

Streszczenie w języku polskim

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 grzybni *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 pohodowlanych (sugerujący wzrost produkcji biosurfaktantów). Niemniej jednak podwyższoną aktywność przeciwgrzybową wyznaczono tylko w jednej hodowli – zawierającej grzybnie *F. oxysporum* KKP 458 oraz komórki *Bacillus* sp. Kol D4 oraz *B. subtilis* DSM 3257.

Wykazano, że zastosowane w pracy zanieczyszczenia antropogeniczne mogą w różnicowany 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 pohodowlanych, 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 grzybnie, 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.

23.10.2024, t50d2'

data i miejsce

Aleksandra Wołoszczyk

podpis