

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Magdaléna Švecová

Inhibiční účinky kmene *B. velezensis* na rostlinné patogeny rodu *Xanthomonas*

Inhibitory effects of *B. velezensis* strain on plant pathogens of the genus
Xanthomonas

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Andrea Palyzová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03.01.2022

Podpis

Poděkování

Mé velké poděkování patří vedoucí mé diplomové práce RNDr. Andree Palyzové, PhD. a RNDr. Heleně Marešové, CSc. za jejich odborné vedení, milý přístup, nesmírnou trpělivost, ochotu a pomoc při práci. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Hynku Máchovi za spolupráci při vyhodnocování LC-MS analýzy a Mgr. Tereze Juříkové za milou spolupráci nejen při SEM analýze. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině, kteří mě po celou dobu studia velmi podporovali.

Abstrakt

Biologická kontrola je metoda aplikované ekologie, která využívá jeden organismus, případně jeho produkt, k inhibici jiného, patogenního, organismu. Využití této metody v ochraně rostlin by měla být oproti běžně používaným pesticidům šetrnější k životnímu prostředí. Jako biokontrolní činidlo může být využívána rhizobakterie *Bacillus velezensis* FZB42, která disponuje schopností potlačit růst jiných mikroorganismů. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* je fytopatogen, který způsobuje značné ztráty v zemědělské produkci.

Tato diplomová práce měla prokázat, že bakteriální kmen *B. velezensis* FZB42 působí antagonisticky na fytopatogenní bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* SU ve směsné kultuře. Studie potvrdila, že antibiotický efekt kmene *B. velezensis* FZB42 proti *X. campestris* pv. *campestris* SU ve směsné kultuře závisí na počátečním množství buněk obou kmenů. Interakce dvou bakteriálních kmenů byla charakterizována prostřednictvím metabolické analýzy, bylo potvrzeno, že *B. velezensis* FZB42 produkuje čtyři dominantní sekundární metabolity: lipopeptidy surfaktin, fengycin a bacillomycin a siderofor bacillibaktin, které vykazují antifungální a antibiotickou aktivitu. Inhibiční aktivita kmene *B. velezensis* FZB42 byla dále sledována SEM analýzou směsné kultury, kde bylo patrné poškození buněk *X. campestris* pv. *campestris* SU.

Klíčová slova: *Bacillus velezensis* FZB42; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; biologická kontrola; metabolická analýza; surfaktin; fengycin; bacillomycin; bacillibaktin; mikroskopická analýza

Abstract

Biological control is a method of applied ecology that uses one organism, or its product, to inhibit another pathogenic organism. This method in plant protection should be more environmentally friendly than commonly used pesticides. The rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42, which can suppress the growth of other microorganisms, can be used as a biological control agent. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* is a phytopathogen that causes significant losses in agricultural production.

This diploma thesis proved an antagonistic effect of the bacterial strain *B. velezensis* FZB42 on the phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* SU in mixed culture. The study confirmed that the antibiotic effect of *B. velezensis* strain FZB42 against *X. campestris* pv. *campestris* SU in mixed culture depends on the inoculation ratios of both strains. The interaction of the two bacterial strains was characterized by metabolomics analysis, it was confirmed that *B. velezensis* FZB42 produces four dominant secondary metabolites: lipopeptides surfactin, fengycin, and bacillomycin and siderophore bacillibactin, which show antifungal and antibiotic activity. The inhibitory activity of *B. velezensis* strain FZB42 was further monitored by SEM analysis, which showed damage to *X. campestris* pv. *campestris* SU cells.

Key words: *Bacillus velezensis* FZB42; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; biological control; metabolomics analysis; surfactin; fengycin; bacillomycin; bacillibactin; microscopic analysis

Obsah

1.	Literární úvod	9
1.1.	Úvod	9
1.2.	Infekce rostlin rodu <i>Xanthomonas</i>	10
1.2.1.	Proces infekce rostlin patogenem	11
1.2.2.	Chemická ochrana rostlin proti fytopatogenům rodu <i>Xanthomonas</i>	12
1.3.	Inhibiční vlastnosti rodu <i>Bacillus</i> proti patogenům	12
1.3.1.	Využití bakterií rodu <i>Bacillus</i> v biologické kontrole rostlinných škůdců	12
1.3.2.	Rod <i>Bacillus</i> jako ochrana před lidskými patogeny	15
1.4.	Sekundární metabolity produkované kmenem <i>B. amyloliquefaciens</i>	15
1.4.1.	Surfaktin	15
1.4.2.	Bacillomycin	17
1.4.3.	Fengycin	18
1.4.4.	Bacillibaktin	19
1.5.	Stimulace růstu rostlin prostřednictvím mikroorganismů	20
1.5.1.	Indukovaná systémová rezistence	20
1.5.2.	Rhizobakterie podporující růst rostlin	21
2.	Cíle práce	22
3.	Materiál	23
3.1.	Použité chemikálie	23
3.2.	Složení kultivačních médií	24
3.2.1.	LB médium (Luria-Bertani)	24
3.2.2.	M9 médium	24
3.2.3.	Selekční médium (mCS20ABN)	24
3.3.	Pufry a zásobní roztoky	25
3.3.1.	Zásobní roztoky stopových prvků (TE)	25
3.3.2.	Zásobní roztoky zdrojů uhlíku	25
3.3.3.	Kakodylátový pufr	26
3.3.4.	Glutaraldehyd 25% roztok	26
3.3.5.	TRIS-HCl	26
3.3.6.	Fyziologický roztok	26
3.3.7.	Tris/glycerol roztok	26
3.3.8.	Enzymatický roztok pro stanovení glukosy	26
3.3.9.	Mobilní fáze pro HPLC	27
3.3.10.	Pufrovaný 3% fixační roztok glutaraldehydu	27
3.3.11.	Postfixační roztok	27

3.4.	Použité přístroje	28
4.	Metody	29
4.1.	Použité kmeny	29
4.2.	Sterilizace médií, laboratorních pomůcek a nádobí	29
4.3.	Příprava glycerinové konzervy.....	29
4.4.	Příprava inokula a kultivace v tekutém médiu	29
4.5.	Biochemická charakterizace	30
4.6.	Kultivace bakteriálních kmenů na vybraných zdrojích C	30
4.7.	Diskový difúzní test	30
4.8.	Duální kultivace v minimálním médiu	31
4.9.	Stanovení suché hmotnosti buněk	31
4.10.	Stanovení zbytkové koncentrace glukosy	31
4.11.	Stanovení koncentrace živých buněk.....	32
4.12.	LC-MS analýza	32
4.12.1.	Příprava vzorků pro LC-MS analýzu	32
4.12.2.	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) – Detekce metabolitů	33
4.13.	Příprava vzorků pro SEM.....	33
5.	Výsledky	35
5.1.	Charakterizace růstu bakteriálních kmenů v komplexním tekutém médiu	35
5.2.	Utilizace různých zdrojů uhlíku a energie jednotlivými bakteriálními kmeny	38
5.3.	Optimalizace složení minerálního média doplněného vybranými zdroji C	39
5.3.1.	Růstová charakterizace jednotlivých kmenů na optimalizovaném minimálním médiu	40
5.4.	Inhibiční experimenty.....	42
5.4.1.	Inhibice fytopatogenů rodu <i>Xanthomonas</i> antagonistickým kmenem <i>Bacillus velezensis</i> na pevném médiu.....	42
5.4.2.	Inhibiční vliv antagonistického kmene <i>B. velezensis</i> na přírodní izolát <i>Xcc</i> SU.....	43
5.4.3.	Detekce metabolitů kmene <i>B. velezensis</i> v průběhu duální kultivace.....	48
5.4.4.	Morfologické změny buněk pozorované SEM analýzou.....	49
6.	Diskuse	52
7.	Souhrn	57
8.	Seznam použité literatury	58
9.	Přílohy	i
9.1.	Příloha 1: Publikované výsledky	i

Seznam zkratek

μ	Specifická růstová rychlost (h^{-1})
$A_{(489)}$	Naměřená absorbance při vlnové délce 489 nm
BS	(Bile salt) žlučová sůl
$C_{(\text{glu})}$	Koncentrace glukosy (g/l)
CDW	(Cell dry weight) suchá hmotnost buněk (mg/ml)
CFU	(Colony forming unit) počet životaschopných buněk (CFU/ml)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DSMZ	(German collection of Micromicroorganisms) sbírka mikroorganismů (Německo)
f	Směrnice grafu kalibrační přímky pro koncentraci glukosy
FT-ICR	(Fourier transform ion cyclotron resonance) iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
g	Tíhové zrychlení
GPS	Globální polohový systém
HPLC	(High-performance liquid chromatography) vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISR	Indukovaná systémová rezistence
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
M9TE	M9 médium se stopovými prvky
M9TEGlu	M9 médium se stopovými prvky a s D-glukosou jako zdrojem uhlíku
M9TEPyr	M9 médium se stopovými prvky a s pyruvátem jako zdrojem uhlíku
M9TEXyl	M9 médium se stopovými prvky a s D-xylosou jako zdrojem uhlíku
MS	Hmotnostní spektrometrie
m/z	(Mass /charge) hmota/náboj
NCTC	(The National Collection of Type Cultures) sbírka mikroorganismů (Velká Británie)

OD ₍₆₀₀₎	Optická densita při 600 nm
PGPR	Rhizobakterie podporující růst rostlin
pv.	Pathovar
rpm	(Revolutions per minute) otáčky za min
SEM	Rastrovací elektronová mikroskopie
T	Doba zdvojení (h)
TE	(Trace elements) stopové prvky
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Xcc	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

1. Literární úvod

1.1. Úvod

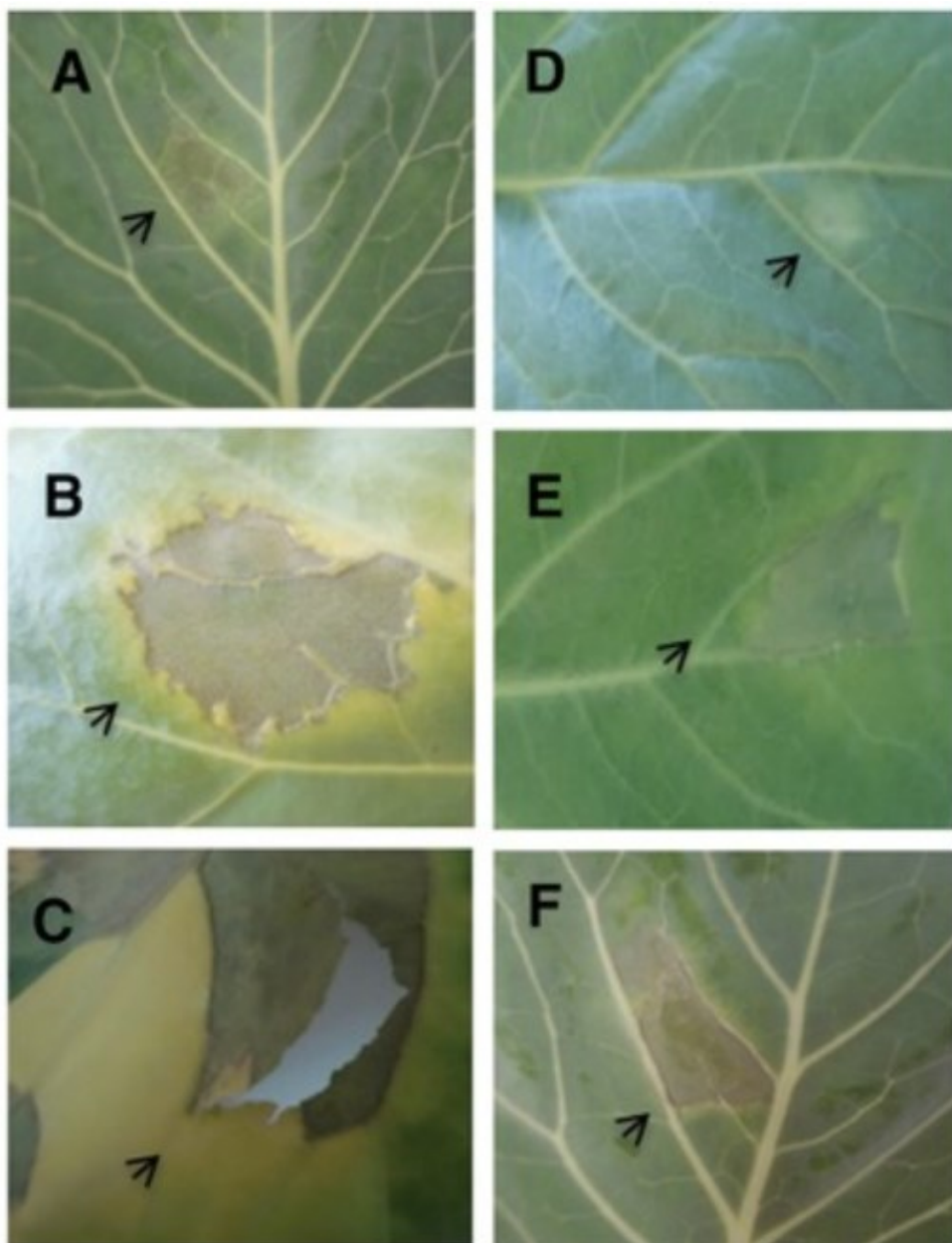
Tato diplomová práce je zaměřena na studium vlivu bakteriálního kmene *Bacillus velezensis* na fytopatogena kmene *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* prostřednictvím produkce extracelulárních sekundárních metabolitů např. antimikrobiálních látek a sideroforů. Pochopení mechanismu vzájemného působení mikroorganismů by mohlo být využitelné v biologické kontrole rostlin napadené patogeny.

Kvůli rostlinným onemocněním způsobovaným patogenními bakteriemi, houbami a viry dochází k významným ztrátám v rostlinné zemědělské produkci (Oerke a Dehne, 2004). Proti těmto chorobám jsou hojně používány chemické pesticidy s antibiotickými a antimykotickými účinky. Tyto látky se ovšem mohou dostávat do životního prostředí, tam mohou přetrvávat, akumulovat se a následně negativně ovlivňovat další organismy nebo celé ekosystémy. Navíc se patogenní mikroorganismy stále častěji stávají proti konvenčně používaným pesticidům rezistentní. Některé látky, které jsou na rostliny aplikovány pro jejich posílení, mohou mít také negativní vliv na lidské zdraví. Se zvyšujícím se zájmem veřejnosti o ochranu životního prostředí roste poptávka po snižování množství plošně využívaných pesticidů chránící rostliny před patogeny a škůdci. Právě kvůli vzrůstajícímu problému vzniku rezistence proti běžně používaným pesticidům, které potlačují rostlinné patogeny, je nutné získávat nové poznatky a aplikovat moderní přístupy v ochraně zemědělských plodin. Jedním z těchto přístupů je tzv. biologická kontrola. Biologická kontrola je metoda aplikované ekologie, jejímž principem je, že určitá látka, případně organismus, cíleně negativně působí na jiný, patogenní, organismus, a to za předpokladu, že těmito účinky nebudou ovlivněny necílové organismy. V praxi se pro biologickou kontrolu napadených rostlin často používají mikroorganismy izolované rhizosféry, případně jejich sekundární metabolity.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že bakteriální kmen *Bacillus velezensis* FZB42 působí antagonisticky na fytopatogenní bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (kmeny SU a 1279) a popsat probíhající interakci.

1.2. Infekce rostlin rodu *Xanthomonas*

Bakterie rodu *Xanthomonas* patří mezi Gram negativní striktně aerobní chemoorganotrofní organismy. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* je průmyslově významným organismem, neboť produkuje polysacharid xanthan, ze kterého je dále vyráběna xanthanová guma. Většina kmenů se vyznačuje produkcí žlutého pigmentu xanthomonadinu (Starr et al., 1977). *Xanthomonas* patří mezi fytopatogeny s vysokou hostitelskou specifitou, jenž způsobují infekce u přibližně čtyři sta druhů rostlin. Velké množství kmenů způsobuje značné hospodářské škody, protože snižují výnosy v pěstování zemědělských plodin, bylo popsáno na sto dvacet pathovarů *Xanthomonas* (Leyns et al., 1984). *Xanthomonas cucurbitae* způsobuje bakteriální skvrnitost a nekrotické léze u rostlin z čeledi *Cucurbitaceae* (Altin et al., 2020). Kmeny *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* způsobují bakteriální onemocnění rýže, které se projevuje chlorózou, tedy světlými pruhy na listech (Swings et al., 1990). *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* je jednou z možných příčin chřadnutí rostlin banánovníků (Tushemereirwe et al., 2004). U cukrové třtiny bylo popsáno onemocnění zvané „leaf scald disease“, původcem tohoto rostlinného onemocnění je *Xanthomonas albilineans* (Birch, 2001). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* je původcem onemocnění zvané rakovina citrusů, které způsobuje nekrotické léze na listech, stoncích a plodech citrusů (Leksomboon et al., 2001) a kmeny *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas perforans* nebo *Xanthomonas gardneri* způsobují choroby rostlin rajčat a paprik (Jones et al., 2004). V neposlední řadě je významným rostlinným patogenem také *X. campestris* pv. *campestris*. Tento kmen zapříčiňuje rostlinné onemocnění tzv.: černá hniloba u rostlin z čeledi *Brassicaceae* (tj. čeled' brukvovité) (Obr. 1). Tato nemoc se projevuje žloutnutím listů a nekrotickými lézemi ve tvaru písmene V, které se rozšiřují z okrajů listů do jejich středu (Sutton a Williams, 1970; Williams et al., 1972; Santos et al., 2017). Působením rostlinných patogenů dochází ke ztrátám v produkci zemědělských plodin až o 15 % (Oerke a Dehne, 2004).



Obr. 1: Rostlinné onemocnění černá hniloba na brukvi zelné (*Brassica oleracea*) způsobené bakteriálním fytopatogenním kmenem *X. campestris* pv. *campestris*. (Převzato a upraveno ze Santos et al., 2017).

1.2.1. Proces infekce rostlin patogenem

Při infekci jsou bakterie rodu *Xanthomonas* na rostliny nejčastěji přenášeny na semenech, která byla infikována mateřskou rostlinou, nebo ostatními rostlinami. Patogeny se mohou šířit prostřednictvím vody, buď činností deště nebo díky umělému zavlažování. Existuje také možnost rozšiřování patogenů mechanickou manipulací s půdou (orbou) nebo prostřednictvím hmyzu. *Xanthomonas* vstupuje do rostliny hydatodami nebo přes poraněnou rostlinnou tkáň (Ryan et al., 2011). Infekce bakterií *Xanthomonas* začíná primárním pomnožením na povrchu a vně epidermálních buněk v okolí místa vstupu infekce.

Infekce dále postupuje do buněk pochvy cévních svazků a xylému. Rozšiřuje se také v apoplastu nebo infekce postupuje až do rostlinných cév, kde se buňky aktivně dělí a vytváří agregáty (Akimoto-Tomiyama et al., 2014). Přilnutí k povrchu listu, vstup infekce, kolonizace a přežívání patogena v rostlinné buňce usnadňují následující virulenční faktory produkované bakterií *Xanthomonas*, jsou to: adhesiny (Das et al. 2008), lipopolysacharidy vnější membrány a slizového pouzdra (Kingsley et al., 1993) a polysacharid xanthan (Chou et al., 1997).

1.2.2. Chemická ochrana rostlin proti fytopatogenům rodu *Xanthomonas*

Pro ochranu rostlin proti patogenním bakteriím *Xanthomonas* bylo v minulosti používáno antibiotikum streptomycin a sloučeniny mědi, případně jejich kombinace. Ovšem současným problémem jsou vznikající rezistence, jak proti antibiotikům, tak proti pesticidům na základě sloučenin mědi (Ritchie a Dittapongpitch, 1991). Rezistence bakterií rodu *Xanthomonas* na pesticidy na bázi mědi je poměrně rozšířená. Rezistentní kmeny jsou např.: *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* a *X. vesicatoria*. Geny zodpovědné za rezistenci na látky s obsahem mědi jsou lokalizované na plasmidu (Richard et al., 2017). Navíc, syntetické organické sloučeniny obsahující měď, mohou mít značný negativní dopad na životní prostředí. Zvýšení koncentrace mědi v půdě může mít za následek snížení biodiverzity edafonu (Lejon et al., 2008). Dále může prostřednictvím působení těžkých kovů docházet ke snížení aktivity půdních mikroorganismů (Wang et al., 2007). Erozí půdy a splachem sloučenin s obsahem mědi z polí může docházet ke zhoršování kvality vody, která může být následně toxická pro vodní organismy (Schuler et al., 2008). I přes to, že měď je esenciální prvek pro člověka, tak pokud je dostupná ve formě některých solí, může působit toxicky. Měď je akumulována v játrech, v nervové soustavě a v orgánech reprodukční soustavy (Ashish et al., 2013). Měď může mít také vliv na trávicí soustavu, kdy může zapříčinit žaludeční potíže (Araya et al., 2003).

1.3. Inhibiční vlastnosti rodu *Bacillus* proti patogenům

1.3.1. Využití bakterií rodu *Bacillus* v biologické kontrole rostlinných škůdců

Bakterie rodu *Bacillus* patří mezi Gram pozitivní sporulující bakterie, jeho endospory mohou vydržet dehydrataci, a proto dlouhodobě přežívat v prostředí. *Bacillus* patří mezi rhizobakterie a je běžnou součástí půdní mikrobioty. Navíc mají schopnost podporovat růst

rostlin (Idris et al., 2004). V roce 2016 došlo ke sjednocení taxonomie bakteriálních druhů, kdy bylo na základě genetické shody navrženo, že *Bacillus amyloliquefaciens* je nově označován jako *Bacillus velezensis* (Dunlap et al., 2016).

Bakterie rodu *Bacillus* jsou producenty antibiotických a antifungálních látek (Loeffler et al., 1986). Jejich výhodou, jako biokontrolního agens, je, že disponují schopností dělit se uvnitř tkáně hostitele (Daungfu et al., 2019). Účinky bakterie rodu *Bacillus* bývají využívány v zemědělství k cílené biologické ochraně rostlin, jsou registrovány jako biopesticidy a jsou komerčně prodávány pro potlačení rostlinných onemocnění způsobovaných bakteriálními nebo houbovými patogeny (Tab. 1). Proti houbovým patogenům rodu *Rhizoctonia*, *Fusarium* a *Aspergillus* byly použity například bakteriální kmeny *Bacillus licheniformis* SB3086, *Bacillus pumilus* GB 34 a *Bacillus subtilis* GBO3, které zamezují vzniku infekce na semenech pšenice, hrachu, fazolí nebo bavlny, podobně jako *B. subtilis* MBI 600. V roce 2000 byl kmen *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* FZB24 komerčně registrován, jako účinný prostředek pro ochranu sazenic stromů a keřů proti houbovým patogenům *Rhizoctonia* a *Fusarium* (Fravel, 2005). Jedním z nejpoužívanějších biopesticidů je bakteriální kmen *Bacillus thuringiensis*, který je základem pro více než dvě stě registrovaných biopesticidních přípravků (Mishra et al., 2015). Jako biopesticid byl, pro své larvicidní účinky, poprvé registrován ve Francii v roce 1938 pod názvem „Sporeine“ (Sanahuja et al., 2011). Poskytuje účinnou ochranu před hmyzími škůdci produkcí toxinů, které mají schopnost usmrtit jejich larvy (Hannay, 1953). Biopesticidy obsahující *B. thuringiensis* jako účinnou látku by neměly mít výrazný vliv na jiné než cílové organismy, a tím být bezpečnější v porovnání se syntetickými pesticidy (Caquet et al., 2011). Bylo ovšem zjištěno, že aplikace postřiků s *B. thuringiensis* v polních podmínkách způsobuje změny ve společenstvu hmyzu, a tím může docházet ke změnám v celém ekosystému (Schoenly et al., 2003). Většina izolátů rodu *Bacillus* má schopnost inhibovat růst bakteriálního patogena kmene *X. campestris* pv. *campestris* (Wulff et al., 2002a; Monteiro et al., 2005).

Tab. 1: Bakterie rodu *Bacillus* jako účinná látka biopesticidů. (Převzato a upraveno z Pérez-García et al., 2011).

Název biopesticidu	Bakteriální druhy	Patogen /Onemocnění	Cílová plodina	Výrobce
Avogreen	<i>B. subtilis</i>	<i>Cercospora</i> , skvrnitost listu	Avokádo	Stimuplant, JAR
Ballad Plus	<i>B. pumilus</i>	Rez, padlí, <i>Cercospora</i> , hnědá skvrnitost	Sója	AgraQuest, USA
Biobest	<i>B. subtilis</i>	Sněť, hnědá skvrnitost, plíseň listové pochvy	Rýže	Appliedchem, Thajsko
Companion	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Sclerotinia</i>	Skleníkové, školkařské a okrasné dřeviny	Growth Products, USA
EcoGuard	<i>B. licheniformis</i>	Dolarová skvrnitost, antraknóza	Rašelina	Novozymes, Dánsko
HiStick	<i>B. subtilis</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Aspergillus</i>	Sója, podzemnice olejná	Becker Underwood, USA
Kodiak	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Aspergillus</i>	Bavlník, luštěniny, sója a zelenina	Bayer CropScience, USA
Larminar	<i>B. subtilis</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Botryodiplodia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Corticium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phytophthora</i>	Zelenina, ovocné stromy, okrasné rostliny, rýže a polní plodiny	Appliedchem, Thajsko
Rhapsody	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i>	Rašelina a okrasné rostliny, zelenina a ovoce pěstované ve skleníku	AgraQuest, USA
Serenade	<i>B. subtilis</i>	Rzi, padlí, <i>Botrytis</i> , <i>Sclerotinia</i>	Zelenina, vinná réva, ořechy a ovoce	AgraQuest, USA
Sonata	<i>B. pumilus</i>	Rzi, padlí	Zelenina a ovoce	AgraQuest, USA
Subtilex	<i>B. subtilis</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Aspergillus</i>	Polní plodiny a zelenina, okrasné rostliny	Becker Underwood, USA
Taegro	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>Rhizoctonia</i> , <i>Fusarium</i>	Sazenice stromů, okrasné rostliny a keře	Novozymes, DEU

1.3.2. Rod *Bacillus* jako ochrana před lidskými patogeny

Bakterie rodu *Bacillus* byly také testovány pro potlačování lidských patogenů (Torres et al., 2015; Meena et al., 2019), nabízí se zde možnost využívat jejich sekundární metabolity jako nová antibiotika. Bakterie rodu *Bacillus* potlačují růst jak bakteriálních infekcí, které bývají často rezistentní k běžně používaným antibiotikům (Meena et al., 2019; Medeot et al., 2020), tak organismů patřící mezi houby (Tabbene et al., 2015). Praktické využití těchto sekundárních metabolitů v budoucnu je pravděpodobné, neboť nebyly popsány žádné účinky bakteriálního kmene *B. amyloliquefaciens* (který produkuje, mimo jiné, surfaktin, fengycin a bacillibaktin) na střevní buňky (Lv et al., 2020), stejně tak tomu bylo i u účinků fengycinu na plicní fibroblasty, jejichž životaschopnost nebyla působením tohoto sekundárního metabolitu negativně ovlivněna (Medeot et al., 2020). U surfaktinu byla popsána pouze nízká toxicita pro savčí buňky (Meena et al., 2019).

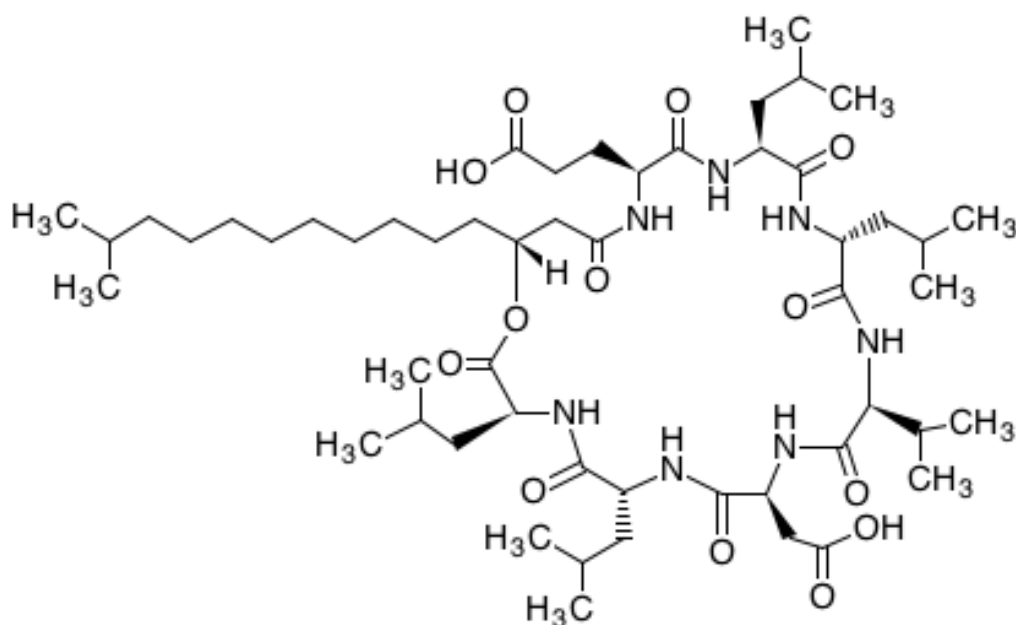
1.4. Sekundární metabolity produkované kmenem *B. amyloliquefaciens*

Bakteriální kmen *B. amyloliquefaciens* FZB42, jinak označován též *Bacillus velezensis* (Dunlap et al., 2016), produkuje několik sekundárních metabolitů, kterým je připisována antibiotická a antifungální aktivita. Tyto látky patří mezi neribozomálně syntetizované sloučeniny. Jsou to lipopeptidy surfaktin, bacillomycin D a fengycin (Koumoutsi et al., 2004) a siderofor bacillibaktin (Arguelles-Arias et al., 2009). Sekundární metabolity bakterií rodu *Bacillus* hrají důležitou roli v inhibici jiných mikroorganismů. Bylo také pozorováno, že geny účastníci se syntézy těchto sekundárních metabolitů jsou aktivovány v různé míře podle toho, s jakým mikroorganismem se buňky setkávají. Je pravděpodobné, že bakterie dokáže rozpoznat konkurenční organismy, a podle toho cíleně aktivovat syntézu dalších antifungálních nebo antibiotických látek (Li et al., 2014).

1.4.1. Surfaktin

Surfaktin je povrchově aktivní molekula, produkovaná bakteriemi rodu *Bacillus* (Arima et al., 1968). Struktura surfaktinu (Obr. 2) byla poprvé popsána v roce 1969 (Kakinuma et al., 1969). Molekula surfaktinu je tvořena oligopeptidovým kruhem, který je tvořen sedmi aminokyselinami s postranním řetězcem tvořeným 3-hydroxy mastnými kyselinami (Obr. 2) (Hoffmann et al., 2021). Surfaktin hraje důležitou úlohu v quorum sensing systému při tvorbě biofilmu. Působení surfaktinu způsobuje únik iontů draslíku, které aktivují membránovou

proteinovou kinázu KinC, která řídí expresi genů podílejících se na tvorbě biofilmu (López et al., 2009). Surfaktin také napomáhá buňkám při pohybu po povrchu kultivačního média (Kinsinger et al., 2003). Antimikrobiální aktivita surfaktinu spočívá v tom, že má schopnost interagovat s acylovými řetězci membránových fosfolipidů, a tím dochází k rozrušování membrány (Maget-Dana a Ptak, 1995; Heerklotz et al., 2004). Surfaktin má negativní vliv na tvorbu biofilmu u ostatních organismů (Meena et al., 2019). Je schopný usmrtit savčí buňky, neboť u něho byla popsána hemolytická aktivita (Morán et al., 2002).



Obr. 2: Strukturální vzorec surfaktinu. (Převzato z: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C12043).

Surfaktin hraje důležitou roli při potlačování rostlinných patogenů a jejich cílené biologické kontrole. Kmen *B. amyloliquefaciens* FZB42 potlačuje houbovou kulturu *Rhizoctonia solani*, která způsobuje hnilobu salátu. Při tomto pokusu výrazně rostla hladina produkovaného surfaktinu v čase (Chowdhury et al., 2015). *Bacillus subtilis* vytvářel biofilm na kořenech a měl významné biokontrolní účinky proti bakteriálnímu patogenu *Pseudomonas syringae*, která je původcem bakteriální infekce na rostlinách rajčete. Inhibiční účinky *B. subtilis* byly závislé na produkci surfaktinu. Tyto obranné mechanismy brání kolonizaci kořenů jinými mikroorganismy (Bais et al., 2004). Surfaktin je dále odpovědný za fungicidní působení na houby rodu *Fusarium* (Snook et al., 2009), *Trichoderma* (Sarwar et al., 2018) a značně inhibuje růst dvou významných houbových patogenů *Aspergillus flavus* a *Colletotrichum gloeosporioides* (Mohammadipour et al., 2009). Surfaktin v kombinaci

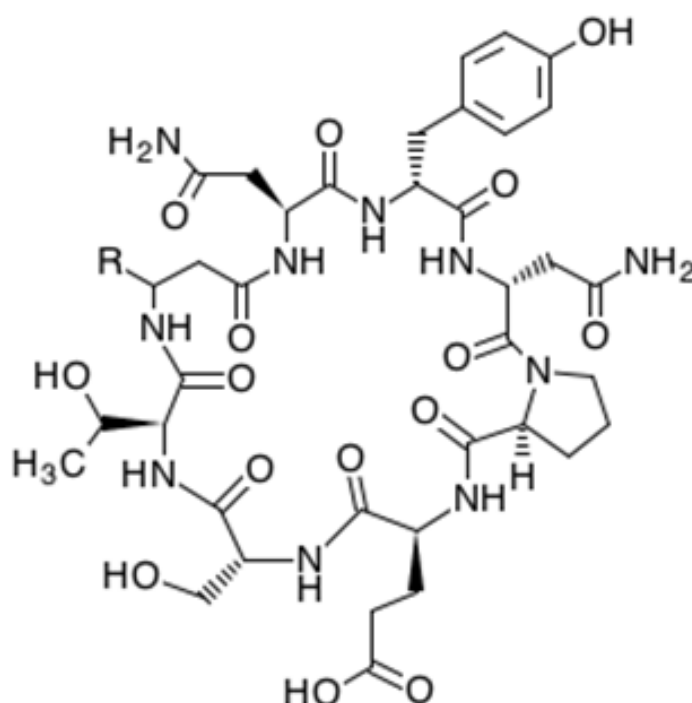
s bacillomycinem je zodpovědný za antagonistickou aktivitu potlačující růst houby *R. solani*, která je původcem onemocnění listů rýže (Luo et al., 2015). Vedle toho surfaktin zvyšuje účinky dalšího lipopeptidu produkovaného bakteriemi rodu *Bacillus* - mykosubtilinu. Jejich kombinace potlačuje obligátního patogena rostlin salátu *Bremia lactucae*. Experimentální studie (Deravel et al., 2014) demonstruje, že surfaktin ovlivňuje také oomycety, eukaryotické organismy podobné houbám. Účinek surfaktinu byl studován i na lidské patogeny a bylo dokázáno, že surfaktin dokáže potlačovat růst bakterií jako jsou např. *Listeria monocytogenes* (původce listeriózy), *Bacillus cereus* (původce enterogastrických onemocnění) (Torres et al., 2015), *Klebsiella pneumoniae* (původce uroinfekcí a pneumonie), *Salmonella typhimurium* (původce břišního tyfu) nebo *Staphylococcus aureus* (původce infekcí a septického šoku) (Meena et al., 2019). Vedle výše zmíněných účinků, surfaktin vykazuje i cytotoxický účinek na savčí nádorové buňky s nižší toxicitou ke zdravým buňkám (Meena et al., 2019). Surfaktin se řadí i mezi sloučeniny, které dokáží podporovat růst rostlin. Rostliny, na které byl aplikován, vykazovaly zvýšenou produkci (Sarwar et al., 2018), což může být způsobeno tím, že surfaktin indukuje v rostlinách systémovou rezistenci (Chowdhury et al., 2015).

1.4.2. Bacillomycin

Struktura bacillomycinu D (Obr. 3) byla popsána roku 1981 (Peypoux et al., 1981). Molekula bacillomycinu D je tvořena cyklickými heptapeptidy, které jsou spojené s řetězcem β -mastných kyselin s délkou řetězce 14 až 17 uhlíků (Vairagkar a Mirza, 2021). Inhibiční aktivita bacillomycinu byla popsána již v roce 1947, kdy bylo zjištěno, že disponuje silnou antifungální aktivitou (Landy et al., 1947). Produkce bacillomycinu je zásadní pro tvorbu biofilmu u kmene *B. amyloliquefaciens*, a to stimulací genů zodpovídající za syntézu biofilmu, včetně kinázy KinC (Xu et al., 2013).

Bacillomycin má silné antifungální účinky, mimo jiné, i proti některým oportunním lidským patogenům (Gong et al., 2014). Mechanismus účinku bacillomycinu jako antimikrobiálního činidla je založen na poškození buněčné membrány eukaryotických organismů (Rajaofera et al., 2020; Wu et al., 2020), což je pravděpodobně způsobeno změnou v permeabilitě buněčné membrány, ke které dochází prostřednictvím interakce bacillomycinu D a membránového ergosterolu. Bacillomycin může být tedy označován za povrchově aktivní molekulu (Wu et al., 2020). Bacillomycin izolovaný z kmene

B. amyloliquefaciens vykazoval antibakteriální aktivitu proti lidskému patogenu *Burkholderia pseudomallei* (původce melioidozy) (Rajaofera et al., 2020) a také silnou fungicidní aktivitu proti fytopatogenním houbám: *C. gloeosporoides* (Jin et al., 2018), *Fusarium oxysporum* (Xu et al., 2013) nebo kvasince *Mallassezia globosa* (Wu et al., 2020), která je oportunní lidský patogen. Bacillomycin způsobuje u kmene *A. flavus* zastavení růstu mycelia, tvorbu a klíčení spor, dále narušuje buněčnou stěnu, membrány a orgány hub (Gong et al., 2014). U bacillomycinu byla potvrzena pouze nízká toxicita pro vodní organismy, což zvyšuje jeho potenciál v praktickém využití jako antibiotika (Jin et al., 2018).

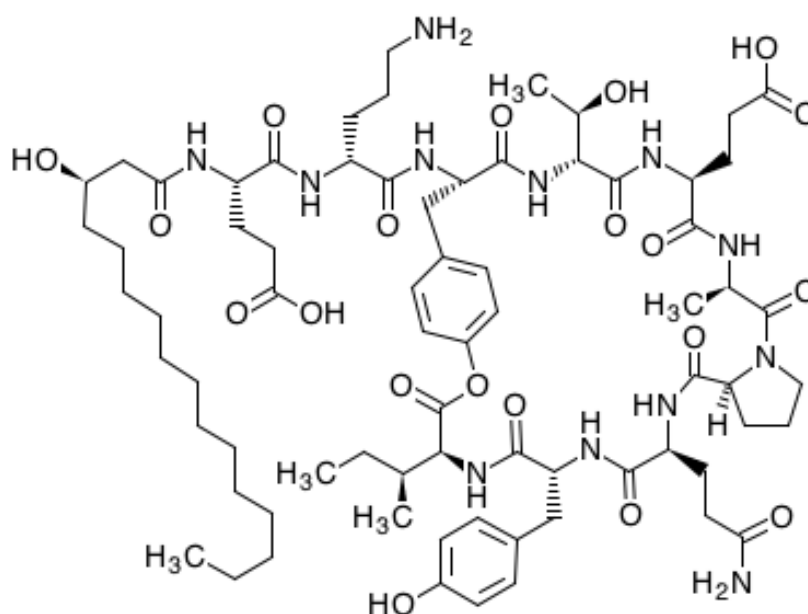


Obr. 3: Strukturální vzorec bacillomycinu D. R = mastná kyselina.
(Převzato z: <https://www.genome.jp/entry/C12267>).

1.4.3. Fengycin

Molekula fengycinu je tvořena dekapeptidem s laktonovým kruhem s β -hydroxy mastnou kyselinou v postranním řetězci o délce 14 až 18 atomů uhlíku (Obr. 4) (Vairagkar a Mirza, 2021). Fengycin byl poprvé popsán v roce 1986 jako látka s antifungálními a antimikrobiálními účinky (Vanittanakom et al., 1986). Podstatou antimikrobiálního účinku je změna integrity biologických membrán tím, že fengycin interaguje s membránovými fosfolipidy a při vyšších koncentracích způsobuje přímo destrukci membrány (Deleu

et al., 2005). U houbových kultur fengycin způsobuje morfologické změny mycelia, vykazuje slabší hemolytickou aktivitu (Vanittanakom et al., 1986) a poškozuje buněčnou stěnu prostřednictvím interakce s jejími hydrofobními částmi. Zvýšením hladiny kyslíkových radikálů způsobuje poškození buněčných organel (Liu et al., 2019). Jeho antifungální aktivita vede k inhibici růstu mikroorganismů např. *Pyricularia oryzae*, *Conidiobolus coronatus*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Rhizomucor miehei*, *Alternaria kikuchiana* a *R. solani* (Vanittanakom et al., 1986), *Botrytis circinea* (Touré et al., 2004), *Candida albicans* (Liu et al., 2019) nebo *Mycosphaerella fijiensis* (González-Jaramillo et al., 2017), potlačuje růst mycelií a klíčení spor a také může mít schopnost inhibovat biosyntézu houbových mykotoxinů (Hanif et al., 2019). Na druhou stranu, fengycin produkovaný kmenem *B. amyloliquefaciens* má také baktericidní účinky, a to na bakterie rodu *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas aeruginosa* a *L. monocytogenes*, u kterých fengycin způsobil lýzi buněk (Torres et al., 2015; Medeot et al., 2020).



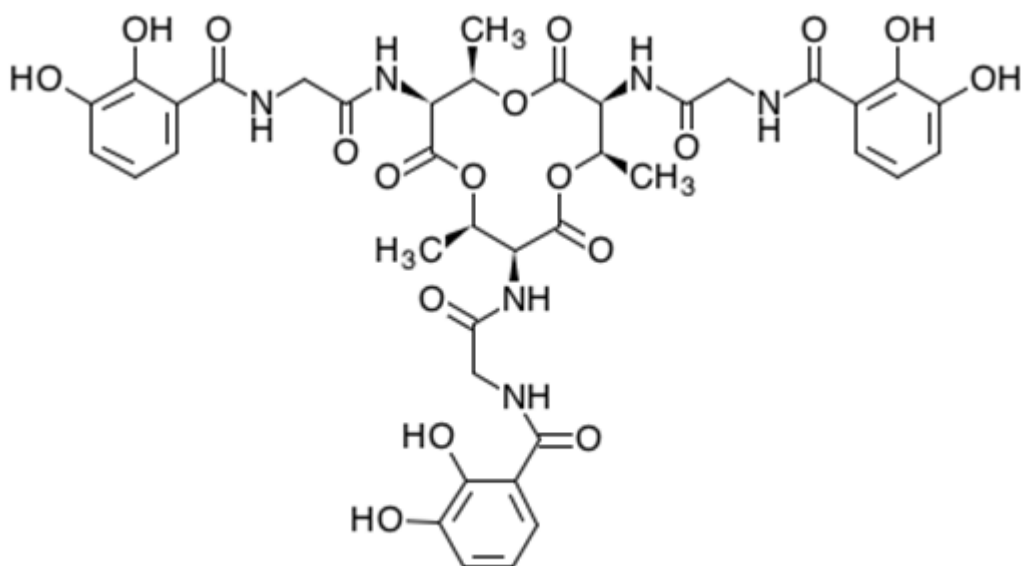
Obr. 4: Strukturální vzorec fengycinu.

(Převzato z: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd_ja:C12042).

1.4.4. Bacillibaktin

O bacillibaktinu se poprvé zmínil May v roce 2001 (May et al., 2001) jako o sekundárním metabolitu produkovaném kmenem *B. subtilis*. Bacillibaktin patří mezi siderofory katecholátového typu, které jsou schopné chelátovat ze svého okolí ionty železa a přenášet je přes membránu (May et al., 2001). Inhibiční efekt bacillibaktinu spočívá tedy v chelataci

iontů železa, a tím způsobeného potlačení růstu ostatních mikroorganismů díky zamezení přístupu k železu (Miethke a Marahiel, 2007). Jeho struktura je velmi podobná struktuře sideroforu enterobaktinu produkovaného bakterií *Escherichia coli* (May et al., 2001). Struktura bacillibaktinu je tvořena cyklickým esterovým jádrem se třemi threoniny. Na každý threonin je přes glycin navázána dihydroxybenzoová kyselina (Obr. 5) (Dunlap et al., 2013). Bacillibaktin je stejně jako ostatní výše zmíněné metabolity produkován neribozomálně (May et al., 2001). Bacillibaktin hraje výraznou úlohu při inhibici fytopatogenních hub, jako jsou *Verticillium dahliae*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* (Li et al., 2014), *R. solani* a *A. flavus* (Dimopoulou et al., 2021). Vedle antifungálního účinku má bacillibaktin také antibakteriální aktivitu, neboť potlačuje růst kmene *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Dimopoulou et al., 2021).



Obr. 5: Strukturální vzorec bacillibaktinu. (Převzato z: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?C12219).

1.5. Stimulace růstu rostlin prostřednictvím mikroorganismů

1.5.1. Indukovaná systémová rezistence

Využívání bakteriálních kultur při pěstování rostlin není založeno pouze na jejich přímé ochraně, ale také může způsobovat nepřímou ochranu rostlin proti patogenům prostřednictvím stimulace rostlinné imunity. Některé bakterie totiž disponují schopností vyvolávat u rostlin tzv. „indukovanou systémovou rezistenci“ (ISR). Při indukované systémové rezistenci je podporováno posílení přirozené imunitní reakce rostliny proti vzniku onemocnění prostřednictvím jiného činitele např. nepatogenním mikroorganismem

(Kloepper et al., 1992). Tento efekt vyvolávají rhizobakterie u rostlin po kolonizaci kořenů. Mezi bakterie mající schopnost indukovat systémovou rezistenci rostlin patří např.: *Pseudomonas fluorescens* (Hoffland et al., 1996), *B. amyloliquefaciens* (Kang et al., 2015), *B. cereus* (Huang et al., 2012) nebo *Micromonospora spp.* (Martínez-Hidalgo et al., 2015). Indukovanou systémovou rezistenci pravděpodobně podporují také lipopeptidy produkované rhizobakteriemi. Mezi lipopeptidy, které mají schopnost aktivovat v rostlinách ISR patří surfaktin a fengycin (Ongena et al., 2007).

1.5.2. Rhizobakterie podporující růst rostlin

Využívání mikroorganismů v zemědělství není založeno pouze na ochraně rostlin proti škůdcům a patogenům. Některé bakteriální kmeny fungují jako tzv. biofertilizátory. Takové kmeny, které mají schopnost podporovat růst rostlin a zlepšovat tak jejich kondici, jsou označovány jako „rhizobakterie podporující růst rostlin“ (PGPR) (Kloepper et al., 1980b). PGPR mohou výrazně podporovat růst rostlin prostřednictvím produkce fytohormonů (Müller et al., 1989), zvýšením dostupnosti minerálních živin (de Freitas et al., 1997; Barriuso et al., 2005) nebo produkcí sideroforů (Kloepper et al., 1980a). Rhizobakterie, které významně podporují růst rostlin jsou např.: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomycetales*, *Cellovibrio* nebo *Rhizobium* (Anderson a Habiger, 2012). Bakteriální kmen *B. amyloliquefaciens* je jedním z neúčinnějších biofertilizátorů. Kmen *B. amyloliquefaciens* FZB42 produkuje rostlinný fytohormon kyselinu indol-3-octovou (Idris et al., 2004), jejíž výtěžek stoupá v přítomnosti aminokyseliny tryptofanu (Idris et al., 2007). Navíc tento bakteriální kmen dokáže zvýšit zemědělskou produkci o 30-75 % v závislosti na koncentraci dusíku použitého jako hnojiva (El Hussein et al., 2012).

2. Cíle práce

Cíle této diplomové práce s názvem „Inhibiční účinky kmene *B. velezensis* na rostlinné patogeny rodu *Xanthomonas*“ jsou následující:

- Ověřit hypotézu, že bakteriální kmen *Bacillus velezensis* FZB42 působí antagonisticky na fytopatogenní bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* kmene 1279 a SU a popsat probíhající interakci.
- Optimalizovat kultivační podmínky jednotlivých kmenů i směsných kultur *B. velezensis* a *X. campestris* pv. *campestris* SU nebo *X. campestris* pv. *campestris* 1279 (složení média, fyzikální podmínky, růstové parametry).
- Popsat účinky antagonistického mikroorganismu (*B. velezensis*) na vybrané rostlinné patogeny (*X. campestris* pv. *campestris* SU a 1279) na pevném médiu pomocí obdoby diskové difúzní metody.
- Optimalizovat počáteční koncentraci buněk kmenů *B. velezensis* a *X. campestris* pv. *campestris* SU při vstupu do vzájemných interakcí. Ve směsných kulturách sledovat počet životaschopných buněk kultur a koncentraci zdroje C.
- Stanovit sekundární metabolity produkované kmenem *B. velezensis* pomocí LC-MS analýzy v třepaných monokulturách a duálních kulturách.
- Studovat morfologické změny na buňkách směsných kultur při vzájemné interakci pomocí SEM.

3. Materiál

3.1. Použité chemikálie

Tab. 2: Použité chemikálie

Aceton	J. T. Baker	USA
Acetonitril (LC-MS grade)	VWR	ČR
Agar	Difco	USA
CaCl ₂ . 7 H ₂ O	Lachema	ČR
D-glukosa . H ₂ O	Lachema	ČR
D-xylosa	Lachema	ČR
Ethanol	J.T. Baker	USA
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	Lachema	ČR
Glutaraldehyd	Serva	Německo
Glycerol	VWR	ČR
HCl	Lachema	ČR
K ₂ HPO ₃	Merck	Německo
KH ₂ PO ₄	Lachner	ČR
Kit EcoPLATE	BioLog	USA
Kit „GLUKOSA GOD 1500“	Biolatest	ČR
KOH	Lachema	ČR
Kvasničný autolyzát (Yeast extract)	Oxoid	USA
Kyselina mravenčí (LC-MS grade)	Thermo Fisher Scientific	USA
mCS20ABN médium	Duchefa	Nizozemsko
Methanol	VWR	ČR
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	Lachner	ČR
MilliQ H ₂ O	Watrex	ČR
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	Lachema	ČR
NaCl	Lachner	ČR
NaH ₂ PO ₄ . 2 H ₂ O	Lachema	ČR
NaOH	Lachner	ČR
NH ₄ Cl	Lachema	ČR
OsO ₄	Degussa	Německo
Pepton	Oxoid	USA
poly-L-lysin	Sigma-Aldrich	USA
Pyruvát	Lachema	ČR
Surfaktin	Sigma-Aldrich	ČR
Trihydrát kakodylanu sodného C ₂ H ₁₂ AsNaO ₅ . 3 H ₂ O	Alfa Aesar	Německo
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Lachner	ČR
Trypton	Oxoid	USA
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	Lachema	ČR
Žlučová sůl No. 3	Difco	USA

3.2. Složení kultivačních médií

Média byla připravena rozpuštěním daného množství látky v 1000 ml destilované H₂O a následně sterilizována autoklávováním po dobu 30 min při teplotě 121 °C. Pro vytvoření pevné půdy bylo přidáno do 1000 ml tekutého média 20,00 g agaru.

3.2.1. LB médium (Luria-Bertani)

NaCl	9,00 g
Yeast extract	5,00 g
Trypton	10,00 g
pH 7,2 – 7,4 (úprava pomocí NaOH)	

3.2.2. M9 médium

NaCl	0,50 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	14,62 g
KH ₂ PO ₄	3,00 g
NH ₄ Cl	1,00 g
pH 7,2 - 7,4 (úprava pomocí NaOH)	

Minimální médium M9 bylo doplněno různými stopovými prvky a zdroji uhlíku dle kapitoly 3.3.1. a 3.3.2.

3.2.3. Selekční médium (mCS20ABN)

Selekční médium (mCS20ABN) bylo připraveno ze směsi (Duchefa) dle návodu od výrobce a doplněno žlučovou solí (mCS20ABN+BS) působící jako selekční marker inhibující růst Gram pozitivních bakterií. Složení směsi bylo následující:

Rozpustný škrob	25,00 g
Sójový pepton	2,00 g
Trypton	2,00 g
KH ₂ PO ₄	2,80 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,80 g

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1952 g
L-glutamin	6,00 g
L-histidin	1,00 g
Glukosa . H ₂ O	1,00 g
Žlučová sůl No.3	0,50 g
pH 6,5	

3.3. Pufry a zásobní roztoky

3.3.1. Zásobní roztoky stopových prvků (TE)

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním daného množství látky ve 100 ml destilované H₂O. Roztoky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 30 min při teplotě 121 °C.

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	2,00 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,50 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,15 g

Po sterilizaci byly do minimálního média M9 přidány stopové prvky ze zásobních roztoků v následujících finálních koncentracích (M9TE):

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,20 g /l
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,01 g/l
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0015 g/l

3.3.2. Zásobní roztoky zdrojů uhlíku

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním daného množství látky ve 100 ml destilované H₂O. Roztoky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 30 min při teplotě 121 °C.

D-glukosa	20,00 g
D-xylosa	20,00 g
Pyruvát	20,00 g

Po sterilizaci byly do minimálního média M9TE přidány zdroje uhlíku ze zásobních roztoků v následujících finálních koncentracích:

D-glukosa	10,00 g /l	(M9TEGlu)
D-xylosa	10,00 g/l	(M9TEXyl)
Pyruvát	10,00 g/l	(M9TEPyr)

3.3.3. Kakodylátový pufr

$C_2H_{12}AsNaO_5 \cdot 3 H_2O$	0,2 M
HCl	0,2 M
pH 7,4	

3.3.4. Glutaraldehyd 25% roztok

Glutaraldehyd	25 ml
H ₂ O	100 ml

3.3.5. TRIS-HCl

Tris-HCl	10 mM
pH 8,5	

3.3.6. Fyziologický roztok

NaCl	9,00 g/l
------	----------

3.3.7. Tris/glycerol roztok

Glycerol	400,00 g/l H ₂ O
TRIS-HCl	25 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 M
pH 7,5	

3.3.8. Enzymatický roztok pro stanovení glukosy

Pracovní roztok pro stanovení koncentrace glukosy (Biolatest) obsahoval následující složky, které byly použity dle návodu výrobce:

Fosforečnanový pufr, pH 8,0	140 mmol/l
-----------------------------	------------

Glukosaoxidas	≥ 166 μkat/l
Peroxidas	≥ 16 μkat/l
3-Methylfenol	10 mmol/l
4-Aminoantipyrin	1 mmol/l

3.3.9. Mobilní fáze pro HPLC

Mobilní fáze A:

Kyselina mravenčí	0,1 % (1 ml)
Acetonitril	1 % (10 ml)
Rozpuštěno v Milli Q H ₂ O 1000 ml	

Mobilní fáze B:

Kyselina mravenčí	0,1 % (1 ml)
Milli Q H ₂ O	5 % (50 ml)
Rozpuštěno ve 1000 ml acetonitrilu	

3.3.10. Pufrovaný 3% fixační roztok glutaraldehydu

0,1 M kakodylátový pufr	22 ml
25% roztok glutaraldehydu	3 ml

3.3.11. Postfixační roztok

OsO ₄	1 % (1 ml)
Rozpuštěno v redestilované H ₂ O (100 ml)	

3.4. Použité přístroje

Tab. 3: použité přístroje

Centrifuga 5403	Eppendorf	Německo
Flowbox BIO 96	Labox	ČR
Hmotnostní spektrometr Solarix 12T FT-ICR	Bruker Daltonik	Německo
ImageJ, software k měření velikosti buněk	LOCi	USA
Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 HPLC	Thermo Fisher Scientific	USA
Lyofilizátor Lyovac GT2	Leybold	Německo
Míchačka RH basic 2	IKA	Německo
Mikrodestičkový spektrofotometr SpectraMax 340PC 384	Molecular devices	USA
Napašovačka kovů pro SEM Quorum Q150T ES	Quorum	Velká Británie
pH metr 340	WTW	Německo
Přístroj pro sušení metodou kritického bodu (Critical point dryer) Quorum K850	Quorum	Velká Británie
Rastrovací elektronový mikroskop FEI Nova NanoSEM 450	FEI Brno	ČR
Separáční kolona HSS T3 C18 (1.8 μm , 1.0 \times 150 mm)	Waters Corporation	Velká Británie
Sušička HS122A	BMT	ČR
Termostat KBC – 25W	WAMED	Polsko
Termostatovaný inkubátor	Gallenkamp	Velká Británie
Třepačka policová	Kühner	Švýcarsko
UV/VIS spektrofotometr UV-1601	SHIMADZU	Japonsko
Váhy AJ-2200CE	VIBRA	Japonsko
Vakuová odstředivka Savant SpeedVac	Thermo Scientific	USA
Vortex genius 3	IKA	Německo

4. Metody

4.1. Použité kmeny

Kmeny *Bacillus velezensis* FZB42 (DSM 23117), dříve označovaný jako *B. amyloliquefaciens* (Dunlap et al., 2016) a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) kmen 1279 byly získány ze sbírky mikroorganismů German collection of Microorganisms (DSMZ, Leibniz Institute, Německo) a sbírky The National Collection of Type Cultures (NCTC, University of Warwick, Velká Británie). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) kmen SU byl izolován v Laboratoři strukturní a molekulární charakterizace, MBÚ AV ČR, v.v.i. z napadených rostlin zelí v lokalitě severní Čechy (GPS souřadnice: 50.5872317 s. š., 15.0433481 v. d.).

4.2. Sterilizace médií, laboratorních pomůcek a nádobí

Média a roztoky byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 20 min, laboratorní pomůcky a nádobí bylo ošetřeno suchou sterilizací při 100 °C po dobu 9 h.

4.3. Příprava glycerinové konzervy

Pracovní konzerva sloužící k dlouhodobému uchování bakteriálních kultur byla připravena následovně: z bakteriální kultury rostoucí ve 100 ml tekutého LB média 24 h při 28 °C, vzdušněno na třepačce při 199 rpm, bylo odebráno 600 µl kultury a následně důkladně promícháno v 600 µl roztoku Tris/glycerolu a uloženo do mrazicího boxu při teplotě -80 °C.

4.4. Příprava inokula a kultivace v tekutém médiu

- **jednostupňové inokulum** – Z pracovní konzervy, uložené v mrazicím boxu při teplotě -80 °C, bylo sterilní bakteriologickou kličkou přeneseno cca 10 µl bakteriální kultury na pevné LB médium. Po nárůstu kolonií (48 h, 28 °C) byla jedna bakteriální kolonie přenesena do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml tekutého LB média. Kultura byla kultivována 24 h při 28 °C se vzdušněním na třepačce při 199 rpm.
- **dvoustupňové inokulum** – Kultura narostlá v tekutém LB médiu byla použita pro inokulaci minimálního média M9TE obohaceného o zdroj uhlíku. Nejprve byla kultura z LB centrifugována v 50 ml Falcon zkumavce (8 000 x g, 4 °C, 15 min), supernatant byl odstraněn a buňky byly promyty sterilním M9 médiem. Promyté buňky získané po centrifugaci byly následně resuspendovány ve sterilním M9 médiu do původního

objemu a použity pro 1% zaočkování minimálního média. Kultura byla kultivována 48 h při 28 °C se vzdušnáním na třepačce při 199 rpm.

4.5. Biochemická charakterizace

Pro biochemickou charakterizaci bakteriálních kmenů *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* byla použita suspenze buněk připravená jako dvoustupňové inokulum (kapitola 4.4.). Pro promytí a přípravu finální suspenze buněk byl použit fyziologický roztok. 120 µl suspenze takto připraveného inokula bylo převedeno pomocí multikanálové pipety do každé jamky komerčního kitu EcoPLATE (BioLOG) obsahujícího 31 různých zdrojů uhlíku a vodu, jako kontrolní vzorek (ve třech paralelách). Kultivační mikrodestičky byly uloženy do kultivačního boxu při 28 °C po dobu 5 dnů. Vývoj barvy v destičce byl měřen jako nárůst absorbance při 590 nm ve 24h intervalech po dobu 5 dnů pomocí mikrodestičkového spektrofotometru.

4.6. Kultivace bakteriálních kmenů na vybraných zdrojích C

Připraveným dvoustupňovým inokulem bakteriálních kmenů (*Xcc* SU, *Xcc* 1279 nebo *B. velezensis*) bylo 1% zaočkováno 100 ml minimálního média M9 obohaceného o D-glukosu, pyruvát, nebo D-xylosu a stopové prvky (dle kapitol 3.3.1. a 3.3.2.). Kultury byly kultivovány v 500 ml baňce, 72 h při teplotě 28 °C na orbitální třepačce při 199 rpm. Každá kultivace na jednotlivých médiích probíhala vždy ve třech paralelách. V pravidelných intervalech byla měřena koncentrace biomasy (optická densita při vlnové délce 600 nm).

4.7. Diskový difúzní test

Kultury kmene *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* kultivované v LB médiu (24 h, 199 rpm, 28 °C) byly dle ředící řady připraveny v příslušném ředění a použity pro inokulaci pevného média M9TEGlu. Pro každou *Xcc* kulturu byla připravena samostatná Petriho miska s pevným médiem, na kterou bylo přeneseno pomocí pipety 100 µl 1000 x zředěné kultury *Xcc* SU nebo *Xcc* 1279, která byla důkladně rozetřena po celé ploše pomocí mikrobiologické hokejky. Do středu misek s příslušnou *Xcc* kulturou bylo přeneseno 10 µl 1000 x zředěné kultury *B. velezensis*. Jako kontrolní vzorky byly použity pouze samotné 1000 x zředěné kultury *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* nanesené na M9TEGlu agarové misky (100 µl). Kultivace probíhaly při teplotě 28 °C po dobu 72 h. Všechny experimenty byly provedeny ve dvou paralelách.

4.8. Duální kultivace v minimálním médiu

Baňky (500 ml) se 100 ml M9TEGlu média byly zaočkovány dvoustupňovým inokulem ve výsledném 2% objemu dle kapitoly 4.4. Pro kultivaci směsné kultury byly použity rozdílné počáteční koncentrace obou kultur. Duální kultura byla připravena smícháním inokulační kultury kmene *B. velezensis* a *Xcc* SU ve třech různých poměrech 1:3, 1:15 a 1:100. Jednotlivé poměry kultur byly vypočítány na základě naměřených hodnot CFU z exponenciální fáze růstu v tekutém médiu M9TEGlu. Jako kontroly byly použity monokultury kmenů *Xcc* SU a *B. velezensis*. V pravidelných časových intervalech byla u monokultur měřena koncentrace biomasy (OD při vlnové délce 600 nm). V duálních kultivacích byly jednotlivé kultury sledovány pomocí hodnot CFU kultivací na pevném mediu (LB nebo mCS20ABN). Kultura kmene *Xcc* SU byla detekována ve směsné kultuře pomocí selekčního média mCS20ABN obohaceného o žlučovou sůl sloužící jako selekční marker (mCS20ABN+BS). Kultivace probíhala ve dvou paralelách při 28 °C na orbitální třepačce při 199 rpm po dobu 72 h.

4.9. Stanovení suché hmotnosti buněk

Bakteriální kultury v objemu 2 ml byly stočeny na centrifuze (8000 x g, 4 °C, 5 min), supernatant byl oddělen od peletu buněk. Pelet byl resuspendován v destilované vodě (2 ml) a následně znovu centrifugován za stejných podmínek. Poté byl znovu odstraněn supernatant a pelet doplněn destilovanou vodou do původního objemu (2 ml). Suspenze byla důkladně promíchána a 1 ml suspenze byl převeden do předem zvážených hliníkových váženek. Váženky byly uloženy do sušárny při teplotě 120 °C po dobu 1 h. Hliníkové misky byly zváženy a poté znovu uloženy do sušárny na dalších 15 min, vážení bylo zopakováno do konstantní hmotnosti. Suchá hmotnost buněk v 1 ml byla vypočtena z rozdílu hmotnosti hliníkové misky s buněčnou suspenzí a hmotnosti prázdné misky.

4.10. Stanovení zbytkové koncentrace glukosy

Zbytková koncentrace glukosy byla měřena pomocí komerčního kitu „GLUKOSA GOD 1500“ (Biolatest®). V průběhu duální kultivace byly v pravidelných časových intervalech (0., 24., 32., 48. a 72. h) odebírány vzorky narostlé kultury. Kultury byly stočeny na centrifuze (8000 x g, 5 min, 4 °C) a pro stanovení zbytkové koncentrace glukosy byl použit 50 x ředěný supernatant v H₂O. Ke 20 µl vzorku supernatantu byly přidány 2 ml enzymatického

pracovního roztoku. Kontrolní vzorek byl připraven smícháním 20 μ l destilované H₂O a 2 ml pracovního enzymatického roztoku. Pro vytvoření kalibrační křivky byl připraven roztok glukosy v koncentracích: 1, 2, 4, 6, 8 a 10 mmol/l. Vzorky byly inkubovány 15 min při 37 °C. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 498 nm s použitím kontrolního vzorku jako blanku.

Koncentrace glukosy v médiu byla stanovena podle vzorce:

$$c_{\text{glu}} = A_{498} / f \cdot \text{ředění vzorku}$$

kde: $c_{\text{(glu)}}$ koncentrace glukosy (mmol/l)

f směrnice grafu kalibrační přímky pro koncentraci glukosy

$A_{(489)}$ naměřená absorbance

4.11. Stanovení koncentrace živých buněk

Pro výpočet koncentrace živých buněk byla použita desítková ředící řada. Do Eppendorf mikrozkušavky bylo napipetováno 900 μ l sterilního fyziologického roztoku a 100 μ l bakteriální kultury. Po důkladném promíchání suspenze na vortexu bylo 100 μ l této suspenze převedeno do následující Eppendorf zkumavky s 900 μ l fyziologického roztoku a opět důkladně rozmícháno na vortexu, inokulum bylo tedy 100 x zředěno. Tento postup byl opakován až do dosažení požadovaného zředění kultury. Z vybraného ředění bylo sterilně přeneseno 100 μ l suspenze na pevné LB médium (pro kmen *B. velezensis*), nebo na selekční médium mCS20ABN+BS (pro kmen *Xcc* 1279 nebo SU) a důkladně rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou. Misky byly inkubovány v termostátovaném inkubátoru při 28 °C po dobu 72 h. Množství životaschopných buněk (CFU v 1 ml) bylo získáno jako součin počtu kolonií vyrostlých na misce, hodnoty ředění a objemu kultury naneseného na pevné médium.

4.12. LC-MS analýza

4.12.1. Příprava vzorků pro LC-MS analýzu

V průběhu kultivací byly odebírány vzorky (3 ml) z duálních kultur a monokultur kmene *B. velezensis* v pravidelných časových intervalech kultivace (0., 6., 12., 24., 33., 48. h). Kultura byla centrifugována (8 000 rpm, 10 min, 4 °C), 3 ml supernatantu byly přelity do sterilní plastové zkumavky a uloženy do mrazicího boxu do -80 °C. Takto připravený vzorek byl

následně lyofilizován 72 h ve vakuovém lyofilizátoru Lyovac. Z každého vzorku bylo naváženo 10 mg lyofilizátu, který byl rozpuštěn v 50% acetonitrilu na výslednou koncentraci 1 mg/ml. 100 μ l této suspenze bylo smícháno se 400 μ l methanolu a následně byl vzorek uložen do mrazicího boxu (30 min, -80 °C). Následovala centrifugace (14 000 rpm, 10 min, 4 °C), odpipetování supernatantu a jeho vysušení ve vakuové odstředivce při 35 °C po dobu 2 h. Vzorky byly následně rozpuštěny ve 100 μ l 50% acetonitrilu.

4.12.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) – Detekce metabolitů

Vlastní hmotnostně spektrometrické měření sekundárních metabolitů bacillibaktinu, bacillomycinu, surfaktinu a fengycinu probíhalo ve spolupráci s týmem specialistů v Laboratoři charakterizace molekulární struktury AVČR. Kvalitativní analýza sekundárních metabolitů byla sledována systémem Dionex UltiMate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) s detekcí hmotnostním spektrometrem Solarix 12T FT-ICR (Bruker Daltonik, Bremen, Německo). Byla použita separační kolona HSS T3 C18 (1.8 μ m, 1.0 \times 150 mm, Waters Corporation, Manchester, Velká Británie). Separace probíhala pomocí mobilní fáze A a B (viz kapitola 3.3.9.) při průtoku 50 μ l/min, program gradientové eluce byl nastaven na: 0 min (2 % B); 2 min (2 % B); 9 min (60 % B); 11 min (99 % B); 14 min (99 % B); 14.5 min (2 % B); 20 min (2 % B). Vzorky byly měřeny v triplicátech, pro analýzu byly injikovány 2 μ l vzorku. Teplota kolony v průběhu analýzy byla 40 °C. Detekce analytů byla prováděna v módu pozitivních iontů v hmotnostním rozsahu 500-1600 m/z s externí hmotnostní kalibrací.

4.13. Příprava vzorků pro SEM

V průběhu duální kultivace bylo odebíráno 800 μ l kultury, ke kterým bylo přidáno 800 μ l fixačního roztoku. Odběry probíhaly v časech kultivace: 0.; 12.; 24.; 28.; 33. a 48. h. Vzorky byly promíchány a do dalšího zpracování byly uchovávány ve 4 °C. Vzorky byly centrifugovány (14 300 \times g, 5 min, 25 °C) a pelet byl rozmíchán v 500 μ l 3% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru a uložen přes noc ve 4 °C. Uložení filtračního papíru nasáklého destilovanou vodou do skleněné Petriho misky byla vytvořena vlhká komůrka, do níž byla umístěna kruhová krycí sklíčka o průměru 12 mm. Na každé sklíčko bylo nanášeno 300 μ l roztoku poly-L-lysinu filtrovaného přes filtr Millipore, velikost pórů 0,2 μ m. Vlhká komůrka

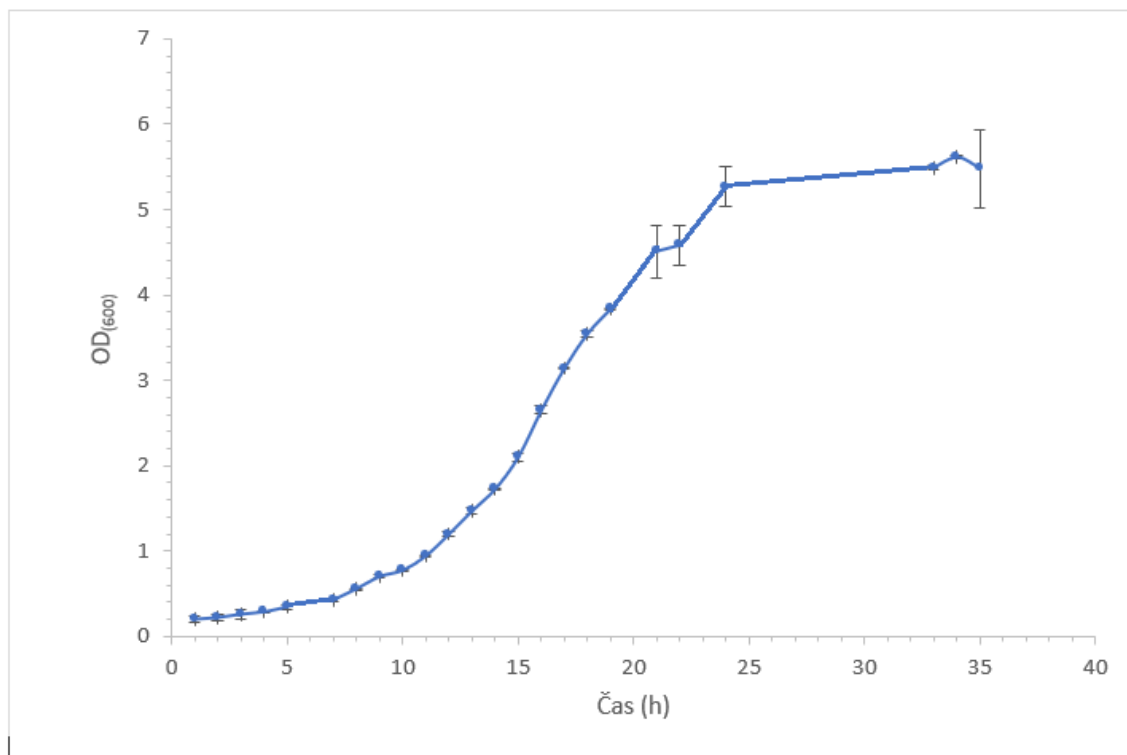
byla umístěna přes noc do 4 °C. Poté byl roztok poly-L-lysinu odstraněn pomocí filtračního papíru a sklíčka byla omyta redestilovanou vodou. Vzorky byly centrifugovány (12000 x g, 5 min, 25 °C) a pelet byl resuspendován ve 2 ml kakodylátového pufru, následně byly vzorky třikrát proplachovány po dobu 20 min. Vzorky byly centrifugovány (12000 x g, 5 min, 25 °C) a pelet byl resuspendován v 500 - 800 µl kakodylátového pufru v závislosti na optické densitě. Vzorky byly převedeny na krycí sklíčka ve vlhké komůrce a byly uloženy ve 4 °C, kde buňky ze vzorku sedimentovaly 24 h. Po ukončení sedimentace byly vzorky temperovány 1 h při 25 °C, poté byly omyty redestilovanou vodou. Do připravených jamkových destiček bylo převedeno 800 µl postfixačního roztoku a do těchto jamek byla uložena sklíčka. Po 1 h byla sklíčka třikrát omývána redestilovanou vodou po dobu 20 min. Preparáty upevněné v držáku na sklíčka pro elektronovou mikroskopii byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou 25%, 50%, 75%, 90%, 96%, 100% ethanolem a acetonem, ponořením na 20 min do každé kádinky s daným roztokem. Po druhém uložení vzorků do acetonu byly vzorky umístěny do -20 °C po dobu 8 min. Do pracovní komory vytemperovaného přístroje k sušení kritickým bodem (Quorum K850) byl umístěn vychlazený držák se vzorky s malým množstvím temperovaného acetonu. Sušení ke kritickému bodu probíhalo dle návodu. Po vysušení byla sklíčka se vzorky nalepena uhlíkovou pastou na hliníkové nosníky a po zaschnutí byla pokovena 3 nm platiny pomocí přístroje Quorum Q150T ES.

5. Výsledky

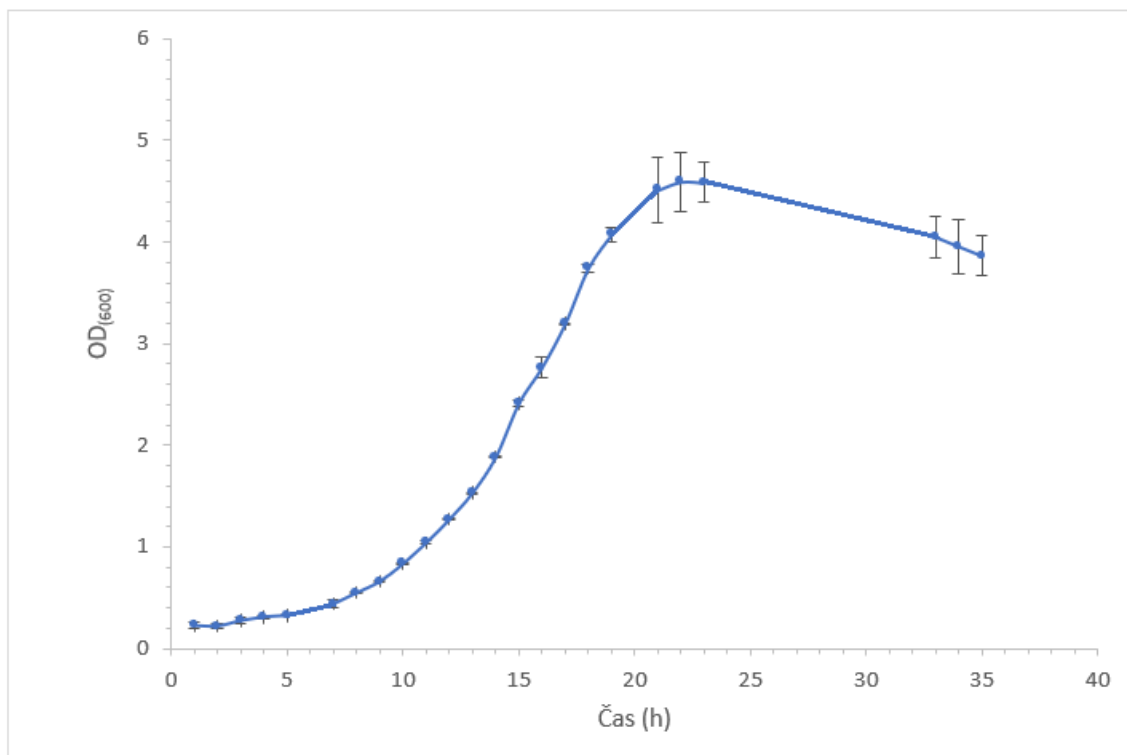
5.1. Charakterizace růstu bakteriálních kmenů v komplexním tekutém médiu

Pro charakterizaci růstu jednotlivých kmenů bylo nejprve vybráno na živiny bohaté LB médium. Bakteriální kmeny *B. velezensis*, *Xcc* SU (přírodní izolát) a *Xcc* 1279 (sbírkový kmen) byly kultivovány ve třech paralelách při teplotě 28 °C na orbitální třepačce (199 rpm) v objemu 100 ml LB média. Pro inokulaci LB média byly použity všechny kultury v koncentraci 10^8 CFU/ml. V průběhu kultivace byly v pravidelných časových intervalech odebírány vzorky pro stanovení následujících růstových parametrů: optická densita ($OD_{(600)}$), suchá hmotnost buněk (cdw; mg/ml), specifická růstová rychlost (μ ; h^{-1}), počet životaschopných buněk (CFU/ml). Dále bylo měřeno také pH kultury v průběhu kultivace. U každého kmene byl charakterizován průběh růstu v závislosti na čase po dobu 38 h (Obr. 6, 7, 8).

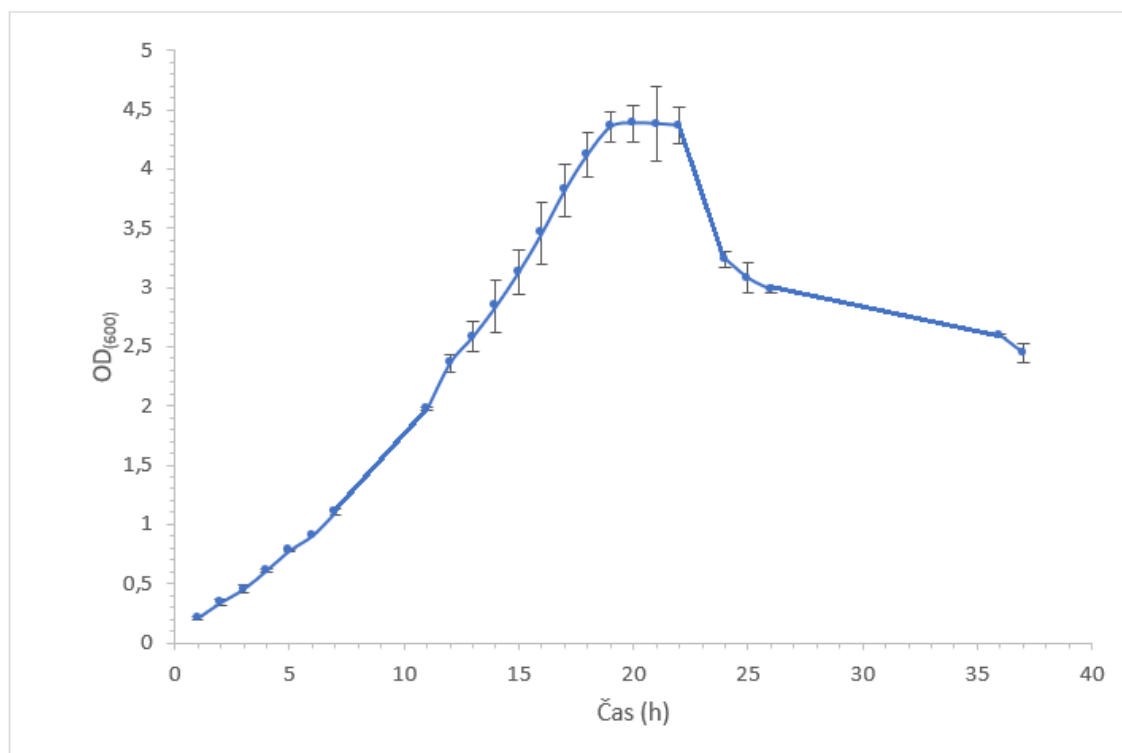
U obou kmenů *Xcc* SU a *Xcc* 1279 je patrná delší lag fáze (do 5. h inkubace), která je následovaná exponenciální fází růstu se specifickou růstovou rychlostí $0,184 h^{-1}$ (pro kmen *Xcc* SU) a $0,168 h^{-1}$ (pro kmen *Xcc* 1279) (Tab. 4). Stacionární fáze růstu nastává u obou kmenů *Xanthomonas* podobně, tedy ve 24. h u *Xcc* SU a ve 22. h u *Xcc* 1279 (Obr. 6 a 7). Nejrychlejší doba zdvojení byla zjištěna u kmene *B. velezensis* $T = 200$ min, zatímco doba zdvojení pro kmen *Xcc* SU byla 226 min a pro *Xcc* 1279 248 min. Pro bakteriální kmen *B. velezensis* je charakteristický rychlejší nástup exponenciálního růstu (Obr. 8) s vyšší specifickou růstovou rychlostí $0,208 h^{-1}$. U kmene *B. velezensis* dochází k přechodu z exponenciální fáze do stacionární již v 18. h kultivace, která pokračuje až do 22. h kultivace.



Obr. 6: Růstová křivka ($OD_{(600)}$) kmene *Xcc* SU na LB médiu při teplotě 28 °C. Experiment byl veden ve třech paralelách.



Obr. 7: Růstová křivka ($OD_{(600)}$) kmene *Xcc* 1279 na LB médiu při teplotě 28 °C. Experiment byl veden ve třech paralelách.



Obr. 8: Růstová křivka ($OD_{(600)}$) kmene *B. velezensis* na LB médiu při teplotě 28 °C. Experiment byl veden ve třech paralelách.

V průběhu kultivace byly dále sledovány růstové parametry jednotlivých kultur (Tab. 4). Vyšší hodnota suché hmotnosti buněk byla naměřena u obou kmenů *Xanthomonas*. Pro kmen *Xcc* SU byla hodnota suché hmotnosti buněk $2,13 \pm 0,07$ mg/ml a pro kmen *Xcc* 1279 byla hodnota $2,34 \pm 0,19$ mg/ml. V případě kmene *B. velezensis* byla suchá hmotnost nižší $0,62 \pm 0,15$ mg/ml. Obdobně byl detekován ve 24. h kultivace pro kmen *B. velezensis* i znatelně nižší nárůst životaschopných buněk $1,7 \times 10^9$, což je pravděpodobně způsobeno tím, že kmeny *Xcc* byly ve 24. h kultivace v exponenciální fázi, zatímco kmen *B. velezensis* byl již v pozdní stacionární fázi růstu. Kmeny rodu *Xanthomonas* se ve 24. h kultivace vyskytovaly ve stacionární nebo přechodové fázi růstu mezi exponenciální a stacionární fází, dosahovaly v tuto dobu nejvyššího počtu životaschopných buněk $9,2 \times 10^{10}$ (pro kmen *Xcc* SU) a $8,6 \times 10^{10}$ (pro kmen *Xcc* 1279). Dále byl sledován v průběhu kultivace fyzikální parametr pH, jehož maximální hodnota 7,8 byla dosažena v průběhu kultivace u kmenů rodu *Xanthomonas*, zatímco pro kmen *B. velezensis* byly zaznamenány nižší hodnoty 7,4 (Tab. 4).

Tab. 4: Růstové parametry jednotlivých kmenů *B. velezensis*, *Xcc* SU a *Xcc* 1279 ve 24. h kultivace na LB médiu

Bakteriální kmen	μ (h ⁻¹)	CFU/ml	cdw (mg/ml)	pH
<i>Xcc</i> SU	0,184	$9,2 \times 10^{10}$	$2,13 \pm 0,07$	7,8
<i>Xcc</i> 1279	0,168	$8,6 \times 10^{10}$	$2,34 \pm 0,19$	7,8
<i>B. velezensis</i>	0,208	$1,7 \times 10^9$	$0,62 \pm 0,15$	7,4

5.2. Utilizace různých zdrojů uhlíku a energie jednotlivými bakteriálními kmeny

Pro zjištění vhodných podmínek pro růst na minimálním kultivačním médiu bylo na místě zjistit, který zdroj uhlíku dané bakteriální kmeny využívají pro svůj růst. Stanovení schopnosti využít jednotlivé zdroje uhlíku bylo provedené dle kapitoly 4.5. za použití komerčně dostupného kitu EcoPLATE (BioLOG). Inkubace jednotlivých kultur probíhala při teplotě 28 °C po dobu 5 dnů. V průběhu inkubace byl růst biomasy sledován měřením absorbance při vlnové délce 590 nm. Zvýšené hodnoty absorbance ukazovaly využití daného zdroje uhlíku, což se projevilo viditelným zabarvením jednotlivých jamek vlivem redukce indikátoru (tetrazoliové barvivo). Metabolická charakterizace kultur byla testována na ve třech paralelách. Schopnost využití C zdrojů vybranými bakteriálními kmeny je zaznamenána v tabulce 5.

Tab. 5: Schopnost využití sledovaných zdrojů C kmeny *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis*

Zdroj C	Bakteriální kmen		
	<i>Xcc</i> SU	<i>Xcc</i> 1279	<i>B. velezensis</i>
Methylpyruvát	+	+	+
Tween 40	+	+	-
Tween 80	+	+	-
α -cyklodextrin	-	-	-
Glykogen	-	-	-
D-celobiosa	+	+	-
α -D-laktosa	-	-	-
β -methyl-D-glukosid	-	-	-
D-xyloza	+	+	+
i-erythritol	-	-	-
D-mannitol	-	-	-
N-acetyl-D-glukosamin	+	+	-
Kyselina D-glukosaminová	-	-	-
Glukosa-1-fosfát	+	+	+
D,L- α -glycerol fosfát	-	-	-
γ -lakton kyseliny D-galaktónové	-	-	-
Kyselina D-galaktouronová	-	-	-
Kyselina 2-hydroxybenzoová	-	-	-

Kyselina 4-hydroxybenzoová	-	-	-
Kyselina γ -hydroxymásečná	-	-	-
Kyselina itakónová	-	-	-
Kyselina α -ketomásečná	-	-	-
Kyselina D-jablečná	-	-	-
L-arginin	-	-	-
L-asparagin	-	-	-
L-fenylalanin	-	-	-
L-serin	-	-	-
L-threonin	-	-	-
Kyselina glycyll-L-glutamová	-	-	-
Fenylethylamin	-	-	-
Putrescin	-	-	-

Kmeny rodu *Xanthomonas* využívaly shodně jako zdroj uhlíku methylpyruvát, D-xylosu, tween 40, tween 80, N-acetyl-D-glukosamin, D-celobiosu a glukosu-1-fosfát. Kmen *B. velezensis* využíval pouze D-xylosu, methylpyruvát a glukosu-1-fosfát. V případě ostatních sledovaných zdrojů C nebyla zaznamenána intenzita zabarvení a zvýšená absorpance při vlnové délce 590 nm, což ukázalo, že žádný z těchto zdrojů nebyl kmeny využíván. Pro optimalizaci složení minimálního média byly v následujících experimentech vybrány substráty pyruvát, D-xylosa a D-glukosa jako zdroje C.

5.3. Optimalizace složení minerálního média doplněného vybranými zdroji C

Na základě výsledků utilizace zdrojů C jednotlivými kmeny, byly následně kmeny kultivovány v minimálním médiu M9 o objemu 100 ml doplněným stopovými prvky (M9TE; kapitola 3.3.1.) a následujícími již vybranými zdroji C v koncentraci 10,00 g/l: pyruvát, D-xylosa a D-glukosa. Dvoustupňové inokulum bylo použito pro 1% inokulaci minimálního média M9TE doplněného zdrojem C. Kultury byly inkubovány při teplotě 28 °C, na orbitální třepačce při 199 rpm po dobu 48 h. V průběhu kultivace byl růst jednotlivých kmenů charakterizován růstovými parametry: optickou densitou ($OD_{(600)}$), specifickou růstovou rychlostí (μ , h^{-1}) a dobou zdvojení (T , h). Ve 48. h kultivace byl stanoven další růstový parametr: cdw (mg/ml) (Tab. 6). V tabulce 6 je charakterizován růst jednotlivých kmenů jednotlivými růstovými parametry v minimálním M9TE médiu doplněném o vybrané zdroje C.

Tab. 6: Růstové parametry jednotlivých bakteriálních kmenů *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* na vybraných zdrojích C ve 33. h ($OD_{(600)}$) a 48. h kultivace (cdw; mg/ml)

Bakteriální kmen	Pyruvát		D-xyloza		D-glukosa	
	$OD_{(600)}$	cdw (mg/ml)	$OD_{(600)}$	cdw (mg/ml)	$OD_{(600)}$	cdw (mg/ml)
<i>Xcc</i> SU	0,651	0,64 ± 0,06	0,540	0,42 ± 0,08	1,017	0,62 ± 0,10
<i>Xcc</i> 1279	0,940	0,62 ± 0,09	0,315	1,21 ± 0,11	0,729	0,60 ± 0,07
<i>B. velezensis</i>	1,351	0,39 ± 0,14	1,132	0,48 ± 0,09	1,342	0,54 ± 0,13

Pro kmen *Xcc* SU se jako vhodný zdroj C ukázal substrát D-glukosa. Kmen na tomto substrátu dosahoval ve 33. h kultivace nejvyšších hodnot absorpance $OD_{(600)} = 1,017$. V případě suché hmotnosti buněk se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,4 a 0,6 mg/ml na všech sledovaných zdrojích C. Kmen *Xcc* SU vykazoval nejvyšší množství biomasy $0,64 \pm 0,60$ mg/ml na substrátu pyruvátu. Při využití D-xylosy jako zdroji uhlíku pro *Xcc* SU docházelo k pomalejšímu růstu bakteriální kultury a také byla naměřena nejnižší hodnota suché hmotnosti buněk ($0,42 \pm 0,08$ mg/ml) (Tab 6).

Nejvyšších hodnot suché hmotnosti biomasy ($1,21 \pm 0,11$ mg/ml) kmene *Xcc* 1279 bylo dosaženo při růstu na D-xylose, kdy dosahovala téměř dvojnásobného množství oproti růstu kultury na ostatních dvou zdrojích uhlíku. Nicméně, hodnoty cdw byly zatíženy produkcí xanthanu, který je při růstu v minerálním médiu rodem *Xanthomonas* hojně produkován. Ovšem hodnoty optické density kultury *Xcc* 1279 na D-xylose byly ve 33. h kultivace velmi nízké, tj. 0,315. Vyšší hodnoty optické density kmene *Xcc* 1279 byly pozorovány při růstu na ostatních dvou zdrojích uhlíku D-glukosa a pyruvát (Tab 6).

Bakteriální kmen *B. velezensis* dosahoval ve 33. h kultivace podobných hodnot optické density při růstu na pyruvátu a D-glukose (1,351 a 1,342). D-xyloza byla také klasifikována jako poměrně dobrý zdroj uhlíku, neboť naměřená hodnota suché hmotnosti buněk byla $0,48 \pm 0,09$ mg/ml (Tab. 6).

Ze zjištěných výsledků vyplynulo, že bakteriální kmeny *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* metabolizují všechny sledované zdroje C v minimálním médiu, nicméně byl patrný rozdíl v jednotlivých růstových parametrech kmenů v závislosti na vybraném zdroji C.

5.3.1. Růstová charakterizace jednotlivých kmenů na optimalizovaném minimálním médiu

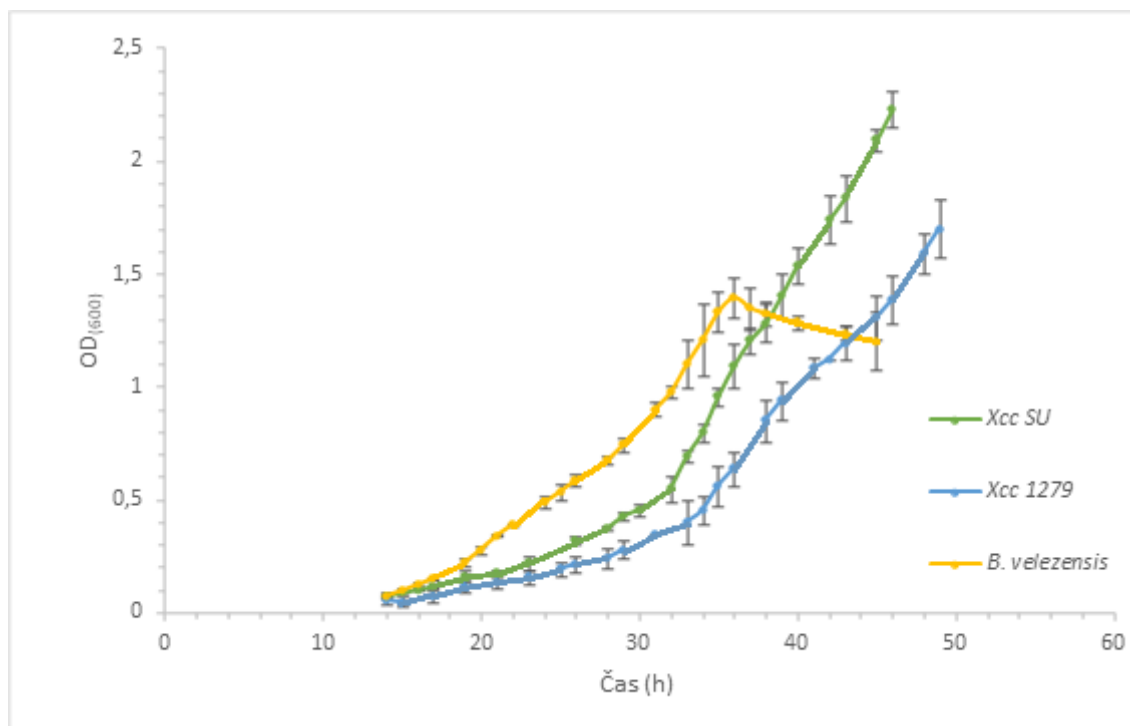
Na základě předchozích výsledků bylo minimální médium M9TE doplněno D-glukosou (10,00 g/l) jako jediným zdrojem C pro všechny tři testované kmeny. Kmeny byly inokulovány

1% připravenou kulturou ve dvoustupňovém systému přípravy inokula (viz. kapitola 4.4.) a inkubovány jednotlivě ve 100 ml média M9TEGLu při teplotě 28 °C na orbitální třepačce (199 rpm) po dobu 48 h. V průběhu kultivace byl sledován růst kultur a měřeny růstové parametry jako specifická růstová rychlost (μ ; h^{-1}) a doba zdvojení (T; min). Ve 33. h kultivace byl měřen parametr CFU/ml a současně byla na konci kultivace (48. h) sledována suchá hmotnost buněk (cdw; mg/ml) (Tab. 7).

Tab. 7: Růstové parametry jednotlivých kmenů *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* v minimálním médiu M9TE s D-glukosou ve 33. h kultivace (CFU/ml) 48. h kultivace (cdw; mg/ml)

Bakteriální kmen	μ (h^{-1})	T (min)	CFU/ml	cdw (mg/ml)
<i>Xcc</i> SU	0,120	355	$2,83 \pm 0,08 \times 10^9$	$0,60 \pm 0,07$
<i>Xcc</i> 1279	0,102	406	$3,68 \pm 0,02 \times 10^9$	$0,54 \pm 0,13$
<i>B. velezensis</i>	0,163	258	$5,65 \pm 0,02 \times 10^8$	$0,62 \pm 0,10$

Oba bakteriální kmeny rodu *Xanthomonas* dosahovaly ve 33. h kultivace podobných hodnot počtu životaschopných buněk ($2,83 \pm 0,08 \times 10^9$ a $3,68 \pm 0,02 \times 10^9$), oba kmeny byly v této hodině na vstupu do exponenciální fáze. *B. velezensis* produkoval ve 33. h méně životaschopných buněk ($5,65 \pm 0,02 \times 10^8$), hodnota specifické růstové rychlosti pro tento kmen byla $0,163 h^{-1}$. Buňky kmene *Xcc* SU měly kratší dobu zdvojení než kmen *Xcc* 1279 (Tab. 7). V průběhu kultivace na minimálním M9TE médiu s D-glukosou jako jediným zdrojem C byla u všech bakteriálních kmenů *Xcc* SU, *Xcc* 1279 a *B. velezensis* pozorována delší lag fáze oproti kultivaci na komplexním médiu LB (Obr. 9). Na minimálním médiu M9 se stopovými prvky a glukosou jako zdrojem uhlíku dosáhl antagonistický kmen *B. velezensis* maxima exponenciální fáze růstu ve 35. h kultivace, zatímco kmeny rodu *Xanthomonas* až později ve 46-48. h kultivace (Obr. 9).

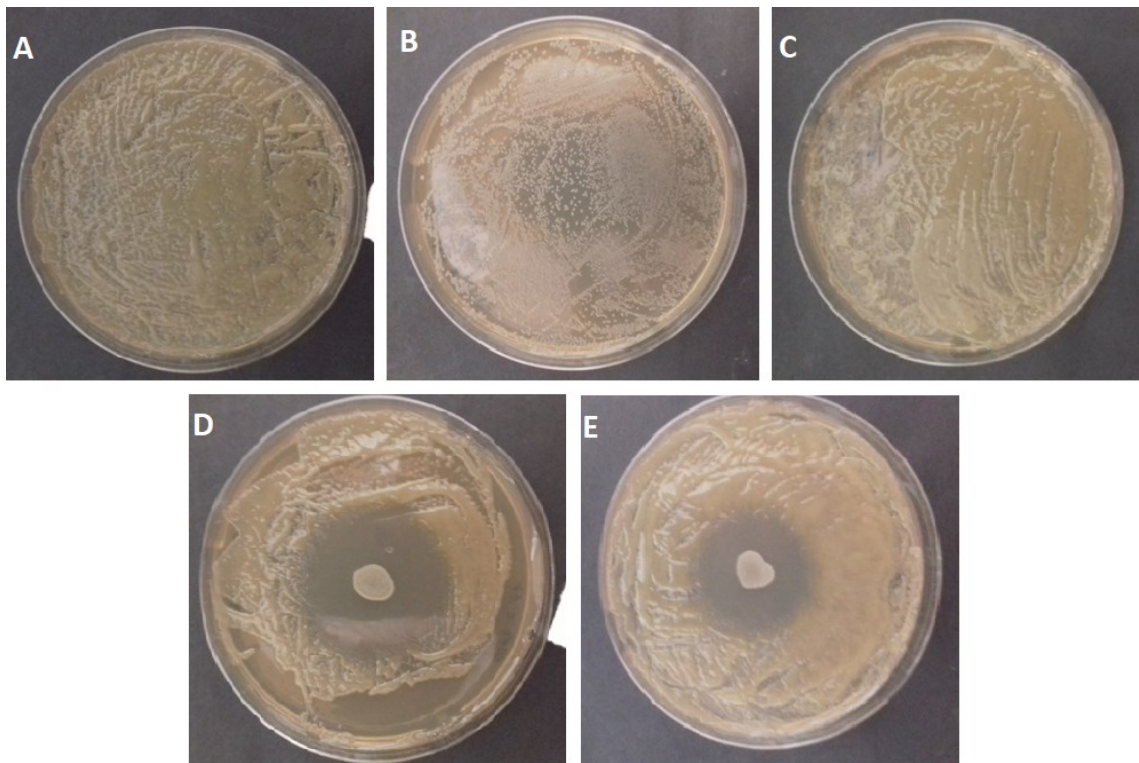


Obr. 9: Růstové křivky ($OD_{(600)}$) bakteriálních kmenů *Xcc* SU (zelená), *Xcc* 1279 (modrá) a *B. velezensis* (žlutá) na M9TE médiu s D-glukosou. Experiment byl proveden ve 3 paralelách.

5.4. Inhibiční experimenty

5.4.1. Inhibice fytopatogenů rodu *Xanthomonas* antagonistickým kmenem *Bacillus velezensis* na pevném médiu

Pro sledování inhibičního účinku antagonisty na bakteriální rostlinné patogeny byla použita obdoba diskové difúzní metody pro stanovení citlivosti k antibiotikům. Patogenní kmeny rodu *Xanthomonas* - sbírkový kmen *Xcc* 1279 a přírodní izolát *Xcc* SU narostlé do koncentrace 10^9 CFU/ml byly 1000 x naředěny a 100 μ l rozetřeno po celé ploše agaru. Pro inhibiční experimenty bylo použito 10 μ l kultury *B. velezensis* FZB42 zředěné na koncentraci 10^5 /ml, která byla nanášena do středu zaočkované misky. Kmeny na pevném M9TEGLu médiu byly inkubovány při teplotě 28 °C po dobu 72 h. Následně byla odečtena velikost tzv. inhibičních zón. Na obrázku 10 (D, E) lze sledovat různou velikost zřetelných, inhibičních zón při použití antagonisty v množství 10^3 CFU. Inhibiční zóna o velikosti 25 ± 2 mm byla detekována při interakci kmene *B. velezensis* a *Xcc* SU. V případě sbírkového kmene *Xcc* 1279 byla v důsledku působení antagonisty na patogena vytvořena inhibiční zóna o velikosti 20 ± 2 mm. Kmen *B. velezensis* potlačuje růst obou bakteriálních kmenů rodu *Xanthomonas* na pevném médiu. Na základě různé velikosti inhibičních zón je zřejmé, že přírodní izolát *Xcc* SU je citlivější k antagonistickému kmeni než sbírkový kmen *Xcc* 1279.

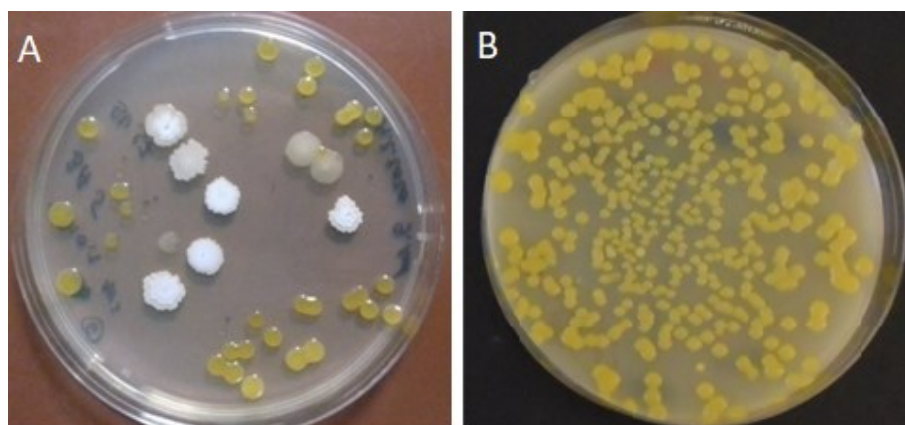


Obr. 10: Inhibiční efekt kmene *B. velezensis* na kmeny *Xcc* SU a *Xcc* 1279. **(A)** Monokultura *Xcc* SU, **(B)** monokultura *B. velezensis*, **(C)** monokultura *Xcc* 1279, **(D)** interakce kultury *Xcc* SU a *B. velezensis*, **(E)** interakce *Xcc* 1279 a *B. velezensis* na M9TEGlu médiu po 72 h kultivace.

5.4.2. Inhibiční vliv antagonistického kmene *B. velezensis* na přírodní izolát *Xcc* SU

Na základě výsledků z předchozích inhibičních experimentů na pevném médiu (kapitola 5.4.1.) a vzhledem k tomu, že jednotlivé kmeny rodu *Xanthomonas* mají podobné růstové faktory, byl pro interakce patogen - antagonist v tekutém médiu vybrán přírodní izolát patogena *Xcc* SU. Kultivace směsných kultur probíhaly v optimalizovaném minimálním médiu M9TEGlu při teplotě 28 °C na orbitální třepačce (199 rpm) po dobu 72 h. Pro interakce patogen - antagonist byly zvoleny různé poměry (1:3; 1:15 a 1:100) počátečních koncentrací kultur *B. velezensis* : *Xcc* SU podle hodnot CFU/ml. Kultivace směsných kultur probíhala ve dvou paralelách vždy se samostatnými kontrolními kulturami kmene *B. velezensis* a *Xcc* SU. V pravidelných časových intervalech byly měřeny počty životaschopných buněk (CFU/ml) v kontrolních kulturách a ve směsné kultuře byly tyto růstové parametry sledovány pomocí hodnot CFU získaných na LB médiu (pro kmen *B. velezensis*) a na selekčním médiu mCS20ABN+BS (pro kmen *Xcc* SU). Detekce jednotlivých kmenů ve směsné kultuře po 9. h kultivace na LB médiu a selekčním médiu mCS20ABN+BS je znázorněna na obrázku 11.

V případě kultivace směsné kultury na pevném LB médiu byly patrné v okolí jednotlivých kolonií kmene *B. velezensis* inhibiční zóny, kde kmen *Xcc* SU nerostl.

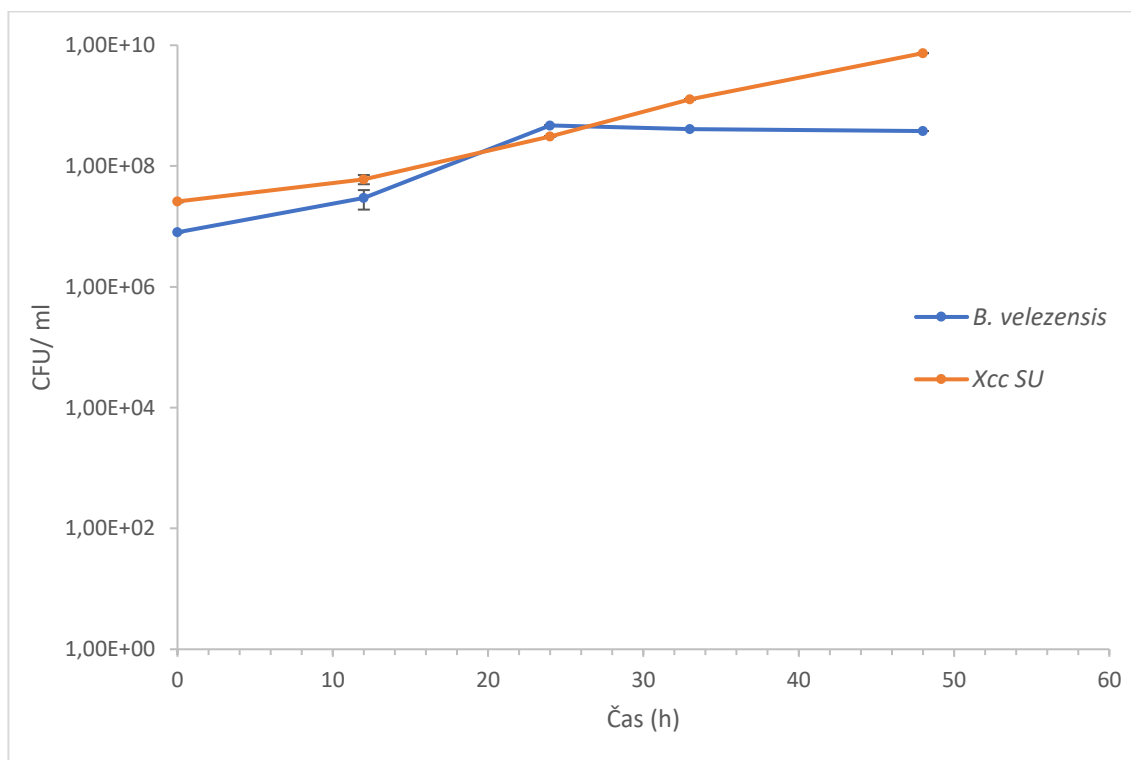


Obr. 11: Detekce směsné kultury kmene *B. velezensis* a *Xcc* SU na komplexním LB médiu **(A)** a selekčním mCS20ABN+BS médiu **(B)** při počáteční inokulaci 1:100 v 9. h kultivace.

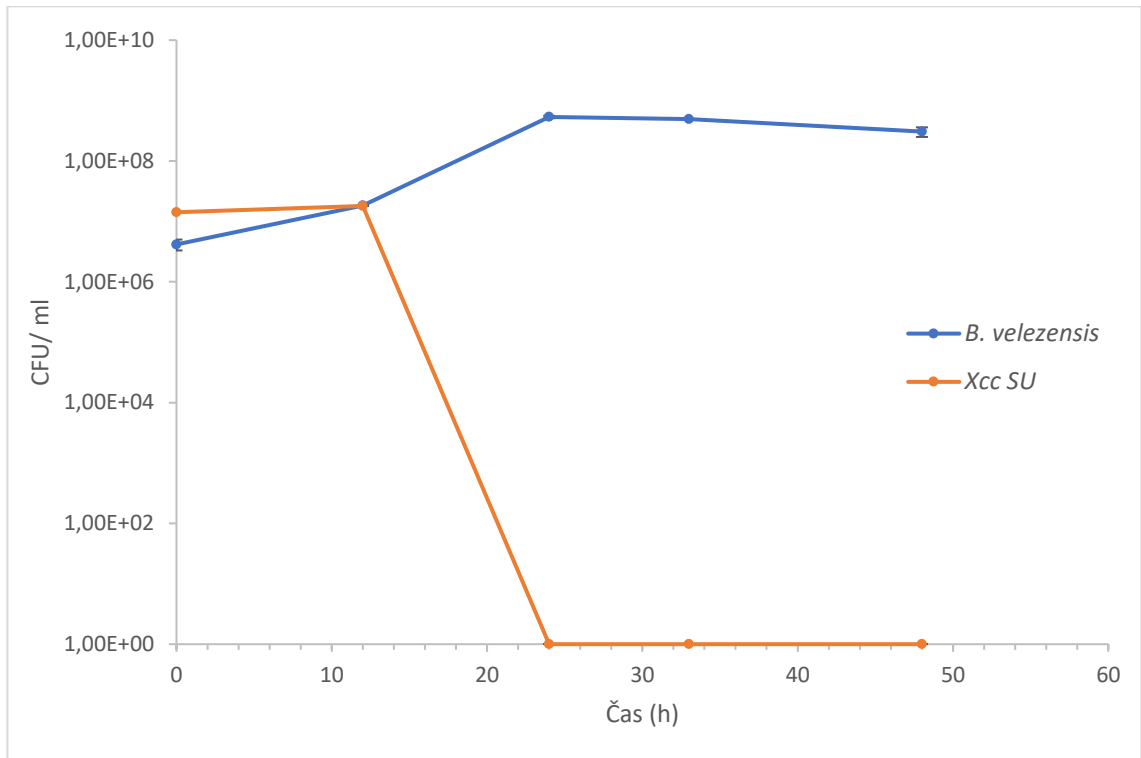
V průběhu duální kultivace byly v pravidelných časových intervalech odebírány vzorky směsné kultury pro studium vlivu vzájemného působení organismů prostřednictvím růstového parametru CFU jednotlivých kmenů. Jednotlivé počty životaschopných buněk v průběhu kultivací jsou zaznamenány v grafech (Obr. 12-15). V případě směsné kultury inokulované v poměru 1:3 dochází k zastavení růstu kmene *Xcc* SU již ve 24. h inkubace (Obr. 13). Kultura *Xcc* SU dosáhla ve 12. h kultivace nejvyšší hodnoty CFU $1,8 \pm 0,01 \times 10^7$. Za stejných podmínek kmen *B. velezensis* dosahoval na konci kultivace ve 48. h hodnoty CFU $3,0 \pm 0,6 \times 10^7$. Při počátečním inokulačním poměru 1:100 (*B. velezensis* : *Xcc* SU) byl patrný nejpomalejší úbytek buněk kmene *Xcc* SU, až ve 33. h inkubace dosahovaly hodnoty CFU kmene *Xcc* $1,3 \pm 0,5 \times 10^6$. Co se týká kmene *B. velezensis* při počátečním poměru inokulace 1:100 dosahoval vyšší počet životaschopných buněk $4,4 \pm 0,3 \times 10^8$ po 48. h kultivace v porovnání s kultivací směsné kultury v poměru 1:15 ($2,7 \pm 0,5 \times 10^8$ CFU/ml). Při porovnání dvou rozdílných inokulačních poměrů obou kmenů (1:15 a 1:100) kmen *Xcc* SU nebyl detekován až ve 48. h kultivace při poměru inokulace 1:100 (Obr. 15), zatímco při počátečním poměru 1:15 byl zřetelný úbytek kmene *Xcc* SU zaznamenán již ve 33. h kultivace (Obr. 14).

Monokultura kmene *B. velezensis* na minimálním médiu M9TEGlu dosáhla počtu životaschopných buněk $1,3 \pm 0,3 \times 10^8$, zatímco monokultura kmene *Xcc* SU o řád výše $5,0 \pm 0,2 \times 10^9$ (Obr. 12). Z předcházejících výsledků vyplývá, že kmen *B. velezensis* inhibuje růst kmene *Xcc* SU v duální kultuře a projevuje se jeho antagonistický efekt (Obr. 13-15).

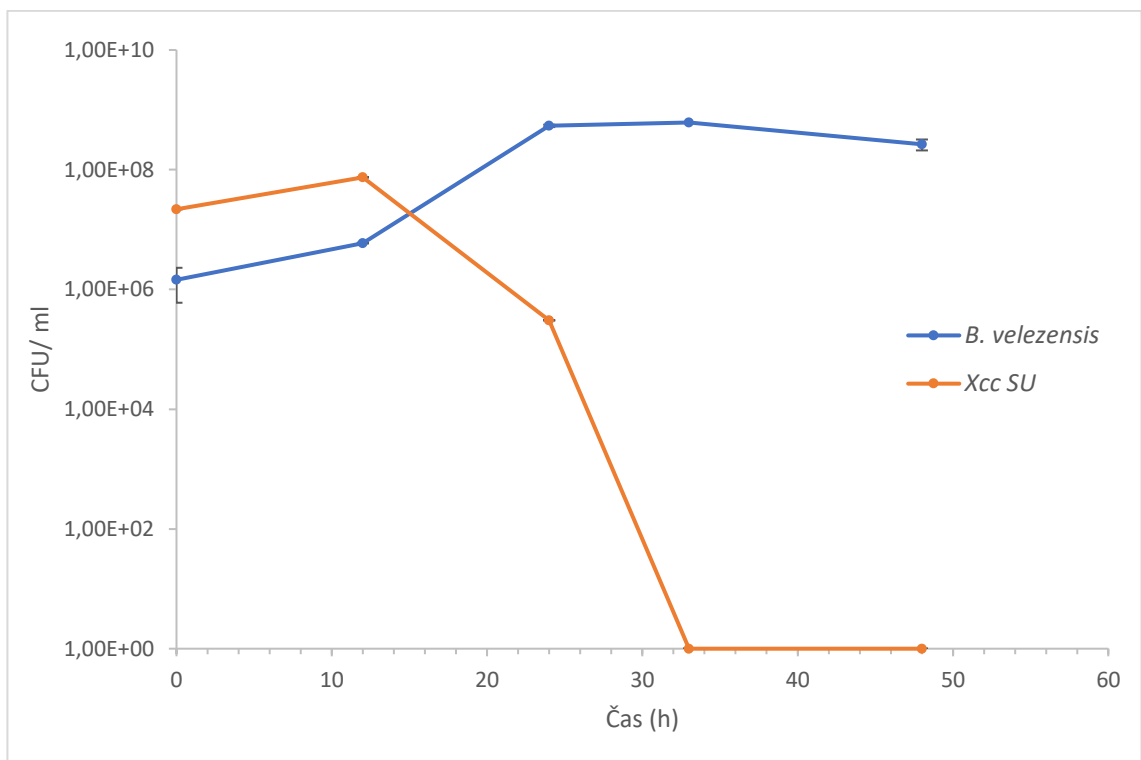
Rychlost úbytku kmene *Xcc* SU závisí na jeho počátečním množství vstupujícího do interakce s antagonistickou kulturou kmene *B. velezensis* ve stejném počátečním čase. Nejrazantnější úbytek kmene *Xcc* SU vlivem antagonisty *B. velezensis* byl pozorován při počátečním poměru obou kultur 1:3 (Obr. 13). Na druhou stranu nebyl pozorován negativní vliv kmene *Xcc* SU na růst kmene *B. velezensis* (Obr. 13-15).



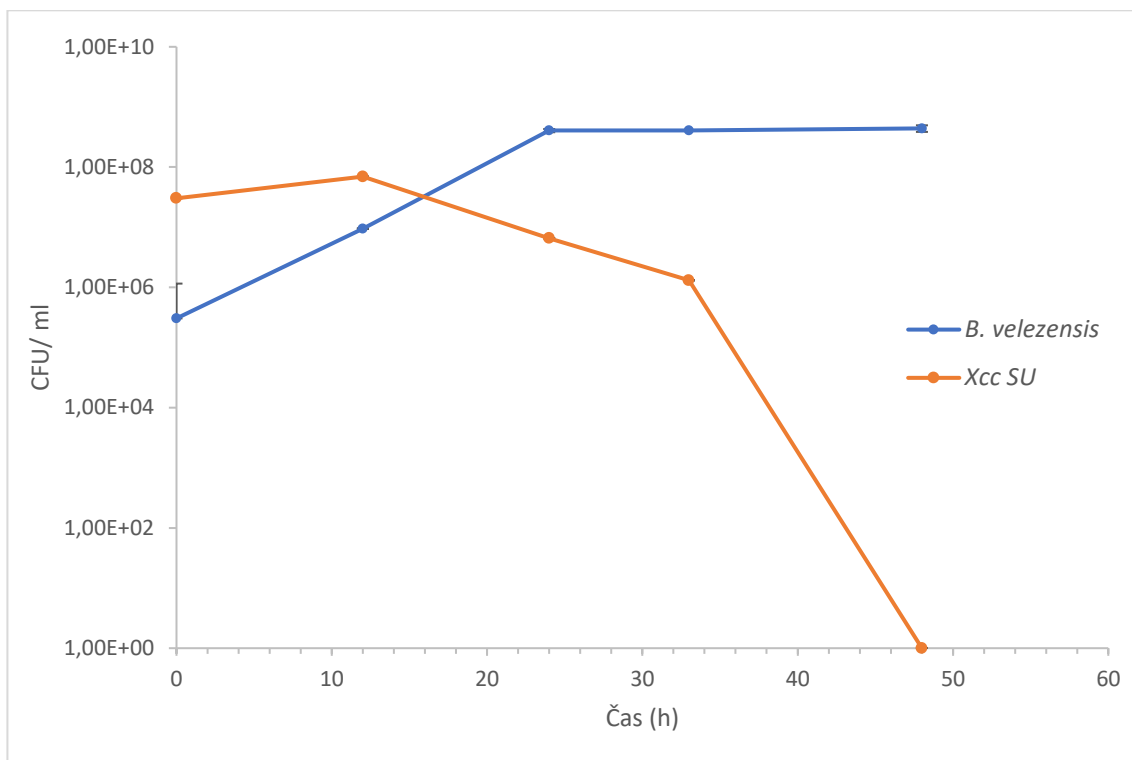
Obr. 12: Graf závislosti počtu životaschopných buněk jednotlivých kmenů v monokulturách *B. velezensis* a *Xcc* SU na době kultivace (h). Počet životaschopných bakteriálních buněk (CFU/ml) v monokultuře *B. velezensis* (modrá), hodnota CFU/ml *Xcc* SU z monokultury (oranžová).



Obr. 13: Graf závislosti počtu životaschopných buněk jednotlivých kmenů v duální kultuře kmene *B. velezensis* a *Xcc SU* v poměru 1:3 na době kultivace (h). Počet životaschopných bakteriálních buněk *B. velezensis* (CFU/ml) v duální kultuře (modrá), hodnota CFU/ml *Xcc SU* z duální kultury (oranžová).



Obr. 14: Graf závislosti počtu životaschopných buněk jednotlivých kmenů v duální kultuře kmene *B. velezensis* a *Xcc SU* v poměru 1:15 na době kultivace (h). Počet životaschopných bakteriálních buněk *B. velezensis* (CFU/ml) v duální kultuře (modrá), hodnota CFU/ml *Xcc SU* z duální kultury (oranžová).



Obr. 15: Graf závislosti počtu životaschopných buněk jednotlivých kmenů v duální kultuře kmene *B. velezensis* a *Xcc SU* v poměru 1:100 na době kultivace (h). Počet životaschopných bakteriálních buněk *B. velezensis* (CFU/ml) v duální kultuře (modrá), hodnota CFU/ml *Xcc SU* z duální kultury (oranžová).

V průběhu kultivace byla dále sledována zbytková koncentrace D-glukosy jako jediného zdroje C. Stanovení tohoto parametru potvrdilo úbytek kmene *Xcc* vlivem působení antagonisty a vyvrátilo možnost limitace kmene živinou. Vzorky pro měření koncentrace glukosy v médiu byly odebírány v pravidelných časových intervalech (0., 24., 32., 48. a 72. h). V tabulce 8 jsou zaznamenány zbytkové koncentrace D-glukosy v průběhu smíšené kultivace.

Tab. 8: Zbytková koncentrace glukosy v médiu v čase v průběhu duální kultivace

Vzorek	Čas (h)	Koncentrace glukosy (g/l)	Zbytková koncentrace glukosy (%)
<i>B. velezensis</i>: <i>Xcc SU</i> (1:3)	0	10,04 ± 0,07	100
	24	8,11 ± 3,51	81,1
	32	7,67 ± 3,55	76,7
	48	5,70 ± 1,32	57,0
	72	3,96 ± 1,93	39,6
<i>B. velezensis</i>: <i>Xcc SU</i> (1:15)	0	10,02 ± 0,05	100
	24	7,50 ± 0,30	75,0
	32	7,05 ± 3,57	70,5
	48	5,00 ± 2,59	50,0
	72	2,90 ± 1,12	29,0

<i>B. velezensis</i>: Xcc SU (1:100)	0	10,04 ± 0,06	100
	24	7,99 ± 4,21	79,9
	32	7,00 ± 1,98	70,0
	48	5,47 ± 0,05	54,7
	72	3,07 ± 0,71	30,7

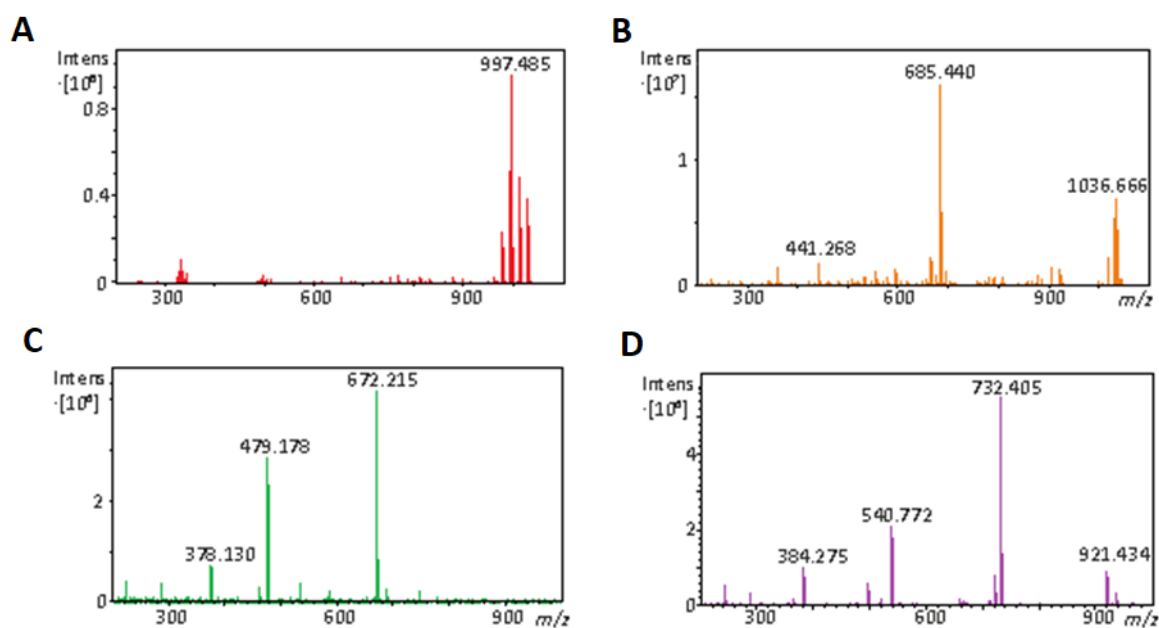
Výchozí koncentrace D-glukosy byla 10,00 g/l. Ve všech vzorcích docházelo během kultivace ke spotřebě D-glukosy. V duálních kulturách při různých inokulačních poměrech došlo po 24 h kultivace ke snížení koncentrace D-glukosy v médiu na 81,1 % (poměr 1:3), 75,0 % (poměr 1:15) a 79,9 % (1:100) z původní koncentrace glukosy v médiu. Zbytková koncentrace D-glukosy v duálních kulturách neklesla po 72 h pod 29 %. Proto může být vyloučeno, že inhibice růstu bakteriálního kmene je způsobena nedostatkem zdroje uhlíku v médiu.

5.4.3. Detekce metabolitů kmene *B. velezensis* v průběhu duální kultivace

V průběhu duální kultivace byly v pravidelných časových intervalech (0., 6., 12., 24., 33. a 48. h kultivace) odebírány vzorky supernatantu duálních kultur a monokultury *B. velezensis*. Lyofilizované vzorky supernatantu ve vhodném množství (viz kapitola 4.12.1.) byly předány pro vlastní měření do Laboratoře charakterizace molekulární struktury, v níž byla provedena vlastní hmotnostně spektrometrická měření. Pro identifikaci sledovaných metabolitů byl použit systém vysokoúčinné kapalinové chromatografie Dionex UltiMate 3000 HPLC s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením SolariX 12T FT-ICR. Pomocí výše zmíněné analýzy byly detekovány čtyři dominantní sekundární metabolity: siderofor bacillibaktin a lipopeptidy fengycin, surfaktin a bacillomycin. Látky byly identifikovány pomocí shody fragmentačních spekter s literaturou (Palyzová et al., 2019), nebo, v případě surfaktinu, s komerčním standardem dané látky. Tyto sekundární metabolity byly produkovány kmenem *B. velezensis* v monokulturách i v duálních kulturách. Kmen Xcc SU neprodukuje ani jeden z těchto detekovaných metabolitů.

Z MS spekter byla izolována a následně fragmentována hodnota 1036,697 m/z (což odpovídá protonované formě lipopeptidu surfaktinu) s dominantním fragmentačním iontem 685,440 m/z (Obr. 16 B). Další metabolit charakterizovaný protonovanou molekulou s molekulovou hmotností 883,263 m/z byl identifikován jako bacillibaktin, jeho fragmentační spektrum je zaznamenáno na obrázku 16 C. Další lipopeptid s hodnotou 1031,548 m/z a s dominantním fragmentačním iontem 997,485 m/z (Obr. 16 A) byl identifikován jako

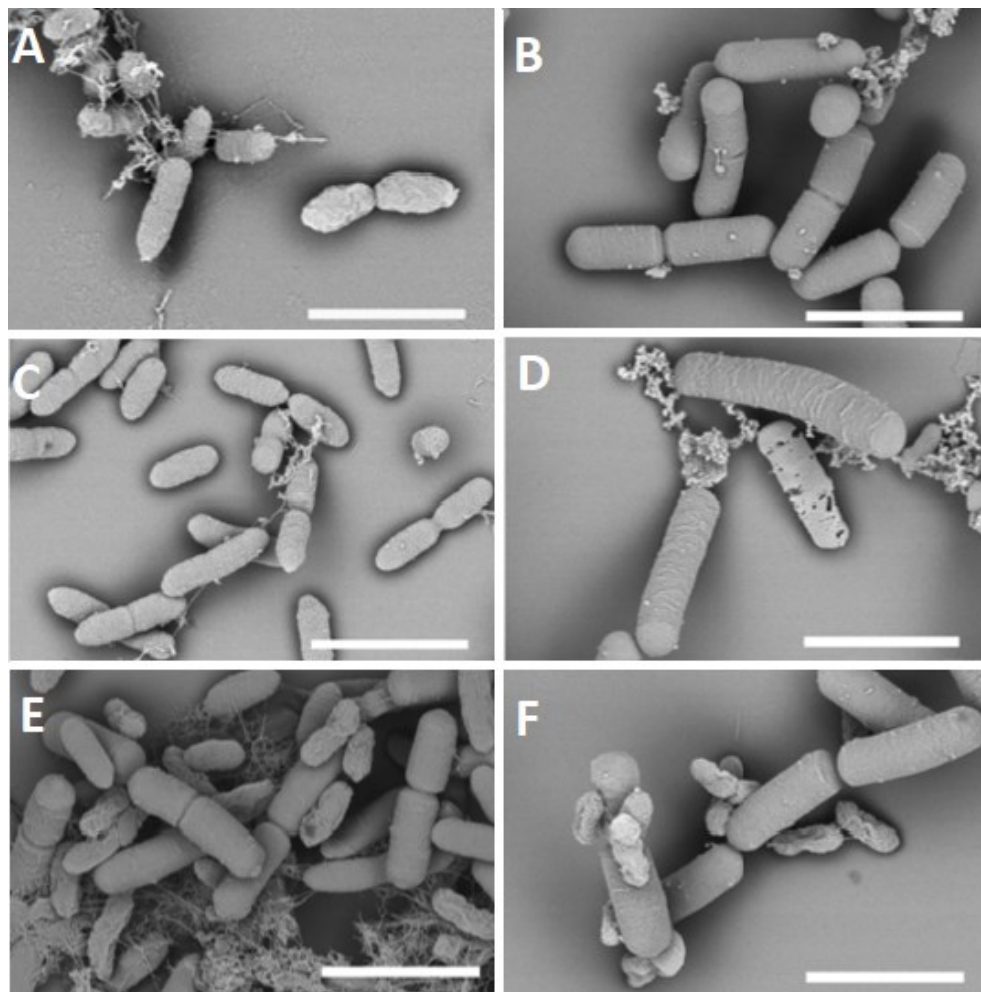
bacillomycin D. Identifikace fengycinu byla provedena na základě fragmentace iontu 732,405 m/z (Obr. 16 D).



Obr. 16: Fragmentační spektra charakteristická pro bacillomycin D (A), surfaktin (B), bacillibaktin (C) a fengycin A (D) shodující se s dříve publikovanou literaturou (Palyzová et al., 2019), nebo standardem (surfaktin).

5.4.4. Morfologické změny buněk pozorované SEM analýzou

Účinky sekundárních metabolitů na Xcc SU produkovaných kmenem *B. velezensis* byly pozorovány prostřednictvím snímků z elektronového rastrovacího mikroskopu. U bakteriálního kmene Xcc SU v duální kultuře docházelo k významným morfologickým změnám, které jsou zobrazeny na obrázku 17.



Obr. 17: Interakce dvou bakteriálních kmenů v průběhu kultivace duálních kultur *B. velezensis* a *Xcc* SU a kontrolních monokultur *B. velezensis* a *Xcc* SU v čase, snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu (měřítko 2 μm). (A) Monokultura kmene *Xcc* SU v čase 0 h. (B) Monokultura kmene *B. velezensis* v čase 0 h. (C) Monokultura kmene *Xcc* SU v čase 48. h kultivace. (D) *B. velezensis* ve 48. h kultivace. (E) Duální kultura *B. velezensis* a *Xcc* SU zaočkované v poměru 1:1000 v čase 28 h. (F) Duální kultura *B. velezensis* a *Xcc* SU zaočkované v poměru 1:100 v čase 48 h.

Buňky kmene *Xcc* SU jsou krátké tyčinky, které dosahují délky $1,31 \pm 0,22 \mu\text{m}$ a šířky $0,44 \pm 0,07 \mu\text{m}$. Buňky kmene *B. velezensis* mají tyčinkovitý tvar a hladký povrch, jejich délka činí $2,56 \pm 0,67 \mu\text{m}$ a šířka je $0,60 \pm 0,04 \mu\text{m}$. K produkci extracelulárních metabolitů dochází jak v monokultuře, tak v duálních kulturách. U buněk *Xcc* SU ve směsné kultuře byla výrazně pozměněna morfologická struktura buněk, tento efekt byl rozeznatelný od 28. h kultivace, zároveň byla pozorována snížená schopnost dělení buněk tohoto kmene. Buňky měly signifikantně svaštělý povrch a docházelo k redukci jejich celkové velikosti (Obr. 17 E, F). Ve 48. h kultivace byla u *Xcc* SU z duálních kultur patrná lýze buněk *Xcc* SU (Obr. 17 F). Naopak buňky *Xcc* SU v monokultuře ve 48. h pokračují v dělení. Analýzou rastrovací elektronové

mikroskopie nebyly v průběhu kultivace zaznamenány žádné morfologické přeměny u kmene *B. velezensis* kultivovaného v duálních kulturách s *Xcc* SU (Obr. 17 E, F).

6. Diskuse

V této diplomové práci byly popsány inhibiční účinky bakteriálního kmene *B. velezensis* FZB42 na růst rostlinných patogenů *X. campestris* pv. *campestris* 1279 (sbírkový kmen) a *X. campestris* pv. *campestris* SU (přírodní izolát) na pevném médiu a v třepaných kulturách v laboratorních podmínkách. Antagonistické působení bylo ověřeno metodami stanovení počtu životaschopných buněk (CFU/ml), bylo pozorováno, že v průběhu duální kultivace dochází k morfologickým změnám buněk *X. campestris* pv. *campestris*. Dále byl stanoven profil sekundárních metabolitů produkovaných kmenem *B. velezensis* v interakcích s rostlinným patogenem a bylo potvrzeno, že kmen produkuje čtyři dominantní sekundární metabolity fengycin A, bacillomycin D, surfaktin a bacillibaktin, jejichž antibiotická a chelatační aktivita ovlivňuje růst rostlinných patogenů.

Pro jednotlivé kmeny byly optimalizovány kultivační podmínky v minimálním médiu M9 doplněném stopovými prvky a zdrojem C. Na základě biochemické charakterizace byla vybrána D-glukosa jako vhodný zdroj C pro růst všech tří bakteriálních kultur, což potvrzují i růstové studie na minimálních médiích (Al-Ali et al., 2018; Zhang et al., 2019). Růst všech kmenů na optimalizovaném minimálním médiu byl charakterizován růstovými parametry, a to specifickou rychlostí růstu, koncentrací životaschopných buněk a suchou hmotností buněk. Z výsledků vyplynulo, že antagonistický kmen *B. velezensis* vykazoval rychlejší růst na M9TEGlu médiu ($0,163 \text{ h}^{-1}$) ve srovnání s rostlinným patogenem *Xcc* 1279 ($0,102 \text{ h}^{-1}$) a přírodním izolátem *Xcc* SU ($0,120 \text{ h}^{-1}$). Koncentrace životaschopných buněk pro antagonistu *B. velezensis* byla ve 33. h nižší ($5,65 \pm 0,02 \times 10^8$), než u obou fytopatogenních kmenů (pro *Xcc* SU byl změřen počet životaschopných buněk $2,83 \pm 0,08 \times 10^9$ a pro *Xcc* 1279 $3,68 \pm 0,02 \times 10^9$).

Rychlost inhibičního účinku antagonistického kmene *B. velezensis* je závislá na počátečním poměru zaočkování směsné kultury. Se snižujícím se objemem inokula *B. velezensis* ve směsné kultuře klesá jeho inhibiční účinnost. V této diplomové práci bylo prokázáno, že k nejvýraznějšímu antibiotickému efektu *B. velezensis* dochází při počátečním inokulačním poměru kultur *B. velezensis* : *Xcc* SU 1:3 podle hodnot CFU/ml. V tomto případě došlo k plnému potlačení bakteriální kultury již ve 24. h kultivace (Obr. 13), hodnota CFU/ml *B. velezensis* ve 48. h dosahovala $3,0 \pm 0,6 \times 10^7$. Při zaočkování v počátečním poměru *B. velezensis* : *Xcc* SU 1:100 bylo inhibiční působení *B. velezensis* na *Xcc* SU značně

zpomaleno, neboť kmen *Xcc* SU nebyl detekovatelný ve směsné kultuře až ve 48. h kultivace (Obr. 15). Kmen *B. velezensis* dosahoval ve 48. h počtu $4,4 \pm 0,3 \times 10^8$ životaschopných buněk, zatímco při zaočkování *B. velezensis* : *Xcc* SU 1:15 bylo detekováno ve 48. h $2,7 \pm 0,5 \times 10^8$ životaschopných buněk. Ve směsné kultuře zaočkované v tomto poměru byl kmen *Xcc* SU plně inhibován ve 33. h (Obr. 14). Poměr zaočkování 1:100 CFU/ml byl testován pro duální kulturu kmene *B. amyloliquefaciens* N2-4 a N3-8 pro potlačení Gram negativní bakterie *Burkholderia pseudomallei*. Růst *B. pseudomallei* byl po 72 h růstu v duální kultuře snížen o 5 log₁₀ ve srovnání s kontrolním vzorkem (Boottanun et al., 2017).

V kontrolních kulturách kmene *B. velezensis* a při interakcích s fytopatogenem *Xcc* SU byly pomocí LC-MS analýzy detekovány čtyři sekundární metabolity. Na základě získaných fragmentačních spekter byla hmotnostně spektrometrickou analýzou potvrzena přítomnost surfaktinu, bacillomycinu a fengycinu a sideroforu bacillibaktinu (Obr. 16). Bacillomycin hraje zásadní roli v tvorbě biofilmu pro kmen *B. velezensis* (Xu et al., 2013) a vykazuje silný antifungální a antibakteriální účinek (Gong et al., 2014; Rajaofera et al., 2020). Detekce této povrchově aktivní molekuly naznačila jeden ze způsobů inhibičního efektu antagonisty v interakcích a potvrdila hypotézu, že bakterie rodu *Bacillus* napadají fytopatogeny a způsobují prostřednictvím bacillomycinu poškození buněčné membrány (Rajaofera et al., 2020). V interakci s fytopatogenem *Xcc* SU byla detekována produkce bacillomycinu v maximálním množství $1,6 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ (Mácha et al., 2021), která se přibližuje k hodnotě minimální inhibiční koncentrace tohoto metabolitu $2 \mu\text{g/ml}$ (Ramachandran et al., 2017). V monokultuře kmene *B. velezensis* byl detekován surfaktin, který je znám jako lipopeptid, který způsobuje změny integrity membrán, čímž vede k jejich narušení a destrukci buňky (Heerklotz et al., 2004). Mimo jiné má surfaktin i negativní vliv na tvorbu biofilmu u ostatních organismů (Meena et al., 2019). V duální kultuře *B. velezensis* a *Xcc* SU byla potvrzena LC-MS měřením produkce surfaktinu což naznačilo, že by mohl ovlivnit integritu membrány (Heerklotz et al., 2004) fytopatogena *Xcc* SU. Siderofor bacillibaktin byl také nalezen a potvrzen pomocí LC-MS analýzy v monokultuře kmene *B. velezensis* (Obr. 16). Jedná se o látku, která je schopna chelatovat z okolního prostředí ionty železa (May et al., 2001) a znemožnit tak jinému mikroorganismu přístup k tomuto prvku, a tím inhibovat růst a metabolismus okolních mikroorganismů (Miethke a Marahiel, 2007). Mimo jiné má i bacillibaktin antifungální a antibakteriální účinky (Dimopoulou et al., 2021). V monokultuře

i v duální kultuře byla potvrzena LC-MS spektrem produkce tohoto sideroforu. Dalším metabolitem produkovaným kmenem *B. velezensis* a detekovaným při interakci s fytopatogenem Xcc SU byl lipopeptid fengycin A. Poškození buněk Xcc SU mohlo být způsobeno tímto metabolitem, neboť fengycin interaguje s membránovými fosfolipidy a způsobuje lýzi membrány (Deleu et al., 2005). Koncentrace fengycinu v duální kultuře s Xcc SU byla $2,0 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$ (Mácha et al., 2021), ovšem koncentrace nutná pro inhibici jiných mikroorganismů je přibližně třikrát vyšší (6,25 $\mu\text{g/ml}$) (Medeot et al., 2020).

I přes to, že v experimentu s duálními kulturami nebyl detekován žádný ukazatel toho, že by bakteriální kmen *X. campestris* pv. *campestris* potlačoval růst kmene *B. velezensis*, existují studie (Birch a Patil, 1987; Deng et al. 2016), kde byly popsány inhibiční účinky rodu *Xanthomonas* na jiný mikroorganismus. Deng et al. (2016) uvádí, že difusibilní signální faktory produkované *X. campestris* pv. *campestris* negativně ovlivňují přežívání bakterie *B. thuringiensis* v duální kultuře. Prostřednictvím modulace proteinu FtsZ dochází k inhibici schopnosti dělení a sporulace buněk *B. thuringiensis*. *X. campestris* pv. *campestris* také snižuje schopnost rezistence *B. thuringiensis* k antibiotikům (Deng et al., 2016). Literatura ukazuje i na to, že *X. albilineans*, fytopatogen cukrové třtiny, produkuje albicidin, toxin, který zabraňuje diferenciaci rostlinných plastidů a tím způsobuje blednutí rostliny (Birch a Patil, 1987). Albicidin, mimo jiné, inhibuje replikaci prokaryotické DNA a tím může mít antibiotické účinky na mnoho Gram pozitivních a Gram negativních bakterií (Birch a Patil, 1985). Nicméně v této práci nebyla prokázána jeho produkce pomocí LC-MS analýzy. Navíc bakteriální kmen *X. campestris* pv. *campestris* disponuje schopností štěpit uhlovodíky (Szulc et al., 2014) a také produkuje proteolytické enzymy (Dow et al., 1990). Existuje možnost, že by nižší koncentrace lipopeptidů v duální kultuře mohla být způsobena právě činností těchto proteáz. Ovšem je možné, že by sekundární metabolity produkované *B. velezensis* mohly být odolné působení proteáz, jako je tomu u kmene *Bacillus mojavensis* (Ayed et al., 2014).

Během kultivace byly zaznamenány výrazné morfologické změny buněk *X. campestris* pv. *campestris* SU při kultivaci ve směsné kultuře s *B. velezensis* oproti monokultuře *X. campestris* pv. *campestris* SU. Zatímco morfologie buněk *B. velezensis* se neměnila, buňky *X. campestris* pv. *campestris* SU měly svrstělý povrch a v pozdějších hodinách kultivace byla narušena buněčná stěna i cytoplasmatická membrána, byla zde patrná lýze buněk. Morfologické změny v buňkách *X. campestris* pv. *campestris* jsou pravděpodobně způsobeny

účinky sekundárních metabolitů - lipopeptidů produkovaných kmenem *B. velezensis*. Fengycin A (Medeot et al., 2020), surfaktin (Bernheimer a Avigad, 1970) a bacillomycin D (Wu et al., 2020) byly popsány jako látky, které ovlivňují integritu buněčných struktur. Surfaktin způsobuje porušení membrány bakterií *Brachyspira hyodysenteriae* (Hornig et al., 2019) a fengycin zapříčiňuje lýzi buněk *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* a *P. aeruginosa* (Medeot et al., 2020). Bacillomycin má také pravděpodobně schopnost narušit buněčnou stěnu a membránu hub (Gong et al., 2014). Navíc lipopeptidy fengycin a bacillomycin D mohou působit synergicky, co se týče jejich antifungální aktivity (Koumoutsi et al., 2004). Je tedy na místě se domnívat, že tyto sekundární metabolity jsou zodpovědné za lýzi buněk, ať už jde o účinek jednotlivých lipopeptidů, nebo jde o jejich synergické působení.

Bylo vyloučeno, že by potlačení růstu bakteriálního kmenu *X. campestris* pv. *campestris* bylo způsobeno vypotřebováním zdroje uhlíku v médiu, neboť zbytková koncentrace glukosy v médiu neklesla u duálních kultur pod 24 %. V čase kultivace 32 h dosahovaly všechny duální kultury podobné zbytkové koncentrace glukosy v médiu (cca 58 %), což odpovídá koncentraci okolo 7 g/l. Tento jev může ale ovlivňovat produkci sekundárních metabolitů, protože ideální koncentrace glukosy pro produkci surfaktinu je 36,5 g/l (Sen, 1997), což je více než trojnásobné množství koncentrace glukosy v médiu při inokulaci.

Kmen *Bacillus* je vhodný jako biopesticid zvláště proto, že má široké spektrum antimikrobiálních účinků, je běžnou součástí rhizosféry ale také kvůli tomu, že sporuluje, což umožňuje jednodušší manipulaci při aplikaci na rostlinu a navíc je schopný se množit ve tkáních hostitele (Daungfu et al., 2019). Díky odolnosti spor by navíc mohla být zaručena delší trvanlivost biopesticidního přípravku. Bylo již provedeno značné množství experimentů, kde byly účinky rodu *Bacillus* testovány přímo na rostlinách (Romeiro et al., 2005; Liu et al., 2016). Otázkou ovšem zůstává, zda jsou buňky rodu *Bacillus* schopné efektivně přetrvávat na rostlině a jaké je nejvhodnější místo pro aplikaci biopesticidu (aplikace na list, či ke kořenům, nebo na semena) (Massomo et al., 2004). Bakteriální kmen *Bacillus* dokáže potlačit i již rozvinuté rostlinné onemocnění způsobené *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Daungfu et al., 2019). Také se nabízí možnost izolace sekundárních metabolitů z bakteriální kultury (Romeiro et al., 2010), to by ale znamenalo časově i finančně náročnější proces, než je přímá aplikace buněk.

I přes to, že biopesticidy by měly být šetrnější k životnímu prostředí a k lidskému zdraví než konvenční pesticidy, existuje možnost, že využívání mikroorganismů k biologické kontrole rostlinných škůdců a patogenů prostřednictvím sekundárních metabolitů může způsobovat další závažné problémy. Cílená biologická kontrola se může potýkat s následujícími problémy: Může docházet k interakci s ostatními mikroorganismy a tím by mohlo docházet k posunu biodiverzity v ekosystému (Cook et al., 1996; Scherwinski et al., 2008), případně by sekundární metabolity mohly působit toxicky na jiné než cílové organismy (Cook et al., 1996; Tabbene et al., 2011). Bylo také popsáno, že ošetřením semen bakteriemi rodu *Bacillus* může být snížena klíčivost semen (Wulff et al., 2002a). Přestože pro biologickou kontrolu jsou speciálně vybírány nepatogenní kmeny, je zde možnost, že by se mohly stát patogeny pro další organismy (Cook et al., 1996). Sekundární metabolity mikroorganismů by také mohly způsobovat alergické reakce u lidí a zvířat (Cook et al., 1996; Bernstein et al., 1999). V neposlední řadě také hrozí vznik rezistence proti biopesticidům (Tabashnik et al., 1990). Dalším problémem je riziko rozšíření geneticky modifikovaných organismů, jejichž užívání je v Evropské unii zakázáno (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 298/2008).

Vzhledem k tomu, že mnoho experimentů využívající bakterie rodu *Bacillus* jako antagonistu rostlinných onemocnění způsobené rodem *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, bylo testováno v polních podmínkách (Wulff et al., 2002b; Massomo et al., 2004; Mishra a Arora, 2012), je vysoce pravděpodobné, že by experiment prováděný v rámci této diplomové práce mohl být aplikovatelný i „*in vivo*“. Vzhledem k tomu, že *X. campestris* pv. *campestris* SU je přírodní izolát izolovaný z čínského zelí napadeného černou hnilobou, může být tento experiment blíže reálnému využití principu tohoto pokusu v zemědělství.

7. Souhrn

Všechny stanovené cíle pro tuto diplomovou práci se podařilo splnit:

- Bylo optimalizováno kultivační médium pro kultivaci jak jednotlivých kmenů *B. velezensis* a *X. campestris* pv. *campestris*, tak pro směsné kultury.
- Byly připraveny směsné kultury kmenů *B. velezensis* a *X. campestris* pv. *campestris* SU v různých poměrech inokulační suspenze buněk, během kultivace byly sledovány růstové parametry.
- Antagonistické účinky kmene *B. velezensis* na *X. campestris* pv. *campestris* SU v tekutém médiu byly potvrzeny výsevy směsné kultury na komplexním a selekční pevném médiu. Interakce byla charakterizována prostřednictvím počtu životaschopných buněk v kultuře.
- Inhibiční účinky kmene *B. velezensis* na *X. campestris* pv. *campestris* SU ve směsné kultuře byly charakterizovány metabolomickou analýzou. Bylo potvrzeno, že *B. velezensis* je producentem čtyř dominantních sekundárních metabolitů (surfaktin, fengycin, bacillibaktin a bacillomycin) s antimikrobiální aktivitou.
- Antimikrobiální působení *B. velezensis* na *X. campestris* pv. *campestris* SU bylo charakterizováno morfologickými změnami buněk *X. campestris* pv. *campestris* SU detekované SEM analýzou.
- Nebyly detekovány žádné inhibiční účinky rodu *Xanthomonas*.

8. Seznam použité literatury

- Akimoto-Tomiya, C., Furutani, A., Ochiai, H., 2014. Real time live imaging of phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* MAFF106712 in 'plant sweet home.' *PLoS ONE* 9, e94386. doi: 10.1371/journal.pone.0094386.
- Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., Jacques, P., 2018. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environ Sci Pollut. Res.* 25, 29910–29920. doi: 10.1007/s11356-017-0469-1.
- Altin, I., Casoli, L., Stefani, E., 2020. First report of bacterial spot caused by *Xanthomonas cucurbitae* on pumpkin in Italy. *New Dis. Rep.* 41, 21-21. doi: 10.5197/j.2044-0588.2020.041.021.
- Anderson, M., Habiger, J., 2012. Characterization and identification of productivity-associated rhizobacteria in wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4434–4446. doi: 10.1128/AEM.07466-11.
- Araya, M., Peña, C., Pizarro, F., Olivares, M., 2003. Gastric response to acute copper exposure. *Sci. Total Environ.* 303, 253–257. doi: 10.1016/S0048-9697(02)00495-3.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., Fickers, P., 2009. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microb. Cell Fact.* 8, 63. doi: 10.1186/1475-2859-8-63.
- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G., 1968. Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 488–494. doi: 10.1016/0006-291X(68)90503-2.
- Ashish, B., Neeti, K., Himanshu, K., 2013. Copper toxicity: A comprehensive study. *Res. J. Recent Sci.* 2, 58-67.
- Bais, H.P., Fall, R., Vivanco, J.M., 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134, 307–319. doi: 10.1104/pp.103.028712.
- Barriuso, J., Pereyra, M.T., García, J.A.L., Megías, M., Mañero, F.J.G., Ramos, B., 2005. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. *Microb. Ecol.* 50, 82–89. doi: 10.1007/s00248-004-0112-9.
- Ayed, H.B., Hmidet, N., Béchet, M., Chollet, M., Chataigné, G., Leclère, V., Jacques, P., Nasri, M., 2014. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochem.* 49, 1699–1707. doi: 10.1016/j.procbio.2014.07.001.
- Bernheimer, A.W., Avigad, L.S., 1970. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 61, 361–369. doi: 10.1099/00221287-61-3-361.
- Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., Bernstein, D.I., Lummus, Z., Selgrade, M.K., Doerfler, D.L., Seligy, V.L., 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.* 107, 575–582. doi: 10.1289/ehp.99107575.
- Birch, R.G., 2001. *Xanthomonas albilineans* and the antipathogenesis approach to disease control. *Mol. Plant Pathol.* 2, 1–11. doi: 10.1046/j.1364-3703.2001.00046.x.
- Birch, R.G., Patil, S.S., 1987. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30, 207–214. doi: 10.1016/0885-5765(87)90034-8.
- Birch, R.G., Patil, S.S.Y., 1985. Preliminary characterization of an antibiotic produced by *Xanthomonas albilineans* which inhibits DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1069–1075. doi: 10.1099/00221287-131-5-1069.
- Boottanun, P., Potisap, C., Hurdle, J.G., Sermswan, R.W., 2017. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express* 7, 16. doi: 10.1186/s13568-016-0302-0.
- Caquet, T., Roucaute, M., Le Goff, P., Lagadic, L., 2011. Effects of repeated field applications of two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target saltmarsh invertebrates in

- Atlantic coastal wetlands. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1122–1130.
doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.04.028.
- Chou, F.-L., Chou, H.-C., Lin, Y.-S., Yang, B.-Y., Lin, N.-T., Weng, S.-F., Tseng, Y.-H., 1997.** The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 265–269. doi: 10.1006/bbrc.1997.6365.
- Chowdhury, S.P., Uhl, J., Grosch, R., Alquéres, S., Pittroff, S., Dietel, K., Schmitt-Kopplin, P., Borriss, R., Hartmann, A., 2015.** Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 984–995.
doi: 10.1094/MPMI-03-15-0066-R.
- Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S.F., Quimby, P.C., Stack, J.P., Vaughn, J.L., 1996.** Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. *Biol. Control* 7, 333–351. doi: 10.1006/bcon.1996.0102.
- Das, A., Rangaraj, N., Sonti, R.V., 2008.** Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 73–85. doi: 10.1094/MPMI-22-1-0073.
- Daungfu, O., Youpensuk, S., Lumyong, S., 2019.** Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. *Trop. Life Sci. Res.* 30, 73–88.
doi: 10.21315/tlsr2019.30.1.5.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J., 1997.** Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soils* 24, 358–364. doi: 10.1007/s003740050258.
- Deleu, M., Paquot, M., Nylander, T., 2005.** Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.* 283, 358–365. doi: 10.1016/j.jcis.2004.09.036.
- Deng, Y., Wu, J., Yin, W., Li, P., Zhou, J., Chen, S., He, F., Cai, J., Zhang, L.-H., 2016.** Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition. *Environ. Microbiol.* 18, 1534–1545.
doi: 10.1111/1462-2920.13244.
- Deravel, J., Lemièrre, S., Coutte, F., Krier, F., Van Hese, N., Béchet, M., Sourdeau, N., Höfte, M., Leprêtre, A., Jacques, P., 2014.** Mycosubtilin and surfactin are efficient, low ecotoxicity molecules for the biocontrol of lettuce downy mildew. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 6255–6264. doi: 10.1007/s00253-014-5663-1.
- Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D.G., Skandalis, N., 2021.** Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere* 6, e0037621.
doi: 10.1128/mSphere.00376-21.
- Dow, J.M., Clarke, B.R., Milligan, D.E., Tang, J.L., Daniels, M.J., 1990.** Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2994–2998. doi: 10.1128/aem.56.10.2994-2998.1990.
- Dunlap, C.A., Bowman, M.J., Schisler, D.A., 2013.** Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of Fusarium head blight. *Biol. Control* 64, 166–175. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.11.002.
- Dunlap, C.A., Kim, S.-J., Kwon, S.-W., Rooney, A.P., 2016.** *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and “*Bacillus oryzicola*” are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 1212–1217.
doi: 10.1099/ijsem.0.000858.

- El Husseini, M.M., Bochow, H., Junge, H., 2012.** The biofertilising effect of seed dressing with PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 combined with two levels of mineral fertilising in African cotton production. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 45, 2261-2271. doi: 10.1080/03235408.2012.673259.
- Fravel, D.R., 2005.** Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337–359. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924.
- Gong, Q., Zhang, C., Lu, F., Zhao, H., Bie, X., Lu, Z., 2014.** Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food Control* 36, 8-14. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.034.
- González-Jaramillo, L.M., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Villegas-Escobar, V., Ortiz, A., 2017.** Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids Surf., B* 156, 114–122. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.021.
- Hanif, A., Zhang, F., Li, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M., Zhang, M., Jia, D., Zhao, X., Liang, J., Majid, T., Yan, J., Farzand, A., Wu, H., Gu, Q., Gao, X., 2019.** Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins* 11, 295. doi: 10.3390/toxins11050295.
- Hannay, C.L., 1953.** Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature* 172, 1004. doi: 10.1038/1721004a0.
- Heerklotz, H., Wieprecht, T., Seelig, J., 2004.** Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR. *J. Phys. Chem. B* 108, 4909–4915. doi: 10.1021/jp0371938.
- Hoffland, E., Hakulinen, J., van Pelt, J.A., 1996.** Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. *Phytopathology* 86, 757-762. doi: 10.1094/Phyto-86-757.
- Hoffmann, M., Mück, D., Grossmann, L., Greiner, L., Klausmann, P., Henkel, M., Lilge, L., Weiss, J., Hausmann, R., 2021.** Surfactin from *Bacillus subtilis* displays promising characteristics as O/W-emulsifier for food formulations. *Colloids Surf., B* 203, 111749. doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111749.
- Hornig, Y.-B., Yu, Y.-H., Dybus, A., Hsiao, F.S.-H., Cheng, Y.-H., 2019.** Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. *AMB Express* 9, 188. doi: 10.1186/s13568-019-0914-2.
- Huang, C.-J., Tsay, J.-F., Chang, S.-Y., Yang, H.-P., Wu, W.-S., Chen, C.-Y., 2012.** Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. *Pest Manage. Sci.* 68, 1306–1310. doi: 10.1002/ps.3301.
- Idris, E.E., Bochow, H., Ross, H., Borriss, R., 2004.** Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. phytohormone-like action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *J. Plant Dis. Prot.* 111, 583–597.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., Borriss, R., 2007.** Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 619–626. doi: 10.1094/MPMI-20-6-0619.
- Jin, P., Wang, H., Liu, W., Fan, Y., Miao, W., 2018.** A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation. *Pestic. Biochem. Physiol.* 147, 40–45. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.08.015.
- Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W., 2004.** Reclassification of the *Xanthomonads* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 755–762. doi: 10.1078/0723202042369884.
- Kakinuma, A., Hori, M., Isono, M., Tamura, G., Arima, K., 1969.** Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.* 33, 971–972. doi: 10.1271/bbb1961.33.971.

- Kang, S.-M., Radhakrishnan, R., Lee, I.-J., 2015.** *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 1517–1527. doi: 10.1007/s11274-015-1896-0.
- Kingsley, M.T., Gabriel, D.W., Marlow, G.C., Roberts, P.D., 1993.** The *opsX* locus of *Xanthomonas campestris* affects host range and biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 175, 5839–5850. doi: 10.1128/jb.175.18.5839-5850.1993.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C., Fall, R., 2003.** Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* 185, 5627–5631. doi: 10.1128/JB.185.18.5627-5631.2003.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980a.** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286, 885–886. doi: 10.1038/286885a0.
- Kloepper, J. W., Schroth, M.N., Miller, T.D., 1980b.** Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70, 1078-1082. doi: 10.1094/Phyto-70-1078.
- Kloepper, J.W., Tuzun, S., Kuć, J.A., 1992.** Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 349–351. doi: 10.1080/09583159209355251.
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., 2004.** Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* 186, 1084–1096. doi: 10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004.
- Landy, M., Rosenman, S.B., Warren, G.H., 1947.** An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *J. Bacteriol.* 54, 24. doi: 10.3181/00379727-67-16367.
- Lejon, D.P.H., Martins, J.M.F., Lévêque, J., Spadini, L., Pascualt, N., Landry, D., Milloux, M.-J., Nowak, V., Chaussod, R., Ranjard, L., 2008.** Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status. *Environ. Sci. Technol.* 42, 2819–2825. doi: 10.1021/es071652r.
- Leksomboon, C., Thaveechai, N., Kositratana, W., 2001.** Potential of plant extracts for controlling citrus canker of lime. *Nat. Sci.* 35, 392–396.
- Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J.-G., De Ley, J., 1984.** The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot. Rev.* 50, 308–356. doi: 10.1007/BF02862635.
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., Zhang, R., 2014.** Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* 5, 636. doi: 10.3389/fmicb.2014.00636.
- Liu, K., Garrett, C., Fadamiro, H., Kloepper, J.W., 2016.** Antagonism of black rot in cabbage by mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *BioControl* 61, 605–613. doi: 10.1007/s10526-016-9742-3.
- Liu, Y., Lu, J., Sun, J., Zhu, X., Zhou, L., Lu, Z., Lu, Y., 2019.** C16-fengycin A affect the growth of *Candida albicans* by destroying its cell wall and accumulating reactive oxygen species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 8963–8975. doi: 10.1007/s00253-019-10117-5.
- Loeffler, W., Tschen, J.S.-M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T.-F., S, M., Wu, T.-G., 1986.** Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115, 204–213. doi: 10.1111/j.1439-0434.1986.tb00878.x.
- López, D., Fischbach, M.A., Chu, F., Losick, R., Kolter, R., 2009.** Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 280–285. doi: 10.1073/pnas.0810940106.
- Luo, C., Zhou, H., Zou, J., Wang, X., Zhang, R., Xiang, Y., Chen, Z., 2015.** Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the

- biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1897–1910. doi: 10.1007/s00253-014-6195-4.
- Lv, J., Da, R., Cheng, Y., Tuo, X., Wei, J., Jiang, K., Monisayo, A.O., Han, B., 2020.** Mechanism of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 lipopeptide toward anaerobic *Clostridium difficile*. *BioMed Res. Int.* 2020, e3104613. doi: 10.1155/2020/3104613.
- Mácha, H., Marešová, H., Juříková, T., Švecová, M., Benada, O., Škríba, A., Baránek, M., Novotný, Č., Palyzová, A., 2021.** Killing Effect of *Bacillus velezensis* FZB42 on a *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc) Strain Newly Isolated from Cabbage *Brassica oleracea* Convar. *Capitata* (L.): A Metabolomic Study. *Microorganisms* 9, 1410. doi: 10.3390/microorganisms9071410.
- Maget-Dana, R., Ptak, M., 1995.** Interactions of surfactin with membrane models. *Biophys. J.* 68, 1937–1943. doi: 10.1016/S0006-3495(95)80370-X.
- Martínez-Hidalgo, P., García, J.M., Pozo, M.J., 2015.** Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Front. Microbiol.* 6, 922. doi: 10.3389/fmicb.2015.00922.
- Massomo, S.M.S., Mortensen, C.N., Mabagala, R.B., Newman, M.-A., Hockenhull, J., 2004.** Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *J. Phytopathol.* 152, 98–105. doi: 10.1111/j.1439-0434.2003.00808.x.
- May, J.J., Wendrich, T.M., Marahiel, M.A., 2001.** The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* 276, 7209–7217. doi: 10.1074/jbc.M009140200.
- Medeot, D.B., Fernandez, M., Morales, G.M., Jofré, E., 2020.** Fengycins from *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 exhibit antibacterial activity by producing alterations on the cell surface of the pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Front. Microbiol.* 10, 3107. doi: 10.3389/fmicb.2019.03107.
- Meena, K.R., Sharma, A., Kanwar, S.S., 2019.** Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 26, 423–433. doi: 10.1007/s10989-019-09848-w.
- Miethke, M., Marahiel, M.A., 2007.** Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 413–451. doi: 10.1128/MMBR.00012-07.
- Mishra, S., Arora, N.K., 2012.** Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 693–702. doi: 10.1007/s11274-011-0865-5.
- Mishra, J., Tewari S., Singh S., Arora N.K., 2015.** Biopesticides: Where we stand?. In: Arora N. (eds.): Plant microbes symbiosis: Applied facets. *Springer*, New Delhi, 37-75. doi: 10.1007/978-81-322-2068-8_2.
- Mohammadipour, M., Mousivand, M., Salehi Jouzani, G., Abbasalizadeh, S., 2009.** Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Can. J. Microbiol.* 55, 395–404. doi: 10.1139/W08-141.
- Monteiro, L., Mariano, R. de L.R., Souto-Maior, A.M., 2005.** Antagonism of *Bacillus spp.* against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 23–29. doi: 10.1590/S1516-89132005000100004.
- Morán, A.C., Martínez, M.A., Siñeriz, F., 2002.** Quantification of surfactin in culture supernatants by hemolytic activity. *Biotechnol. Lett.* 24, 177–180. doi: 10.1023/A:1014140820207.
- Müller, M., Deigle, C., Ziegler, H., 1989.** Hormonal interactions in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) and their effects on plant development. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 152, 247–254. doi: 10.1002/jpln.19891520217.

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 298/2008 ze dne 11. března 2008, kterým se mění nařízení (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech, pokud jde o prováděcí pravomoci svěřené Komisi, 2008., OJ L.
- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W., 2004.** Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Prot.* 23, 275–285. doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.001.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., Thonart, P., 2007.** Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* 9, 1084–1090. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x.
- Palyzová, A., Svobodová, K., Sokolová, L., Novák, J., Novotný, Č., 2019.** Metabolic profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2 in dual cultures with biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol. (Praha)* 64, 779–787. doi: 10.1007/s12223-019-00690-7.
- Pérez-García, A., Romero, D., de Vicente, A., 2011.** Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 187–193. doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.003.
- Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Delcambe, L., 1981.** Structure of bacillomycin D, a new antibiotic of the iturin group. *Eur. J. Biochem.* 118, 323–327. doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06405.x.
- Rajaofera, M.J.N., Kang, X., Jin, P.-F., Chen, X., Li, C.-C., Yin, L., Liu, L., Sun, Q.-H., Zhang, N., Chen, C.-Z., He, N., Xia, Q.-F., Miao, W.-G., 2020.** Antibacterial activity of bacillomycin D-like compounds isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 against *Burkholderia pseudomallei*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 10, 183–188. doi: 10.4103/2221-1691.280295.
- Ramachandran, R., Shrivastava, M., Narayanan, N.N., Thakur, R.L., Chakrabarti, A., Roy, U., 2017.** Evaluation of antifungal efficacy of three new cyclic lipopeptides of the class bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, e01457-17. doi: 10.1128/AAC.01457-17.
- Richard, D., Boyer, C., Lefeuvre, P., Canteros, B.I., Beni-Madhu, S., Portier, P., Pruvost, O., 2017.** Complete genome sequences of six copper-resistant *Xanthomonas* strains causing bacterial spot of solanaceous slants, belonging to *X. gardneri*, *X. euvesicatoria*, and *X. vesicatoria*, using long-read technology. *Genome Announc.* 5, e01693-16. doi: 10.1128/genomeA.01693-16.
- Ritchie, D.F., Dittapongpitch, V., 1991.** Copper- and streptomycin-resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.* 75, 733–736. doi: 10.1094/PD-75-0733.
- Romeiro, R.S., Lanna Filho, R., Vieira Junior, J.R., Silva, H.S.A., Baracat-Pereira, M.C., Carvalho, M.G., 2005.** Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *J. Phytopathol.* 153, 120–123. doi: 10.1111/j.1439-0434.2005.00941.x.
- Romeiro, R.S., Lanna Filho, R., Macagnan, D., Garcia, F., Silva, H.S.A., 2010.** Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. *Trop. Plant Pathol.* 35, 11–15. doi: 10.1590/S1982-56762010000100002.
- Ryan, R.P., Vorhölter, F.-J., Potnis, N., Jones, J.B., Van Sluys, M.-A., Bogdanove, A.J., Dow, J.M., 2011.** Pathogenomics of *Xanthomonas* : understanding bacterium–plant interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 344–355. doi: 10.1038/nrmicro2558.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., 2011.** *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol. J.* 9, 283–300. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x.
- Santos, C., Maximiano, M.R., Ribeiro, D.G., Oliveira-Neto, O.B., Murad, A.M., Franco, O.L., Mehta, A., 2017.** Differential accumulation of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* proteins during the interaction with the host plant: Contributions of an in vivo system. *Proteomics* 17, 1700086. doi: 10.1002/pmic.201700086.

- Sarwar, A., Hassan, M.N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A., Hafeez, F.Y., 2018. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiol. Res.* 209, 1–13. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.006.
- Scherwinski, K., Grosch, R., Berg, G., 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 106–116. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00421.x.
- Schoenly, K.G., Cohen, M.B., Barrion, A.T., Zhang, W., Gaolach, B., Viajante, V.D., 2003. Effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. *Environ. Biosaf. Res.* 2, 181–206. doi: 10.1051/ebr:2003013.
- Schuler, L.J., Hoang, T.C., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of copper in freshwater and saltwater ecosystems of South Florida. *Ecotoxicology* 17, 642–659. doi: 10.1007/s10646-008-0236-7.
- Sen, R., 1997. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68, 263–270. doi: 10.1002/(SICI)1097-4660(199703)68:3<263::AID-JCTB631>3.0.CO;2-8.
- Snook, M.E., Mitchell, T., Hinton, D.M., Bacon, C.W., 2009. Isolation and characterization of Leu7-surfactin from the endophytic bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a biocontrol agent for *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4287–4292. doi: 10.1021/jf900164h.
- Starr, M.P., Jenkins, C.L., Bussey, L.B., Andrewes, A.G., 1977. Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated aryl-polyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. *Arch. Microbiol.* 113, 1–9. doi: 10.1007/BF00428572.
- Sutton, J.C., Williams, P.H., 1970. Relation of xylem plugging to black rot lesion development in cabbage. *Can. J. Bot.* 48, 391–401. doi: 10.1139/b70-056.
- Swings, J., Van Den Mooter, M., Vauterin, L., Hoste, B., Gillis, M., Mew, T.W., Kersters, K.Y., 1990. Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 40, 309–311. doi: 10.1099/00207713-40-3-309.
- Szulc, A., Ambrożewicz, D., Sydow, M., Ławniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., Chrzanowski, Ł., 2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *J. Environ. Manage.* 132, 121–128. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.11.006.
- Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N., Johnson, M.W., 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*). *J. Econ. Entomol.* 83, 1671–1676. doi: 10.1093/jee/83.5.1671.
- Tabbene, O., Kalai, L., Slimene, I.B., Karkouch, I., Elkahoui, S., Gharbi, A., Cosette, P., Mangoni, M.-L., Jouenne, T., Limam, F., 2011. Anti-*Candida* effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38. *FEMS Microbiol. Lett.* 316, 108–114. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02199.x.
- Tabbene, O., Di Grazia, A., Azaiez, S., Slimene, I.B., Elkahoui, S., Alfeddy, M.N., Casciaro, B., Luca, V., Limam, F., Mangoni, M.L., 2015. Synergistic fungicidal activity of the lipopeptide bacillomycin D with amphotericin B against pathogenic *Candida* species. *FEMS Yeast Res.* 15, fov022. doi: 10.1093/femsyr/fov022.
- Torres, M.J., Petroselli, G., Daz, M., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., 2015. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against Gram-positive foodborne pathogenic bacteria: UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 929–940. doi: 10.1007/s11274-015-1847-9.
- Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1151–1160. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x.

- Tushemereirwe, W., Kangire, A., Ssekiwoko, F., Offord, L.C., Crozier, J., Boa, E., Rutherford, M., Smith, J.J., 2004.** First report of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* on banana in Uganda. *Plant Pathol.* 53, 802–802. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01090.x.
- Vairagkar, U., Mirza, Y., 2021.** Antagonistic activity of antimicrobial metabolites produced from seaweed-associated *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 10456 against *Malassezia* spp. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 13, 1228-1237. doi: 10.1007/s12602-021-09742-2.
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G., 1986.** Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot. (Tokyo)* 39, 888–901. doi: 10.7164/antibiotics.39.888.
- Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Lin, Q., Chen, X., Chen, Y., 2007.** The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 75–81. doi: 10.1016/j.ecoenv.2006.03.007.
- Williams, P.H., Staub, T., Sutton, J.C., 1972.** Inheritance of resistance in cabbage to black rot. *Phytopathology* 62, 247–252. doi: 10.1094/Phyto-62-247.
- Wu, T., Chen, M., Zhou, L., Lu, F., Bie, X., Lu, Z., 2020.** Bacillomycin D effectively controls growth of *Malassezia globosa* by disrupting the cell membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 3529–3540. doi: 10.1007/s00253-020-10462-w.
- Wulff, E. G., Mguni, C.M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., Hockenhull, J., 2002a.** Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 51, 574–584. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x.
- Wulff, E.G., Mguni, C.M., Mortensen, C.N., Keswani, C.L., Hockenhull, J., 2002b.** Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of *Brassicaceae* with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 317–325. doi: 10.1023/A:1015671031906.
- Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., Zhang, R., 2013.** Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 808–815. doi: 10.1128/AEM.02645-12.
- Zhang, C., Lv, M., Yin, W., Dong, T., Chang, C., Miao, Y., Jia, Y., Deng, Y., 2019.** *Xanthomonas campestris* promotes diffusible signal factor biosynthesis and pathogenicity by utilizing glucose and sucrose from host plants. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 32, 157–166. doi: 10.1094/MPMI-07-18-0187-R.

9. Přílohy

9.1. Příloha 1: Publikované výsledky



Article

Killing Effect of *Bacillus velezensis* FZB42 on a *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc) Strain Newly Isolated from Cabbage *Brassica oleracea* Convar. *Capitata* (L.): A Metabolomic Study

Hynek Mách a^{1,2}, Helena Marešová¹, Tereza Juříková¹, Magdaléna Švecová¹, Oldřich Benada¹ , Anton Škriba¹ , Miroslav Baránek³ , Čeněk Novotný¹ and Andrea Palyzová^{1,*}

¹ Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Videňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic; hynek.macha@biomed.cas.cz (H.M.); maresova@biomed.cas.cz (H.M.); tereza.jurikova@biomed.cas.cz (T.J.); majdulas@seznam.cz (M.Š.); benada@biomed.cas.cz (O.B.); anton.skriba@biomed.cas.cz (A.Š.); novotny@biomed.cas.cz (Č.N.)

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic

³ Faculty of Horticulture-Mendeleum, Mendel University, Valtická 337, 69144 Lednice, Czech Republic; baranek@mendelu.cz

* Correspondence: palyzova@biomed.cas.cz; Tel: +420-241062617



Citation: Mách a, H.; Marešová, H.; Juříková, T.; Švecová, M.; Benada, O.; Škriba, A.; Baránek, M.; Novotný, Č.; Palyzová, A. Killing Effect of *Bacillus velezensis* FZB42 on a *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* (Xcc) Strain Newly Isolated from Cabbage *Brassica oleracea* Convar. *Capitata* (L.): A Metabolomic Study. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1410. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071410>

Academic Editors: Innocenzo Mazzalupo and Adriana Ada Chiappetta

Received: 27 May 2021

Accepted: 25 June 2021

Published: 29 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 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: The potential use of *Bacillus velezensis* FZB42 for biological control of various phytopathogens has been documented over the past few years, but its antagonistic interactions with xanthomonads has not been studied in detail. Novel aspects in this study consist of close observation of the death of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* cells in a co-culture with *B. velezensis* FZB42, and quantification of lipopeptides and a siderophore, bacillibactin, involved in the killing process. A new robust Xcc-SU isolate tolerating high concentrations of ferric ions was used. In a co-culture with the antagonist, the population of Xcc-SU was entirely destroyed within 24–48 h, depending on the number of antagonist cells used for inoculation. No inhibitory effect of Xcc-SU on *B. velezensis* was observed. Bacillibactin and lipopeptides (surfactin, fengycin, and bacillomycin) were present in the co-culture and the monoculture of *B. velezensis*. Except for bacillibactin, the maximum contents of lipopeptides were higher in the antagonist monoculture compared with the co-culture. Scanning electron microscopy showed that the death of Xcc-SU bacteria in co-culture was caused by cell lysis, leading to an enhanced occurrence of distorted cells and cell ghosts. Analysis by mass spectrometry showed four significant compounds, bacillibactin, surfactin, fengycin, and bacillomycin D amongst a total of 24 different forms detected in the co-culture supernatant. Different forms of surfactin and fengycin with variations in their side-chain length were also detected. These results demonstrate the ability of *B. velezensis* FZB42 to act as a potent antagonistic strain against Xcc.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; *Bacillus velezensis* FZB42; antagonism; cyclic lipopeptides; siderophore; killing effect; metabolomic analysis

1. Introduction

The bacterial genus *Xanthomonas* includes phytopathogens that can be encountered worldwide and cause diseases of various economically important vegetable species. The bacterial species *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) causes black rot in cruciferous vegetables, a disease responsible for severe economic losses [1]. Generally, the control of infections is mainly achieved with chemical pesticides, less susceptible plant varieties, and by destroying the contaminated plants. Biological control is an ecological-friendly alternative, less toxic for non-target species, and with the potential to suppress resistant pathogens [2,3].

Bacillus spp. is a group of bacteria widely used in biocontrol research, and commercial formulations are available on the biopesticide market [4]. Several strains of the genus *Bacillus* exhibit biological control activity against plant pathogens, including Xcc [1,5]. *B. amyloliquefaciens* strains were reported to antagonize *X. citri* sbsp. *citri* [6], *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* [7], and *X. campestris* pv. *campestris* [8,9]. *B. velezensis* strain FZB42 (formerly *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42) has become the Gram-positive prototype for biocontrol of plant pathogens [4].

Almost 10% of the *B. velezensis* FZB42 genome is involved in the synthesis of antimicrobial compounds, the principal ones being the lipopeptides surfactin, bacillomycin D, and fengycin [10]; and polyketides bacillaene, macrolactin, and difficidin [11]. The production of bioactive and surfactant compounds occurs during the late growth phase and can be stimulated by plant pathogens [12,13]. All secondary metabolites produced by *B. velezensis* FZB42 are summarized in the review of Fan and coworkers [4]. Studies in vitro suggest that the antifungal activity of this bacterium is mainly due to the synthesis of the cyclic lipopeptides fengycin and bacillomycin D, whereas antibacterial activity is due to the production of polyketides, bacilysin, and bacteriocins. Difficidin, macrolactin, and bacillaene also possess antibacterial activity [14,15].

The cyclic lipopeptide surfactin, produced by many *Bacillus* species, is one of the most effective biosurfactants. As a molecule of amphiphilic nature, it destabilizes membranes and disturbs their integrity [16]. The antibacterial activity of surfactin inhibits the growth of bacterial pathogens, e.g., *Pseudomonas syringae* [17], *X. axonopodis* pv. *glycines* [18], *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* [19], or has a bactericidal effect, e.g., *Clostridium perfringens* [20], *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, and *S. aureus* [21]. Fengycin was demonstrated to have an inhibitory effect on fungal growth, e.g., on *Fusarium graminearum* [22], *F. moniliforme* [23], *Venturia inaequalis* [24], or on conidia germination, e.g., *Podosphaera fusca* [25] and *Plasmopara viticola* [26]. Interestingly, the effect of fengycin was promoted in the presence of surfactin [24,26]. Fengycin also changes the hyphal morphology of *F. graminearum* [22]. Medeot and coworkers [27] reported that fengycins from *B. amyloliquefaciens* MEP218 also exhibited antibacterial activity by exerting a bactericidal effect on *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and *P. aeruginosa*.

The third major lipopeptide produced by *B. velezensis* FZB42, bacillomycin D, was identified as a potent antifungal metabolite against a spectrum of fungi [28]. It was reported to inhibit mycelial growth, sporulation, and spore germination of *Aspergillus flavus*, causing damage to the cell walls and membranes of the fungal hyphae and spores [29]. Similar effects of bacillomycin D isolated from *B. velezensis* HN-2 on the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* were described by Jin and coworkers [30]. An interesting synergistic fungicidal activity of bacillomycin D, isolated from *B. subtilis* B38, with the polyene amphotericin B against *Candida albicans*, was also reported [31]. However, the adverse effects of bacillomycin are not limited to fungal organisms. Antibacterial activity of a bacillomycin D-like cyclic lipopeptide, bacillomycin DC, isolated from *B. amyloliquefaciens* HAB-2, against the bacterium *Burkholderia pseudomallei*, was reported. The compound inhibited growth of the pathogen and caused a roughening of the cell surface and damage to the cell membrane [32]. Another major non-ribosomal peptide, produced by *B. velezensis*, is bacillibactin, which acts as a catechol-type siderophore for the compartmentalization of iron in competition with other microbial cohabitants [14].

Xcc is a rod-shaped, non-sporulating, Gram-negative, motile bacterium with an optimum growth temperature of 25–30 °C. The Xcc infection of cruciferous crops is characterized by yellow V-shaped lesions, progressing from leaf margins to the center through vascular tissue, and by the darkening of veins resulting in wilting and leaf necrosis [33]. Xcc produces an α -hydroxycarboxylate-type siderophore named xanthoferrin that is required for growth under low-iron conditions and optimal virulence [34]. Generally, xanthomonads are believed not to produce secondary metabolites with antibiotic activity. Despite that, they are able to negatively influence other microorganisms cohabiting their environment, as is documented in the following examples. *X. campestris* pv. *vitisans* was shown to reduce

the bacterial population of lettuce-leaf microbiota [35]. In an antagonistic interaction with *B. thuringiensis* in a mixed culture, Xcc was able to interfere with cell division and sporulation of *B. thuringiensis* by producing diffusible signaling factors [36]. *X. perforans* was found to produce different bacteriocin-like compounds that were antagonistic toward its phytopathogenic competitor *X. euvesicatoria* [37]. *X. albilineans* was found to produce the pathotoxin albicidin which, in addition to its crucial role in pathogenesis and development of disease symptoms in the sugarcane plant host, also inhibits prokaryotic DNA replication and exhibits a bactericidal effect against a range of Gram-positive and Gram-negative bacteria [38].

Various *B. velezensis* strains were demonstrated to inhibit the growth of *X. campestris* pv. *campestris* in confrontation experiments on agar medium [2,39]. The purpose of our study was to analyze the inhibitory action of *B. velezensis* FZB42 on the growth of *X. campestris* pv. *campestris* under in vitro conditions in a dual liquid-medium culture and provide evidence of antagonist metabolites involved in the destruction of the Xcc population and the kinetics of bacterial elimination. A new strain to be used in our study, Xcc-SU, was isolated from a cabbage field massively attacked by an Xcc infection, and we will conduct an antagonistic study with a fresh Xcc isolate not affected by lengthy conservation. The biochemical and molecular genetic characteristics of the novel Xcc strain were obtained and used for its taxonomical classification. The conditions of the dual culture of *B. velezensis* FZB42 and Xcc-SU were optimized with respect to the proportion of the two microbes used for inoculation. The antagonistic interaction was investigated over time by measuring viable counts of the two microorganisms and carrying out the metabolomic analysis, including quantification of crucial secondary metabolites produced by *B. velezensis* FZB42.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and Growth Media

Bacillus velezensis FZB42 (DSMZ 23117) was obtained from DSMZ collection (Braunschweig, Germany). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692), *P. fluorescens* (ATCC 13525), and *P. putida* B10 (ATCC 39169) were purchased from the ATCC collection (Manassas, VA, USA), and *Pseudomonas* sp. DF was isolated from the activated sludge (Třeboň, wastewater treatment plant, Czech Republic) and classified at the Institute of Microbiology of the Czech Academy Sciences, Prague. The *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) strains Xcc 3811, Xcc 1279A, and Xcc 3871A were purchased from the NCTC collection (University of Warwick, UK). The Xcc-SU strain was isolated from an infested cabbage field in north Bohemia (coordinates: 50.5872317N latitude, 15.0433481E longitude). The yeast *Kluyveromyces lactis* IFO 1267 (killer-toxin + strain) was a gift from the Department of Microbiology and Genetics, Charles University, Prague.

The media used for growth were Luria-Bertani broth (LB, g/L: 10 tryptone, 5 yeast extract, 10 NaCl, pH 7.0) or Bushnell-Haas medium (BH, g/L: 0.2 MgSO₄·7H₂O, 0.02 CaCl₂·2H₂O, 1 K₂HPO₄, 1 KH₂PO₄, 1 NH₄NO₃, 5 glucose, pH 7.0) containing a high (200 µM) or low (8 µM) Fe³⁺ concentration. For antagonistic studies, a mineral medium was used (M9, g/L: 0.5 NaCl, 3.0 KH₂PO₄, 14.62 Na₂HPO₄, and 1.0 NH₄Cl, pH 7.0) supplemented with glucose (5 g/L) and trace elements (M9TE, mg/L: 200 MgSO₄·7H₂O, 10 CaCl₂·2H₂O, 2.16 FeCl₃·6H₂O). A selective culture medium MCS (mCS20ABN, Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands) supplemented with bile salt No.3 (0.5 g/L, Difco) was used to identify Xcc strains in dual cultures. In order to solidify the medium for dual cultures (BH and MCS) or short-term strain maintenance (LB), 22 g/L of agar was added.

2.2. Isolation and Taxonomy of the Newly Isolated Xcc-SU Strain

Leaf samples of napa cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) were cut into pieces 2 cm long and placed in a 500 mL flask containing 50 mL of LB medium. The content was shaken for 4 h at 28 °C, and the isolated bacteria were spread by serial dilution in LB medium onto Petri plates. The plates were incubated at 28 °C for 48 h. Monocolony isolates were picked and maintained for biochemical and genetic studies. Molecular identification

was carried out by sequencing the 16S rRNA gene amplified by polymerase chain reaction using a universal primer set (Fwd27 and Rev1492). Total DNA was isolated from the bacterium using a QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany). PCR amplicons were purified using a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Basel, Switzerland), following the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences were determined by sequencing on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), edited by Chromas Lite software (Technelysium Pty Ltd., Brisbane, Australia), and assembled using SeqMan (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA). The search for 16S rRNA gene sequence similarity was performed using the GenBank data library and the BLASTN program (NCBI, Bethesda, MD, USA). Physiological and biochemical characterizations were carried out by the Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University, Brno.

2.3. Antagonism Assays on Solid Medium

The antagonistic effects of *B. velezensis* FZB42, *K. lactis* IFO 1267, *P. aeruginosa* PAO1, *P. fluorescens*, *P. putida* B10, and *Pseudomonas* sp. DF on the collection of Xcc strains 3811, 1279A, and 3871A, and on the natural isolate, Xcc-SU, were measured using the dual-culture technique on BH agar medium. Xcc was spread on the agar surface, and, simultaneously, the antagonist bacterium was inoculated at the center of the plate using a drop (10 µL) of a fresh culture (10^8 CFU/mL) grown in LB medium. Monoculture BH plates inoculated with either the antagonist or the pathogenic strain served as the controls. All plates were incubated at 28 °C for 7 days. The antagonistic effect was visualized as a halo zone formed around the antagonist colony. The experiments were carried out in three replicates.

2.4. Antagonism Assay in Liquid-Medium Culture

Growth inhibition of Xcc-SU was tested in a dual culture with *B. velezensis* FZB42 in liquid M9TE medium. The inoculum was prepared in two stages. The primary inoculum of each bacterium was obtained by inoculating 100 mL of LB medium with a vial (1 mL) of a glycerol-stock bacterial culture and subsequent incubation on an orbital shaker (200 rpm) for 24 h at 28 °C. The overnight culture was centrifuged, washed, and resuspended in M9 medium and then inoculated into 100 mL of M9TE medium and incubated at 28 °C for 24 h. The fresh bacterial suspensions of *B. velezensis* and Xcc-SU, both harvested in the exponential growth phase and adjusted to a final concentration of 10^8 CFU/mL, were used for inoculation of the dual culture using respective ratios of 1:3, 1:15, or 1:100 CFU/mL. The total volume of the dual culture was 100 mL of M9TE medium and was incubated into a 500-mL culture flask and agitated on an orbital shaker (200 rpm) at 28 °C. A monoculture of each strain, incubated under similar conditions, was used as the control. Samples were collected during growth to measure the culture density as absorbance at 600 nm (A_{600}), pH, and colony-forming units (CFU) of both microorganisms. The samples used for the metabolomic analysis were centrifuged to obtain the supernatant, and this was lyophilized before analysis. All experiments were conducted in duplicate.

2.5. Scanning Electron Microscopy Analysis

Samples removed from the dual culture were fixed (3% glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) for 48–96 h at 4 °C. They were centrifuged ($14,300 \times g$, 5 min, room temperature), and the sediment was resuspended in 500 µL of 3% glutaraldehyde and fixed overnight. After fixation, the samples were centrifuged again ($12,000 \times g$, 5 min, room temperature) and washed with cacodylate buffer (20 min, three times). The cells were sedimented onto poly-L-lysine-treated glass coverslips for 24 h at 4 °C. The coverslips were then washed with double-distilled water at room temperature, post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h, washed again with ddH₂O (20 min, three times), dehydrated in a graded ethanol series and absolute acetone, and critical-point dried (K850, Quorum Technologies Ltd., Ringmer, UK). The dried coverslips were mounted onto aluminum specimen stubs using Wire Glue (Anders Products, Andover, MA, USA) and sputter-coated with 3 nm of platinum in a high-resolution Turbo-Pumped Sputter Coater Q150T (Quorum Technologies

Ltd., Ringmer, UK). The samples were examined using an FEI Nova NanoSEM scanning electron microscope (FEI, Brno, Czech Republic) at 3 or 5 kV using Everhart–Thornley Detector (ETD), Circular Backscatter Detector (CBS), and Through the Lens Detector (TLD).

2.6. Metabolite Extraction

Culture samples were removed at 12-h intervals. The supernatants were obtained by centrifugation ($10,000\times g$, 10 min, 4 °C), decanting, and subsequent lyophilization. The lyophilized supernatants were dissolved in 50% LC-MS-grade acetonitrile (Honeywell CHROMASOLV™, VWR, Stříbrná Skalice, Czech Republic) to a final concentration of 1 mg/mL. A volume of 100 µL of the dissolved sample was then mixed with 400 µL of methanol (Honeywell CHROMASOLV™, VWR, Stříbrná Skalice, Czech Republic) and deep-frozen (30 min, -80 °C). The precipitates were removed by centrifugation ($14,000\times g$, 10 min, 4 °C), and the supernatants were transferred to a new microcentrifuge vial and dried using a Savant SpeedVac vacuum concentrator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 2 h at 35 °C. The dried samples were dissolved in 100 µL of 50% LC-MS-grade acetonitrile.

2.7. Metabolite Separation, Identification, and Quantitation

Samples were analyzed by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) using the external calibration curve method. Surfactin, fengycin, and bacillomycin were quantified using a Waters Acquity M-class HPLC system connected to a Synapt G2-Si Q-TOF mass spectrometer (Waters Corporation, Manchester, UK). Each sample (1 µL) was injected in triplicate onto an Acquity HSS T3 C18 analytical column (1.8 µm, 1.0×150 mm, Waters Corporation, Manchester, UK) kept at 40 °C. Analytes were separated using A/B solvent mixture with gradient elution (flow rate 50 µL/min) under the following conditions: 0 min (5% B); 2 min (5% B); 7 min (99% B); 14 min (99% B); 14.5 min (5% B); and 20 min (5% B). Solvent A contained 0.1% formic acid water solution, and solvent B contained 0.1% formic acid in acetonitrile.

Higher sensitivity was needed for bacillibactin quantification. Therefore, a Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) connected to a Solarix 12T Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) was used. Samples (2 µL) were injected on the same Acquity column in triplicate. Gradient elution of bacillibactin was performed at 50 µL/min flow rate: 0 min (2% B); 2 min (2% B); 9 min (60% B); 11 min (99% B); 14 min (99% B); 14.5 min (2% B); 20 min (2% B). Solvent A contained 0.1% formic acid and 1% acetonitrile in water, and solvent B contained 0.1% formic acid and 5% water in acetonitrile.

Both mass spectrometers were operated in positive-ion mode. Ions were generated by electrospray ionization and the ion transfer optics were tuned to the highest intensity of standards. The mass spectra were collected in the 500–1600 *m/z* window with mass accuracy better than 50 ppm for Synapt and the 500–1500 *m/z* window with mass error better than 5 ppm for Solarix, respectively. All metabolites were identified by a combination of retention time, precise mass-to-charge ratio, and collision-induced dissociation experiments. Qualitative and quantitative data processing was performed by CycloBranch [40] version 2.0.8 (Prague, Czech Republic), Waters MassLynx 4.1 (Manchester, UK), and Bruker DataAnalysis 5.0 software (Bremen, Germany).

Surfactin and fengycin standards were obtained from Sigma-Aldrich (Czech Republic). Bacillibactin was purchased from EMC Microcollections (Tübingen, Germany). The external matrix match calibration curves were prepared from lyophilized growth medium spiked with commercial standards. Surfactin and fengycin standards were represented by several forms with variations in aliphatic side-chains, therefore, the sums of all forms were used in the construction of calibration curves, including the limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ). Semi-quantification of bacillomycin D was performed based on the fengycin standard calibration curve. The LOD and LOQ for bacillibactin, surfactin and fengycin were defined as the sum of the background average with 3 (LOD) and 10 (LOQ)

multiples of standard deviation. The LOD and LOQ calculated from the bacillibactin, surfactin, and fengycin signal-to-noise ratios were 1.9 and 4.5 ng/mL; 1.1 and 3.2 ng/mL; and 1.6 and 4.1 ng/mL, respectively.

3. Results and Discussion

3.1. Characterization and Identification of Xcc-SU

Out of eight monoclonies, cabbage-leaf isolates of the same morphological appearance were grown on LB agar medium and a single colony was selected and designated as strain Xcc-SU. It was characterized to be a Gram-negative, rod-shaped (in irregular clusters) aerobic bacterium. The colonies grown on nutrient Tryptic soy agar were circular, smooth, and glossy with a raised center. The optimum temperature for growth was in the range of 20–30 °C. The biochemical characteristics included positive biochemical results: catalase, oxidase; growth in Simons citrate; hydrolysis of gelatin, starch, Tween 80, aesculin, casein, and lecithin; and production of acids from mannitol, glucose, fructose, and xylose. Negative results: acid fermentation from glucose; production of fluorescein, arginine dihydrolase; hydrolysis of tyrosine; decarboxylation of tyrosine and ornithine; and growth in the presence of 6.5% NaCl. The molecular classification of Xcc-SU was carried out using 1.5 kb of the 16S rRNA sequence, which was amplified from the total DNA of the strain. The BLAST search showed that the strain belonged to the family *Xanthomonadaceae* and the genus *Xanthomonas*. The partial nucleotide sequence of 16S rRNA region (about 1350 nucleotides) showed a homologous identity (over 99%) with *X. campestris* pv. *campestris* (GenBank accession number NC_003902.1). The strain was designated as *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* SU and the sequence of the 16S rRNA gene was deposited in the GenBank database under accession number MZ182354.

3.2. Characterization of Xcc Strains and Dual-Culture Agar Diffusion Bioassay

Properties of Xcc strains obtained from the NCTC collection and the newly isolated Xcc-SU strain were compared by testing their growth in BH medium pH7 containing glucose as the carbon and energy source and at high (200 µM) or low (8 µM) Fe³⁺ concentrations. Iron concentration is a factor that contributes to antagonistic interactions between microbes due to the competitive actions of siderophores [12,41], so we tested Xcc strains for their Fe³⁺ dependence.

Strains Xcc-1279A and Xcc-SU showed smaller growth inhibition zones when exposed to *B. velezensis* at 200 µM, compared to 8 µM Fe³⁺ (Figure 1A), which indicated a smaller antagonistic effect at the high iron concentration. In the case of Xcc-3871A and Xcc-3811 strains (Figure 1B), a similar size of inhibition zones was observed at both Fe³⁺ concentrations. As the siderophore bacillibactin was produced by *B. velezensis* FZB42 (see Figure 2), the results may indicate an active role of bacillibactin in the suppression of Xcc growth in solid medium by making Fe³⁺ ions unavailable to Xcc. In the case of the abundance of Fe³⁺ at 200 µM, the production of bacillibactin was reduced [42], and the effect of the siderophore was much less important. Mostly, the lipopeptides surfactin, fengycin, and bacillomycin (see Figure 2) were responsible for the inhibition of Xcc growth. High xanthan production has been shown to play a role in the antibiotic resistance of Xcc, and this effect could take place at the high Fe³⁺ concentration [43,44]. We can hypothesize that strains Xcc 3811 and Xcc 3871A produced less xanthan material than strains Xcc 1279A and Xcc SU, resulting in a less efficient protection against the lipopeptides of the antagonist, which could explain the different sizes of the inhibition zones observed with the two groups of Xcc strains at 200 µM Fe³⁺ [43,45].

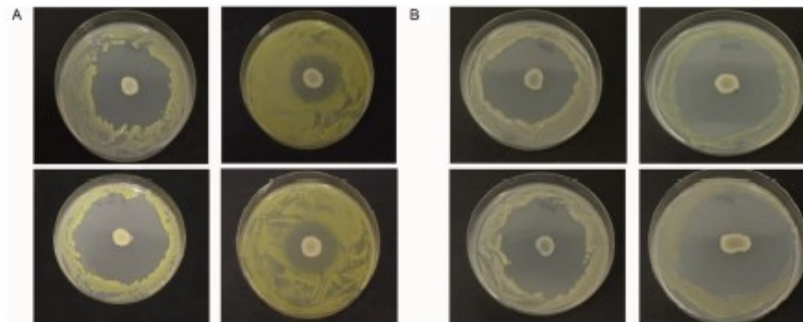


Figure 1. Inhibition of growth of Xcc strains by *B. velezensis* FZB42 on BH agar medium at $8 \mu\text{M Fe}^{3+}$ (left column) and $200 \mu\text{M Fe}^{3+}$ (right column): (A) top, Xcc 1279A; bottom, Xcc SU; (B) top, Xcc 3811; bottom, Xcc 3871A.

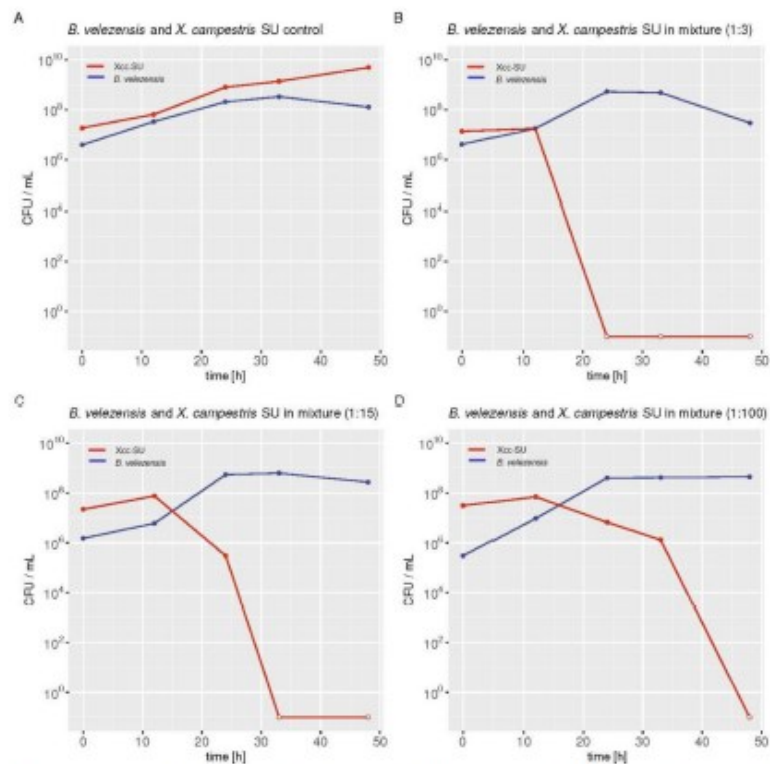


Figure 2. Xcc-SU dying rates in dual cultures with *B. velezensis* FZB42 grown in liquid medium. The ratios of *B. velezensis* to *X. campestris* SU at the time of inoculation was 1:3 (B), 1:15 (C), and 1:100 (D) in CFU/mL. (A) Representative growth curves of both microorganisms in control monocultures. The individual values in the graphs show the arithmetic means of CFU/mL measured at a given time in two independent cultures. The open dots in the Xcc plots indicate that no living Xcc bacteria were detected in the dual culture. R Core Team (2021) [46] free software environment for statistical computing and graphics was used for graphical presentation of the data. *B. velezensis* FZB42, blue line; Xcc-SU, red line.

When pseudomonas strains were used to inhibit Xcc under similar conditions, the inhibitory effect was extremely weak, with *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* slightly inhibiting Xcc-1279A or Xcc-SU and *Pseudomonas* sp. DF1 inhibiting strains Xcc-3811 or Xcc-3871A. No inhibition was observed with *P. putida* and the yeast *K. lactis* IFO 1267. The Xcc-SU strain was chosen for the biocontrol metabolomic study with *B. velezensis* FZB42, because it was a phytopathogenic strain freshly isolated from a field massively struck by bacterial infection and exhibiting robust growth.

3.3. Microbial Interaction in the Dual Liquid Medium Culture of *B. velezensis* FZB42 and Xcc-SU

The inhibitory effect of *B. velezensis* FZB42 on the phytopathogen was studied in M9TE medium supplemented with glucose as a source of carbon and energy at a low Fe^{3+} concentration of 8 μM . To study the antagonistic effect, the low iron concentration was chosen based on the previous inhibition analyses. The doubling times of *B. velezensis* FZB42 and Xcc-SU in M9TE medium were 3 and 6 h, respectively. In order to follow the inhibitory effect in batch cultivation over time, the proportion of both microorganisms used for inoculation had to be optimized. The overnight inocula of both microorganisms were used to inoculate single and mixed cultures of *B. velezensis* with Xcc-SU at three different ratios (1:3, 1:15, and 1:100 CFU/mL). Figure 2 documents the time course of the killing effect of *B. velezensis* on Xcc-SU in the different inoculation ratios of *B. velezensis* to Xcc-SU. Killing was proportional to the ratios of the organisms at inoculation. When the concentration of *B. velezensis* was 100 times lower than that of Xcc-SU, the population of Xcc was eliminated within 48 h. When the antagonistic culture was only three times lower, Xcc was not detectable in the culture after a period of 24 h. The ratio of *B. velezensis*/Xcc-SU of 1:100 CFU/mL was chosen as the most suitable for further study.

In the dual culture, *B. velezensis* FZB42 achieved a total growth yield similar to that in its monoculture within 24 h. The number of viable cells did not decline until the end of cultivation. The monoculture of *B. velezensis* reached its maximum specific growth rate of $0.14 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ within 24 h. No inhibitory effect of Xcc-SU on *B. velezensis* was observed. In the control monoculture, Xcc-SU reached a specific growth rate of $0.12 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$ and maximal growth yield approaching $5.0 \pm 0.2 \times 10^9$ within 48 h. A two-fold decrease in the number of living cells of Xcc-SU was observed when the incubation continued until 96 h.

3.4. Detailed Analysis of Biocontrol Metabolites Produced by *B. velezensis* FZB42 in the Dual Culture with Xcc-SU

The MS analysis revealed four compounds, bacillibactin, surfactin, fengycin, and bacillomycin D, in 24 different forms (Supplementary Table S1) in the cell-free supernatant. The biocontrol siderophore and lipopeptide metabolites were present in both the dual culture and in the monoculture of *B. velezensis* (Figure 3). All metabolites were present until at least the 48th hour of cultivation so that they could contribute to the annihilation of the Xcc-SU population (cf. Figure 2). The observed bactericidal effect is in accordance with the antagonistic studies where various *Bacillus* antagonists were used for the biological control of bacterial and fungal phytopathogens. For instance, the bactericidal effect of fengycins from *B. amyloliquefaciens* MEP218 on *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and *P. aeruginosa* PA01 was documented by Medeot et al. [27]. Our analyses showed that the 13 ionic forms belong to the lipopeptide fengycin (Supplementary Table S1). Using MS/MS analysis of the doubly charged ion with an m/z 732.406 (4A,4B in Supplementary Figure S1), we identified fengycin A with a C16 side-chain. Other forms with variations in the side-chain were confirmed based on the same retention time as their standards or an exact mass. In addition to the metabolite mentioned above, the other compound with an m/z 1036.697 (2A,2B in Supplementary Figure S1) was detected and identified as the lipopeptide surfactin with a C12 side-chain. Based on the same retention time with the surfactin standard, we confirmed the presence of other forms with variations in side-chain length (Supplementary Table S1). Interestingly, growth-inhibitory and morphology-modification effects induced by a combination of fengycin and surfactin on the ascomycete fungus *Venturia inaequalis* were observed, suggesting a possible synergistic effect [24,47]. Similarly, both surfactin

and fengycin contributed to the activity of *B. subtilis* supernatant against the oomycete *Plasmopara viticola* [26]. Further, our data showed several signals in dual cultures associated with the presence of bacillomycin D. Using MS/MS, we identified the ion with m/z 1031.548 (1A,1B in Supplementary Figure S1) as bacillomycin D with a C14 side-chain. Other homologs were confirmed by exact masses. Antibacterial activity of bacillomycin isolated from *B. amyloliquefaciens* against *Burkholderia pseudomallei*, including growth inhibition and cell membrane damage, was reported [32]. The lipopeptides measured in the dual- and single cultures of *B. velezensis* FZB42 were not present in the monoculture of Xcc-SU. Polyketides such as bacillaene, macrolactin, or difficidin, known to have antibacterial activity [15,48], were not detected in the dual culture of *B. velezensis* with Xcc-SU nor in the monoculture of the antagonist. In addition, using MS/MS spectra, we identified a dominant protonated form of the compound with m/z 883.263 (3A,3B in Supplementary Figure S1), which was identified as bacillibactin. It mediates iron transport in *Bacillus subtilis* [49] and is involved in antibacterial or antifungal activities [50].

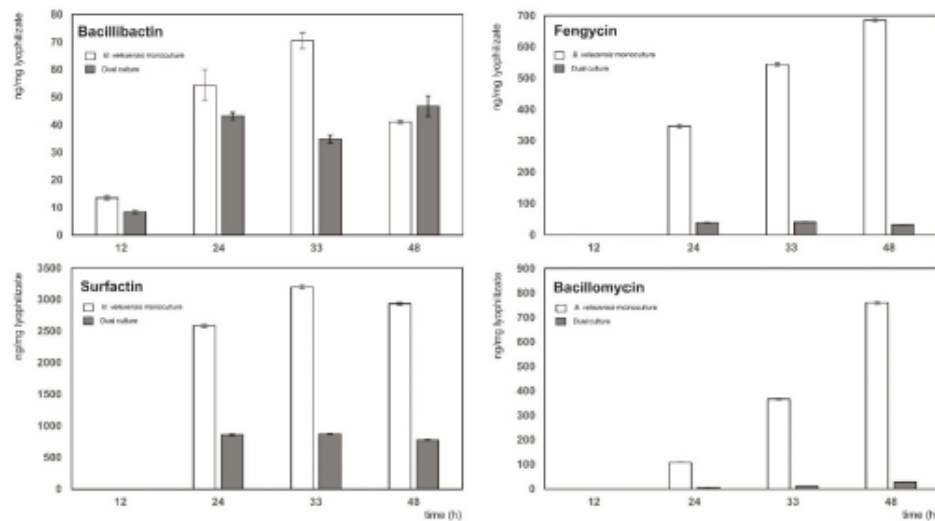


Figure 3. Production of biocontrol metabolites in a dual culture of *B. velezensis* FZB42 and Xcc-SU grown in liquid medium. The ratio of *B. velezensis* to Xcc-SU at the time of inoculation was 1:100 (CFU/mL). Dual culture, full columns; *B. velezensis* monoculture, empty columns.

In addition to the qualitative analysis of the cell-free extracts of dual cultures, a quantitative analysis of individual metabolites was performed. The quantity of lipopeptides (ng per mg of lyophilized supernatant) measured in the monoculture of *B. velezensis* FZB42 was much higher than those in the dual culture except for the siderophore bacillibactin, where the maximum content in both cultures was comparable. The maximum amount of bacillibactin, surfactin, and fengycin in the dual culture was achieved in 24 h, whereas bacillomycin increased during cultivation up to 48 h (Figure 3). In the monoculture of *B. velezensis* FZB42, the maximum contents of surfactin (3198 ± 30 ng/mg) and bacillibactin (70 ± 3 ng/mg) were reached at 33 h, whereas those of fengycin (685 ± 5 ng/mg) and bacillomycin (760 ± 6 ng/mg) at 48 h. The maximum amounts of bacillibactin, surfactin, fengycin, and bacillomycin detected in the dual culture were about 1.4, 3.8, 14.0, and 26.7 times lower (Figure 3).

The presence of Xcc-SU in the co-culture with *B. velezensis* FZB42 did not enhance the production of lipopeptides, as observed for the production of iturin, fengycin, and

bacillibactin by *B. amyloliquefaciens* in the presence of some phytopathogens [12,13]. In contrast, the production of fengycin, surfactin, and bacillomycin in the dual culture was considerably reduced compared to the monoculture of *B. velezensis* (Figure 3). In spite of that, the maximal surfactin concentration of $46 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ detected in the dual culture was similar to that of $50 \mu\text{g/mL}$ reported by Chen et al. [51], exhibiting the bacteriostatic effect. The other two lipopeptides, fengycin and bacillomycin, were produced in the dual culture at respective maximal concentrations of $2.0 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$ and $1.6 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. Purified bacillomycin and fengycin lipopeptides were shown to exhibit the antibiotic activity in the range of concentrations of $2\text{--}32 \mu\text{g/mL}$ and $6.25 \mu\text{g/mL}$, respectively [27,52]. The reason for low concentration of metabolites could be a competition for nutrients between the two microorganisms during growth. The optimum nitrogen concentration reported for *B. amyloliquefaciens*, with respect to the synthesis of lipopeptides, is about 10 times higher than that in our M9 medium [53], so competition could primarily concern assimilable nitrogen. In streptomycetes, carbon and nitrogen source limitation resulted in a significant reduction in antibiotic synthesis [54]. Similarly, in *B. amyloliquefaciens*, indirect evidence of the relationship between the provision of sufficient quantities of building precursors and the overproduction of surfactin was reported [55]. Another factor contributing to the reduction in the synthesis of lipopeptides could be a relative lack of iron caused by competition of both microorganisms for Fe^{3+} that was present at a low concentration of $8 \mu\text{M}$ in the dual culture. Such a scarcity of Fe^{3+} could result in a decrease in lipopeptide synthesis since iron serves as a cofactor for enzymes involved in the production of lipopeptides [56,57].

As for the production of bacillibactin, there was little or no reduction in its synthesis in the dual culture, possibly because its total level was approximately 10 times lower than that of each of the other three lipopeptides produced under nonlimiting conditions in the monoculture of *B. velezensis*. Consequently, its biosynthesis could be less affected by a limit in carbon and nitrogen supply (Figure 3). In addition, at a low Fe^{3+} concentration of $8 \mu\text{M}$ used in the medium, the Fur regulon-controlling bacterial iron homeostasis was depressed, which probably led to the non-repressed synthesis of bacillibactin [42].

A possibility exists that the level of lipopeptides in the dual culture could also be reduced by biodegradative activity of Xcc-SU. Xanthomonads have been shown to degrade various recalcitrant compounds such as the herbicides chlopyrifos and lindane [58,59] or hydrocarbons [60]. Xcc also possesses extracellular proteases [61]. However, experiments with *B. mojavensis* demonstrated that a lipopeptide mixture produced by this microorganism was relatively insensitive to the action of proteolytic enzymes [62]. Also, the fact that the amount of bacillibactin was not significantly reduced in the dual culture, despite the chemical similarity with the other lipopeptide molecules, seemed not to support this hypothesis.

3.5. Morphology Changes of Xcc Cells in the Presence of *B. velezensis* FZB42

Scanning electron microscopy was used to examine the effect of extracellular metabolites on the cell morphology of Xcc-SU and *B. velezensis*. No change in the cellular form of *B. velezensis* occurred during cultivation in the dual culture with Xcc-SU (Figure 4E,F). *Bacillus* formed motile rod-shaped cells with a cell width of $0.60 \pm 0.04 \mu\text{m}$ and length of $2.56 \pm 0.67 \mu\text{m}$. The Xcc-SU monoculture control showed regular, full, smooth rod-shaped cells whose dimensions were $0.44 \pm 0.07 \mu\text{m}$ (width) and $1.31 \pm 0.22 \mu\text{m}$ (length) during the whole experiment. In contrast, Xcc-SU morphology was significantly changed in the dual culture over time. The loss of viability of Xcc-SU in the dual culture (see Figure 2) was paralleled by shrinkage and distortion of the cells, accompanied by a wrinkled surface. This damaged the outer wall compared to the monoculture control (Figure 4A,C). After 48 h, a complete collapse of some Xcc cells was observed (Figure 4F). Evidently, the cell surface of Xcc-SU and the cell membrane were damaged by exposure to the antagonist as ruptures of the Xcc cells could be seen accompanied by leakage of cytoplasm (Figure 4F). Similar cell-perturbing effects were observed when *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* and *P. aeruginosa* were exposed to fengycin from *B. amyloliquefaciens* [27] or when *Brachyspira hyo-*

dysenteriae was exposed to surfactin at 10–250 µg/mL [20]. Bacillomycin D-like compounds isolated from *B. amyloliquefaciens* HAB-2 were also reported to produce a roughening of the cell surface and membrane damage in *B. pseudomallei* cells [32], similar to what we observed (Figure 4F). Such effects of lipopeptides were also reported in fungal organisms, e.g., *F. graminearum* and *A. flavus* [22,29,63]. The ability of lipopeptides to form pores in the membrane structure and to cause lysis of erythrocytes was demonstrated [5,64,65]. It is evident that the combined presence of surfactin, fengycin, and bacillomycin produced by *B. velezensis* caused significant cell surface damage in Xcc-SU, which resulted in the rapid elimination of Xcc-SU from the dual culture. A similar combined effect of several lipopeptides was observed in *B. subtilis*, active in the biological control of some fungal phytopathogens [24,26], and in *B. amyloliquefaciens* disrupting the structure of the conidia and mycelium of *Botryosphaeria dothidea* causing peach gummosis [66].

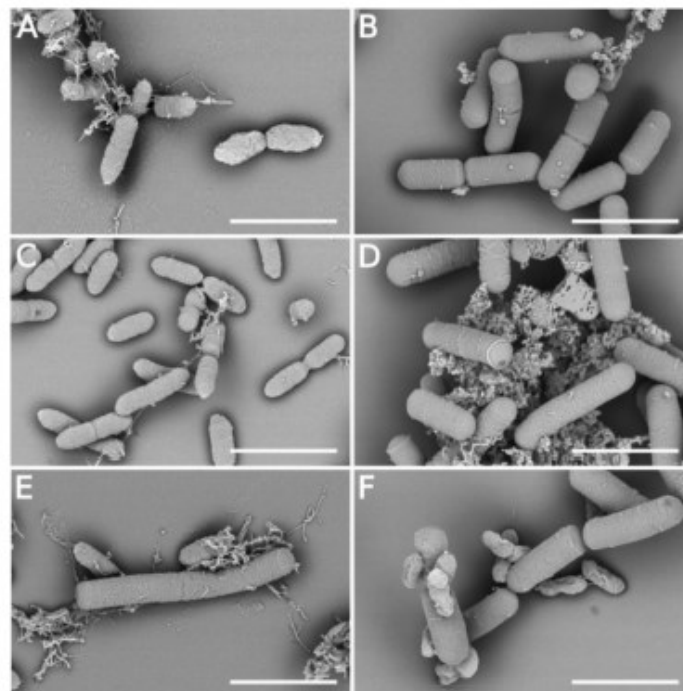


Figure 4. Time course of the interaction of *B. velezensis* FZB42 and Xcc-SU growing in a dual culture visualized by SEM (scale 2 µm): (A) start inoculation: Xcc-SU monoculture, (B) start inoculation: *B. velezensis* monoculture, (C) 48 h after inoculation: Xcc-SU monoculture, (D) 48 h after inoculation: *B. velezensis* monoculture, (E) 12 h after inoculation: dual culture, (F) 48 h after inoculation: dual culture. The ratio of *B. velezensis* cells to Xcc-SU cells at the time of inoculation was 1:100.

4. Conclusions

A detailed analysis of the antagonistic interaction of *B. velezensis* FZB42 and the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* under in vitro conditions was carried out in order to monitor the kinetics of Xcc death overtime and quantify major lipopeptides involved in the biological control of the phytopathogen. Novel findings included the demonstration of a combined effect of surfactin, fengycin, and bacillomycin, causing the death of the Xcc population, even when the lipopeptides were present at relatively low levels.

The antagonistic interaction was investigated using a new Xcc strain freshly isolated from a cabbage field struck with black rot infection. The mechanism of killing was documented by visualizing the attack of the bacterial cell wall and cytoplasmic membrane using SEM. The results confirmed the remarkable potential of *B. velezensis* strain FZB42 for biological control of phytopathogens, including Xcc, a causative agent of black rot of cruciferous vegetables.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9071410/s1>, Figure S1: Extracted ion chromatograms of bacillomycin D ($[M+H]^+ = 1031.541\ m/z$, 1A), surfactin ($[M+H]^+ = 1036.690\ m/z$, 2A), bacillobactin ($[M+H]^+ = 883.263\ m/z$, 3A), and fengycin A ($[M+2H]^{2+} = 732.405\ m/z$, 4A) in a particular retention times. Table S1: Metabolites detected in dual culture of *B. velezensis* FZB42 and Xcc-SU.

Author Contributions: H.M. (Hynek Mácha): mass spectrometry data analysis, review and editing. H.M. (Helena Marešová): molecular genetics, taxonomy identification, review and editing. T.J.: SEM analysis, cell measurement. M.Š.: microbiology, bacterial cultivation. O.B.: SEM analysis and statistics, writing—review and editing. A.Š.: underlying MS data verification, writing—review and editing. M.B.: methodology, project administration, review and editing. Č.N.: project administration, data curation, writing—review and editing. A.P.: conceptualization, underlying data verification, writing—original draft, supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The work was supported by the following projects: EU COST No. CA16107, INTER-COST LTC18009, RVO 61388971 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), 19-10907S (Czech Science Foundation), IGA_PrF_2021_021 (internal grant agency of Palacký University).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The obtained 16S rRNA gene sequence of the strain Xcc-SU was submitted in GenBank under accession number MZ182354.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Marin, V.R.; Ferrarez, J.H.; Vieira, G.; Sass, D.C. Recent advances in the biocontrol of *Xanthomonas* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *35*, 72. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, K.; Garnet, C.; Fadamiro, H.; Kloepfer, J.W. Antagonism of black rot in cabbage by mixture of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *BioControl* **2016**, *61*, 605–613. [CrossRef]
- Bhattacharyya, P.N.; Goswami, M.P.; Bhattacharyya, L.H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. *J. Phyto.* **2016**, *8*, 26–41. [CrossRef]
- Fan, B.; Wang, C.; Song, X.; Ding, X.; Wu, L.; Wu, H.; Gao, X.; Borriss, R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2491. [CrossRef]
- Monteiro, L.; Mariano, R.L.R.; Souto-Maior, A.M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* **2005**, *48*, 23–29. [CrossRef]
- Daungfu, O.; Youpensuk, S.; Lumyong, S. Endophytic bacteria isolated from Citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. *Trop. Life Sci. Res.* **2019**, *30*, 73–88. [CrossRef]
- Li, S.B.; Fang, M.; Zhou, R.C.; Huang, J. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*—Induced blight of *Anthurium*. *Biol. Control.* **2012**, *63*, 9–16. [CrossRef]
- Wulff, E.G.; Mguni, C.M.; Mansfeld-Giese, K.; Fels, J.; Lübeck, M.; Hockenhull, J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant. Pathol.* **2002**, *51*, 574–584. [CrossRef]
- Issazadeh, K.; Rad, S.K.; Zarrabi, S.; Rahimibashar, M.R. Antagonism of *Bacillus* species against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pectobacterium carotovorum* pv. *carotovorum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, *6*, 1615–1620. [CrossRef]
- Koumoutsis, A.; Chen, X.H.; Henne, A.; Liesegang, H.; Hitzeroth, G.; Franke, P.; Vater, J.; Borriss, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1084–1096. [CrossRef]

11. Chen, X.H.; Vater, J.; Piel, J.; Franke, P.; Scholz, R.; Schneider, K.; Koumoutsi, A.; Hitzeroth, G.; Grammel, N.; Strittmatter, A.W.; et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 4024–4036. [\[CrossRef\]](#)
12. Li, B.; Li, Q.; Xu, Z.; Zhang, N.; Shen, Q.; Zhang, R. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 636. [\[CrossRef\]](#)
13. 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*. *Microb. Biotechnol.* **2015**, *8*, 281–295. [\[CrossRef\]](#)
14. Chowdhury, S.P.; Hartmann, A.; Gao, X.W.; Borriss, R. Biocontrol mechanisms by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—A review. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 780. [\[CrossRef\]](#)
15. Chen, X.H.; Scholz, R.; Borriss, M.; Junge, H.; Mögel, G.; Kunz, S.; Borriss, R. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J. Biotechnol.* **2009**, *140*, 38–44. [\[CrossRef\]](#)
16. Bernheimer, A.W.; Avigad, L.S. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **1970**, *6*, 361–366. [\[CrossRef\]](#)
17. Bais, H.P.; Fall, R.; Vivanco, J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant. Physiol.* **2004**, *134*, 307–319. [\[CrossRef\]](#)
18. Preecha, C.; Sadowsy, M.J.; Prathuangwong, S. Lipopeptide surfactin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46 is required for biocontrol efficacy against *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. *Kasetsart J.* **2010**, *44*, 84–99.
19. Meena, K.R.; Sharma, A.; Kanwar, S. Antitumoral and antimicrobial activity of surfactin extracted from *Bacillus subtilis* KLP2015. *Int. J. Peptide Res. Therapeut.* **2020**, *26*, 423–433. [\[CrossRef\]](#)
20. Horng, Y.-B.; Yu, Y.-H.; Dybus, A.; Hsiao, F.S.-H.; Cheng, Y.-H. Antibacterial activity of *Bacillus* species-derived surfactin on *Brachyspira hyodysenteriae* and *Clostridium perfringens*. *AMB Expr.* **2019**, *9*, 188. [\[CrossRef\]](#)
21. Torres, M.J.; Petroselli, G.; Daz, M.; Erca-Balsells, R.; Audisio, M.C. *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against Gram-positive foodborne pathogenic bacteria: UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 929–940. [\[CrossRef\]](#)
22. Hanif, A.; Zhang, F.; Li, P.; Li, C.; Xu, Y.; Zubair, M.; Zhang, M.; Jia, D.; Zhao, X.; Liang, J.; et al. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins* **2019**, *11*, 295. [\[CrossRef\]](#)
23. Hu, L.B.; Shi, Z.Q.; Zhang, T.; Yang, Z.M. Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *272*, 91–98. [\[CrossRef\]](#)
24. Desmyttere, H.; Deweer, C.; Muchembled, J.; Sahmet, K.; Jacquin, J.; Coutte, F.; Jacques, P. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2327. [\[CrossRef\]](#)
25. Romero, D.; de Vicente, A.; Rakotoaly, R.H.; Dufour, S.E.; Veening, J.W.; Arrebola, E.; Cazoria, F.; Kuipers, O.P.; Paquot, M.; Perez-García, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2007**, *10*, 183–188. [\[CrossRef\]](#)
26. Li, Y.; Heloir, M.C.; Zhang, X.; Geissler, M.; Trouvelot, S.; Jacquens, L.; Henkel, M.; Su, X.; Fang, X.; Wang, Q.; et al. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. *Mol. Plant Pathol.* **2019**, *20*, 1037–1050. [\[CrossRef\]](#)
27. Medeot, D.B.; Fernandez, M.; Morales, G.M.; Jofre, E. Fengycins from *Bacillus amyloliquefaciens* MEP₂18 exhibit antibacterial activity by producing alterations on the cell surface of the pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3107. [\[CrossRef\]](#)
28. Moyne, A.L.; Shelby, R.; Cleveland, T.E.; Tuzun, S. Bacillomycin D: An iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 622–629. [\[CrossRef\]](#)
29. Gong, Q.; Zhang, C.; Lu, F.; Zhao, H.; Bie, X.; Lu, Z. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbj and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. *Food. Control.* **2014**, *36*, 8–14. [\[CrossRef\]](#)
30. Jin, P.; Wang, H.; Tan, Z.; Xuan, Z.; Dahar, G.Y.; Li, Q.X.; Miao, W.; Liu, W. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochem. Physiol.* **2019**, *163*, 102–107. [\[CrossRef\]](#)
31. Tabbene, O.; Di Grazia, A.; Azaiez, S.; Ben Slimene, I.; Elkahoui, S.; Alfeddy, M.N.; Casciaro, B.; Luca, V.; Limam, F.; Mangoni, M.L. Synergistic fungicidal activity of the lipopeptide bacillomycin D with amphotericin B against pathogenic *Candida* species. *FEMS Yest Res.* **2015**, *15*, fov022. [\[CrossRef\]](#)
32. Rajaofera, M.J.N.; Kang, X.; Jin, P.-F.; Chen, X.; Li, C.-C.; Yin, L.; Liu, L.; Sun, Q.H.; Zhang, N.; Chen, C.Z.; et al. Antibacterial activity of bacillomycin D-like compounds isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 against *Burkholderia pseudomallei*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2020**, *10*, 183–188.
33. Alvarez, A.M. Black rot of crucifers. In *Mechanisms of Resistances to Plant Diseases*; Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., London, L.C., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp. 21–52.
34. Pandey, S.S.; Patnana, P.K.; Rai, R.; Chatterjee, S. Xanthoferrin, the α -hydroxycarboxylate-type siderophore of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, is required for optimum virulence and growth inside cabbage. *Mol. Plant. Pathol.* **2017**, *18*, 949–962. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Rastogi, G.; Sbodio, A.; Tech, J.J.; Suslow, T.V.; Coaker, G.L.; Leveau, J.H. Leaf microbiota in an agroecosystem: Spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce. *ISME J.* **2012**, *6*, 1812–1822. [\[CrossRef\]](#)

36. Deng, Y.; Wu, J.; Yin, W.; Li, P.; Zhou, J.; Chen, S.; He, F.; Cai, J.; Zhang, L.H. Diffusible signal factor family signals provide a fitness advantage to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in interspecies competition. *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 1534–1545. [CrossRef]
37. Hert, A.P.; Marutani, M.; Momol, M.T.; Roberts, P.D.; Jones, J.B. Analysis of pathogenicity mutants of a bacteriocin producing *Xanthomonas perforans*. *Biol. Control.* **2009**, *51*, 362–369. [CrossRef]
38. Royer, M.; Costet, L.; Vivien, E.; Bes, M.; Cousin, A.; Damais, A.; Pieretti, I.; Savin, A.; Megessier, S.; Viard, M.; et al. Albicidin pathotoxin produced by *Xanthomonas albūineans* is encoded by three large PKS and NRPS genes present in a gene cluster also containing several putative modifying, regulatory, and resistance genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2004**, *17*, 414–427. [CrossRef]
39. Reva, O.N.; Swanevelder, D.Z.H.; Mwita, L.A.; Mwakilili, A.D.; Muzondiwa, D.; Joubert, M.; Chan, W.Y.; Lutz, S.; Ahrens, C.H.; Avdeeva, L.V.; et al. Genetic, epigenetic and phenotypic diversity of four *Bacillus velezensis* strains used for plant protection or as probiotics. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2610. [CrossRef]
40. Novák, J.; Sokolová, L.; Lemr, K.; Pluháček, T.; Palyzová, A.; Havlíček, V. Batch-processing of imaging or liquid-chromatography mass spectrometry datasets and de novo sequencing of polyketide siderophores. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1865*, 768–775. [CrossRef]
41. Palyzová, A.; Svobodová, K.; Sokolová, L.; Novák, J.; Novotný, Č. Metabolic profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* race 2 in dual cultures with biocontrol agents *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol.* **2019**, *64*, 779–787. [CrossRef]
42. Pi, H.; Helmann, J.D. Sequential induction of Fur-regulated genes in response to iron limitation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12785–12790. [CrossRef]
43. Rodríguez, H.; Aguilar, L.; LaO, M. Variations in xanthan production by antibiotic resistant mutants of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *48*, 626–629. [CrossRef]
44. Rojas, M.; Pena, M.; Pena-Vera, M.J.; Sulbaran, M.; Perez, E.; Velasquez, C.L. Characterization and determination of antimicrobial and metal resistant profiles of *Xanthomonas* strains isolated from natural environments. *J. Anal. Pharm. Res.* **2019**, *8*, 55–60. [CrossRef]
45. Marquett, M.; Mikolajezak, M.; Throne, L.; Pollock, T.J. Improved strains for production of xanthan gum by fermentation of *Xanthomonas campestris*. *J. Ind. Microbiol.* **1989**, *4*, 53–64.
46. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021; Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 18 May 2021).
47. 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]
48. Borriass, R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. In *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*; De Bruijn, F.J., Ed.; Wiley Blackwell Hoboken: Hoboken, NJ, USA, 2013; p. 98.
49. Dertz, E.A.; Stintzi, A.; Raymond, K.N. Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 1087–1097. [CrossRef]
50. Khare, A.; Tavazoie, S. Multifactorial competition and resistance in a two-species bacterial system. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005715. [CrossRef]
51. Chen, Y.; Liu, S.A.; Mou, H.; Ma, Y.; Li, M.; Hu, X. Characterization of Lipopeptide Biosurfactants Produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from Marine Sediments. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 871. [CrossRef]
52. Ramachandran, R.; Shrivastava, M.; Narayanan, N.N.; Thakur, R.L.; Chakrabarti, A.; Roy, U. Evaluation of Antifungal Efficacy of Three New Cyclic Lipopeptides of the Class Bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01457-17. [CrossRef]
53. Pretorius, D.; van Rooyen, J.; Clarke, K.G. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnol.* **2015**, *32*, 243–252. [CrossRef]
54. Kirk, S.; Avignone-Rosa, C.A.; Bushell, M.E. Growth limiting substrate affects antibiotic production and associated metabolic fluxes in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1803–1809. [CrossRef]
55. Zhi, Y.; Wu, Q.; Xu, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* MT45. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 40976. [CrossRef] [PubMed]
56. Sen, R. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1997**, *68*, 263–270. [CrossRef]
57. Wei, Y.H.; Chu, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-entriched media by *Bacillus subtilis* ATCC21332. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 724–728. [CrossRef]
58. Manickam, N.; Misra, R.; Mayilraj, S. A novel pathway for the biodegradation of γ -hexachlorocyclohexane by a *Xanthomonas* sp. strain ICH12. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 1468–1478. [CrossRef]
59. Rayu, S.; Nielsen, U.N.; Nazaries, L.; Singh, B.K. Isolation and molecular characterization of novel chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-degrading bacteria from sugarcane farm soils. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 518. [CrossRef]
60. Szulc, A.; Ambrożewicz, D.; Sydow, M.; Ławniczak, Ł.; Piotrowska-Cyplik, A.; Marecik, R.; Chrzanowski, Ł. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *J. Environ. Manag.* **2014**, *132*, 121–128. [CrossRef]

61. Dow, M.D.; Clarke, B.R.; Milligan, D.E.; Tang, J.-L.; Daniels, M.J. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 2994–2998. [[CrossRef](#)]
62. Ayed, H.N.; Hmidet, N.; Bechet, M.; Chollet, M.; Chataigne, G.; Leclere, V.; Jacques, P.; Nasri, M. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 1699–1707. [[CrossRef](#)]
63. Gu, Q.; Yang, Y.; Yuan, Q.; Shi, G.; Wu, L.; Lou, Z.; Huo, R.; Wu, H.; Borriss, R.; Gao, X. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e01075-17. [[CrossRef](#)]
64. Shafi, J.; Tian, H.; Mingshan, J. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2017**, *31*, 446–459. [[CrossRef](#)]
65. Maget-Dana, R.; Ptak, M.; Peypoux, E.; Michel, G. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *815*, 405–409. [[CrossRef](#)]
66. Li, X.; Zhang, Y.; Wei, Z.; Guan, Z.; Cai, Y.; Liao, X. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* BC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162125. [[CrossRef](#)]