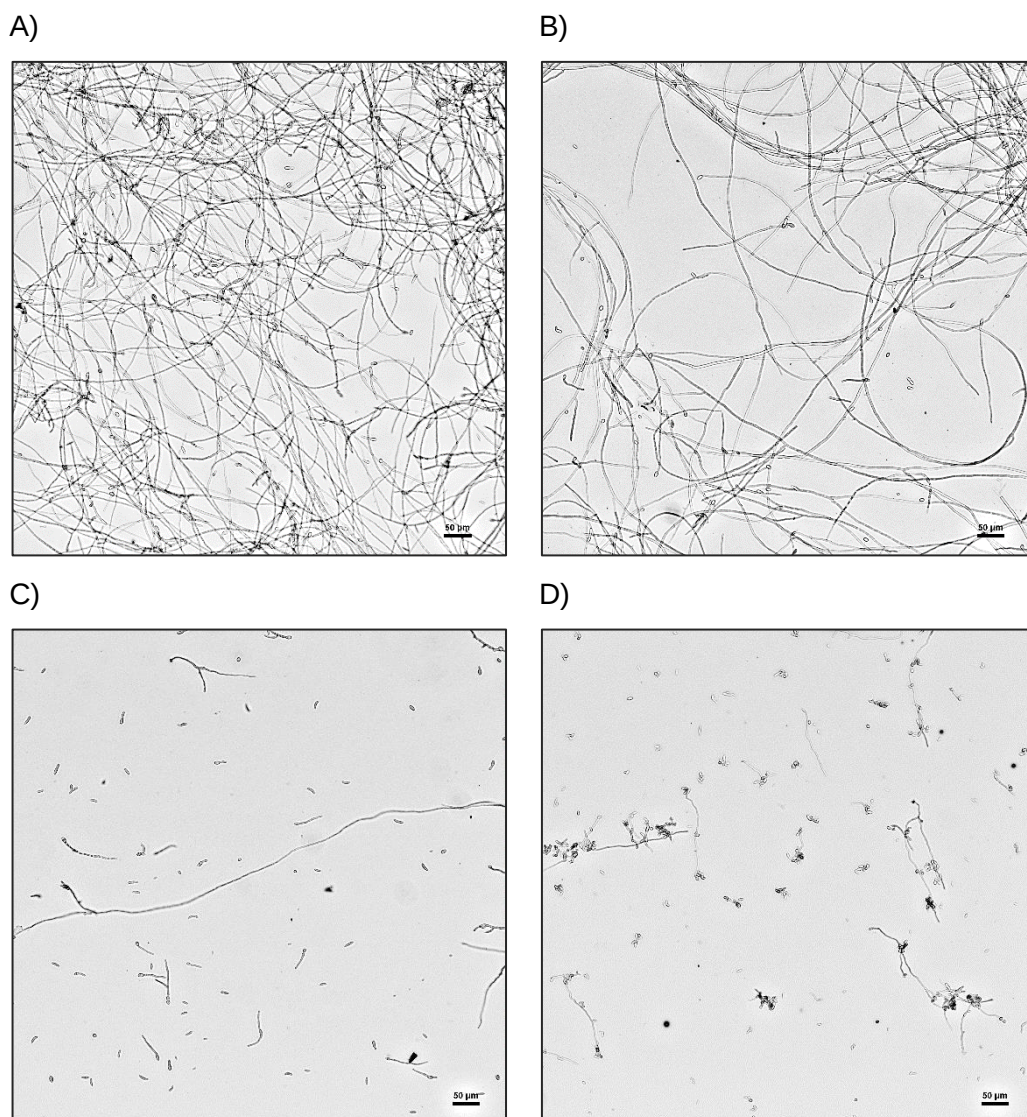
Rycina 42. Wpływ metabolitów produkowanych przez bakterie ryzosferowe na kiełkowanie zarodników A) *F. culmorum* DSM 1094 oraz B) *F. sambucinum* IM 6525. Próby kontrolne stanowiły zarodniki inkubowane w mieszaninie podłoża LB i wody (1:1 v/v). Próbami badanymi były zarodniki inkubowane w mieszaninach płynu pohodowlanego otrzymanego z 72-godz. hodowli właściwej wybranych szczepów bakteryjnych oraz wody (1:1 v/v). Za 100% przyjęto liczbę wszystkich zarodników obecnych w próbie kontrolnej. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łąńskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).



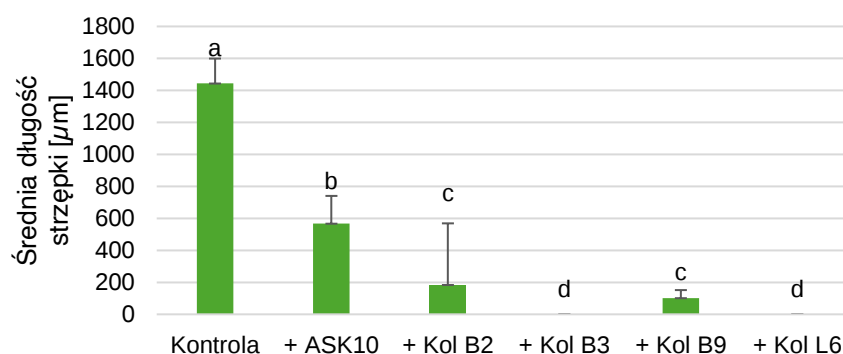
Rycina 43. Kielkowanie zarodników grzybn *F. culmorum* DSM 1094 w A) układzie kontrolnym; lub w obecności płynów pochodowlanych B) *P. koreensis* ASK 10; C) *Bacillus* sp. Kol B2; D) *Bacillus* sp. Kol B9.



Rycina 44. Średnia długość strzępek grzybn *F. culmorum* DSM 1094 po 48-godz. inkubacji zarodników w mieszaninie płynu pochodowlanego (uzyskanego po 72-godz. hodowli bakterii *Bacillus* lub *Pseudomonas*) i wody (50/50 v/v). Kontrolę stanowiły zarodniki inkubowane w mieszaninie podłoża LB i wody (50/50 v/v).



Rycina 45. Kiełkowanie zarodników grzybn *F. sambucinum* IM 6525 w A) układzie kontrolnym; lub w obecności płynów pochodowlanych B) *P. koreensis* ASK 10; C) *Bacillus* sp. Kol B2; D) *Bacillus* sp. Kol B9.



Rycina 46. Średnia długość strzępek grzybn *F. sambucinum* IM 6525 po 48-godz. inkubacji zarodników w mieszaninie płynu pochodowlanego (uzyskanego po 72-godz. hodowli bakterii *Bacillus* lub *Pseudomonas*) i wody (50/50 v/v). Kontrolę stanowiły zarodniki inkubowane w mieszaninie podłoża LB i wody (50/50 v/v).

V.9. Ocena aktywności przeciwgrzybowej wybranych szczepów *Bacillus* wobec grzybów *Fusarium* z wykorzystaniem nasion ogórka siewnego

Przeprowadzono ocenę wpływu wstępnej inkubacji (zaprawiania) nasion ogórka siewnego w zawieszynie bakterii wybranych szczepów *Bacillus* na kiełkowanie nasion oraz intensywność wzrostu siewek zarówno w obecności jak i nieobecności zarodników *Fusarium*. Badania przeprowadzono w doniczkach z użyciem gleby, zgodnie z metodą opisaną w podrozdziale IV.11C. Intensywność wzrostu siewek i ich korzeni oceniano na podstawie suchej biomasy. Celem badań było sprawdzenie, czy komórki wybranych szczepów bakterii umieszczone na powierzchni nasion ogórka siewnego mogą skutecznie chronić siewki przed negatywnym wpływem fitopatogenów *F. culmorum* DSM 1094 lub *F. sambucinum* IM 6525 (których zarodniki dodawano do gleby).

Do doświadczenia wybrano trzy szczepy *Bacillus*: Kol B2, Kol B3 oraz Kol B9, ze względu na wykazywane przez nie różnorodne mechanizmy aktywności przeciwgrzybowej oraz ustalony we wcześniejszym etapie badań brak negatywnego wpływu na rozwój korzeni siewek ogórka siewnego (**Tabela 15**).

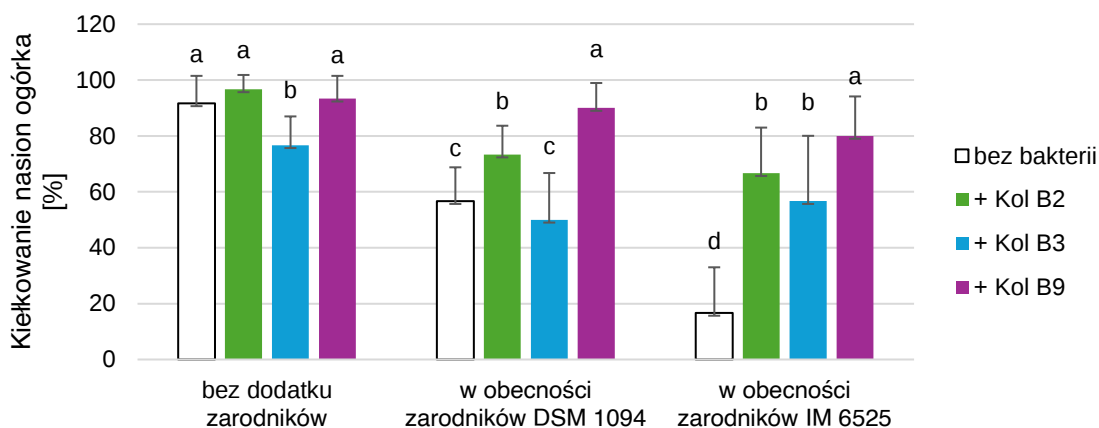
Tabela 15. Skrócone podsumowanie wyników dotyczących szczepów *Bacillus* wybranych do badań opisanych w niniejszej części pracy.

Szczep <i>Bacillus</i>	Produkcja lipopeptydów [+ / -]			Produkcja VOCs hamujących wzrost grzybni powierzchniowej DSM 1094 [+ / -]	Ograniczenie wzrostu grzybni w hodowlach płynnych [%]		Zdolność do kolonizacji strzępek IM 6525	Wpływ na kiełkowanie zarodników grzybni	Wpływ na wzrost korzeni ogórka **
	Surf.	Itur.	Feng.		DSM 1094	IM 6525			
Kol B2	+	+	+	–	40,8	49,3	+	ograniczenie wzrostu i rozwoju strzępek	brak
Kol B3	+	+	+	+	70,7	69,8	–	liza zarodników	+
Kol B9	+	+	+	–	80,8	65,0	+	ograniczenie kiełkowania zarodników	+++

Oceniono wpływ badanych szczepów bakterii na kiełkowanie nasion ogórka siewnego w układach bez dodatku zarodników badanych szczepów *Fusarium*. Stwierdzono, że wstępna inkubacja (zaprawianie) nasion w zawiesinie bakterii *Bacillus* nie powodowała wzrostu intensywności kiełkowania nasion (w porównaniu do kontroli zawierającej nasiona niezaprawione) (**Rycina 47**). W obecności bakterii szczepów Kol B2 oraz Kol B9 nasiona kiełkowały na poziomie porównywalnym do kontroli, natomiast zaprawienie nasion szczepem Kol B3 nieznacznie ograniczyło kiełkowanie w porównaniu z kontrolą.

Oceniono także wpływ obecności zarodników *F. culmorum* DSM 1094 lub *F. sambucinum* IM 6525 w glebie na kiełkowanie nasion niezaprawionych bakteriami. Stwierdzono, że w glebie z zawierającej zarodniki DSM 1094 lub IM 6525 kiełkowanie nasion ogórka siewnego jest ograniczane odpowiednio do 56,7 oraz 16,7% (**Rycina 47**; **Rycina 49A**; **Rycina 50A**).

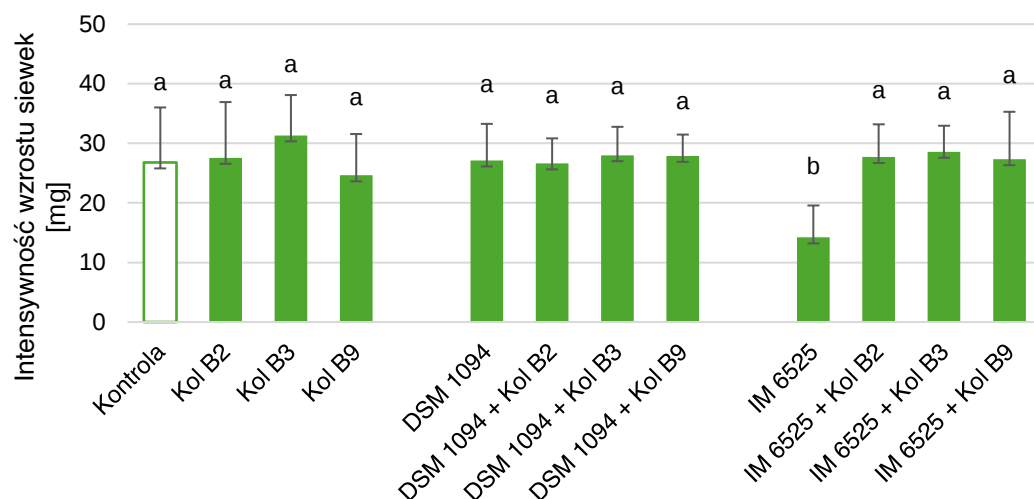
Analiza wpływu zaprawiania nasion ogórka na kiełkowanie w glebie z dodatkiem zarodników badanych szczepów *Fusarium* wykazała, że bakterie szczepów Kol B2 oraz Kol B9 ograniczają negatywny wpływ obu badanych grzybni. Szczególnie obecność bakterii szczepu Kol B9 na powierzchni nasion ogórka przyniosła pozytywny efekt, sprawiając, że nasiona kiełkowały w obecności zarodników grzybni z porównywalną intensywnością jak w układach bez zarodników grzybni.



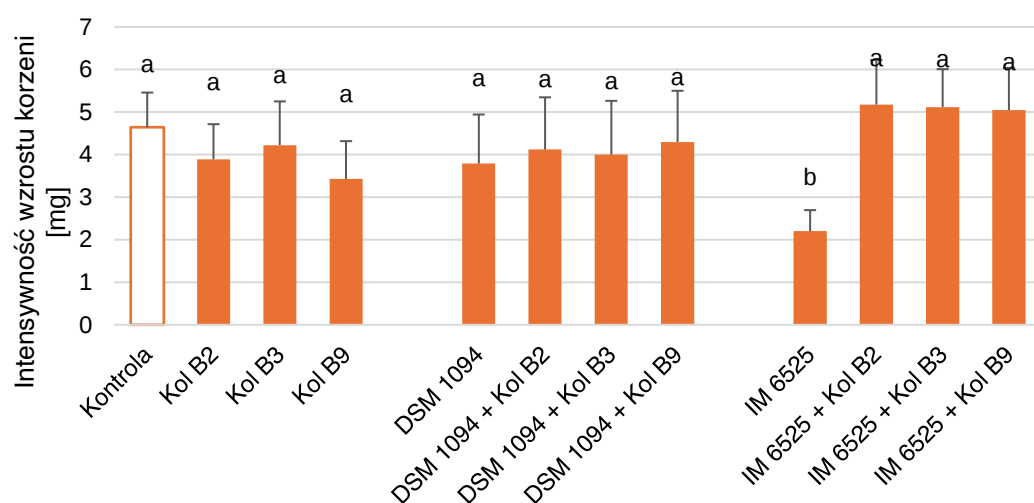
Rycina 47. Wpływ wstępnej inkubacji (zaprawiania) nasion ogórka siewnego w wodnej zawiesinie bakterii *Bacillus* na kiełkowanie nasion w glebie z dodatkiem lub bez zarodników *F. culmorum* DSM 1094 lub *F. sambucinum* IM 6525. Oceny dokonano po 120 godz. inkubacji w glebie. Kontrolę (przyjętą za 100%) stanowił wynik uzyskany dla nasion niezaprawionych bakteriami inkubowanych w glebie bez dodatku zarodników DSM 1094 oraz IM 6525. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

Oceniono także wpływ zaprawiania nasion ogórka siewnego na intensywność wzrostu siewek i ich korzeni w nieobecności i obecności zarodników *F. culmorum* DSM 1094 lub *F. sambucinum* IM 6525. Stwierdzono, że zastosowane w badaniu szczepy *Bacillus* nie mają istotnego wpływu na średnią biomasę siewek ogórka i ich korzeni w układach bez dodatku zarodników badanych grzybn *Fusarium* (**Rycina 48**).

A)



B)



Rycina 48. Wpływ wstępnej inkubacji (zaprawiania) nasion ogórka siewnego w wodnej zawiesinie bakterii *Bacillus* na intensywność wzrostu A) siewek ogórka oraz B) korzeni siewek ogórka w glebie z dodatkiem lub bez zarodników *F. culmorum* DSM 1094 lub *F. sambucinum* IM 6525. Oceny dokonano po 120 godz. inkubacji w glebie, na podstawie suchej biomasy. Kontrolę stanowił wynik uzyskany dla nasion niezaprawionych bakteriami inkubowanych w glebie bez dodatku zarodników DSM 1094 oraz IM 6525. Różnice statystyczne oznaczano małymi literami alfabetu łacińskiego. Wartości oznaczone tą samą literą w ramach wykresu nie różnią się od siebie istotnie ($p < 0,05$).

W porównaniu do zarodników *F. culmorum* DSM 1094, dodatek zarodników *F. sambucinum* IM 6525 do gleby powodował drastyczne ograniczenie nie tylko kiełkowania ale i średniej biomasy siewek ogórka i ich korzeni (**Rycina 48; Rycina 49A; Rycina 50A**).

Ustalono, że zaprawienie nasion ogórka którymkolwiek z badanych szczepów *Bacillus* ogranicza negatywny wpływ użytych w badaniu zarodników *Fusarium* na średnią intensywność wzrostu siewek i ich korzeni (**Rycina 48; Rycina 49; Rycina 50**).

Biorąc pod uwagę zarówno wyniki dotyczące kiełkowania nasion, jak i wyniki dotyczące intensywności wzrostu siewek ogórka (szczególnie przedstawione na **Rycina 50**) stwierdzono, że szczep *Bacillus* sp. Kol B9 wykazuje najwyższy potencjał aplikacyjny ze wszystkich badanych szczepów.

A)



B)



C)



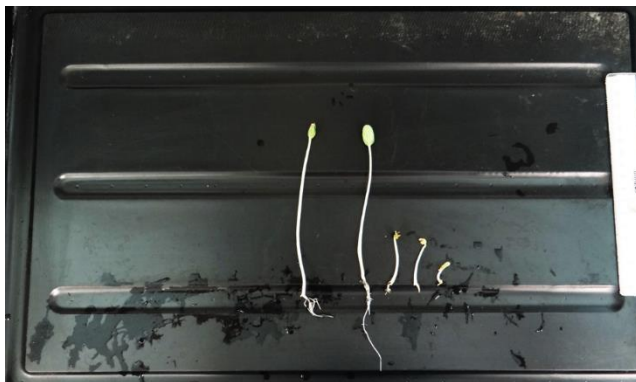
D)



Rycina 49. Siewki ogórka siewnego po 120-godz. inkubacji nasion w glebie z dodatkiem zarodników *F. culmorum* DSM 1094.

Nasiona: A) nie inkubowane w zawieszynie bakteryjnej; B) wstępnie inkubowane w zawieszynie *Bacillus* sp. Kol B2; C) wstępnie inkubowane w zawieszynie *Bacillus* sp. Kol B3 oraz D) wstępnie inkubowane w zawieszynie *Bacillus* sp. Kol B9. Zdjęcia wykonano dla siewek pobranych z trzech powtórzeń (30 nasion).

A)



B)



C)



D)



Rycina 50. Siewki ogórka siewnego po 120-godz. inkubacji nasion w glebie z dodatkiem zarodników *F. sambucinum* IM 6525.

Nasiona: A) nie inkubowane w zawieszynie bakteryjnej; B) wstępnie inkubowane w zawieszynie *Bacillus* sp. Kol B2; C) wstępnie inkubowane w zawieszynie *Bacillus* sp. Kol B3 oraz D) wstępnie inkubowane w zawieszynie *Bacillus* sp. Kol B9. Zdjęcia wykonano dla siewek pobranych z trzech powtórzeń (30 nasion).

V.10. Opracowanie podłoża wzrostowego do hodowli bakterii *Bacillus* z wykorzystaniem produktów ubocznych przemysłu spożywczego

W ostatnim etapie pracy opracowano skład podłoża służącego do efektywnego namnażania bakterii o stwierdzonym w poprzednim rozdziale (V.9) wysokim potencjale aplikacyjnym (*Bacillus* sp. Kol B9). Przygotowano 36 wariantów płynnych podłoży zawierających: wodny ekstrakt skórki marchwi, 10% wody roztwór tryptonu oraz wodną zawiesinę drożdży odpadowych (III.2.6). Powyższe składniki mieszano w różnych proporcjach, a po uzupełnieniu wodą destylowaną oraz doprowadzeniu pH do wartości 7, podłoża sterylizowano. Liczbę bakterii w 1 mL hodowli określano na podstawie liczby jednostek tworzących kolonię na podłożu bulionowym zestalonym agarem, stosując metodę opisaną w podrozdziale IV.4.2. Uzyskane wyniki porównywano z wynikami uzyskanymi dla hodowli prowadzonej w podłożu LB.

Stwierdzono, że podłoża zawierające 0,5% wodnego ekstraktu marchwi i 2 lub 5% wodnej zawiesiny drożdży skutkowały najbardziej intensywnym wzrostem bakterii szczepu Kol B9 (**Tabela 16**). Największą liczbę komórek bakteryjnych wyznaczono w hodowli prowadzonej w podłożu zawierającym 0,5% ekstraktu ze skórki marchwi, 5% zawiesiny drożdży oraz 0,1% tryptonu. W powyższej hodowli liczba bakterii osiągnęła $30,63 \times 10^7$ komórek/mL, co stanowiło ponad dwukrotny wzrost w porównaniu do hodowli prowadzonej w podłożu LB, w której odnotowano $13,2 \times 10^7$ komórek/mL.

W podsumowaniu wyników stwierdzono, że produkty uboczne przemysłu spożywczego, takie jak drożdże odpadowe uzyskane po produkcji piwa czy skórki z marchwi, mogą być wykorzystane do opracowania efektywnego i ekologicznego podłoża wzrostowego zapewniającego intensywny wzrost biomasy *Bacillus* sp. Kol B9.

Tabela 16. Liczba komórek *Bacillus* sp. Kol B9 w 1 mL 24-godz. hodowli w podłożach zawierających różne proporcje produktów ubocznych przemysłu spożywczego (wodną zawiesinę drożdży, 10% roztworu tryptonu oraz wodny ekstrakt ze skórki marchwi). Liczba komórek w hodowli kontrolnej prowadzonej w podłożu LB wynosiła $13,2 \times 10^7$.

Ekstrakt ze skórki marchwi [%]	Trypton [%]	Wodna zawiesina drożdży			
		0,1%	1%	2%	5%
	Liczba komórek <i>Bacillus</i> sp. Kol B9 × 10 ⁷ w 1 mL hodowli				
0,25	0	1,57	2,41	14,33	14,70
	0,1	1,79	3,72	8,52	7,97
	1	4,60	3,44	9,90	7,73
0,5	0	0,76	6,09	23,63	21,17
	0,1	0,34	3,70	14,33	30,63
	1	0,40	5,04	14,13	19,43
1	0	0,10	10,03	13,68	0,93
	0,1	0,15	2,44	3,28	0,52
	1	0,45	1,88	2,29	1,35

VI. Dyskusja

Pomimo rozległej wiedzy na temat bakterii PGPR, do których należą między innymi niektóre szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas*, zdolność tych drobnoustrojów do produkcji biosurfaktantów i wykorzystywania ich w walce z patogenami grzybowymi (szczególnie w obecności zanieczyszczeń antropogenicznych w środowisku) wciąż wymaga dalszych badań.

W początkowych etapach niniejszej pracy stosowano 80 szczepów bakteryjnych – 77 szczepów *Bacillus* i trzy szczepy *Pseudomonas*. Wyznaczono profile produkcji biosurfaktantów oraz oceniono aktywność przeciwgrzybową wobec dwóch grzybów – *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525. Wraz z postępowaniem pracy stopniowo zawężano pulę szczepów bakteryjnych wybieranych do realizacji kolejnych badań. Wyboru dokonywano w oparciu o różnorodne kryteria, do których między innymi należały: miejsce izolacji szczepu, profil i poziom produkcji cLP, aktywność przeciwgrzybowa, zdolność do degradacji zanieczyszczeń oraz wpływ na kiełkowanie nasion i wzrost siewek ogórka siewnego.

Zastosowane w pracy szczepy bakterii pochodziły ze środowisk potencjalnie różniących się poziomem zanieczyszczenia związkami pochodzenia antropogenicznego. W puli ocenianych szczepów bakteryjnych znalazły się zarówno izolaty pochodzące z gleby ryzosferowej, pobranej z terenów wiejskich i leśnych, jak i z terenów miejskich. W większości, do analiz wybrane zostały szczepy z terenów wiejskich i leśnych (65 z 80 szczepów), z uwagi na wysoką aktywność powierzchniową płynów pochodzących oraz na profil produkcji cLP. Poziom zanieczyszczenia gleby w dużym stopniu determinuje skład i bioróżnorodność społeczności bakteryjnych, które ją zamieszkują (Sazykina i in. 2022). Tym samym, gleba z terenów wiejskich i leśnych może charakteryzować się bardziej zróżnicowaną mikrobiotą. W kontekście rolnictwa i ochrony roślin, bakterie z terenów wiejskich mogą być lepiej przystosowane do warunków, w jakich byłby stosowane jako biofungicydy.

Do badań wybrano w większości szczepy *Bacillus* zdolne do produkcji dwóch lub trzech biosurfaktantów o budowie cLP, z uwagi na doniesienia literaturowe, według których cLP-Bc mogą wzajemnie wzmacniać i wspomagać swoje działanie przeciwgrzybowe. Na przykład, w wyniku badań nad hamowaniem rozwoju fitopatogennego wobec ziemniaka szczepu *Phytophthora infestans* W101, Wang i in. (2020) stwierdzili, że produkowane przez szczep *B. pumilus* W-7 surfaktyna i fengicyna wykazują zdolność do synergistycznego hamowania wzrostu badanej grzybni. W efekcie tej pracy ustalono, że surfaktyna bierze udział w indukcji ISR, podczas gdy fengicyna przede wszystkim odpowiada za deformację komórek grzybowych, indukcję stresu

oksydacyjnego oraz destabilizację działania mitochondriów. Podobnie, w badaniach nad działaniem surfaktyny, fengicyny i mykosubtiliny, prowadzonych przez Mihalache i in. (2018), stwierdzono wzmocniony efekt działania mykosubtiliny i surfaktyny wobec fitopatogenicznego szczepu *F. oxysporum* f. sp. *iridacearum*. Połączenie powyższych związków znacznie zwiększało aktywność przeciwgrzybową, szczególnie w niskich stężeniach. Z kolei Liu i in. (2014a), w wyniku badań nad synergistycznym działaniem różnych cLP-Bc wobec fitopatogennych grzybów wykazali, że interakcje pomiędzy poszczególnymi biosurfaktantami mogą wywoływać efekty addytywne, synergistyczne lub negatywne (zależnie od zastosowanego szczepu grzybowego). Autorzy podkreślili, że korzyści płynące z działania szczepów produkujących różne cLP powinny być oceniane indywidualnie dla każdego szczepu.

W puli wybranych szczepów w większości znalazły się izolaty zdolne do produkcji fengicyny oraz nadprodukcji surfaktyny i ituryny (przyjęto, że jest to poziom nie niższy niż 15 mg L^{-1}). W literaturze naukowej istnieje niewiele prac, które opisują jednoczesną produkcję surfaktyny, ituryny i fengicyny przez bakterie *Bacillus*. W pracy autorstwa Jasim i in. (2016) wykorzystano technikę PCR oraz LC–MS/MS do potwierdzenia, że endofityczny szczep *Bacillus* sp. BmB 9 jest zdolny do jednoczesnej produkcji surfaktyny, ituryny i fengicyny. Nie wykonano jednak analizy ilościowej tych związków. W pracy Paraszkievicz i in. (2017) badano zdolność sześciu szczepów *Bacillus* do produkcji surfaktyny, ituryny i fengicyny. Wykorzystując technikę LC–MS/MS do ilościowej oceny surfaktyny i ituryny oraz technikę MALDI–TOF/TOF do jakościowej oceny produkcji fengicyny wyznaczono, że spośród sześciu badanych szczepów, trzy wykazywały zdolność do produkcji wszystkich trzech cLP.

Warto zaznaczyć, że szczepy *Bacillus* zdolne są do wytwarzania innych niż cLP-Bc metabolitów wtórnych, zdolnych do ograniczania wzrostu grzybni (Caulier i in. 2019). W związku z tym, poza szczepami *Bacillus* produkującymi jednocześnie surfaktynę, iturynę i fengicynę, do badań wybrano również szczepy zdolne do produkcji tylko dwóch lub jednego z powyższych cLP-Bc oraz takie szczepy, w hodowlach których nie stwierdzono produkcji cLP-Bc. Wybór ten opierał się na chęci zbadania szczepów o różnorodnych uzdolnieniach metabolicznych.

Wśród szczepów stosowanych w niniejszej pracy, najwyższym poziomem produkcji **surfaktyny** ($109,2 \text{ mg L}^{-1}$) charakteryzował się szczep Kol B1. Dane literaturowe wskazują, że wyznaczany poziom produkcji danego biosurfaktanta zależy od wielu czynników, między innymi od czasu prowadzenia hodowli, składu podłoża, a także sposobu ekstrakcji. Na przykład w pracy autorstwa Płazy i in. (2015) dla szczepu *B. subtilis* KP7 ustalony poziom produkcji surfaktyny wynosił $40,2 \text{ mg L}^{-1}$, przy czym związek ten izolowano z 48-godz. hodowli w podłożu LB stosując wstępne

zakwaszenie płynu pohodowlanego, a następnie ekstrakcję mieszaniną octanu etylu i metanolu. W pracy Paraszkievicz i in. (2017) zastosowanie techniki QuEChERS do ekstrakcji surfaktyny oraz wydłużenie czasu hodowli szczepu KP7 do 72 godz. powodowało, że poziom izolowanej z płynu pohodowlanego surfaktyny wzrósł do 61,5 mg L⁻¹. Z kolei wydłużenie czasu hodowli tego szczepu do 96 godz. W podłożu LB powodowało, że wyznaczany poziom surfaktyny wynosił 100,3 mg L⁻¹ (Paraszkievicz i in. 2018). Dodatkowo, w powyższej pracy stwierdzono, że produkcja surfaktyny przez szczep KP7 wzrasta dwukrotnie jeśli bakterie zamiast w podłożu LB hodowane są w podłożu Coopera. Jung i in. (2012) ustalili, że wyizolowany ze środowiska (dziki) szczep *B. subtilis* 1012WT produkuje 21,0 mg L⁻¹ surfaktyny, natomiast, mutant charakteryzujący się nadekspresją genów sygnalizacji pozakomórkowej bakterii, wydziela 6-krotnie więcej tego związku (135,1 mg L⁻¹). Istnieją również dane literaturowe, wskazujące, że niektóre szczepy *Bacillus* bezpośrednio izolowane ze środowiska także są zdolne bardzo wysokiej produkcji biosurfaktantów. Przykładem może być szczep *B. subtilis* #573 wyizolowany z próby ropy naftowej pochodzącej z szybu wiertniczego w Brazylii (Gudiña i in. 2012). Bakterie tego szczepu były zdolne do produkcji aż 1,3 g L⁻¹ surfaktyny podczas hodowli w podłożu CSL (ang. *Corn Steep Liquor*) zawierającym jako główny składnik odżywczy wyciąg namokowy kukurydzy (Gudiña i in. 2015). Dodatkowo, wykazano, że produkcję surfaktyny przez szczep #573 można zwiększyć do poziomu 4,4 g L⁻¹ wprowadzając do podłoża jony manganu.

W przypadku szczepów *Bacillus* badanych w niniejszej pracy najwyższe poziomy produkcji **ituryny** wynoszące 517,1 oraz 420,1 mg L⁻¹ ustalono kolejno dla izolatów Kol S11 i Kol Si4. Szczepy stosowane we wcześniejszych badaniach prowadzonych przez KMPIB UŁ, pomimo nadprodukcji ituryny, charakteryzowały się o wiele niższym poziomem wytwarzania tego cLP. Najwyższe poziomy produkcji ituryny w pracach Paraszkievicz i in. (2017, 2018) wynosiły 132,5 oraz 73,3 mg L⁻¹ kolejno dla szczepów *B. subtilis* IM 13 oraz *B. subtilis* l'-1a. Z kolei wyniki uzyskane przez Xu i in. (2020) wskazały, że dziki szczep *B. amyloliquefaciens* był zdolny do produkcji 409 mg L⁻¹ ituryny. Podobnie wysokie poziomy produkcji powyższego cLP, wynoszące 449 oraz 430 mg L⁻¹, wykazali Gao i in. (2022) oraz She i in. (2024) dla dwóch dzikich szczepów *B. amyloliquefaciens*. W literaturze naukowej opisano również szczepy *Bacillus* zdolne do wyższej produkcji ituryny, jednak badania te zazwyczaj koncentrują się na optymalizacji składu podłoża wzrostowego (Xu i in. 2020) lub wykorzystują różne strategie inżynierii genetycznej w celu maksymalizacji produkcji tego cLP (Xu i in. 2020; Gao i in. 2022; She i in. 2024).

W puli szczepów będących modelami badawczymi w niniejszej pracy znalazły się również trzy szczepy *Pseudomonas*. W wyniku analiz przeprowadzonych technikami LC–MS/MS oraz MALDI–TOF/TOF ustalono, że szczepy te nie wydzielają RL, natomiast są zdolne do produkcji cLP-Ps. Stwierdzono, że szczep *P. fluorescens* ASK 68 produkuje wiskozynę oraz HAA (będący prekursorem RL), szczep *P. koreensis* ASK 10 wydziela folipeptynę, natomiast szczep *Pseudomonas* sp. Zg 9.3 produkuje milkisynę C.

Według danych literaturowych, **wiskozyna** jest głównie produkowana przez szczepy *P. fluorescens* (Geudens i in. 2017; Guan i in. 2024). Niemniej jednak istnieją doniesienia, według których szczepy innych gatunków *Pseudomonas*, np. *P. libanensis* M9-3 (Saini i in. 2008) czy *P. antarctica* 28E (Ciurko i in. 2023), również mogą być zdolne do produkcji wiskozyny. Powyższy lipopeptyd (podobnie jak wiele innych cLP-Ps), opisywany jest jako związek, który może mieć zastosowanie w medycynie, w ochronie roślin czy też w procesach bioremediacji (np. w technikach polegających na usuwaniu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych z gleby czy podczas mikrobiologicznego odzyskiwania ropy naftowej) (Saini i in. 2008; Alsohim i in. 2014; Guan i in. 2024; Ma i in. 2023). Badania nad szczepem *P. fluorescens* SBW25 wykazały, że wiskozyna odgrywa kluczową rolę w ruchliwości bakterii (ang. *motility*), podczas formowania biofilmów i w efektywnej kolonizacji korzeni pszenicy. Wykazano także istotny udział wiskozyny w ochronie roślin przed fitopatogenami, w tym przed szczepem *Pythium* sp. FFP1 (Alsohim i in. 2014; Bonnichsen i in. 2015, Guan i in. 2024). Geudens i in. (2017) ustalili, że wiskozyna produkowana przez szczep *P. fluorescens* DR54 (podobnie jak wiele innych cLP) wykazuje silną aktywność przeciwbakteryjną i wpływa na przepuszczalność błon komórkowych.

Stwierdzono, że stosowany w niniejszej pracy szczep *P. fluorescens* ASK 68, poza wiskozyną, jest również zdolny do produkcji **HAA**. Powyższy metabolit opisywany jest w literaturze jako związek będący prekursorem RL (Germer i in. 2020). Zdolność do produkcji tego związku wykazano dotychczas między innymi dla szczepu *P. aeruginosa* (Deziel i in. 2003). HAA charakteryzuje się wysoką aktywnością powierzchniową (silnie obniża napięcie powierzchniowe) oraz bierze udział w procesie kolonizacji powierzchni przez wytwarzające go bakterie. Tiso i in. (2017) stwierdzili, że niewielki rozmiar HAA sprawia, że więcej cząsteczek może gromadzić się na granicy dwóch faz różniących się powinowactwem do wody, co w efekcie prowadzi do silniejszego spadku napięcia powierzchniowego (w porównaniu do większych cząsteczek innych surfaktantów).

W niniejszej pracy ustalono, że szczep *P. koreensis* ASK 10 jest zdolny do produkcji **folipeptyny** – cyklicznego lipopeptydu, wyizolowanego po raz pierwszy przez Ui i in. (1997) z hodowli *P. fluorescens*. Folipeptyna jest cLP-Ps zaliczanym do grupy amfisyn (Raaijmakers i in. 2006). Niewiele jest danych w literaturze naukowej na temat

powyższego związku. W pracy Ui i in. (1997), opisano folipeptynę jako inhibitor fosfolipaz C – grupy enzymów odgrywających kluczową rolę w szlakach sygnalizacyjnych komórek różnych organizmów. Powyższe enzymy biorą udział m.in. we wzroście grzybni, produkcji zarodników oraz procesie infekowania tkanek roślinnych (Fang i in. 2023). Biorąc pod uwagę funkcję folipeptyny jako inhibitora fosfolipaz C, powyższy biosurfaktant potencjalnie może odgrywać pozytywną rolę w ochronie roślin przed fitopatogennymi grzybami. Przegląd danych literaturowych nie wskazał innych doniesień na temat szczepów *P. koreensis* zdolnych do produkcji folipeptyny. Istnieją natomiast doniesienia na temat szczepów tego gatunku bakterii zdolnych do produkcji lokisyny (Hultberg i in. 2009; Gu i in. 2020) – lipopeptydu, który podobnie jak folipeptyna należy do grupy amfisyn (Sørensen i in. 2002).

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy ustalono, że szczep *Pseudomonas* sp. Zg 9.3, wyizolowany ze Składowiska Odpadów Niebezpiecznych w Zgierzu, ma zdolność do produkcji **milkisyny C**. Milkisyna jest niedawno odkrytym przeciwbakteryjnym cLP, który może być wydzielany przez niektóre szczepy *Pseudomonas* w formie czterech izoform: A, B, C lub D (Chauhan i in. 2023). Powyższy związek po raz pierwszy został wyizolowany z hodowli szczepu *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 pochodzącego z mleka krowiego (Schlusselhuber i in. 2018; Schlusselhuber i in. 2020). Wykazano, że milkisyna działa przeciwbakteryjnie wobec szczepów należących do *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* czy *Staphylococcus aureus* (Schlusselhuber i in. 2018; Chauhan i in. 2023).

W niniejszej pracy oceniono **aktywność przeciwgrzybową** badanych szczepów bakteryjnych wobec szczepów grzybów z rodzaju *Fusarium*, wykorzystując zarówno hodowle na podłożu zestalonym agarem, jak i hodowle prowadzone w podłożu płynnym. Analizowano działanie przeciwgrzybowych metabolitów wydzielanych do podłoża oraz związków o charakterze lotnym. Wyniki badań wykazały zróżnicowaną aktywność przeciwgrzybową badanych szczepów.

W części badań, w której wykorzystano **podłoże zestalone agarem**, szczep *Bacillus* sp. Kol B2 wyróżniał się największą skutecznością, hamując wzrost grzybni *F. culmorum* DSM 1094 o 55,9%, a *F. sambucinum* IM 6525 o 40,0%. Wyznaczono słabą ujemną korelację pomiędzy wyższą produkcją surfaktyny przez szczepy z rodzaju *Bacillus* a intensywnością wzrostu grzybni (-0,40 dla układów z grzybnią szczepu DSM 1094 oraz 0,40 dla układów z grzybnią szczepu IM 6525). W przypadku produkcji ituryny stwierdzono umiarkowaną ujemną korelację z intensywnością wzrostu grzybni (- 0,53 dla układów z grzybnią szczepu DSM 1094 oraz -0,52 dla układów z grzybnią szczepu IM 6525). Wynik ten wskazuje na częściowy udział powyższych lipopeptydów w ograniczaniu wzrostu obu badanych grzybów. Słaba korelacja w przypadku surfaktyny

sugeruje, że jej wpływ na hamowanie wzrostu strzępek jest słabszy, podczas gdy umiarkowana korelacja w przypadku ituryny wskazuje na silniejszy efekt hamujący wzrost badanych fitopatogenów. Mimo to, prawdopodobnie w aktywności przeciwwgrzybowej biorą udział również inne czynniki.

Spośród 75 ocenionych szczepów bakteryjnych, w przypadku 22 hodowli *dual culture* z grzybnią *F. sambucinum* IM 6525 obserwowano kolonizację powierzchni strzępek przez bakterie oraz intensywny, dendrytyczny wzrost populacji bakteryjnej w kierunku macierzystej kolonii bakteryjnej. Proces ten skutecznie uniemożliwił dalszą kolonizację powierzchni podłoża przez strzępki. Zjawisko to stanowi przykład konkurencji drobnoustrojów o środowisko wzrostu. Bakterie wielu szczepów *Bacillus* mogą poruszać się w środowisku za pomocą rzęsek (ang. *swimming motility*) lub przemieszczać się ruchem ślizgowym (ang. *sliding motility*) w wyniku wydzielania biosurfaktantów (Sharma i in. 2021). Istnieją dane, według których obecność grzybni w środowisku wzrostu ułatwia bakteriom ruch za pomocą rzęsek. Powyższy proces pozwala komórkom bakteryjnym na poruszanie się wzdłuż strzępek oraz ich kolonizację (Kohlmeier i in. 2005; Ingham i in. 2011). Według Haq i in. (2014) strzępki grzybów mogą wiązać cząsteczki wody wokół swoich komórek, a tym samym wspomagać ruchliwość bakterii. Pion i in. (2013) stwierdzili, że obecność rzęsek na komórkach szczepu *P. putida* KT2440 pozwala bakteriom przemieszczać się po powierzchni grzybni *Morchella crassipes* a tym samym zwiększa zdolność bakterii do przetrwania w środowiskach o ograniczonym dostępie wody. Z kolei w wyniku wydzielania związków powierzchniowo czynnych dochodzi do obniżenia napięcia międzyfazowego, co dodatkowo ułatwia komórkom bakteryjnym przemieszczanie się po różnych powierzchniach, a także umożliwia skuteczne kolonizowanie różnego rodzaju struktur oraz wytwarzanie biofilmu (Sharma i in. 2021).

W wyniku przeprowadzonych w niniejszej pracy analiz mikroskopowych w przypadku 22 z 75 badanych szczepów zaobserwowano wzrost komórek bakteryjnych wzdłuż strzępek *F. sambucinum* IM 6525. Stwierdzono także, że szczepy kolonizujące powierzchnię strzępek tej grzybni miały statystycznie większą zdolność do hamowania jej wzrostu niż te, które nie wykazywały tego zjawiska. Ponadto, porównując te wyniki z danymi dotyczącymi produkcji surfaktyny i ituryny, zauważono, że szczepy zdolne do kolonizacji strzępek szczepu IM 6525 częściej produkowały iturynę w ilości przekraczającej 200 mg L⁻¹ oraz częściej wytwarzały fengicynę niż te, które nie wykazywały tej zdolności.

Zjawisko kolonizacji strzępek przez komórki innych drobnoustrojów nie jest nowe. Pisi i in. w 2006 r. opisali pasożytnicze działanie różnych szczepów z rodzaju *Trichoderma* (należących do PGPF) wobec szczepów *F. culmorum*,

Fusarium graminearum i *Fusarium nivale*. Proces ten polegał otaczaniu komórek *Fusarium* przez strzępki *Trichoderma*. Podobnie Chege i in. (2010) wykazali, że pasożytnicze działanie szczepu *T. harzianum* polega na wzroście strzępek, ściśle przylegających do strzępek żywiciela (fitopatogennego szczepu *Pythium*). W wyniku działania różnych metabolitów wydzielanych przez *Trichoderma* dochodziło do degradacji komórek *Fusarium*. Podobne zjawisko obserwowane jest także w przypadku niektórych szczepów bakteryjnych. Na przykład, wykazano, że komórki *P. fluorescens* BBc6 mają zdolność do tworzenia biofilmu na strzępkach *Laccaria bicolor* S238N (Miquel Guennoc i in. 2017; 2018). Kjeldgaard i in. (2019) badali tego typu interakcje stosując różne szczepy *B. subtilis* oraz szczepy grzybów należące do gatunków *Aspergillus niger* i *Agaricus bisporus*. Uzyskane w powyższej pracy wyniki wskazały, że macierz biofilmu jest kluczowym elementem w procesie kolonizacji strzępek grzybni.

W niniejszej pracy, wykorzystując hodowle na podłożu stałym, zbadano także zdolność wybranych 32 szczepów bakteryjnych do produkcji przeciwgrzybowych **związków o charakterze lotnym (VOCs)**. Zastosowana metoda analizy z użyciem dwukomorowych szalek Petriego uniemożliwiła migrację metabolitów takich jak cLP w podłożu i spowodowała, że w efekcie znaczna większość badanych szczepów bakteryjnych miała jedynie niewielki wpływ na wzrost **grzybni powierzchniowej** szczepu *F. culmorum* DSM 1094 oraz nie miała żadnego wpływu na wzrost grzybni powierzchniowej szczepu *F. sambucinum* IM 6525. Spośród ocenianych szczepów, VOCs produkowane przez *Bacillus* sp. Kol B3 oraz *Bacillus* sp. KAS 2.2 najsilniej hamowały wzrost grzybni powierzchniowej szczepu DSM 1094. W obecności tych bakterii, intensywność wzrostu grzybni wynosiła kolejno 74,9 oraz 71,0%. Dla siedmiu szczepów nie stwierdzono produkcji związków hamujących wzrost grzybni powierzchniowej (intensywność wzrostu grzybni wynosiła $\geq 95\%$). W pozostałych układach wzrost powierzchniowy grzybni mieścił się w przedziale od 79,8 do 93,6%. W badaniach przeprowadzonych przez He i in. (2020) z wykorzystaniem dwukomorowych płytek Petriego stwierdzono, że szczep *B. methylotrophicus* BCN2 ograniczał wzrost grzybni szczepu *F. oxysporum* o około 10-20%. W cytowanej pracy najwyższy poziom zahamowania wzrostu grzybni (47%) w obecności VOCs wydzielanych przez bakterie szczepu BCN2 wyznaczono dla szczepu grzyba z rodzaju *Botryosphaeria*.

W niniejszej pracy obserwowano różnorodny wpływ bakteryjnych VOCs na wzrost **grzybni powietrznej** badanych szczepów *Fusarium*. Podobnie jak w przypadku grzybni powierzchniowej, nie stwierdzono wpływu bakteryjnych VOCs na grzybnę powietrzną *F. sambucinum* IM 6525. Zaobserwowano jednak wyraźny wpływ tych związków na grzybnę powietrzną drugiego badanego szczepu – *F. culmorum*

DSM 1094. Różnica w działaniu VOCs na oba szczepy grzybowe może wynikać z indywidualnych cech danego grzyba, takich jak na przykład intensywność zarodnikowania. W późniejszych badaniach nad wpływem metabolitów bakterii na kiełkowanie zarodników stwierdzono, że gęstość zarodników szczepu IM 6525 otrzymana pod zmyciu powierzchni grzybni była około 100 razy większa niż gęstość zarodników w próbie szczepu DSM 1094. He i in. (2020) również obserwowali zróżnicowany wpływ bakterii wytwarzających VOCs na grzyby. Stwierdzili także, że VOCs produkowane przez bakterie *B. thuringiensis* BCN10 nie mają wpływu na wzrost grzybni szczepu *F. oxysporum*, ale ograniczają wzrost innych grzybów, np. szczepu *Penicillium expansum*.

W niniejszej pracy stwierdzono, że wszystkie oceniane 32 szczepy bakteryjne wydzielają VOCs, wpływające na morfologię strzępek powietrznych grzybni *F. culmorum* DSM 1094. Wyznaczono, że związki wydzielane przez *Bacillus* sp. Kol D4 miały największy wpływ, powodując wyraźne zahamowanie rozwoju strzępek powietrznych. Inni badacze również obserwowali wpływ bakteryjnych VOCs na intensywność wzrostu oraz morfologię strzępek grzybni. Zhang i in. (2020a) zaobserwowali, że w wyniku działania VOCs wytwarzanych przez *B. subtilis* ZD01 grzybnia *Alternaria solani* stawała się bardziej zbita i zmieniała barwę. Podobnie, Chaves-López i in. (2015) podczas analiz z użyciem dwukomorowych szelek Petriego zaobserwowali cztery różne efekty działania VOCs wydzielanych przez bakterie różnych szczepów *Bacillus* na morfologię grzybni: 1) silne ograniczenie sporulacji u *A. flavus* MG09 w obecności VOCs *B. cereus* SV40, *B. subtilis* SV36/2 i *B. coagulans* SV95; 2) silne hamowanie wzrostu grzybni *M. perniciosa* DM4B w obecności VOCs *B. cereus* SV75-1; 3) zmianę morfologii grzybni polegającą na ograniczeniu produkcji różowego pigmentu przez szczep *F. oxysporum* f.sp. *lactucae* MA28 w obecności VOCs *B. amyloliquefaciens* M49 oraz 4) stymulację wzrostu grzybni oraz zarodnikowania w próbach *A. clavatus* MG103 i *A. parasiticus* MG51, poddanych działaniu VOCs wydzielanych odpowiednio przez szczep *B. cereus* SV40 i *B. amyloliquefaciens* SV20-2. Jako główny mechanizm leżący u podstaw działania przeciwgrzybowych VOCs wskazywana jest indukcja stresu oksydacyjnego oraz zaburzenie struktury ściany komórkowej i błony, prowadzące nawet do lizy komórek (Li i in. 2012; Tahir i in. 2017; Ebadzadsahrai i in. 2020; Wang i in. 2021; Zhao i in. 2022b).

Badając aktywność przeciwgrzybową w ramach niniejszej pracy wykorzystano nie tylko hodowle na podłożu stałym, ale również **hodowle w podłożu płynnym**. Jednoczesne namnażanie komórek bakteryjnych i grzybowych w środowisku płynnym spowodowało, że grzybnia miała bardziej równomierny kontakt z metabolitami bakteryjnymi niż w hodowli prowadzonej na podłożu stałym. Wyniki analizy hodowli

mieszanych (bakteryjno-grzybowych), które prowadzono w warunkach wstrząsanych ponownie wykazały zróżnicowaną aktywność przeciwgrzybową bakterii. Stwierdzono, że większość badanych szczepów bakteryjnych znacząco hamuje wzrost grzybni obu użytych w badaniu szczepów *Fusarium*. Najwyższą aktywnością przeciwgrzybową charakteryzowały się szczepy *Bacillus* opisywane symbolami Kol B1, Kol Si4 oraz Kol Si6, dla których ograniczenie wzrostu grzybni szczepu DSM 1094 wynosiło kolejno 75,5; 73,9 oraz 81,8%, a wzrostu szczepu IM 6525 odpowiednio 81,7; 80,1 oraz 80,6%. Wcześniejsze badania prowadzone w KMPiB UŁ z użyciem hodowli płynnych do oceny aktywności przeciwgrzybowej szczepów *Bacillus* wykazały, że ograniczenie wzrostu biomasy grzybni różnych szczepów z rodzaju *Fusarium* w obecności szczepów *B. subtilis* IM 13 i *B. subtilis* IM 14 mieści się w przedziale odpowiednio 50,5-56,2 oraz 43,3-47,1% (Paraszkiewicz i in. 2017). W niniejszej pracy także zbadano działanie przeciwgrzybowe szczepów IM 13 oraz IM 14 wobec grzybni innych szczepów *Fusarium* (DSM 1094 oraz IM 6525). Aktywność przeciwgrzybowa wyznaczona w niniejszej pracy była porównywalna do wyników z pracy Paraszkiewicz i in. (2017). W obecności komórek szczepu IM 13 wzrost grzybni *Fusarium* szczepów DSM 1094 oraz IM 6525 był ograniczony odpowiednio o 55 oraz 61%, natomiast w obecności komórek szczepu IM 14 ograniczenie wzrostu grzybni wynosiło odpowiednio 41 oraz 53%. W pracy Putri i in. (2021), w której oceniano wpływ *B. subtilis* W3.15 na wzrost szczepu *F. oxysporum* (na podstawie biomasy grzybni), stwierdzono, że obecność bakterii w hodowli płynnej ogranicza wzrost grzybni o 70%. Z kolei w pracy Dukare i in. (2020) nad aktywnością przeciwgrzybową *Pseudomonas* spp. NS-1 i *Bacillus* spp. NS-22 wobec *Fusarium udum*, stwierdzono, że bakterie powyższych szczepów ograniczają biomasę grzybni o kolejno 47,6 oraz 42,6%. Biorąc pod uwagę dane literaturowe, można stwierdzić, że analizowane w niniejszej pracy szczepy *Bacillus* Kol B1, Kol Si4 czy Kol Si6 charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwgrzybową.

Co ciekawe, ponownie stwierdzono, że w porównaniu do pozostałych badanych izolatów, szczepy, dla których opisano zdolność do kolonizacji powierzchni strzępek IM 6525 częściej wykazują wysoką aktywność przeciwgrzybową w hodowlach płynnych wobec obu użytych w doświadczeniu szczepów *Fusarium*. Może to być związane ze wspomnianą już wcześniej wysoką produkcją ituryny oraz zdolnością do produkcji fengicyny, które są cLP-Bc o silnym działaniu przeciwgrzybowym. Ponadto, wyznaczono umiarkowaną negatywną korelację (-0,46) pomiędzy poziomem produkcji ituryny a intensywnością wzrostu grzybni *F. culmorum* DSM 1094. Taka zależność nie występowała natomiast w przypadku drugiego szczepu grzybowego. W tej części badań nie stwierdzono również korelacji pomiędzy poziomem produkcji surfaktyny a aktywnością przeciwgrzybową. Co ciekawe ustalono również, że wszystkie szczepy,

charakteryzujące się aktywnością przeciwgrzybową ocenianą jako wysoka (powodujące spadek intensywności wzrostu grzybni do $\leq 35\%$) wobec obu badanych szczepów *Fusarium* zostały wyizolowane z terenu wiejskiego (wieś Kolnica, województwo wielkopolskie).

Analizując wszystkie dotychczas uzyskane wyniki, dotyczące aktywności przeciwgrzybowej badanych szczepów bakteryjnych, stwierdzono dużą zależność między wyznaczaną aktywnością przeciwgrzybową bakterii a zastosowanymi warunkami hodowli oraz użytym do badania szczepem *Fusarium*. Powyższe dane wskazują na potencjalne trudności w doborze szczepów bakteryjnych do zaprojektowania efektywnego biofungicydu.

Bakteryjne cLP w większości zaliczane są także do antybiotyków, a tym samym stanowią część mechanizmów obronnych bakterii przeciwko innym mikroorganizmom, w tym fitopatogennym grzybom. Podczas prowadzonych w ramach niniejszej pracy badań, oceniano nie tylko wpływ bakterii produkujących cLP na wzrost grzybni, ale również **wpływ obecności grzybni na produkcję cLP-Bc** przez bakterie.

Przeprowadzono badania nad wpływem obecności grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525 na produkcję surfaktyny i ituryny przez 20 szczepów *Bacillus*. Uzyskane wyniki wykazały, że w obrębie wszystkich ocenianych szczepów, tylko w przypadku szczepu Kol D3 oraz Kol D4 w hodowlach bakteryjno-grzybowych nastąpił wzrost poziomu przynajmniej jednego ocenianego biosurfaktanta. Dla pozostałych badanych szczepów wyznaczono spadek poziomu surfaktyny i ituryny w hodowlach mieszanych bakteryjno-grzybowych. Wyznaczona intensywność produkcji surfaktyny w hodowli mieściła się w przedziale 0-77% dla surfaktyny oraz 0-88% dla ituryny. Najwyższy wzrost poziomu cLP uzyskano w hodowlach szczepu *Bacillus* sp. Kol D4, w których wyznaczono wyższą (niż w hodowli bakteryjnej bez dodatku grzybni) produkcję surfaktyny w obecności grzybni szczepu IM 6525 (o 19%) oraz ituryny w obecności grzybni obu badanych szczepów (o 21% w hodowli z grzybnią szczepu DSM 1094 oraz o 18% w hodowli z grzybnią szczepu IM 6525). Jednak wysoki poziom surfaktyny i ituryny w hodowli mieszanej szczepu *Bacillus* sp. Kol D4 i szczepu *F. sambucinum* IM 6525 nie prowadził do zahamowania rozwoju grzybni, której intensywność wzrostu wynosiła 100%.

Dostępne dane literaturowe wskazują, że szczepy należące do gatunków takich jak *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* czy *B. subtilis* mogą w różny sposób reagować na obecność antagonistycznych grzybów (Andrić i in. 2020). Na przykład Cawoy i in. (2014), stwierdzili, że komórki szczepu *B. subtilis* 98S znacznie zwiększają produkcję ituryny i fengicyny w odpowiedzi na obecność w środowisku wzrostu grzybni szczepów *Pythium aphanidermatum* i *F. oxysporum*. Efektu tego nie obserwowano w układach

zawierających grzybnię szczepu *Botrytis cinerea*. Podobnie, wykazano, że trzy szczepy *B. velezensis* (SQR9, FZB42, S499) w odmienny sposób reagują zmianą metabolizmu na obecność różnych szczepów grzybów, prowadzącą do specyficznej nadprodukcji wybranych cLP (Liu i in. 2014b; Chowdhury i in. 2015). W badaniach przeprowadzonych przez Paraszewicz i in. (2017) stwierdzono, że w obecności grzybni szczepu *F. oxysporum* IM 6449: szczep *B. subtilis* IM 13 produkuje dwukrotnie więcej surfaktyny i ituryny, podczas gdy szczep *B. subtilis* IM 14 ogranicza poziom wydzielanej surfaktyny i ituryny. Z kolei szczep *B. subtilis* KP7 również wykorzystany w cytowanej pracy charakteryzował się porównywalnym poziomem produkcji surfaktyny i ituryny zarówno w obecności grzybni jak i w hodowli kontrolnej. DeFilippi i in. (2018), oceniając produkcję surfaktyny i fengicyny przez szczep *B. subtilis* B9-5 w obecności strzępek różnych fitopatogennych grzybów, stwierdzili, że zmiany w produkcji cLP, obserwowane w kolejnych etapach hodowli, zależą zarówno od wrażliwości fitopatogenów na biosurfaktanty *Bacillus* jak i od różnic w dynamice wzrostu grzybni oraz bakterii. Zarówno Cawoy i in. (2014) jak i Kulimushi i in. (2017) sugerują, że zmiany poziomu produkcji cLP mogą być odpowiedzią bakterii na sygnały molekularne uwalniane przez grzyby.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy oraz przegląd danych literaturowych wskazują, że zmienność poziomu produkcji cLP-Bc w odpowiedzi na obecność grzybni jest wysoce zależna od użytych szczepów drobnoustrojów, co może być wynikiem złożonych interakcji między komórkami bakteryjnymi i grzybowymi. W wyniku badań prowadzonych w niniejszej pracy stwierdzono dodatnią, choć słabą, korelację pomiędzy poziomem surfaktyny (0,36) i ituryny (0,41) w hodowlach bakteryjno-grzybowych zawierających grzybnię *F. sambucinum* IM 6525 a przyrostem biomasy grzybowej. Możliwe, że bakterie początkowo produkują surfaktynę i iturynę na wysokim poziomie, jednak w trakcie ograniczania wzrostu grzybni związki te są zużywane, co prowadzi do spadku ich poziomu w próbach. Innym wyjaśnieniem może być reakcja obronna grzybni na obecność biosurfaktantów, polegająca na przykład na wydzielaniu sygnałów molekularnych, modyfikujących produkcję cLP lub wytwarzaniu enzymów biorących udział w ich rozkładzie.

Podczas prowadzonych w niniejszej pracy badań sprawdzono również wpływ innych niż obecność grzybni czynników, które mogą modyfikować produkcję cLP przez szczepy *Bacillus*. Analizie poddano między innymi **hodowle bakteryjne zawierające dwa różne szczepy *Bacillus***. Badanie to pozwoliło ocenić czy, czy współdziałanie bakterii różnych szczepów może zwiększać produkcję biosurfaktantów i w konsekwencji prowadzić do silniejszego efektu przeciwgrzybowego. Oddziaływania pomiędzy drobnoustrojami w środowisku naturalnym przebiegają w oparciu o wysyłanie i odbieranie związków sygnałowych, często modyfikujących biosyntezę różnych

metabolitów wtórnych (Abisado i in. 2018; Mukherjee i Bassler 2019). W warunkach laboratoryjnych geny odpowiedzialne za produkcję takich związków mogą jednak pozostać nieaktywne. W odpowiedzi na to wyzwanie, przez lata rozwijano metody indukcji nieaktywnych szlaków biosyntetycznych. Jedną z takich metod jest wspólna hodowla dwóch różnych drobnoustrojów w tym samym środowisku wzrostu (Bertrand i in. 2014).

W związku z tym, w niniejszej pracy przeprowadzono wstępną ocenę produkcji biosurfaktantów w hodowlach zawierających komórki dwóch szczepów *Bacillus* wyznaczając zmiany aktywności powierzchniowej płynów pohodowlanych testem DCT. Stwierdzono, że w przypadku 10 spośród 37 zbadanych bakteryjnych hodowli mieszanych aktywność powierzchniowa płynów pohodowlanych była wyższa niż w przypadku monokultur. W obrębie badanych układów, cztery hodowle wykazujące największy wzrost aktywności powierzchniowej w porównaniu do monokultur, zawierały komórki szczepu *B. subtilis* DSM 3257. Inni badacze również stwierdzali wzmożoną produkcję biosurfaktantów przez szczepy *Bacillus* hodowane w konsorcjach bakteryjnych. Na przykład Shao i in. (2022) porównując dane doświadczalne uzyskane za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej faz odwróconych (RP-HPLC; ang. *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*) ustalili, że hodowle mieszane zawierające szczepy *B. velezensis* SQR9 i FZB42 charakteryzują się większą produkcją bacillomycyny D oraz fengicyny niż monokultury tych szczepów.

Podczas opisywanych w niniejszej pracy badań oceniono wpływ czterech par szczepów *Bacillus* na wzrost grzybni czterech szczepów *Fusarium*: *F. culmorum* DSM 1094, *F. sambucinum* IM 6525, *F. solani* IM 450 oraz *F. oxysporum* KKP 458. Pomimo wykazanej wcześniej wyższej aktywności powierzchniowej, ustalono, że w znacznej większości przypadków aktywność przeciwgrzybowa w układzie zawierającym dwa szczepy *Bacillus* nie jest istotnie wyższa niż w układach zawierających tylko jeden szczep *Bacillus*. Wyjątek stanowił jeden układ badany, zawierający grzybnię *F. oxysporum* KKP 458 oraz bakterie szczepów Kol D3 i DSM 3257. Podczas, gdy intensywność wzrostu powyższej grzybni w obecności komórek pojedynczych szczepów wynosiła około 45%, w obecności komórek obu szczepów wyniosła około 30%. W pracy autorstwa Slimene i in. (2024) badano skuteczność przeciwgrzybową konsorcjów różnych szczepów *Bacillus* zdolnych do produkcji cLP wobec szczepu *Rhizoctonia solani* RS.5.2, o potwierdzonej zdolności do wywoływania rizoktoriozy ziemniaka. Stwierdzono, że szczep *B. halotolerans* SpS5 i jego konsorcja z innymi szczepami *Bacillus* są skuteczne w promocji wzrostu ziemniaka oraz spowalniają przebieg choroby, jednak aktywność przeciwgrzybowa tych konsorcjów nie różniła się znacząco od aktywności przeciwgrzybowej pojedynczych szczepów.

Przeprowadzona przez Shao i in. (2022) ocena wpływu szczepów *B. velezensis* SQR9 i FZB42 na aktywność przeciwgrzybową wobec szczepu *F. oxysporum* wykazała, że konsorcjum bakteryjne jest mniej efektywne niż pojedyncze szczepy. Devi i in. (2018) przedstawili wyniki badań nad promocją wzrostu i ochroną ziemniaka przed fuzariozą z wykorzystaniem konsorcjów, w skład których wchodziły bakterie należące do różnych gatunków drobnoustrojów. Autorzy stwierdzili, że konsorcjum zawierające komórki różnych szczepów *P. aeruginosa* (B4, B23, B25 oraz B35) oraz szczepów *Serratia marcescens* B8 i *Alcaligenes faecalis* B16 stymuluje wzrost ziemniaka oraz chroni przed chorobą wywoływaną przez *F. oxysporum* F9 oraz *Fusarium* sp. F15.

Niestety nie ma zbyt wielu prac, w których wykazano wzrost aktywności przeciwgrzybowej konsorcjów zawierających komórki różnych szczepów *Bacillus* oraz zawierających dane dotyczące ilościowej analizy biosurfaktantów. W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono analizę ilościową produkcji surfaktyny i ituryny w hodowli mieszanej szczepów *Bacillus* sp. Kol D3 oraz *B. subtilis* DSM 3257. Powyższa hodowla charakteryzowała się wzmożoną aktywnością przeciwgrzybową wobec *F. oxysporum* KKP 458. Stwierdzono jednak, że pomimo wzrostu aktywności przeciwgrzybowej, produkcja surfaktyny i ituryny w bakteryjnej hodowli mieszanej nie była wyższa niż w monokulturze. Możliwe, że wzmożona aktywność przeciwgrzybowa wynika z nadprodukcji np. enzymów litycznych lub innych niż surfaktyna i ituryna metabolitów wtórnych. Biorąc pod uwagę biosurfaktanty *Bacillus*, szczep *B. subtilis* DSM 3257 charakteryzuje produkcją jedynie surfaktyny na bardzo niskim poziomie ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$). Mimo to, w przeprowadzonych badaniach z użyciem wszystkich czterech badanych szczepów grzybni z rodzaju *Fusarium* (*F. culmorum* DSM 1094, *F. sambucinum* IM 6525, *F. solani* IM 450 oraz *F. oxysporum* KKP 458) wykazał znaczącą aktywność przeciwgrzybową. Być może, zwiększona aktywność przeciwgrzybowa w hodowlach zawierających oba badane szczepy *Bacillus* wynika z addytywnego działania cLP-Bc produkowanych przez szczep *Bacillus* sp. Kol D3 oraz innych związków o aktywności przeciwgrzybowej produkowanych przez szczep *B. subtilis* DSM 3257. Podobnie jak we wcześniejszych badaniach będących częścią tej pracy, również w przypadku hodowli dwóch szczepów *Bacillus* obecność grzybni powodowała istotne ograniczenie produkcji analizowanych cLP-Bc. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wybór konsorcjów bakteryjnych do produkcji biofungicydu nie może opierać się wyłącznie na zwiększonej produkcji związków powierzchniowo czynnych. Podobnie jak w przypadku pojedynczych szczepów, działanie konsorcjów bakteryjnych zależy od wielu czynników takich jak indywidualne cechy fitopatogenicznego szczepu grzyba.

Istotna część wyników badań przedstawionych w niniejszej pracy dotyczyła analizy wpływu wybranych **zanieczyszczeń antropogenicznych** na produkcję

biosurfaktantów / aktywność powierzchniową płynów pochodowlanych oraz zdolność wybranych szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas* do ograniczania wzrostu grzybów *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. W powyższych badaniach stosowano barwniki azowe (AB113, RB5, AMR, RO16 oraz SY), MP oraz herbicydy (MET i 2,4-D) i fungicydy (AZ i PR).

Do badań z użyciem **barwników azowych** wybrano szczepy wyizolowane z ryzosfery pobranej ze środowisk o potencjalnie wysokim zanieczyszczeniu antropogenicznym (Składowisko Odpadów Niebezpiecznych w Zgierzu oraz Aleja Klonów Srebrzystych). Szczepy izolowane z terenów zanieczyszczonych często wykazują wysoką oporność na niekorzystne dla wzrostu czynniki fizykochemiczne. Badaniom wstępnym z użyciem pięciu barwników azowych (AB113, RB5, AMR, RO16 oraz SY) poddano siedem szczepów z rodzaju *Bacillus* (Zg 1.3, Zg 1.4, Zg 3.3, Zg 3.8, Zg 7.6, Zg 8.6, Zg 8.8) oraz trzy szczepy z rodzaju *Pseudomonas* (Zg 9.3, ASK 10 i ASK 68).

Większość danych literaturowych dotyczących barwników azowych oraz biosurfaktantów skupia się na wykorzystaniu drobnoustrojowych związków powierzchniowo czynnych do usuwania / zwiększania efektywności dekoloryzacji barwników azowych (Mnif i in. 2015; Liu i in. 2017; Kumari i in. 2024). W niniejszej pracy oceniono nie tylko zdolność badanych szczepów do dekoloryzacji barwników, ale również wpływ tych związków na wzrost bakterii oraz na aktywność powierzchniową wydzielanych biosurfaktantów (na podstawie wyników testu DCT, pośrednio wskazujących na zmiany w produkcji związków powierzchniowo czynnych). Uzyskane dane wskazały, że obecność barwników azowych nie ogranicza wzrostu zastosowanych w badaniach szczepów bakteryjnych. Wykazano także, że trzy szczepy (*P. koreensis* ASK 10, *P. fluorescens* ASK 68 oraz *Bacillus* sp. Zg 8.6) mają zdolność do dekoloryzacji wszystkich użytych w badaniu barwników azowych. Pozostałe szczepy nie dekoloryzowały jedynie barwnika SY. Najwyższą skutecznością powyższego procesu charakteryzowały się szczepy *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68. Różnice w uzdolnieniach bakterii do dekoloryzacji poszczególnych barwników azowych mogą zależeć od specyficznych struktur tych barwników (Al-Amrani i in. 2014; Varjani i in. 2020). Różne szczepy bakterii zostały opisane jako zdolne do efektywnego odbarwiania / biodegradacji barwników azowych (Pinheiro i in. 2022). Wiele z tych mikroorganizmów zostało zidentyfikowanych jako bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* (Jadhav i in. 2012; Khan i Malik 2016; Kuppusamy i in. 2017; Joshi i in. 2020). W literaturze obecne są doniesienia o zdolności szczepów *P. fluorescens* do dekoloryzacji barwników azowych (Pandey i Upadhyay 2006; Zabłocka-Godlewska i in.

2012; Sumayya i in. 2021). Niemniej jednak nie ma wielu danych literaturowych o szczepach *P. koreensis* zdolnych do przeprowadzania tego procesu (Han i in. 2010).

Stwierdzono, że obecność barwników azowych w hodowlach bakteryjnych wywiera zróżnicowany wpływ na aktywność powierzchniową płynów pochodzących. Wykazano umiarkowaną korelację (-0,59) pomiędzy intensywnością dekoloryzacji barwnika a spadkiem aktywności powierzchniowej płynów pochodzących. Zależność ta była szczególnie widoczna w układach zawierających barwnik AB113, który był również najskuteczniej dekoloryzowany przez wszystkie badane szczepy. Wyznaczony spadek aktywności powierzchniowej sugeruje, że proces dekoloryzacji może negatywnie wpływać na produkcję lub aktywność związków powierzchniowo czynnych. Ponadto, stwierdzono, że biosorpcja lub bioakumulacja najprawdopodobniej biorą udział w procesie dekoloryzacji barwnika AB113, o czym świadczyło zabarwienie biomasy bakteryjnej. Prawdopodobnie to właśnie ten mechanizm jest powodem sprawnej dekoloryzacji barwnika AB113 – biomasa bakteryjna wiąże barwnik, ale go nie rozkłada. Uzyskane wyniki wykazały również, że wzrost wyjściowego stężenia barwnika AB113 w hodowli powoduje obniżenie poziomu dekoloryzacji, co również może wskazywać, że barwnik AB113 jest dekoloryzowany z użyciem biosorpcji lub bioakumulacji. Prawdopodobnie, barwnik AB113 wiąże się z komórkami bakteryjnymi, co prowadzi do wysycenia miejsc wiążących. Gdy zostaje zwiększone stężenie barwnika, cząsteczki nie mają już możliwości przyłączenia się, co skutkuje zatrzymaniem procesu dekoloryzacji. Możliwe również, że powyższy mechanizm dekoloryzacji przyczynia się także do ograniczenia wydzielania związków powierzchniowo czynnych przez bakterie.

Ponieważ szczepy *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68 wyróżniały się najwyższą skutecznością w dekoloryzacji barwników azowych, porównano efektywność tego procesu stosując hodowle wytrząsane oraz prowadzone w warunkach statycznych. Oceniono także produkcję enzymu AzoR. Stwierdzono, że dostępność tlenu znacząco wpływa na efektywność dekoloryzacji barwników azowych przez badane szczepy *Pseudomonas* oraz na aktywność enzymu AzoR. Wykazano, że szczep ASK 10 charakteryzuje się wyższą efektywnością dekoloryzacji i aktywnością AzoR w warunkach statycznych, szczególnie w hodowlach z dodatkiem barwników AB113 lub RB5. Z kolei szczep ASK 68 wykazywał wyższy poziom dekoloryzacji barwników oraz wyższą aktywność AzoR w hodowlach wstrząsanych. Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowane w badaniach szczepy *Pseudomonas* wykorzystują odmienne mechanizmy dekoloryzacji, zależne od poziomu dostępności tlenu w hodowli oraz od użytego w badaniu barwnika azowego.

Dane literaturowe wskazują, że usuwanie barwników azowych przez bakterie może zachodzić zarówno w warunkach statycznych jak i wstrząsanych (Bhatia i in.

2017). Niemniej jednak, zastosowanie warunków statycznych do namnażania bakterii w obecności tej grupy barwników częściej zapewnia wyższy poziom dekoloryzacji. Zarówno Haque i in. (2021) jak i Afrin i in. (2021) stwierdzili bardziej efektywną dekoloryzację barwników azowych przez konsorcja bakteryjne hodowane w warunkach statycznych. Według Haque i in. (2021) w warunkach o niższej dostępności tlenu elektrony pochodzące z NADH (kluczowego nośnika elektronów w komórkach bakteryjnych) są przekazywane na grupy azowe, co prowadzi do ich redukcji, a tym samym dekoloryzacji. Z kolei w warunkach z wyższą dostępnością tlenu, tlen konkuruje z grupami azowymi o elektrony pochodzące z NADH, tym samym ograniczając usuwanie barwników azowych.

W niniejszej pracy oceniono również, wpływ barwników na aktywność przeciwgrzybową bakterii *P. koreensis* ASK 10 oraz *P. fluorescens* ASK 68 wobec grzybnia *F. sambucinum* IM 6525. Uzyskane wcześniej wyniki testu DCT sugerowały, że bakterie ASK 10 produkują mniej biosurfaktantów w obecności barwników azowych. Niemniej jednak stwierdzono, że dodatek tych związków do hodowli bakteryjno-grzybowej nie miał istotnego wpływu na aktywność przeciwgrzybową bakterii. Z kolei w przypadku szczepu ASK 68, dodatek barwników RB5 i AMR dodatkowo ograniczał wzrost grzybnia do około 35%, w porównaniu do 63% wyznaczonych w hodowlach bez barwników.

Zarówno barwniki azowe jak i aminy aromatyczne powstające w wyniku rozkładu barwników azowych są związkami potencjalnie toksycznymi dla organizmów żywych, w tym dla drobnoustrojów (Pinheiro i in. 2022). Wzmocniona aktywność przeciwgrzybowa wyznaczona w hodowlach bakteryjno-grzybowych z udziałem bakterii *P. fluorescens* ASK 68 oraz barwników RB5 lub AMR może więc być wynikiem toksycznego działania produktów rozkładu barwników azowych na grzybnie.

Do badań z użyciem MP, herbicydów i fungicydów wybrano szczepy *Bacillus* pochodzące ze wsi Kolnica i Kaszubskiego Parku Narodowego. Wybór powyższych szczepów wynikał z ich wysokiej aktywności przeciwgrzybowej oraz efektywnej produkcji cLP-Bc. Dodatkowo, na polach uprawnych i w szklarniach (gdzie mogą być stosowane biofungicydy oparte na bakteriach z rodzaju *Bacillus*) istnieje ryzyko obecności zanieczyszczeń takich jak pozostałości syntetycznych pestycydów, czy MP, które potencjalnie mogą modyfikować działanie biologicznych środków ochrony roślin.

Zanieczyszczenie środowiska **MP** może mieć zarówno bezpośredni, jak i pośredni wpływ na drobnoustroje. Bezpośrednio, cząstki MP mogą powodować zmianę tempa wzrostu, stres oksydacyjny i zaburzenia struktury i/lub funkcji komórek (Sun i in. 2018; Jasińska i in. 2022). Dzięki zdolności do wiązania na swojej powierzchni hydrofobowych zanieczyszczeń i przenoszenia ich z jednego środowiska do drugiego,

MP może pośrednio stanowić źródło toksycznych związków (Gouin i in. 2011; Mammo i in. 2020). Obecnie wiele badań skupia się na zdolności drobnoustrojów do biodegradacji MP (Jeon i Kim 2016; Zhang i in. 2020b; Miri i in. 2022). Dostępne są również dane dotyczące wpływu tego zanieczyszczenia na różne procesy metaboliczne zachodzące w komórkach drobnoustrojów (Jasińska i in. 2022; Shi i in. 2023; Wu i in. 2023b). Jednak pomimo obecności MP w glebie (również na polach uprawnych; Tariq i in. 2024), nie ma dostępnych danych naukowych na temat jego wpływu na produkcję biosurfaktantów czy aktywność przeciwrzybową szczepów *Bacillus*.

W niniejszej pracy stwierdzono, że obecność MP w hodowlach szczepów *Bacillus* nie ma znaczącego wpływu na produkcję surfaktyny, ale istotnie wpływa na produkcję ituryny w przypadku czterech z 19 badanych szczepów. Wpływ ten mógł być zarówno pozytywny (szczepy I'-1a i KAS 2.2) jak i negatywny (szczepy Kol B9 i Kol L6), co sugeruje, że MP może stymulować lub ograniczać produkcję ituryny u niektórych szczepów *Bacillus*, a tym samym może potencjalnie wpływać na ich aktywność przeciwrzybową. Stwierdzono, że obecność MP w hodowli szczepu *F. culmorum* DSM 1094 nie ma wpływu na intensywność wzrostu grzybni. Z kolei w mieszanych hodowlach grzybowo-bakteryjnych (zawierających grzybnie szczepu DSM 1094 i bakterie szczepu *Bacillus* sp. Kol L6), obecność MP powoduje wzrost aktywności przeciwrzybowej bakterii. Ten wynik nie jest zgodny z obserwacjami dotyczącymi wpływu MP na produkcję surfaktyny i ituryny w monokulturach szczepu Kol L6, gdzie wyznaczono znaczący spadek produkcji ituryny w obecności MP.

W niniejszej pracy badano również wpływ wybranych syntetycznych **pestycydów** na produkcję biosurfaktantów oraz aktywność przeciwrzybową szczepów *Bacillus*. Rolnictwo konwencjonalne, które nadal stanowi dominujący sposób produkcji żywności, wciąż opiera się na stosowaniu chemicznych środków ochrony roślin, które choć skutecznie zwalczają szkodniki i choroby, mogą przez długi czas pozostawać w środowisku (Riedo i in. 2023). Związki te, i/lub ich toksyczne pochodne, mogą nie tylko wpływać na aktywność naturalnie występujących w glebie mikroorganizmów sprzyjających wzrostowi i zdrowotności roślin, ale także ograniczać skuteczność celowo wprowadzanych do gleby drobnoustrojowych fungicydów. Zrozumienie interakcji pomiędzy syntetycznymi pestycydami a bakteriami zaliczanymi do grupy PGPR jest kluczowe dla oceny ryzyka, przewidywania skuteczności biopreparatów i opracowania strategii zrównoważonego rolnictwa, które minimalizują negatywny wpływ syntetycznych pestycydów na mikrobiotę glebową. Mimo to, podobnie jak w przypadku MP, brakuje danych naukowych dotyczących oceny wpływu syntetycznych pestycydów na poziom produkcji biosurfaktantów *Bacillus*. Dostępne prace naukowe skupiają się głównie na ocenie zdolności drobnoustrojów do biodegradacji poszczególnych syntetycznych

pestycydów (Myresiotis i in. 2011; Carles i in. 2018; Mpofu i in. 2021; Song i Hwang 2023; Wu i in. 2023a; Vanitha i in. 2023) czy też wpływie tych związków na wzrost i/lub aktywność metaboliczną drobnoustrojów. Na przykład, w badaniach prowadzonych przez Vörös i in. (2018) oceniano wzrost i aktywność enzymatyczną bakterii szczepu *B. velezensis* SZMC 6161J w obecności metali ciężkich i syntetycznych pestycydów. Stwierdzono, że badane bakterie są wrażliwe na zastosowane w pracy związki, jednak izolowane mutanty (oporne na działanie metali ciężkich i syntetycznych pestycydów) zachowały podobne zdolności antagonistyczne wobec bakteryjnych fitopatogenów. Z kolei Baćmaga i in. (2015) badali wpływ AZ na aktywność enzymatyczną i mikrobiologiczną gleby, w tym na wzrost bakterii i grzybów oraz zmiany bioróżnorodności mikrobiologicznej. W cytowanej pracy stwierdzono, że AZ zmienia różnorodność mikrobiologiczną gleby. Niemniej jednak, z próby gleby zawierającej najwyższą z opisywanych w badaniach dawek AZ (22,5 mg kg⁻¹) wyizolowano między innymi cztery szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*. Gonçaves i in. (2020) stwierdzili, że syntetyczny herbicyd glifosat negatywnie wpływa na wzrost bakterii szczepu *Bacillus* sp. FC1, ale nie wpływa na jego aktywność przeciwgrzybową wobec szczepu *Fusarium* sp. Mimo to, w cytowanej pracy stwierdzono, że wrażliwość badanego szczepu bakteryjnego na herbicyd mogła ograniczać jego zdolność do konkurencji z fitopatogenem o składniki odżywcze. Wszystkie zacytowane powyżej prace wskazują, że niektóre szczepy z rodzaju *Bacillus* charakteryzują się wysoką zdolnością do adaptacji wobec zanieczyszczeń środowiskowych, zachowując jednocześnie swoje antagonistyczne właściwości wobec fitopatogenów.

W kontekście interakcji pożytecznych drobnoustrojów z syntetycznymi środkami ochrony roślin, wielu badaczy skupia się na ocenie aktywności przeciwgrzybowej bakterii ryzosferowych w połączeniu np. z syntetycznymi fungicydami. Wyniki takich badań mogą być pomocne podczas opracowywania nowych, bardziej efektywnych, strategii ochrony roślin przed fitopatogenami (Peng i in. 2014; Peng i in. 2017; Liu i in. 2018; Ji i in. 2019; Xu i in. 2022; Chen i in. 2023; Gu i in. 2023; Liu i in. 2023b; Wesche i Schnabel 2024). Liczne badania wskazują, że szczepy *Bacillus* często wykazują zdolność do synergistycznego współdziałania z chemicznymi środkami ochrony roślin, co czyni je obiecującym wsparciem w zintegrowanych strategiach ochrony upraw, łącząc biologiczną skuteczność z konwencjonalnymi metodami. Jednak pomimo potencjalnie praktycznego zastosowania, badania te nie dostarczają danych na temat wpływu syntetycznych pestycydów na poziom produkcji kluczowych cLP-Bc, takich jak surfaktyna czy ituryna.

Podobnie jak w przypadku MP, badania przeprowadzone w niniejszej pracy dotyczące wpływu syntetycznych pestycydów (2,4-D, MET, AZ i PR) na produkcję cLP-

Bc ujawniły zróżnicowany wpływ tych związków na poziom produkcji surfaktyny i ituryny. W zależności od użytego szczepu *Bacillus*, obecność syntetycznego pestycydu mogła nie mieć wpływu, prowadzić do wzrostu lub spadku produkcji surfaktyny i/lub ituryny. Również wyniki dotyczące aktywności przeciwgrzybowej szczepów *Bacillus* wobec *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525 wykazały różnice pomiędzy działaniem użytych w pracy syntetycznych herbicydów i fungicydów wobec bakterii *Bacillus*.

Dodatek **herbicydów** do hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej często prowadził do zwiększenia poziomu izolowanej z hodowli surfaktyny w porównaniu do wyników uzyskanych dla hodowli prowadzonej w nieobecności herbicydów. Szczególnie interesujące wyniki uzyskano dla szczepu *Bacillus* sp. Kol B2. Pomimo, że obecność grzybni *F. culmorum* DSM 1094 obniżała produkcję surfaktyny przez powyższy szczep bakteryjny, to w wyniku obecności herbicydu (2,4-D lub MET) w hodowli stwierdzano wzrost zawartości surfaktyny do poziomu dwukrotnie wyższego niż w kontroli bakteryjnej. Podobne efekty zaobserwowano w hodowli *Bacillus* sp. Kol B3 z tym samym szczepem grzybowym i herbicydem 2,4-D. W przypadku szczepów *Bacillus* sp. Kol B9 oraz *Bacillus* sp. Kol L6 także zanotowano wzrost produkcji surfaktyny w obecności herbicydów, choć nie przekraczał on poziomu wyznaczonego w kontrolnych hodowlach bakteryjnych. Z kolei w przypadku ituryny, jedynie w hodowli mieszanej szczepu *Bacillus* sp. Kol L6 ze szczepem *F. culmorum* DSM 1094 odnotowano wzrost produkcji powyższego cLP w obecności zarówno 2,4-D jak i MET (w porównaniu do odpowiedniej hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej bez dodatku herbicydów). Mimo to, wyższy poziom surfaktyny i/lub ituryny w hodowli nie wiązał się z wyższą aktywnością przeciwgrzybową w badanych układach.

Pozytywny wpływ herbicydów na produkcję surfaktyny może być wynikiem wielu złożonych mechanizmów. W wyniku stresu i reakcji obronnej bakterii, obecność herbicydów w hodowli może aktywować szlaki biosyntezy surfaktyny, co prowadzi do zwiększonej produkcji tego związku. Być może, herbicydy modyfikują metabolizm komórek bakteryjnych, wpływając na produkcję różnych metabolitów wtórnych, w tym surfaktyny czy ituryny. Bakterie mogą modyfikować swoją odpowiedź metaboliczną w reakcji na stres środowiskowy, co ułatwia im przystosowanie się do nowych warunków (Shimizu 2015). Drugim, bardziej złożonym mechanizmem odpowiedzialnym za to zjawisko, może być wpływ syntetycznego herbicydu na interakcje zachodzące pomiędzy bakteriami i grzybami. W oparciu o wyniki uzyskane podczas realizacji niniejszej pracy wielokrotnie stwierdzano, że w obecności grzybni w hodowli bakteryjno-grzybowej poziom surfaktyny i ituryny zazwyczaj ulega ograniczeniu. Wynik ten sugeruje, że grzybnia może mieć wpływ na metabolizm bakterii, np. poprzez produkcję różnych

związków regulujących aktywność metaboliczną bakterii. Herbicydy, mimo że nie działają bezpośrednio przeciwgrzybowo, mogły wpływać na procesy metaboliczne zachodzące w komórkach grzybowych lub hamować produkcję związków, modyfikujących metabolizm bakterii. W efekcie, grzybnia nie oddziaływała na biosyntezę surfaktyny tak, jak w przypadku hodowli bez dodatku herbicydów, co mogło powodować, że z hodowli bakteryjno-grzybowej z dodatkiem herbicydu izolowano więcej surfaktyny niż z hodowli prowadzonej w nieobecności danego związku.

Podsumowując, możliwe, że wykorzystane w pracy syntetyczne herbicydy mogły wpływać zarówno bezpośrednio na bakterie poprzez zmiany w produkcji badanych cLP, jak i pośrednio poprzez modyfikację interakcji pomiędzy bakteriami a grzybami, co ostatecznie prowadziło do zwiększonej produkcji cLP w niektórych układach badanych.

W niniejszej pracy przeprowadzono także badania nad wpływem obecności MP na zdolność bakterii *Bacillus* sp. Kol L6 do jednoczesnego usuwania herbicydów (2,4-D i MET), produkcję biosurfaktantów oraz aktywność przeciwgrzybową wobec *F. culmorum* DSM 1094. Stwierdzono, że obecność MP w połączeniu z obydwoma herbicydami w hodowli zakłóca zdolność bakterii *Bacillus* sp. Kol L6 do efektywnej degradacji herbicydów, znacząco ogranicza wydzielanie ituryny oraz działanie przeciwgrzybowe bakterii. Pomimo, że w niektórych przypadkach dodatek herbicydów lub MP do hodowli bakteryjnej zwiększał aktywność przeciwgrzybową, obecność wszystkich trzech zanieczyszczeń jednocześnie powodowała wyraźne osłabienie tego efektu. Powyższy wynik wskazuje na złożone interakcje pomiędzy bakteriami a licznymi obecnymi w środowisku zanieczyszczeniami.

Podczas gdy dodatek herbicydów do hodowli często prowadził do wzrostu produkcji surfaktyny przez bakterie rosnące w obecności grzybni, to użyte w pracy **fungicydy** (AZ i PR) w podobny sposób wpływały na produkcję ituryny. Jak wspomniano wcześniej, w większości hodowli mieszanych bakteryjno-grzybowych stwierdzano spadek poziomu izolowanych biosurfaktantów w porównaniu do monokultur bakteryjnych. Stwierdzono jednak, że obecność fungicydu w hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej mogła spowodować (w zależności od zastosowanego szczepu i dodawanego związku), że izolowano więcej ituryny niż w hodowlach bez dodatku fungicydów. W kilku przypadkach, obecność fungicydu AZ w hodowli skutkowała również wyznaczeniem wyższej aktywności przeciwgrzybowej w przypadku hodowli mieszanych zawierających bakterie szczepu *Bacillus* sp. Kol B3 oraz grzybnię (DSM 1094 lub IM 6525). W hodowli szczepu *Bacillus* sp. Kol B3 oraz grzybni szczepu IM 6525 w obecności AZ odnotowano zarówno wzrost produkcji surfaktyny (do poziomu

porównywalnego z poziomem wyznaczonym w kontroli bakteryjnej), jak i ituryny (do poziomu wyższego niż w kontroli bakteryjnej).

W niniejszej pracy określono również wpływ syntetycznych fungicydów AZ i PR na aktywność przeciwgrzybową oraz produkcję surfaktyny i ituryny w hodowli mieszanej zawierającej dwa różne szczepy *Bacillus*. Jak wspomniano już wcześniej, podczas badań z użyciem dwóch szczepów *Bacillus* (Kol D3 i DSM 3257) hodowanych razem stwierdzono, że obecność obu badanych szczepów *Bacillus* w hodowli grzybni *F. oxysporum* KKP 458 prowadzi do większego ograniczenia wzrostu grzybni niż obecność tylko jednego z powyższych szczepów bakteryjnych. Mimo to, nie wyznaczono wyższego poziomu produkcji surfaktyny lub ituryny w hodowli zawierającej oba powyższe szczepy *Bacillus*. Badając wpływ fungicydów na aktywność przeciwgrzybową oraz cLP w hodowlach zawierających komórki bakterii Kol D3 oraz DSM 3257 stwierdzono, że fungicyd AZ powoduje znaczny wzrost produkcji ituryny w obecności grzybni *F. oxysporum* KKP 458 (odnotowywany zarówno w hodowli zawierającej grzybnię oraz szczep *Bacillus* sp. Kol D3 jak i w hodowli zawierającej grzybnię oraz komórki obu badanych szczepów *Bacillus*). Z kolei fungicyd PR powodował znaczny wzrost produkcji ituryny w hodowli bakteryjnej zawierającej dwa szczepy *Bacillus*. Nie miał jednak takiego efektu gdy w hodowli znajdowała się również grzybnia. Uzyskane wyniki ponownie sugerują udział AZ w modulowaniu wydzielania biosurfaktantów przez bakterie w obecności grzybni.

Podobnie jak w przypadku hodowli z dodatkiem herbicydów, również w przypadku fungicydów, podwyższona produkcja cLP mogła być spowodowana wpływem zastosowanych w badaniu związków na aktywność metaboliczną zarówno bakterii jak i grzybów.

Jak już wcześniej wspomniano, inni badacze również wielokrotnie stwierdzali addytywne lub synergistyczne działanie bakterii z rodzaju *Bacillus* w połączeniu z syntetycznymi fungicydami (Peng i in. 2017; Ji i in. 2019; Xu i in. 2022; Gu i in. 2023; Liu i in. 2023a; Wesche i Schnabel 2024). Na przykład Peng i in. (2014) wykazali, że komórki szczepu *B. subtilis* NJ-18 w połączeniu z syntetycznymi fungicydami flutolanilem i difenokonazolem zapewniają lepszą ochronę pszenicy przed chorobą wywoływaną przez szczep *Rhizoctonia cerealis*. Podobnie, Chen i in. (2023) wykazali, że lipopeptydy wyizolowane z hodowli szczepu *B. velezensis* SDTB038 w połączeniu z fungicydem o nazwie fenamakryl wykazują silne synergiczne działanie przeciwgrzybowe wobec szczepu *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. W innym badaniu, Liu i in. (2018) stwierdzili, że zastosowanie szczepu *B. subtilis* H158 razem z syntetycznym fungicydem strobiluryną powoduje silniejszy efekt przeciwgrzybowy wobec grzybni szczepu *R. solani* GD118. Warto zaznaczyć, że AZ zastosowana

w niniejszej pracy doktorskiej należy do fungicydów z grupy strobiluryn. Zhou i in. (2021) stwierdzili, że bakterie szczepu *B. subtilis* MBI600 w połączeniu z obniżoną dawką fungicydu AZ wykazują wzmocnione działanie przeciwgrzybowe wobec grzybni szczepu *R. solani* AG1-IA. W cytowanej powyżej pracy opisano również efekty przeprowadzonych badań polowych, które potwierdziły efekt wyznaczony w warunkach laboratoryjnych.

W literaturze naukowej wskazywane są różne możliwe mechanizmy odpowiedzialne za podwyższony efekt przeciwgrzybowy obserwowany przy jednoczesnym użyciu syntetycznych i biologicznych środków ochrony. Według Xu i in. (2022) zwiększona skuteczność bakterii w połączeniu z fungicydem może wynikać z faktu, że w obecności syntetycznego fungicydu, bakterie mogą skuteczniej konkurować z grzybami o składniki odżywcze i przestrzeń. Z kolei Liu i in. (2023b) analizując wyniki swoich badań zasugerowali, że wzmocniona aktywność przeciwgrzybowa połączenia fungicydu tebukonazolu i *B. subtilis* H158 może wynikać z np. ze stymulacji wzrostu bakterii przy niskich stężeniach fungicydu czy też szybszego formowania biofilmu bakteryjnego w obecności tego związku.

Wyznaczona w niniejszej pracy wzmocniona aktywność przeciwgrzybowa w niektórych układach badanych mogła być wynikiem addytywnego działania niektórych szczepów z rodzaju *Bacillus* oraz AZ, które charakteryzują się odmiennymi mechanizmami ograniczania wzrostu grzybów. Wysoki poziom produkcji cLP-Bc, czasami wynikający z obecności AZ w środowisku wzrostu, prowadził do destabilizacji błon grzybów, co z kolei ułatwiało wnikanie fungicydu do wnętrza strzępek. Zwiększona destabilizacja błon grzybowych połączona z działaniem fungicydu AZ na mitochondria grzybów (Joseph 1999; Crupkin i in. 2021) mogła być powodem wzmocnionej aktywności przeciwgrzybowej. Zjawisko to nie było jednak obserwowane we wszystkich układach badanych, co może wskazywać na udział innych czynników, takich jak na przykład specyficzne interakcje pomiędzy komórkami drobnoustrojów i fungicydem oraz różnice w metabolizmie poszczególnych szczepów.

W toku badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy oceniono także wpływ szczepu *P. koreensis* ASK 10 i czterech szczepów *Bacillus* (Kol B2, Kol B3, Kol B9 i Kol L6) oraz produkowanych przez nie metabolitów na przepuszczalność błon, zmiany w lipidomie grzybni oraz kiełkowanie zarodników. W badaniach ponownie zastosowano szczepy grzybowe *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525.

Zmiany w **przepuszczalności błon** mogą znacząco wpływać na funkcjonowanie i procesy metaboliczne grzybni. Zrozumienie, jak w pod wpływem bakterii poszczególnych szczepów modyfikowana jest struktura błon grzybowych, pozwala lepiej poznać mechanizmy aktywności przeciwgrzybowej. Stwierdzono, że w obecności

wszystkich pięciu wybranych do badania szczepów bakteryjnych wzrasta przepuszczalność błon obu badanych szczepów grzybni (DSM 1094 oraz IM 6525). Największy wzrost przepuszczalności błon obu badanych grzybni *Fusarium*, wyznaczono w obecności bakterii komórek *Bacillus* szczepów Kol B3, Kol B9 i Kol L6. Stwierdzono, że uzyskane wyniki silnie korelują z wynikami dotyczącymi aktywności przeciwgrzybowej (ocenianej z użyciem hodowli w podłożu płynnym) szczepów bakteryjnych wobec szczepów grzybowych. Wynik ten wskazuje, że zwiększona przepuszczalność błon w komórkach grzybowych szczepów DSM 1094 i IM 6525 hodowanych w obecności bakterii jest związana z wyższą aktywnością przeciwgrzybową w tych samych hodowlach. Wysoki współczynnik korelacji sugeruje, że zmiany w przepuszczalności błon oraz obecność czynników zdolnych do powodowania tego zjawiska (np. cLP) mogą być istotnym wskaźnikiem skuteczności działania przeciwgrzybowego użytych w badaniu szczepów bakteryjnych. W pracy autorstwa Liu i in. (2014a) oceniano działanie cLP wydzielanych przez bakterie szczepu *B. subtilis* CU12 na fitopatogenne szczepy należące do gatunków *Alternaria solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus stolonifer* oraz *Verticillium dahliae*. Autorzy stwierdzili, że wzrost przepuszczalności błon grzybów jest jednym z kluczowych mechanizmów przeciwdrobnoustrojowego działania cLP-Bc. Również badania przeprowadzone przez Zhao i wsp. (2017) wykazały, że przeciwgrzybowe działanie ituryny A (produkowanej przez bakterie szczepu *B. amyloliquefaciens* BH072) wobec komórek grzybowych szczepu *F. oxysporum* wynika z uszkodzenia ściany komórkowej, błon plazmatycznych a także struktur wewnątrzkomórkowych. Stwierdzono, także, że ituryna A powoduje silne zahamowanie kiełkowania zarodników i wzrostu strzępek.

W niniejszej pracy oceniono także wpływ pięciu szczepów bakteryjnych (ASK 10, Kol B2, Kol B3, Kol B9 oraz Kol L6) na **zmiany w składzie lipidowym błon** *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Fosfolipidy są kluczowymi składnikami błon komórkowych, a zmiany w ich strukturze wpływają na właściwości fizyczne dwuwarstwy lipidowej (de Kroon i in. 2013; Stolarek i in. 2019). Zmiany w lipidomie grzybni (zespole lipidów obecnych w błonach komórek grzybowych) prowadzące do destabilizacji struktury / funkcjonowania błon mogą negatywnie wpływać na wzrost, rozwój i patogeniczność grzybów. Ustalenie, jak bakterie wykazujące aktywność przeciwgrzybową wpływają na lipidy grzybów, pozwala lepiej zrozumieć mechanizmy ograniczania rozwoju tej grupy fitopatogenów.

W niniejszej pracy stwierdzono, że fosfatydylocholina (PC) i fosfatydyloetanolamina (PE) są głównymi fosfolipidami błon plazmatycznych szczepów *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525, a powyższe szczepy różnią się między sobą stosunkiem zawartości PC do PE. Dane literaturowe wskazują,

że wrażliwość grzybni na cLP-Bc jest uzależniona od składu lipidomu. Wysoka wrażliwość grzybów na poszczególne biosurfaktanty może być powiązana z niską zawartością ergosterolu, obecnością krótkołańcuchowych fosfolipidów, niskim poziomem PE w błonach komórkowych czy też z niskim stopniem nasycenia kwasów tłuszczowych w tych fosfolipidach (Wise i in. 2014; Bakker i in. 2024). W niniejszej pracy, analizując procentową zawartość poszczególnych fosfolipidów w próbach obu grzybni, stwierdzono, że w błony grzybni *F. culmorum* DSM 1094 zawierają nieznacznie więcej kwasów tłuszczowych o niższym stopniu nasycenia niż w przypadku błon grzybni *F. sambucinum* IM 6525 (stosunek 1:0,9). Uzyskany wynik wskazuje na wyższą podatność lipidomu grzybni *F. culmorum* DSM 1094 na działanie biosurfaktantów. Z kolei w błonach grzybni *F. sambucinum* IM 6525 stwierdzono niższą zawartość procentową PE w stosunku do PC niż w błonach grzybni *F. culmorum* DSM 1094. Dane literaturowe sugerują, że taki wynik wskazuje z kolei na wyższą wrażliwość błon *F. sambucinum* IM 6525 na działanie związków powierzchniowo czynnych.

Uzyskane wyniki badań ujawniły zmiany w profilu fosfolipidów (proporcji PC do PE) grzybni szczepu *F. culmorum* DSM 1094 pod wpływem obecności trzech szczepów bakteryjnych (*P. koreensis* ASK 10, *Bacillus* sp. Kol B2 lub *Bacillus* sp. Kol B3). Z kolei zmianę w profilu fosfolipidowego w próbach grzybni *F. sambucinum* IM 6525 stwierdzono w obecności szczepu *Bacillus* sp. Kol L6. Fosfolipidy PC i PE odpowiadają za stabilność, elastyczność i płynność dwuwarstwy lipidowej, zapewniając jej integralność oraz prawidłowe funkcjonowanie. W niniejszej pracy wyznaczono wzrost zawartości PE w stosunku do PC w obecności niektórych szczepów bakteryjnych, powodujący spadek płynności błon, prowadzący do ograniczenia jej przepuszczalności (de Kroon i in. 2013). Taki proces adaptacyjny pozwala komórkom na stopniowe wchłanianie toksycznych dla nich związków, spowalniając ich negatywne działanie na grzybnie (Stolarek i in. 2019). Możliwe, że obserwowane w niniejszej pracy zmniejszenie płynności błon badanych grzybni w obecności niektórych szczepów bakteryjnych było reakcją obronną fitopatogenów na negatywne działanie biosurfaktantów.

W niektórych próbach uzyskanych z hodowli mieszanych bakteryjno-grzybowych stwierdzono także obecność fosfolipidów charakterystycznych dla bakterii. Najwyższy poziom fosfolipidów bakteryjnych wyznaczono w próbach obu badanych grzybni namnażanych w obecności bakterii *Bacillus* sp. Kol B3. Wynik ten może sugerować, że bakterie Kol B3 w porównaniu do pozostałych szczepów bakteryjnych silniej zdominowały środowisko prowadzonych hodowli.

W niniejszej pracy analizowano także wpływ metabolitów obecnych w płynach pohodowlanych uzyskanych z hodowli bakteryjnych wybranych pięciu szczepów (ASK 10, Kol B2, Kol B3, Kol B9 oraz Kol L6) na **kiełkowanie zarodników** *F. culmorum*

DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Metabolity wtórne produkowane przez bakterie mogą wpływać na różne etapy rozwoju grzybów, w tym na kiełkowanie zarodników. Analiza, jak metabolity produkowane przez bakterie wpływają na ten proces, może prowadzić do lepszego zrozumienia, jak kontrolować rozwój patogenów grzybowych.

Stwierdzono, że grzybnia szczepu *F. culmorum* DSM 1094 produkuje zarodniki makrokonidialne, natomiast grzybnia szczepu *F. sambucinum* IM 6525 produkuje zarodniki mikrokonidialne. Ponadto ustalono, że gęstość zarodników szczepu IM 6525, uzyskanych po zmyciu powierzchni grzybni hodowanej na podłożu zestalonym agarem, była około 100 razy większa niż gęstość zarodników szczepu DSM 1094.

Analizując wpływ metabolitów bakteryjnych na kiełkowanie zarodników badanych szczepów *Fusarium* wykazano, że metabolity wytwarzane przez *P. koreensis* ASK 10 nie hamują znacząco powyższego procesu, natomiast ograniczają rozwój strzępek w środowisku wzrostu. Zewnątrzkomórkowe metabolity (w tym także biosurfaktanty) produkowane przez bakterie *Bacillus* sp. Kol B2 hamowały kiełkowanie zarodników skuteczniej niż te produkowane przez bakterie szczepu ASK 10, ale były mniej efektywne niż metabolity pozostałych badanych szczepów *Bacillus*. Z kolei metabolity Kol B9, choć nie hamowały kiełkowania całkowicie, znacząco ograniczały rozwój strzępek. Najbardziej interesujące wyniki uzyskano dla szczepów Kol B3 i Kol L6, gdzie obserwowano całkowitą lizę zarodników.

Liu i in. (2014a) oceniali zdolność cLP produkowanych przez *B. subtilis* CU12 do ograniczania kiełkowania zarodników fitopatogennych szczepów należących do gatunków *Alternaria solani*, *F. sambucinum*, *Rhizopus stolonifer* oraz *Verticillium dahliae*. Uzyskane w cytowanej pracy wyniki wykazały, że skuteczność hamowania kiełkowania zarodników była zróżnicowana i zależała od użytego w badaniu grzyba oraz od rodzaju lipopeptydu. Kombinacje różnych lipopeptydów wykazywały addytywne, synergistyczne, a czasem nawet wzajemnie hamujące działanie na skuteczność kiełkowania zarodników. Autorzy powyższej pracy stwierdzili również, że hamowanie kiełkowania zarodników jest ściśle związane z przepuszczalnością błon komórkowych.

W badaniach przeprowadzonych przez Hirozawa i in. (2024), oceniano działanie supernatantów pozyskanych z hodowli dwóch szczepów *B. subtilis* (NT1 i NT2) na szczep *Fusarium verticillioides*. Wyniki wykazały, że badane płyny pohodowlane hamowały kiełkowanie zarodników *F. verticillioides* (o 22–74%). Również Zhao i in. (2022a) wykazali, że płyn pohodowlany uzyskany z hodowli szczepu *B. velezensis* A4 skutecznie hamuje kiełkowanie zarodników, wydłużanie strzępek oraz wzrost grzybni szczepu *B. cinerea*. W cytowanej pracy stwierdzono, że badany płyn pohodowlany znacząco ogranicza ekspresję genów użytego szczepu *B. cinerea* związanych ze

wzrostem grzybni i fitopatogennością oraz ogranicza zdolność zarodników do penetracji ścian komórkowych roślin.

W niniejszej pracy zbadano mechanizmy aktywności przeciwgrzybowej szczepu ***Bacillus* sp. Kol B3 w połączeniu z fungicydem AZ** wobec grzybni szczepu *F. sambucinum* IM 6525. Uzyskane dane wykazały, że obecność zarówno AZ, jak i bakterii Kol B3 w hodowlach *F. sambucinum* IM 6525 zwiększa przepuszczalność błon cytoplazmatycznych grzybni znacznie bardziej w porównaniu do działania tych czynników osobno.

Oceniono także zmiany morfologiczne w komórkach grzybni pod wpływem obecności fungicydu AZ i/lub bakterii szczepu Kol B3 w hodowli płynnej. W monokulturze grzybni *F. sambucinum* IM 6525 bez dodatku AZ obserwowano długie, rozgałęzione strzępki z widocznymi organellami. Zaobserwowano, że zarówno obecność AZ jak i bakterii Kol B3 (stosowanych osobno) w hodowlach prowadzi do widocznego zniekształcenia i fragmentacji komórek grzybni. Z kolei jednoczesne zastosowanie pestycydu i bakterii w hodowli grzybni skutkowało rozwojem krótkich strzępek o zwiększonej średnicy i bez widocznych organelli.

Przeanalizowano również wpływ fungicydu AZ i bakterii szczepu Kol B3 na żywotność grzybni *F. sambucinum* IM 6525. Stwierdzono, że zarówno fungicyd AZ, jak i bakterie szczepu Kol B3 znacząco obniżają żywotność badanej grzybni, a ich jednoczesna obecność w hodowli prowadzi do całkowitej dezintegracji strzępek.

Dalsze badania dotyczące produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach *F. sambucinum* IM 6525 wykazały, że zarówno AZ, jak i bakterie szczepu Kol B3 zwiększają produkcję ROS, przy czym efekt ten jest silniejszy w monokulturze grzybni zawierającej AZ niż w hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej bez dodatku AZ. Co ciekawe, w hodowlach zawierających zarówno AZ jak i bakterie Kol B3 poziom wewnątrzkomórkowych ROS był zbliżony do poziomu w próbie kontrolnej (bez czynników przeciwgrzybowych). Ten niespodziewanie niski poziom ROS może wynikać z poważnych uszkodzeń grzybni, lizy ścian komórkowych oraz destabilizacji funkcji mitochondriów.

W niniejszej pracy analizowano nie tylko produkcję biosurfaktantów oraz aktywność przeciwgrzybową bakterii, ale również wpływ badanych szczepów na **wzrost korzeni siewek ogórka siewnego**. Badania nad wpływem bakterii na korzenie pozwalają ocenić ich potencjał do stymulacji wzrostu roślin i poprawie ich adaptacji do różnych warunków środowiskowych. Istnieje wiele danych na temat szczepów bakteryjnych, szczególnie z rodzaju *Bacillus*, wykazujących zdolność do promocji wzrostu systemu korzeniowego roślin, co pomaga roślinie w efektywnym pobieraniu wody i składników odżywczych. Obecność bakterii w środowisku wzrostu rośliny może

prować do wzrostu liczby korzeni, stymulowania rozwoju korzeni bocznych czy też do indukcji wzrostu i wydłużania włóśników korzeniowych (López-Bucio i in. 2007; Batista i in. 2021; Liu i in. 2023a; Jensen i in. 2024ab). Pozytywne działanie bakterii na korzenie może wynikać z produkcji auksyn lub innych metabolitów wpływających na rozwój roślin (Sharifi i Ryu 2018; Mahapatra i in. 2022).

W niniejszej pracy oceniono wpływ 32 szczepów bakteryjnych na wzrost korzeni ogórka siewnego, w oparciu o suchą biomasę korzeni. Nasiona ogórka inkubowano w obecności bakterii na podłożu MS oraz na wilgotnej bibule umieszczonej w szalkach Petriego. Stwierdzono, że korzenie siewek ogórka inkubowane na podłożu MS rosły intensywniej w porównaniu do tych inkubowanych na wilgotnej bibule, co najprawdopodobniej wynikało z obecności składników odżywczych w podłożu. Uzyskane wyniki wykazały, że większość z ocenianych szczepów bakteryjnych ogranicza wzrost korzeni ogórka (niezależnie od zastosowanej w badaniu metody). Wyniki uzyskane po inkubacji nasion na podłożu MS wykazały, że 53,1% szczepów użytych w badaniu znacząco hamuje wzrost korzeni, 40,6% nie ma istotnego wpływu, a tylko 6,3% wykazuje działanie stymulujące. Zidentyfikowano sześć szczepów z rodzaju *Bacillus* (Kol B2, Kol B3, Kol B9, Kol D3, Kol D8, Kol S10), które niezależnie od zastosowanej w badaniu metody nie wykazywały negatywnego wpływu na rozwój korzeni. Szczególną wyróżniał się szczep *Bacillus* sp. Kol B9, który jako jedyny stymulował wzrost korzeni bez względu na zastosowaną w badaniu metodę.

Liczne szczepy bakterii ryzosferowych klasyfikowane są jako PGPR, a dane literaturowe wielu prac sugerują zdolność ryzosferowych bakterii z rodzaju *Bacillus* do promocji wzrostu korzeni (Bavaresco i in. 2020; de Araujo i in. 2021; Wang i in. 2022). Jednakże, oceniane w niniejszej pracy szczepy bakteryjne w większości nie miały pozytywnego działania na wzrost korzeni ogórka. Wpływ bakterii na wzrost korzeni może zależeć od wielu czynników. Specyfika szczepu jest jednym z kluczowych elementów, które należy wziąć pod uwagę analizując uzyskane wyniki. Nie wszystkie szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas* mają identyczne właściwości; niektóre mogą produkować substancje stymulujące wzrost roślin, takie jak fitohormony, podczas gdy inne mogą mieć ograniczoną zdolność do produkcji tych związków. Warunki środowiskowe także odgrywają istotną rolę. Dostępność składników odżywczych, temperatura i wilgotność mogą wpływać na skuteczność stymulowania wzrostu roślin przez bakterie. Możliwe jest również, że w niektórych warunkach bakterie mogą konkurować z rośliną o składniki odżywcze. Zwłaszcza w przypadku metody z użyciem wilgotnej bibuły, w której odnotowano mniej pozytywne wyniki w porównaniu do metody w której stosowano podłoże MS. Bakterie i rośliny rozwijając się na bogatym w składniki odżywcze podłożu MS nie musiały konkurować o składniki odżywcze i wodę. Co więcej, duża część

mechanizmów promocji wzrostu roślin opiera się na zwiększaniu dostępności składników odżywczych dla rośliny, takich jak na przykład jony amonowe, fosforanowe, potasu czy cynku (Olanrewaju i in. 2017; Jeyanthi i in. 2018; Kumar i in. 2021b). W metodzie z podłożem MS (zaprojektowanym do optymalnego wzrostu roślin) oraz w metodzie z użyciem wilgotnej bibuły (gdzie ograniczono dostęp do składników odżywczych) bakterie mogły nie mieć możliwości zastosowania tych mechanizmów. Negatywny wpływ większości poddanych badaniu szczepów bakteryjnych mógł również wynikać z nieodpowiedniej dawki wprowadzanych do próby bakterii lub sposobu ich aplikacji.

W niniejszej pracy oceniono także **wpływ wstępnej inkubacji (zaprawiania) nasion** ogórka siewnego w zawiesinie bakterii wybranych szczepów *Bacillus* na kiełkowanie nasion oraz intensywność wzrostu siewek zarówno w obecności jak i nieobecności zarodników *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525. Badania przeprowadzono w doniczkach z użyciem gleby, a intensywność wzrostu korzeni ogórka oceniano na podstawie suchej biomasy. Celem badań było sprawdzenie, czy komórki wybranych szczepów bakterii umieszczone na powierzchni nasion ogórka mogą skutecznie chronić nasiona i rozwijające się siewki przed negatywnym wpływem zastosowanych szczepów *Fusarium* (których zarodniki dodawano do gleby). Wiele danych literaturowych sugeruje, że zaprawienie nasion bakteriami z rodzaju *Bacillus* może chronić rośliny przed zarówno przed zakażeniem fitopatogenem jak i stresem oksydacyjnym oraz osmotycznym (pośrednio zwiększając poziom chlorofilu i ligniny w korzeniach, co korzystnie wpływa na ściany komórek roślinnych i poprawia tolerancję na stres) (Chen i in. 2009; Lastochkina i in. 2021; Akram i in. 2024). Efekt ten jest jednak w dużym stopniu zależny od konkretnego szczepu bakteryjnego (Lastochkina i in. 2021).

Do dalszych badań realizowanych w niniejszej pracy wybrano trzy szczepy *Bacillus*: Kol B2, Kol B3 oraz Kol B9, biorąc pod uwagę wykazywane przez nie różnorodne mechanizmy aktywności przeciwgrzybowej oraz ustalony we wcześniejszym etapie badań brak negatywnego wpływu na rozwój korzeni siewek ogórka siewnego.

Stwierdzono, że bakterie powyższych szczepów nie zwiększają intensywności kiełkowania nasion warunkach w środowisku bez dodatku zarodników *Fusarium*, a szczep *Bacillus* sp. Kol B3 nieznacznie ogranicza ten proces. W glebie z dodatkiem zarodników *Fusarium* kiełkowanie nasion niezaprawionych było silnie hamowane, zwłaszcza przez *F. sambucinum* IM 6525. Zaprawienie nasion bakteriami Kol B2 lub Kol B9 ograniczało negatywny wpływ zarodników *Fusarium*. Najlepsze rezultaty uzyskano stosując nasiona ogórka otoczone bakteriami Kol B9. W powyższej próbie poziom kiełkowania nasion był zbliżony do poziomu wyznaczonego w kontroli (w glebie do której nie dodano zarodników *Fusarium*).

Dodatkowo, stwierdzono, że wszystkie trzy szczepy *Bacillus* ograniczają negatywne działanie zarodników *Fusarium* na rozwój korzeni i intensywność wzrostu siewek ogórka. Na podstawie wszystkich uzyskanych wyników stwierdzono, że szczep *Bacillus* sp. Kol B9 wykazuje największy potencjał aplikacyjny, zarówno w ochronie przed negatywnym wpływem *F. culmorum* DSM 1094 i *F. sambucinum* IM 6525, jak i w promowaniu rozwoju siewek ogórka.

Autorzy innych prac wielokrotnie wykazywali, że zaprawianie nasion niektórymi szczepami *Bacillus* może chronić roślinę przed zakażeniem fitopatogenem. Miljaković i in. (2024) ocenili potencjał izolatów *Bacillus* sp. jako biopreparatów mających na celu ochronę grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) przed dwoma szczepami fitopatogennych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Z sześciu izolatów bakteryjnych dwa (*B. subtilis* B43 i *B. amyloliquefaciens* B50) miały największy pozytywny wpływ na wzrost i zdrowotność siewek, ograniczając infekcję nasion i stymulując ich kiełkowanie. Również Akram i in. (2024) wykazali, że zaprawianie nasion pomidora bakteriami szczepu *Bacillus aryabhattai* Z-48 poprawia wzrost roślin i spowalnia rozwój choroby wywoływanej przez szczepy z rodzaju *Fusarium*. W cytowanej pracy stwierdzono, że zaprawienie nasion znacząco poprawia kiełkowanie, wzrost siewek i odporność roślin na fuzariozę. Wykazano również wzrost poziomu roślinnych metabolitów i enzymów działających ochronnie wobec stresu środowiskowego.

W ostatnim etapie niniejszej pracy **opracowano skład podłoża wzrostowego** służącego do efektywnego namnażania bakterii *Bacillus* sp. Kol B9, o stwierdzonym wysokim potencjale aplikacyjnym. W badaniu wykorzystano wodny roztwór tryptonu oraz produkty uboczne przemysłu spożywczego – drożdże odpadowe uzyskane po produkcji piwa oraz wodny ekstrakt ze skórek marchwi. Stwierdzono, że zastosowanie podłoża o zawartości 0,5% wodnego ekstraktu ze skórek marchwi, 5% wodnej zawiesiny drożdży oraz 0,1% tryptonu najbardziej sprzyja intensywnemu wzrostowi bakterii Kol B9. Stosując powyższe podłoże uzyskano największą gęstość komórek bakteryjnych w hodowli ($30,6 \times 10^7$ komórek/mL), co stanowiło ponad dwukrotny wzrost gęstości komórek w porównaniu do hodowli prowadzonej w podłożu LB (w której odnotowano $13,2 \times 10^7$ komórek/mL).

W innych pracach również wykorzystywano browarnicze drożdże odpadowe jako źródło węgla w podłożu wzrostowym. Na przykład Moshtagh i in. (2018) wykorzystali podłoże odpadowe złożone z 7% odpadu browarnianego oraz $6,22 \text{ g L}^{-1}$ azotanu amonu w celu optymalizacji produkcji biosurfaktantów przez szczep *B. subtilis* N3-1P. Podobnie Nazareth i in. 2021 w swoich badaniach również skupili się na optymalizacji produkcji surfaktyny przez szczep *B. subtilis* z wykorzystaniem osadu browarniczego jako źródła węgla.

Podsumowując, wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na zróżnicowany wpływ zanieczyszczeń antropogenicznych na biosurfaktantów przez bakteryjne szczepy ryzosferowe. Wykazano, że oddziaływanie tych czynników zależy zarówno od użytego szczepu bakteryjnego i grzybowego, jak i od rodzaju zanieczyszczenia dodawanego do hodowli. W przypadku szczepu *Bacillus* sp. Kol B9, charakteryzującego się najbardziej korzystnym działaniem na kiełkowanie nasion i wzrost korzeni siewek ogórka siewnego, również stwierdzono zróżnicowany wpływ syntetycznych pestycydów na poziom produkcji surfaktyny i ituryny (także w hodowlach zawierających grzybnie *Fusarium*). Zaobserwowano jednak, że żadne z badanych zanieczyszczeń nie ograniczyło aktywności przeciwgrzybowej tego szczepu w warunkach laboratoryjnych, co ponownie wskazuje na jego wysoki potencjał aplikacyjny. Mimo to, istnieje ryzyko, że działanie przeciwgrzybowe szczepu Kol B9 mogłoby zostać istotnie osłabione w obecności kilku różnych zanieczyszczeń jednocześnie. Taki efekt zaobserwowano w przypadku szczepu Kol L6 – mimo, że w wielu układach badanych dodatek herbicydów lub MP do hodowli zwiększał aktywność przeciwgrzybową bakterii, jednoczesna obecność wszystkich trzech zanieczyszczeń prowadziła do wyraźnego osłabienia tego efektu.

VII. Wnioski i stwierdzenia końcowe

Najważniejsze wnioski, wyciągnięte na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej wyników, zostały podsumowane poniżej.

A. Wnioski dotyczące produkcji biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej szczepów bakteryjnych, w hodowlach prowadzonych w nieobecności zanieczyszczeń antropogenicznych:

- [1] Spośród 72 zbadanych szczepów *Bacillus*, 22 szczepy wykazują zdolność do kolonizacji strzępek grzybni *F. sambucinum* IM 6525 w hodowli typu *dual culture* prowadzonej na podłożu zestalonym agarem. Powyższe szczepy wykazują dodatkowy mechanizm działania przeciwgrzybowego polegający na intensywnym, dendrytycznym wzroście uniemożliwiającym grzybni dalszą kolonizację powierzchni podłoża. Bakterie te charakteryzują się także bardzo wysoką produkcją ituryny ($\geq 200 \text{ mg L}^{-1}$) i wytwarzają fengicynę.
- [2] Większość badanych szczepów *Bacillus* znacząco hamuje wzrost grzybni badanych szczepów *Fusarium* w hodowlach płynnych.

Największą skuteczność wyznaczono dla szczepu Bacillus sp. Kol Si6, który ograniczał wzrost grzybni F. culmorum DSM 1094 o 81,8%, natomiast grzybni F. sambucinum IM 6525 o 80,6%.
- [3] Wysoka aktywność przeciwgrzybowa badanych szczepów bakteryjnych wiąże się ze wzrostem przepuszczalności błon grzybni, wskazującym na duże znaczenie biosurfaktantów w procesie ograniczania wzrostu grzybni.
- [4] Wszystkie 32 ocenione szczepy wytwarzają związki lotne (VOCs) zmieniające morfologię grzybni powietrznej szczepu *F. culmorum* DSM 1094. VOCs produkowane przez niektóre szczepy hamują także wzrost grzybni powierzchniowej tego szczepu. Nie stwierdzono żadnego wpływu tych związków na grzybnie *F. sambucinum* IM 6525.

Najsilniejsze działanie hamujące wzrost grzybni powierzchniowej DSM 1094 wykazują szczepy Bacillus sp. Kol B3 i Bacillus sp. KAS 2.2, zmniejszając wzrost o 25,1 i 29%.

- [5] Metabolity (w tym biosurfaktanty) wydzielane przez badane szczepy w hodowlach płynnych w różnorodny sposób mogą wpływać na zarodniki *Fusarium* oraz proces ich kiełkowania.

Na przykład związki obecne w płynach pohodowlanych Bacillus sp. Kol B3 oraz Bacillus sp. Kol L6 powodują całkowitą lizę zarodników F. culmorum DSM 1094 oraz F. sambucinum IM 6525. Natomiast metabolity produkowane przez Bacillus sp. Kol B9 silnie spowalnia rozwój strzępek powyższych grzybów.

- [6] Obecność grzybni *F. culmorum* DSM 1094, *F. sambucinum* IM 6525 lub *F. oxysporum* KKP 458 w hodowlach badanych szczepów *Bacillus* zazwyczaj powoduje ograniczenie poziomu izolowanej z hodowli surfaktyny i ituryny.

Wyjątek stanowi poziom surfaktyny w hodowli F. sambucinum IM 6525 zawierającej bakterie Bacillus sp. Kol D4 oraz poziom ituryny w hodowlach F. culmorum DSM 1094 zawierających bakterie Bacillus sp. Kol D3 lub Bacillus sp. Kol D4 oraz hodowli F. sambucinum IM 6525 zawierającej bakterie Bacillus sp. Kol D4.

- [7] Hodowle zawierające komórki dwóch różnych szczepów *Bacillus*, wykazujące podwyższoną aktywność powierzchniową płynów pohodowlanych, zazwyczaj nie wykazują wyższej aktywności przeciwgrzybowej wobec szczepów *Fusarium*.

B. Wnioski dotyczące produkcji biosurfaktantów i aktywności przeciwgrzybowej szczepów bakteryjnych, w hodowlach prowadzonych w obecności zanieczyszczeń antropogenicznych:

- [1] Szczepy *P. koreensis* ASK 10 i *P. fluorescens* ASK 68 najbardziej wydajnie z ocenionych szczepów dekoloryzują barwniki azowe.
- [2] Korelacja pomiędzy wysokim poziomem dekoloryzacji barwników azowych oraz obniżoną aktywnością powierzchniową płynów pohodowlanych sugeruje ograniczenie produkcji i/lub aktywności biosurfaktantów wydzielanych przez szczepy *Bacillus* i *Pseudomonas* hodowane w obecności powyższych ksenobiotyków.
- [3] Zastosowane w badaniach barwniki azowe nie wpływają na aktywność przeciwgrzybową *P. koreensis* ASK 10 wobec *F. sambucinum* IM 6525,

natomiast w obecności barwników RB5 i AMR wzrasta działanie przeciwgrzybowe *P. fluorescens* ASK 68 wobec powyższego grzyba.

- [4] Dodatek MP do hodowli *Bacillus* może stymulować wzrost badanych szczepów bakteryjnych, nie ma znaczącego wpływu na produkcję surfaktyny, ale może istotnie wpływać na poziom wydzielanej ituryny.

Na przykład w obecności MP rośnie poziom ituryny wydzielanej przez szczepy Bacillus sp. I'-1a i Bacillus sp. KAS 2.2, natomiast spada poziom tego związku w hodowlach Bacillus sp. Kol B9 i Bacillus sp. Kol L6.

- [5] Syntetyczne herbicydy i fungicydy w zróżnicowany sposób wpływają na produkcję surfaktyny i ituryny, a ich wpływ zależy zarówno od użytego szczepu *Bacillus* jak i dodawanego do hodowli pestycydu.

- [6] Herbicydy 2,4-D i MET powodują ograniczenie lub nie zmieniają aktywności przeciwgrzybowej badanych szczepów *Bacillus* wobec zastosowanych szczepów *Fusarium*.

Na przykład szczepy Bacillus sp. Kol B2 i Bacillus sp. Kol B3 tracą część swojej skuteczności przeciwgrzybowej w obecności herbicydów, podczas gdy szczepy Bacillus sp. Kol B9 i Bacillus sp. Kol L6 zachowują swoją aktywność przeciwgrzybową bez względu na obecność herbicydów.

- [7] Fungicydy AZ i PR powodują wzrost lub nie zmieniają aktywności przeciwgrzybowej badanych szczepów *Bacillus* wobec grzybów *Fusarium*.

Na przykład dodatek AZ do hodowli mieszanej bakteryjno-grzybowej zawierającej bakterie Bacillus sp. Kol B3 oraz grzybnie F. sambucinum IM 6525 zwiększa aktywność przeciwgrzybową wyznaczoną jako spadek intensywności wzrostu biomasy grzybni, zwiększenie przepuszczalności błon grzyba, fragmentację strzępek i zanik organelli.

- [8] Dodatek syntetycznych herbicydów lub fungicydów zarówno do monokultur *Bacillus*, jak i do hodowli mieszanych bakteryjno-grzybowych może ograniczać, nie wpływać lub stymulować poziom wydzielanej ituryny i surfaktyny. Efekt ten zależy od użytego w badaniu szczepu *Bacillus*, szczepu *Fusarium* i rodzaju herbicydu.

Na przykład 2,4-D zazwyczaj nie wpływa na produkcję surfaktyny w monokulturach Bacillus, ale w hodowli szczepu Bacillus sp. Kol L6

powoduje około 20% spadek produkcji tego cLP. MET ogranicza produkcję surfaktyny przez *Bacillus* sp. Kol B2 i *Bacillus* sp. Kol B3, ale nie wpływa na produkcję surfaktyny przez *Bacillus* sp. Kol B9 i *Bacillus* sp. Kol L6. AZ znacząco zwiększa produkcję ituryny przez bakterie *Bacillus* sp. Kol D3 w obecności grzybni *F. oxysporum* KKP 458. Natomiast PR zwiększa produkcję ituryny w hodowlach mieszanych *Bacillus* sp. Kol D3 i *B. subtilis* DSM 3257, ale efekt ten nie występuje w obecności grzybni *F. oxysporum* KKP 458.

- [9] Jednoczesna obecność MP oraz dwóch herbicydów (2,4-D i MET) w hodowli ogranicza zdolność bakterii *Bacillus* sp. Kol L6 do efektywnej degradacji herbicydów, niekorzystnie wpływa na poziom ituryny oraz na działanie przeciwgrzybowe bakterii. Mimo że w niektórych przypadkach dodatek herbicydów lub MP do hodowli *Bacillus* zwiększa aktywność przeciwgrzybową, to obecność wszystkich trzech zanieczyszczeń jednocześnie powoduje wyraźne osłabienie tego efektu.

C. Wnioski dotyczące wpływu badanych szczepów bakteryjnych na wzrost ogórka siewnego:

- [1] Spośród 32 badanych szczepów bakteryjnych 53,1% szczepów ogranicza wzrost korzeni ogórka siewnego, 40,6% nie ma istotnego wpływu, a tylko 6,3% szczepów stymuluje rozwój korzeni ogórka. Najbardziej korzystny wpływ na powyższy proces wyznaczono w przypadku bakterii *Bacillus* sp. Kol B9.
- [2] Zaprawianie nasion ogórka siewnego zawiesiną bakterii szczepu *Bacillus* sp. Kol B9 chroni nasiona i siewki ogórka przed niekorzystnym wpływem grzybni *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525, których strzępki dodano do gleby.

D. Wnioski dodatkowe:

- [1] Stwierdzono, że produkty uboczne przemysłu spożywczego, takie jak drożdże odpadowe uzyskane po produkcji piwa czy skórki z marchwi, mogą być wykorzystane do opracowania efektywnego i ekologicznego podłoża wzrostowego zapewniającego intensywny wzrost biomasy *Bacillus* sp. Kol B9.

VIII. Streszczenie

Jednym z kluczowych wyzwań w stosowaniu mikrobiologicznych środków ochrony roślin są ich interakcje z antropogenicznymi zanieczyszczeniami, takimi jak pozostałości syntetycznych pestycydów, MP oraz barwniki przemysłowe. Pomimo rosnącej świadomości ekologicznej, zmian w przepisach oraz wzrastającej dostępności alternatywnych środków ochrony roślin, syntetyczne pestycydy wciąż dominują w walce ze szkodnikami. Wiele szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas* wyróżnia się zdolnością do wspomagania wzrostu roślin, ograniczania rozwoju fitopatogennych grzybów oraz udziałem w bioremediacji gleby. W powyższych procesach duże znaczenie mają wydzielane do środowiska metabolity bakteryjne, w tym biosurfaktanty – związki charakteryzujące się zarówno aktywnością powierzchniową jak i zróżnicowaną aktywnością biologiczną.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena aktywności przeciwgrzybowej szczepów *Bacillus* i *Pseudomonas* zdolnych do produkcji cLP, także w obecności wybranych zanieczyszczeń antropogenicznych.

Opisane w pracy badania rozpoczynają się od charakterystyki biosurfaktantów produkowanych przez 80 ryzosferowych szczepów bakteryjnych (77 z rodzaju *Bacillus* i trzy z rodzaju *Pseudomonas*). W pracy wykorzystano 62 izolaty *Bacillus* zdolne do wydzielania dwóch lub trzech biosurfaktantów cLP-Bc (surfaktyny, ituryny i/lub fengicyny). W początkowej puli stosowanych modeli badawczych znalazły się także bakterie produkujące tylko jeden cLP-Bc lub też nie produkujące ich wcale. Badaniom poddano także trzy izolaty z rodzaju *Pseudomonas* i zidentyfikowano produkowane przez nie biosurfaktanty. Stwierdzono, że szczepy ASK 10, ASK 68 oraz Zg 9.3 produkują odpowiednio folipeptynę, mieszaninę wiskozyny i HAA (prekursora RL) oraz milkisynę C. Wraz z postępem dalszych badań stopniowo zawężano pulę badanych szczepów.

W kolejnym etapie pracy porównano zdolność bakterii do hamowania wzrostu grzybów z rodzaju *Fusarium* w wyniku działania wydzielanych do podłoża metabolitów oraz VOCs. Badania przeprowadzone z użyciem hodowli typu *dual culture* prowadzonych na podłożu zestalonym agarem wykazały, że 22 spośród 72 zbadanych izolatów *Bacillus* skutecznie kolonizuje strzępki *F. sambucinum* IM 6525. W przypadku powyższych szczepów zaobserwowano także intensywny, dendrytyczny wzrost populacji bakteryjnej, skutecznie uniemożliwiający grzybni dalszą kolonizację powierzchni podłoża. Szczepy te charakteryzowały się ponadto bardzo wysoką produkcją ituryny ($\geq 200 \text{ mg L}^{-1}$) oraz wytwarzały fengicynę. Nie stwierdzono jednak

kolonizacji strzępek przez komórki bakteryjne w przypadku drugiego szczepu *Fusarium* – *F. culmorum* DSM 1094.

Następnie przeprowadzono badania aktywności przeciwgrzybowej 32 wybranych szczepów z użyciem podłoża płynnego. Stwierdzono, że większość analizowanych bakterii znacząco hamuje wzrost biomasy użytych w pracy grzybów *Fusarium*. Z kolei ocena produkcji bakteryjnych VOCs wykazała, że 32 szczepy (wszystkie zastosowane w badaniu) wydzielają VOCs ograniczające wzrost grzybni powietrznej *F. culmorum* DSM 1094. Stwierdzono, że w przypadku kilku izolatów bakteryjnych powyższe metabolity hamują również wzrost grzybni powierzchniowej DSM 1094, jednak o nie więcej niż 30%. Związki te nie miały żadnego wpływu na grzybnie *F. sambucinum* IM 6525.

Kolejnym etapem pracy była ocena wpływu bakterii na intensywność wzrostu korzeni siewek ogórka siewnego. Nasiona ogórka inkubowano na podłożu MS i na wilgotnej bibule. Stwierdzono, że spośród 32 badanych szczepów: 53,1% ogranicza wzrost korzeni ogórka siewnego, 40,6% nie ma istotnego wpływu, a tylko 6,3% izolatów stymuluje rozwój korzeni ogórka. Najbardziej korzystny wpływ na powyższy proces wyznaczono w przypadku bakterii *Bacillus* sp. Kol B9.

Powyższą część pracy zakończono identyfikacją genetyczną 23 izolatów bakteryjnych. Wykazano, że większość badanych szczepów *Bacillus* należy do tzw. kompleksu szczepów *B. subtilis*, w tym osiem najprawdopodobniej należy do gatunku *B. subtilis*, pięć do *B. amyloliquefaciens* oraz pięć do *B. velezensis*. Szczep Kol B3 może należeć do gatunku *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* lub *B. methylotrophicus*. Ustalono, że szczep Kol Si4 najprawdopodobniej należy do gatunku *B. subtilis* lub *B. halotolerans*, natomiast szczep Zg 7.6 do gatunku *B. pumilus*. Uzyskane wyniki wykazały także, że izolaty oznaczone symbolami ASK 10, ASK 68 oraz Zg 9.3 to odpowiednio *P. koreensis*, *P. fluorescens* oraz *Pseudomonas* sp.

Poza ograniczaniem przyrostu biomasy grzybowej, produkcji cLP oraz produkcji przeciwgrzybowych VOCs, w niniejszej pracy zbadano również inne mechanizmy aktywności przeciwgrzybowej wobec grzybów z rodzaju *Fusarium*. Oceniono wpływ pięciu szczepów bakteryjnych (ASK 10, Kol B2, Kol B3, Kol B9, Kol L6) na przepuszczalność błon grzybni, zmiany w lipidomie oraz na kiełkowanie zarodników. Stwierdzono, że wysoka aktywność przeciwgrzybowa bakterii wiąże się ze wzrostem przepuszczalności błon grzybni. Stwierdzono także, że wydzielane przez bakterie metabolity (w tym biosurfaktanty) mogą różnorodnie wpływać na zarodniki *Fusarium*, np. ograniczać proces kiełkowania zarodników i rozwoju strzępek albo nawet powodować lizę zarodników.

Dużą część pracy poświęcono ocenie wpływu różnych czynników biotycznych i abiotycznych na produkcję biosurfaktantów i aktywność przeciwgrzybową badanych szczepów bakteryjnych. Stwierdzono, że obecność grzybnii *F. culmorum* DSM 1094, *F. sambucinum* IM 6525 lub *F. oxysporum* KKP 458 w hodowlach badanych bakterii *Bacillus* zazwyczaj powoduje ograniczenie poziomu izolowanej surfaktyny i ituryny.

Stwierdzono, że w przypadku 10 spośród 37 zbadanych hodowli zawierających komórki dwóch różnych szczepów *Bacillus* następuje wzrost aktywności powierzchniowej płynów pochodzących (sugerujący wzrost produkcji biosurfaktantów). Niemniej jednak podwyższoną aktywność przeciwgrzybową wyznaczono tylko w jednej hodowli – zawierającej grzybnię *F. oxysporum* KKP 458 oraz komórki *Bacillus* sp. Kol D4 oraz *B. subtilis* DSM 3257.

Wykazano, że zastosowane w pracy zanieczyszczenia antropogeniczne mogą w zróżnicowany sposób wpływać na produkcję biosurfaktantów i aktywność przeciwgrzybową bakterii. Efekt ten zależy zarówno od użytego szczepu bakteryjnego i grzybowego, jak i od dodawanego do hodowli ksenobiotyku.

Stwierdzono, że dodatek barwników azowych do hodowli negatywnie wpływa na aktywność powierzchniową płynów pochodzących, co sugeruje ograniczenie produkcji i/lub aktywności biosurfaktantów wydzielanych przez bakterie. Pomimo takiego efektu, obecność barwników azowych w hodowli bakteryjno-grzybowej nie miała negatywnego wpływu na aktywność przeciwgrzybową szczepów ASK 10 i ASK 68 wobec *F. sambucinum* IM 6525. Wręcz przeciwnie, w hodowli zawierającej powyższą grzybnię, bakterie *P. fluorescens* ASK 68 oraz barwnik RB5 lub AMR wyznaczono wzrost aktywności przeciwgrzybowej.

Ustalono, że dodatek MP do hodowli *Bacillus* może stymulować wzrost bakterii, nie ma znaczącego wpływu na produkcję surfaktyny przez badane szczepy, ale może istotnie wpływać na poziom ituryny. Stwierdzono także, że herbicydy 2,4-D i MET powodują ograniczenie lub nie zmieniają aktywności przeciwgrzybowej badanych szczepów *Bacillus* wobec grzybów *Fusarium*. Z kolei fungicydy AZ i PR powodują wzrost lub nie zmieniają aktywności przeciwgrzybowej zastosowanych w badaniu bakterii. Dodatek syntetycznych herbicydów lub fungicydów zarówno do monokultur *Bacillus*, jak i do hodowli mieszanych bakteryjno-grzybowych ograniczał, nie wpływał lub zwiększał poziom wydzielanej ituryny i surfaktyny. Efekt ten zależał od użytego w badaniu szczepu *Bacillus*, szczepu *Fusarium* oraz rodzaju pestycydu.

Ostatni etap pracy poświęcono ocenie potencjału aplikacyjnego tych szczepów *Bacillus*, które charakteryzowały się różnorodnymi mechanizmami działania przeciwgrzybowego oraz brakiem negatywnego wpływu na wzrost korzeni siewek ogórka siewnego. Stwierdzono, że zaprawienie (otoczenie warstwą komórek

bakteryjnych) nasion ogórka siewnego chroni nasiona i siewki ogórka przed niekorzystnym wpływem *F. culmorum* DSM 1094 oraz *F. sambucinum* IM 6525, których zarodniki wprowadzono do gleby. Efekt ten był szczególnie widoczny gdy do zaprawienia nasion wykorzystano bakterie *Bacillus* sp. Kol B9.

Pomimo stwierdzonego w niniejszej pracy zróżnicowanego wpływu zanieczyszczeń na produkcję biosurfaktantów przez różne szczepy bakteryjne, żaden z zastosowanych związków nie ograniczał aktywności przeciwgrzybowej szczepu *Bacillus* sp. Kol B9, co potwierdza jego wysoki potencjał aplikacyjny. Jednakże, istnieje ryzyko, że efektywne działanie przeciwgrzybowe tych bakterii mogłoby zostać silnie osłabione w obecności kilku różnych zanieczyszczeń jednocześnie. Taki efekt zaobserwowano w przypadku szczepu *Bacillus* sp. Kol L6 – mimo, że w wielu układach badanych dodatek herbicydów lub MP do hodowli zwiększał aktywność przeciwgrzybową tych bakterii, jednoczesna obecność wszystkich trzech zanieczyszczeń prowadziła do wyraźnego osłabienia tego efektu.

IX. Abstract

One of the key challenges in using microbiological plant protection agents is their interactions with anthropogenic pollutants such as synthetic pesticide residues, MPs, and industrial dyes. Despite growing environmental awareness, regulatory changes, and increasing availability of biopesticides, synthetic pesticides still dominate in pest control. Many strains of bacteria from the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera are notable for their ability to promote plant growth, inhibit the development of phytopathogenic fungi, and participate in soil bioremediation. In these processes, bacterial metabolites, including biosurfactants – compounds characterized by both surface activity and diverse biological activity – play a significant role.

The main objective of this study was to assess the antifungal activity of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains capable of producing cLPs, also in the presence of selected anthropogenic pollutants.

The research begins with the characterization of biosurfactants produced by 80 rhizosphere bacterial strains (77 from genus *Bacillus* and three from genus *Pseudomonas*). The study included 62 *Bacillus* isolates capable of producing two or three cLP-Bc biosurfactants (surfactin, iturin, and/or fengycin). The initial pool of bacterial models also included strains that produce only one cLP-Bc or none at all. Three *Pseudomonas* isolates were also examined, and their produced biosurfactants were identified. It was found that the strains ASK 10, ASK 68, and Zg 9.3 produce, respectively, pholipeptin, a mixture of viscosin and HAA (a precursor of RLs), and milkisin C. As the research progressed, the number of strains used was gradually narrowed down.

In the next stage, the ability of bacteria to inhibit the growth of *Fusarium* fungi through non-volatile metabolites and VOCs was compared. Dual culture experiments on agar solid media showed that 22 out of 72 *Bacillus* isolates effectively colonized *F. sambucinum* IM 6525 hyphae. For these strains, intensive dendritic bacterial growth was observed, preventing the fungal mycelium from further colonizing the medium surface. These strains also demonstrated high iturin production ($\geq 200 \text{ mg L}^{-1}$) and produced fengycin. However, no hyphal colonization was observed for the second *Fusarium* strain, *F. culmorum* DSM 1094.

Antifungal activity studies of 32 selected bacterial strains were then conducted in liquid media. It was found that most analyzed bacteria significantly inhibited the biomass growth of *Fusarium* fungi used in the study. The evaluation of bacterial VOCs production showed that all 32 strains emitted VOCs that inhibited the aerial mycelium growth of *F. culmorum* DSM 1094. In the case of several bacterial isolates, these

metabolites also inhibited surface mycelium growth by no more than 30%, but had no effect on the mycelium of *F. sambucinum* IM 6525.

The next phase assessed the influence of bacteria on the growth of cucumber seedling roots. Cucumber seeds were incubated on MS medium and wet filter paper. Of the 32 strains tested, 53.1% inhibited cucumber root growth, 40.6% had no significant effect, and only 6.3% stimulated root development. The most beneficial effect was observed for *Bacillus* sp. Kol B9.

This section concluded with the genetic identification of 23 bacterial isolates. It was determined that most *Bacillus* strains belong to the *B. subtilis* species complex, with eight likely to be *B. subtilis*, five to be *B. amyloliquefaciens*, and five to be *B. velezensis*. Strain named Kol B3 may belong to either *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, or *B. methylotrophicus*. It was also found that strain named Kol Si4 most likely belongs to *B. subtilis* or *B. halotolerans*, while strain Zg 7.6 probably belongs to *B. pumilus*. The isolates ASK 10, ASK 68, and Zg 9.3 were identified as *P. koreensis*, *P. fluorescens*, and *Pseudomonas* sp., respectively.

In addition to biomass inhibition, cLP production, and antifungal VOCs production, other antifungal mechanisms against *Fusarium* were investigated. The impact of five bacterial strains (ASK 10, Kol B2, Kol B3, Kol B9, and Kol L6) on fungal membrane permeability, lipidome changes, and spore germination was assessed. It was found that high antifungal activity was associated with an increased hyphal membrane permeability. It was also shown that bacterial non-volatile metabolites (including biosurfactants) can variably affect *Fusarium* spores by inhibiting spore germination and hyphal growth or even causing spore lysis.

A significant portion of the study focused on the effects of various biotic and abiotic factors on biosurfactant production and antifungal activity of the tested strains. It was found that the presence of *F. culmorum* DSM 1094, *F. sambucinum* IM 6525, or *F. oxysporum* KKP 458 fungi in bacterial-fungal co-cultures generally reduced surfactin and iturin levels.

It was also observed that in 10 out of 37 co-cultures containing two different *Bacillus* strains, the surface activity of the supernatants increased (suggesting higher biosurfactant production). However, subsequent increased antifungal activity was only noted in one cultivation, containing *F. oxysporum* KKP 458 mycelium and *Bacillus* sp. Kol D4 and *B. subtilis* DSM 3257 cells.

The study demonstrated that anthropogenic pollutants can differentially affect biosurfactant production and bacterial antifungal activity. This effect depended on the bacterial and fungal strain used, as well as the xenobiotic added to the culture.

It was found that azo dyes negatively affect the surface activity of post-culture broths, suggesting reduced biosurfactant production and/or activity. However, the presence of azo dyes in bacterial-fungal co-cultures did not negatively impact the antifungal activity of neither ASK 10 nor ASK 68 bacteria against *F. sambucinum* IM 6525. In fact, increased antifungal activity was observed when *P. fluorescens* ASK 68 and the RB5 or AMR azo dyes were both present in the cultivation.

It was also found that and addition of MP to *Bacillus* cultivation can stimulate bacterial growth, does not significantly affect surfactin production, but may impact iturin levels. It was determined that the synthetic herbicides 2,4-D and MET either reduced or did not change the antifungal activity of *Bacillus* strains against *Fusarium* fungi. In contrast, the synthetic fungicides AZ and PR either increased or had no effect on antifungal activity. An addition of synthetic pesticides to *Bacillus* cultivations either reduced, had no effect, or increased the levels of iturin and surfactin. This effect was dependent on the *Bacillus* strain, *Fusarium* strain, and the pesticide used.

The final stage of the study focused on the evaluation of the application potential of *Bacillus* strains with diverse antifungal mechanisms and no negative impact on cucumber seedling root growth. It was found that coating cucumber seeds with bacterial cells protected the seeds and seedlings from the harmful effects of *F. culmorum* DSM 1094 and *F. sambucinum* IM 6525, which spores were introduced into the soil. This effect was particularly pronounced when *Bacillus* sp. Kol B9 was used for the seed coating.

Despite the diverse effects of environmental pollutants on the biosurfactant production observed in this study, none of the applied compounds limited the antifungal activity of *Bacillus* sp. Kol B9, confirming its high application potential. However, there is a risk that the antifungal efficacy of these bacteria could be significantly reduced in the presence of multiple different pollutants. Such effect was observed for *Bacillus* sp. Kol L6 – although in many experimental setups the addition of synthetic herbicides or MP increased the antifungal activity of these bacteria, the simultaneous presence of all three pollutants led to a significant reduction of this effect.

X. Oświadczenia współautorów

Oświadczenia współautorów dotyczące udziału w dwóch opublikowanych pracach naukowych oraz manuskrypcie przygotowanym do czasopisma znajdują się na kolejnych stronach.

23.09.2024, Łódź

mgr Aleksandra Walaszczyk
Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

1. **Walaszczyk A**, Jasińska A, Bernat P, Płaza G, Paraszkievicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618. DOI: 10.1038/s41598-023-41210-5

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 60%.

Mój wkład polegał na: 1) współudziale w przygotowaniu koncepcji pracy; 2) realizacji badań (w tym przygotowaniu hodowli drobnoustrojów; wykonaniu ekstrakcji herbicydów i biosurfaktantów z hodowli bakteryjnych; określeniu wpływu mikroplastiku i herbicydów na aktywność przeciwgrzybową bakterii oraz wykonaniu analiz za pomocą technik mikroskopowych); 3) interpretacji uzyskanych wyników; 4) przeprowadzeniu analiz statystycznych; 5) przygotowaniu manuskryptu (w tym opracowanie graficzne wyników, opis wstępu, materiałów i metod, uzyskanych wyników oraz dyskusję) oraz 6) współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. **Walaszczyk A**, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszkievicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 55%.

Mój wkład polegał na: 1) współudziale w przygotowaniu koncepcji pracy; 2) realizacji badań (w tym przygotowaniu hodowli drobnoustrojów; określeniu wpływu azoksystrobiny na aktywność przeciwgrzybową bakterii oraz przepuszczalność błon grzyba; wykonaniu ekstrakcji azoksystrobiny i biosurfaktantów z hodowli); 3) interpretacji uzyskanych wyników; 4) przeprowadzeniu analiz statystycznych; 5) przygotowaniu manuskryptu (w tym opracowanie graficzne wyników, opis wstępu, materiałów i metod, uzyskanych wyników oraz dyskusję) oraz 6) współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Aleksandra Wołoszycz

23 09 2024, Łódź

(data i miejsce)

dr hab. Katarzyna Paraszkievicz, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

1. Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Płaza G, **Paraszkievicz K.** (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618. DOI: 10.1038/s41598-023-41210-5

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 15%. Mój wkład polegał na współudziale w przygotowaniu koncepcji pracy, nadzorze nad postępami pracy badawczej, współudziale w interpretacji wyników oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam również autorem korespondencyjnym.

2. Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, **Paraszkievicz K.** (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 15%. Mój wkład polegał na współudziale w przygotowaniu koncepcji pracy, nadzorze nad postępami pracy badawczej, współudziale w interpretacji wyników oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów. Byłam również autorem korespondencyjnym.

Katarzyna Paraszkievicz

(podpis)

28.08.2024, Łódź

(data i miejsce)

dr Anna Jasińska

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

Łódź, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

1. Walaszczyk A, **Jasińska A**, Bernat P, Płaza G, Paraszkiwicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618. DOI: 10.1038/s41598-023-41210-5

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 10%. Mój wkład polegał na współudziale w ekstrakcji herbicydów i przygotowaniu mikroplastiku, nadzorze nad postępami pracy badawczej oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. Walaszczyk A, **Jasińska A**, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszkiwicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 5%. Mój wkład polegał na nadzorze nad postępami pracy badawczej oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Anna Jasińska

(podpis)

Łódź 24.08.26

(data i miejsce)

dr hab. Przemysław Bernat, prof. UŁ
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii
Uniwersytet Łódzki
Łódź, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

1. Walaszczyk A, Jasińska A, **Bernat P**, Płaza G, Paraszkievicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618. DOI: 10.1038/s41598-023-41210-5

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 10%. Mój wkład polegał na oznaczeniu zawartości surfaktyny, ituryny, kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego i metolachloru (z wykorzystaniem technik LC-MS/MS) w próbach, nadzorze nad opisywaniem metod chromatograficznych oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. Walaszczyk A, Jasińska A, **Bernat P**, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszkievicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 10%. Mój wkład polegał na oznaczeniu zawartości surfaktyny, ituryny i azoksystrobiny (z wykorzystaniem technik LC-MS/MS) w próbach, nadzorze nad opisywaniem metod chromatograficznych oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.



(podpis)

02.09.2024 r. Łódź

(data i miejsce)

dr hab. Sylwia Różalska, prof. UŁ

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii

Uniwersytet Łódzki

Łódź, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, **Różalska S**, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraskiewicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 5%. Mój wkład polegał na wykonaniu analiz mikroskopowych, pomiarze wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu oraz współudziale w interpretacji uzyskanych wyników.



(podpis)

Zabrze, 02.09.2024

(data i miejsce)

prof. dr hab. Grażyna Płaza

Wydział Organizacji i Zarządzania

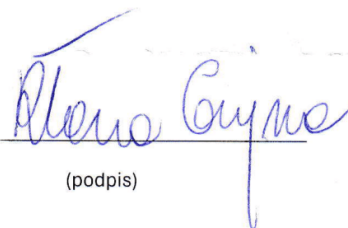
Politechnika Śląska

Zabrze, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, **Płaza G**, Paraszkievicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618. DOI: 10.1038/s41598-023-41210-5

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 5%. Mój wkład polegał na współudziale w interpretacji uzyskanych wyników oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.



(podpis)

Skierniewice,
4.09.2024 r.

(data i miejsce)

dr hab. Lidia Sas-Paszt, prof. IO

Zakład Mikrobiologii i Ryzosfery

Instytut Ogrodnictwa

Skierniewice, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

Walażczyk A, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, **Sas-Paszt L**, Lisek A, Paraszkievicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej powstanie oceniam na 5%. Mój wkład polegał na współudziale przygotowywaniu manuskryptu.

Lidia SasPaszt

(podpis)

Skierniewice, 26.08.2024

(data i miejsce)

dr Anna Lisek

Zakład Odmianoznawstwa, Szkółkarstwa i Zasobów Genowych

Instytut Ogrodnictwa-PIB

Skierniewice, Polska

Oświadczenie o wkładzie w powstanie publikacji

Walaszczyk A, Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, **Lisek A**, Paraszkiwicz K.
(2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol
B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal
of Molecular Sciences 25: 4175. DOI: 10.3390/ijms25084175

Oświadczam, że jestem współautorem powyższej publikacji, a swój wkład w jej
powstanie oceniam na 5%. Mój wkład polegał na genetycznej identyfikacji badanego szczepu
bakteryjnego.

Anna Lisek

(podpis)

XI. Całkowity dorobek naukowy

XI.1. Publikacje

Paraszkiewicz K. i **Walaszczyk A.** (2021) Characteristics, classification and directions for practical use of surfactants. Screening of *Bacillus* strains capable of lipopeptide surfactants production. W: J. Długoński, red., Microbial biotechnology in the laboratory and practice: theory, exercises and specialist laboratories. 198–210.

Walaszczyk A., Jasińska A, Bernat P, Płaza G, Paraszkiewicz K. (2023) Microplastics influence on herbicides removal and biosurfactants production by a *Bacillus* sp. strain active against *Fusarium culmorum*. Scientific Reports 13: 14618.

DOI: [10.1038/s41598-023-41210-5](https://doi.org/10.1038/s41598-023-41210-5)

5-letni Impact Factor: 4.3; punkty MNiSW: 140

Walaszczyk A., Jasińska A, Bernat P, Różalska S, Sas-Paszt L, Lisek A, Paraszkiewicz K. (2024) The Combined Effects of Azoxystrobin and the Biosurfactant-Producing *Bacillus* sp. Kol B3 against the Phytopathogenic Fungus *Fusarium sambucinum* IM 6525. International Journal of Molecular Sciences 25: 4175.

DOI: [10.3390/ijms25084175](https://doi.org/10.3390/ijms25084175)

5-letni Impact Factor: 5.6; punkty MNiSW: 140

Jasińska A, **Walaszczyk A.**, Paraszkiewicz K. (2024) Omics-Based Approaches in Research on Textile Dye Microbial Decolorization. Molecules 29: 2771.

DOI: [10.3390/molecules29122771](https://doi.org/10.3390/molecules29122771)

5-letni Impact Factor: 4.6; punkty MNiSW: 140

XI.2. Doniesienia konferencyjne

XI.2.1. O zasięgu międzynarodowym

- [1] **Walaszczyk A.**, Sas-Paszt L., Paraszkievicz K. Various antifungal activities of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium sambucinum*. MycoRise Up! Młodzi w Mykologii, 23-25 kwietnia 2021 r., str. 80, Poster.
- [2] **Walaszczyk A.**, Jarecki W., Długoński J., Paraszkievicz K. Ocena zdolności szczepów bakteryjnych, wyizolowanych z terenu środowiska odpadów niebezpiecznych do produkcji biosurfaktantów i eliminacji barwników azowych. I Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego MKDUS 2.0, 23-25 czerwca 2021 r., str. 25-26, Poster.
- [3] **Walaszczyk A.**, Sas-Paszt L., Trzeciński P., Bernat P., Paraszkievicz K. Role of biosurfactants and volatile compounds produced by *Bacillus* strains in *Fusarium sambucinum* growth inhibition. MycoRise Up! Youth in Mycology 3rd Edition, 27-29 maja 2022 r., str. 52, Poster.
- [4] **Walaszczyk A.**, Rzeźnikowska W., Jasińska A., Bernat P., Paraszkievicz K. Assessment of herbicides effect on *Bacillus* antifungal activity against a phytopathogenic *Fusarium sambucinum* strain. MycoRise Up! Youth in Mycology 4th Edition, 20-21 maja 2023 r., str. 8, Wystąpienie ustne.

XI.2.2. O zasięgu krajowym

- [1] **Walaszczyk A.**, Paraszkievicz K., Bernat P. Wpływ syntetycznych pestycydów na wzrost bakterii oraz produkcję surfaktantów wybranych szczepów *Bacillus*. II Ogólnopolska Przyrodnicza Konferencja Naukowa „*Mater naturae*”, 11 grudnia 2020 r., str. 67, Poster.
- [2] **Walaszczyk A.**, Bernat P., Paraszkievicz K. Ocena wzrostu bakterii *Escherichia coli* w obecności metabolitów *Bacillus* sp. w skojarzonym działaniu z ogrodnictwymi preparatami mydła potasowego lub ciprofloksacyną. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa Tygiel 2021 „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 25-28 marca 2021 r., str. 273, Poster.
- [3] Jarecki W., **Walaszczyk A.**, Długoński A., Bernat P., Paraszkievicz K. Identyfikacja cyklicznych lipopeptydów wytwarzanych przez ryzosferowy szczep *Bacillus* wyizolowane ze składowiska odpadów niebezpiecznych. 54 Konferencja

Mikrobiologiczna – „Mikroorganizmy różnych środowisk”, 20-21 września 2021 r., str. 82, Poster.

- [4] **Walaszczyk A.**, Bernat P., Płaza G., Paraszkievicz K. Produkcja związku powierzchniowo czynnego – folipeptyny przez ryzosferowy szczep *Pseudomonas*. XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2022 - „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 24-27 marca 2022 r., str. 259, Poster.
- [5] **Walaszczyk A.**, Bernat P., Góralczyk-Bińkowska A., Paraszkievicz K. Dekoloryzacja barwników azowych przez szczep *Pseudomonas fluorescens* ASK 68, zdolny do produkcji biosurfaktantów. XIV Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2022 - „Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju”, 24-27 marca 2022 r., str. 251, Poster.
- [6] **Walaszczyk A.**, Lisek A., Sas-Paszt L., Bernat P., Paraszkievicz L. Identyfikacja taksonomiczna aktywnych przeciwgrzybowo i produkujących surfaktanty szczepów *Bacillus*. VII Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen, 7-8 kwietnia 2022 r., str. 81, Wystąpienie ustne.
- [7] Nowak A., **Walaszczyk A.**, Paraszkievicz K. Zdolność wybranych szczepów wyizolowanych z składowiska odpadów niebezpiecznych w Zgierzu do wzrostu w obecności odcieków i ich możliwej detoksykacji. XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 15-17 września 2022 r., str. 62-63, Poster.
- [8] Nowak A., **Walaszczyk A.**, Rzeźnikowska W., Długoński J., Paraszkievicz K. Ocena zdolności szczepów *Bacillus* do wzrostu, produkcji biosurfaktantów oraz detoksykacji ksenobiotyków obecnych w odciekach pochodzących ze składowiska odpadów niebezpiecznych. Krajowa Konferencja EkoBioTox – Znaczenie ekotoksykologii, bioindykacji, biodegradacji w identyfikacji i rozwiązywaniu problemów środowiskowych w dobie antropocenu i zmiany klimatu od skali molekularnej do krajobrazowej, 19-21 kwietnia 2023 r., str. 154-157, Poster.
- [9] **Walaszczyk A.**, Kulbachko A., Jasińska A., Bernat P., Paraszkievicz K. Wpływ wybranych zanieczyszczeń antropogenicznych na aktywność przeciwgrzybową biopestycydów zawierających bakterie różnych szczepów *Bacillus*. 55 Jubileuszowa Konferencja Mikrobiologiczna, 14-15 września 2023 r., Wystąpienie ustne.

XI.3. Aktywność organizacyjna

- [1] Współprowadzenie warsztatów podczas X Ogólnopolskiej Nocy Biologów – 8 stycznia 2021 r.
- [2] Udział w organizacji IV Dnia Doktoranta Uniwersytetu Łódzkiego – 11 czerwca 2021 r.
- [3] Udział w organizacji VII Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen 2022 – 7-8 kwietnia 2022 r.
- [4] Współprowadzenie warsztatów dla uczniów Szkoły Podstawowej nr 199 im. Juliana Tuwima w Łodzi w ramach Festiwalu Nauki i Techniki – 2 grudnia 2022 r.
- [5] Współprowadzenie warsztatów „Wykorzystanie mikroorganizmów w produkcji zdrowej żywności” w ramach Instytutu Kreatywnej Biologii przy Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego – 21 czerwca 2023 r.
- [6] Współprowadzenie warsztatów podczas Dnia Otwartego Wydziału Chemii oraz Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego – 5 kwietnia 2024 r.
- [7] Udział w organizacji Konferencji Jubileuszowej “50 lat Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii UŁ – lata minione – dzień dzisiejszy – perspektywy” – 17 maja 2024 r.
- [8] Praca ze Studenckim Kołem Naukowym Biotechnologiczno–Mikrobiologicznym SKN Bio-Mik działającym przy Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

XI.4. Szkolenia

- [1] Staż naukowy w Zakładzie Mikrobiologii i Ryzosfery w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach pod opieką prof. dr hab. Lidii Sas-Paszt – od 15 lutego do 4 marca 2022 r.
- [2] Staż naukowy w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach pod opieką prof. dr hab. Grażyny Płazy – 16-30 października 2023 r.
- [3] Udział w szkoleniu „Kupujemy pożywki mikrobiologiczne – na co zwrócić uwagę i czym się kierować przy ich wyborze?” prowadzonym online przez firmę A2KCeNT – 21 września 2023 r.

- [4] Udział w szkoleniu „Walidacja metod badawczych oraz kontrola ważności wyników w laboratorium – teoria i praktyka” prowadzonym online przez firmę A2KCeNT – 26 października 2023 r.
- [5] Udział w szkoleniu „Podstawy Spektrometrii Mas Sprzężonej z Chromatografią Cieczową (LC–MS/MS)” prowadzonym przez firmę Bioanalytic Sp. z o. o. w Łodzi – 8-10 listopada 2023 r.

XII. Literatura

- [1] Abisado, R.G.; Benomar, S.; Klaus, J.R.; Dandekar, A.A.; Chandler, J.R. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio* **2018**, *9*, DOI: 10.1128/mbio.02331-17.
- [2] Afrin, S.; Shuvo, H.R.; Sultana, B.; Islam, F.; Rus'd, A.A.; Begum, S.; Hossain, M.N. The Degradation of Textile Industry Dyes Using the Effective Bacterial Consortium. *Heliyon* **2021**, *7*, e08102, DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e08102.
- [3] Akram, W.; Waqar, S.; Hanif, S.; Anjum, T.; Aftab, Z.-H.; Li, G.; Ali, B.; Rizwana, H.; Hassan, A.; Rehman, A.; i in.
- [4] Comparative Effect of Seed Coating and Biopriming of *Bacillus aryabhatai* Z-48 on Seedling Growth, Growth Promotion, and Suppression of *Fusarium* Wilt Disease of Tomato Plants. *Microorganisms* **2024**, *12*, 792–792, DOI: 10.3390/microorganisms12040792.
- [5] Al-Amrani, W.A.; Lim, P.-E.; Seng, C.-E.; Saime, W. Factors Affecting Bio-Decolorization of Azo Dyes and COD Removal in Anoxic–Aerobic REACT Operated Sequencing Batch Reactor. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **2014**, *45*, 609–616, DOI: 10.1016/j.jtice.2013.06.032.
- [6] Ali, S.; Ullah, M.I.; Sajjad, A.; Shakeel, Q.; Hussain, A. Environmental and Health Effects of Pesticide Residues. *Sustainable Agriculture Reviews* **2020**, *48*, 311–336, DOI: 10.1007/978-3-030-54719-6_8.
- [7] Alsohim, A.S.; Taylor, T.B.; Barrett, G.A.; Gallie, J.; Zhang, X.-X.; Altamirano-Junqueira, A.E.; Johnson, L.J.; Rainey, P.B.; Jackson, R.W. The Biosurfactant Viscosin Produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 Aids Spreading Motility and Plant Growth Promotion. *Environmental Microbiology* **2014**, *16*, 2267–2281, DOI: 10.1111/1462-2920.12469.
- [8] Andrić, S.; Meyer, T.; Ongena, M. Bacillus Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities. *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01350.
- [9] Ansari, I.; El-Kady, M.M.; El Din Mahmoud, A.; Arora, C.; Verma, A.; Rajarathinam, R.; Singh, P.; Verma, D.K.; Mittal, J. Persistent Pesticides: Accumulation, Health Risk Assessment, Management and Remediation: An Overview. *Desalination and Water Treatment* **2024**, *317*, 100274, DOI: 10.1016/j.dwt.2024.100274.
- [10] Arantza, S.-J.; Hiram, M.-R.; Erika, K.; Chávez-Avilés, M.N.; Valiente-Banuet, J.I.; Fierros-Romero, G. Bio- and Phytoremediation: Plants and Microbes to the

- Rescue of Heavy Metal Polluted Soils. *SN Applied Sciences* **2022**, *4*, DOI: 10.1007/s42452-021-04911-y.
- [11] Auch, A.F.; von Jan, M.; Klenk, H.-P.; Göker, M. Digital DNA-DNA Hybridization for Microbial Species Delineation by Means of Genome-To-Genome Sequence Comparison. *Standards in Genomic Sciences* **2010**, *2*, 117–134, DOI: 10.4056/sigs.531120.
- [12] Ayilara, M.S.; Adeleke, B.S.; Akinola, S.A.; Fayose, C.A.; Adeyemi, U.T.; Gbadegesin, L.A.; Omole, R.K.; Johnson, R.M.; Uthman, Q.O.; Babalola, O.O. Biopesticides as a Promising Alternative to Synthetic Pesticides: A Case for Microbial Pesticides, Phytopesticides, and Nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology* **2023**, *14*, DOI: 10.3389/fmicb.2023.1040901.
- [13] Ayilara, M.S.; Adeleke, B.S.; Babalola, O.O. Bioprospecting and Challenges of Plant Microbiome Research for Sustainable Agriculture, a Review on Soybean Endophytic Bacteria. *Microbial Ecology* **2022**, DOI: 10.1007/s00248-022-02136-z.
- [14] Baćmaga, M.; Kucharski, J.; Wyszowska, J. Microbial and Enzymatic Activity of Soil Contaminated with Azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment* **2015**, *187*, 615–615, DOI: 10.1007/s10661-015-4827-5.
- [15] Bakker, C.; Graham, H.; Popescu, I.; Li, M.; McMullin, D.R.; Avis, T.J. Fungal Membrane Determinants Affecting Sensitivity to Antifungal Cyclic Lipopeptides from *Bacillus* spp. *Fungal Biology* **2024**, DOI: 10.1016/j.funbio.2024.08.006.
- [16] Ballio, A.; Barra, D.; Bossa, F.; Collina, A.; Grgurina, I.; Marino, G.; Moneti, G.; Paci, M.; Pucci, P.; Segre, A.; i in. Syringopeptins, New Phytotoxic Lipodepsipeptides of *Pseudomonas syringae* Pv. *syringae*. *FEBS letters* **1991**, *291*, 109–112, DOI: 10.1016/0014-5793(91)81115-o.
- [17] Ballio, A.; Bossa, F.; Camoni, L.; Di Giorgio, D.; Flamand, M.-C.; Maraite, H.; Nitti, G.; Pucci, P.; Scaloni, A. Structure of Fuscopeptins, Phytotoxic Metabolites of *Pseudomonas fuscovaginae*. *FEBS Letters* **1996**, *381*, 213–216, DOI: 10.1016/0014-5793(96)00043-9.
- [18] Bartal, A.; Vigneshwari, A.; Bóka, B.; Vörös, M.; Takács, I.; Kredics, L.; Manczinger, L.; Varga, M.; Vágvolgyi, C.; Szekeres, A. Effects of Different Cultivation Parameters on the Production of Surfactin Variants by a *Bacillus subtilis* Strain. *Molecules* **2018**, *23*, 2675, DOI: 10.3390/molecules23102675.
- [19] Bassarello, C.; Lazzaroni, S.; Bifulco, G.; Lo Cantore, P.; Iacobellis, N.S.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L.; Evidente, A. Tolaasins A–E, Five New Lipodepsipeptides Produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Journal of Natural Products* **2004**, *67*, 811–816, DOI: 10.1021/np0303557.

- [20] Batista, B.D.; Dourado, M.N.; Figueredo, E.F.; Hortencio, R.O.; Paulo, J.; Piotto, F.A.; Bonatelli, M.L.; Settles, M.L.; Azevedo, J.L.; Quecine, M.C. The Auxin-Producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 Promotes the Growth and Modifies the Root Architecture of Tomato (*Solanum Lycopersicum* Cv. Micro-Tom). *Archives of Microbiology* **2021**, *203*, 3869–3882, DOI: 10.1007/s00203-021-02361-z.
- [21] Bavaresco, L.G.; Osco, L.P.; Araujo, A.S.F.; Mendes, L.W.; Bonifacio, A.; Araújo, F.F. *Bacillus Subtilis* Can Modulate the Growth and Root Architecture in Soybean through Volatile Organic Compounds. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **2020**, *32*, 99–108, DOI: 10.1007/s40626-020-00173-y.
- [22] Behrens, B.; Engelen, J.; Tiso, T.; Blank, L.M.; Hayen, H. Characterization of Rhamnolipids by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry after Solid-Phase Extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408*, 2505–2514, DOI: 10.1007/s00216-016-9353-y.
- [23] Berkeley, R.C.W.; Logan, N.A.; Shute, L.A.; Capey, A.G. 12 Identification of *Bacillus* Species. *Methods in microbiology* **1984**, 291–328, DOI: 10.1016/s0580-9517(08)70397-0.
- [24] Bernat, P.; Nesme, J.; Paraszkievicz, K.; Schlöter, M.; Płaza, G. Characterization of Extracellular Biosurfactants Expressed by a *Pseudomonas putida* Strain Isolated from the Interior of Healthy Roots from *Sida Hermaphrodita* Grown in a Heavy Metal Contaminated Soil. *Current Microbiology* **2019**, *76*, 1320–1329, DOI: 10.1007/s00284-019-01757-x.
- [25] Bernat, P.; Paraszkievicz, K.; Siewiera, P.; Moryl, M.; Płaza, G.; Chojniak, J. Lipid Composition in a Strain of *Bacillus subtilis*, a Producer of Iturin a Lipopeptides That Are Active against Uropathogenic Bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2016**, *32*, DOI: 10.1007/s11274-016-2126-0.
- [26] Bertrand, S.; Bohni, N.; Schnee, S.; Schumpp, O.; Gindro, K.; Wolfender, J.-L. Metabolite Induction via Microorganism Co-Culture: A Potential Way to Enhance Chemical Diversity for Drug Discovery. *Biotechnology Advances* **2014**, *32*, 1180–1204, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.03.001.
- [27] Bhatia, D.; Sharma, N.R.; Singh, J.; Kanwar, R.S. Biological Methods for Textile Dye Removal from Wastewater: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **2017**, *47*, 1836–1876, DOI: 10.1080/10643389.2017.1393263.
- [28] Bonnichsen, L.; Tolker-Nielsen, T.; Rybtke, M.; Bygvraa Svenningsen, N.; de Bruijn, I.; Nybroe, O.; Raaijmakers, J.M. Lipopeptide Biosurfactant Viscosin Enhances Dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 Biofilms. *Microbiology* **2015**, *161*, 2289–2297, DOI: 10.1099/mic.0.000191.

- [29] Burgess, L.; Bryden, W. *Fusarium*: A Ubiquitous Fungus of Global Significance. *Microbiology Australia* **2012**, *33*, 22, DOI: 10.1071/ma12022.
- [30] Carles, L.; Joly, M.; Bonnemoy, F.; Leremboure, M.; Donnadieu, F.; Batisson, I.; Besse-Hoggan, P. Biodegradation and Toxicity of a Maize Herbicide Mixture: Mesotrione, Nicosulfuron and S-Metolachlor. *Journal of Hazardous Materials* **2018**, *354*, 42–53, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.04.045.
- [31] Caulier, S.; Nannan, C.; Gillis, A.; Licciardi, F.; Bragard, C.; Mahillon, J. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology* **2019**, *10*, DOI: 10.3389/fmicb.2019.00302.
- [32] Cawoy, H.; Debois, D.; Franzil, L.; De Pauw, E.; Thonart, P.; Ongena, M. Lipopeptides as Main Ingredients for Inhibition of Fungal Phytopathogens By *Bacillus subtilis*/Amyloliquefaciens. *Microbial Biotechnology* **2014**, *8*, 281–295, DOI: 10.1111/1751-7915.12238.
- [33] Chauhan, V.; Mazumdar, S.; Pandey, A.; Kanwar, S.S. *Pseudomonas* Lipopeptide: An Excellent Biomedical Agent. *MedComm - Biomaterials and applications* **2023**, *2*, DOI: 10.1002/mba2.27.
- [34] Chaves-López, C.; Serio, A.; Gianotti, A.; Sacchetti, G.; Ndagijimana, M.; Ciccarone, C.; Stellarini, A.; Corsetti, A.; Paparella, A. Diversity of Food-Borne *Bacillus* Volatile Compounds and Influence on Fungal Growth. *Journal of Applied Microbiology* **2015**, *119*, 487–499, DOI: 10.1111/jam.12847.
- [35] Chege, N.C.; Okoth, S.; Amugune, N.O.; Siameto, E.N. Antagonism of *Trichoderma harzianum* Isolates on Soil Borne Plant Pathogenic Fungi from Embu District, Kenya. *Journal of Yeast and Fungal Research* **2010**, *1*, 47–54, DOI: 10.5897/jyfr.9000004.
- [36] Chen, F.; Wang, M.; Zheng, Y.; Luo, J.; Yang, X.; Wang, X. Quantitative Changes of Plant Defense Enzymes and Phytohormone in Biocontrol of Cucumber *Fusarium* Wilt by *Bacillus subtilis* B579. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2009**, *26*, 675–684, DOI: 10.1007/s11274-009-0222-0.
- [37] Chen, Q.; Gao, J.; Yang, X.; Qiu, Y.; Wang, Y.; Wang, H. Synergistic Effects of *Bacillus velezensis* SDTB038 and Phenamacril on *Fusarium* Crown and Root Rot of Tomato. *Plant Pathology* **2023**, *72*, 1453–1462, DOI: 10.1111/ppa.13769.
- [38] Chowdhury, S.P.; Uhl, J.; Grosch, R.; Maria, S.; Pittroff, S.; Dietel, K.; Philippe Schmitt-Kopplin; Rainer Borriss; Hartmann, A. Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* Subsp. *Plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses toward the Bottom Rot Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-microbe Interactions* **2015**, *28*, 984–995, DOI: 10.1094/mpmi-03-15-0066-r.

- [39] Ciurko, D.; Chebbi, A.; Kruszelnicki, M.; Czapor-Irزابek, H.; Urbanek, A.K.; Polowczyk, I.; Franzetti, A.; Janek, T. Production and Characterization of Lipopeptide Biosurfactant from a New Strain of *Pseudomonas antarctica* 28E Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *RSC Advances* **2023**, *13*, 24129–24139, DOI: 10.1039/d3ra03408a.
- [40] Corkley, I.; Fraaije, B.; Hawkins, N. Fungicide Resistance Management: Maximizing the Effective Life of Plant Protection Products. *Plant Pathology* **2021**, DOI: 10.1111/ppa.13467.
- [41] Corradini, F.; Meza, P.; Eguiluz, R.; Casado, F.; Huerta-Lwanga, E.; Geissen, V. Evidence of Microplastic Accumulation in Agricultural Soils from Sewage Sludge Disposal. *Science of The Total Environment* **2019**, *671*, 411–420, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.368.
- [42] Crupkin, A.C.; Fulvi, A.B.; Iturburu, F.G.; Medici, S.; Mendieta, J.; Panzeri, A.M.; Menone, M.L. Evaluation of Hematological Parameters, Oxidative Stress and DNA Damage in the Cichlid *Australoheros facetus* Exposed to the Fungicide Azoxystrobin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2021**, *207*, 111286, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111286.
- [43] Datta, D.; Ghosh, S.; Kumar, S.; Gangola, S.; Majumdar, B.; Saha, R.; Mazumdar, S.P.; Singh, S.V.; Kar, G. Microbial Biosurfactants: Multifarious Applications in Sustainable Agriculture. *Microbiological Research* **2024**, *279*, 127551–127551, DOI: 10.1016/j.micres.2023.127551.
- [44] de Araujo, F.F.; Bonifacio, A.; Bavaresco, L.G.; Mendes, L.W.; de Araújo, A.S.F. *Bacillus subtilis* Changes the Root Architecture of Soybean Grown on Nutrient-Poor Substrate. *Rhizosphere* **2021**, 100348, DOI: 10.1016/j.rhisph.2021.100348.
- [45] de Kroon, A.I.P.M.; Rijken, P.J.; De Smet, C.H. Checks and Balances in Membrane Phospholipid Class and Acyl Chain Homeostasis, the Yeast Perspective. *Progress in Lipid Research* **2013**, *52*, 374–394, DOI: 10.1016/j.plipres.2013.04.006.
- [46] Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; i in. The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology* **2012**, *13*, 414–430, DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.
- [47] DeFilippi, S.; Groulx, E.; Megalla, M.; Mohamed, R.; Avis, T.J. Fungal Competitors Affect Production of Antimicrobial Lipopeptides in *Bacillus subtilis* Strain B9–5. *Journal of Chemical Ecology* **2018**, *44*, 374–383, DOI: 10.1007/s10886-018-0938-0.

- [48] Devi, A.R.; Sharma, G.D.; Majumdar, P.B.; Pandey, P. A Multispecies Consortium of Bacteria Having Plant Growth Promotion and Antifungal Activities, for the Management of *Fusarium* Wilt Complex Disease in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2018**, *16*, 614–624, DOI: 10.1016/j.bcab.2018.10.003.
- [49] Deziel, E.; Lépine, F.; Milot, S.; Villemur, R. RhIA Is Required for the Production of a Novel Biosurfactant Promoting Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoic Acids (HAAs), the Precursors of Rhamnolipids. *Microbiology* **2003**, *149*, 2005–2013, DOI: 10.1099/mic.0.26154-0.
- [50] Duis, K.; Coors, A. Microplastics in the Aquatic and Terrestrial Environment: Sources (with a Specific Focus on Personal Care Products), Fate and Effects. *Environmental Sciences Europe* **2016**, *28*, DOI: 10.1186/s12302-015-0069-y.
- [51] Dukare, A.; Paul, S.; Arambam, A. Isolation and Efficacy of Native Chitinolytic Rhizobacteria for Biocontrol Activities against *Fusarium* Wilt and Plant Growth Promotion in Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* **2020**, *30*, DOI: 10.1186/s41938-020-00256-7.
- [52] Ebadzadsahrai, G.; Higgins Keppler, E.A.; Soby, S.D.; Bean, H.D. Inhibition of Fungal Growth and Induction of a Novel Volatilome in Response to *Chromobacterium vaccinii* Volatile Organic Compounds. *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01035.
- [53] Ekwomadu, T.I.; Mwanza, M. *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. *Agriculture* **2023**, *13*, 1810, DOI: 10.3390/agriculture13091810.
- [54] El-Housseiny, G.S.; Aboshanab, K.M.; Aboulwafa, M.M.; Hassouna, N.A. Structural and Physicochemical Characterization of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* P6. *AMB Express* **2020**, *10*, DOI: 10.1186/s13568-020-01141-0.
- [55] Emanuele, M.C.; Scaloni, A.; Lavermicocca, P.; Jacobellis, N.S.; Camoni, L.; Di Giorgio, D.; Pucci, P.; Paci, M.; Segre, A.L.; Ballio, A. Corceptins, New Bioactive Lipodepsipeptides from Cultures of *Pseudomonas corrugata*. *FEBS Letters* **1998**, *433*, 317–320, DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00933-8.
- [56] Fan, B.; Blom, J.; Klenk, H.-P.; Borriss, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00022.

- [57] Fang, Y.; Jiang, J.; Ding, H.; Li, X.; Xie, X. Phospholipase C: Diverse Functions in Plant Biotic Stress Resistance and Fungal Pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* **2023**, *24*, 1192–1202, DOI: 10.1111/mpp.13343.
- [58] Fenta, L.; Mekonnen, H. Microbial Biofungicides as a Substitute for Chemical Fungicides in the Control of Phytopathogens: Current Perspectives and Research Directions. *Scientifica (Hindawi. Online)* **2024**, *2024*, 1–12, DOI: 10.1155/2024/5322696.
- [59] Fenta, L.; Mekonnen, H.; Kabtimer, N. The Exploitation of Microbial Antagonists against Postharvest Plant Pathogens. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1044, DOI: 10.3390/microorganisms11041044.
- [60] Fernández, L. “Global Pesticide Use by Country”. Statista, www.statista.com/statistics/1263069/global-pesticide-use-by-country. Dostęp: 24.08.2024.
- [61] Fritze, D. Taxonomy of the Genus *Bacillus* and Related Genera: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria. *Phytopathology* **2004**, *94*, 1245–1248, DOI: 10.1094/phyto.2004.94.11.1245.
- [62] Gao, L.; She, M.; Shi, J.; Cai, D.; Wang, D.; Xiong, M.; Shen, G.; Gao, J.; Zhang, M.; Yang, Z.; i in. Enhanced Production of Iturin a by Strengthening Fatty Acid Synthesis Modules in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2022**, *10*, 974460, DOI: 10.3389/fbioe.2022.974460.
- [63] George, S.; Jayachandran, K. Production and Characterization of Rhamnolipid Biosurfactant from Waste Frying Coconut Oil Using a Novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology* **2013**, *114*, 373–383, DOI: 10.1111/jam.12069.
- [64] Germer, A.; Tiso, T.; Müller, C.; Behrens, B.; Vosse, C.; Scholz, K.; Froning, M.; Hayen, H.; Blank, L.M. Exploiting the Natural Diversity of RhIA Acyltransferases for the Synthesis of the Rhamnolipid Precursor 3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)Alkanoic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* **2020**, *86*, DOI: 10.1128/AEM.02317-19.
- [65] Geudens, N.; Martins, J.C. Cyclic Lipopeptides from *Pseudomonas* spp. – Biological Swiss-Army Knives. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01867.
- [66] Geudens, N.; Nasir, M.N.; Crowet, J.-M.; Raaijmakers, J.; Fehér, K.; Coenye, T.; Martins, J.; Lins, L.; Sinnaeve, D.; Deleu, M. Membrane Interactions of Natural Cyclic Lipopeptides of the Viscosin Group. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* **2017**, *1859*, 331–339, DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.12.013.

- [67] Ghosh, S.; Sinha, J.K.; Ghosh, S.; Vashisth, K.; Han, S.; Bhaskar, R. Microplastics as an Emerging Threat to the Global Environment and Human Health. *sustainability* **2023**, *15*, 10821–10821, DOI: 10.3390/su151410821.
- [68] Gikas, G.D.; Parlakidis, P.; Mavropoulos, T.; Vryzas, Z. Particularities of Fungicides and Factors Affecting Their Fate and Removal Efficacy: A Review. *Sustainability* **2022**, *14*, 4056, DOI: 10.3390/su14074056.
- [69] Gonçalves, O.S.; Júlia, M.; Martins, P. Glyphosate-Induced Impact on the Functional Traits of the *Bacillus* sp. FC1 Isolate. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **2020**, *50*, DOI: 10.1590/1983-40632020v5057954.
- [70] Gouin, T.; Roche, N.; Lohmann, R.; Hodges, G. A Thermodynamic Approach for Assessing the Environmental Exposure of Chemicals Absorbed to Microplastic. *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 1466–1472, DOI: 10.1021/es1032025.
- [71] Grimmer, M.K.; van den Bosch, F.; Powers, S.J.; Paveley, N.D. Fungicide Resistance Risk Assessment Based on Traits Associated with the Rate of Pathogen Evolution. *Pest Management Science* **2014**, *71*, 207–215, DOI: 10.1002/ps.3781.
- [72] Gross, H.; Stockwell, V.O.; Henkels, M.D.; Nowak-Thompson, B.; Loper, J.E.; Gerwick, W.H. The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 53–63, DOI: 10.1016/j.chembiol.2006.11.007.
- [73] Groupé, V.; Pugh, L.H.; Weiss, D.; Kochi, M. Observations on Antiviral Activity of Viscosin. *Experimental Biology and Medicine* **1951**, *78*, 354–358, DOI: 10.3181/00379727-78-19071.
- [74] Gu, Y.; Ma, Y.; Wang, J.; Xia, Z.; Wei, H. Genomic Insights into a Plant Growth-Promoting *Pseudomonas koreensis* Strain with Cyclic Lipopeptide-Mediated Antifungal Activity. *MicrobiologyOpen* **2020**, *9*, DOI: 10.1002/mbo3.1092.
- [75] Gu, Z.; Yin, J.; Wu, H.; Liang, Y.; Wu, W.; Lu, Y.; Li, R.; Tan, S.; He, C.; Yi, K. Synergistic Mechanism of *Bacillus subtilis* Czk1 Combined with Propiconazole and Tebuconazole Mixtures against Pyrrhoderma Noxium. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* **2023**, *10*, DOI: 10.1186/s40538-023-00487-4.
- [76] Guan, Y.; Bak, F.; Hennessy, R.C.; Horn Herms, C.; Lorenzen Elberg, C.; Bodin Dresbøll, D.; Winding, A.; Rumakanta Sapkota; Mette Haubjerg Nicolaisen The Potential of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 to Produce Viscosin Enhances Wheat Root Colonization and Shapes Root-Associated Microbial Communities in

- a Plant Genotype-Dependent Manner in Soil Systems. *mSphere* **2024**, DOI: 10.1128/msphere.00294-24.
- [77] Gudiña, E.J.; Fernandes, E.C.; Rodrigues, A.I.; Teixeira, J.A.; Rodrigues, Lã.R. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Using Corn Steep Liquor as Culture Medium. *Frontiers in Microbiology* **2015**, *6*, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00059.
- [78] Gudiña, E.J.; Pereira, J.F.B.; Rodrigues, L.R.; Coutinho, J.A.P.; Teixeira, J.A. Isolation and Study of Microorganisms from Oil Samples for Application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2012**, *68*, 56–64, DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.01.001.
- [79] Gunther, N.W.; NuñezA.; Fett, W.; Solaiman, D.K.Y. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis* , a Nonpathogenic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71*, 2288–2293, DOI: 10.1128/aem.71.5.2288-2293.2005.
- [80] Guo, J.-J.; Huang, X.-P.; Xiang, L.; Wang, Y.-Z.; Li, Y.-W.; Li, H.; Cai, Q.-Y.; Mo, C.-H.; Wong, M.-H. Source, Migration and Toxicology of Microplastics in Soil. *Environment International* **2020**, *137*, 105263, DOI: 10.1016/j.envint.2019.105263.
- [81] Güven, Ö.; Aydın, T.; Karaca, İ.; Butt, T.M. Biopesticides Offer an Environmentally Friendly Solution for Control of Pine Processionary Moth (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams) Larvae and Pupae in Urban Areas. *Biocontrol Science and Technology* **2020**, *31*, 35–52, DOI: 10.1080/09583157.2020.1826905.
- [82] Guzmán, E.; Ortega, F.; Rubio, R.G. Exploring the World of Rhamnolipids: A Critical Review of Their Production, Interfacial Properties, and Potential Application. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2024**, *69*, 101780, DOI: 10.1016/j.cocis.2023.101780.
- [83] Han, J.-L.; Liu, Y.; Chang, C.-T.; Chen, B.-Y.; Chen, W.-M.; Xu, H.-Z. Exploring Characteristics of Bioelectricity Generation and Dye Decolorization of Mixed and Pure Bacterial Cultures from Wine-Bearing Wastewater Treatment. *Biodegradation* **2010**, *22*, 321–333, DOI: 10.1007/s10532-010-9401-9.
- [84] Haq, I.U.; Zhang, M.; Yang, P.; van Elsas, J.D. The Interactions of Bacteria with Fungi in Soil: Emerging Concepts. *Advances in Applied Microbiology* **2014**, *89*, 185–215, DOI: 10.1016/B978-0-12-800259-9.00005-6.
- [85] Haque, M.; Haque, A.; Mosharaf, M.K.; Marcus, P.K. Decolorization, Degradation and Detoxification of Carcinogenic Sulfonated Azo Dye Methyl Orange by Newly Developed Biofilm Consortia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2021**, *28*, 793–804, DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.11.012.

- [86] Hawkins, N.J.; Fraaije, B.A. Predicting Resistance by Mutagenesis: Lessons from 45 Years of MBC Resistance. *Frontiers in Microbiology* **2016**, *7*, DOI: 10.3389/fmicb.2016.01814.
- [87] He, C.-N.; Ye, W.-Q.; Zhu, Y.-Y.; Zhou, W.-W. Antifungal Activity of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus Methylophilus* and *Bacillus thuringiensis* against Five Common Spoilage Fungi on Loquats. *Molecules* **2020**, *25*, 3360, DOI: 10.3390/molecules25153360.
- [88] Hirozawa, M.T.; Ono, M.A.; de Souza Suguiura, M.; Bordini, J.G.; Hirooka, E.Y.; Ono, S. Antifungal Effect and Some Properties of Cell-Free Supernatants of Two *Bacillus subtilis* Isolates against *Fusarium verticillioides*. *Brazilian Journal of Microbiology* **2024**, DOI: 10.1007/s42770-024-01414-x.
- [89] Huang, X.; Liu, J.-N.; Wang, Y.; Liu, J.; Lu, L. The Positive Effects of Mn²⁺ on Nitrogen Use and Surfactin Production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **2015**, *29*, 381–389, DOI: 10.1080/13102818.2015.1006905.
- [90] Hultberg, M.; Alsberg, T.; Khalil, S.; Alsanius, B. Suppression of Disease in Tomato Infected by *Pythium ultimum* with a Biosurfactant Produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl* **2009**, *55*, 435–444, DOI: 10.1007/s10526-009-9261-6.
- [91] Ingham, C.J.; Kalisman, O.; Finkelshtein, A.; Ben-Jacob, E. Mutually Facilitated Dispersal between the Nonmotile Fungus *Aspergillus fumigatus* and the Swarming Bacterium *Paenibacillus vortex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 19731–19736, DOI: 10.1073/pnas.1102097108.
- [92] Jadhav, S.B.; Patil, N.S.; Watharkar, A.D.; Apine, O.A.; Jadhav, J.P. Batch and Continuous Biodegradation of Amaranth in Plain Distilled Water by *P. aeruginosa* BCH and Toxicological Scrutiny Using Oxidative Stress Studies. *Environmental Science and Pollution Research* **2012**, *20*, 2854–2866, DOI: 10.1007/s11356-012-1155-y.
- [93] Jahan, R.; Bodratti, A.M.; Tsianou, M.; Alexandridis, P. Biosurfactants, Natural Alternatives to Synthetic Surfactants: Physicochemical Properties and Applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2020**, *275*, 102061, DOI: 10.1016/j.cis.2019.102061.
- [94] Jain, D.K.; Collins-Thompson, D.L.; Lee, H.; Trevors, J.T. A Drop-Collapsing Test for Screening Surfactant-Producing Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **1991**, *13*, 271–279, DOI: 10.1016/0167-7012(91)90064-W.
- [95] Janek, T.; Łukaszewicz, M.; Rezanka, T.; Krasowska, A. Isolation and Characterization of Two New Lipopeptide Biosurfactants Produced by

- Pseudomonas fluorescens* BD5 Isolated from Water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresource Technology* **2010**, *101*, 6118–6123, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.109.
- [96] Jasim, B.; Sreelakshmi, K.S.; Mathew, J.; Radhakrishnan, E.K. Surfactin, Iturin, and Fengycin Biosynthesis by Endophytic *Bacillus* sp. From *Bacopa monnieri*. *Microbial Ecology* **2016**, *72*, 106–119, DOI: 10.1007/s00248-016-0753-5.
- [97] Jasińska, A.; Różalska, S.; Rusetskaya, V.; Słaba, M.; Bernat, P. Microplastic-Induced Oxidative Stress in Metolachlor-Degrading Filamentous Fungus *Trichoderma harzianum*. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 12978, DOI: 10.3390/ijms232112978.
- [98] Jasińska, A.; Walaszczyk, A.; Paraszkiwicz, K. Omics-Based Approaches in Research on Textile Dye Microbial Decolorization. *Molecules* **2024**, *29*, 2771–2771, DOI: 10.3390/molecules29122771.
- [99] Jensen, C.N.G.; Pang, J.K.Y.; Gottardi, M.; Kračun, S.K.; Svendsen, B.A.; Nielsen, K.F.; Kovács, Á.T.; Moelbak, L.; Fimognari, L.; Husted, S.; i in. *Bacillus subtilis* Promotes Plant Phosphorus (P) Acquisition through P Solubilization and Stimulation of Root and Root Hair Growth. *Physiologia Plantarum* **2024a**, *176*, DOI: 10.1111/ppl.14338.
- [100] Jensen, C.N.G.; Peng, J.K.Y.; Hahn, C.M.; Gottardi, M.; Husted, S.; Moelbak, L.; Kovács, Á.T.; Fimognari, L.; Schulz, A. Differential Influence of *Bacillus subtilis* Strains on Arabidopsis Root Architecture through Common and Distinct Plant Hormonal Pathways. *Plant Science* **2024b**, *339*, 111936–111936, DOI: 10.1016/j.plantsci.2023.111936.
- [101] Jeon, H.J.; Kim, M.N. Isolation of Mesophilic Bacterium for Biodegradation of Polypropylene. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2016**, *115*, 244–249, DOI: 10.1016/j.ibiod.2016.08.025.
- [102] Jeyanthi, V.; Kanimozhi, S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) - Prospective and Mechanisms: A Review. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **2018**, *12*, 733–749, DOI: 10.22207/jpam.12.2.34.
- [103] Ji, X.; Li, J.; Meng, Z.; Zhang, S.; Dong, B.; Qiao, K. Synergistic Effect of Combined Application of a New Fungicide Fluopimomide with a Biocontrol Agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for Management of Gray Mold in Tomato. *Plant Disease* **2019**, *103*, 1991–1997, DOI: 10.1094/pdis-01-19-0143-re.
- [104] Joseph, R.S.I. Metabolism of Azoxystrobin in Plants and Animals. *Elsevier eBooks* **1999**, 265–278, DOI: 10.1533/9781845698416.6.265.
- [105] Joshi, A.U.; Hinsu, A.T.; Kotadiya, R.J.; Rank, J.K.; Andharia, K.N.; Kothari, R.K. Decolorization and Biodegradation of Textile Di-Azo Dye Acid Blue 113 by

- Pseudomonas stutzeri* AK6. *3 Biotech* **2020**, *10*, DOI: 10.1007/s13205-020-02205-5.
- [106] Jouzani, G.S.; Valijanian, E.; Sharafi, R. *Bacillus thuringiensis*: A Successful Insecticide with New Environmental Features and Tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2017**, *101*, 2691–2711, DOI: 10.1007/s00253-017-8175-y.
- [107] Jung, J.; Yu, K.O.; Ramzi, A.B.; Choe, S.H.; Kim, S.W.; Han, S.O. Improvement of Surfactin Production in *Bacillus subtilis* Using Synthetic Wastewater by Overexpression of Specific Extracellular Signaling Peptides, ComX and PhrC. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, *109*, 2349–2356, DOI: 10.1002/bit.24524.
- [108] Khan, S.; Malik, A. Degradation of Reactive Black 5 Dye by a Newly Isolated Bacterium *Pseudomonas entomophila* BS1. *Canadian Journal of Microbiology* **2016**, *62*, 220–232, DOI: 10.1139/cjm-2015-0552.
- [109] Kjeldgaard, B.; Listian, S.A.; Ramaswamhi, V.; Richter, A.; Kiesealther, H.T.; Kovács, Á.T. Fungal Hyphae Colonization by *Bacillus subtilis* Relies on Biofilm Matrix Components. *Biofilm* **2019**, *1*, 100007, DOI: 10.1016/j.bioflm.2019.100007.
- [110] Kohlmeier, S.; Smits, T.H.M.; Ford, R.M.; Keel, C.; Harms, H.; Wick, L.Y. Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 4640–4646, DOI: 10.1021/es047979z.
- [111] Kole, P.J.; Löhr, A.J.; Van Belleghem, F.; Ragas, A. Wear and Tear of Tyres: A Stealthy Source of Microplastics in the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2017**, *14*, 1265, DOI: 10.3390/ijerph14101265.
- [112] Kuiper, I.; Lagendijk, E.L.; Pickford, R.; Derrick, J.P.; Lamers, G.E.M.; Thomas-Oates, J.E.; Lugtenberg, B.J.J.; Bloemberg, G.V. Characterization of Two *Pseudomonas putida* Lipopeptide Biosurfactants, Putisolvin I and II, Which Inhibit Biofilm Formation and Break down Existing Biofilms. *Molecular Microbiology* **2003**, *51*, 97–113, DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03751.x.
- [113] Kulimushi, P.Z.; Arias, A.A.; Franzil, L.; Steels, S.; Ongena, M. Stimulation of Fengycin-Type Antifungal Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the Presence of the Maize Fungal Pathogen *Rhizomucor Variabilis*. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00850.
- [114] Kumar, J.; Ramlal, A.; Mallick, D.; Mishra, V. An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants* **2021a**, *10*, 1185, DOI: 10.3390/plants10061185.

- [115] Kumar, S.S.; Mahale, A.G.; Faizullah, M.; Krishna, J.R.; Channa, T.K. A Critical Review on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as a Drought Stress Management Tool. *International Journal of Plant & Soil Science* **2021b**, 44–66, DOI: 10.9734/ijpss/2021/v33i2130657.
- [116] Kumari, S.; Debnath, M.; Joshi, S.; Sonawane, S.H. Isolation, Screening, Characterization, and Optimization of Biosurfactant-Producing Bacteria for Removal of Micropollutants from Textile Effluents. *Industrial & engineering chemistry research* **2024**, DOI: 10.1021/acs.iecr.4c00168.
- [117] Kuppusamy, S.; Sethurajan, M.; Kadarkarai, M.; Aruliah, R. Biodecolourization of Textile Dyes by Novel, Indigenous *Pseudomonas stutzeri* MN1 and *Acinetobacter baumannii* MN3. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2017**, 5, 716–724, DOI: 10.1016/j.jece.2016.12.021.
- [118] Lastochkina, O.; Aliniaefard, S.; Garshina, D.; Garipova, S.; Pusenkova, L.; Allagulova, C.; Fedorova, K.; Baymiev, A.; Koryakov, I.; Sobhani, M. Seed Priming with Endophytic *Bacillus subtilis* Strain-Specifically Improves Growth of Phaseolus Vulgaris Plants under Normal and Salinity Conditions and Exerts Anti-Stress Effect through Induced Lignin Deposition in Roots and Decreased Oxidative and Osmotic Damages. *Journal of Plant Physiology* **2021**, 263, 153462, DOI: 10.1016/j.jplph.2021.153462.
- [119] Li, Q.; Ning, P.; Zheng, L.; Huang, J.; Li, G.; Hsiang, T. Effects of Volatile Substances of Streptomyces Globisporus JK-1 on Control of *Botrytis cinerea* on Tomato Fruit. *Biological Control* **2012**, 61, 113–120, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2011.10.014.
- [120] Li, W.; Rokni-Zadeh, H.; De Vleeschouwer, M.; Ghequire, M.G.K.; Sinnaeve, D.; Xie, G.; Rozenski, J.; Madder, A.; Martins, J.; De Mot, R. The Antimicrobial Compound Xantholysin Defines a New Group of *Pseudomonas* Cyclic Lipopeptides. *PLOS ONE* **2013**, 8, e62946–e62946, DOI: 10.1371/journal.pone.0062946.
- [121] Litwin, A.; Bernat, P.; Nowak, M.; Słaba, M.; Różalska, S. Lipidomic Response of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* to Pyrethroids. *Scientific Reports* **2021**, 11, DOI: 10.1038/s41598-021-00702-y.
- [122] Liu, C.; You, Y.; Zhao, R.; Sun, D.; Zhang, P.; Jiang, J.-H.; Zhu, A.; Liu, W. Biosurfactant Production from *Pseudomonas taiwanensis* L1011 and Its Application in Accelerating the Chemical and Biological Decolorization of Azo Dyes. **2017**, 145, 8–15, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.012.
- [123] Liu, J.; Fimognari, L.; de Almeida, J.; Niketa, C.; Compant, S.; Oliveira, T.; Baelum, J.; Pastar, M.; Sessitsch, A.; Moelbak, L.; i in. Effect of *Bacillus*

- paralicheniformis* on Soybean (*Glycine Max*) Roots Colonization, Nutrient Uptake and Water Use Efficiency under Drought Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* **2023a**, 209, 547–565, DOI: 10.1111/jac.12639.
- [124] Liu, J.; Hagberg, I.; Novitsky, L.; Hadj-Moussa, H.; Avis, T.J. Interaction of Antimicrobial Cyclic Lipopeptides from *Bacillus subtilis* Influences Their Effect on Spore Germination and Membrane Permeability in Fungal Plant Pathogens. *Fungal Biology* **2014a**, 118, 855–861, DOI: 10.1016/j.funbio.2014.07.004.
- [125] Liu, L.; Liang, M.; Li, L.; Sun, L.; Xu, Y.; Gao, J.; Wang, L.; Hou, Y.; Huang, S. Synergistic Effects of the Combined Application of *Bacillus subtilis* H158 and Strobilurins for Rice Sheath Blight Control. *Biological Control* **2018**, 117, 182–187, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2017.11.011.
- [126] Liu, L.; Zhao, K.; Cai, L.; Zhang, Y.; Fu, Q.; Huang, S. Combination Effects of Tebuconazole with *Bacillus subtilis* to Control Rice False Smut and the Related Synergistic Mechanism. *Pest Management Science* **2023b**, 79, 234–243, DOI: 10.1002/ps.7193.
- [127] Liu, Y.; Zhang, N.; Qiu, M.; Feng, H.; Vivanco, J.M.; Shen, Q.; Zhang, R. Enhanced Rhizosphere Colonization of Beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by Pathogen Infection. *FEMS Microbiology Letters* **2014b**, 353, 49–56, DOI: 10.1111/1574-6968.12406.
- [128] Lopes, R.; Tsui, S.; Gonçalves, P.J.R.O.; de Queiroz, M.V. A Look into a Multifunctional Toolbox: Endophytic *Bacillus* Species Provide Broad and Underexploited Benefits for Plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2018**, 34, DOI: 10.1007/s11274-018-2479-7.
- [129] López-Bucio, J.; Campos-Cuevas, J.C.; Hernández-Calderón, E.; Velásquez-Becerra, C.; Farías-Rodríguez, R.; Macías-Rodríguez, L.I.; Valencia-Cantero, E. *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* **2007**, 20, 207–217, DOI: 10.1094/mpmi-20-2-0207.
- [130] Lozowicka, B.; Abzeitova, E.; Sagitov, A.; Kaczynski, P.; Toleubayev, K.; Li, A. Studies of Pesticide Residues in Tomatoes and Cucumbers from Kazakhstan and the Associated Health Risks. *Environmental Monitoring and Assessment* **2015**, 187, DOI: 10.1007/s10661-015-4818-6.
- [131] Ma, Y.; Kong, Q.; Qin, C.; Chen, Y.; Chen, Y.; Ruihuan Lv; Zhou, G. Identification of Lipopeptides in *Bacillus megaterium* by Two-Step Ultrafiltration and LC–ESI–MS/MS. *AMB Express* **2016a**, 6, DOI: 10.1186/s13568-016-0252-6.

- [132] Ma, Y.; Vosátka, M.; Freitas, H. Editorial: Beneficial Microbes Alleviate Climatic Stresses in Plants. *Frontiers in Plant Science* **2019**, *10*, DOI: 10.3389/fpls.2019.00595.
- [133] Ma, Z.; Geudens, N.; Kieu, N.P.; Sinnaeve, D.; Ongena, M.; Martins, J.C.; Höfte, M. Biosynthesis, Chemical Structure, and Structure-Activity Relationship of Orfamide Lipopeptides Produced by *Pseudomonas protegens* and Related Species. *Frontiers in Microbiology* **2016b**, *7*, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00382.
- [134] Ma, Z.; Zuo, P.; Sheng, J.; Liu, Q.; Qin, X.; Ke, C. Characterization and Production of a Biosurfactant Viscosin from *Pseudomonas* sp. HN11 and Its Application on Enhanced Oil Recovery during Oily Sludge Cleaning. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2023**, *195*, 7668–7684, DOI: 10.1007/s12010-023-04503-z.
- [135] Mahapatra, S.; Yadav, R.; Ramakrishna, W. *Bacillus subtilis* Impact on Plant Growth, Soil Health and Environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology* **2022**, *132*, DOI: 10.1111/jam.15480.
- [136] Mammo, F.K.; Amoah, I.D.; Gani, K.M.; Pillay, L.; Ratha, S.K.; Bux, F.; Kumari, S. Microplastics in the Environment: Interactions with Microbes and Chemical Contaminants. *Science of The Total Environment* **2020**, *743*, 140518, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140518.
- [137] Meliani, A. Bioremediation Strategies Employed by *Pseudomonas* Species. In *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem. Sustainable Development and Biodiversity*, vol 12; Maheshwari, D., Ed.; Springer, Cham, 2015.
- [138] Mihalache, G.; Balaes, T.; Gostin, I.; Stefan, M.; Coutte, F.; Krier, F. Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* as New Biocontrol Products against Fusariosis in Ornamental Plants. *Environmental Science and Pollution Research* **2017**, *25*, 29784–29793, DOI: 10.1007/s11356-017-9162-7.
- [139] Miljaković, D.; Marinković, J.; Tamindžić, G.; Milošević, D.; Ignjatov, M.; Karačić, V.; Jakšić, S. Bio-Priming with *Bacillus* Isolates Suppresses Seed Infection and Improves the Germination of Garden Peas in the Presence of *Fusarium* Strains. *Journal of Fungi* **2024**, *10*, 358, DOI: 10.3390/jof10050358.
- [140] Miquel Guennoc, C.; Rose, C.; Guinnet, F.; Miquel, I.; Labbé, J.; Deveau, A. A New Method for Qualitative Multi-Scale Analysis of Bacterial Biofilms on Filamentous Fungal Colonies Using Confocal and Electron Microscopy. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, DOI: 10.3791/54771.
- [141] Miquel Guennoc, C.; Rose, C.; Labbé, J.; Deveau, A. Bacterial Biofilm Formation on the Hyphae of Ectomycorrhizal Fungi: A Widespread Ability under Controls? *FEMS Microbiology Ecology* **2018**, *94*, DOI: 10.1093/femsec/fiy093.

- [142] Miri, S.; Saini, R.; Davoodi, S.M.; Pulicharla, R.; Brar, S.K.; Magdouli, S. Biodegradation of Microplastics: Better Late than Never. *Chemosphere* **2022**, 286, 131670, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131670.
- [143] Mnif, I.; Ghribi, D. Review Lipopeptides Biosurfactants: Mean Classes and New Insights for Industrial, Biomedical, and Environmental Applications. *Biopolymers* **2015**, 104, 129–147, DOI: 10.1002/bip.22630.
- [144] Mnif, I.; Maktouf, S.; Fendri, R.; Kriaa, M.; Ellouze, S.; Ghribi, D. Improvement of Methyl Orange Dye Biotreatment by a Novel Isolated Strain, *Aeromonas Veronii* GRI, by SPB1 Biosurfactant Addition. *Environmental Science and Pollution Research* **2015**, 23, 1742–1754, DOI: 10.1007/s11356-015-5294-9.
- [145] Moreno-Velandia, C.A.; Ongena, M.; Kloepper, J.W.; Cotes, A.M. Biosynthesis of Cyclic Lipopeptides by *Bacillus velezensis* Bs006 and Its Antagonistic Activity Are Modulated by the Temperature and Culture Media Conditions. *Current Microbiology* **2021**, 78, 3505–3515, DOI: 10.1007/s00284-021-02612-8.
- [146] Moshtagh, B.; Hawboldt, K.; Zhang, B. Optimization of Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* N3-1P Using the Brewery Waste as the Carbon Source. *Environmental Technology* **2018**, 40, 3371–3380, DOI: 10.1080/09593330.2018.1473502.
- [147] Mpofu, E.; Alias, A.; Tomita, K.; Suzuki-Minakuchi, C.; Tomita, K.; Chakraborty, J.; Malon, M.; Ogura, Y.; Takikawa, H.; Okada, K.; i in. Azoxystrobin Amine: A Novel Azoxystrobin Degradation Product from *Bacillus licheniformis* Strain TAB7. *Chemosphere* **2021**, 273, 129663–129663, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.129663.
- [148] Mukherjee, S.; Bassler, B.L. Bacterial Quorum Sensing in Complex and Dynamically Changing Environments. *Nature Reviews Microbiology* **2019**, 17, DOI: 10.1038/s41579-019-0186-5.
- [149] Myresiotis, C.K.; Vryzas, Z.; Papadopoulou-Mourkidou, E. Biodegradation of Soil-Applied Pesticides by Selected Strains of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Their Effects on Bacterial Growth. *Biodegradation* **2011**, 23, 297–310, DOI: 10.1007/s10532-011-9509-6.
- [150] Nazareth, T.C.; Zanutto, C.P.; Maass, D.; de Souza, A.A.U.; Guelli Ulson de Souza, S.M. de A. Bioconversion of Low-Cost Brewery Waste to Biosurfactant: An Improvement of Surfactin Production by Culture Medium Optimization. *Biochemical Engineering Journal* **2021**, 172, 108058, DOI: 10.1016/j.bej.2021.108058.
- [151] Nguyen, D.D.; Melnik, A.V.; Koyama, N.; Lu, X.; Schorn, M.; Fang, J.; Aguinaldo, K.; Lincecum, T.L.; Ghequire, M.G.K.; Carrion, V.J.; i in. Indexing the

- Pseudomonas* Specialized Metabolome Enabled the Discovery of Poaeamide B and the Bananamides. *Nature Microbiology* **2016**, 2, 1–10, DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.197.
- [152] Nikitin, D.A.; Ivanova, E.A.; Semenov, M.; Zhelezova, A.D.; Ksenofontova, N.; Tkhakakhova, A.K.; Kholodov, V.A. Diversity, Ecological Characteristics and Identification of Some Problematic Phytopathogenic *Fusarium* in Soil: A Review. *Diversity* **2023**, 15, 49–49, DOI: 10.3390/d15010049.
- [153] Nurfarahin, A.; Mohamed, M.; Phang, L. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production—an Overview. *Molecules* **2018**, 23, 1049, DOI: 10.3390/molecules23051049.
- [154] Nykiel-Szymańska, J.; Stolarek, P.; Bernat, P. Elimination and Detoxification of 2,4-D by *Umbelopsis Isabellina* with the Involvement of Cytochrome P450. *Environmental Science and Pollution Research* **2017**, 25, 2738–2743, DOI: 10.1007/s11356-017-0571-4.
- [155] Ojuederie, O.B.; Chukwuneme, C.F.; Olanrewaju, O.S.; Adegboyega, T.T.; Ayilara, M.S.; Babalola, O.O. Contribution of Microbial Inoculants in Sustainable Maintenance of Human Health, Including Test Methods and Evaluation of Safety of Microbial Pesticide Microorganisms. *Biopestic. Bot. Microorgan. Improv. Agric. Hum. Health* **2021**, 1, 207–240.
- [156] Olanrewaju, O.S.; Glick, B.R.; Babalola, O.O. Mechanisms of Action of Plant Growth Promoting Bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2017**, 33, DOI: 10.1007/s11274-017-2364-9.
- [157] Ons, L.; Bylemans, D.; Thevissen, K.; Cammue, B.P.A. Combining Biocontrol Agents with Chemical Fungicides for Integrated Plant Fungal Disease Control. *Microorganisms* **2020**, 8, 1930, DOI: 10.3390/microorganisms8121930.
- [158] Pandey, B.V.; Upadhyay, R.S. Spectroscopic Characterization and Identification of *Pseudomonas fluorescens* Mediated Metabolic Products of Acid Yellow-9. *Microbiological Research* **2006**, 161, 311–315, DOI: 10.1016/j.micres.2005.11.003.
- [159] Paraszkievicz, K. Biosurfactant Enhancement Factors in Microbial Degradation Processes. *Caister Academic Press eBooks* **2016**, 167–182, DOI: 10.21775/9781910190456.10.
- [160] Paraszkievicz, K.; Bernat, P.; Kuśmierska, A.; Chojniak, J.; Płaza, G. Structural Identification of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* Strains Grown on the Media Obtained from Renewable Natural Resources. *Journal of Environmental Management* **2018**, 209, 65–70, DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.12.033.

- [161] Paraszkievicz, K.; Bernat, P.; Siewiera, P.; Moryl, M.; Sas Paszt, L.; Trzciński, P.; Jałowiecki, Ł.; Płaza, G. Agricultural Potential of Rhizospheric *Bacillus subtilis* Strains Exhibiting Varied Efficiency of Surfactin Production. *Scientia Horticulturae* **2017**, *225*, 802–809, DOI: 10.1016/j.scienta.2017.07.034.
- [162] Paraszkievicz, K.; Moryl, M.; Płaza, G.; Bhagat, D.; K. Satpute, S.; Bernat, P. Surfactants of Microbial Origin as Antibiofilm Agents. *International Journal of Environmental Health Research* **2019**, *31*, 401–420, DOI: 10.1080/09603123.2019.1664729.
- [163] Parra, E.; Pérez-Gil, J. Composition, Structure and Mechanical Properties Define Performance of Pulmonary Surfactant Membranes and Films. *Chemistry and Physics of Lipids* **2015**, *185*, 153–175, DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2014.09.002.
- [164] Parte, A.C.; Sardà Carbasse, J.; Meier-Kolthoff, J.P.; Reimer, L.C.; Göker, M. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN) Moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **2020**, *70*, 5607–5612, DOI: 10.1099/ijsem.0.004332.
- [165] Pathak, V.M.; Verma, V.K.; Rawat, B.S.; Kaur, B.; Babu, N.; Sharma, A.; Dewali, S.; Yadav, M.; Kumari, R.; Singh, S.; i in. Current Status of Pesticide Effects on Environment, Human Health and It's Eco-Friendly Management as Bioremediation: A Comprehensive Review. *Frontiers in Microbiology* **2022**, *13*, DOI: 10.3389/fmicb.2022.962619.
- [166] Pecci, Y.; Rivardo, F.; Martinotti, M.G.; Allegrone, G. LC/ESI-MS/MS Characterisation of Lipopeptide Biosurfactants Produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 Strain. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45*, 772–778, DOI: 10.1002/jms.1767.
- [167] Peng, D.; Li, S.; Chen, C.; Zhou, M. Combined Application of *Bacillus subtilis* NJ-18 with Fungicides for Control of Sharp Eyespot of Wheat. *Biological Control* **2014**, *70*, 28–34, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.11.013.
- [168] Peng, D.; Luo, K.; Jiang, H.; Deng, Y.; Bai, L.; Zhou, X. Combined Use of *Bacillus subtilis* Strain B-001 and Bactericide for the Control of Tomato Bacterial Wilt. *Pest Management Science* **2017**, *73*, 1253–1257, DOI: 10.1002/ps.4453.
- [169] Pinheiro, L.R.S.; Gradíssimo, D.G.; Xavier, L.P.; Santos, A.V. Degradation of Azo Dyes: Bacterial Potential for Bioremediation. *Sustainability* **2022**, *14*, 1510, DOI: 10.3390/su14031510.
- [170] Pion, M.; Bshary, R.; Bindschedler, S.; Filippidou, S.; Wick, L.Y.; Job, D.; Junier, P. Gains of Bacterial Flagellar Motility in a Fungal World. *Applied and Environmental Microbiology* **2013**, *79*, 6862–6867, DOI: 10.1128/aem.01393-13.

- [171] Pisi, A.; Cesari, A.; Zakrisson, E.; Filippini, Gi.; Roberti, R.; Mantovani, W. SEM Investigation about Hyphal Relationships between Some Antagonistic Fungi against “*Fusarium*” Spp. Foot Rot Pathogen of Wheat. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)* **2006**, DOI: 10.14601/phytopathol_mediterr-1588.
- [172] Płaza, G.; Chojniak, J.; Rudnicka, K.; Paraszkievicz, K.; Bernat, P. Detection of Biosurfactants in *Bacillus* Species: Genes and Products Identification. *Journal of Applied Microbiology* **2015**, *119*, 1023–1034, DOI: 10.1111/jam.12893.
- [173] Prashar, P.; Shah, S. Impact of Fertilizers and Pesticides on Soil Microflora in Agriculture. *Sustainable Agriculture Reviews* **2016**, *19*, 331–361, DOI: 10.1007/978-3-319-26777-7_8.
- [174] Putri, R.E.; Mubarik, N.R.; Ambarsari, L.; Wahyudi, A.T. Antagonistic Activity of Glucanolytic Bacteria *Bacillus subtilis* W3.15 against *Fusarium oxysporum* and Its Enzyme Characterization. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* **2021**, *22*, DOI: 10.13057/biodiv/d220956.
- [175] Raaijmakers, J.M.; de Bruijn, I.; de Kock, M.J.D. Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2006**, *19*, 699–710, DOI: 10.1094/mpmi-19-0699.
- [176] Raaijmakers, J.M.; De Bruijn, I.; Nybroe, O.; Ongena, M. Natural Functions of Lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than Surfactants and Antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* **2010**, *34*, 1037–1062, DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x.
- [177] Rahman, Pattanathu K. S. M.; Pasirayi, G.; Auger, V.; Ali, Z. Production of Rhamnolipid Biosurfactants By *Pseudomonas Aeruginosa*DS10-129 in a Microfluidic Bioreactor. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2010**, *55*, 45–52, DOI: 10.1042/ba20090277.
- [178] Rainey, P.B.; Brodey, C.L.; Johnstone, K. Biological Properties and Spectrum of Activity of Tolaasin, a Lipodepsipeptide Toxin Produced by the Mushroom Pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1991**, *39*, 57–70, DOI: 10.1016/0885-5765(91)90031-c.
- [179] Rampersad, S. Pathogenomics and Management of *Fusarium* Diseases in Plants. *Pathogens* **2020**, *9*, 340, DOI: 10.3390/pathogens9050340.
- [180] Riedo, J.; Wächter, D.; Gubler, A.; Wettstein, F.E.; Meuli, R.G.; Bucheli, T.D. Pesticide Residues in Agricultural Soils in Light of Their On-Farm Application History. *Environmental Pollution* **2023**, *331*, 121892, DOI: 10.1016/j.envpol.2023.121892.

- [181] Rooney, A.P.; Price, N.P.J.; Ehrhardt, C.; Swezey, J.L.; Bannan, J.D. Phylogeny and Molecular Taxonomy of the *Bacillus subtilis* Species Complex and Description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* **2009**, *59*, 2429–2436, DOI: 10.1099/ijs.0.009126-0.
- [182] Roy, A. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and Its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications* **2018**, *08*, DOI: 10.4172/2090-4541.1000248.
- [183] Ruomeng, B.; Meihao, O.; Siru, Z.; Shichen, G.; Yixian, Z.; Junhong, C.; Ruijie, M.; Yuan, L.; Gezhi, X.; Xingyu, C.; i in. Degradation Strategies of Pesticide Residue: From Chemicals to Synthetic Biology. *Synthetic and Systems Biotechnology* **2023**, *8*, 302–313, DOI: 10.1016/j.synbio.2023.03.005.
- [184] Saini, H.S.; Barragán-Huerta, B.E.; Lebrón-Paler, A.; Pemberton, J.E.; Vázquez, R.R.; Burns, A.M.; Marron, M.T.; Seliga, C.J.; Gunatilaka, A.A.L.; Maier, R.M. Efficient Purification of the Biosurfactant Viscosin from *Pseudomonas libanensis* Strain M9-3 and Its Physicochemical and Biological Properties. *Journal of Natural Products* **2008**, *71*, 1011–1015, DOI: 10.1021/np800069u.
- [185] Santos, D.K.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, DOI: 10.3390/ijms17030401.
- [186] Savary, S.; Willocquet, L.; Pethybridge, S.J.; Esker, P.; McRoberts, N.; Nelson, A. The Global Burden of Pathogens and Pests on Major Food Crops. *Nature Ecology & Evolution* **2019**, *3*, 430–439, DOI: 10.1038/s41559-018-0793-y.
- [187] Sazykina, M.A.; Minkina, T.; Konstantinova, E.; Khmelevtsova, L.; Azhogina, T.N.; Antonenko, E.; Karchava, S.K.; Klimova, M.; Sushkova, S.; Polienko, E.; i in. Pollution Impact on Microbial Communities Composition in Natural and Anthropogenically Modified Soils of Southern Russia. *Microbiological Research* **2022**, *254*, 126913–126913, DOI: 10.1016/j.micres.2021.126913.
- [188] Schlusshuber, M.; Godard, J.; Sebban, M.; Bernay, B.; Garon, D.; Séguin, V.; Oulyadi, H.; Desmaures, N. Characterization of Milkisin, a Novel Lipopeptide with Antimicrobial Properties Produced by *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 Isolated from Bovine Raw Milk. **2018**, *9*, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01030.
- [189] Schlusshuber, M.; Godard, J.; Sebban, M.; Bernay, B.; Garon, D.; Seguin, V.; Oulyadi, H.; Desmaures, N. Corrigendum: Characterization of Milkisin, a Novel Lipopeptide with Antimicrobial Properties Produced by *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 Isolated from Bovine Raw Milk. *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01323.

- [190] Schultz, M.; Burton, J.P.; Chanyi, R.M. Use of *Bacillus* in Human Intestinal Probiotic Applications. *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology* **2017**, 119–123, DOI: 10.1016/b978-0-12-804024-9.00011-2.
- [191] Segre, A.; Bachmann, R.C.; Ballio, A.; Bossa, F.; Grgurina, I.; Iacobellis, N.S.; Marino, G.; Pucci, P.; Simmaco, M.; Takemoto, J.Y. The Structure of Syringomycins a₁, E and G. *FEBS Letters* **1989**, 255, 27–31, DOI: 10.1016/0014-5793(89)81054-3.
- [192] Shao, J.; Liu, Y.; Xie, J.; Štefanič, P.; Lv, Y.; Fan, B.; Mandic-Mulec, I.; Zhang, R.; Shen, Q.; Xu, Z. Annulment of Bacterial Antagonism Improves Plant Beneficial Activity of a *Bacillus velezensis* Consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **2022**, 88, e00240-22, DOI: 10.1128/aem.00240-22.
- [193] Sharifi, R.; Ryu, C.-M. Revisiting Bacterial Volatile-Mediated Plant Growth Promotion: Lessons from the Past and Objectives for the Future. *Annals of Botany* **2018**, 122, 349–358, DOI: 10.1093/aob/mcy108.
- [194] Sharma, J.; Sundar, D.; Srivastava, P. Biosurfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2021**, 8, DOI: 10.3389/fmolb.2021.727070.
- [195] Sharma, R.; Singh, J.; Verma, N. Production, Characterization and Environmental Applications of Biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2018**, 16, 132–139, DOI: 10.1016/j.bcab.2018.07.028.
- [196] She, M.; Zhou, H.; Dong, W.; Xu, Y.; Gao, L.; Gao, J.; Yang, Y.; Yang, Z.; Cai, D.; Chen, S. Modular Metabolic Engineering of *Bacillus Amyloliquefaciens* for High-Level Production of Green Biosurfactant Iturin A. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2024**, 108, DOI: 10.1007/s00253-024-13083-9.
- [197] Shi, J.; Wang, Z.; Peng, Y.; Zhang, Z.; Zhang, F.; Wang, J.; Wang, X. Microbes Drive Metabolism, Community Diversity, and Interactions in Response to Microplastic-Induced Nutrient Imbalance. *Science of The Total Environment* **2023**, 877, 162885–162885, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162885.
- [198] Shimizu, K. Metabolic Regulation and Coordination of the Metabolism in Bacteria in Response to a Variety of Growth Conditions. *Advances in biochemical engineering, biotechnology* **2015**, 1–54, DOI: 10.1007/10_2015_320.
- [199] Singh, P.; Singh, R.; Zhou, Y.; Wang, J.; Jiang, Y.; Shen, N.; Wang, Y.; Yang, L.; Jiang, M.-G. Unlocking the Strength of Plant Growth Promoting *Pseudomonas* in Improving Crop Productivity in Normal and Challenging Environments: A Review. *Journal of Plant Interactions* **2022**, 17, 220–238, DOI: 10.1080/17429145.2022.2029963.

- [200] Slimene, B.; Alaya, A.B.; Karkouch, I.; Khiari, B.; Garcia-Caparrós, P.; Alyami, N.M.; Debez, A.; Tarhouni, B.; Djébali, N. In Vitro and in Vivo Antifungal Efficacy of Individual and Consortium *Bacillus* Strains in Controlling Potato Black Scurf and Possible Development of Spore-Based Fungicide. *Biological Control* **2024**, *193*, 105527–105527, DOI: 10.1016/j.biocontrol.2024.105527.
- [201] Smulek, W.; Zdzarta, A.; Pacholak, A.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Marczak, Ł.; Jarzębski, M.; Kaczorek, E. Saponaria Officinalis L. Extract: Surface Active Properties and Impact on Environmental Bacterial Strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *150*, 209–215, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.11.035.
- [202] Song, S.; Hwang, C.-W. Microbial Degradation of the Benzimidazole Fungicide Carbendazim by *Bacillus velezensis* HY-3479. *International Microbiology* **2023**, DOI: 10.1007/s10123-023-00427-0.
- [203] Sørensen, D.; Nielsen, T.H.; Sørensen, J.; Christophersen, C. Cyclic Lipoundecapeptide Lokisin from *Pseudomonas* sp. Strain DSS41. *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 4421–4423, DOI: 10.1016/S0040-4039(02)00856-0.
- [204] Sørensen, D.; Theis Nielsen, T.; Christophersen, C.; Sørensen, J.; Gajhede, M. Cyclic Lipoundecapeptide Amphisin from *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry* **2001**, *57*, 1123–1124, DOI: 10.1107/S0108270101010782.
- [205] Stolarek, P.; Różalska, S.; Bernat, P. Lipidomic Adaptations of the Metarhizium Robertsii Strain in Response to the Presence of Butyltin Compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861*, 316–326, DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.06.007.
- [206] Sumayya, R.; Aravindan, G.; Karthick, G. Spectral Studies of Azo Dye Degradation Using Selected Biofertilizer: *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2021**, *11*, 73–79, DOI: 10.22376/ijpbbs/lpr.2021.11.1.173-79.
- [207] Sun, X.; Chen, B.; Li, Q.; Liu, N.; Xia, B.; Zhu, L.; Qu, K. Toxicities of Polystyrene Nano- and Microplastics toward Marine Bacterium *Halomonas alkaliphila*. *Science of The Total Environment* **2018**, *642*, 1378–1385, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.141.
- [208] Tahir, H.A.S.; Gu, Q.; Wu, H.; Niu, Y.; Huo, R.; Gao, X. *Bacillus* Volatiles Adversely Affect the Physiology and Ultra-Structure of Ralstonia Solanacearum and Induce Systemic Resistance in Tobacco against Bacterial Wilt. *Scientific Reports* **2017**, *7*, DOI: 10.1038/srep40481.
- [209] Tariq, M.; Iqbal, B.; Khan, I.; Khan, A.R.; Jho, E.H.; Salam, A.; Zhou, H.; Zhao, X.; Li, G.; Du, D. Microplastic Contamination in the Agricultural Soil—Mitigation

- Strategies, Heavy Metals Contamination, and Impact on Human Health: A Review. *Plant cell reports* **2024**, 43, DOI: 10.1007/s00299-024-03162-6.
- [210] Tian, B.; Xie, J.; Fu, Y.; Cheng, J.; Li, B.; Chen, T.; Zhao, Y.; Gao, Z.; Yang, P.; Barbetti, M.J.; i in. A Cosmopolitan Fungal Pathogen of Dicots Adopts an Endophytic Lifestyle on Cereal Crops and Protects Them from Major Fungal Diseases. *The ISME Journal* **2020**, 14, 3120–3135, DOI: 10.1038/s41396-020-00744-6.
- [211] Tiso, T.; Zauter, R.; Tulke, H.; Leuchtle, B.; Li, W.-J.; Behrens, B.; Wittgens, A.; Rosenau, F.; Hayen, H.; Blank, L.M. Designer Rhamnolipids by Reduction of Congener Diversity: Production and Characterization. *Microbial Cell Factories* **2017**, 16, DOI: 10.1186/s12934-017-0838-y.
- [212] Topaç, F.O.; Dindar, E.; Uçaroğlu, S.; Başkaya, H.S. Effect of a Sulfonated Azo Dye and Sulfanilic Acid on Nitrogen Transformation Processes in Soil. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, 170, 1006–1013, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.05.080.
- [213] Tudi, M.; Daniel Ruan, H.; Wang, L.; Lyu, J.; Sadler, R.; Connell, D.; Chu, C.; Phung, D.T. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2021**, 18, DOI: 10.3390/ijerph18031112.
- [214] Ui, H.; Miyake, T.; Iinuma, H.; Imoto, M.; Naganawa, H.; Hattori, S.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, S.; Umezawa, K. Pholipeptin, a Novel Cyclic Lipoundecapeptide from *Pseudomonas fluorescens*. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, 103–108, DOI: 10.1021/jo9603993.
- [215] Vallet-Gely, I.; Novikov, A.; Augusto, L.; Liehl, P.; Bolbach, G.; Péchy-Tarr, M.; Cosson, P.; Keel, C.; Caroff, M.; Lemaitre, B. Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, 76, 910–921, DOI: 10.1128/AEM.02112-09.
- [216] Vanitha, T.K.; Suresh, G.; Bhandi, M.M.; Reddy, K.; Mohan, S.V. Microbial Degradation of Organochlorine Pesticide: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by Axenic and Mixed Consortium. *Bioresource Technology* **2023**, 382, 129031–129031, DOI: 10.1016/j.biortech.2023.129031.
- [217] Varjani, S.; Rakholiya, P.; Ng, H.Y.; You, S.; Teixeira, J.A. Microbial Degradation of Dyes: An Overview. *Bioresource Technology* **2020**, 314, 123728, DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123728.

- [218] Veerapagu, M.; Jeya, K.R.; Sankaranarayanan, A. Role of Plant Growth-Promoting Microorganisms in Phytoremediation Efficiency. *Elsevier eBooks* **2023**, 45–61, DOI: 10.1016/b978-0-323-91875-6.00020-7.
- [219] Vörös, M.; Manczinger, L.; Kredics, L.; Szekeres, A.; Shine, K.; Alharbi, N.S.; Khaled, J.M.; Vágvolgyi, C. Influence of Agro-Environmental Pollutants on a Biocontrol Strain of *Bacillus velezensis*. *MicrobiologyOpen* **2018**, 8, e00660, DOI: 10.1002/mbo3.660.
- [220] Wang, J.; Qu, F.; Liang, J.; Yang, M.; Hu, X. *Bacillus velezensis* SX13 Promoted Cucumber Growth and Production by Accelerating the Absorption of Nutrients and Increasing Plant Photosynthetic Metabolism. *Scientia Horticulturae* **2022**, 301, 111151–111151, DOI: 10.1016/j.scienta.2022.111151.
- [221] Wang, K.; Qin, Z.; Wu, S.; Zhao, P.; Zhen, C.; Gao, H. Antifungal Mechanism of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* Assessed Using Omics Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, 69, 5267–5278, DOI: 10.1021/acs.jafc.1c00640.
- [222] Wang, X.; An, J.; Cao, T.; Guo, M.; Han, F. Application of Biosurfactants in Medical Sciences. *Molecules* **2024**, 29, 2606–2606, DOI: 10.3390/molecules29112606.
- [223] Wang, Y.; Zhang, C.; Liang, J.; Wang, L.Y.; Gao, W.; Jiang, J.; Chang, R. Surfactin and Fengycin B Extracted from *Bacillus pumilus* W-7 Provide Protection against Potato Late Blight via Distinct and Synergistic Mechanisms. **2020**, 104, 7467–7481, DOI: 10.1007/s00253-020-10773-y.
- [224] Wesche, J.; Schnabel, G. Influence of Propiconazole and Metconazole Formulations on *Bacillus subtilis* Vegetative Cell Growth and Disease Control of Fruit Crops. *Phytopathology* **2024**, 114, 1515–1524, DOI: 10.1094/phyto-01-24-0029-r.
- [225] Wise, C.; Falardeau, J.; Hagberg, I.; Avis, T.J. Cellular Lipid Composition Affects Sensitivity of Plant Pathogens to Fengycin, an Antifungal Compound Produced by *Bacillus subtilis* Strain CU12. *Phytopathology®* **2014**, 104, 1036–1041, DOI: 10.1094/phyto-12-13-0336-r.
- [226] Wu, S.; Zhong, J.; Lei, Q.; Song, H.; Chen, S.-F.; Wahla, A.Q.; Bhatt, K.; Chen, S. New Roles for *Bacillus thuringiensis* in the Removal of Environmental Pollutants. *Environmental Research* **2023a**, 236, 116699–116699, DOI: 10.1016/j.envres.2023.116699.
- [227] Wu, T.; Zhong, L.; Ding, J.; Pang, J.-W.; Sun, H.-J.; Ding, M.-Q.; Ren, N.-Q.; Yang, S.-S. Microplastics Perturb Nitrogen Removal, Microbial Community and

- Metabolism Mechanism in Biofilm System. *Journal of hazardous materials* **2023b**, 458, 131971–131971, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131971.
- [228] Xu, Q.; Kang, D.; Meyer, M.D.; Pennington, C.L.; Gopal, C.; Schertzer, J.W.; Kirienko, N.V. Cytotoxic Rhamnolipid Micelles Drive Acute Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Infection and Immunity* **2024**, 92, DOI: 10.1128/iai.00407-23.
- [229] Xu, X.; Wang, Y.; Lei, T.; Sohail, M.A.; Wang, J.; Wang, H. Synergistic Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* SDTB009 and Difenconazole on *Fusarium* Wilt of Tomato. *Plant Disease* **2022**, 106, 2165–2171, DOI: 10.1094/PDIS-12-21-2650-RE.
- [230] Xu, Y.; Cai, D.; Zhang, H.; Gao, L.; Yang, Y.; Gao, J.; Li, Y.; Yang, C.; Ji, Z.; Yu, J.; i in. Enhanced Production of Iturin a in *Bacillus amyloliquefaciens* by Genetic Engineering and Medium Optimization. *Process Biochemistry* **2020**, 90, 50–57, DOI: 10.1016/j.procbio.2019.11.017.
- [231] Yadav, I.C.; Devi, N.L.; Syed, J.H.; Cheng, Z.; Li, J.; Zhang, G.; Jones, K.C. Current Status of Persistent Organic Pesticides Residues in Air, Water, and Soil, and Their Possible Effect on Neighboring Countries: A Comprehensive Review of India. *Science of The Total Environment* **2015**, 511, 123–137, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.041.
- [232] Zabłocka-Godlewska, E.; Przysaś, W.; Grabińska-Sota, E. Decolourization of Diazo Evans Blue by Two Strains of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Different Wastewater Treatment Plants. *Water, Air, & Soil Pollution* **2012**, 223, 5259–5266, DOI: 10.1007/s11270-012-1276-4.
- [233] Zhang, D.; Yu, S.; Yang, Y.; Zhang, J.; Zhao, D.; Pan, Y.; Fan, S.; Yang, Z.; Zhu, J. Antifungal Effects of Volatiles Produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology* **2020a**, 11, DOI: 10.3389/fmicb.2020.01196.
- [234] Zhang, J.; Gao, D.; Li, Q.; Zhao, Y.; Li, L.; Lin, H.; Bi, Q.; Zhao, Y. Biodegradation of Polyethylene Microplastic Particles by the Fungus *Aspergillus flavus* from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. *Science of The Total Environment* **2020b**, 704, 135931, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135931.
- [235] Zhao, F.; Shi, R.; Ma, F.; Han, S.; Zhang, Y. Oxygen Effects on Rhamnolipids Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Cell Factories* **2018**, 17, DOI: 10.1186/s12934-018-0888-9.
- [236] Zhao, H.; Liu, K.; Fan, Y.; Cao, J.; Li, H.; Song, W.; Liu, Y.; Miao, M. Cell-Free Supernatant of *Bacillus velezensis* Suppresses Mycelial Growth and Reduces

- Virulence of *Botrytis cinerea* by Inducing Oxidative Stress. *Frontiers in Microbiology* **2022a**, 13, DOI: 10.3389/fmicb.2022.980022.
- [237] Zhao, X.; Zhou, J.; Tian, R.; Liu, Y. Microbial Volatile Organic Compounds: Antifungal Mechanisms, Applications, and Challenges. *Frontiers in Microbiology* **2022b**, 13, DOI: 10.3389/fmicb.2022.922450.
- [238] Zhao, X.; Zhou, Z.; Han, Y. Antifungal Effects of Lipopeptide Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **2017**, 08, 295–310, DOI: 10.4236/abb.2017.89022.
- [239] Zhou, J.; Xue, R.; Liu, S.; Xu, N.; Xin, F.; Zhang, W.; Jiang, M.; Dong, W. High Di-Rhamnolipid Production Using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, Separation of Mono/Di-Rhamnolipids, and Evaluation of Their Properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2019a**, 7, DOI: 10.3389/fbioe.2019.00245.
- [240] Zhou, X.-G.; Kumar, K.V.K.; Zhou, L.W.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W. Combined Use of PGPRs and Reduced Rates of Azoxystrobin to Improve Management of Sheath Blight of Rice. *Plant Disease* **2021**, 105, 1034–1041, DOI: 10.1094/pdis-07-20-1596-re.
- [241] Zhou, Y.; Liu, X.; Wang, J. Characterization of Microplastics and the Association of Heavy Metals with Microplastics in Suburban Soil of Central China. *Science of The Total Environment* **2019b**, 694, 133798, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.133798.
- [242] Zimmermann, T.; Kulla, H.G.; Leisinger, T. Properties of Purified Orange II Azoreductase, the Enzyme Initiating Azo Dye Degradation by *Pseudomonas* KF46. *European Journal of Biochemistry* **1982**, 129, 197–203, DOI: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb07040.x.