

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biologie**

**Biologická ochrana rostlin proti houbovým  
patogenům rodu *Fusarium* s využitím  
bakteriálních kmenů**

**Bakalářská práce**

Autor: Adéla Samuelová  
Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie  
Studijní obor: Biologie a ekologie  
Vedoucí práce: RNDr. Andrea Palyzová, Ph.D.



## Zadání bakalářské práce

**Autor:** Adéla Samuelová

Studium: S20BI022BP

Studijní program: B0511A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

**Název bakalářské práce:** **Biologická ochrana rostlin proti houbovým patogenům rodu *Fusarium* s využitím bakteriálních kmenů**

Název bakalářské práce AJ: Biological protection of plants against fungal pathogens of the genus *Fusarium* using bacterial strains

### Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Rostliny mohou být v průběhu vegetace poškozovány mnoha různými druhy virů, bakterií, hub a živočichů. Následkem těchto poruch dochází často ke snížení výnosu plodin a zhoršení kvality sklizených produktů. Současné moderní technologie pěstování zemědělských plodin stále využívají aplikaci chemických přípravků proti plevelům, chorobám a škůdcům. Nicméně v posledních letech trendy stále více směřují ke snižování zátěže životního prostředí i v oblasti zemědělství. Stále větší pozornost je věnována vývoji a využití nových biologických přípravků na ochranu rostlin, přispívající k přirozené rovnováze mezi půdními mikroorganismy a podporující výskyt přirozených antagonistických mikroorganismů potlačující infekce způsobené houbami nebo škůdci. Přirozených vlastností mikroorganismů, které se uplatňují v konkurenčním boji, lze využít právě v rostlinné produkci a jejich ochraně. Doposud komerčně známé biopreparáty obsahující např. houbové kmeny *Trichoderma harzianum* a *Pythium oligandrum* nebo bakteriální kmen *Bacillus* jsou využívány k potlačení infekcí a současně stimulují růst rostlin. Pro objasnění účinku jednotlivých biopreparátů je nezbytné charakterizovat interakce mezi patogenem a jeho antagonistou na úrovni metabolické analýzy a morfologických změn u jednotlivých mikroorganismů a zároveň i při jejich interakcích.

Rashmi Srivastava, Abdul Khalid, U.S. Singh, A.K. Sharma, Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt, *Biological Control*, Volume 53, Issue 1, 2010, Pages 24-31, ISSN 1049-9644

Clara Oliver, Iker Hernández, Marta Caminal, José M. Lara & Carolina Fernández (2019) *Pseudomonas putida* strain B2017 produced as technical grade active ingredient controls fungal and bacterial crop diseases, *Biocontrol Science and Technology*, 29:11, 1053-1068, DOI: 10.1080/09583157.2019.1645304

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,  
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Oponent: RNDr. Jakub Toman, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.3.2022

# **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Adéla Samuelová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala Mikrobiologickému ústavu Akademie věd ČR, v. v. i. za možnost uskutečnění praktické části této práce. V první řadě děkuji paní RNDr. Andree Palyzové, Ph.D. za její odborné vedení, vstřícnost a trpělivost při jejím zpracování. Dále také děkuji paní RNDr. Heleně Marešové, Ph.D. za její odbornou pomoc při realizaci experimentů a její věcné připomínky. Též bych chtěla poděkovat panu RNDr. Jakubovi Tomanovi, Ph.D. za jeho administrativní komunikaci na univerzitní půdě související s touto bakalářskou prací.

## ANOTACE

SAMUELOVÁ, A. *Biologická ochrana rostlin proti houbovým patogenům rodu Fusarium s využitím bakteriálních kmenů*, Hradec Králové, 2023. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Andrea Palyzová, Ph.D., 51 s.

Bakalářská práce se zabývá ochranou rostlin biologickou formou na úrovni bakteriálního antagonismu proti houbovým patogenům, které mohou rostlinu tak jako i mnoho dalších druhů virů, bakterií i živočichů v průběhu vegetace narušovat. Biologická forma ochrany rostlin je ve srovnání s chemickou ochranou zcela přírodní, vykazuje dlouhodobější účinek a je mnohem šetrnější k životnímu prostředí. V této práci byl konkrétně vybrán houbový patogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a druhy bakteriálních kmenů (*Pseudomonas fluorescens* 13525, *Bacillus velezensis* DSM 23117, *Bacillus subtilis* CCM 2217) s potenciálem inhibičního účinku. Cílem práce bylo pomocí interakčních testů na pevném médiu zjistit vliv antagonisty na růst vybraného houbového patogena.

### KLÍČOVÁ SLOVA

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, biologická ochrana, bakterie, chemická ochrana, inhibiční efekt, interakční testy, siderofory

# ANNOTATION

SAMUELOVÁ, A. *Biological protection of plants against fungal pathogens of the genus Fusarium using bacterial strains*, Hradec Králové, 2023. Bachelor thesis at the Faculty of Natural Sciences. Bachelor thesis supervisor RNDr. Andrea Palyzová, PhD., 51 p.

The Bachelor thesis deals with protection of plants through a biological form at the level of bacterial antagonism against fungal pathogens that may disrupt the plant as well as many other kinds of viruses, bacteria and animals during its vegetation. The biological form of protection plants compared with chemical protection is completely natural, it shows a longer effect and is much more environment-friendly. For this thesis in this particular case the fungal pathogen of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* has been chosen and species of bacterial strains (*Pseudomonas fluorescens* 13525, *Bacillus velezensis* DSM 23117, *Bacillus subtilis* CCM 2217) with the potential of an inhibitory effect. The object of the thesis was to determine the effect of the antagonist on the growth of the chosen fungal pathogen through interaction tests on a solid medium.

## KEYWORDS

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, biological protection, bacteria, chemical protection, inhibitory effect, interaction tests, siderophores

# Obsah

Úvod .....	- 11 -
1 Literární přehled.....	- 12 -
1.1 Podpora rostliny pomocí mikroorganismů .....	- 12 -
1.2 Infekce rostlin způsobené mikroorganismy .....	- 13 -
1.2.1 Bakteriální patogeny rostlin.....	- 14 -
1.2.2 Houbové patogeny rostlin .....	- 15 -
1.3 Chemická ochrana rostlin.....	- 16 -
1.3.1 Chemická ochrana proti houbovým patogenům.....	- 17 -
1.3.2 Chemická ochrana proti bakteriálním patogenům .....	- 17 -
1.3.3 Dopady chemické ochrany .....	- 18 -
1.4 Biologická ochrana rostlin pomocí mikroorganismů .....	- 19 -
1.4.1 Strategie biologické ochrany mikroorganismy .....	- 19 -
1.4.2 Biologická ochrana v praxi .....	- 20 -
2 Metodika .....	- 21 -
2.1 Mikroorganismus.....	- 21 -
2.1.1 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> CBS KNAW 123 668 (FOL) ..	- 21 -
2.1.2 <i>Bacillus velezensis</i> FZB42 (DSM 23117) .....	- 21 -
2.1.3 <i>Bacillus subtilis</i> CCM 2217 .....	- 22 -
2.1.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 .....	- 22 -
2.2 Materiály .....	- 22 -
2.2.1 Kultivační média.....	- 22 -
2.2.2 Roztoky .....	- 23 -
2.3 Pracovní postupy .....	- 24 -
2.3.1 Krátkodobé uchování kultur na pevných médiích .....	- 24 -
2.3.2 Příprava konzerv bakteriálních a houbových kultur .....	- 25 -

2.3.3	Příprava inokula houbové kultury .....	- 25 -
2.3.4	Kultivace houbové kultury v tekutém médiu.....	- 25 -
2.3.5	Kultivace bakteriální kultury v tekutém médiu .....	- 26 -
2.3.6	Interakce na pevném médiu .....	- 26 -
2.3.7	Stanovení suché biomasy houbové kultury .....	- 26 -
2.3.8	Stanovení glukózy v médiu .....	- 26 -
2.3.9	Stanovení životaschopnosti buněk .....	- 27 -
2.3.10	Stanovení koncentrace buněk .....	- 27 -
2.3.11	Výpočet a grafické znázornění růstových parametrů .....	- 28 -
2.4	Přístrojová technika .....	- 29 -
3	Výsledky.....	- 30 -
3.1	Výběr kultivačního média .....	- 30 -
3.2	Interakční testy na vybraném pevném médiu.....	- 32 -
3.3	Růstové parametry v tekutých médiích.....	- 35 -
3.3.1	Růst <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> v MEB médiu.....	- 35 -
3.3.2	Růst <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> v optimalizovaném BHAK médiu - 36 -	
3.3.3	Růst <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 v LB médiu.....	- 37 -
3.3.4	Růst <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525 v optimalizovaném BHAK médiu - 38 -	
3.3.5	Stanovení úbytku glukózy v optimalizovaném BHAK médiu .....	- 40 -
4	Diskuze .....	- 41 -
	Závěr.....	- 44 -
	Seznam použité literatury.....	- 45 -
	Seznam tabulek a obrázků.....	- 51 -



## Terminologický slovník

Aerobní	Potřebující kyslík k životu
Antagonista	Protichůdně působící
Antimikrobiální	Účinkující proti mikroorganismu
Fototropismus	Růst ve směru zdroje světla
Fungicid	Chemický prostředek proti houbám a plísním
Fytoremediace	Dekontaminace půdy s využitím rostlin
Geotropismus	Růst ve směru gravitační síly
Inhibice	Zpomalení či zastavení procesů
Inokulace	Naočkování
Intoxikace	Otrava
<i>In vitro</i>	„Ve skle“ – v laboratoři, mimo živý organismus
Kompetice	Soutěžení, konkurence
Konidie (makro-/mikrokonidie)	Nepohyblivá spora hub (nepohlavní)
Metabolit	Produkt látkové přeměny metabolismu určité látky
Parazitismus	Mezidruhový vztah, kdy organismus žije na úkor druhého
Sekundární metabolity	Látky organického původu vytvářené v tělech organismů, které nejsou životně nezbytné pro proces růstu či jeho rozmnožování
Sekvestrace	Zachycení a následná izolace látek v prostředí
Spora	Výtrus hub

## Seznam použitých zkratk

cdw	Cell dry weight (suchá hmotnost buněk)
KTJ	Kolonie-tvořící jednotky
OD	Optická denzita
PBS	Phosphate Buffered Saline (fosfátový pufr)
pH	Hodnota poukazující na kyselost či zásaditost (stupnice 0–14)
SD	Směrodatná odchylka
rpm	Otáčky za minutu

## ÚVOD

Přibývající množství spotřebitelů na planetě jde ruku v ruce s narůstajícím zájmem o zemědělské plodiny. Potřeba zákazníků mít potraviny v nejvyšší jakosti tak apeluje na zemědělský průmysl, který se lidem pokouší vyhovět v co nejrychlejším časovém horizontu. S chorobami rostlin se však zemědělci setkávají každý den. Nejen bakteriální a houbové patogeny mohou výnosy plodin značně ovlivnit, a proto je důležité proti nim rostliny chránit.

Velmi často se zemědělci setkávají s různými druhy patogenních hub z rodů *Botrytis*, *Verticillium* nebo *Fusarium*, které vyvolávají různé skvrnitosti, hniloby, tvorbu lézí a další řadu onemocnění. Chemické postřiky pro pěstitelé představují ideální formu efektivní a rychlé ochrany s téměř okamžitým nástupem účinku, a to nejen proti mikroorganismům. Jen pro představu lze zmínit, že ročně využívají země v Evropě okolo 45 % všech vyrobených pesticidů na celém světě (Rajmohan *et al.*, 2020). Chemická ochrana ovšem do určité míry ovlivňuje současnou krajinu svými látkami, které zůstávají nejen v půdě, ale dostávají se také do okolních vod.

Šetrná forma ochrany rostlin se již dostává více do povědomí lidí. Některé přípravky na bázi mikroorganismů si čeští zákazníci mohou v dnešní době pořídit ve specializovaných obchodech. Biologická ochrana rostlin za pomoci mikroorganismů současně napomáhá rostlinám k jejich kvalitnímu růstu a u některých může přispět k větší odolnosti vůči stresovým faktorům, jako je třeba sucho (Su *et al.*, 2017). Zároveň má přípravek dlouhodobější účinek oproti chemické ochraně a skvělé předpoklady k ochraně krajiny. Studium biologické ochrany rostlin tak významně přispívá ke změnám v současných technikách ochrany proti patogenům.

V teoretické části má bakalářská práce za cíl popsat vztahy rostlin s mikroorganismy, které jim mohou být prospěšné či nikoliv. Se vztahy souvisí také jejich ochrana. Potraviny někteří zemědělci pěstují spíše na kvantitu, než aby dbali na samotnou kvalitu, proto má práce za cíl i popis dopadu nebezpečné chemické ochrany na životní prostředí. Ochrana na bázi přírodních prostředků, jako jsou například mikroorganismy, nabírá v posledních letech značného trendu, což vede k většímu zájmu se této problematice věnovat.

Hlavním cílem praktické části je zaměření se na inhibiční účinek vybraných bakteriálních kmenů proti houbovému patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na pevných médiích. Výběr vhodného společného média pro kultivaci je stěžejní bod v následných experimentech. Ten může ovlivnit produkci různých látek antagonisty i patogenu. Pro správné pochopení vlastností vybraných mikroorganismů je zapotřebí i laboratorně stanovit jejich růstové parametry v tekutých médiích. Získané poznatky by mohly být nápomocné v tvorbě biologických přípravků rostlin s vybraným patogenem na českém trhu.

# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Podpora rostliny pomocí mikroorganismů

V přírodě existují různé vztahy mezi jednotlivými organismy, které mohou být prospěšné pro obě zúčastněné strany, jako je možné pozorovat u některých mikroorganismů koexistujících s rostlinami.

Výskyt je často situován poblíž povrchu rostlin nebo také v místech, kde se nacházejí v jejich bezprostřední blízkosti, což může představovat půdní prostor v okolí kořenového systému, v rhizosféře. Mikroorganismy využívají ke zdroji potravy látky (cukry, organické kyseliny a aminokyseliny) vylučované kořeny rostlin. Jednotlivé působení mikroorganismů na rostliny lze rozdělit na přímé a nepřímé procesy (Olanrewaju *et al.*, 2017; Schirawski & Perlin, 2018).

Do přímých mechanismů lze zahrnout produkci sekundárních látek, které mohou sloužit rostlině jako podpora jejího růstu. V případě, že bakterie produkuje auxiny, může je rostlina využít ve vlastní prospěch ke zlepšení jejího geotropismu i fototropismu. Za zmínku stojí taktéž produkce cytokininů, které pomohou rostlině regulovat stárnutí listů ovlivněním buněčného dělení (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Cytokiny zlepšují též odolnost vůči suchu. V rámci studie (Su *et al.*, 2017) byla zkoumána rostlina jílek vytrvalý (*Lolium perenne*) a jeho nízká tolerance k suchu. Při vystavení vysoké míry tohoto stresu se rostlina významně zlepšila po přidání činidla zadržující vodu s konkrétním druhem bakterie *Bacillus amyloliquefaciens* GB03. S cytokiny byly prováděny také experimenty na vojtěškách, kde byl opět prokázán pozitivní vliv půdních bakterií, které za pomoci cytokininů dokázaly zlepšit toleranci rostliny k suchu (Olanrewaju *et al.*, 2017; Schirawski & Perlin, 2018).

S mikroorganismy se také pojí i známá fixace dusíku. Vztah půdních bakterií například rodu *Rhizobium*, *Azorhizobium* či *Allorhizobium* je zejména pro bobovité rostliny velmi výhodný (Vessey, 2003). Dusík totiž hraje klíčovou roli v životaschopnosti všech živých soustav. Pro bobovité rostliny je mnohem výhodnější přijímat dusík ve formě amoniaku, jenž vznikne přeměnou ze vzdušného dusíku za pomoci již zmíněných půdních bakterií (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Dalším důležitým prvkem k růstu rostlin se stává nepochybně fosfor. I přestože se může v půdě vyskytovat ve větším množství, rostliny si pro svou potřebu neumí brát z nerozpustných forem tohoto prvku (Vessey, 2003). Většina dostupného organického fosforu se v půdě vyskytuje ve formě takzvaného fytátu. Jeho rozklad je pro rostliny velmi obtížný kvůli přítomnosti malého množství enzymu k tomuto úkonu. Existují ovšem bakterie se schopností přeměnit nerozpustnou formu fosfátů na vhodnou pro rostliny (Olanrewaju *et al.*, 2017). Mezi účinné bakterie této metody se řadí *Bacillus cirulans*, *Pseudomonas putida*, *Rhizobium* a další (Vessey, 2003).

Zajímavým zjištěním funkce bakterií podporující růst rostlin byl výzkum (Montalbán *et al.*, 2017) zaměřený na využití těchto mikroorganismů ke zlepšení fyto-remediace půd, které jsou kontaminované kovy. Jejich studie prokázala, že vybraná rostlina díky přítomné bakterii byla schopna snížit stres iniciovaný kadmíem a zinkem, a zvýšit tak produkci své biomasy (Montalbán *et al.*, 2017).

Některé bakterie mohou svými nepřímými mechanismy napomoci k omezení růstu patogenních hub i bakterií. Mezi tyto procesy se řadí opět produkce sekundárních metabolitů z řad antibiotik, sideroforů, pigmentů a toxinů, které mohou zabránit těžkému napadení infekcí (Olanrewaju *et al.*, 2017; Schirawski & Perlin, 2018). Dále dochází také k produkci enzymů schopných degradovat buněčnou stěnu patogenů, které opět dodají rostlině větší šance na zvládnutí choroby. Díky těmto zjištěním se mohou některé mikroorganismy využívat v biologické ochraně rostlin, která je šetrná vůči životnímu prostředí (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Samozřejmě i houbové kmeny mají své místo při podpoře rostlin. Mykorhiza disponuje vztahem mezi houbou a kořeny vyšších rostlin, která vyhovuje oběma zúčastněným stranám (Wang & Qiu, 2006). Rostlina poskytuje houbě asimiláty a ta naopak podporuje její růst i dokonce odolnost vůči patogenům (Schirawski & Perlin, 2018). Existují různé varianty mykorhiz, z nichž ta nejčastější nese název arbuskulární vyznačující se tvorbou interních útvarů zvaných arbuskuly. Houbové mycelium tak není jen na povrchu buněk, ale i uvnitř, kde se stromovitě větví (Wang & Qiu, 2006). Příkladem arbuskulární mykorhizní houby může být *Rhizophagus irregularis* (Schirawski & Perlin, 2018).

## 1.2 Infekce rostlin způsobené mikroorganismy

Ničivý účinek některých mikroorganismů bývá pro rostlinu nepříjemným setkáním. Tento biotický stres způsobený rostlinnými patogeny může vést až k jejímu samotnému úhynu. Infekce způsobené mikroorganismy páchají též ekonomické škody v rámci zemědělského průmyslu, největší dopad na něj mají nákazy způsobené především houbovými patogeny rostlin (Horbach *et al.*, 2011).

Pro zahájení infekce rostliny využívají fytopatogeny převážně efekторы – proteiny a malé molekuly (toxiny, sekundární metabolity a další), kterými jsou schopni manipulovat se strukturou a funkcí hostitelských buněk, potlačit jejich imunitu, a tak obsadit a rozšířit sebe samotné v dané části rostliny (Zhang *et al.*, 2022). Fytopatogen nakládá s efekторы podle způsobu jeho výživy, proto biotrofní patogen se snaží vylučováním efektorů rozvracet imunitní systém rostliny, ale zároveň nepoškodit životaschopnost buněk (Schirawski & Perlin, 2018). Efekторы, které jsou schopné způsobit i buněčnou smrt, vylučuje takzvaný nekrotrofní patogen. Zároveň se mohou vyskytovat různé alternativy těchto dvou typů výživy, kdy mikroorganismus přechází z biotrofní do nekrotické fáze, jako je tomu u houbového patogenu *Verticillium dahliae* (Horbach *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2022).

Aby mohlo dojít k samotné infekci rostliny, je nutností fytopatogenů dostat se do rostlinných tkání (Melotto *et al.*, 2006). Poranění na rostlině či její průduchy představují ideální volný vstup pro fytopatogeny především z řad bakterií, které neumějí pronikat skrz epidermis rostlin, jako to umějí houbové patogeny. Rostlina samozřejmě může své průduchy zavírat před nežádoucími infekcemi. Kvůli však zmíněným efektorům dochází zjednodušeně ke zmatení signálů buňky, která tak omezí produkci fytohormonu kyseliny salicylové, jež má na starost uzavírání průduchů (Melotto *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2022).

Jako jeden z dalších mechanismů využívaný k odstranění fyzické bariéry lze zmínit použití efektorů k narušení složek stěn rostlinných buněk. Za pomoci enzymů degradujících buněčnou stěnu (například celobiohydroláza či endoceluláza) získá navíc fytopatogen potřebné cukry pro svůj rozvoj (Gibson *et al.*, 2011). Ke vstupu do hostitelské buňky mohou využít i plasmodesmata, která spojují ostatní buňky, čímž zajišťují komunikaci mezi nimi (Zhang *et al.*, 2022). Bakteriální a houbové patogeny si umějí zajistit průchodnost těmito plasmodesmaty. Nechají opět působit specifické efekторы, které zabrání ukládání kalózy v blízkosti póru v buněčné stěně, jež by měla za následek jejich uzavření (Liu *et al.*, 2021).

Většina nekrotrofních patogenů zabíjí hostitelské buňky za použití nejrůznějších efektorů z řad toxinů. Ty mohou působit na inhibici cytokineze, způsobit pylovou sterilitu, různým způsobem měnit fyziologické procesy v buňce, která tak způsobí nekrózu tkáně (Horbach *et al.*, 2011). Patogeny na rostlinách dbají také na situace, při kterých je dokáže rostlinná buňka rozpoznat jen podle jejich struktury buněčné stěny. Často tak musí houbový patogen volit pomocí efektorů taktiku maskování chitinu, který jinak po zaregistrování rostlinou v ní spouští reakce na jeho destrukci (Horbach *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2022). Rostlinná buňka má tendenci různým dalším útokům se vyvarovat, ne vždy se ale setká s úspěchem.

### **1.2.1 Bakteriální patogeny rostlin**

Zastoupení jednotlivých patogenů a jejich rozšíření se liší kontinent od kontinentu, ovšem v zásadě se jedná o takové patogeny, jejichž výhodou je poměrně rychlé namnožení doplněné o vhodné podmínky v podobě teploty a přísunu srážek. Bakteriálních fytopatogenních druhů existuje v řádu stovek, za ty nejzajímavější se počítají někteří zástupci z rodu *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Pectobacterium*, *Xylella*, *Clavibacter* či například *Erwinia* (Mansfield *et al.*, 2012).

Fytopatogenní bakterie z rodu *Pseudomonas*, konkrétněji lze uvést bakterii *Pseudomonas syringae*, žijí často i na površích hostitelských rostlin. Existuje mnoho patologických typů tohoto gramnegativního druhu, které způsobují nežádoucí bakteriální skvrnitosti, deformace na ovocných stromech a různé rakoviny rostliny (Mansfield *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2018).

*Ralstonia solanacearum* se podle žebříčku nejznámějších fytopatogenních bakterií řadí na druhé místo (Mansfield *et al.*, 2012). Tato půdní gramnegativní bakterie je hrozbou pro komerční plodiny brambor, rajčat, tabáku nebo i banánů. Díky perzistentním buňkám může přežít nepříznivé podmínky a znovu napadnout hostitele (Martins *et al.*, 2018).

U bakterií rodu *Xanthomonas* se lze setkat s patogenními druhy jako *Xanthomonas oryzae*. Tyto bakterie představují velké riziko pro všechny pěstitele rýže (Mansfield *et al.*, 2012). V České republice se vyskytuje například gramnegativní bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* postihující brukvovité rostliny, které mají za následek výskyt černé hniloby (Mácha *et al.*, 2021).

Své prvenství v historii popsaných fytopatogenních bakterií si drží druh *Erwinia amylovora*, který často využívá opylující hmyz pro rychlejší šíření. Teplotní škála životaschopnosti se pohybuje od 4 °C do 37 °C (Martins *et al.*, 2018). Tato bakterie degraduje právě pomocí již zmíněných efektorů buněčnou stěnu hostitelských buněk (Gibson *et al.*, 2011). U růžovitých rostlin způsobuje bakteriální spálu (Mansfield *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2018).

### 1.2.2 Houbové patogeny rostlin

Ve spojitosti s houbovými fytopatogeny lze narazit na hostitelskou specificitu, kterou se vyznačuje většina jejich zástupců (Schirawski & Perlin, 2018). V případě houbových patogenů rostlin se mezi již zmíněné nekrotrofy řadí rody jako *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Ramularia* nebo i *Sclerotinia* a mnoho dalších. Z biotrofních patogenů stojí za zmínku houby z řádu Erysiphales (Horbach *et al.*, 2011).

Při styku rostliny s houbovým patogenem rodu *Botrytis*, například *Botrytis cinerea*, dochází kromě produkce toxinů také k navození reaktivních forem kyslíku u hostitele, jež zapříčiní oxidační vzplanutí a tvorbu lézí (Horbach *et al.*, 2011). Častým výskytem tohoto druhu bývají plody rajčat, vinné révy a jahodníků, ale může se vyskytovat také v listech či stoncích těchto rostlin. Pomocí nepohlavních spor zvaných konidie mají možnost se šířit větrem nebo vodou (Hua *et al.*, 2018).

Poměrně známým houbovým fytopatogenním rodem je *Fusarium*, který často infikuje kořenový systém. Mezi konkrétní zástupce patří *Fusarium solani* specializující se na infekci hrachu, *Fusarium graminearum* napadající obiloviny, jako bývá pšenice (Zhang *et al.*, 2022). Nebo známý druh *Fusarium oxysporum* a jeho různé patologické formy mohou kooperovat s plasmodesmaty při napadení buněk hostitele například rajčete jedlého (Liu *et al.*, 2021). U rajčat se vyskytuje také houbový patogen *Fusarium proliferatum*. Charakteristické hnědé nekrotické skvrny zapříčiní změkнутý stonek, kvůli kterému následně uvadá celá rostlina, a ta potom hyne (Schirawski & Perlin, 2018).

Fytopatogenní houby z řádu Erysiphales jsou charakterizovány jako ektoparazitičtí biotrofové. Mají schopnost narušit kutikulu, aby se do buněk dostaly co nejlépe (Horbach *et al.*, 2011). Tyto patogenní houby jsou zodpovědné za chorobu známou jako padlí, která vytváří bělavé skvrny na povrchu rostlin. Výskyt nemusí být pouze na listech, ale i na stoncích či plodech. Hostiteli bývá hlavně vinná réva, ale i různé druhy zeleniny, jiné ovoce nebo často i pšenice (Vielba-Fernández *et al.*, 2020).

### 1.3 Chemická ochrana rostlin

Pro uspokojení základních potřeb člověka je samozřejmostí dostatečný přísun živin. Právě kvůli neustálému se zvyšujícímu počtu obyvatel na Zemi vzniká velká poptávka po zemědělských plodinách, které budou mít minimální tržní ztráty díky vyhubení jejich škůdců (Aktar *et al.*, 2009; Montesinos, 2003).

Pro tuto zásadní ochranu plodin byly vytvořeny látky zvané pesticidy, jež mají různou podobu z hlediska mnoha faktorů. Do pesticidů se v širokém pojetí řadí také ty vyráběné z přírodních zdrojů a pomocí mikroorganismů, pro které se využívá spíše název biopesticidy (Khan *et al.*, 2022).

Vývoj pesticidů má dlouholetou historii. Koncem 19. století lidé začali používat anorganické materiály nejvíce na bázi mědi a síry. Velký přelom pak nastal v přibližné polovině 20. století, kdy se rozšířilo používání chemických látek jako poměrně známé DDT (triviálním názvem dichlordifenyltrichlorethan), BHC (též HCB – hexachlorbenzen), endrin a další (Rajmohan *et al.*, 2020; Tudi *et al.*, 2021).

Pesticidy lze rozdělit dle jejich zaměření proti škůdcům, a to na insekticidy (hmyz), herbicidy (nežádoucí rostliny) a rodenticidy (hlodavci). Pro zamezení infekce způsobené houbovými patogeny se využívají fungicidy a pro bakteriální choroby je možnost využít pesticidy baktericidní či bakteriostatické (Pankey & Sabath, 2004; Raffa & Chiampo, 2021).

Dále lze vzít v potaz dělení podle jejich míry spektra účinku, toxicitě, struktury, ale i podle jejich chemického složení. V tomto případě je možné zjednodušeně hovořit o anorganických nebo organických pesticidech, které se v dnešní době využívají nejvíce (Rajmohan *et al.*, 2020; Tudi *et al.*, 2021). Do nich se řadí čtyři hlavní skupiny. Organofosfáty a organochloridy fungující nejčastěji jako insekticidy a herbicidy, karbamáty jakožto častí představitelé fungicidů a pyrethryny s pyrethroidy, které působí toxicky na hmyz (Raffa & Chiampo, 2021; Tudi *et al.*, 2021).

Množství chemických pesticidů se od druhé poloviny minulého století stále zvyšuje, i přestože existuje právní posun k jejich snížení pomocí alternativ v podobě šetrných biologických pesticidů či tvorba geneticky modifikovaných organismů, které budou odolné vůči patogenům, a zajistí si tak větší výnosy plodin (Raffa & Chiampo, 2021). Jedná se o necelé 3 miliony tun chemických pesticidů ročně, přičemž z toho 45 % využívají evropské země (Rajmohan *et al.*, 2020; Tudi *et al.*, 2021).



### 1.3.1 Chemická ochrana proti houbovým patogenům

Fungicidy představují pro zemědělský průmysl rychlé ošetření rostlin před nebezpečnými plísněmi a jejich sporami. Z celkového prodeje všech pesticidů zauímají okolo 40 % (Zubrod *et al.*, 2019). Jsou schopné pronikat do buněk, kde započnou zpomalovat funkci enzymů, které mají na starost správný metabolismus lipidů, syntézu adenosintrifosfátu (ATP) či samotnou respiraci, což jim zapříčiní jejich záhubu (Raffa & Chiampo, 2021; Rajmohan *et al.*, 2020).

Kromě toho, že mají fungicidy například lipofilní charakter, jsou schopné v menších dávkách velmi dobře účinkovat na širokou škálu houbových patogenů obývajících především druhy ovoce, zeleniny, ale také obilovin (Petit *et al.*, 2012; Zubrod *et al.*, 2019). Často se jejich aplikace nevztahuje jen na semena, ale i na samotné plody, což umocňuje zásadní pravidlo, a to dané potraviny před samotnou konzumací vždy řádně umýt. Při aplikaci postřiku ze vzduchu na velké zemědělské oblasti, například u vinné révy, dochází často k riziku zanesení fungicidů větrem do míst, kde mohou kontaminovat také vodní systém (Zubrod *et al.*, 2019).

Fungicidní přípravky vykazují poměrně vysokou účinnost a jejich složení zasahuje i do anorganických sloučenin, kdy jde často o spojení síry a mědi (Petit *et al.*, 2012). Příkladem může být komerčně vyráběný přípravek cuproxat a kumulus pro ochranu vinné révy, rajčat, jahod a dalších plodin. Z anorganických přípravků se lze setkat i s takzvanou směsí Bordeaux, jejíž hlavní složkou je síran měďnatý. Směs využívají plantážníci k ochraně palmy areky obecné (Mathew *et al.*, 2015; Petit *et al.*, 2012).

Mezi účinné fungicidní organické látky se řadí přípravky ziram, mancozeb, benomyl účinný pro předsklizňovou i posklizňovou ochranu a fludioxonil, který se využívá proti houbě *Botrytis cinerea* na vinné révě (Petit *et al.*, 2012). Ze skupiny organochloridů stojí za zmínku chlorothalonil, tebuconazol a captan působící spíše širokospektrálně proti houbovým patogenům (Petit *et al.*, 2012; Raffa & Chiampo, 2021; Zubrod *et al.*, 2019).

### 1.3.2 Chemická ochrana proti bakteriálním patogenům

Účinnost chemických pesticidů proti bakteriím je založena převážně na dvou typech inhibice. V případě baktericidních látek dochází k usmrcení velkého množství bakterií. Oproti tomu bakteriostatické látky se snaží zastavit další růst bakteriálních buněk, bakterie též usmrtí, ale v tomto případě se nejedná o tak vysoké procento, jako tomu je látek baktericidních (Pankey & Sabath, 2004; Raffa & Chiampo, 2021). V porovnání s fungicidy není rozmanitost těchto chemických pesticidů natolik markantní, a tak na bakterie často používají zemědělci fungicidní chemické přípravky (Zubrod *et al.*, 2019).

Z příkladů onemocnění způsobených bakteriemi lze jmenovat strupovitost brambor, za kterou je zodpovědná bakterie rodu *Streptomyces*. Proti této chorobě zemědělci nejčastěji bojují aplikací anorganických pesticidů obsahující chlornan sodný, roztoky kyseliny chlorovodíkové, nebo využijí pomoci skrz zmíněné fungicidy, kterými je mancozeb či fludixonil (Pu *et al.*, 2022).

### 1.3.3 Dopady chemické ochrany

Chemický pesticid je sice dobrý sluha, ale zlý pán, proto by se s jeho množstvím a aplikací mělo zacházet vždy s co největší opatrností. I přestože je konkrétní pesticid aplikován na danou rostlinu, většina z této aplikované látky končí v okolí rostliny, z velké části v půdě, kde zvládne zabít užitečné mikroorganismy napomáhající dané rostlině (Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Rajmohan *et al.*, 2020). V půdě se mohou látky ukládat, dostávat se do podzemních vod, ale mohou i putovat a končit v povrchových vodních systémech představující řeky a jezera (Aktar *et al.*, 2009).

Intoxikace povrchové vody zapříčiní i styl aplikace, jako bývají letecké postřiky na velkých zemědělských oblastech. V těchto případech jde především o problém, že se plochy často nadměrně zavlažují. Půda tak velké množství vody nedokáže pojmout, čímž pak dochází k jejímu odtoku z oblasti (Carvalho, 2017; Tudi *et al.*, 2021).

Ke kontaminaci vzduchu dochází použitím postřiků na způsob sprejů, díky čemuž se do ovzduší rozšíří drobné kapky, které jsou následně unášeny větrem (Carvalho, 2017; Rajmohan *et al.*, 2020). U většiny pesticidů hraje roli též jejich těkavost. Ta zapříčiňuje únik látek do ovzduší a jejich následný transport do oblastí, kde mohou zpětně tyto látky kondenzovat a kontaminovat zdroje sladkých vod, jako tomu je v Severní Americe u Velkých jezer (Carvalho, 2017; Li & Jin, 2013). Přenos chemického pesticidu umocní aktuální počasí – vítr, déšť a teplota, která zároveň dokáže napomoci rychlejší degradaci látek v pesticidu (Tudi *et al.*, 2021).

Právě degradace pesticidů je někdy záležitostí pár hodin, ale může trvat i řadu let. Nejčastěji k tomuto jevu dochází pomocí mikroorganismů (pomocí hub a bakterií), různých chemických reakcí probíhajících v půdě nebo za pomoci slunečního záření, jehož degradace se projevuje především u insekticidů (Raffa & Chiampo, 2021; Tudi *et al.*, 2021).

Používání chemických pesticidů prochází velmi důraznou kontrolou z hlediska jejich toxicity vůči životnímu prostředí, způsobu nakládání s vytvořeným odpadem, ale i z hlediska dopadu na necílové organismy včetně samotného člověka. Pesticidy nepředstavují však riziko pouze pro pevninu, jelikož existují záznamy o jejich škodlivém účinku na korálové útesy v mořích (Carvalho, 2017; Damalas & Eleftherohorinos, 2011; Rajmohan *et al.*, 2020).

## 1.4 Biologická ochrana rostlin pomocí mikroorganismů

Se zvyšováním výnosů zemědělských plodin na této planetě postupně převládá názor k ochraně korespondující s životním prostředím a zdravím všech organismů. Díky tomu byla vytvořena šetrnější metoda ochrany spojená s využitím přírodních zdrojů (Buttimer *et al.*, 2017; Montesinos, 2003). Tyto zdroje nepředstavují jen všudypřítomné mikroorganismy, ale jejich významný účinek může snížit dopad chemických látek na zemědělské plochy.

Za ty nejvýznamnější představitele biologické ochrany z řad mikroorganismů stojí za zmínku některé bakterie z rodu *Bacillus* (jako např. *B. velezensis*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*), dále vybraní zástupci rodu *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida*), ale řadí se sem i houba *Trichoderma harzianum* nebo *Beauveria bassiana* (Chowdhury *et al.*, 2015; Kowalska *et al.*, 2020; Oliver *et al.*, 2019).

### 1.4.1 Strategie biologické ochrany mikroorganismy

Nejčastěji se hovoří o mechanismech účinku působení sekundárních metabolitů, které může vést k antagonistickému efektu (Kowalska *et al.*, 2020). Zmíněná účinná houba *Trichoderma harzianum* bojuje proti fytopatogenním houbám na rostlinách pomocí látek zvaných peptaiboly, které umějí potlačit klíčení patogenních spor a zpomalí růst hyf u patogenů *Botrytis cinerea* či *Phytophthora parasitica*. Dále produkuje různé steroidy, laktony a jiné látky schopné inhibice (Khan *et al.*, 2020; Kowalska *et al.*, 2020).

U zástupce *Beauveria bassiana* došlo také ke zjištění, že kromě entomopatogenní funkce napomáhá některým rostlinám proti patogenu *Verticillium dahliae*. Dokonce zvětrává i horniny, čímž přispívá rostlinám k příjmu železa v půdách bohatých hlavně na vápník (Kowalska *et al.*, 2020; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018).

Bakterie rodu *Bacillus* se netají produkcí sekundárních metabolitů typu lipopeptid surfaktin či bakteriociny mající antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia maylovora* a jiných zástupců (Chowdhury *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2018; Kowalska *et al.*, 2020). Z tohoto rodu se vyznačují i některé (*B. velezensis* FZB42) se schopností potlačení houbových škůdců jako *Fusarium graminearum* (Fan *et al.*, 2018). Kromě významného inhibičního účinku vůči patogenům napomáhá rod *Bacillus* i s růstem rostliny produkcí růstových hormonů. Díky této schopnosti si získaly ohlas u zemědělců (Fan *et al.*, 2018; Kowalska *et al.*, 2020).

Velmi důležitou roli hraje též produkce sekundárních látek sideroforů vyskytujících se například u bakterií rodu *Pseudomonas* nebo i u rodu *Bacillus* (Khan *et al.*, 2022; Oliver *et al.*, 2019). Mikroorganismus produkuje molekuly se schopností vázat železo ve formě  $Fe^{3+}$  z půdy, které následně vstřebává pro svou vlastní výživu (Arya *et al.*, 2018; Buyer *et al.*, 1990).

Některé bakteriální siderofory mají vyšší afinitu k železu než houbové patogeny na rostlinách, čímž zapříčiní mezi nimi konkurenci o významný zdroj obživy (Glick & Bashan, 1997). Tímto procesem zajišťuje biologickou ochranu rostlin bakterie *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* či *Bacillus subtilis*, který se podílí na inhibici vadnutí způsobeného houbou rodu *Fusarium* (Arya *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2022; Kowalska *et al.*, 2020). Mimo již zmíněné mechanismy účinku biologické ochrany mikroorganismů se uvádí také produkce lytických enzymů či pouhé fyzické zabránění niky (Khan *et al.*, 2022; Oliver *et al.*, 2019).

#### 1.4.2 Biologická ochrana v praxi

Většina světové populace tíhne k udržitelnému zemědělství, a proto se společnost snaží vyhovět aktuálním trendům. Proces výroby biopesticidů šetrných vůči životnímu prostředí je často běh na dlouhou trať. Potencionální mikroorganismy schopné biologické ochrany se musejí otestovat vůči více patogenům pro zjištění jejich spektra účinnosti (Montesinos, 2003). Mechanismy působení, nízká toxicita sekundárních látek, ale také snášenlivost na pesticidy hrají významnou roli při výběru mikroorganismu dávající vznik komerčním biologickým pesticidům (Kowalska *et al.*, 2020; Montesinos, 2003).

Při jejich přípravě se nesmí opomenout takzvaný nosič, který vytváří danému mikroorganismu ty nejlepší podmínky pro jeho přežití před samotnou aplikací (Malusá *et al.*, 2012). Podle použitého materiálu je lze dělit na suché využívající například rašelinu, jíl, ale i třeba perlit, nebo kapalné, které mají často základ v různých suspenzích s olejem a vodou. Některé práškové biopesticidy se mohou rozmíchávat v kapalině, a ta se poté aplikuje dle potřeby za vhodného počasí (Kowalska *et al.*, 2020; Malusá *et al.*, 2012).

V rámci Evropské unie existuje databáze povolených pesticidů, kde mimo jiné jsou uvedeny i ty, jež mají aktivní složku mikroorganismus (Kowalska *et al.*, 2020; Oliver *et al.*, 2019). Jedním z nich je přípravek SERENADE® ASO, jehož účinnou látku tvoří *Bacillus amyloliquefaciens* QST 713 (Fan *et al.*, 2018). Z komerčně vyráběných biologicky šetrných přípravků se používá také tekutý přípravek PROMETHEUS® s bioaktivní bakterií rodu *Pseudomonas* nebo HIRUNDO® obsahující bakterie rodu *Bacillus* se schopností inhibovat růst houbových patogenů jako je *Sclerotinia sclerotiorum* (Novotný & Neuwirthová, 2014).

## 2 METODIKA

### 2.1 Mikroorganismus

#### 2.1.1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* CBS KNAW 123 668 (FOL)

Houba byla získána z nizozemské sbírky (CBS – KNAW, Nizozemsko). Jedná se o půdní patogen, který napadá rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*) pěstované v teplých podmínkách (ve sklenících, ale i na polích) v jeho optimální teplotě 28 °C (Nirmaladevi *et al.*, 2016). Po proniknutí přes rhizodermis rostliny proniká patogen do xylému, kde začne tvořit mycelium. U rajčat především zamezí přísunu vody, což má za následek žloutnutí listů a jejich následné uvadání (McGovern, 2015; Srinivas *et al.*, 2019).

Houba je schopna tvořit celkem tři typy spor, a to makrokonidie, mikrokonidie a chlamydospory. Nejčastěji se vyskytují makrokonidie se třemi přepážkami, které jsou na koncích do špičky. Menšími sporami jsou mikrokonidie elipsoidního tvaru nejčastěji bez přepážek, které napomáhají tvorbě mycelia ve xylému horní části rostliny (Nirmaladevi *et al.*, 2016). Poslední typ spor se jeví jako spící, které čekají na výskyt hostitele (Srinivas *et al.*, 2019).

Mycelium na Petriho miskách s PDA médiem vypadá po okrajích řídce s bělavým pigmentem, který se směrem ke středu mycelia mění ve starorůžovou barvu eskalující často do odstínů fialové. Na šikmých agarech s PDA médiem se pigment mycelia projevuje od dna zkumavky sytou červenorůžovou barvou, která se směrem k hrdlu zkumavky mění na fialovou.

#### 2.1.2 *Bacillus velezensis* FZB42 (DSM 23117)

Byl získán z německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig, Německo). Tato grampozitivní bakterie (dříve označovaná jako *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42) má podobu tyčinek vyskytujících se samostatně či v drobných skupinách (Mácha *et al.*, 2021). Bakterii vyhovují podmínky od 15 °C do 45 °C (Ruiz-García *et al.*, 2005).

Jsou schopné produkovat látky fungující antimikrobiálně, a tím tak biologicky chránit rostlinu proti houbovým i bakteriálním patogenům. Její první izolace proběhla z řeky Vélez ve Španělsku (Ruiz-García *et al.*, 2005). Monokolonie této bakterie vykazuje na LB médiu perlově bílou barvou s vlněným okrajem.

### 2.1.3 *Bacillus subtilis* CCM 2217

Bakterie byla získána z české sbírky mikroorganismů (CCM, Česká republika). Její výskyt je nejčastěji situován v blízkosti kořenů rostlin v půdě (Earl *et al.*, 2008). U této grampozitivní bakterie schopné vytvářet endospory byla zjištěna podpora růstu samotné rostliny a zároveň její biologická ochrana využívaná v zemědělském průmyslu (Nagórska *et al.*, 2007; Stein, 2005).

Druh *B. subtilis* je schopen inhibovat růst více než dvěma desítkám fytopatogenům z řad hub i bakterií, a to za produkce antimikrobiálních látek jako je například surfaktin nebo pro příklad iturin (Nagórska *et al.*, 2007; Stein, 2005). Světle žlutobílá monokolonie tvoří na LB médiu roztržený okraj.

### 2.1.4 *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525

Bakteriální kmen byl získán ze sbírky mikroorganismů American type culture collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Jde o gramnegativní aerobní bakterii ve tvaru tyčinek, která velmi dobře roste v optimální teplotě 25–30 °C (Kahli *et al.*, 2022; Scales *et al.*, 2014). Výskyt je pro tento typ situován v půdě, kde je v blízkosti kořenů rostlin. Zároveň napomáhá i jejich ochraně proti fytopatogenům díky produkci široké škály sekundárních metabolitů (Arya *et al.*, 2018; Scales *et al.*, 2014).

Bakterie produkuje siderofory schopné vychytávat železo v rhizosféře, o které soutěží například i fytopatogenní houby (Glick & Bashan, 1997; Whipps, 2001). Pigment fluorescein vylučovaný bakterií má charakteristické fluorescenční vlastnosti pod UV světlem (Arya *et al.*, 2018; Glick & Bashan, 1997). Monokolonie s drobně zvlněným okrajem má na LB médiu matně bílou barvu s drobným zelenavým nádechem.

## 2.2 Materiály

### 2.2.1 Kultivační média

Všechna kultivační média a roztoky byly sterilizovány v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C. Laboratorní sklo a plastový materiál prošly sterilizací 8 hodin při 100 °C.

#### Potato dextrose agar (PDA médium)

Bramborová infuze	200 g.l <sup>-1</sup>
Glukóza	20 g.l <sup>-1</sup>
Agar	15 g.l <sup>-1</sup>

Do 1 000 ml destilované vody bylo přidáno 39 g připravené směsi a sterilizováno.

### **Bushnell Haas Broth médium (BH médium)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g.l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g.l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 g.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,02 g.l <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	8 μM / 200 μM

Navážené složky byly přidány do 1 000 ml destilované vody pro tvorbu média. V závislosti na koncentraci bylo přidáváno železo v množství 0,002 g.l<sup>-1</sup> (8 μM Fe<sup>3+</sup>) či 0,05 g.l<sup>-1</sup> (200 μM Fe<sup>3+</sup>). Pro pevná média byl přidán ještě agar (20 g.l<sup>-1</sup>).

Pro růst obou mikroorganismů bylo použito BH médium, do kterého byla po sterilizaci přidána glukóza (5 g.l<sup>-1</sup>) a směs aminokyselin (5 g.l<sup>-1</sup>) – Casamino acids (Difco) jako zdroj uhlíku a energie (BHAK médium).

### **Komplexní Luria – Broth médium (LB médium)**

Trypton	10 g
Yeast extrakt	5 g
NaCl	10 g

Jednotlivé navážené složky byly rozpuštěny v 1 000 ml destilované vody a pH upraveno na hodnotu 7,2 pomocí 40% roztoku NaOH a laboratorního pH metru. Pro přípravu pevné půdy k médiu před sterilizací bylo přidáno 18 g agaru na litr média. Po ochlazení agarové půdy na teplotu kolem 50 °C bylo médium rozlito do připravených sterilních Petriho misek.

### **Malt Extract Broth médium (MEB médium)**

Sladový extrakt	17 g
Mykologický pepton	5 g

Navážené množství bylo rozpuštěno v 1 000 ml destilované vody a následně ponecháno 15 minut v klidu pro nabobtnání a standartně sterilizováno v autoklávu.

## **2.2.2 Roztoky**

### **Fyziologický roztok**

NaCl	9 g.l <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> O)
------	----------------------------------------

Roztok byl připraven smícháním naváženého chloridu sodného s destilovanou vodou a následně sterilizováno.

### **PBS - TWEEN ® 80**

PBS pufr (0,1 M, pH 7.0)	10 ml
TWEEN® 80	10 µl

Roztok byl připraven smícháním PBS pufru (WWR) se smáčedlem TWEEN® 80 (Sigma). Následně byla směs zvortexována a přenášena na šikmé agary pro sběr konidií.

### **Tris - Glycerol**

Glycerol	40% (v/v)
Tris - HCl	25 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 M

Roztok byl připraven smícháním všech složek a jeho pH bylo upraveno na 7,5 a sterilizován.

## **2.3 Pracovní postupy**

### **2.3.1 Krátkodobé uchování kultur na pevných médiích**

#### **Bakteriální kmeny**

Pro pozorování čerstvého materiálu vybraných mikroorganismů bylo zapotřebí kultury kultivovat na Petriho miskách s příslušným médiem obohaceným o agar. Jako výchozí kultura byla použita kryokonzerva uchovávaná v -80 °C. Sterilně byla přenesena část kultury pomocí křížového roztěru na pevné medium, pro ověření čistoty a dosažení většího nárustu biomasy. Misky s bakteriální kulturou byly inkubovány při teplotě 28 °C po dobu 24 hodin.

#### **Houbové kmeny**

Při inokulaci houbového patogenu se použila metoda přenesení malého čtverce agarů (rozměr 0,5 cm) s narostlým myceliem z jedné misky do nově sterilně připravené. Misky byly následně kultivovány při 28 °C po dobu 3 dnů.

Další metodou pro kultivaci houbového kmene a jeho pozorování byl použit šikmý agar. Do sterilních zkumavek bylo nalito PDA médium do přibližné výšky 3 cm. Následně se hrdla zkumavek ožehla pomocí kahanu a zazátkovala. Zkumavky byly opatrně položeny na skleněnou tyčinku pro docílení šikmé půdy a ponechány ztuhnout. Následně byl proveden jednoduchý roztěr kultury sterilní kličkou po celé délce agarů. Kultura byla inkubována při teplotě 28 °C po dobu 3 dnů.



### 2.3.2 Příprava konzerv bakteriálních a houbových kultur

K dlouhodobému uchovávání bakteriálních kultur nejsou pevné misky ani šikmé agary nejvhodnější. Z tohoto důvodu byly připraveny takzvané kryokonzervy, které byly použity pro další experimenty. Pro přípravu bakteriální konzervy bylo použito stejné množství Tris/glycerolu a bakteriální kultury z narostlého inokula v tekutém médiu, tedy vždy v poměru 1:1. Následně byla směs v kryozkumavce homogenizována, popsána a uchována v -80 °C.

U přípravy konzerv s houbovým patogenem rodu *Fusarium* byly použity jeho konidie. Pro jejich získání se odebralo houbové mycelium, které rostlo na šikmém agaru po dobu 3 dnů při teplotě 28 °C. Pro získání konidií bylo využito roztoku složeného z PBS pufru a TWEEN80. Do zkumavky se šikmým agarem byly nality 2 ml tohoto roztoku a následně jemnými tahy jednorázovou bakteriologickou kličkou stahovány konidie z mycelia do roztoku. Tekutina s konidiami byla přefiltrována přes sterilní filtr typu Syringe Strainer (firma) o velikosti 15 µm za pomoci injekční stříkačky k vytvoření podtlaku. Přefiltrovaná tekutina byla smíchána s Tris/glycerolem v poměru 1:1 na tvorbu konzervy pro dlouhodobé uchování a opět přenesena do -80 °C.

### 2.3.3 Příprava inokula houbové kultury

Z narostlé Petriho misky s houbovým myceliem byly odebrány 3 čtverce agaru (rozměr 0,5 cm). Do tekutého MEB média byly tyto čtverce vloženy, a poté kultivovány po dobu 26 hodin při 28 °C a 190 rpm. Za pomoci Ultra-turrax homogenizátoru bylo narostlé mycelium v podobě pelet 30 sekund homogenizováno. Takto připravené inokulum bylo použito pro další experimenty.

### 2.3.4 Kultivace houbové kultury v tekutém médiu

Růst houbové kultury pro další experimenty byl sledován v připraveném tekutém komplexním médiu. Pro houbovou kulturu bylo vybráno médium MEB. Inokulační kultura byla připravena postupem vysvětleným výše. Následně byl do 500 ml baněk doplněných 100 ml MEB média přidán 1 ml připraveného inokula. Uzavřená baňka byla kultivována při 28 °C a 190 rpm a v průběhu jejího růstu byly sledovány v pravidelných časových intervalech (8., 20. a 26. hodin) růstové a fyzikální parametry (cdw, pH). Růstová kinetika pro dané časové úseky se měřila ve třech paralelách. V případě optimalizovaného BH média s 8 µM Fe<sup>3+</sup>, doplněném glukózou (5 g.l<sup>-1</sup>) a směs aminokyselin (5 g.l<sup>-1</sup>) jako zdroje uhlíku (BHAK), byla kultivace prováděna obdobným způsobem.

### **2.3.5 Kultivace bakteriální kultury v tekutém médiu**

Pro přípravu bakteriálního inokula bylo 100 ml LB média zaočkováno kulturou z glycerinové konzervy. Po 24 h růstu při 28 °C a 190 rpm byla tato kultura použita jako inokulum pro vlastní růstový experiment. Na 100 ml sterilního tekutého komplexního LB média a optimalizovaného BHAK média bylo zaočkováno 1 ml narostlé bakteriální kultury.

V případě kultivace na optimalizovaném BHAK médiu byla použita kultura získaná centrifugací (6 min, 6 000 rpm a 21 °C) z 10 ml LB média a promytím 10 ml fyziologického roztoku pro odstranění zbytků bohatého média. Celý experiment probíhal ve třech paralelách. Kultivace probíhala při 28 °C v orbitálním inkubátoru při 190 rpm. V průběhu růstu byly odebírány vzorky pro stanovení optické hustoty (OD) při 600 nm, pH a koncentrace životaschopných buněk (KTJ/ml). Zároveň v případě optimalizovaného BHAK média byla stanovena koncentrace zbytkové glukózy jako zdroje uhlíku.

### **2.3.6 Interakce na pevném médiu**

Při zjišťování působení antagonisty bakteriálního kmene na patogena rodu *Fusarium* na pevném médiu BHAK bylo zapotřebí rozdělit Petriho misku na dvě stejné poloviny. Na vhodný typ média byla nanášena po celé polovině vybraná bakteriální kultura za pomoci bakteriologické kličky, která nesla inokulum dané bakterie. Na druhou polovinu Petriho misky bylo nanášeno mycelium houbového patogenu. Inkubace probíhala po dobu 7 dní do doby vytvoření inhibiční zóny antagonistou.

### **2.3.7 Stanovení suché biomasy houbové kultury**

Po kultivaci houbového kmene byla použita kultivační kapalina, která byla přefiltrována pomocí aparatury s vývěvou. Mokrý filtrát zachycený na filtračním papíře byl zvážena a následně vysušen v laboratorní sušárně do konstantní váhy. Suchá hmota mycelia byla vypočtena jako rozdíl mezi mokrou a suchou váhou.

### **2.3.8 Stanovení glukózy v médiu**

Ke zjištění úbytku glukózy jako zdroje cukru v tekutém optimalizovaném BHAK médiu byla použita souprava činidel od společnosti BIOLATEST – GLUKOSA GOD 1500 (GLU GOD 6x250). Nejprve bylo zapotřebí připravit pracovní roztok, který se skládá z činidla 1 obsahující enzymy (peroxidáza, 4-aminoantipyrin, glukózaoxidáza) a z činidla 2 obsahující pufr – chromogen (fosforečnanový pufr, 3-methyl-fenol) smíchané v destilované vodě dle návodu.

Před samotným stanovením vlastních vzorků byla připravena kalibrační řada s 6 různými koncentracemi glukózy (mmol/l). Ta posloužila pro výsledný přepočet stanovených hodnot u vlastních vzorků.

Ve zkumavkách byl smíchán vždy pracovní roztok s kalibračními vzorky, vzorky supernatantu kultury i kontrolním vzorkem v poměru 100+1, v tomto případě 1 ml pracovního roztoku a 10  $\mu$ l vzorku. Kontrolní roztok obsahoval destilovanou vodu. Vzorky supernatantů kultur z tekutého optimalizovaného BHAK média byly připraveny oddělením peletu centrifugací 0,5 ml vzorku (3 minuty, 6 000 rpm, 24 °C). Inkubace proběhla po dobu 15 minut při 37 °C bez přímého kontaktu se světlem, a pak byla měřena jejich absorbance při vlnové délce 540 nm do 40 minut.

### **2.3.9 Stanovení životaschopnosti buněk**

V průběhu růstové kinetiky bakteriálního kmene bylo zaznamenáváno KTJ/ml (kolonie tvořící jednotky), díky čemuž se zjišťovalo množství životaschopných kolonií pomocí výsevu na Petriho misku s pevným médiem LB. Správný počet kolonií na misce pohybující se v rozmezí od 30 do 300 bylo třeba získat pomocí takzvaného desítkového ředění fyziologickým roztokem.

Suspenze buněk byla vždy ředěna na 10x nižší koncentraci čistým fyziologickým roztokem ve stanoveném poměru (0,9 ml fyziologického roztoku a 0,1 ml kultury). Na pevné médium pak bylo nanášeno 0,1 ml ředěné suspenze nejméně ze tří ředění a rozetřeno mikrobiologickou hokejkou. Misky byly inkubovány při 28 °C 24 hodin, kde bylo následně spočítáno množství kolonií. KTJ/ml kultury bylo vypočteno vynásobením počtu kolonií příslušným ředěním.

### **2.3.10 Stanovení koncentrace buněk**

Za pomoci spektrofotometru byla měřena hustota bakteriální kultury při vlnové délce 600 nm. Vzorek byl stanovován proti blanku (médium nebo ředěné médium) v plastových kyvetách (d=1 cm) o objemu 1,5 ml. Hodnoty optické denzity se pro správnost přístroje musejí pohybovat v rozmezí od hodnot 0,1-0,6, proto bylo nutné vzorky kultury patřičně ředit.

### 2.3.11 Výpočet a grafické znázornění růstových parametrů

Pro grafické znázornění zvětšování množství biomasy bakteriální kultury byl vynesena graf závislosti  $OD_{600}$  na čase. K dalším charakteristickým vlastnostem růstu bylo potřeba vyneset grafická závislost  $\log_2 OD$  na čase. Pro zjištění dané směrnice přímky po tomto grafickém vynesení byla použita rovnice:

$$y = k \cdot x + q$$

Při zjišťování počtu generací za časovou jednotku je směrnice přímky z vynesení „c“:

$$c = k [h^{-1}]$$

Rychlost množení bakterií byla získána výpočtem specifické růstové rychlosti „ $\mu$ “:

$$\mu = c \cdot \ln 2 [h^{-1}]$$

Pro zjištění doby zdvojení biomasy „T“ byl využit vztah:

$$T = (c^{-1}) \cdot 60 [\text{min}]$$

## 2.4 Přístrojová technika

<b>Přístroj</b>	<b>Název</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Země původu</b>
Třepaný inkubátor	ISS - 7100R	Jeio Tech	Korejská republika
UV/VIS spektrofotometr	UV - 1601	Shimadzu	Japonsko
Mikroskop	LABOVAL 3	Kodak	USA
Centrifuga	Centrifuge 5804R	Eppendorf	Německo
Vortex	VORTEX GENIUS 3	IKA	Německo
Míchačka	RH basic 2	IKA	Německo
Sušička	HS122A	BMT	Česká republika
Flowbox	BIO 96	Labox	Česká republika
pH metr	pH 340	WTW	Německo
Váhy	AJ-2200CE	VIBRA	Japonsko
Homogenizátor	IKA TP18/10	ULTRA-TURRAX	Německo

## 3 VÝSLEDKY

### 3.1 Výběr kultivačního média

Na samotném počátku práce byly vybrány tři různé sbírkové bakterie, u kterých byla popsána schopnost inhibovat růst nežádoucích fytopatogenních mikroorganismů. Konkrétně se jednalo o *B. velezensis* FZB42 (DSM 23117), dále *B. subtilis* CCM 2217 a *P. fluorescens* ATCC 13525. Pro tyto tři bakterie a zároveň pro sbírkovou patogenní houbu *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 123 668 bylo nutné vybrat společné kultivační médium, jež by bylo vhodné pro sledování vzájemných interakcí. Dále bylo také zapotřebí zjistit kvalitu růstu a čistotu jednotlivých kmenů.

Z pevných médií pro testování růstu bylo vybráno LB a PDA médium, která představují komplexní bohaté médium. BH médium s 8 a 200  $\mu\text{M}$  železem je minimální definované médium, kde zdrojem uhlíku a energie je glukóza. Každý ze čtyř mikroorganismů na čtyřech typech médiích byl kultivován při 28 °C. Jejich růst byl pozorován po dobu tří dnů.

Z hlediska rychlého množení se vybraným bakteriím dařilo nejlépe na LB médiu, kde po 24 hodinách byl nárůst již okem patrný. Na tomto médiu dobře rostla i houba *Fusarium*, která dokázala po 72 hodinách vytvořit z místa čtverce silnou bělavou síť mycelia v průměru 6 cm (Obr. č. 1).



Obr. č. 1: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pevné LB médium, 72 hodin, 28 °C

Na PDA médiu tvořila patogenní houba po třech dnech bohaté mycelium s výrazně narůžovělým pigmentem (Obr. č. 2). Bakterie vykazovaly známky růstu na tomto médiu již po 24 hodinách, ale oproti LB médiu byl nárůst bakterií výrazně menší.



Obr. č. 2: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, pevné PDA médium, 72 hodin, 28 °C

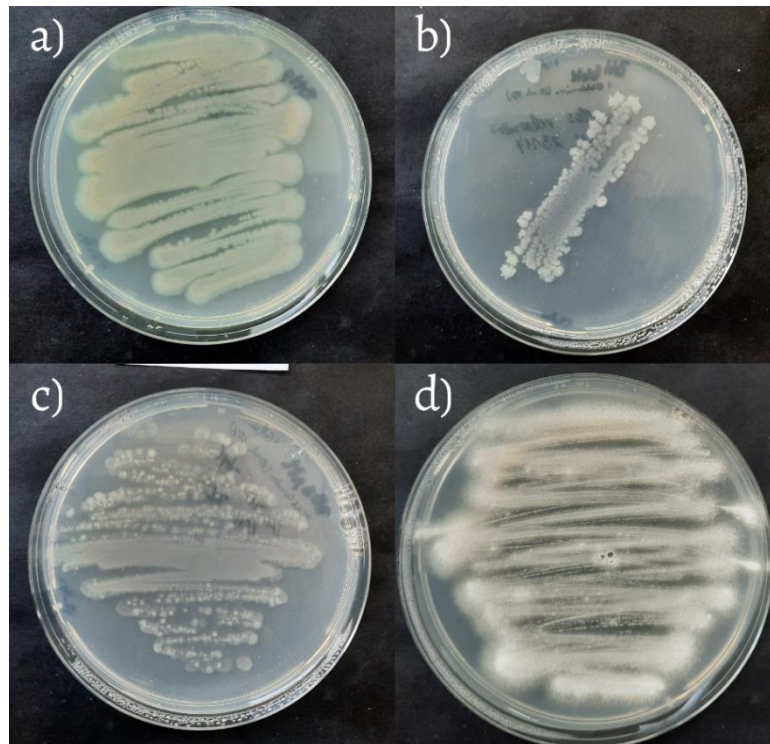
Z hlediska BH médií bylo patrné, že růst vybraných bakterií i patogenní houby byl pomalejší. Kolonie obou bakterií rodu *Bacillus* a s nimi bakterie rodu *Pseudomonas* vykazovaly znatelný nárůst až po 48 hodinách od počátku kultivace, a to jak na BH médiu s nízkou, tak i s vysokou koncentrací železa.

Při pohledu na houbu rodu *Fusarium* mycelium vykazovalo na povrchu bílé zabarvení. Po třech dnech kultivace dosahovala velikost mycelia v průměru 6,2 cm u BH média s nízkou koncentrací železa, s vysokou koncentrací činil průměr 7 cm.

Vzhledem k podobné rychlosti růstu bakterií i houby na BH médiu bylo vybráno právě toto médium ke společným interakcím. Ovšem pro zajištění větší kompetice o zdroj železa bylo použito BH médium s jeho nižší koncentrací ( $8 \mu\text{M Fe}^{3+}$ ). Pro optimalizaci růstu bylo navíc BH médium obohaceno ještě o glukózu ( $5 \text{ g.l}^{-1}$ ) a směs aminokyselin (Casamino acids – Difco) ( $5 \text{ g.l}^{-1}$ ) jako zdroje uhlíku (BHAK).

Při testování růstu na optimalizovaném BHAK médiu projevovala bakterie *P. fluorescens* drobný fluoreskující charakter, a následně po 24 hodinách kultivace při 28 °C plně porostla Petriho misku, zbývající dvě bakterie na tom byly s růstem obdobně (Obr. č. 3).

Z důvodu lepší manipulace s patogenem při vzájemných interakcích se využívala zhomogenizovaná forma. Růst houby *Fusarium*, které bylo na pevnou půdu nanášeno homogenizované, po 72 hodinách dosáhl viditelného nárůstu a projevil se myceliem bílé barvy (Obr. č. 3).



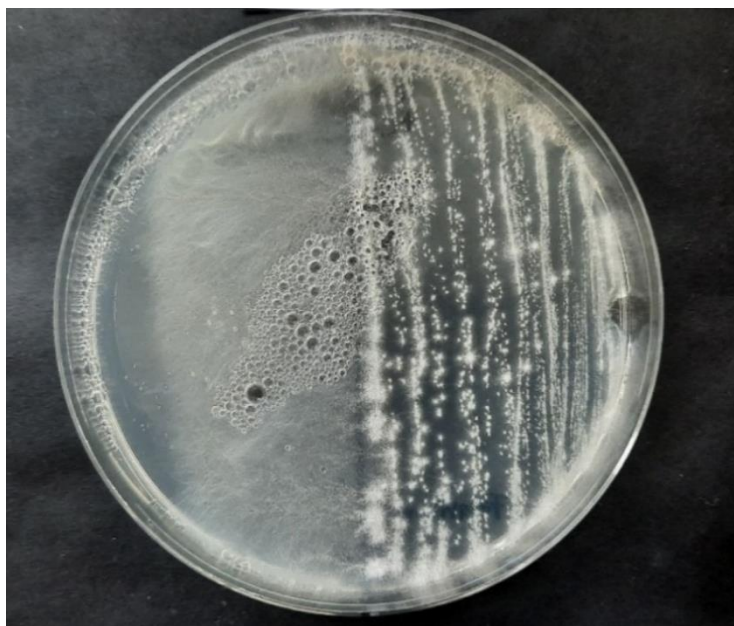
Obr. č. 3: Testování růstu na optimalizovaném BHAK médiu, 28 °C, 72 hodin  
a) *P. fluorescens* b) *B. velezensis* c) *B. subtilis* d) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

### 3.2 Interakční testy na vybraném pevném médiu

Na Petriho miskách s optimalizovaným BHAK médiem obsahujícím 8  $\mu\text{M}$  železo byly prováděny interakce vybraných tří bakterií proti patogenní houbě. Kultivace probíhala při teplotě 28 °C po dobu 72 hodin.

Pro lepší zachycení inhibiční zóny byla miska pomyslně rozdělena na dvě poloviny, kde na jednu polovinu byl rozetřen patogen a proti němu jeho bakteriální antagonista. Jako kontrolní vzorek byl sledován růst mycelia u patogenní houby *Fusarium*. Ta byla nanášena po polovině Petriho misky s pevným BHAK médiem (Obr. č. 4).





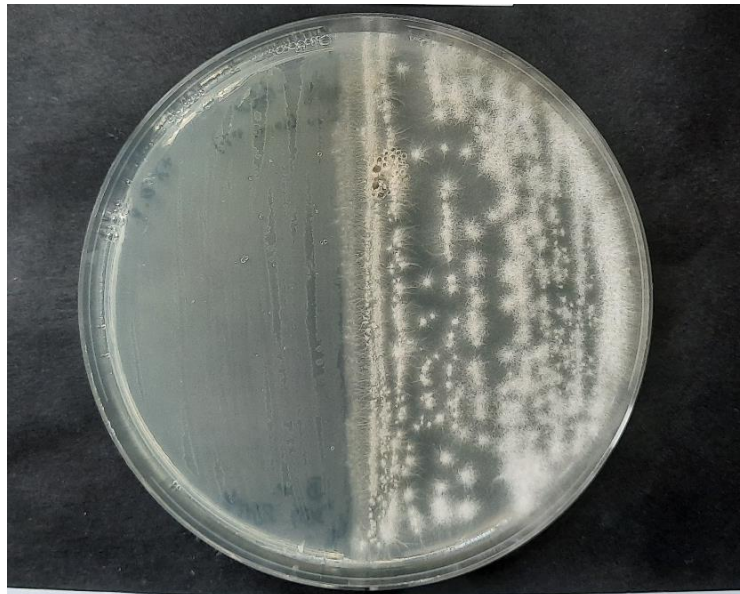
Obr. č. 4: Vpravo nanesené *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C

Při interakci houby a antagonistické bakterie *B. subtilis* CCM 2217 se v oblasti zóny interakce tvořilo velmi slabé mycelium houby. Lze pozorovat viditelný tlak antagonistické bakterie na houbu, jejíž bílé shluky mycelia jsou zatlačeny až k samotnému okraji Petriho misky, čímž byla dokázána inhibiční vlastnost této bakterie (Obr. č. 5).



Obr. č. 5: Vlevo *B. subtilis* a vpravo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C

V případě působení bakterie *B. velezensis* DSM 23117 proti patogenu *Fusarium* nebyl na Petriho misce vidět dostatečný inhibiční efekt. *Fusarium* tvořilo mycelium do shluků i v oblasti interakční zóny mezi oběma mikroorganismy. Do interakční zóny mycelium zasahovalo i v případě výskytu bakterie, která svůj růst v této oblasti neměla natolik výrazný (Obr. č. 6).



Obr. č. 6: Vlevo *B. velezensis* a vpravo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C

Největší antagonistický účinek oproti patogenu *Fusarium* byl pozorován u bakterie *P. fluorescens* ATCC 13525. V místě kontaktu těchto dvou mikroorganismů byla patrná inhibiční zóna o velikosti 0,2 cm bez přítomnosti mycelia houbového patogena. Opět jako v případě *B. subtilis* byl růst mycelia zatlačen až k okraji Petriho misky (Obr. č. 7).

Po porovnání tří interakcí bylo vyhodnoceno, že pro další inhibiční experimenty proti *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se nejlépe osvědčila bakterie *P. fluorescens* ATCC 13525.



Obr. č. 7: Vlevo *P. fluorescens* a vpravo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C

### 3.3 Růstové parametry v tekutých médiích

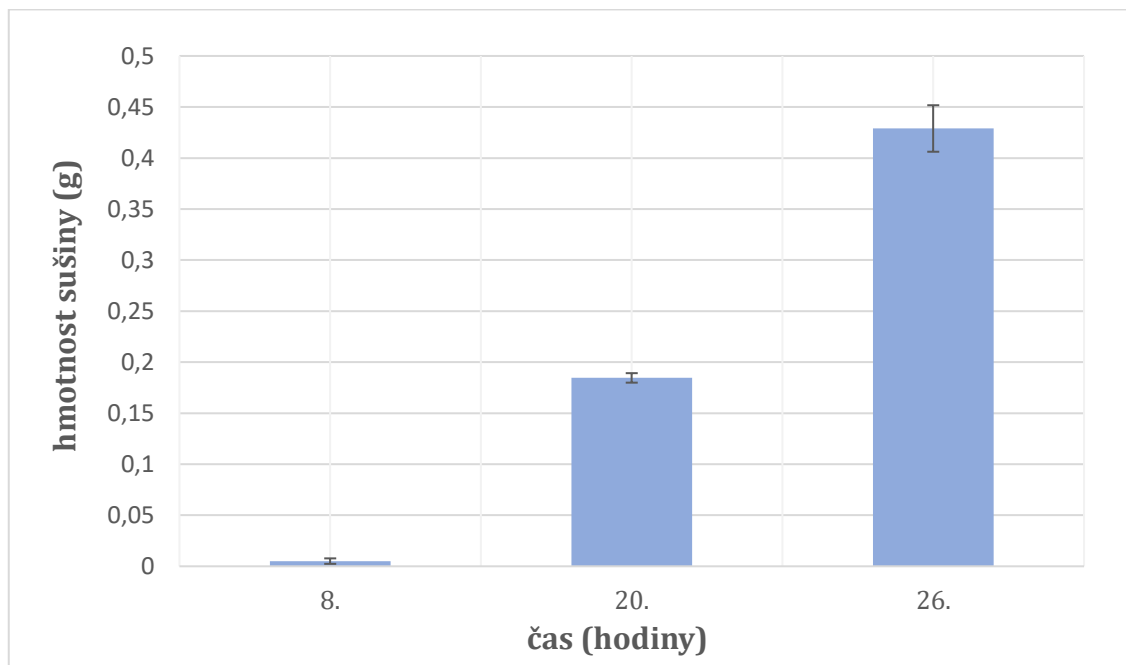
Vedle inhibičních testů na pevných médiích bylo nutné zjistit růstové vlastnosti mikroorganismů v tekutých médiích, aby bylo možné následně přistoupit ke studiu mikrobiálních interakcí v submerzní kultivaci. Houbový patogen byl kultivován v komplexním MEB médiu a optimalizovaném BHAK médiu s 8  $\mu\text{M}$  železem, glukózou a směsí aminokyselin. U bakterie byla růstová kinetika sledována na stejném interakčním BHAK médiu, ale zároveň i na komplexním tekutém LB médiu. Růstová kinetika u obou mikroorganismů probíhala ve třech paralelách.

#### 3.3.1 Růst *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* v MEB médiu

Narostlá zhomogenizovaná kultura houbového patogenu v MEB médiu (26 hodin, 28 °C, 190 rpm a pH 5,2) byla využita pro přípravu 1% inokula. Vlastní růstový experiment následně probíhal v komplexním MEB médiu po dobu 26 hodin při teplotě 28 °C a 190 rpm.

Od začátku experimentu se v tekutém MEB médiu po 4 hodinách začaly tvořit dobře viditelné pelety mycelia. Biomasa s postupem času rostla a tvořila neuspořádané vláknité mycelium, které ulpávalo na povrchu baňky. Pro získání veškeré biomasy byl celý objem kultury z baňky filtrován přes filtrační papír, a následně promyt 50 ml destilované vody. Získaná biomasa byla využita pro stanovení suché hmotnosti.

Při měření pH kultury docházelo postupně k jejímu snižování, kdy v osmé hodině se jednalo hodnotu pH  $5,17 \pm 0,09$ , která klesla ve 26. hodině hodnotu pH  $4,49 \pm 0,23$ . Hmotnosti vysušených filtrátů byly zaneseny do grafu, kde je patrné zvyšování hmotnosti biomasy v závislosti na čase (Obr. č. 8).



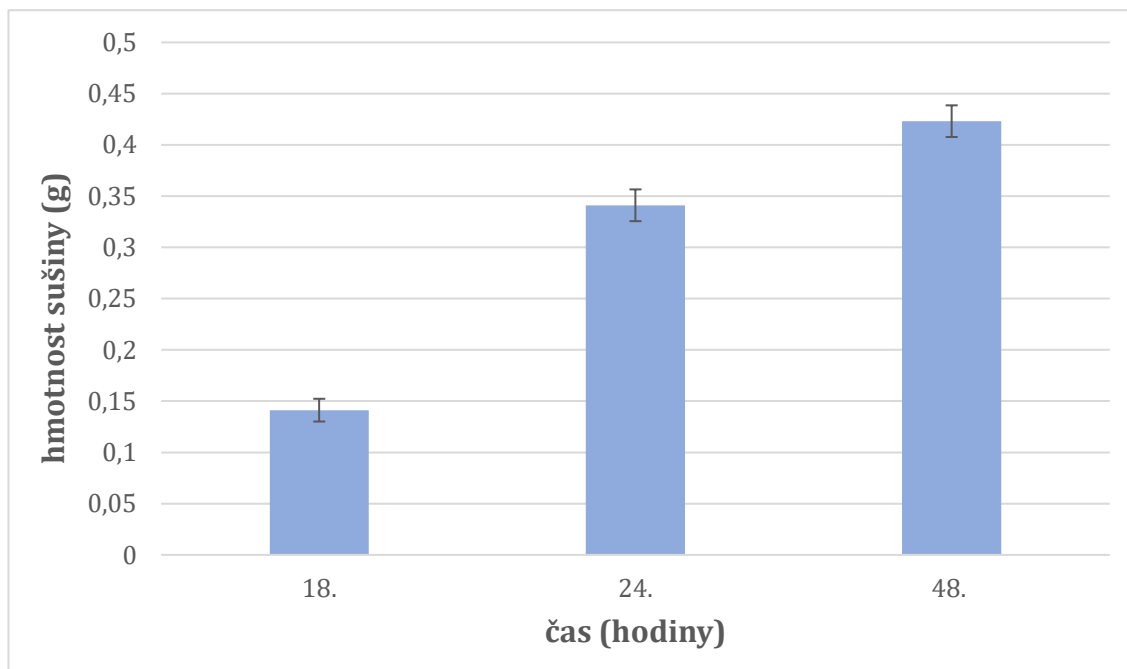
Obr. č. 8: Růstová kinetika sušiny na tekutém MEB médiu patogenní houby *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

### 3.3.2 Růst *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* v optimalizovaném BHAK médiu

Pro sledování růstu v optimalizovaném BHAK médiu s glukózou a směsí aminokyselin bylo médium inokulováno 1% homogenizovaným myceliem, které bylo získáno z kultury narostlé v MEB médiu. V tomto experimentu byla pozorována růstová kinetika patogenní houby stanovením suché hmotnosti vyprodukované sušiny při 28 °C, 190 rpm po dobu 48 hodin ve třech paralelách. Počáteční houbová kultura, ze které se připravovalo 1% inokulum, měla hodnotu pH 6,09.

Od počátku experimentu bylo patrné, že nárůst biomasy na optimalizovaném BHAK médiu byl odlišný ve srovnání s MEB médiem. Pelety biomasy se začaly tvořit mnohem později až kolem 18. hodiny, což znamená delší adaptaci buněk na prostředí. Vzniklé pelety byly mnohem menší velikosti než v kulturačním experimentu na MEB médiu.

Při měření pH po 24. hodinách dosahovaly hodnoty  $4,6 \pm 0,07$ . Ty se ke konci experimentu dostaly na hodnotu  $4,19 \pm 0,09$ . Hodnoty suché hmotnosti buněk stoupaly v závislosti na čase při kultivaci kmene v optimalizovaném BHAK médiu, kdy po 48 hodinách kultura dosáhla maximální hodnoty  $0,42 \pm 0,02$ , což je zaznamenáno v grafu níže (Obr. č. 9).



Obr. č. 9: Růstová kinetika sušiny na optimalizovaném BHAK médiu patogenní houby *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

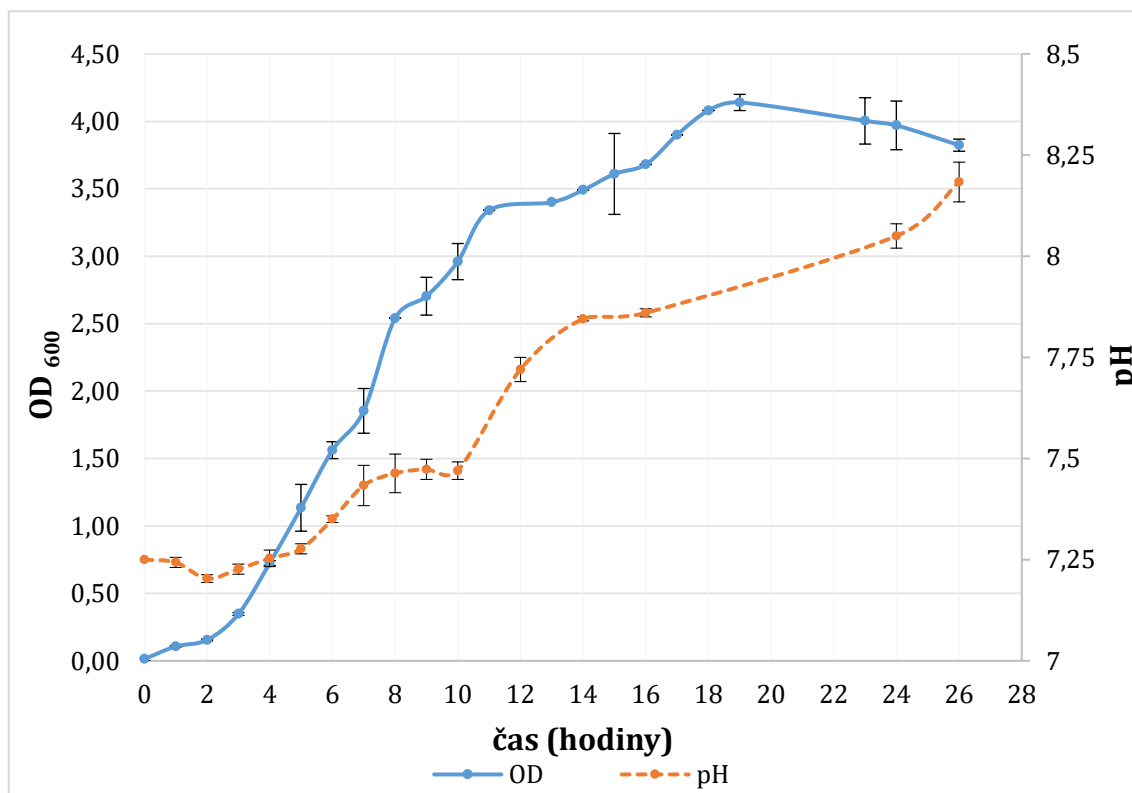
### 3.3.3 Růst *P. fluorescens* ATCC 13525 v LB médiu

Pro přípravu inokula byl antagonistický kmen *P. fluorescens* kultivován v LB médiu při 28 °C a 190 rpm. Po 24 hodinách růstu činila hodnota  $OD_{600}$  kultury 6,88 s pH 7,25 a KTJ/ml kultury bylo stanoveno na  $2 \cdot 10^{11}$ . Jeden ml této kultury byl použit pro zaočkování 100 ml tekutého LB média. Kultivace pokračovala při 28 °C se 190 rpm ve třech paralelách. V pravidelných časových intervalech byly odebírány vzorky pro stanovení OD, pH a KTJ/ml. Průběh růstové křivky bakterie a jejích hodnot pH zachycuje graf (Obr. č. 10).

V deváté hodině bylo stanoveno množství kolonií na  $1,6 \cdot 10^{11}$  KTJ/ml, při 26. hodině bylo vypočteno na  $4 \cdot 10^9$  KTJ/ml. Pomocí hodnot  $OD_{600}$  ze třech paralel bylo možné vypočítat, že bakterie má v tomto LB médiu dobu zdvojení 67,6 minut se specifickou růstovou rychlostí  $0,62 \text{ h}^{-1}$ . Suchá hmotnost buněk *P. fluorescens* činila po 26 hodinách  $1,34 \text{ g.l}^{-1}$ . Hodnoty se směrodatnými odchylkami (SD) jsou zanesené v tabulce (Tab. č. 1).

Tab. č. 1: Růstové parametry *P. fluorescens* v LB médiu a suchá hmotnost po 26 hodinách kultivace se směrodatnými odchylkami (SD)

T [min]	±SD	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	±SD	cdw [g.l <sup>-1</sup> ]	±SD
67,6	4,2	0,62	0,03	1,3	0,18



Obr. č. 10: Růstová kinetika a hodnoty pH u bakterie *P. fluorescens* ATCC 13525 v LB médiu

### 3.3.4 Růst *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 v optimalizovaném BHAK médiu

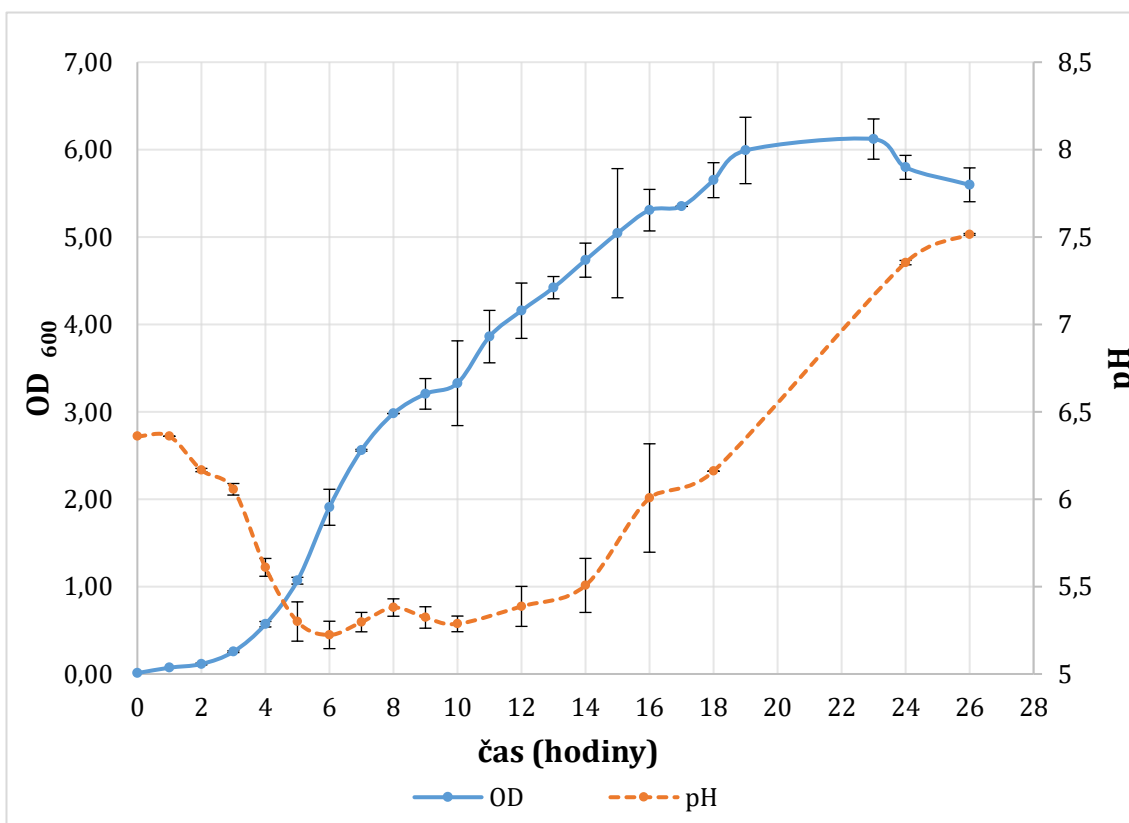
Pro sledování růstu v optimalizovaném médiu bylo 100 ml BH média doplněné o 8  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ , přidanou glukózu a směs aminokyselin 1% zaočkováno kulturou promytou fyziologickým roztokem v LB médiu, která je popsána v kapitole 3.3.3. Postup promývání je uveden v kapitole 2.3.5.

V průběhu kultivace byly odebírány vzorky pro stanovení OD, pH i KTJ/ml. V 9. hodině od počátku kultivace KTJ/ml dosahovalo hodnoty  $3 \cdot 10^9$ . Na konci experimentu při 26. hodině byla tato hodnota o řád vyšší  $1 \cdot 10^{10}$ . V grafickém zobrazení jsou znázorněny hodnoty OD a pH během 26 hodin (Obr. č. 11).

Z průběhu růstové křivky jsou viditelné dvě fáze růstové křivky, které značí možnou diauxii, která je způsobena přítomností dvou zdrojů uhlíku v kultivačním růstovém médiu, z nichž jeden je pro bakterii snadněji metabolizován.

Preferovaný cukr je spotřebován jako první, což vede k rychlému růstu, ke snížení pH, po němž následuje krátká přechodová fáze. Během této fáze je aktivován buněčný aparát používaný k metabolizaci aminokyselin. Následně je metabolizován druhý zdroj uhlíku představující směs aminokyselin, jehož spotřeba je dokumentována zvýšením hodnot pH (Obr. č. 11).

První exponenciální fáze růstu je zaznamenána mezi 2. a 8. hodinou kultivace, hodnoty růstových parametrů jsou následující: doba zdvojení 60 min a specifická růstová rychlost  $0,73 \text{ h}^{-1}$ . Druhá fáze růstu byla podle výpočtu rychlosti množení za jednotku času stanovena na dobu od 10. do 16. hodiny, kde byla doba zdvojení výrazně pomalejší, a to 487,4 minut, což představuje zaokrouhleně 8 hodin. Suchá hmotnost buněk *P. fluorescens* činila po 26 hodinách experimentu ze tří paralel  $1,6 \pm 0,08 \text{ g.l}^{-1}$ , což představuje vyšší hodnotu oproti suché hmotnosti buněk v LB médiu. Růstové parametry společně s hmotností sušiny jsou dostupné v tabulce (Tab. č. 2).



Obr. č. 11: Růstová kinetika a hodnoty pH u bakterie *P. fluorescens* ATCC 13525 v optimalizovaném BHAK médiu

Tab. č. 2: Růstové parametry *P. fluorescens* v optimalizovaném BHAK médiu a suchá hmotnost po 26 hodinách kultivace se směrodatnými odchylkami (SD)

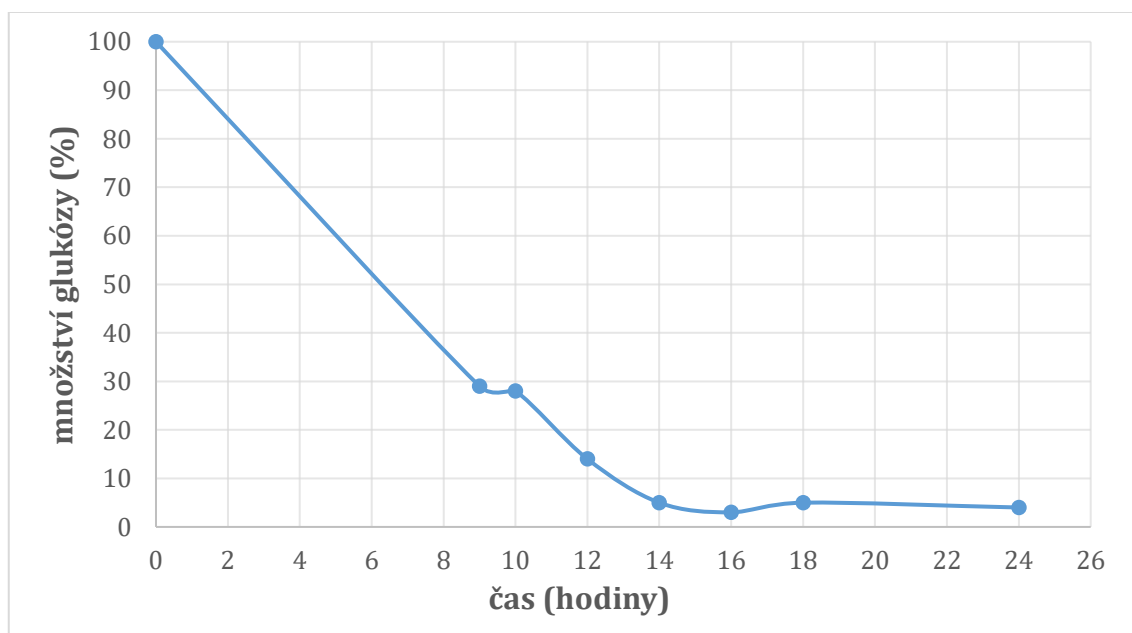
	T [min]	±SD	μ [h <sup>-1</sup> ]	±SD	cdw [g.l <sup>-1</sup> ]	±SD
I. (2.-8. h)	60,0	1,4	0,73	0,03	1,6	0,08
II. (10.-16. h)	487,4	19,2	0,09	0,01		

### 3.3.5 Stanovení úbytku glukózy v optimalizovaném BHAK médiu

Kromě měření růstové kinetiky obou mikroorganismů byl stanovován úbytek zdroje uhlíku v podobě přidané glukózy (5 g.l<sup>-1</sup>) do minimálního BH média, které dále obsahovalo i zmíněnou směs aminokyselin. Pro stanovení jejího množství během růstu u obou antagonistů v tekutém médiu byly odebírány vzorky ze tří paralel a ty dále měřeny dle postupu uvedeného v kapitole 2.3.8.

Postupný úbytek glukózy během 26 hodiny kultivace u *P. fluorescens* byl zaznamenán v grafu níže (Obr. č. 12), kde během prvních devíti hodin docházelo k rapidnímu snížení množství a spotřebování téměř 70 % z celkového množství glukózy. V další fázi růstu bakterie byl úbytek glukózy pomalejší. Ve 24. hodině činila hodnota zbytkové koncentrace glukózy jen 4 %.

Hodnoty zbytkové koncentrace glukózy u patogenní houby rodu *Fusarium* klesly po 24 hodinách růstu na optimalizovaném BHAK médiu na 2 %. Po následujících 48 hodinách od počátku kultivace byla tato procentuální hodnota glukózy jen 0,55 %.



Obr. č. 12: Procentuální úbytek glukózy u *P. fluorescens* v optimalizovaném BHAK médiu



## 4 DISKUZE

Zemědělství shodující se zásadami kvalitního životního prostředí se v poslední době stále inovuje. Chemické pesticidy se tak častěji nahrazují alternativní šetrnou formou. Proti chorobě na rajčatech způsobené houbou *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se například v druhé polovině 20. století až do roku 2014 ve Spojených státech amerických aktivně aplikoval chemický fungicid methylbromid, který s velikou účinností potlačil tento patogen (Chitwood-Brown *et al.*, 2021).

Proti houbě *Fusarium* se stále používá řada dalších chemických fungicidů, které ale nejsou tak účinné jako methylbromid. Neustále je však vidět snaha vytvořit rezistentní odrůdy rajčat proti této chorobě či snaha uvést na trh šetrnou ochranu s podporou růstu rostliny pomocí mikroorganismů (Chitwood-Brown *et al.*, 2021; Ramamoorthy *et al.*, 2002).

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je možné potlačit růst houbového patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* za pomoci vybraných bakteriálních kmenů. Většina studií (Elanchezhian *et al.*, 2018; Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013; Vignesh *et al.*, 2021) provádí interakce na PDA médiu, které je výhodné především pro kultivaci plísní. V rámci této práce bylo optimalizováno definované BH médium s 8  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ , glukózou (5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a směsí aminokyselin (5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) jako zdroje uhlíku.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1, všechny tři bakterie se aktivně zapojují do biologické ochrany rostlin proti mnoha patogenům. Při vzájemných interakcích byla použita jiná metoda aplikace, kdy se neaplikovaly disky mycelia na Petriho misku (Srivastava *et al.*, 2010) ani se antagonistická bakterie nenanášela jako pouhý jeden pruh proti patogenu (Vignesh *et al.*, 2021). V každé polovině soutěžil o prostor a živiny bakteriální kmen proti *Fusarium*. Antagonista ani patogen nebyl zředěn, což by jinak mohlo mít vliv na velikost inhibiční zóny, která je závislá také na rychlosti růstu obou mikroorganismů, koncentraci látek v pevném médiu nebo třeba na difúzi látek do buněk.

V případě *Bacillus subtilis* CCM 2217 došlo ke schopnosti snížení růstu houby *Fusarium*, kdy vícevrstevné mycelium se tvořilo až 1 cm od hranice interakční zóny. Jedna ze studií (Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013) uvádí, že stejná bakterie v kombinaci s *P. fluorescens* je schopna patogen mnohem více omezit, a to i o více jak 2 cm. Při samostatné interakci bakterie *B. subtilis* studie uvádí velikost inhibiční zóny okolo 1 cm. V rámci této bakalářské práce bylo potvrzeno, že bakterie vykazuje inhibiční efekt projevující se stejnou interakční zónou (1 cm), jak uvádí zmíněná studie (Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013), která byla ovšem prováděna na komplexním PDA médiu.

Druhá zvolená bakterie *Bacillus velezensis* DSM 23117 nedokázala vytvořit silný inhibiční efekt proti houbě na optimalizovaném BHAK médiu, jako tomu bylo u ostatních dvou kmenů. Zmíněná bakterie se již v biologické ochraně hojně využívá (Novotný & Neuwirthová, 2014). Její inhibiční efekt proti stejnému *Fusarium* však zaznamenal výzkum (Elanchezhiyan *et al.*, 2018), který interakce testoval opět na komplexním PDA médiu. K měření interakcí využili týden staré disky mycelia. Uvádějí, že v *in vitro* podmínkách byla inhibice podobná jako ve výzkumu s *B. subtilis* (Sundaramoorthy & Balabaskar, 2013). Je tak možné, že v případě experimentu v rámci této bakalářské práce se inhibiční efekt *B. velezensis* nedostavil z důvodu zvoleného optimalizovaného BHAK média.

V interakci patogena s bakterií *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 došlo na optimalizovaném BHAK médiu k největšímu snížení růstu mycelia, kdy byla detekována interakční zóna bez přítomnosti mycelia o velikosti 0,2 cm. O její schopnosti inhibice informuje mnoho studií (Alzandi & Naguib, 2019; Couillerot *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2010; Vignesh *et al.*, 2021), které tento fakt aplikovaly i v praxi na semena rajčat či vzrostlé rostliny. Pokusy biologických prostředků na rostliny zkoušeli výzkumníci (Srivastava *et al.*, 2010) také v kombinaci s *Trichoderma harzianum*.

Teplotní rozsah pro kultivaci *P. fluorescens* se pohybuje v rozmezí od 4 °C do 42 °C, přičemž nejlepšími podmínkami pro růst disponuje při 28 °C, kdy se buňky jeví výrazně silnější než při vysokých teplotách (Kahli *et al.*, 2022). Díky jejich vlastnosti, která jim umožňuje žít v poměrně rozsáhlé škále podmínek, se dobře adaptují na dané prostředí, což částečně potvrzovalo i testování na optimalizovaném BHAK médiu.

Hlavním aspektem potlačení růstu patogenu je pro bakterii produkce sekundárních látek, jež mohou zastavit nebo omezit růst *Fusarium*. U rostlin se díky produkci sekundárních metabolitů může nastartovat indukovaná systémová rezistence, díky níž může rajče okamžitě zareagovat na onemocnění způsobené tímto patogenem (Alzandi & Naguib, 2019; Ramamoorthy *et al.*, 2002). Na tento fakt poukazuje zvýšené množství kyseliny jasmonové (přirozený rostlinný růstový regulátor, který je zařazován mezi rostlinné hormony) jakožto signální molekuly aktivující se stresem (Alzandi & Naguib, 2019).

Snížení množství železa v optimalizovaném BHAK médiu bylo provedeno z důvodu, aby se projevil vliv jeho nedostatku v antagonistických reakcích. Bakterie *P. fluorescens* je schopna produkovat siderofory (pyoverdin a pyochelin), které dokáží chelátovat železo v prostoru, kde je ho nedostatek. Právě tento klíčový zdroj může mít za následek zvýhodnění antagonisty *P. fluorescens* v konkurenčním boji s houbovým patogenem (Couillerot *et al.*, 2009).

Při pozorování působení sideroforů v jedné studii (Arya *et al.*, 2018) bylo zjištěno, že se snižujícím se množstvím koncentrace železa v médiu se zvyšuje velikost inhibiční zóny. Zároveň již bylo zmíněno, že afinita některých bakteriálních sideroforů k železu je větší jak u houbových patogenů (Glick & Bashan, 1997), čímž by se potvrdil větší inhibiční účinek u *P. fluorescens* než u zbylých bakterií.

Pro charakterizaci dalších vlastností bakterie *P. fluorescens* ATCC 13525 byly provedeny kultivační testy růstu v tekutých médiích. V porovnání komplexního LB média pro růst s optimalizovaným BHAK médiem bylo patrné, že průměrná hodnota suché hmotnosti buněk se v optimalizovaného BHAK médiu pohybovala o 0,3 g výše než v případě komplexního LB média. Větší množství biomasy dokazuje i měření KTJ/ml ve 26. hodině, které bylo pro optimalizované BHAK médium  $1 \cdot 10^{10}$ . V LB médiu činila hodnota KTJ/ml  $4 \cdot 10^9$ .

Růst probíhající v komplexním LB médiu měl pouze jednu exponenciální fázi, ovšem v optimalizovaném BHAK médiu měla bakterie dva zdroje uhlíku, které se v grafickém znázornění růstové křivky (Obr. č. 11) projeví diauxií, kdy byla křivka složena ze dvou růstových křivek. Při zjišťování množství glukózy v BHAK médiu lze usoudit, že pro zdroj uhlíku nejprve čerpala bakterie glukózu, kterou postupně nahradila ve druhé fázi růstu směsí aminokyselin. Jak je ale vidět z grafu (Obr. č. 12), bakterie *Pseudomonas* veškeré množství glukózy ihned nespotřebovala a po 10 hodinách kultivace byl obsah glukózy v médiu necelých 30 %.

U houbového patogenu byl nárůst biomasy v případě optimalizovaného BHAK média pozvolnější, což si lze vysvětlit nutnou adaptací *Fusarium* na nové kultivační prostředí. Množství biomasy bylo následně srovnatelné s hodnotami, které byly naměřené v komplexním MEB médiu. Necelá 2 % z původního množství glukózy zůstaly v upraveném tekutém BH médiu při stanovení po 24 hodinách kultivace.

Pro další pokračování v charakterizaci mikroorganismů by bylo vhodné se zaměřit především na již zmíněné sekundární metabolity, a to konkrétněji na siderofory. Právě nedostatek železa v půdě, které rostliny potřebují pro život, může mít za následek oslabení rostliny, čímž se zvyšuje její náchylnost k propuknutí onemocnění. Bylo také potvrzeno (Radzki *et al.*, 2013), že produkce sideroforů bakteriemi zajišťuje rostlinám nejen ochranu před houbovými patogeny, ale i přísun železa pro jejich růst.

V jaké míře se bude zvyšovat produkce sideroforů závisí na zvolení kultivačního média (Vindeirinho *et al.*, 2021), proto by se práce v budoucnu zaměřila na produkci sideroforů ve zmíněném upraveném BH médiu. Otestováním média by se následně mohlo více specifikovat, zda množství sideroforů závisí na množství přidané směsi aminokyselin a glukóze, stopových prvků nebo kultivační teplotě. Přenesením těchto znalostí do praktického využití by bylo jistě nápomocné k udržitelnému zemědělství.

## ZÁVĚR

Biologická ochrana rostlin zajišťuje budoucím generacím adekvátní alternativu k chemickým postřikům, které by jinak životní prostředí nadále devastovaly. Využívaných mikroorganismů v praxi je už poměrně mnoho, ale na českém trhu se stále tyto alternativy nevyskytují ve velkém měřítku.

V rámci teoretické části byly splněny všechny cíle popisu jednotlivých okruhů týkajících se vztahů mezi rostlinou a mikroorganismy, zároveň také ochrany rostlin, kde byl rozebrán neblahý účinek chemické ochrany na životní prostředí z hlediska půdy, vodstva a vzduchu.

Hlavním cílem praktické části práce bylo zjistit, jaký je inhibiční účinek vybraných bakteriálních kmenů na daném houbovém patogenu. Tento cíl byl zcela naplněn.

Při hledání společného média byl kladen důraz na omezení používání komplexních médií, které by mohly zkreslovat inhibiční efekt. Ve většině studiích se interakce na pevných médiích prováděly na komplexním PDA médiu. Právě zvolené upravené BH médium s 8  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ , glukózou (5  $\text{g.l}^{-1}$ ) a směsí aminokyselin (Casamino acids – Difco) (5  $\text{g.l}^{-1}$ ) poskytlo nejlepší výsledky pro bakterii *Pseudomonas fluorescens*, která oproti *Bacillus subtilis* a *Bacillus velezensis* vykazovala největší potlačení růstu proti houbovému patogenu *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

*P. fluorescens* a patogen *Fusarium* byly následně podrobeny sledovanému růstu v tekutých médiích. Růstová křivka u bakterie vykazovala diauxický růst v optimalizovaném BHAK médiu, při kterém měla čerpat dva zdroje uhlíku. Z následného měření úbytku glukózy a změně hodnot pH vyšlo najevo, že jako první zdroj čerpala bakterie *P. fluorescens* glukózu.

V rámci bakalářské práce byly splněny všechny stanovené cíle a do budoucna by se práce měla zaměřit především na sekundární metabolity jako antagonistické nástroje produkované bakterií *P. fluorescens* ve zvoleném optimalizovaném médiu. Hlavním středem zájmu bude produkce sideroforů, která má významný vliv na inhibici rostlinného patogena a zároveň vliv na samotný růst rostliny prostřednictvím sekvestrace železa. Nedílnou součástí při produkci hraje zvolené médium, kdy v limitovaném prostředí železa se produkce sideroforů zvětšuje.

Pokud by se potvrdilo, že makronutrienty či mikronutrienty (např. zdroje C, N a kovy Fe, Cu, Zn) významně ovlivňují produkci sekundárních metabolitů na úrovni sideroforů, mohl by upravený biologický přípravek s *P. fluorescens* obsahovat větší množství těchto antagonistických nástrojů, a napomoci tak k šetrnému způsobu ochrany rostlin.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AKTAR, M.W., SENGUPTA, D. & CHOWDHURY, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*. 2(1), 1–12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7
- ALZANDI, A.A. & NAGUIB, D.M., 2019. *Pseudomonas fluorescens* metabolites as biopriming agent for systemic resistance induction in tomato against *Fusarium* wilt. *Rhizosphere*. 11, 124–128. doi: 10.1016/j.rhisph.2019.100168
- ARYA, N., RANA, A., RAJWAR, A., SAHGAL, M. & SHARMA, A.K., 2018. Biocontrol efficacy of siderophore producing indigenous *Pseudomonas* strains against *Fusarium* wilt in tomato. *National Academy Science Letters*. 41(3), 133–136. doi: 10.1007/s40009-018-0630-5
- BUTTNER, C., MCAULIFFE, O., ROSS, R.P., HILL, C., O'MAHONY, J. & COFFEY, A., 2017. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Frontiers in Microbiology*. 8:34, 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2017.00034
- BUYER, J.S., SIKORA, L.J. & KRATZKE, M.G., 1990. Monoclonal antibodies to ferric pseudobactin, the siderophore of plant growth-promoting *Pseudomonas putida* B10. *Applied and Environmental Microbiology*. 56(2), 419–424. doi: 10.1128/aem.56.2.419-424.1990
- CARVALHO, F.P., 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*. 6(2), 48–60. doi:10.1002/fes3.108
- CHITWOOD-BROWN, J., VALLAD, G.E., LEE, T.G. & HUTTON, S.F., 2021. Breeding for resistance to *Fusarium* wilt of tomato: a review. *Genes*. 12(11):1673, 1–16. doi: 10.3390/genes12111673
- CHOWDHURY, S.P., HARTMANN, A., GAO, X. & BORRIS, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*. 6:780, 1–11. doi: 10.3390/genes12111673
- COUILLEROT, O., PRIGENT-COMBARET, C., CABALLERO-MELLADO, J. & MOËNNE-LOCCOZ, Y., 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 48(5), 505–512. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02566.x
- DAMALAS, C.A. & ELEFTHEROHORINOS, I.G., 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8(5), 1402–1419. doi: 10.3390/ijerph8051402
- EARL, A.M., LOSICK, R. & KOLTER, R., 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*. 16(6), 269–275. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.004
- ELANCHEZHIAN, K., KEERTHANA, U., NAGENDRAN, K., PRABHUKARTHIKEYAN, S.R., PRABAKAR, K., RAGUCHANDER, T. & KARTHIKEYAN, G., 2018. Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 103, 92–101. doi: 10.1016/j.pmpp.2018.05.008

- FAN, B., WANG, C., SONG, X., DING, X., WU, L., WU, H., GAO, X. & BORRIS, R., 2018. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*. 9:2491, 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2018.02491
- GIBSON, D.M., KING, B.C., HAYES, M.L. & BERGSTROM, G.C., 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. *Current Opinion in Microbiology*. 14(3), 264–270. doi: 10.1016/j.mib.2011.04.002
- GLICK, B.R. & BASHAN, Y., 1997. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*. 15(2), 353–378. doi: 10.1016/S0734-9750(97)00004-9
- HORBACH, R., NAVARRO-QUESADA, A.R., KNOGGE, W. & DEISING, H.B., 2011. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*. 168(1), 51–62. doi: 10.1016/j.jplph.2010.06.014
- HUA, L., YONG, C., ZHANQUAN, Z., BOQIANG, L., GUOZHENG, Q. & SHIPING, T., 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*. 2(3), 111–119. doi: 10.1093/fqsafe/fyy016
- KAHLI, H., BÉVEN, L., GRAUBY-HEYWANG, C., DEBEZ, N., GAMMOUDI, I., MOROTÉ, F., SBARTAI, H. & COHEN-BOUHACINA, T., 2022. Impact of growth conditions on *Pseudomonas fluorescens* morphology characterized by atomic force microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(17):9579, 1–17. doi: 10.3390/ijms23179579
- KHAN, A.R., MUSTAFA, A., HYDER, S., VALIPOUR, M., RIZVI, Z.F., GONDAL, A.S., YOUSUF, Z., IQBAL, R. & DARAZ, U., 2022. *Bacillus* spp. as bioagents: uses and application for sustainable agriculture. *Biology*. 11(12):1763, 1–21. doi: 10.3390/biology11121763
- KHAN, R.A.A., NAJEEB, S., HUSSAIN, S., XIE, B. & LI, Y., 2020. Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi. *Microorganisms*. 8(6):817, 1–22. doi: 10.3390/microorganisms8060817
- KOWALSKA, J., TYBURSKI, J., MATYSIAK, K., TYLKOWSKI, B. & MALUSÁ, E., 2020. Field exploitation of multiple functions of beneficial microorganisms for plant nutrition and protection: real possibility or just a hope? *Frontiers in Microbiology*. 11:1904, 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2020.01904
- LI, R. & JIN, J., 2013. Modeling of temporal patterns and sources of atmospherically transported and deposited pesticides in ecosystems of concern: a case study of toxaphene in the Great Lakes. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*. 118(20), 11 863-11 874. doi: 10.1002/jgrd.50777
- LIU, J., ZHANG, L. & YAN, D., 2021. Plasmodesmata-involved battle against pathogens and potential strategies for strengthening hosts. *Frontiers in Plant Science*. 12:644870, 1–14. doi: 10.3389/fpls.2021.644870

- 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(7):1410, 1–15. doi: 10.3390/microorganisms9071410
- MALUSÁ, E., SAS-PASZT, L. & CIESIELSKA, J., 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. *The Scientific World Journal*. 2012:491206, 1–12. doi: 10.1100/2012/491206
- MANSFIELD, J., GENIN, S., MAGOR, S., CITOVSKY, V., SRIARIYANUM, M., RONALD, P., DOW, M., VERDIER, V., BEER, S.V., MACHADO, M.A., TOTH, I., SALMOND, G. & FOSTER, G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13(6), 614–629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- MARTINS, P.M.M., MERFA, M.V., TAKITA, M.A. & DE SOUZA A.A., 2018. Persistence in phytopathogenic bacteria: do we know enough? *Frontiers in Microbiology*. 9:1099, 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2018.01099
- MATHEW, P., AUSTIN, R.D., VARGHESE, S.S. & MANOJKUMAR, A.D., 2015. Effect of copper-based fungicide (bordeaux mixture) spray on the total copper content of areca nut: implications in increasing prevalence of oral submucous fibrosis. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*. 5(4), 283–289. doi: 10.4103/2231-0762.161755
- MCGOVERN, R.J., 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 73, 78–92. doi: 10.1016/j.cropro.2015.02.021
- MELOTTO, M., UNDERWOOD, W., KOCZAN, J., NOMURA, K. & HE, S.Y., 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*. 126(5), 969–980. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.054
- MONTALBÁN, B., THIJS, S., LOBO, M.C., WEYENS, N., AMELOOT, M., VANGRONSVELD, J. & PÉREZ-SANZ, A., 2017. Cultivar and metal-specific effects of endophytic bacteria in *Helianthus tuberosus* exposed to Cd and Zn. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(10):2026, 1–14. doi: 10.3390/ijms18102026
- MONTESINOS, E., 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*. 6(4), 245–252. doi: 10.1007/s10123-003-0144-x
- NAGÓRSKA, K., BIKOWSKI, M. & OBUCHOWSKI, M., 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*. 54(3), 495–508. doi: 10.18388/abp.2007\_3224
- NIRMALADEVI, D., VENKATARAMANA, M., SRIVASTAVA, R.K., UPPALAPATI, S.R., GUPTA, V.K., YLI-MATTILA, T., CLEMENT TSUI, K.M., SRINIVAS, C., NIRANJANA, S.R. & CHANDRA, N.S., 2016. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports*. 6(1):21367, 1–14. doi: 10.1038/srep21367

- NOVOTNÝ, D. & NEUWIRTHOVÁ, J., 2014. Ochrana kořenů řepky proti houbovým chorobám. *Úroda*. 2014(8), 58. ISSN 0139-6013
- OLANREWAJU, O.S., GLICK, B.R. & BABALOLA, O.O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33(11):197, 1-16. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9
- OLIVER, C., HERNÁNDEZ, I., CAMINAL, M., LARA, J.M. & FERNÁNDEZ, C., 2019. *Pseudomonas putida* strain B2017 produced as technical grade active ingredient controls fungal and bacterial crop diseases. *Biocontrol Science and Technology*. 29(11), 1053–1068. doi: 10.1080/09583157.2019.1645304
- PANKEY, G.A. & SABATH, L.D., 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*. 38(6), 864–870. doi: 10.1086/381972
- PETIT, A.N., FONTAINE, F., VATSA, P., CLÉMENT, C. & VAILLANT-GAVEAU, N., 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynthesis Research*. 111(3), 315–326. doi: 10.1007/s11120-012-9719-8
- PU, J., ZHANG, Z., ZHANG, H., XU, Y., ZHANG, B., YANG, M., LI, K., ZHANG, L., XIONG, S., ZHONG, N. & YU, D., 2022. Efficacy of bactericides against potato common scab caused by *Streptomyces* in Yunnan, China. *American Journal of Potato Research*. 99(4), 326–335. doi: 10.1007/s12230-022-09883-2
- RADZKI, W., GUTIERREZ MAÑERO, F.J., ALGAR, E., LUCAS, G.J.A., GARCÍA-VILLARACO, A. & RAMOS SOLANO, B., 2013. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*. 104(3), 321–330. doi: 10.1007/s10482-013-9954-9
- RAFFA, C.M. & CHIAMPO, F., 2021. Bioremediation of agricultural soils polluted with pesticides: a review. *Bioengineering*. 8(7):92, 1–29. doi: 10.3390/bioengineering8070092
- RAJMOHAN, K.S., CHANDRASEKARAN, R. & VARJANI, S., 2020. A review on occurrence of pesticides in environment and current technologies for their remediation and management. *Indian Journal of Microbiology*. 60(2), 125–138. doi: 10.1007/s12088-019-00841-x
- RAMAMOORTHY, V., RAGUCHANDER, T. & SAMIYAPPAN, R., 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and Soil*. 239(1), 55–68. doi:10.1023/A:1014904815352
- RUIZ-GARCÍA, C., BÉJAR, V., MARTÍNEZ-CHECA, F., LLAMAS, I. & QUESADA, E., 2005. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(1), 191–195. doi: 10.1099/ijs.0.63310-0



- SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, A.R., RAYA-DÍAZ, S., ZAMARREÑO, A.M., GARCÍA-MINA, J. M., DEL CAMPILLO, M.C. & QUESADA-MORAGA, E., 2018. An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*. 116, 90–102. doi: 10.1016/j.biocontrol.2017.01.012
- SCALES, B.S., DICKSON, R.P., LIPUMA, J.J. & HUFFNAGLE, G.B., 2014. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(4), 927–948. doi: 10.1128/CMR.00044-14
- SCHIRAWSKI, J. & PERLIN, M.H., 2018. Plant–microbe interaction 2017—the good, the bad and the diverse. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(5):1374, 1–6. doi: 10.3390/ijms19051374
- SRINIVAS, C., NIRMALA DEVI, D., NARASIMHA MURTHY, K., MOHAN, C.D., LAKSHMEESHA, T.R., SINGH, B., KALAGATUR, N.K., NIRANJANA, S.R., HASHEM, A., ALQARAWI, A.A., TABASSUM, B., ABD ALLAH, E.F. & CHANDRA NAYAKA, S., 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26(7), 1315–1324. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.06.002
- SRIVASTAVA, R., KHALID, A., SINGH, U.S. & SHARMA, A.K., 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*. 53(1), 24–31. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.11.012
- STEIN, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. 56(4), 845–857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x
- SU, A.Y., NIU, S.Q., LIU, Y.Z., HE, A.L., ZHAO, Q., PARÉ, P.W., LI, M.F., HAN, Q.Q., ALI KHAN, S. & ZHANG, J.L., 2017. Synergistic effects of *Bacillus amyloliquefaciens* (GB03) and water retaining agent on drought tolerance of perennial ryegrass. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(12):2651, 1–13. doi: 10.3390/ijms18122651
- SUNDARAMOORTHY, S. & BALABASKAR, P., 2013. Evaluation of combined efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in managing tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol). *Plant Pathology Journal*. 12(4), 154–161. doi: 10.3923/ppj.2013.154.161
- TUDI, M., DANIEL RUAN, H., WANG, L., LYU, J., SADLER, R., CONNELL, D., CHU, C. & PHUNG, D.T., 2021. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(3):1112, 1–23. doi: 10.3390/ijerph18031112
- VESSEY, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255(2), 571–586. doi: 10.1023/A:1026037216893

- VIELBA-FERNÁNDEZ, A., POLONIO, A., RUIZ-JIMÉNEZ, L., DE VICENTE, A., PÉREZ-GARCÍA, A. & FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D., 2020. Fungicide resistance in powdery mildew Fungi. *Microorganisms*. 8(9):1431, 1–34. doi: 10.3390/microorganisms8091431
- VIGNESH, K., RAJAMOHAN, K., BALABASKAR, P. & ANANDAN, R., 2021. In vitro efficacy of PGPR *Pseudomonas fluorescens* against Fusarium wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant archives*. 21(1), 430–460. doi: 10.51470/plantarchives.2021.v21.no1.060
- VINDEIRINHO, J.M., SOARES, H.M.V.M. & SOARES, E.V., 2021. Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* through the manipulation of the culture medium composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 193(3), 607–618. doi: 10.1007/s12010-020-03349-z
- WANG, B. & QIU, Y.L., 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*. 16(5), 299–363. doi: 10.1007/s00572-005-0033-6
- WHIPPS, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 52(1), 487–511. doi: 10.1093/jexbot/52.suppl\_1.487
- ZHANG, S., LI, C., SI, J., HAN, Z. & CHEN, D., 2022. Action mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(12):6758, 1–33. doi: 10.3390/ijms23126758
- ZUBROD, J.P., BUNDSCHUH, M., ARTS, G., BRÜHL, C.A., IMFELD, G., KNÄBEL, A., PAYRAUDEAU, S., RASMUSSEN, J.J., ROHL, J., SCHARMÜLLER, A., SMALLING, K., STEHLE, S., SCHULZ, R. & SCHÄFER, R.B., 2019. Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environmental Science & Technology*. 53(7), 3347–3365. doi: 10.1021/acs.est.8b04392

## SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. č. 3: Růstové parametry <i>P. fluorescens</i> v LB médiu a suchá hmotnost po 26 hodinách kultivace se směrodatnými odchylkami (SD).....	38 -
Tab. č. 4: Růstové parametry <i>P. fluorescens</i> v optimalizovaném BHAK médiu a suchá hmotnost po 26 hodinách kultivace se směrodatnými odchylkami (SD)..	40 -
Obr. č. 1: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , pevné LB médium, 72 hodin, 28 °C .....	30 -
Obr. č. 2: <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , pevné PDA médium, 72 hodin, 28 °C.....	31 -
Obr. č. 3: Testování růstu na optimalizovaném BHAK médiu, 28 °C, 72 hodin...	32 -
Obr. č. 4: Vpravo nanesené <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C.....	33 -
Obr. č. 5: Vlevo <i>B. subtilis</i> a vpravo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C.....	33 -
Obr. č. 6: Vlevo <i>B. velezensis</i> a vpravo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C.....	34 -
Obr. č. 7: Vlevo <i>P. fluorescens</i> a vpravo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> na optimalizovaném BHAK médiu, 72 hodin, 28 °C.....	35 -
Obr. č. 8: Růstová kinetika sušiny na tekutém MEB médiu patogenní houby <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	36 -
Obr. č. 9: Růstová kinetika sušiny na optimalizovaném BHAK médiu patogenní houby <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> .....	37 -
Obr. č. 10: Růstová kinetika a hodnoty pH u bakterie <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 v LB médiu .....	38 -
Obr. č. 11: Růstová kinetika a hodnoty pH u bakterie <i>P. fluorescens</i> ATCC 13525 v optimalizovaném BHAK médiu .....	39 -
Obr. č. 12: Procentuální úbytek glukózy u <i>P. fluorescens</i> v optimalizovaném BHAK médiu .....	40 -