



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

Ochrona i charakterystyka zasobów genetycznych mikroorganizmów *Trichoderma, Bacillus, Pseudomonas,* *Pediococcus, Weissella* dla zastosowań w biotechnologii i zrównoważonym rolnictwie



foto. freepik.com

Badania zrealizowane w ramach Zadań 12 i 32: **Ochrona i charakterystyka zasobów genetycznych mikroorganizmów *Trichoderma, Bacillus, Pseudomonas, Pediococcus, Weissella* dla zastosowań w biotechnologii i zrównoważonym rolnictwie** realizowanego na zlecenie Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi na podstawie umowy nr DRE.prz.070.1.2025.

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

Zakład Mikrobiologii

Zakład Technologii Fermentacji

Zakład Biotechnologii

1. Wstęp

1.1. Znaczenie mikroorganizmów w zrównoważonym rolnictwie

Mikroorganizmy stanowią fundamentalny element funkcjonowania agroekosystemów i są jednym z kluczowych czynników warunkujących realizację założeń zrównoważonego rolnictwa. Gleba nie jest jedynie biernym podłożem produkcyjnym, lecz złożonym, dynamicznym ekosystemem biologicznym, w którym społeczności mikroorganizmów pełnią rolę regulatorów procesów fizycznych, chemicznych i biologicznych. Prawidłowe funkcjonowanie mikrobiomu glebowego warunkuje długoterminową żyzność gleby, stabilność produkcji rolniczej oraz zdolność agroekosystemów do adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych (Nadarajah & Abdul Rahman, 2023; Berg et al., 2022).

Jednym z kluczowych obszarów oddziaływania mikroorganizmów w rolnictwie jest ich udział w cyklach biogeochemicznych pierwiastków, w szczególności w obiegu węgla, azotu i fosforu. Mikroorganizmy glebowe uczestniczą w rozkładzie materii organicznej, mineralizacji związków organicznych oraz w procesach mobilizacji składników pokarmowych, zwiększając ich biodostępność dla roślin. Dzięki tym procesom możliwe jest bardziej efektywne wykorzystanie zasobów glebowych oraz ograniczenie zapotrzebowania na nawozy mineralne, których nadmierne stosowanie wiąże się z degradacją środowiska oraz obniżeniem jakości gleb (Das & Sengupta, 2024; Nadarajah & Abdul Rahman, 2023).

Aktywność mikroorganizmów glebowych wpływa również istotnie na właściwości fizyczne gleby, w tym na stabilność agregatów glebowych, porowatość oraz zdolność retencji wody. Poprzez syntezę substancji organicznych, takich jak polisacharydy i inne metabolity pozakomórkowe, mikroorganizmy przyczyniają się do poprawy struktury gleby i zwiększenia jej odporności na erozję oraz degradację. W kontekście zmian klimatycznych i nasilających się zjawisk ekstremalnych, takich jak susze czy intensywne opady, rola mikroorganizmów w utrzymaniu funkcjonalności gleby nabiera szczególnego znaczenia (Nadarajah & Abdul Rahman, 2023).

Istotnym aspektem znaczenia mikroorganizmów w zrównoważonym rolnictwie jest ich wpływ na wzrost, rozwój i zdrowie roślin uprawnych. W strefie ryzosfery mikroorganizmy mogą stymulować rozwój systemu korzeniowego, zwiększać pobieranie składników mineralnych oraz wpływać na fizjologię roślin poprzez produkcję związków biologicznie czynnych. Zróżnicowana i stabilna społeczność mikroorganizmów sprzyja również

zwiększeniu odporności roślin na stresy biotyczne i abiotyczne, co przekłada się na większą stabilność plonowania w długim okresie (Das & Sengupta, 2024; Berg et al., 2022).

Znaczenie mikroorganizmów w zrównoważonym rolnictwie wykracza jednak poza etap produkcji pierwotnej i obejmuje również sektor rolno-spożywczy. Mikroorganizmy, w szczególności bakterie fermentacji mlekowej, stanowią podstawę wielu procesów technologicznych stosowanych w przemyśle spożywczym, takich jak fermentacja żywności, naturalna konserwacja oraz poprawa jakości i bezpieczeństwa produktów. Zastosowanie mikroorganizmów w przetwórstwie żywności umożliwia ograniczenie stosowania dodatków chemicznych, wydłużenie trwałości produktów oraz nadanie im pożądanych cech sensorycznych i funkcjonalnych, co wpisuje się w założenia zrównoważonego systemu żywnościowego (Zang et al., 2025; Hussain et al., 2025).

Równocześnie mikroorganizmy stanowią istotne narzędzie współczesnej biotechnologii rolniczej i spożywczej. Selekcja i kontrolowane wykorzystanie szczepów o określonych właściwościach funkcjonalnych umożliwia opracowywanie biopreparatów, biofertylizatorów oraz biostymulantów, które wspierają produkcję rolną przy jednoczesnym ograniczeniu negatywnego wpływu na środowisko. Wytwarzane przez mikroorganizmy metabolity, w tym egzopolisacharydy, enzymy i inne związki bioaktywne, znajdują zastosowanie zarówno w technologii żywności, jak i w biotechnologii środowiskowej, stanowiąc element integrujący rolnictwo, przemysł spożywczy i nowoczesne rozwiązania biotechnologiczne (Oleksy-Sobczak et al., 2020; Hussain et al., 2025).

W ujęciu systemowym mikrobiom glebowy oraz mikroorganizmy wykorzystywane w przemyśle rolno-spożywczym należy traktować jako strategiczny zasób zrównoważonego rolnictwa. Ochrona różnorodności mikrobiologicznej, jej świadome kształtowanie oraz bezpieczne i kontrolowane wykorzystanie mikroorganizmów stanowią jeden z kluczowych elementów rozwoju nowoczesnych systemów agro-food, łączących efektywność produkcyjną z dbałością o środowisko i bezpieczeństwo żywności (Berg et al., 2022; Nadarajah & Abdul Rahman, 2023).

1.2. Biokontrola i interakcje antagonistyczne

Biokontrola z wykorzystaniem mikroorganizmów polega na ograniczaniu wzrostu i aktywności niepożądanych mikroorganizmów poprzez naturalne mechanizmy biologiczne, bez stosowania chemicznych środków ochrony. W tym kontekście szczególną rolę odgrywają bakterie fermentacji mlekowej (LAB), które dzięki swojej aktywności metabolicznej oraz zdolności do wytwarzania związków antagonistycznych mogą skutecznie modulować strukturę społeczności mikrobiologicznych w różnych ekosystemach, w tym w środowiskach związanych z produkcją żywności i pasz (Parada i in., 2007; Gálvez i in., 2010).

Jednym z kluczowych mechanizmów antagonistycznych LAB jest synteza krótkołańcuchowych kwasów organicznych, takich jak kwas mlekowy, octowy, propionowy oraz masłowy. Produkcja tych związków prowadzi do obniżenia pH środowiska, co w sposób istotny ogranicza rozwój wielu bakterii patogennych i mikroorganizmów powodujących psucie surowców roślinnych oraz pasz. Zakwaszenie środowiska stanowi zatem podstawowy, niespecyficzny mechanizm biokontroli, skuteczny wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów konkurencyjnych (Gálvez i in., 2010).

Oprócz zakwaszenia środowiska bakterie fermentacji mlekowej mogą wykazywać działanie antagonistyczne poprzez produkcję bakteriocyn – peptydowych substancji o właściwościach przeciwbakteryjnych, działających selektywnie wobec określonych grup mikroorganizmów. Bakteriocyny wytwarzane przez LAB wykazują zdolność do hamowania wzrostu bakterii patogennych, w tym gatunków należących do rodzajów *Listeria*, *Clostridium* czy *Enterobacter*, co znacząco zwiększa bezpieczeństwo mikrobiologiczne produktów fermentowanych oraz pasz (Parada i in., 2007; Gálvez i in., 2010). Działanie to może być dodatkowo wzmacniane przez konkurencję o składniki odżywcze oraz nisze ekologiczne, prowadząc do skutecznego wypierania mikroorganizmów niepożądanych.

Z punktu widzenia zastosowań praktycznych właściwości antagonistyczne bakterii fermentacji mlekowej stanowią podstawę ich wykorzystania w preparatach mikrobiologicznych przeznaczonych do kiszenia pasz, warzyw oraz innych surowców roślinnych. Skuteczna biokontrola mikrobiologiczna przekłada się nie tylko na poprawę bezpieczeństwa i stabilności mikrobiologicznej kiszonek, lecz również na kształtowanie ich cech jakościowych, w tym właściwości organoleptycznych. Interakcje antagonistyczne zachodzące pomiędzy mikroorganizmami fermentacyjnymi determinują przebieg fermentacji oraz końcowy profil metaboliczny produktu (De Vuyst & Leroy, 2020).

Podsumowując, bakterie fermentacji mlekowej pełnią istotną funkcję w procesach biokontroli dzięki połączeniu kilku mechanizmów oddziaływania antagonistycznego, obejmujących produkcję kwasów organicznych, bakteriocyn oraz konkurencję ekologiczną. Właściwości te czynią LAB ważnym narzędziem w zrównoważonych systemach produkcji żywności i pasz, umożliwiając ograniczenie stosowania chemicznych środków konserwujących oraz wspierając stabilność mikrobiologiczną i jakość produktów (Parada i in., 2007; Gálvez i in., 2010; De Vuyst & Leroy, 2020).

1.3. Bakterie fermentacji mlekowej jako producenci egzopolisacharydów (EPS)

Jedną z właściwości mikroorganizmów istotnych dla ich charakterystyki jest zdolność do wytwarzania egzopolisacharydów – naturalnych biopolimerów znajdujących szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach, w tym w biomedycynie, przemyśle spożywczym, kosmetycznym, naftowym i farmaceutycznym, a także w remediacji środowiska. Egzopolisacharydy (EPS) są wielkocząsteczkowymi, złożonymi cząsteczkami węglowodanowymi, wydzielanymi do środowiska zewnątrzkomórkowego przez liczne mikroorganizmy oraz algi.

Bakterie wytwarzające EPS należą do różnych grup filogenetycznych i obejmują zarówno bakterie Gram-ujemne, m.in. z rodzajów *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Zymomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Halomonas*, *Erwinia*, *Vibrio* i *Klebsiella*, jak i bakterie Gram-dodatnie, w tym przedstawicieli rodzajów *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Rhodococcus* oraz bakterii z klasy *Clostridia*, w tym rodzaju *Sarcina*, a także przedstawicieli klasy *Actinomycetia*.

Obecnie najczęściej wykorzystywane praktycznie egzopolisacharydy obejmują m.in. ksantan, wytwarzany przez bakterie z rodzaju *Xanthomonas*; dekstran, produkowany przez bakterie z rodzajów *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*; alginian, syntetyzowany przez bakterie z rodzajów *Azotobacter* i *Pseudomonas*; kurdlan, wytwarzany przez *Alcaligenes faecalis* oraz *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium* sp.); gellan, produkowany przez bakterie z rodzajów *Sphingomonas* i *Pseudomonas*; hialuronian, syntetyzowany przez *Streptococcus* sp.; lewan, wytwarzany przez bakterie z rodzajów *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Halomonas* i *Zymomonas*; oraz celulozę bakteryjną, produkowaną przez *Komagataeibacter* sp.

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) mogą wytwarzać z glukozy dużą różnorodność strukturalną EPS i oligosacharydów, różniących się wielkością, organizacją molekularną, składem chemicznym, strukturą oraz uwarunkowaniami genetycznymi (Palomba et al., 2016). Zróżnicowanie to wynika z aktywności enzymów glikansacharaz i glikozylotransferaz (GTF).

EPS można podzielić na dwie formy: homo-egzopolisacharydy (HoEPS) oraz hetero-egzopolisacharydy (HeEPS), na podstawie składu monosacharydowego. HoEPS charakteryzują się jednorodnym składem, obejmującym głównie glukozę lub fruktozę, natomiast HeEPS są zazwyczaj rozgałęzione i zawierają różne monosacharydy, w tym glukozę, mannozę, ksylozę, fruktozę, arabinozę i ramnozę. EPS są związkami nietoksycznymi, biokompatybilnymi i biodegradowalnymi. W celu uzyskania EPS o znacznej aktywności biologicznej konieczne jest staranne wybranie szczepów produkujących te biopolimery, zoptymalizowanie warunków ich produkcji oraz uzyskanie precyzyjnych informacji dotyczących struktury wytwarzanych egzopolisacharydów.

Większość EPS wytwarzanych przez bakterie kwasu mlekowego (LAB) należy do grupy hetero-egzopolisacharydów (HeEPS). Złożona organizacja molekularna HeEPS wynika z udziału licznych genów zaangażowanych w ich biosyntezę. Głównymi genami odpowiedzialnymi za produkcję homo-egzopolisacharydów (HoEPS) są geny glukanosacharazy i lewansacharazy. Generalnie, w przypadku termofilnych LAB geny związane z syntezą EPS są zlokalizowane w genomie chromosomalnym, natomiast u mezofilnych LAB większość genów EPS występuje na plazmidach. Geny te są zorganizowane w cztery regiony funkcjonalne, zaangażowane odpowiednio w określanie długości łańcucha, polimeryzację, eksport oraz regulację ekspresji klastra genów. Produkcja HeEPS może być niestabilna i zmienna, m.in. ze względu na spontaniczne mutacje na poziomie genetycznym, które w konsekwencji wpływają na skład lub obniżenie wydajności syntezy (zwykle poniżej 0,4–0,5 g/L). W przeciwieństwie do tego ilość HoEPS wytwarzanych przez LAB może przekraczać 1 g/L. Struktura, skład chemiczny oraz lepkość EPS zależą od wielu czynników, takich jak rodzaj szczepu, skład pożywki hodowlanej, obecność soli mineralnych i pierwiastków śladowych oraz warunki fermentacji, w tym pH i temperatura (Wang i in. 2023).

Duża część uwagi poświęcana jest obecnie egzopolisacharydom wytwarzanym przez bakterie potencjalnie probiotyczne z grupy bakterii fermentacji mlekowej (LAB), obejmującej m.in. rodzaje *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* oraz *Enterococcus*. EPS produkowane przez te mikroorganizmy mogą znaleźć zastosowanie m.in. w medycynie, ze

względem na bezpieczeństwo pochodzenia, brak toksyczności, biogodność i biodegradowalność, a także wykazywane właściwości biologiczne, takie jak działanie przeciwzapalne, przeciwutleniające, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, immunomodulujące oraz prebiotyczne (Minervini et al., 2010; Juraskova et al., 2022; Netrusov et al., 2023; Xu et al., 2024; Zarour et al., 2024).

Pomimo że zdolność do wytwarzania egzopolisacharydów jest cechą charakterystyczną dla wielu gatunków bakterii, właściwość ta ma charakter wyraźnie szczepowo-specyficzny. Z tego względu konieczne jest przeprowadzanie badań przesiewowych (screeningowych), umożliwiających fenotypowe potwierdzenie zdolności poszczególnych szczepów do syntezy EPS (Prete et al., 2021; Oleksy-Sobczak et al., 2020).

1.4. Analizy genomowe (WGS) w ocenie potencjału i bezpieczeństwa mikroorganizmów

Antybiotykooporność, rozumiana jako zdolność bakterii do przetrwania i wzrostu w obecności substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, stanowi jedno z kluczowych kryteriów oceny bezpieczeństwa mikroorganizmów przeznaczonych do zastosowań w rolnictwie oraz przemyśle spożywczym. Z tego względu analiza oporności na antybiotyki jest istotnym elementem charakterystyki szczepów mikroorganizmów wykorzystywanych jako składniki biopreparatów, inokulantów glebowych oraz kultur starterowych.

Badania genetyczne i fenotypowe prowadzone w tym zakresie umożliwiają rozróżnienie antybiotykooporności naturalnej (pierwotnej), wynikającej z wrodzonych, uwarunkowanych genetycznie mechanizmów obronnych komórki bakteryjnej, od antybiotykooporności nabytej. Oporność nabyta pojawia się w wyniku adaptacji bakterii do presji selekcyjnej wywieranej przez antybiotyki i może stanowić potencjalne zagrożenie z punktu widzenia bezpieczeństwa biologicznego.

Mechanizmy nabywania oporności obejmują dwa główne procesy: mutacje w materiale genetycznym bakterii oraz poziomy transfer genów. Mutacje punktowe powstające podczas replikacji DNA mogą prowadzić do zmiany struktury docelowych białek lub mechanizmów transportu antybiotyku, umożliwiając bakteriom przetrwanie w warunkach jego obecności. Z kolei poziomy transfer genów polega na przekazywaniu determinant oporności pomiędzy bakteriami tego samego lub różnych gatunków, m.in. za pośrednictwem plazmidów, transpozonów lub elementów integracyjnych.

W tym kontekście analizy genomowe oparte na sekwencjonowaniu całogenomowym (WGS, *Whole Genome Sequencing*) stanowią nowoczesne i precyzyjne narzędzie oceny bezpieczeństwa mikroorganizmów. WGS umożliwia identyfikację genów oporności na antybiotyki, elementów mobilnych związanych z ich przenoszeniem oraz innych cech genetycznych istotnych z punktu widzenia potencjalnego ryzyka środowiskowego i zdrowotnego. Zastosowanie analiz genomowych pozwala na kompleksową ocenę potencjału aplikacyjnego szczepów mikroorganizmów oraz ich kwalifikację do bezpiecznego wykorzystania w zrównoważonych systemach rolniczych i produkcji żywności.

1.5. Metagenomika jako narzędzie badania interakcji mikroorganizmów

Metagenomika stanowi nowoczesne narzędzie umożliwiające kompleksową analizę struktury oraz potencjału funkcjonalnego społeczności mikroorganizmów w ich naturalnym środowisku, bez konieczności izolacji i hodowli poszczególnych szczepów. W kontekście badań nad mikrobiomem gleby podejście metagenomiczne pozwala na ocenę dynamiki interakcji pomiędzy mikroorganizmami autochtonicznymi a mikroorganizmami wprowadzanymi do środowiska w postaci inokulantów.

Zastosowanie analiz metagenomicznych umożliwia ilościową i jakościową ocenę zmian w składzie taksonomicznym mikrobiomu, w tym identyfikację przesunięć w różnorodności alfa i beta, będących efektem oddziaływań konkurencyjnych, antagonistycznych lub synergistycznych pomiędzy mikroorganizmami. Dzięki temu możliwe jest określenie, czy inokulacja wybranymi szczepami prowadzi do stabilnej modulacji mikrobiomu, czy też wywołuje jego istotną przebudowę.

Metagenomika pozwala również na pośrednią ocenę potencjalnych konsekwencji funkcjonalnych obserwowanych zmian w strukturze mikrobioty, w tym wpływu na obieg składników odżywczych, degradację materii organicznej oraz równowagę ekologiczną środowiska glebowego. W przeciwieństwie do klasycznych metod mikrobiologicznych, podejście to umożliwia analizę całych zespołów mikroorganizmów i ich wzajemnych relacji, co jest kluczowe dla oceny bezpieczeństwa i efektywności stosowania preparatów mikrobiologicznych.

1.6. Enzymy oksydacyjne mikroorganizmów (lakazy)

Lakazy należą do grupy wielomiedziowych oksydoreduktaz (multicopper oxidases, MCO) i występują w postaci glikoprotein katalizujących reakcje utleniania związków naturalnych oraz ksenobiotyków, przy jednoczesnej redukcji tlenu cząsteczkowego do wody. Enzymy te są syntetyzowane zarówno przez bakterie, jak i grzyby strzępkowe oraz podstawczaki (Loi i wsp., 2016).

W ostatnich dekadach lakazy stały się przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich zdolność do utleniania fenolowych i niefenolowych związków ligninopochodnych, a także szerokiego spektrum zanieczyszczeń środowiskowych, w tym barwników, pestycydów i innych ksenobiotyków (Kuddus i wsp., 2013). Właściwości te umożliwiają wykorzystanie lakaz w procesach biotechnologicznych, takich jak detoksykacja ścieków przemysłowych, oczyszczanie odpadów oraz bioremediacja środowiska.

Bioremediacja jest uznawana za jedną z najbardziej efektywnych, przyjaznych środowisku i ekonomicznie opłacalnych metod przekształcania zanieczyszczeń. W praktyce proces ten jest częściej realizowany z wykorzystaniem mikroorganizmów niż roślin, co wynika z możliwości precyzyjnej kontroli warunków prowadzenia procesu, szybkiego wzrostu drobnoustrojów oraz ich zdolności do degradacji złożonych związków organicznych i redukcji metali ciężkich (Kuddus i wsp., 2013; Hussain i wsp., 2022).

W środowisku naturalnym mikroorganizmy syntetyzują lakazy zarówno w odpowiedzi na obecność określonych substratów, jak i w ramach mechanizmów adaptacyjnych i ochronnych, obejmujących m.in. ochronę przed stresem oksydacyjnym, pigmentację, sporulację oraz utrzymanie homeostazy komórkowej (Paraschiv i wsp., 2022). Bakterie produkujące lakazy należą do różnych grup taksonomicznych, wśród których szczególne znaczenie przypisuje się przedstawicielom rodzajów *Bacillus* (m.in. *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*) oraz *Pseudomonas* (np. *P. putida*). Produkcja lakaz bakteryjnych może mieć charakter wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowy i jest często indukowana obecnością związków fenolowych lub aromatycznych.

Istotną rolę w degradacji materiału lignocelulozowego oraz w biogeochemicznym cyklu węgla odgrywają również lakazy grzybowe. Enzymy te katalizują utlenianie związków fenolowych, amin aromatycznych, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, barwników syntetycznych, leków oraz innych związków organicznych, uczestnicząc m.in. w rozkładzie ściółki i procesach humifikacji (Paraschiv i wsp., 2022). Do najlepiej poznanych

producentów lakaz należą grzyby z rodzaju *Trichoderma*, w tym *T. atroviride* i *T. harzianum*, a także przedstawiciele rodzajów *Pleurotus*, *Ganoderma* i *Trametes*.

Szczególne zainteresowanie z punktu widzenia zastosowań biotechnologicznych budzą mikroorganizmy z rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* oraz *Trichoderma*, które łączą aktywność lakazową z innymi pożądanymi cechami funkcjonalnymi, takimi jak zdolność do biokontroli patogenów i degradacji ich metabolitów (McMahon i wsp., 2007; Reiss i wsp., 2011; Dhiman i wsp., 2015).

Lakazy są kodowane przez geny należące do rodziny MCO, obejmującej m.in. geny *laccase*, *mco* oraz *cotA* (u rodzaju *Bacillus*), a także *lacA*, *lacB* i *lacC* u grzybów. Poszczególne izoformy lakaz różnią się aktywnością katalityczną, stabilnością oraz zakresem substratowym, co w istotny sposób determinuje ich potencjalne zastosowanie w biotechnologii środowiskowej. U mikroorganizmów glebowych obecność wielu kopii genów lakazowych często koreluje ze zdolnością do degradacji ligniny i złożonych związków organicznych.

2. Metodyka

2.1. Materiały wykorzystane w badaniach

2.1.1. Szczepy wykorzystywane w badaniach antagonizmu

W celu oceny potencjału biokontrolnego mikroorganizmów przeprowadzono testy in vitro z udziałem wybranych szczepów grzybów oraz bakterii, reprezentujących różne grupy funkcjonalne i strategie oddziaływania antypatogenowego. Do badań włączono zarówno mikroorganizmy typowo stosowane w biokontroli (grzyby z rodzaju *Trichoderma*, bakterie z rodzaju *Bacillus*), jak i wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej (LAB), oceniane pod kątem ich selektywnej aktywności antagonistycznej.

Grzyby – potencjalne czynniki biokontrolne

Do badań wykorzystano szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma*, znane z wysokiej aktywności antagonistycznej wobec fitopatogenów grzybowych:

- *Trichoderma* sp. KKP 4166
- *Trichoderma* sp. KKP 4180
- *Trichoderma* sp. KKP 788
- *Trichoderma harzianum* KKP 534
- *Trichoderma* sp. KKP 3053
- *Trichoderma* sp. KKP 3832
- *Trichoderma* sp. KKP 789
- *Trichoderma atroviridae* KKP 3537

Bakterie – antagoniści bakteryjni

Do grupy bakterii o wysokim potencjale biokontrolnym włączono:

- *Bacillus subtilis* KKP 3899
- *Bacillus pumilus* KKP 3900
- *Lactococcus lactis* KKP 835
- *Pediococcus acidilactici* KKP 2065
- *Pediococcus acidilactici* KKP 4140
- *Pediococcus acidilactici* KKP 4216
- *Pediococcus acidilactici* KKP 3246
- *Pediococcus acidilactici* KKP 4220
- *Limosilactobacillus reuteri* KKP 4135
- *Limosilactobacillus reuteri* KKP 4201
- *Lactiplantibacillus curvatus* KKP 1812
- *Lactobacillus fermentum* KKP 1829
- *Leuconostoc citreum* KKP 4214
- *Weissella cibaria* KKP 4218

W celu oceny aktywności antagonistycznej badanych mikroorganizmów zastosowano wybrane izolaty fitopatogenów grzybowych o istotnym znaczeniu gospodarczym, powszechnie odpowiedzialne za choroby roślin uprawnych. Dobór patogenów umożliwił ocenę skuteczności działania antagonistycznego wobec patogenów glebowych oraz patogenów porażających części nadziemne roślin.

Do testów wykorzystano następujące szczepy fitopatogenów:

- *Fusarium graminearum* KKP 3962
- *Fusarium oxysporum* KKP 458
- *Botrytis cinerea* KKP 3292
- *Botrytis cinerea* KKP 451
- *Alternaria alternata* KKP 3368
- *Alternaria alternata* KKP 4022
- *Alternaria infectoria* KKP 3728

2.1.2. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej wykorzystane w badaniach zdolności do syntezy egzopolisacharydów (EPS)

Badaniami objęto 57 izolatów bakterii fermentacji mlekowej (LAB), uzyskanych z różnych produktów fermentowanych oraz surowców roślinnych, w celu przesiewowej oceny ich zdolności do syntezy egzopolisacharydów (EPS).

Tabela 1. Zestawienie szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykorzystanych w badaniach zdolności do syntezy egzopolisacharydów (EPS)

Symbol	Źródło izolacji	Gatunek
750 (10)	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 1808	mąka owsiana EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 1812	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Weissella cibaria</i>
KKP 1829	odchody kur	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
KKP 1839	kiszone ogórki	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 1840	kiszone ogórki; gryka	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 2036p	ogórki ekologiczne kiszone	<i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i>
KKP 2042p	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Weissella cibaria</i>
KKP 2043p	zakwas piekarski naturalnie fermentujący (mąka pszenna)	<i>Weissella cibaria</i>
KKP 2064	zakwasy żytnie EKO	<i>Weissella cibaria</i>
KKP 2065	z kiszonki kukurydzy	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 3066	mąka gryczana EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3070	mąka z prosa EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3180	jabłka ekologiczne niefermentowane	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 3246	mąka jęczmienna	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 3274	kiszone buraczki	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 4214	zakwas piekarski	<i>Leuconostoc citreum</i>
KKP 4215	jabłka ekologiczne fermentowane	<i>Leuconostoc sp.</i>
KKP 4216	mąka gryczana Eko	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 4218	zakwas	<i>Weissella cibaria</i>
KKP 4219	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Weissella cibaria</i>
KKP 4220	zakwasy	<i>Leuconostoc lactis</i>
KKP 593p	fermentujące ziemniaki	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
KKP 825	nieznane	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
1850 (3)	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
750 (9)	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
750 7	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
AG	agrest niefermentowany	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Gryka 1B	mąka gryczana eco	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Gryka 3A	mąka gryczana pełnoziarnista Eko	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Gryka 3B	mąka gryczana pełnoziarnista Eko	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
Gryka 4C	mąka gryczana Eko	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Kap A	kiszona kapusta	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKD	kiszona kapusta	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 1802	zakwasy owsiane	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 1806	zakwasy owsiane	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 1809	mąka owsiana EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

KKP 2058p	mąka jęczmienna eco	<i>Weissella cibaria</i> ZFJ 7/8
KKP 3069	mąka z prosa EKO	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 3100	zakwasy żytnie EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3101	zakwasy żytnie EKO	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 3103	zakwasy żytnie EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3243	mąka jęczmienna EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3244	mąka jęczmienna EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3245	mąka jęczmienna EKO	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3248	mąka jęczmienna EKO	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 3273	kiszzone pomidory	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
KKP 3277	z <i>Viniflora menos</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
KKP 385	Nieznane	<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i>
KKP 879	przewód pokarmowy kurcząt	<i>Pediococcus acidilactici</i>
MA	maliny	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
W.c Jecz 3	mąka jęczmienna EKO	<i>Weissella cibaria</i>
WN 1	winogrona niefermentowane	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
ZFB 138	zakwas piekarski naturalnie fermentujący	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
ZFB 140	barszcz fermentowany spontanicznie	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides/</i> <i>mesenteroides</i>
ZFB 201	zakwas	<i>Pediococcus acidilactici</i>
ZFP6	mąka z prosa EKO	<i>Pediococcus acidilactici</i>

2.1.3. Szczepy mikroorganizmów wykorzystane w analizie metagenomicznej

W analizie metagenomicznej wykorzystano pięć szczepów bakteryjnych pochodzących z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych (KKP), wytypowanych na podstawie wcześniejszych badań fenotypowych i funkcjonalnych. Każdy ze szczepów stosowano w wariancie pojedynczym, bez tworzenia mieszanin drobnoustrojów:

- *Bacillus subtilis* KKP 3905
- *Bacillus subtilis* KKP 3901
- *Bacillus subtilis* KKP 3894
- *Leuconostoc citreum* KKP 4214
- *Weissella* sp. KKP 2042p

Szczepy z rodzaju *Bacillus* zostały wcześniej poddane ocenie fenotypowej w zakresie antybiotykooporności, która nie wykazała obecności cech istotnych z punktu widzenia bezpieczeństwa biologicznego. Szczepy bakterii fermentacji mlekowej (*Leuconostoc*, *Weissella*) uwzględniono jako przedstawicieli mikroorganizmów o odmiennych strategiach metabolicznych i potencjalnie zróżnicowanym oddziaływaniu na mikrobiom glebowy.

2.1.4. Mikroorganizmy ryzosferowe wykorzystane w analizach genomowych

W celu charakterystyki mikroorganizmów związanych ze środowiskiem glebowym i ryzosferą roślin przeprowadzono analizy z udziałem wybranych szczepów bakterii

ryzosferowych, wytypowanych na podstawie ich potencjalnego znaczenia funkcjonalnego w mikrobiomie gleby.

Szczepy bakterii ryzosferowych objęte analizą całogenomową (WGS)

- *Comamonas testosteroni* KKP 1144
- *Sphingomonas* sp. KKP 4232

2.1.5. Szczepy mikroorganizmów wykorzystane w badaniach aktywności lakaz

Tabela 2. Zestawienie szczepów mikroorganizmów wykorzystanych w badaniach aktywności lakaz

NR KKP	Źródło izolacji	Gatunek
3893	gnojówka bydlęca	<i>Bacillus pumilus</i>
3902	gnojówka bydlęca	<i>Bacillus pumilus</i>
4082	ziemia	<i>Bacillus pumilus</i>
4078	gnojówka bydlęca	<i>Bacillus pumilus</i>
4079	gnojówka bydlęca	<i>Bacillus pumilus</i>
4080	gleba	<i>Bacillus xiamenensis/altitudinis/aerius</i>
4081	gleba	<i>Bacillus pumilus</i>
3900	gnojówka bydlęca	<i>Bacillus</i> sp.
1124	woda z jeziora	<i>Pseudomonas putida</i>
1125	woda z jeziora	<i>Pseudomonas putida</i>
534	nieznane	<i>Trichoderma harzianum</i>
535	nieznane	<i>Trichoderma harzianum</i>
3537	nieznane	<i>Trichoderma atroviride</i>
3765	gleba	<i>Trichoderma atroviride/viride</i>

2.2. Testy biokontroli in vitro

2.2.1. Ocena aktywności antagonistycznej szczepów z rodzaju *Trichoderma* w testach in vitro

Potencjał biokontrolny szczepów z rodzaju *Trichoderma* oceniano w testach antagonistycznych *in vitro*, opartych na metodzie hodowli współrzędnej (dual culture assay), powszechnie stosowanej do oceny oddziaływań pomiędzy grzybami antagonistycznymi a fitopatogenami.

Badaniami objęto osiem szczepów *Trichoderma*, które konfrontowano z wybranymi izolatami fitopatogenów roślinnych reprezentujących różne grupy taksonomiczne i strategie infekcji, w

tym: *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* oraz *Alternaria infectoria*.

Testy prowadzono na stałym podłożu agarowym (PDA). Z aktywnie rosnących, kilkudniowych kultur *Trichoderma* oraz fitopatogenów wycinano krążki agaru o jednakowej średnicy, zawierające grzybnię w fazie wzrostu wegetatywnego. Krążki umieszczano symetrycznie na tej samej płytce Petriego, w stałej odległości od siebie, tak aby umożliwić obserwację wzajemnego oddziaływania kolonii w trakcie inkubacji.

Płytki inkubowano w warunkach kontrolowanych, w temperaturze odpowiedniej dla wzrostu badanych grzybów, przez okres umożliwiający kontakt i rozwój strefy oddziaływania pomiędzy koloniami. Równolegle prowadzono hodowle kontrolne fitopatogenów oraz szczepów *Trichoderma* w monokulturze.

Aktywność antagonistyczną oceniano wizualnie, na podstawie porównania tempa wzrostu fitopatogenu w obecności *Trichoderma* względem kontroli, a także charakteru kontaktu kolonii. W szczególności uwzględniano:

- zahamowanie wzrostu fitopatogenu,
- tworzenie strefy inhibicji,
- przerastanie kolonii fitopatogenu przez *Trichoderma*,
- zmiany morfologiczne grzybni w strefie kontaktu.

Na tej podstawie przypisywano stopień antagonizmu w skali półilościowej:

- ++ – silny antagonizm (wyraźne zahamowanie wzrostu i/lub przerastanie fitopatogenu),
- + – antagonizm (zahamowanie wzrostu fitopatogenu),
- – brak efektu antagonistycznego.

Testy wykonywano w powtórzeniach, a ocena wyników opierała się na zgodnych obserwacjach uzyskanych w trakcie inkubacji.

2.2.2. Aktywność antypatogenowa bakterii i drożdży w testach in vitro

W celu uzupełnienia badań nad potencjałem biokontrolnym mikroorganizmów przeprowadzono testy in vitro oceniające aktywność antagonistyczną wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oraz bakterii z rodzaju *Bacillus* wobec istotnych fitopatogenów roślinnych. Badania miały charakter przesiewowy i służyły jakościowej ocenie oddziaływań antypatogenowych w warunkach laboratoryjnych.

Jako organizmy testowe wykorzystano izolaty fitopatogenów grzybowych: *Botrytis cinerea* (KKP 451), *Fusarium oxysporum* (KKP 458) oraz dwa izolaty *Alternaria alternata* (KKP 4022 i KKP 3728), wytypowane ze względu na ich znaczenie w chorobach roślin uprawnych. Do badań włączono szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej reprezentujące różne gatunki i źródła izolacji.

Testy biokontroli przeprowadzono metodą dyfuzji studzienkowej w agarze. Na płytkach Petriego z podłożem agarowym odpowiednim dla wzrostu fitopatogenów grzybowych wykonywano jałowe studzienki, do których aplikowano zawiesiny badanych szczepów bakteryjnych. Następnie powierzchnię podłoża inokulowano kulturą fitopatogena w sposób zapewniający równomierny wzrost grzyba na całej powierzchni płytki. Płytki inkubowano w temperaturze sprzyjającej rozwojowi fitopatogenów, umożliwiającą ocenę oddziaływań antagonistycznych badanych szczepów.

Aktywność antagonistyczną oceniano na podstawie obecności oraz intensywności stref zahamowania wzrostu fitopatogenów wokół studzienek zawierających zawiesiny badanych szczepów bakterii. Efekt antypatogenowy klasyfikowano w sposób ilościowy jako: brak aktywności antagonistycznej (–), słabe lub niejednoznaczne zahamowanie wzrostu (+/–), umiarkowane zahamowanie wzrostu (+) oraz silny antagonizm (++), charakteryzujący się wyraźną strefą zahamowania rozwoju patogenu.

Testy prowadzono w warunkach umożliwiających porównawczą ocenę aktywności poszczególnych szczepów wobec różnych fitopatogenów. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do identyfikacji szczepów o najwyższym potencjale biokontrolnym.

2.3. Charakterystyka funkcjonalna bakterii fermentacji mlekowej

Czyste kultury bakterii przechowywano w bulionie MRS (de Man, Rogosa i Sharpe; Merck) z dodatkiem 20% (v/v) glicerolu w zamrażarce w temperaturze –80,0 °C. Szczepy aktywowano poprzez przeniesienie do świeżego bulionu MRS i inkubację w temperaturze 37 °C przez 24 h. Inokulum bakterii fermentacji mlekowej (LAB) otrzymywano przez ponowne przeniesienie hodowli do pożywki MRS i inkubację przez 24 h. Gęstość inokulum dostosowywano do wartości $OD_{600} = 0,5$, co odpowiadało ok. 10^9 CFU/mL.

2.3.1. Produkcja, izolacja i ilościowa ocena egzopolisacharydów (EPS)

Produkcję egzopolisacharydów (EPS) prowadzono na podłożu płynnym oraz stałym. W przypadku hodowli płynnych do produkcji EPS wykorzystywano 10 mL pożywki MRS, w której glukozę zastąpiono 2% (w/v) sacharozą (MRS-S). Do pożywki dodawano 10% (v/v) inokulum, a następnie hodowle inkubowano przez 48 h w temperaturze 30 °C. Po inkubacji do hodowli dodawano kwas trichlorooctowy (TCA) do końcowego stężenia 10% (w/v) i inkubowano przez 1 h, po czym próbki wirowano przy 5000 rpm przez 10 min w celu oddzielenia komórek bakteryjnych i białek. Surowy EPS wytrącano poprzez dodanie trzykrotnej objętości schłodzonego 95% (w/v) etanolu, a następnie inkubowano w temperaturze 4 °C przez 24 h. Po tym czasie mieszaninę wirowano przy 10 000 rpm przez 10 min w 4 °C. Supernatant odlewano, a osad pozostawiano do odparowania resztek alkoholu, po czym uzyskany EPS ważono na wadze analitycznej.

Produkcję EPS na podłożu stałym oceniano na podstawie morfologii kolonii po 48 h inkubacji w temperaturze 30 °C. Kolonie analizowano pod kątem obecności fenotypu śluzowego oraz sznurowatego, polegającego na tworzeniu długich, widocznych nitek EPS po dotknięciu kolonii sterylną wykałaczką. Do ilościowej oceny produkcji EPS wykorzystywano 10 mL stałej pożywki MRS-S, na której powierzchni wysiewano 10% (v/v) inokulum i inkubowano przez 48 h w 30 °C. Po inkubacji EPS pobierano bezpośrednio z powierzchni płytek poprzez płukanie ich 10 mL wody destylowanej do momentu zaniku widocznej lepkiej warstwy. Zebrany materiał przenoszono do sterylnych probówek typu Falcon, dodawano TCA do końcowego stężenia 10% (w/v) i inkubowano przez 1 h. Następnie próbki wirowano przy 5000 rpm przez 10 min w celu oddzielenia komórek i białek, a surowy EPS wytrącano poprzez dodanie trzykrotnej objętości zimnego 95% (w/v) etanolu. Po 24 h inkubacji w 4 °C próbki wirowano przy 10 000 rpm przez 10 min, supernatant odlewano, a osad pozostawiano do odparowania resztek alkoholu i ważono.

2.3.2. Analiza metabolitów (HPLC – kwasy organiczne)

Badanie przeprowadzono w odciekach po hodowlach bakterii w podłożu MRS w temperaturze 37 °C. Hodowle wirowano przez 3 minuty z prędkością 1500 obr./min. Supernatanty przesączono przez filtr o średnicy porów 0,45 µm (Membrane Solutions, USA) przed analizą HPLC. Metodę HPLC zastosowano do oznaczenia kwasów organicznych (mlekowego, octowego, propionowego i masłowego). Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu Gilson (Middleton, USA) wyposażonego w autosampler (GX-271), pompę wielorozpuszczalnikową (322), piec kolumnowy i detektor RI (LDC Analytical, Floryda, USA). Kwasy organiczne rozdzielono za pomocą kolumny Aminex 87HP (300 mm × 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Kanada, USA) pracującej w temperaturze 50 °C. Elucję przeprowadzono w trybie izokratycznym z kwasem siarkowym (pH 3,4) jako fazą ruchomą, przy przepływie 0,8 ml/min. Oznaczenie ilościowe oparto na detektorze refrakcji i wykonano z zewnętrznymi standardami w dwóch powtórzeniach, wyrażając je jako średnią ± odchylenie standardowe.

2.4. Analizy genomowe i molekularne

2.4.1. Identyfikacja genów syntezy EPS (PCR)

Materiał do badań stanowiły 20 godzinne hodowli bakterii mlekowych, w podłożu MRS. Izolację genomowego DNA wykonano zgodnie z instrukcją producenta, wykorzystując zestaw DNeasy PowerLyzer Microbial Kit (Qiagen). Oczyszczony materiał poddano pomiarowi stężenia i czystości NanoDrop. Identyfikację wybranych genów warunkujących syntezę EPS przez bakterie przeprowadzono na podstawie danych literaturowych. Wybrano osiem genów związanych z syntezą egzopolisacharydów (HoPS i HePS). Dla każdego genu zamówiono odpowiednie startery (Genomed). W **tabeli 3** zestawiono informacje nt. roli genu, sekwencji starterów oraz przewidywanej długości produktu PCR.

Tabela 3. Startery stosowane do identyfikacji genów syntezy eps przez bakterie

Gen	Rola, rodzaj eps (HoPS / HePS)	Sekwencje primerów	Amplicon (bp)	Literatura
gtf (glucansucrase; GH70)	HoPS (glucans: dextran/reuteran/mutan)	GAYAAAYWSNAAAYCCNRYNGTNC (DegF) ADRTCNC CRTARTANAVNYKNG (DegR)	~660	Kralj et al., 2003. (ScienceDirect)
gtf (reuteran-type)	HoPS (reuteran)	GTGAAGGTA ACTATGTTG (DexreuF) ATCCGCATTAAAGAATGG (DexreuR)	~600	Tiekling et al., 2003. (Oxford Academic, ResearchGate)
dsrK (dextransucrase)	HoPS (dextran; Weissella)	GCAACCAACTGAATTTTCGAC (dsrK39F) CAATGCTTTGATGACGTTCC (dsrK39R)	~1950	Bounaix et al., 2010.
lev / ftf (levansucrase; GH68)	HoPS (fructans: levan/inulin-type)	GAYGTNTGGGAYWSNTGGC (LevV-F) TCNTYYTCRTCNSWNRMCAT (LevV-R)	~800	Tiekling et al., 2003. (Oxford Academic, ResearchGate)
epsA	HePS (cluster regulation/initiation)	TAGTGACAACGGTTGTACTG (epsA-F) GATCATTATGGACTGTCAC (epsA-R)	~784	Low et al., 1998 (reported widely). (ScienceDirect)
epsB (Wzz-like chain-length regulator)	HePS (kontrola polimeryzacji)	CGTACGATTTCGTACGACCAT (epsB-F) TGACCAGTGACACTTGAAGC (epsB-R)	~1150	Deveau & Moineau, 2003.
p-gtf (priming glycosyltransferase)	HePS (inicjowanie przenoszenia jednostek)	ATGAGTTTGGTTGGACCAAGACCTCC (G-Lr-Bact-a-F-26) TTTAATAGGCTCCAGTTGGA (G-Lr-Bact-b-R-20b)	~276	Provencher et al., 2003. (PMC, PubMed, ASM Journals)
epsD / epsE (BY-kinase / phosphatase)	HePS (tyrosine kinase regulacja)	TCATTTTATTCGTAAAACCTCAATTGA YGARYTNCC (epsD/E-F) AATATTATTACGACCTSWNAYYTGCCA (epsD/E-R)	~189	Provencher et al., 2003. (PMC, ASM Journals)

Przeprowadzono reakcję PCR z użyciem par starterów przedstawionych w tabeli 1, w odpowiednich warunkach. Mieszanekę reakcyjną przygotowano w objętości całkowitej 30 µl, zawierającej: 2× *PCR Master Mix*, *Taq DNA Polymerase*, primery F i R (końcowe stężenie 0,5 µM), matrycowe DNA (ok. 100 ng), wodę nuclease-free do objętości końcowej.

Produkty amplifikacji zwizualizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym o stężeniu 1% przygotowanym w buforze 1× TAE. Do wizualizacji DNA zastosowano barwnik SimplySafe.

Jako marker masy DNA wykorzystano GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90 V przez 25 min, a uzyskane wyniki dokumentowano w systemie detekcji UV.

2.4.2. Sekwencjonowanie całogenomowe (WGS)

Sekwencjonowanie całogenomowe wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykonano w firmie Genxone (Złotniki, Polska). Do analizy wytypowano szczepy o najwyższym potencjale aplikacyjnym, w szczególności charakteryzujące się wysoką zdolnością do syntezy egzopolisacharydów (EPS) oraz korzystnym profilem metabolicznym, a także wybrane szczepy referencyjne o niskiej produkcji EPS w celach porównawczych.

Genomowe DNA izolowano z czystych hodowli bakteryjnych zgodnie ze standardowym protokołem laboratoryjnym, a następnie poddawano sekwencjonowaniu z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Otrzymane surowe dane sekwencyjne poddano kontroli jakości, montażowi de novo oraz adnotacji funkcjonalnej z użyciem standardowych pipeline'ów bioinformatycznych. W ramach prac analitycznych podjęto również próbę zastosowania autorskiego pipeline'u bioinformatycznego, opartego na narzędziu **KOfamScan**, przeznaczonego do przesiewowej identyfikacji genów związanych z wybranymi szlakami metabolicznymi na podstawie danych genomowych. Pipeline ten został zaimplementowany w postaci repozytorium dostępnego publicznie (https://github.com/mrozon-zip/AminyBiogenne_kofam_scan) i miał charakter narzędzia wspomagającego eksploracyjną analizę danych sekwencyjnych.

Uzyskane sekwencje genomowe analizowano wielokierunkowo, obejmując:

- **identyfikację genów związanych z syntezą egzopolisacharydów (EPS)**, w tym genów odpowiedzialnych za syntezę homo- i heteropolisacharydów (HoEPS i HeEPS), takich jak glikozylotransferazy, fosfotransferazy, regulatory klastrów eps oraz enzymy wykorzystujące sacharozę jako substrat,
- **analizę genów związanych z antybiotykoopornością (AMR)**, obejmującą wyszukiwanie sekwencji kodujących białka oporności, transportery typu efflux, enzymy inaktywujące antybiotyki oraz inne determinanty oporności,
- **weryfikację potencjalnych elementów mobilnych**, takich jak transpozazy, integrazy oraz sekwencje plazmidowe, mogące wskazywać na możliwość horyzontalnego transferu genów.

Wyszukiwanie genów i białek prowadzono na podstawie adnotacji funkcjonalnej oraz przeszukiwania genomów z użyciem słów kluczowych, m.in.: *eps*, *exopolysaccharide*, *glycosyltransferase*, *fructosyltransferase*, *cps*, *sucrose*, *sucrase*, *gtf*, *ftf*, *wzx*, *wzy*, *O-antigen*, *antimicrobial resistance*, *efflux transporter*, *multidrug resistance*.

Wyniki analiz genomowych wykorzystano do interpretacji danych fenotypowych, w szczególności w zakresie zdolności syntezy EPS oraz oceny bezpieczeństwa szczepów pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle spożywczym i rolnictwie.

2.4.3. Analiza antybiotykooporności (fenotypowa i genomowa)

Analizę antybiotykooporności wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono w oparciu o podejście łączące metody fenotypowe oraz analizy genomowe, zgodnie z aktualnymi zaleceniami EFSA dotyczącymi oceny bezpieczeństwa mikroorganizmów stosowanych w łańcuchu żywnościowym.

Fenotypową ocenę wrażliwości na antybiotyki wykonano metodą oznaczania minimalnego stężenia hamującego (MIC). Do badań wykorzystano testy paskowe E-test (bioMérieux), które umożliwiają precyzyjne określenie MIC dla wybranych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Analizie poddano antybiotyki reprezentujące różne klasy, istotne z punktu widzenia medycyny weterynaryjnej i ludzkiej, w tym m.in. β -laktamy, aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, tetracykliny, fenikole oraz glikopeptydy. Zawiesiny komórek przygotowywano z 24-godzinnych hodowli bakterii, doprowadzając ich gęstość do 0,5 w skali McFarlanda, a następnie nanoszono na podłoże MRS agar. Inkubację prowadzono w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Odczytu wartości MIC dokonywano na podstawie granicy strefy zahamowania wzrostu. Uzyskane wyniki interpretowano w odniesieniu do punktów odcięcia (cut-off values) określonych przez EFSA dla bakterii fermentacji mlekowej lub, w przypadku ich braku, zgodnie z zaleceniami dla bakterii Gram-dodatnich.

Równolegle przeprowadzono analizę genotypową antybiotykooporności na podstawie danych z sekwencjonowania całogenomowego (WGS). Zmontowane i zaannotowane genomy szczepów analizowano pod kątem obecności genów oporności na antybiotyki (ARG) z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych oraz kuratorowanych baz danych, w tym AMRFinderPlus oraz CARD. Identyfikację ARG prowadzono zarówno na poziomie

chromosomów, jak i elementów pozachromosomalnych, takich jak plazmidy, co umożliwiała ocenę potencjalnej mobilności wykrytych determinant oporności.

Analiza genotypowa obejmowała również określenie mechanizmów oporności, takich jak modyfikacja miejsca docelowego antybiotyku, enzymatyczna inaktywacja substancji czynnej, aktywne usuwanie antybiotyku z komórki (efflux) oraz mechanizmy ochrony rybosomu. Szczególną uwagę zwrócono na lokalizację genów oporności (chromosomalna vs. plazmidowa), co ma kluczowe znaczenie dla oceny ryzyka horyzontalnego transferu genów oporności pomiędzy mikroorganizmami.

Zintegrowane podejście, łączące dane fenotypowe i genomowe, pozwoliło na kompleksową ocenę profilu antybiotykooporności badanych szczepów, identyfikację rozbieżności pomiędzy opornością deklarowaną na podstawie genotypu a obserwowaną fenotypowo oraz ocenę potencjalnego ryzyka związanego z wykorzystaniem analizowanych bakterii w zastosowaniach technologicznych, rolniczych i spożywczych.

2.5. Analiza metagenomiczna

Badania przeprowadzono na próbkach gleby pochodzących z dwóch typów użytkowania rolniczego:

- KC1 – gleba z powierzchni użytkowanej pod uprawę drzew owocowych,
- K2M – gleba z powierzchni użytkowanej pod uprawę krzewów jagodowych.

Każdą próbkę gleby inokulowano pojedynczo jednym z wymienionych szczepów bakteryjnych. Okres inokulacji wynosił 4 tygodnie. Próby kontrolne stanowiły gleby inkubowane w analogicznych warunkach, bez dodatku mikroorganizmów.

Całkowite DNA mikroorganizmów izolowano z próbek gleby po inokulacji przy użyciu zestawu DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), zgodnie z zaleceniami producenta. Jakość oraz ilość wyizolowanego DNA oceniano spektrofotometrycznie oraz elektroforetycznie.

Profilowanie mikrobiomu gleby przeprowadzono z wykorzystaniem sekwencjonowania amplikonu genu 16S rRNA w oparciu o sekwencjonowanie następnej generacji (NGS). Amplifikację regionu V3–V4 genu 16S rRNA wykonano z zastosowaniem starterów 341F/805R. Przygotowanie bibliotek sekwencyjnych oraz ich indeksowanie przeprowadzono zgodnie z protokołem Nextera XT nr 15044223 Rev. B (Illumina). Sekwencjonowanie

wykonano na platformie Illumina MiSeq, generując parowane odczyty 2×150 bp. Dla każdej badanej próby wykonano pięć powtórzeń technicznych ($n = 5$).

Obróbkę bioinformatyczną surowych danych sekwencyjnych, obejmującą kontrolę jakości, filtrowanie sekwencji niskiej jakości, identyfikację i usuwanie sekwencji chimerycznych oraz inferencję wariantów sekwencji ampikonowych (ASV), przeprowadzono z wykorzystaniem programu DADA2 v2024.2.0. Klasyfikację taksonomiczną wykonano w środowisku QIIME 2 v2024.2 z zastosowaniem bazy referencyjnej SILVA v132. Z dalszych analiz wykluczono ASV o względnej liczebności poniżej 0,25% we wszystkich próbkach.

Dane zaimportowano do środowiska R v4.4.1 z wykorzystaniem pakietu qiime2R i analizowano przy użyciu pakietów phyloseq oraz vegan. Po rozrzedzeniu danych obliczono miary różnorodności alfa, w tym efektywną liczbę Shannona. Analizę różnorodności beta przeprowadzono na podstawie macierzy dystansów Bray–Curtis, z wizualizacją wyników w postaci ordynacji NMDS. Różnice pomiędzy wariantami oceniano testem Kruskala–Wallisa z testem post hoc Dunna (dla alfa-różnorodności) oraz testem PERMANOVA (dla beta-różnorodności). Analizę różnicowej obfitości taksonów przeprowadzono z zastosowaniem metody ANCOM-BC, a identyfikację taksonów wskaźnikowych wykonano przy użyciu analizy LEfSe.

2.6. Analizy aktywności lakazowej i ekspresji genów

W przypadku szczepów *Pseudomonas putida* oraz grzybów z rodzaju *Trichoderma* aktywność lakazy oznaczano w płynie pochodzącym (supernatancie), uzyskany po wirowaniu hodowli ($3500 \times g$, 15 min). Dla szczepów *Bacillus pumilus*, ze względu na obecność lakazy CotA związanej z okrywą endospory, aktywność enzymatyczną oznaczano bezpośrednio w zawiesinie spor, a nie w supernatancie hodowli. Hodowle *B. pumilus* prowadzono do etapu zaawansowanej sporulacji, po czym materiał biologiczny zbierano z podłoża i zawieszano w buforze cytrynianowo-fosforanowym (pH 4,5).

Aktywność lakazy oznaczano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem substratu ABTS (2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolin-6-sulfonowy kwas)). Mieszanina reakcyjna zawierała 740 μ L buforu cytrynianowo-fosforanowego (pH 4,5), 10 μ L próby badanej (supernatantu lub zawiesiny spor) oraz 250 μ L roztworu ABTS, dodawanego bezpośrednio przed pomiarem. Przyrost absorbancji mierzono przy długości fali 420 nm przez 60 s wobec odpowiedniej próby ślepej. Pomiary prowadzono w trzech powtórzeniach. Dla zawiesin spor

B. pumilus stosowano próbę ślepą zawierającą zawiesinę spor w buforze bez dodatku ABTS w celu korekcji tła wynikającego z mętności próbki.

Analizę statystyczną wyników oznaczeń aktywności lakazowej przeprowadzono z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W przypadku stwierdzenia istotnych różnic pomiędzy grupami zastosowano test post-hoc Tukeya (HSD) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Aktywność lakazy obliczano zgodnie ze wzorem:

$$Akt \left[\frac{U}{l} \right] = \frac{\Delta A \cdot 10^6 \cdot V_{całk.}}{\varepsilon \cdot V_{pr.b.} \cdot \Delta t}$$

gdzie:

ΔA – przyrost absorbancji

$V_{całk.}$ - całkowita objętość próby (1 ml)

ε - molowy współczynnik absorbancji [$36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

$V_{pr.b.}$ - objętość próby badanej (0,01 ml)

t – czas pomiaru (1 min)

Całkowite RNA izolowano z wykorzystaniem odczynnika TRIzol (Invitrogen) oraz zestawu Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). Pelety bakteryjne zawieszano w TRIzolu i mrożono przez 1 h w temperaturze -80°C w celu ułatwienia lizy komórek, a następnie mieszano w stosunku 1:1 z etanolem, zgodnie z protokołem zestawu Direct-zol™, i nanoszono bezpośrednio na kolumny oczyszczające, z zastosowaniem trawienia DNazą na kolumnie. RNA płukano zgodnie z instrukcją producenta i eluowano w wodzie wolnej od RNaz. Stężenie i czystość RNA oceniano spektrofotometrycznie (NanoDrop), natomiast integralność RNA określano z wykorzystaniem zestawu Qubit RNA IQ Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Oczyszczone RNA przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

Analizę ekspresji genów lakaz prowadzono metodą jednoetapowego RT-qPCR z wykorzystaniem zestawu Power SYBR™ Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific) oraz starterów wyszczególnionych w Tabeli 2. Do każdej reakcji dodawano 100 ng RNA, a końcowe stężenie każdego startera wynosiło 150 nM. Reakcje prowadzono w objętości 20 μL , zgodnie z protokołem producenta, przy zastosowaniu następujących warunków termocyklera: odwrotna transkrypcja (48°C , 30 min), aktywacja polimerazy (95°C , 15 min), a następnie cykle amplifikacji obejmujące denaturację (95°C , 15 s), przyłączanie

starterów (60°C, 15 s) oraz elongację (60°C, 1 min). Analizy prowadzono na platformie QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems).

Analizę ekspresji genów przeprowadzono w oparciu o porównanie wartości $-\Delta Ct$, z wykorzystaniem oprogramowania QuantStudio™ Design & Analysis Software. Zastosowane podejście umożliwiało ocenę względnych poziomów ekspresji genu lakazowego pomiędzy analizowanymi szczepami, bez definiowania jednej wspólnej próby referencyjnej. Wartości Ct genu docelowego normalizowano względem genu referencyjnego (16S rRNA), przy założeniu porównywalnego poziomu jego transkrypcji w badanych warunkach.

Każdą reakcję RT-qPCR wykonywano w dwóch powtórzeniach technicznych, a do dalszych analiz wykorzystywano średnie wartości Ct. Analiza miała charakter porównawczy pomiędzy szczepami i nie obejmowała analizy statystycznej opartej na replikatach biologicznych. Specyficzność amplifikacji weryfikowano na podstawie analizy krzywych topnienia (melt curves).

Tabela 4. Sekwencje starterów użytych w rt-PCR

Nazwa genu	Sekwencje starterów	Temp. annealingu [°C]	Literatura
CotA	RT-Lac-F CATCTAGATAACGACGCCACAATCTTAC	60	Li et al., 2024
	RT-Lac-R ACATCAAAACGTTTCAGCAGGTGCAAT		
16s	16S_341F CCTACGGGnGGCwGCAG	60	Klindworth et al., 2013
	16s_805R GACTAChvGGGTATCTAATCC		

3. Wyniki i ich omówienie

3.1. Potencjał biokontrolny mikroorganizmów

3.1.1. Aktywność antagonistyczna szczepów *Trichoderma* wobec fitopatogenów roślinnych

W ramach oceny potencjału biokontrolnego przeprowadzono testy *in vitro* dla ośmiu szczepów grzybów z rodzaju *Trichoderma*, konfrontując je z wybranymi izolatami fitopatogenów roślinnych. Badania obejmowały patogeny o istotnym znaczeniu gospodarczym, w tym *Fusarium graminearum* (KKP 3962), *Botrytis cinerea* (KKP 3292, KKP 451), *Alternaria alternata* (KKP 3368, KKP 4022) oraz *Alternaria infectoria* (KKP 3728).

Aktywność antagonistyczną oceniano na podstawie testów hodowli konfrontacyjnych (*dual culture*), analizując zdolność szczepów *Trichoderma* do hamowania wzrostu fitopatogenów oraz ich przerastania. Przykładowe wyniki dla trzech wybranych szczepów *Trichoderma* zestawiono w tabeli 5.

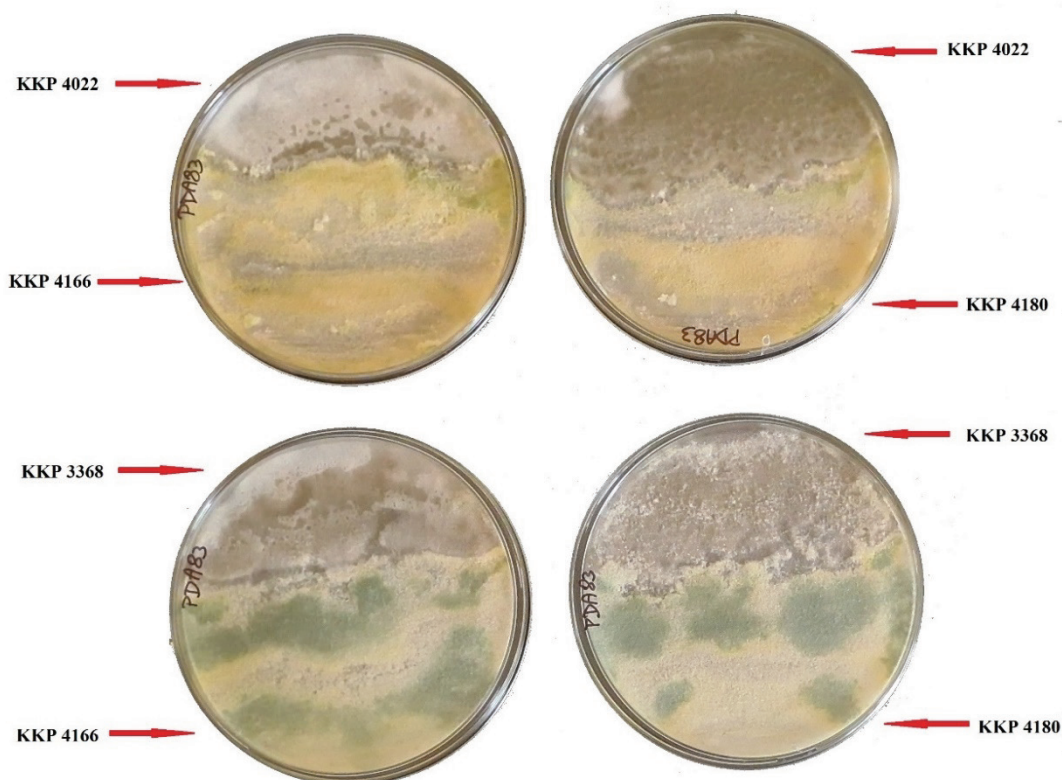
Tabela 5. Ocena aktywności antagonistycznej wybranych szczepów *Trichoderma* wobec fitopatogenów.

Szczep <i>Trichoderma</i>	Fitopatogen					
	KKP 3962	KKP 3292	KKP 451	KKP 3368	KKP 4022	KKP 3728
KKP 4166	++	++	++	++	++	++
KKP 4180	++	++	++	+	+	+
KKP 788	++	++	++	+	+	+
Legenda: ++ – silny antagonizm (zahamowanie wzrostu i przerastanie patogenu); + – antagonizm (zahamowanie wzrostu); – brak efektu antagonistycznego.						

We wszystkich analizowanych przypadkach stwierdzono silną aktywność antagonistyczną szczepów *Trichoderma* wobec izolatów *Fusarium graminearum* oraz *Botrytis cinerea*. Skuteczność wobec patogenów z rodzaju *Alternaria* była bardziej zróżnicowana i zależna od szczepu *Trichoderma*.

Na tle pozostałych obiektów szczególnie wyróżniał się szczep *Trichoderma* sp. KKP 4166, który wykazywał silny antagonizm wobec wszystkich testowanych fitopatogenów, w tym również izolatów *Alternaria alternata* i *Alternaria infectoria*. Obserwowano zarówno wyraźne zahamowanie wzrostu patogenów, jak i ich przerastanie przez grzyb antagonistyczny, co wskazuje na szerokie spektrum działania oraz wysoki potencjał biokontrolny tego szczepu.

Pozostałe analizowane szczepy (*Trichoderma* sp. KKP 4180 oraz *Trichoderma* sp. KKP 788) wykazywały porównywalnie wysoką skuteczność wobec *Fusarium* i *Botrytis*, natomiast ich aktywność względem patogenów z rodzaju *Alternaria* była umiarkowana. Uzyskane wyniki potwierdzają, że szczepy *Trichoderma* różnią się zakresem i intensywnością działania antagonistycznego, co ma istotne znaczenie na etapie selekcji kandydatów do dalszych badań aplikacyjnych.



Zdjęcie 1. Przykładowe wyniki testów konfrontacyjnych (dual culture) szczepów *Trichoderma* wobec izolatów *Alternaria alternata*. Widoczne jest zahamowanie wzrostu fitopatogenu oraz przerastanie kolonii patogenu przez szczepy *Trichoderma* sp. KKP 4166 oraz *Trichoderma* sp. KKP 4180, wskazujące na silne właściwości antagonistyczne.

3.1.2. Aktywność antypatogenowa wybranych szczepów bakterii i drożdży

W celu uzupełnienia badań nad potencjałem biokontrolnym mikroorganizmów przeprowadzono testy in vitro oceniające aktywność antagonistyczną wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oraz bakterii z rodzaju *Bacillus* wobec istotnych fitopatogenów roślinnych. Analizy prowadzono z wykorzystaniem izolatów *Botrytis cinerea* (KKP 451), *Fusarium oxysporum* (KKP 458) oraz dwóch izolatów *Alternaria alternata* (KKP 4022 i KKP 3728).

Tabela 6. Aktywność antagonistyczna wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej oraz bakterii z rodzaju *Bacillus* wobec fitopatogenów roślinnych oceniana w testach in vitro

	<i>Fitopatogen</i>			
	<i>Botrytis cinerea</i> KKP 451	<i>Fusarium oxysporum</i> KKP 458	<i>Alternaria alternata</i> KKP 4022	<i>Alternaria alternata</i> KKP 3728
<i>Bacillus subtilis</i> KKP 3899	++	-	++	++
<i>Bacillus pumilus</i> KKP 3900	++	-	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> KKP 835	+	+	+/-	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 2065	-	-	-	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 4140	-	+/-	-	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 4216	-	-	-	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 3246	-	-	-	+
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> KKP 4135	-	-	-	-
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> KKP 4201	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus curvatus</i> KKP 1812	-	+	+/-	++
<i>Lactobacillus fermentum</i> KKP 1829	-	+	+/-	++
<i>Leuconostoc citreum</i> KKP 4214	-	+	-	+/-
<i>Weissella cibaria</i> KKP 4218	-	+	-	++
<i>Pediococcus acidilactici</i> KKP 4220	-	+	+/-	++
Legenda: ++ – silny antagonizm (silne zahamowanie wzrostu patogenu); + – antagonizm (zahamowanie wzrostu); – brak efektu antagonistycznego.				

Wśród badanych mikroorganizmów na szczególną uwagę zasługują szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus*, które wykazywały silne i szerokie spektrum działania antagonistycznego. Najsilniejszą i najbardziej powtarzalną aktywność antagonistyczną stwierdzono w przypadku szczepów *Bacillus subtilis* KKP 3899 oraz *Bacillus pumilus* KKP 3900. Oba szczepy wykazywały silne hamowanie wzrostu *Botrytis cinerea* oraz obu izolatów *Alternaria alternata*, co klasyfikowano jako silny antagonizm. Jednocześnie nie obserwowano istotnego efektu hamującego wobec *Fusarium oxysporum*.

Uzyskane wyniki wskazują na szerokie, lecz selektywne spektrum działania antagonistycznego szczepów z rodzaju *Bacillus*, ukierunkowane głównie na patogeny grzybowe odpowiedzialne za choroby liści i owoców. Taki profil aktywności jest zgodny z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi zdolności bakterii *Bacillus* do produkcji metabolitów o działaniu przeciwrzybowym, przy jednocześnie ograniczonym wpływie na patogeny glebowe z rodzaju *Fusarium*.

W grupie bakterii fermentacji mlekowej obserwowano zdecydowanie bardziej zróżnicowane i selektywne działanie antagonistyczne, zależne zarówno od szczepu, jak i gatunku fitopatogenu.

Szczepy *Lactococcus lactis* KKP 835, *Lactiplantibacillus curvatus* KKP 1812 oraz *Lactobacillus fermentum* KKP 1829 wykazywały umiarkowaną aktywność antagonistyczną wobec *Botrytis cinerea* i *Fusarium oxysporum*, przy jednocześnie wyraźniejszym działaniu hamującym wobec izolatów *Alternaria alternata*, szczególnie KKP 3728. W tych przypadkach obserwowano zarówno pełne zahamowanie wzrostu (+), jak i efekt częściowy (+/-), wskazujący na ograniczoną, lecz mierzalną aktywność antypatogenową.

Szczepy *Weissella cibaria* KKP 4218 oraz *Pediococcus acidilactici* KKP 4220 wykazywały selektywną aktywność wobec *Alternaria alternata*, przy czym w przypadku izolatu KKP 3728 obserwowano silne zahamowanie wzrostu (++). Działanie wobec pozostałych patogenów było ograniczone lub nieobecne, co sugeruje wąskie spektrum oddziaływania tych szczepów.

Pozostałe szczepy *Pediococcus acidilactici* (KKP 2065, KKP 4140, KKP 4216, KKP 3246) charakteryzowały się brakiem lub bardzo ograniczoną aktywnością antagonistyczną wobec większości testowanych fitopatogenów, z wyjątkiem pojedynczych przypadków słabego lub umiarkowanego hamowania wzrostu izolatów *Alternaria*.

Szczepy *Limosilactobacillus reuteri* (KKP 4135 i KKP 4201) nie wykazywały aktywności antagonistycznej wobec żadnego z testowanych fitopatogenów w zastosowanych warunkach doświadczalnych.

Uzyskane wyniki wskazują, że spośród badanych mikroorganizmów najwyższy potencjał biokontrolny wykazują szczepy z rodzaju *Bacillus*, charakteryzujące się silnym i stosunkowo szerokim spektrum działania antagonistycznego wobec istotnych fitopatogenów roślinnych. Bakterie fermentacji mlekowej wykazywały natomiast działanie wyraźnie szczepozależne i selektywne, ograniczone głównie do wybranych izolatów *Alternaria alternata*.

Obserwowane różnice w aktywności antypatogenowej potwierdzają zasadność prowadzenia selekcji szczepowej oraz wskazują, że bakterie fermentacji mlekowej mogą pełnić rolę uzupełniającą lub wspomagającą w strategiach biokontroli, natomiast szczepy *Bacillus* stanowią najbardziej obiecujące obiekty do dalszych badań aplikacyjnych w kontekście ochrony roślin.

3.2. Zdolność syntezy egzopolisacharydów (EPS) i charakterystyka metaboliczna bakterii fermentacji mlekowej

Wyniki jakościowej oceny zdolności szczepów bakterii fermentacji mlekowej do produkcji egzopolisacharydów (EPS) przedstawiono w tabeli 6. Ocenę przeprowadzono na podstawie obserwacji morfologii kolonii wyhodowanych na podłożu stałym. Kolonie analizowano pod kątem obecności fenotypu sznurowatego EPS poprzez delikatne dotknięcie ich sterylną wykałaczką i obserwację tworzenia się długich, widocznych nitek polisacharydowych. Szczepy wykazujące ten fenotyp zaklasyfikowano jako produkujące EPS („EPS +”), natomiast brak obserwowanego efektu określano jako „EPS –”.

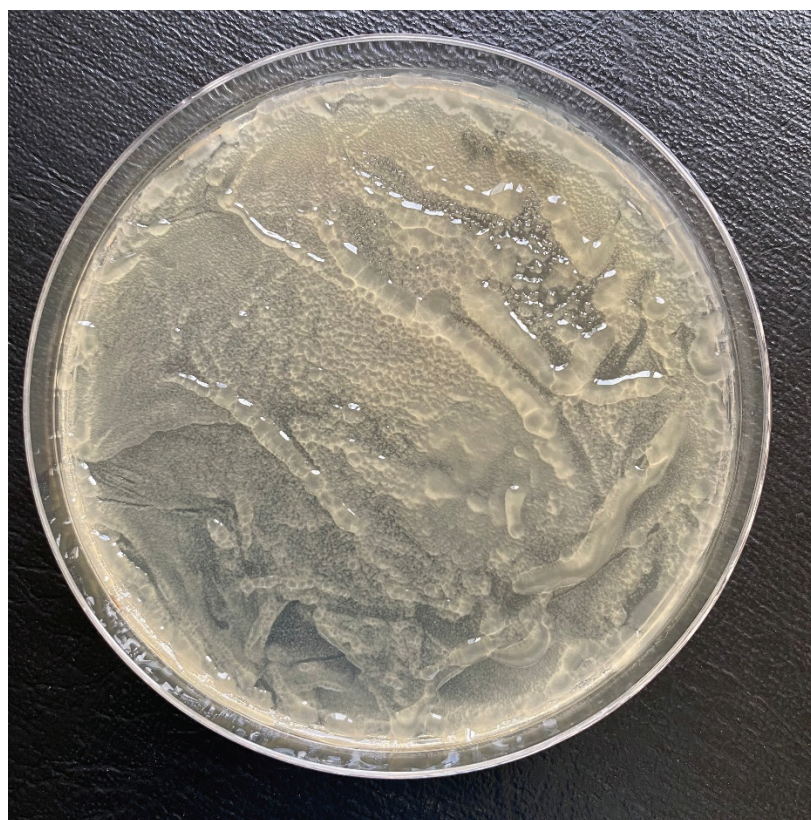
Tabela 6. Synteza egzopolisacharydów (EPS) przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej – ocena jakościowa na podłożu stałym

Lp.	Symbol	Gatunek	Obecność EPS
1	750 (10)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+
2	KKP 1808	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+
3	KKP 1812	<i>Weissella cibaria</i>	+
4	KKP 1829	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	+
5	KKP 1839	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+
6	KKP 1840	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+

7	KKP 2036p	<i>Lactocaseibacillus casei/paracasei</i>	+
8	KKP 2042p	<i>Weissella cibaria</i>	+
9	KKP 2043p	<i>Weissella cibaria</i>	+
10	KKP 2064	<i>Weissella cibaria</i>	+
11	KKP 2065	<i>Pediococcus acidilactici</i>	+
12	KKP 3066	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+
13	KKP 3070	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+
14	KKP 3180	<i>Pediococcus acidilactici</i>	+
15	KKP 3246	<i>Pediococcus acidilactici</i>	+
16	KKP 3274	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+
17	KKP 4214	<i>Leuconostoc citreum</i>	+
18	KKP 4215	<i>Leuconostoc sp.</i>	+
19	KKP 4216	<i>Pediococcus acidilactici</i>	+
20	KKP 4218	<i>Weissella cibaria</i>	+
21	KKP 4219	<i>Weissella cibaria</i>	+
22	KKP 4220	<i>Leuconostoc lactis</i>	+
23	KKP 593p	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+
24	KKP 825	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	+
25	1850 (3)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
26	750 (9)	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	-
27	750 7	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
28	AG	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
29	Gryka 1B	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
30	Gryka 3A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
31	Gryka 3B	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
32	Gryka 4C	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-
33	Kap A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
34	KKD	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
35	KKP 1802	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
36	KKP 1806	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
37	KKP 1809	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
38	KKP 2058p	<i>Weissella cibaria</i> ZFJ 7/8	-
39	KKP 3069	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
40	KKP 3100	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
41	KKP 3101	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
42	KKP 3103	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
43	KKP 3243	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
44	KKP 3244	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
45	KKP 3245	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
46	KKP 3248	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
47	KKP 3273	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
48	KKP 3277	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
49	KKP 385	<i>Leuconostoc mesenteroides dextranicum</i>	-
50	KKP 879	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
51	MA	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
52	W.c Jecz 3	<i>Weissella cibaria</i>	-
53	WN 1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
54	ZFB 138	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-
55	ZFB 140	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides/ mesenteroides</i>	-
56	ZFB 201	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-
57	ZFP6	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-

Spośród 57 badanych izolatów bakterii fermentacji mlekowej zdolność do syntezy EPS wykazano u 23 szczepów, należących do gatunków *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Limosilactobacillus reuteri* oraz *Leuconostoc citreum*.

W kolejnym etapie do ilościowej oceny produkcji EPS wytypowano szczepy pozytywne w teście jakościowym przeprowadzonym na podłożu stałym. Wyniki ilościowej analizy syntezy EPS przedstawiono w **tabeli 7**. Przykładową morfologię kolonii z wyraźnie widoczną produkcją egzopolisacharydów zilustrowano na **Zdjęciu 2**.



Zdjęcie 2. Morfologia kolonii *Weissella cibaria* KKP 2042 z widocznymi EPS.

Wyniki ilościowej oceny zdolności do syntezy EPS przez wyselekcjonowane szczepy bakterii fermentacji mlekowej przedstawiono w **Tabeli 7**.

Tabela 7. Zdolność do syntezy EPS przez szczepy bakterii mlekowej - ocena ilościowa

Symbol	Gatunek	EPS	
		pożywka płynna [g·l ⁻¹]	pożywka stała [g·kg ⁻¹]
KKP 4220	<i>Leuconostoc lactis</i>	11,64 ± 2,25	1,71 ± 1,68
KKP 4214	<i>Leuconostoc citreum</i>	5,70 ± 2,74	2,57 ± 0,92
KKP 2042p	<i>Weissella cibaria</i>	4,65 ± 1,46	1,67 ± 2,46
KKP 2065	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4,65 ± 2,49	0,01 ± 0,00
KKP 4215	<i>Leuconostoc sp.</i>	4,49 ± 1,85	1,72 ± 0,49
KKP 2043p	<i>Weissella cibaria</i>	4,29 ± 0,56	4,90 ± 0,65
KKP 4216	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4,25 ± 1,65	0,75 ± 0,26
KKP 1839	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3,77 ± 1,13	0,31 ± 0,17
KKP 1808	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	3,27 ± 0,83	0,35 ± 0,23
KKP 1812	<i>Weissella cibaria</i>	3,26 ± 1,54	0,74 ± 0,43
KKP 3180	<i>Pediococcus acidilactici</i>	3,01 ± 1,33	0,67 ± 0,15
KKP 4218	<i>Weissella cibaria</i>	3,00 ± 1,36	1,62 ± 0,75
KKP 3066	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,82 ± 0,84	0,65 ± 0,20
KKP 2064	<i>Weissella cibaria</i>	2,71 ± 0,27	0,55 ± 0,15
KKP 4219	<i>Weissella cibaria</i>	2,60 ± 0,56	0,44 ± 0,24
KKP 2036p	<i>Lactocaseibacillus casei/paracasei</i>	2,44 ± 0,62	0,61 ± 0,18
KKP 1829	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2,26 ± 1,40	1,89 ± 1,87
KKP 3070	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,20 ± 0,86	0,23 ± 0,13
KKP 825	<i>Lpb. plantarum</i>	2,14 ± 1,05	0,63 ± 0,23
KKP 1840	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,14 ± 0,12	0,30 ± 0,10
KKP 3274	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1,96 ± 1,95	0,72 ± 0,59
KKP 3246	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1,90 ± 0,74	1,06 ± 0,22
KKP 593p	<i>Lpb. plantarum</i>	1,46 ± 1,30	1,33 ± 1,63
750 (10)	<i>Lpb. plantarum</i>	1,30 ± 0,45	0,30 ± 0,22

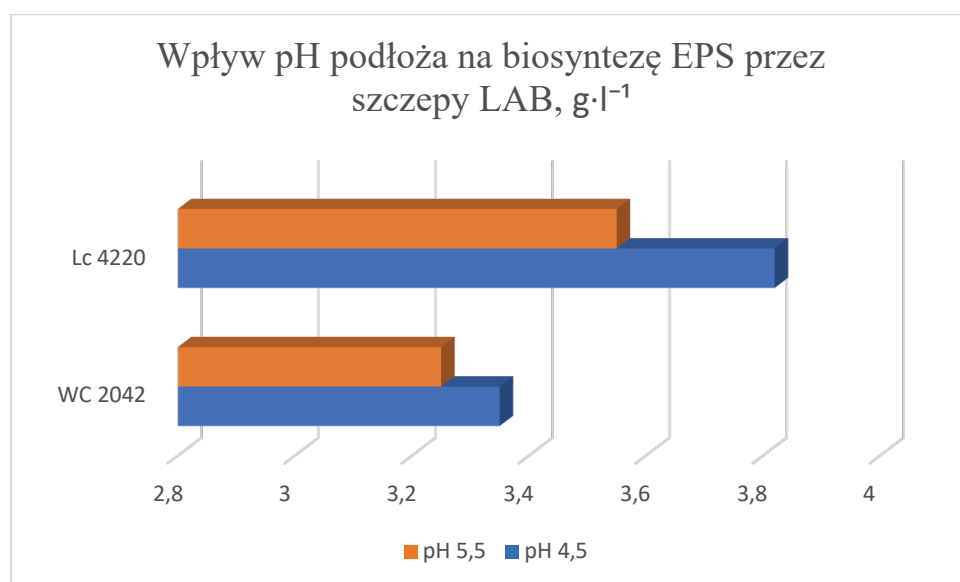
Zaobserwowano istotne zróżnicowanie zdolności do syntezy egzopolisacharydów pomiędzy badanymi szczepami bakterii należącymi do rodzajów *Lactiplantibacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* oraz *Pediococcus*. Najwyższą wydajność biosyntezy EPS w warunkach laboratoryjnych, w podłożu MRS z dodatkiem sacharozy, stwierdzono w przypadku szczepu *Leuconostoc lactis* KKP 4220, dla którego uzyskano ponad 11 g EPS·l⁻¹ pożywki płynnej. W przypadku pozostałych szczepów maksymalna wydajność biosyntezy EPS nie przekraczała 4,65 g·l⁻¹, co zaobserwowano m.in. dla *Pediococcus acidilactici* KKP 2065.

Należy zaznaczyć, że ekstrakcja egzopolisacharydów metodą precypitacji obejmuje kilka etapów, takich jak oddzielenie biomasy komórkowej, degradacja białek oraz wytrącanie polisacharydów, co może wpływać na zmienność uzyskiwanych wyników i skutkować odchyleniami pomiędzy powtórzeniami. Ponadto, ze względu na zróżnicowaną metodykę

oznaczeń oraz badanie różnych szczepów, bezpośrednie porównywanie wydajności syntezy EPS pomiędzy wynikami prezentowanymi przez różnych autorów jest utrudnione.

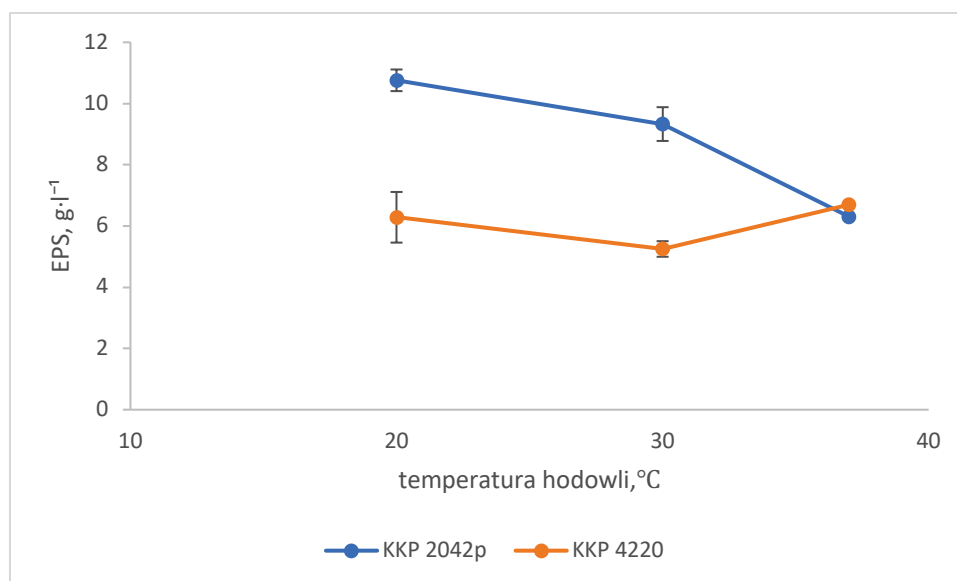
Dane literaturowe wskazują na szeroki zakres raportowanych wydajności biosyntezy EPS przez bakterie fermentacji mlekowej. Oleksy-Sobczak (2020) wykazała, że po optymalizacji warunków hodowli szczepy *Lactocaseibacillus rhamnosus* wytwarzały od około 800 mg do 1 g $\text{EPS} \cdot \text{l}^{-1}$ pożywki, natomiast Badel i wsp. (2011) podają wartość 2,7 g $\text{EPS} \cdot \text{l}^{-1}$ dla tego samego gatunku. Wyniki te potwierdzają, że czynniki środowiskowe w istotnym stopniu determinują wydajność syntezy egzopolisacharydów przez bakterie mlekowe.

W przeprowadzonych badaniach analizowano wpływ temperatury oraz pH środowiska hodowli na wydajność biosyntezy EPS, zarówno w doświadczeniach laboratoryjnych, jak i w hodowlach prowadzonych w bioreaktorach.



Rysunek 1. Wydajność biosyntezy EPS przez wybrane szczepy bakterii mlekowych w zależności od pH

Jednym z kluczowych czynników wpływających na wydajność biosyntezy EPS jest obecność wysokich stężeń sacharydów w pożywce hodowlanej (Palomba et al., 2012; Badel et al., 2011; Madhuri i Prabhakar, 2014). Istotną rolę odgrywają również składniki mineralne, źródła azotu oraz parametry fizykochemiczne hodowli, w tym temperatura i pH.



Rysunek 2. Wydajność biosyntezy EPS przez wybrane szczepy bakterii mlekowych, wpływ temperatury, doświadczenie w skali laboratoryjnej.

Podczas optymalizacji produkcji EPS przez bakterie mlekowe istotnym parametrem jest także czas inkubacji, który zazwyczaj wynosi co najmniej 48 h. Jednak, jak wykazano w badaniach Oleksy-Sobczak (2020), dla wybranych szczepów *Lcb. rhamnosus* optymalny czas hodowli pod względem syntezy EPS wynosił odpowiednio 24 lub 30 h. Ze względu na indywidualne cechy fizjologiczne i metaboliczne szczepów bakterii zdolnych do syntezy EPS nie istnieje uniwersalny model hodowli, a zmienne warunki środowiskowe wpływają nie tylko na ilość, lecz także na strukturę chemiczną, skład monosacharydowy oraz właściwości biologiczne wytwarzanych egzopolisacharydów (Oleksy-Sobczak et al., 2020; Prete et al., 2014).

Na podstawie otrzymanych wyników, zarówno w skali laboratoryjnej, jak i mikrotechnicznej, wyznaczono optymalne warunki biosyntezy egzopolisacharydów (EPS) dla wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej charakteryzujących się najwyższą wydajnością produkcji tych związków.

Tabela 8. Optymalne warunki hodowli bakterii mlekowych pod względem syntezy EPS.

Parametr	Zakres	Szczep bakterii, parametry optymalne	
		<i>Weissella cibaria</i> KKP 2042	<i>Leuconostoc citreum</i> KKP 4220
Temperatura	20 °C - 37 °C	20 °C	30-37 °C
pH	pH 4,5 ÷ pH 5,5	pH 4,5	pH 4,5
Czas hodowli	24h – 48 h	48 h	48 h
Inokulum % v/v	5% -20%	15%	10%
Wydajność produkcji EPS s.m g·l ⁻¹	Sacharoza 2%	5,52	3,45
	Sacharoza 2% + glukoza 2%	5,09	3,87

Doniesienia literaturowe wskazują, że produkcja EPS ma charakter indukowany i jest silnie zależna od pH oraz składu pożywki, w szczególności od rodzaju i stężenia źródeł węgla i azotu, a także od warunków inkubacji, takich jak temperatura i czas hodowli (Milanović et al., 2020; Zarour et al., 2018). Palomba et al. (2012), porównując pożywki wzbogacone różnymi węglowodanami, wykazali, że pożywki zawierające sacharozę są najbardziej odpowiednie do przesiewowej identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej zdolnych do produkcji EPS.

W prezentowanych badaniach określono skład pożywki oraz parametry hodowli sprzyjające syntezie EPS przez szczepy *Weissella cibaria* KKP 2042 oraz *Leuconostoc citreum* KKP 4220. Maksymalna wydajność biosyntezy EPS dla tych szczepów wynosiła odpowiednio **10,76 oraz 6,70 g s.m. EPS·l⁻¹**, natomiast w alternatywnych wariantach podłoża **3,35 oraz 3,82 g s.m. EPS·l⁻¹**. Uzyskane wartości są wysokie w porównaniu z danymi literaturowymi dla bakterii fermentacji mlekowej o właściwościach probiotycznych.

Przykładowo Zhao i Liang (2023) podają wydajność EPS na poziomie 345,98 mg·l⁻¹ dla szczepu *Lactiplantibacillus plantarum* MC5, natomiast Wang et al. (2023) uzyskali dla szczepu *Lpb. plantarum* R301 po optymalizacji jedynie 97,85 mg·l⁻¹. Oleksy-Sobczak (2020), stosując 5% inokulum, wykazała najwyższą produkcję EPS dla szczepu *Lactocaseibacillus rhamnosus* LOCK 0935 w temperaturze 25 °C i przy początkowym pH 5,7, osiągając 1004,67 ± 98,28 mg·l⁻¹.

W przypadku szczepów *Lcb. rhamnosus* wykazano, że optymalna temperatura syntezy EPS wynosi około 25 °C, co potwierdzają również obserwacje Bengoa et al. (2018). Podobnie, Minervini et al. (2010) wykazali, że stosowanie niekontrolowanego pH (w zakresie od 5,6 do

3,5) może prowadzić do wyższej wydajności syntezy EPS niż hodowle prowadzone przy stałym, regulowanym pH.

Wysoką wydajność produkcji EPS przez *Lpb. plantarum* RO30 uzyskali również Elmansy et al. (2023); osiągnięcie wartości $10,32 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ wymagało jednak zastosowania silnie zoptymalizowanych warunków, w tym wysokiego stężenia sacharozy ($40 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) oraz ekstraktu wołowego ($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), przy pH 5,5, temperaturze inkubacji $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oraz czasie hodowli wynoszącym 72 h. Również Patadiya et al. (2025) wskazują na istotny wpływ podwyższonego stężenia sacharydów na wydajność syntezy EPS przez szczepy *Weissella cibaria*.

Wyznaczenie optymalnych warunków biosyntezy EPS w warunkach bioreaktorowych umożliwiło opracowanie standardowych procedur operacyjnych (SOP, *Standard Operating Procedures*) dla hodowli szczepów *Weissella cibaria* KKP 2042 oraz *Leuconostoc citreum* KKP 4220, ukierunkowanych na zwiększoną produkcję egzopolisacharydów.

Określenie standardowych warunków operacyjnych hodowli szczepów bakterii mlekowych optymalnych pod względem syntezy egzopolisacharydów

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń optymalizacyjnych, obejmujących analizę wpływu temperatury, pH, składu pożywki oraz wielkości inokulum, opracowano standardowe warunki operacyjne (SOP) hodowli dwóch szczepów bakterii mlekowych charakteryzujących się najwyższą wydajnością syntezy egzopolisacharydów, tj. *Weissella cibaria* KKP 2042 oraz *Leuconostoc lactis* KKP 4220.

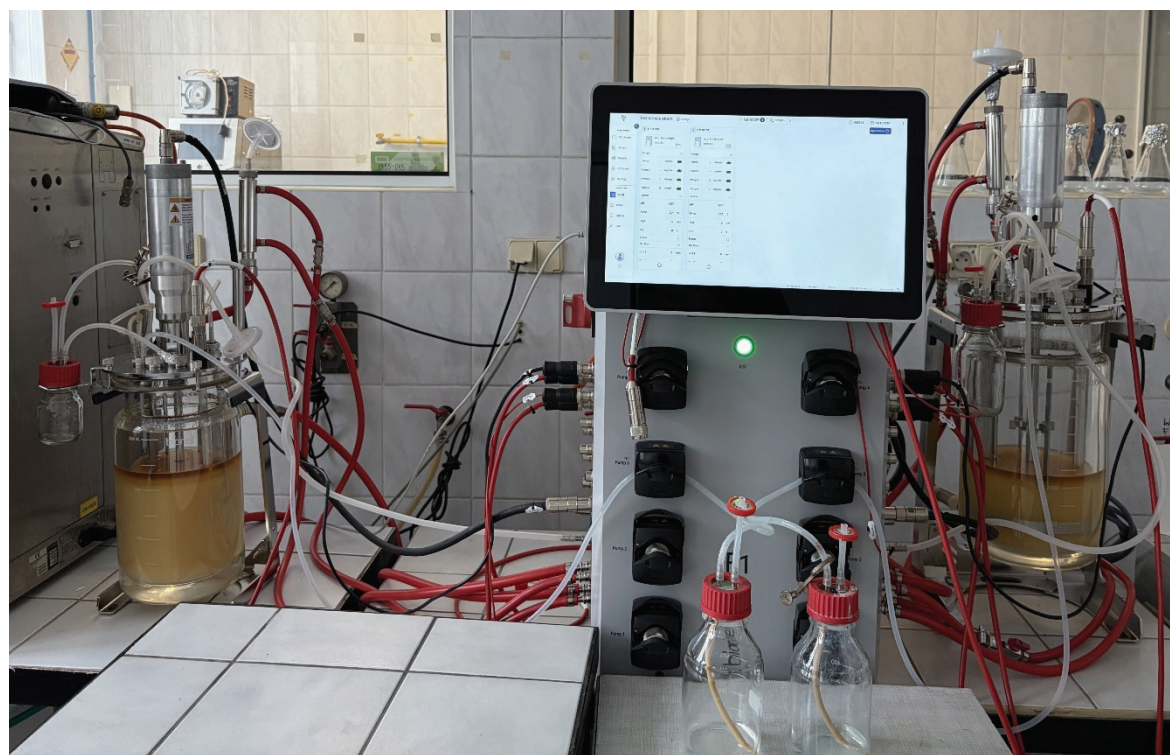
W obu przypadkach procedura wyprowadzania inokulum obejmowała namnażanie bakterii z hodowli przechowywanych w postaci zamrożonej zawiesiny z dodatkiem 20% glicerolu ($-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$), poprzez przeniesienie materiału biologicznego do bulionu MRS i inkubację przez 24 h w temperaturze $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Następnie prowadzono kolejny pasaż hodowli w podłożu MRS, stosując 10% (v/v) inokulum, również inkubowany przez 24 h w temperaturze $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, w celu uzyskania odpowiedniej ilości biomasy do zapoczątkowania właściwej hodowli produkcyjnej.

Podłoże do syntezy EPS stanowił bulion MRS, w którym źródło węgla modyfikowano w zależności od badanego szczepu. W przypadku *Weissella cibaria* KKP 2042 zastosowano sacharozę jako jedyne źródło węgla, natomiast dla *Leuconostoc lactis* KKP 4220 optymalne rezultaty uzyskano przy zastosowaniu mieszaniny glukozy i sacharozy w proporcji 1:1, w

łącznym stężeniu $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. pH podłoża ustalano i utrzymywano na poziomie 4,5, a sterylizację oraz regulację pH prowadzono bezpośrednio w bioreaktorze.

Hodowlę właściwą prowadzono w warunkach zoptymalizowanych indywidualnie dla każdego szczepu. Dla *Weissella cibaria* KKP 2042 najwyższą wydajność syntezy EPS uzyskano w temperaturze $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, przy udziale inokulum stanowiącego 15% (v/v) objętości pożywki. W przypadku *Leuconostoc lactis* KKP 4220 optymalna temperatura hodowli mieściła się w zakresie $30\text{--}37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, przy czym w tym przedziale nie obserwowano istotnych różnic w wydajności produkcji EPS; objętość inokulum wynosiła 10% (v/v). Czas trwania hodowli produkcyjnej dla obu szczepów wynosił 48 h.

Po zakończeniu hodowli biomasa komórkowa była oddzielana metodą wirowania, a egzopolisacharydy izolowano z supernatantu poprzez wytrącanie etanolem 96% w stosunku objętościowym 1:2.



Zdjęcie 3. Hodowle bakterii w bioreaktorze laboratoryjnym, optymalizacja parametrów hodowli w celu zwiększenia produkcji EPS

Schematyczne zestawienie opracowanych warunków operacyjnych dla *Weissella cibaria* KKP 2042 oraz *Leuconostoc lactis* KKP 4220 przedstawiono odpowiednio na **SOP A1** oraz

SOP A2 w załączniku A. Schematy oraz szczegółowe procedury SOP zamieszczono w części końcowej raportu.

Istotnym elementem oceny potencjału aplikacyjnego wyselekcjonowanych szczepów bakterii mlekowych była analiza ich zdolności do syntezy krótkołańcuchowych kwasów organicznych. Profil produkcji kwasów mlekowego, octowego, propionowego i masłowego oznaczono w supernatantach po hodowlach, a uzyskane wyniki przedstawiono w **tabeli 9**.

Tabela 9. Synteza kwasów organicznych przez bakterie mlekowe selekcjonowane pod względem zdolności do produkcji EPS.

Szczep	kwas mlekowy [mg·l ⁻¹]	kwas octowy [mg·l ⁻¹]	kwas propionowy [mg·l ⁻¹]	kwas masłowy [mg·l ⁻¹]
<i>Lpb. plantarum</i> KKP 593	9688 ± 206	1434 ± 34	265 ± 25	< 48,00
<i>W. cibaria</i> KKP 4218 Ł06	8040 ± 19	3025 ± 49	139 ± 2	1690 ± 30
<i>L. citreum</i> KKP 4214 Ł07	2467 ± 51	3550 ± 112	145 ± 5	517 ± 20
<i>P. acidilactici</i> KKP 3246	8181 ± 166	3375,7 ± 20,54	119 ± 9	< 48,00
<i>P. acidilactici</i> KKP 3180 J EIIF	2694 ± 30	3334 ± 187	138 ± 14	810 ± 35
<i>P. pentosaceus</i> KKP 1840	7614 ± 218	1544 ± 74	264 ± 21	< 48,00
<i>P. pentosaceus</i> KKP 3274	8814 ± 352	1678 ± 64	370 ± 70	< 48,00
<i>P. acidilactici</i> KKP 3180	6220 ± 13	2022 ± 43	299 ± 21	< 48,00
<i>P. pentosaceus</i> KKP 1850 (4)	6189 ± 14	2539 ± 55	246 ± 6	1617 ± 36
<i>P. acidilactici</i> KKP 4216 Gr 4E	8651 ± 88	2372 ± 65	231 ± 45	< 48,00
<i>W. cibaria</i> KKP 1850 (2)	5339 ± 87	2455 ± 34	213 ± 20	1568 ± 29
<i>W. cibaria</i> KKP 2064	6185 ± 637	2544 ± 25	227 ± 1	1594 ± 27
<i>Lcb. casei</i> KKP 2036	8821 ± 124	3090 ± 18	927 ± 13	1177 ± 6
<i>Lpb. plantarum</i> 750(10)	12447 ± 100	2818 ± 43	263 ± 23	< 48,00
<i>W. cibaria</i> KKP 2043	22847 ± 1096	10625 ± 663	915 ± 81	5036 ± 262
<i>W. cibaria</i> KKP 2042	7365 ± 11	2704 ± 43	214 ± 3	1158 ± 24
<i>P. pentosaceus</i> KKP 1808	8873 ± 76	1612 ± 37	205 ± 9	< 48,00

<i>P. acidilactici</i> KKP 2065	9238 ± 404	1524 ± 31	231 ± 23	< 48,00
<i>Leu. lactis</i> KKP 4220 L2	15460 ± 100	2356 ± 43	276 ± 28	< 48,00
<i>L. reuteri</i> KKP 1829	8442 ± 164	1032 ± 32	222 ± 24	< 48,00
<i>Lpb. plantarum</i> KKP 825	14382 ± 76	3026 ± 22	345 ± 17	< 48,00

Badane szczepy wykazywały zróżnicowaną zdolność do syntezy kwasów organicznych, zarówno pod względem ich profilu ilościowego, jak i jakościowego. We wszystkich przypadkach dominującym metabolitem był kwas mlekowy, którego stężenie mieściło się w zakresie od ok. 2,5 do ponad 22 g·l⁻¹. U części szczepów obserwowano również istotną produkcję kwasu octowego, natomiast synteza kwasów propionowego i masłowego miała charakter szczepozależny i występowała w znacznie niższych stężeniach lub pozostawała poniżej granicy oznaczalności metody.

Wysoką zdolność do syntezy kwasu mlekowego i octowego wykazywały m.in. szczepy *Weissella cibaria* oraz *Leuconostoc lactis*, które jednocześnie należały do najbardziej efektywnych producentów egzopolisacharydów. Obserwacje te potwierdzają potencjalną przydatność wyselekcjonowanych szczepów w aplikacjach biotechnologicznych i fermentacyjnych, gdzie istotne znaczenie ma jednoczesna produkcja EPS oraz metabolitów o działaniu konserwującym i funkcjonalnym.

3.3. Analizy genomowe i bezpieczeństwo szczepów (WGS, AMR, elementy mobilne)

3.3.1. Genetyczne podstawy syntezy egzopolisacharydów

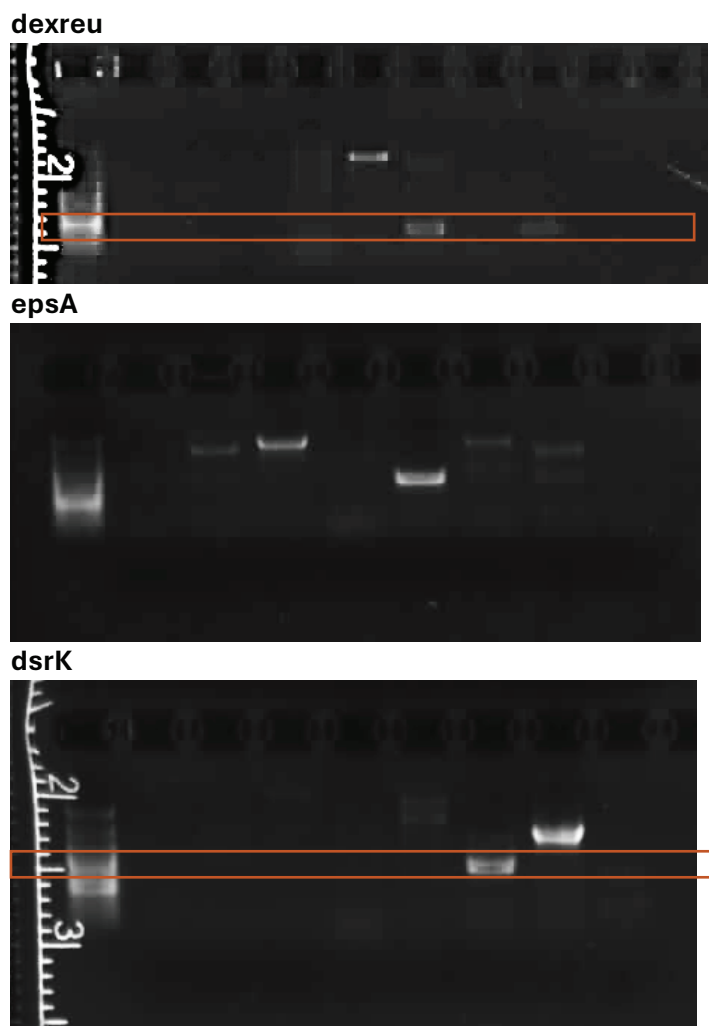
Badania genetycznych podstaw zdolności syntezy egzopolisacharydów przeprowadzono w odniesieniu do wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Do analiz włączono szczepy charakteryzujące się najwyższą wydajnością produkcji EPS (Ł06, Ł07, L2, G4E, KKP 2042, KKP 2065) oraz, w celach porównawczych, dwa szczepy wykazujące niską zdolność do syntezy EPS (KKP 1829, KKP 593).

Na podstawie danych literaturowych wytypowano osiem genów związanych z syntezą egzopolisacharydów, obejmujących zarówno homopolisacharydy (HoEPS), jak i heteropolisacharydy (HeEPS). Do detekcji każdego z wybranych genów zastosowano odpowiednie pary starterów PCR (Genomed). Szczegółowe informacje dotyczące roli poszczególnych genów, sekwencji starterów oraz przewidywanej długości produktów amplifikacji zestawiono w **Tabeli 10**.

Tabela 10. Identyfikacja obecności genów zaangażowanych w syntezę EPS przez wybrane szczepy bakterii mlekowych.

gen	primer	bp	Szczep bakterii mlekowych (LAB)							
			<i>W. cibaria</i> KKP 4218 Ł06	<i>L. citreum</i> KKP 4214 Ł07	<i>L. lactis</i> KKP 4220L2	<i>W. cibaria</i> KKP 4216G4E	<i>Lpb.planta</i> -rum KKP 593	<i>Lo.reuteri</i> KKP 1829	<i>W. cibaria</i> KKP 2042	<i>P.acidilact</i> i-ci KKP 2065
gtf	Dexreu	600						+		+
epsA	epsA	784					+			
epsB	epsB	1150								
epsD/E	epsDE	189								
gtf	Deg	660								
dsrK	dsrK	1950							+	
ftf	LevV	800								
p-gtf	GLr	276								
„-”, brak ampikonu o oczekiwanej wielkości „+” obecność ampikonu o przewidywanej wielkości Deg - brak , epsB - brak wyniku, LevV - brak , GLr – wyniku, epsDE - brak										

Produkty amplifikacji analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Reprezentatywne wyniki reakcji PCR, ilustrujące obecność lub brak ampikonów o oczekiwanej długości dla poszczególnych genów zaangażowanych w syntezę EPS, przedstawiono na **Zdjęciu 4**.



Zdjęcie 4. Wizualizacja wyników reakcji PCR genów związanych z syntezą EPS.

W badaniu obecności genów związanych z syntezą egzopolisacharydów pozytywne wyniki amplifikacji uzyskano dla 4 spośród analizowanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Obecność genu *gtf*, kodującego enzymy zaangażowane w syntezę homopolisacharydów, zidentyfikowano w przypadku dwóch szczepów.

Ograniczona liczba pozytywnych wyników reakcji PCR może wynikać ze znacznego zróżnicowania gatunkowego badanych szczepów, a także ze złożoności mechanizmów genetycznych odpowiedzialnych za syntezę EPS oraz dużej różnorodności strukturalnej egzopolisacharydów wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej. Geny związane z biosyntezą EPS często występują w postaci rozbudowanych klastrów genowych, charakteryzujących się zmienną organizacją oraz niskim stopniem konserwatywności sekwencji, co może ograniczać skuteczność detekcji metodą PCR z użyciem starterów zaprojektowanych na podstawie danych literaturowych.

Potwierdzeniem złożonych podstaw genetycznych syntezy egzopolisacharydów przez wybrane szczepy bakterii mlekowych są wyniki analizy całogenomowej (WGS), które wykazały obecność licznych genów potencjalnie zaangażowanych w biosyntezę, modyfikację oraz transport EPS. Przykładowo, w genomie szczepu *Lactiplantibacillus plantarum* KKP 593 zidentyfikowano 10 genów związanych z syntezą egzopolisacharydów, natomiast w przypadku *Pediococcus acidilactici* KKP 2065 wykryto 9 takich sekwencji. Największą liczbę genów związanych z syntezą EPS stwierdzono w genomie szczepu *Weissella cibaria* KKP 4214, gdzie zidentyfikowano łącznie 15 genów potencjalnie uczestniczących w tym procesie.

Szczegółowe wyniki analizy genomowej szczepów bakterii mlekowych pod kątem obecności genów związanych z syntezą egzopolisacharydów zestawiono w **Załączniku B (Tabela B1)**.

3.3.2. Fenotypowa i genomowa ocena antybiotykooporności szczepów o potencjale przemysłowym

Badanie antybiotykooporności, rozumianej jako wrażliwość na środki przeciwdrobnoustrojowe, ma kluczowe znaczenie w kontekście potencjalnego zastosowania bakterii fermentacji mlekowej w przemyśle spożywczym oraz rolnictwie, w szczególności jako dodatków paszowych (probiotyki) lub inokulantów do kiszenia. Zgodnie z wytycznymi EFSA, mikroorganizmy celowo wprowadzane do łańcucha pokarmowego nie powinny przyczyniać się do zwiększania puli genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) ani sprzyjać ich rozprzestrzenianiu w populacji bakterii jelitowych ludzi i zwierząt. W analizach uwzględniono środki przeciwdrobnoustrojowe uznawane za krytycznie ważne (CIA) lub wysoce ważne (HIA) dla medycyny ludzkiej i weterynaryjnej, zgodnie z klasyfikacją WHO (ostatnia rewizja, 2016).

Oporność badanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej określono metodą mikrorozcieńczeń w bulionie, umożliwiającą wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC, *minimum inhibitory concentration*), definiowanego jako najniższe stężenie antybiotyku powodujące widoczne zahamowanie wzrostu bakterii.

Wyniki fenotypowej oceny antybiotykooporności wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przedstawiono w **Tabeli 11**.

Tabela 11. Fenotypowa antybiotykooporność wybranych szczepów LAB (wartości MIC).

Szczep bakterii symbol	Antybiotyk wartości MIC mg/l , szczepy badane, wartości cut-off EFSA							
	Ampicylina AM	Clindamycyna CL	Chloramfenikol CM	Erytromycyna EM	Gentamycyna GM	Kanamycyna KM	Streptomycyna SM	Tetracyklina TC
<i>Lpb.plantarum</i> KKP 825	0,5	0,25	8	1	32	32	32	32
<i>Lpb.plantarum</i> KKP 593		<0,016		0,125	0,5	16	8	16
<i>P. acidilactici</i> KKP 2065	2	<0,016	8	1	4	128	64	32
<i>Lo.reuteri</i> KKP1829	0,25	<0,016	2	0,031	<0,125	4	2	2
<i>Len.buchneri</i> KKP 907	1	<0,016	4	<0,016	<0,125	2	0,5	32
<i>Lpb.plantarum</i> KKP 788	0,5	<0,016	8	0,125	0,5	16	4	16
<i>W.cibaria</i> KKP 2042	1	8	0,125	0,125	2	128	16	32
<i>W.cibaria</i> KKP 4218	4	8	0,125	0,125	8	128	64	64
<i>Leu. citreum</i> KKP 4214	8	4	1	0,25	16	256	128	32
<i>Leu.lactis</i> KKP 4220	8	8	0,125	0,125	8	128	64	64
<i>P. acidilactici</i> KKP 4216	8	8	0,031	0,25	32	>256	128	32
<i>E.coli</i> ATCC 8739	>8	>8	>32	>8	4	32	16	2

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w badanej grupie szczepów oporność fenotypowa dotyczyła przede wszystkim kanamycyny oraz tetracykliny i była obserwowana u sześciu szczepów. Oporność na klindamycynę oraz ampicylinę występowała odpowiednio u

czterech–pięciu szczepów bakterii. Obniżoną wrażliwość na wybrane antybiotyki najczęściej obserwowano wśród szczepów należących do gatunku *Weissella cibaria* oraz przedstawicieli rodzaju *Leuconostoc*, w tym *Leuconostoc lactis* i *Leuconostoc citreum*. Oporność na niektóre środki przeciwdrobnoustrojowe stwierdzono również u szczepów *Pediococcus acidilactici* (KKP 2065 oraz KKP 4216).

Zgodnie z wytycznymi EFSA, oporność wrodzona (wewnętrzna), charakterystyczna dla danego gatunku bakterii, nie jest uznawana za zagrożenie bezpieczeństwa. Natomiast wykrycie oporności u szczepów należących do gatunków typowo wrażliwych jest interpretowane jako oporność nabyta i wymaga dalszej, pogłębionej analizy, w szczególności w zakresie obecności genów AMR o potencjale mobilnym.

W związku z tym, dla wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej przeprowadzono analizę genomową w oparciu o dane z sekwencjonowania całogenomowego (WGS), ukierunkowaną na identyfikację genów związanych z antybiotykoopornością. Wyniki tej analizy przedstawiono w **Tabeli 12**.

Tabela 12. Obecność genów związanych z antybiotykoopornością w genomie przykładowych szczepów bakterii mlekowych.

Produkt, oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe	Szczepy bakterii fermentacji mlekowej						
	<i>Lpb.plantarum</i> KKP 593	<i>L. citreum</i> KKP 4214	<i>W.cibaria</i> KKP 2042	<i>Lo.reuteri</i> KKP 1829	<i>P.acidilactici</i> KKP 2065	<i>Lpb. plantarum</i> KKP 788	<i>Len. buchneri</i> KKP 907
putative multidrug resistance protein NorM			+				
Multidrug resistance efflux transporter family protein			+				
Multidrug resistance protein YkkC			+				
Multidrug resistance protein YkkD			+				
Multidrug resistance protein D			+				
Drug resistance MFS transporter, drug:H ⁺ antiporter-2 family					+		+
Putative azaleucine resistance protein AzlC		+			+		+
Glyoxalase/bleomycin resistance				+			

protein/dioxygenase							
Cation transporter, small multidrug resistance (SMR) family	+					+	
Drug resistance transport protein, major facilitator superfamily (MFS), EmrB/QacA subfamily	+					+	
Glycopeptide antibiotics resistance protein	+					+	
Small multidrug resistance protein	+					+	
Multidrug resistance protein, SMR family							+

Analiza genomowa wykazała obecność sekwencji genów związanych z opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe we wszystkich badanych szczepach. Profil genów AMR różnił się pomiędzy gatunkami oraz szczepami. Przykładowo, u szczepów *Lactiplantibacillus plantarum* (KKP 593 i KKP 788) zidentyfikowano cztery geny związane z opornością, natomiast w genomie *Weissella cibaria* KKP 2042 wykryto pięć takich sekwencji. W pozostałych analizowanych szczepach liczba genów AMR była zbliżona, co sugeruje obecność głównie mechanizmów oporności o charakterze wewnętrznym, typowych dla danych gatunków bakterii fermentacji mlekowej.

3.3.3. Antybiotykooporność szczepów środowiskowych bakterii fermentacji mlekowej

Antybiotykooporność oceniano u szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych ze środowiska hodowlanego zwierząt gospodarskich. Analizowane izolaty pochodziły z mikrobioty jelitowej zwierząt utrzymywanych w warunkach produkcyjnych i reprezentowały grupę bakterii środowiskowych potencjalnie uczestniczących w obiegu genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w ekosystemie rolniczym.

Fenotypową wrażliwość szczepów na antybiotyki określono na podstawie wyznaczenia minimalnych stężeń hamujących (MIC) dla dziewięciu środków przeciwdrobnoustrojowych, obejmujących antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy, makrolidy, linkozamidy, fenikole, tetracykliny oraz glikopeptydy, zgodnie ze standardową procedurą operacyjną dla bakterii fermentacji mlekowej (SOP-AMR-LAB). Interpretację wyników przeprowadzono w odniesieniu do obowiązujących wytycznych EFSA dla bakterii fermentacji mlekowej.

Uzyskane dane wykazały znaczne zróżnicowanie profili oporności pomiędzy analizowanymi szczepami, przy czym każdy z badanych izolatów wykazywał fenotypową oporność na co najmniej jedną klasę antybiotyków.

Tabela 13. Fenotypowa antybiotykooporność wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w odniesieniu do wartości granicznych EFSA (MIC)

Szczepy	AM	GM	KM	SM	EM	CM	TC	CL	VAN
<i>L. reuteri</i> KKP 4201 EFSA standards	>256 2	12 8	>256 64	>1024 64	>256 1	>256 4	>256 32	>48 4	>256 n.r.
<i>L. petauri</i> KKP 4205 EFSA standards ¹	0.25 1	24 4	>256 16	>1024 8	0.25 1	2 4	0.5 2	2 4	1.5 4
<i>L. oris</i> KKP 4206 EFSA standards ²	0.5 4	8 16	>256 64	48 64	1 1	0.64 4	16 8	3 4	>256 n.r
<i>L. agilis</i> KKP 4207 EFSA standards ³	0.125 2	>256 16	>256 16	>1024 16	0.38 1	1.5 4	1 4	1.5 4	>256 2

Skróty zastosowane w tabeli oznaczają odpowiednio: AM – ampicylinę, GM – gentamycynę, KM – kanamycynę, SM – streptomycynę, EM – erytromycynę, CM – klindamycynę, TC – tetracyklinę, CL – chloramfenikol oraz VAN – wankomycynę. Oznaczenie „1” odnosi się do wartości granicznych ustalonych dla innych bakterii Gram-dodatnich, „2” dotyczy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* fakultatywnie heterofermentatywnych, natomiast „3” odnosi się do bakterii z rodzaju *Lactobacillus* obligatoryjnie homofermentatywnych.

Tabela 14. Identyfikacja genów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR) w genomach wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej na podstawie analizy WGS (AMRFinder i CARD)

Szczep	Gen	Lokalizacja genu	Liczba kopii	Klasa	AMR Finder	CARD
<i>L. reuteri</i> KKP 4201	<i>van(T)</i> (gene in <i>vanG</i> cluster) <i>erm(B)</i>	chromosom plazmid 1	1 2	glycopeptide antibiotic macrolide antibiotic; lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic; streptogramin A antibiotic; streptogramin B antibiotic	– +	+ +
	<i>cat(A)</i>	plazmid 1	2	phenicol antibiotic	+	+
	<i>tet(W)</i>	plazmid 2	1	tetracycline antibiotic	+	+

<i>L. petauri</i> KKP 4205	<i>lsa(D)</i>	chromosom	1	lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic; streptogramin A antibiotic; pleuromutilin antibiotic	+	+
	<i>van(T)</i> (gene in <i>vanG</i> cluster)	chromosom	1	glycopeptide antibiotic	–	+
	<i>van(Y)</i> (gene in <i>vanB</i> cluster)	chromosom	1	glycopeptide antibiotic	–	+
	<i>arr</i>	chromosom	1	rifamycin	+	–
<i>L. oris</i> KKP 4206	<i>van(T)</i> (gene in <i>vanG</i> cluster)	chromosom	1	glycopeptide antibiotic	–	+
<i>L. agilis</i> KKP 4207	<i>van(T)</i> (gene in <i>vanG</i> cluster)	chromosom	1	glycopeptide antibiotic	–	+
	<i>qac(G)</i>	chromosom	1	QAC(benzalkonium chloride)	–	+

Najczęściej obserwowaną cechą była oporność na aminoglikozydy. Wszystkie analizowane szczepy wykazywały oporność na kanamycynę, a większość również na gentamycynę i streptomycynę. Zjawisko to miało charakter powszechny, jednak w analizie genomowej nie stwierdzono obecności znanych genów kodujących enzymatyczne mechanizmy oporności na aminoglikozydy. Sugeruje to, że obserwowana oporność ma w przeważającej mierze charakter wrodzony i wynika z fizjologicznych cech bakterii fermentacji mlekowej, takich jak ograniczona przepuszczalność błony komórkowej czy brak wydajnych systemów transportu tych antybiotyków do wnętrza komórki.

Oporność na antybiotyki β -laktamowe była zjawiskiem rzadszym i została stwierdzona jedynie u pojedynczego szczepu, pomimo braku identyfikacji genów oporności typowych dla tej grupy leków. Podobne rozbieżności pomiędzy profilem fenotypowym a genotypowym

opisywane są w literaturze i wskazują na istnienie alternatywnych, dotychczas słabo poznanych mechanizmów oporności u bakterii fermentacji mlekowej.

W przypadku antybiotyków z grupy makrolidów, linkozamidów, tetracyklin oraz chloramfenikolu oporność fenotypowa miała charakter szczepozależny. Szczególnie istotnym wynikiem było wykrycie szczepu wykazującego fenotyp wielolekooporny (MDR), opornego na wszystkie testowane antybiotyki. Analiza genomowa tego izolatu ujawniła obecność kilku genów oporności, w tym *erm(B)*, *cat(A)* oraz *tet(W)*, zlokalizowanych na plazmidach. Lokalizacja tych genów na elementach mobilnych wskazuje na realne ryzyko ich horyzontalnego transferu do innych bakterii obecnych w środowisku jelitowym oraz w ekosystemie rolniczym.

Analiza WGS wykazała ponadto obecność genów związanych z opornością na glikopeptydy, w szczególności genu *van(T)*, we wszystkich badanych szczepach. Obecność tych sekwencji miała jednak charakter chromosomalny i odpowiadała znanej, wrodzonej oporności bakterii fermentacji mlekowej na wankomycynę, która nie jest uznawana za zagrożenie bezpieczeństwa biologicznego. Wyjątkiem był jeden szczep wrażliwy na wankomycynę, co wskazuje na możliwe różnice w mechanizmach syntezy peptydoglikanu u poszczególnych gatunków.

Podsumowując, wyniki badań szczepów środowiskowych bakterii fermentacji mlekowej wykazały istotne rozbieżności pomiędzy profilem fenotypowym i genotypowym antybiotykooporności. Chociaż większość obserwowanych cech oporności miała charakter wrodzony, identyfikacja genów AMR zlokalizowanych na plazmidach w pojedynczych szczepach potwierdza, że bakterie fermentacji mlekowej obecne w środowisku hodowlanym mogą stanowić rezerwuuar genów oporności o potencjale transferowym. Zjawisko to ma istotne znaczenie w kontekście bezpieczeństwa mikrobiologicznego oraz oceny ryzyka rozprzestrzeniania się antybiotykooporności w łańcuchu żywnościowym.

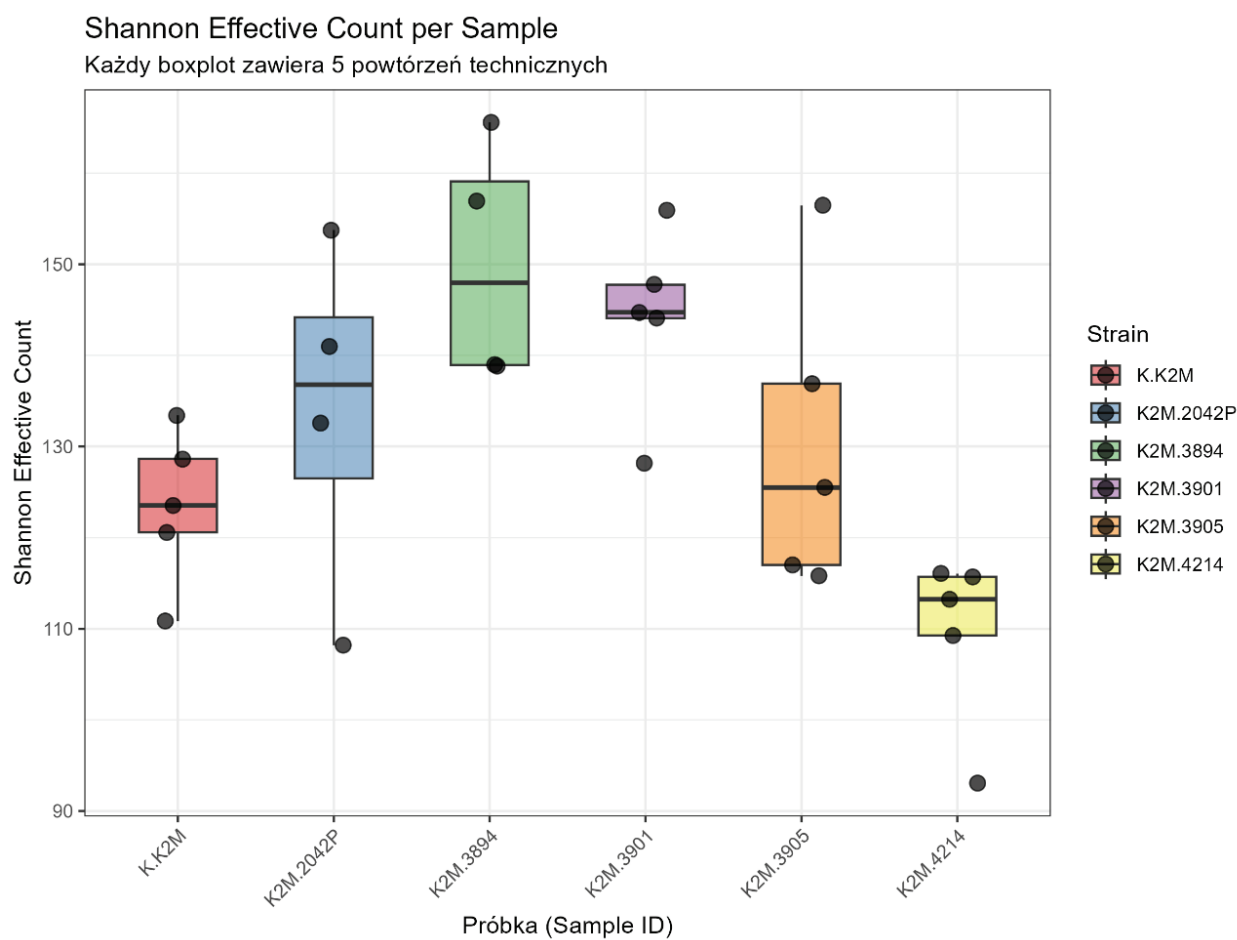
3.4. Analiza metagenomiczna interakcji mikroorganizmów

Inokulacja gleby wybranymi szczepami bakteryjnymi prowadziła do istotnych zmian w α -różnorodności mikrobiomu glebowego w porównaniu z próbami kontrolnymi (K-K2M i K-KC1). Analiza α -różnorodności, wyrażonej jako efektywna liczba Shannona (Shannon effective count), wykazała istotne zróżnicowanie struktury mikrobiomu pomiędzy badanymi wariantami doświadczalnymi. Próba kontrolna K-K2M, reprezentująca glebę bez inokulacji

szczepami bakteryjnymi, charakteryzowała się umiarkowanymi i relatywnie stabilnymi wartościami wskaźnika Shannon effective count, co wskazuje na wyrównaną różnorodność mikrobiologiczną typową dla naturalnej mikroflory gleby w warunkach braku ingerencji biologicznej.

W porównaniu do kontroli, istotny wzrost α -różnorodności zaobserwowano w próbkach inokulowanych szczepami *Bacillus subtilis* KKP 3894 oraz *Bacillus subtilis* KKP 3901, które osiągały najwyższe mediany wartości Shannon effective count. Wynik ten wskazuje, że inokulacja tymi szczepami sprzyjała zwiększeniu liczby współwystępujących taksonów oraz/lub poprawie wyrównania ich udziałów w społeczności mikrobiologicznej gleby. Próbką inokulowaną szczepem *Bacillus subtilis* KKP 3905 wykazywała wartości α -różnorodności zbliżone do kontroli lub umiarkowanie wyższe, przy jednocześnie większej zmienności pomiędzy powtórzeniami technicznymi, co może świadczyć o słabszym lub mniej stabilnym oddziaływaniu tego szczepu na społeczność mikroorganizmów glebowych.

Z kolei inokulacja bakteriami fermentacji mlekowej, *Leuconostoc citreum* KKP 4214 oraz *Weissella* sp. KKP 2042p, prowadziła do obniżenia wartości Shannon effective count w porównaniu do kontroli, co wskazuje na zmniejszenie wyrównania struktury mikrobiomu glebowego w tych wariantach. Istotność statystyczna różnic pomiędzy badanymi wariantami została potwierdzona testem Kruskala–Wallisa ($\chi^2 = 15,391$; $df = 5$; $p = 0,0088$), co wskazuje na istotne zróżnicowanie α -różnorodności mikrobiologicznej pomiędzy analizowanymi wariantami doświadczalnymi. Analiza post hoc testem Dunna wykazała istotne różnice pomiędzy wariantem inokulowanym szczepem *Bacillus subtilis* KKP 3894 (K2M-3894) a wariantem z *Leuconostoc citreum* KKP 4214 ($p = 0,01$) oraz pomiędzy *B. subtilis* KKP 3901 (K2M-3901) a *L. citreum* KKP 4214 ($p = 0,013$) (**Rysunek 3**).

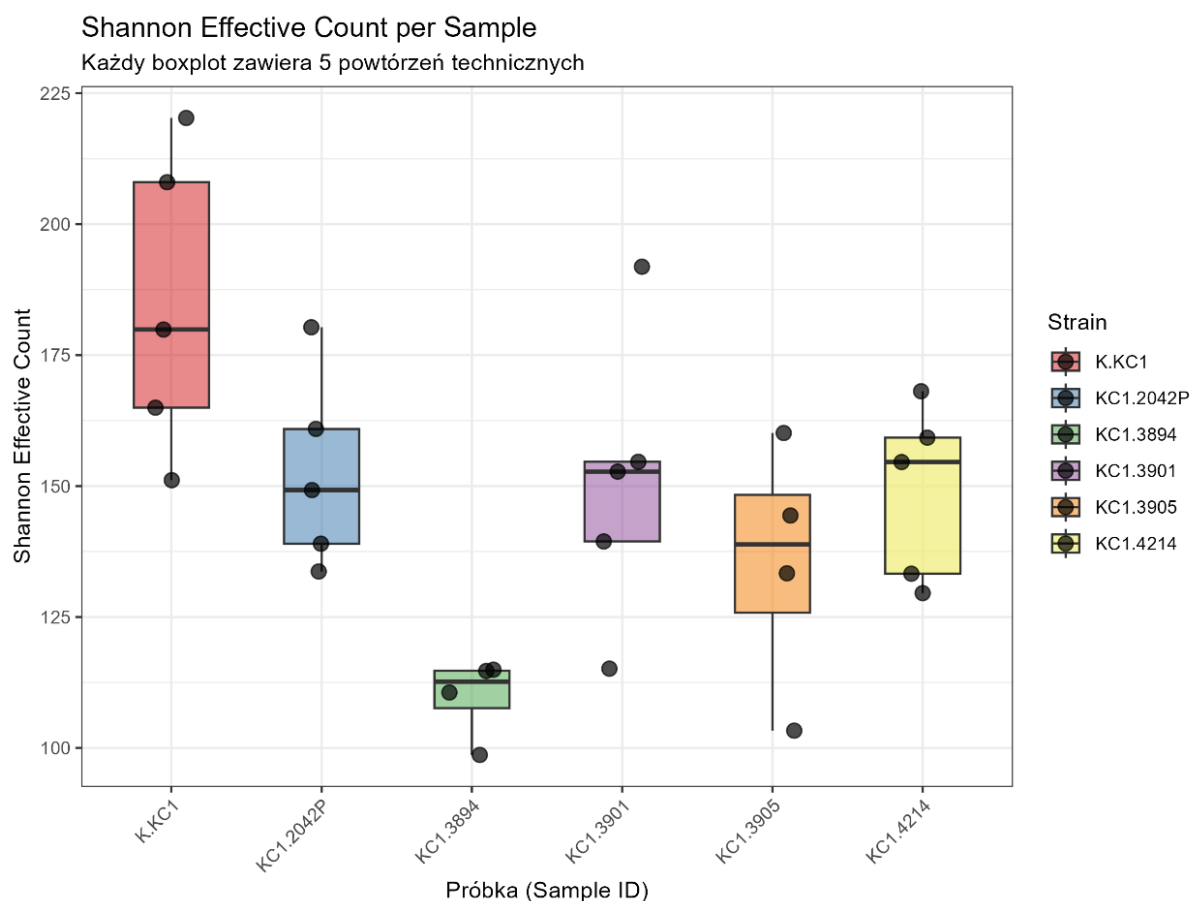


Rysunek 3. α -różnorodność mikrobiomu gleby K2M wyrażona jako efektywna liczba Shannona po 4 tygodniach inokulacji wybranymi szczepami bakterii w porównaniu z glebą kontrolną (K.K2M). Każdy boxplot przedstawia medianę, kwartyle oraz zakres zmienności, z zaznaczonymi pięcioma powtórzeniami technicznymi ($n = 5$).

Analiza alfa-różnorodności wykazała wyraźne zróżnicowanie pomiędzy glebą kontrolną K-KC1 a glebą poddaną inokulacji wybranymi szczepami mikroorganizmów. Próba kontrolna charakteryzowała się najwyższymi wartościami wskaźnika Shannon effective count spośród wszystkich analizowanych wariantów, co wskazuje na wysoką i dobrze wyrównaną różnorodność mikrobiologiczną naturalnej mikroflory gleby w warunkach braku ingerencji biologicznej. W porównaniu do kontroli, inokulacja większością badanych szczepów prowadziła do obniżenia α -różnorodności, co wskazuje, że wprowadzenie mikroorganizmów modyfikowało strukturę lokalnej społeczności mikrobiologicznej.

Największy spadek alfa-różnorodności odnotowano w próbkach inokulowanych szczepem *Bacillus subtilis* KKP 3894 (KC1-3894), które wykazywały najniższe, a jednocześnie stabilne wartości wskaźnika. Wynik ten wskazuje na wyraźny wpływ inokulacji tym szczepem na strukturę mikrobiomu gleby, przejawiający się ograniczeniem liczby współwystępujących taksonów lub zmianą ich wyrównania w obrębie społeczności mikrobiologicznej. Próbkę inokulowaną szczepami *Weissella* sp. KKP 2042p (KC1-2042P), *Bacillus subtilis* KKP 3901 (KC1-3901) oraz *Bacillus subtilis* KKP 3905 (KC1-3905) charakteryzowały się umiarkowanymi wartościami α -różnorodności, niższymi niż w kontroli, lecz wyższymi niż w wariancie KC1-3894. Wariant inokulowany szczepem *Leuconostoc citreum* KKP 4214 (KC1-4214) wykazywał wartości wskaźnika zbliżone do części próbek inokulowanych szczepami *Bacillus*, jednak nadal niższe niż w próbie kontrolnej, co wskazuje na umiarkowany wpływ tego szczepu na różnorodność mikrobiologiczną gleby bez całkowitego zaburzenia jej struktury.

Istotność statystyczna obserwowanych różnic pomiędzy wariantami została potwierdzona testem Kruskala–Wallisa ($\chi^2 = 14,108$; $df = 5$; $p = 0,01494$). Analiza post hoc testem Dunna wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy glebą kontrolną (K-KC1) a wariantem inokulowanym szczepem *Bacillus subtilis* KKP 3894 (KC1-3894; $p = 0,0045$) (**Rysunek 4**).



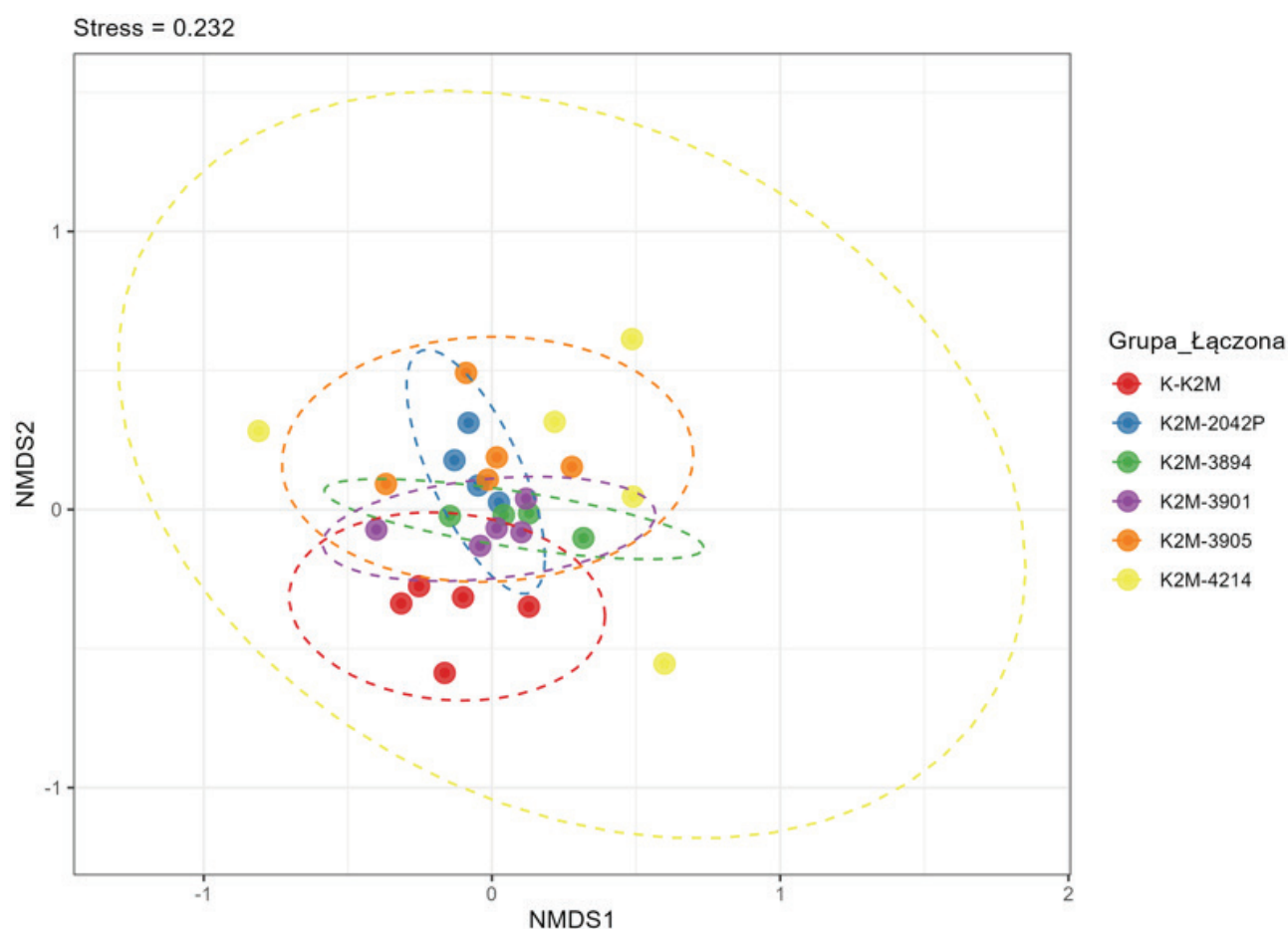
Rysunek 4. α -różnorodność mikrobiomu gleby KC1 wyrażona jako efektywna liczba Shannona po 4 tygodniach inokulacji wybranymi szczepami bakterii w porównaniu z glebą kontrolną (K.KC1). Każdy boxplot przedstawia medianę, kwartyle oraz zakres zmienności, z zaznaczonymi pięcioma powtórzeniami technicznymi ($n = 5$).

Analiza β -różnorodności przedstawiona na wykresie NMDS, oparta na macierzy dystansów Bray–Curtis, wskazuje na zróżnicowanie struktury mikrobiomu gleby pomiędzy próbą kontrolną (K-K2M) a glebami inokulowanymi badanymi szczepami. Próbkę kontrolną tworzyły względnie zwarty klaster, co wskazuje na stabilną i jednorodną strukturę naturalnej społeczności bakteryjnej gleby. Próbkę inokulowaną poszczególnymi szczepami wykazywały częściowe przesunięcie względem kontroli, przy czym stopień separacji zależał od zastosowanego mikroorganizmu.

Szczepy *Bacillus subtilis* KKP 3894 (K2M-3894) oraz *Bacillus subtilis* KKP 3901 (K2M-3901) lokalizowały się najbliżej klastra kontrolnego i częściowo się z nim nakładały, co wskazuje, że ich inokulacja prowadziła do relatywnie niewielkich zmian w składzie mikrobiomu, bez wyraźnej reorganizacji struktury społeczności bakteryjnej. Z kolei próbki

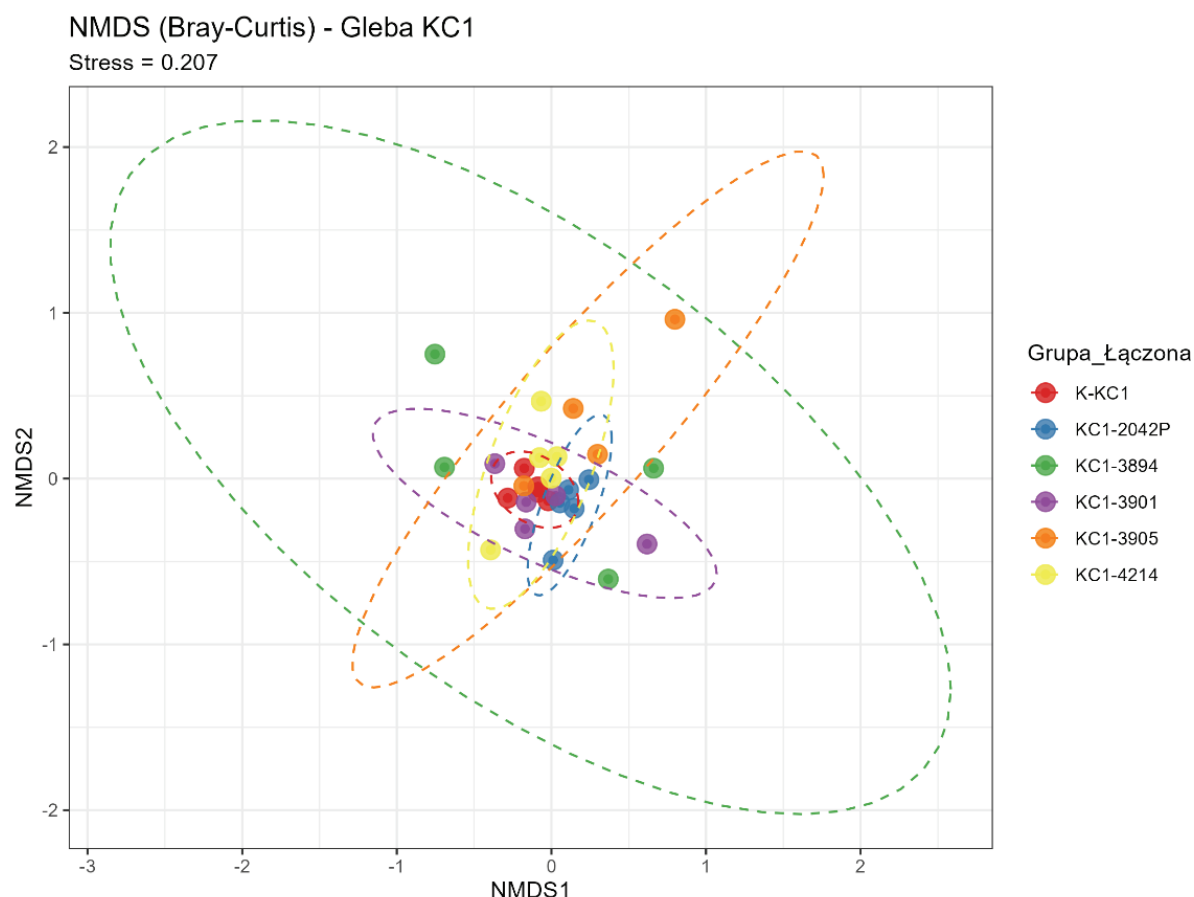
inokulowane szczepami *Weissella* sp. KKP 2042p (K2M-2042P) oraz *Bacillus subtilis* KKP 3905 (K2M-3905) tworzyły klastry bardziej oddalone od kontroli, co wskazuje na silniejszą modulację składu mikrobiomu gleby w tych wariantach.

Wariant inokulowany szczepem *Leuconostoc citreum* KKP 4214 (K2M-4214) wykazywał wyraźniejsze przesunięcie względem próby kontrolnej w przestrzeni NMDS. Obserwowane zmiany, w połączeniu z wynikami analizy α -różnorodności, wskazują na selektywną modyfikację struktury mikrobiomu gleby w tym wariantcie, bez jednoznacznych przesłanek do stwierdzenia całkowitej przebudowy społeczności bakteryjnej (**Rysunek 5**).



Rysunek 5. Analiza β -różnorodności mikrobiomu gleby K2M przedstawiona jako ordynacja NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) oparta na macierzy dystansów Bray–Curtis. Wykres ilustruje różnice w strukturze społeczności mikrobiologicznej pomiędzy glebą kontrolną (K.K2M) a próbkami inokulowanymi wybranymi szczepami bakteryjnymi po 4 tygodniach inkubacji. Elipsy oznaczają 95% przedziały ufności dla poszczególnych wariantów. Istotność różnic potwierdzono testem PERMANOVA ($R^2 = 0.235$; $p = 0.001$); wartość stresu NMDS = 0.232.

Analiza β -różnorodności oparta na macierzy dystansów Bray–Curtis wykazała **zróżnicowanie** struktury mikrobiomu gleby pomiędzy próbką kontrolną (K-KC1) a glebami inokulowanymi wybranymi szczepami z grupy KC1 (**Rysunek 6**).



Rysunek 6. Analiza β -różnorodności mikrobiomu gleby KC1 przedstawiona jako ordynacja NMDS (Non-metric Multidimensional Scaling) oparta na macierzy dystansów Bray–Curtis. Wykres ilustruje różnice w strukturze społeczności mikrobiologicznej pomiędzy glebą kontrolną (K.KC1) a próbkami inokulowanymi wybranymi szczepami bakteryjnymi po 4 tygodniach inkubacji. Elipsy oznaczają 95% przedziały ufności dla poszczególnych wariantów. Istotność różnic potwierdzono testem PERMANOVA ($R^2 = 0.259$; $p = 0.001$); wartość stresu NMDS = 0.207.

Analiza β -różnorodności wykazała, że w zależności od zastosowanego szczepu próbki inokulowane tworzyły kilka odrębnych klastrów, co wskazuje na zróżnicowany wpływ inokulacji na strukturę mikrobiomu glebowego. Próbkę inokulowaną szczepami KC1-3894 oraz KC1-3901 grupowały się najbliżej próby kontrolnej, wykazując częściowe nakładanie się lub bezpośrednie sąsiedztwo z kontrolą. Wskazuje to, że szczepy te wywoływały relatywnie

łagodne zmiany w składzie społeczności bakteryjnej, prowadząc do modulacji mikrobiomu bez istotnej reorganizacji jego ogólnej struktury.

Z kolei próbki inokulowane szczepami KC1-2042P, KC1-3905 oraz KC1-4214 tworzyły klastry bardziej oddalone od kontroli, częściowo nakładające się na siebie, co wskazuje na wyraźniejszą modulację składu mikrobiomu w tych wariantach. Obserwowane podobieństwo pomiędzy tymi wariantami może wskazywać na zbliżony charakter oddziaływania inokulowanych mikroorganizmów na strukturę mikrobiomu gleby.

Analiza profilu taksonomicznego mikrobiomu gleby wykazała, że zarówno w próbach kontrolnych, jak i w wariantach inokulowanych dominowały grupy bakterii typowe dla środowisk glebowych. W obu typach gleby (K2M oraz KC1) struktura mikrobioty była zdominowana przez przedstawicieli głównych klas bakterii glebowych, w tym *Pseudomonadota* (*Alphaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria*) oraz *Acidobacteriota*, co wskazuje na zachowanie charakterystycznego dla gleby profilu mikrobiologicznego.

Inokulacja wybranymi szczepami nie prowadziła do pojawienia się nowych, nietypowych dominujących taksonów, a obserwowane zmiany dotyczyły przede wszystkim przesunięć względnej obfitości już obecnych grup bakteryjnych. Charakter i zakres tych zmian był zależny od zastosowanego szczepu oraz typu gleby i nie wskazywał na wyraźną przebudowę ogólnej struktury społeczności mikroorganizmów glebowych.

Szczegółowe zestawienie względnej obfitości wybranych klas mikroorganizmów glebowych (%) w próbach gleby K2M i KC1 przed oraz po inokulacji wybranymi szczepami bakteryjnymi przedstawiono w Załączniku C.

3.5. Analiza genomowa wybranych bakterii glebowych

Analiza sekwencji całogenomowych (WGS) objęła dwa szczepy bakterii glebowych: *Comamonas testosteroni* KKP 1144 oraz *Sphingomonas* sp. KKP 4232, wybrane jako reprezentatywne mikroorganizmy ryzosferowe istotne z punktu widzenia funkcjonowania mikrobiomu gleby. Sekwencjonowanie i adnotacja genomów umożliwiły kompleksową ocenę ich cech strukturalnych, potencjału funkcjonalnego oraz elementów istotnych z punktu widzenia bezpieczeństwa biologicznego. Szczegółowe zestawienie parametrów genomowych, w tym cech adnotacji, elementów mobilnych oraz genów oporności, przedstawiono w Załączniku D (Tabela D1).

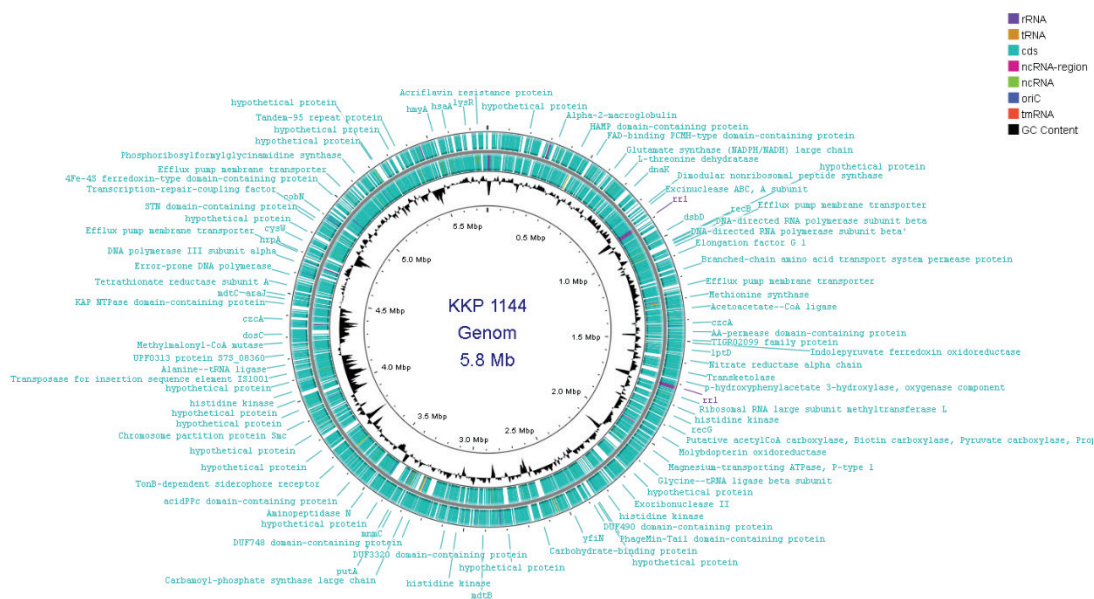
Oba genomy charakteryzowały się wielkością i zawartością GC typową dla bakterii glebowych o szerokich możliwościach metabolicznych. Genom *C. testosteroni* KKP 1144 miał długość 5,78 Mb i zawartość GC na poziomie 61,76%, natomiast genom *Sphingomonas* sp. KKP 4232 był mniejszy (3,59 Mb) i cechował się wyższą zawartością GC (67,34%). Różnice te odzwierciedlają odmienne strategie adaptacyjne obu gatunków, przy czym większy genom *C. testosteroni* wskazuje na szerszy repertuar genów związanych z metabolizmem i adaptacją środowiskową.

Adnotacja genomowa wykazała obecność 5329 cech genetycznych w genomie *C. testosteroni* KKP 1144 oraz 3380 cech w genomie *Sphingomonas* sp. KKP 4232, z dominującym udziałem sekwencji kodujących (CDS). W obu genomach zidentyfikowano kompletne zestawy genów tRNA i rRNA, co potwierdza wysoką jakość złożeń oraz potencjał do aktywnego wzrostu i funkcjonowania w środowisku glebowym. Nie wykazano obecności sekwencji CRISPR ani luk w złożeniach genomowych.

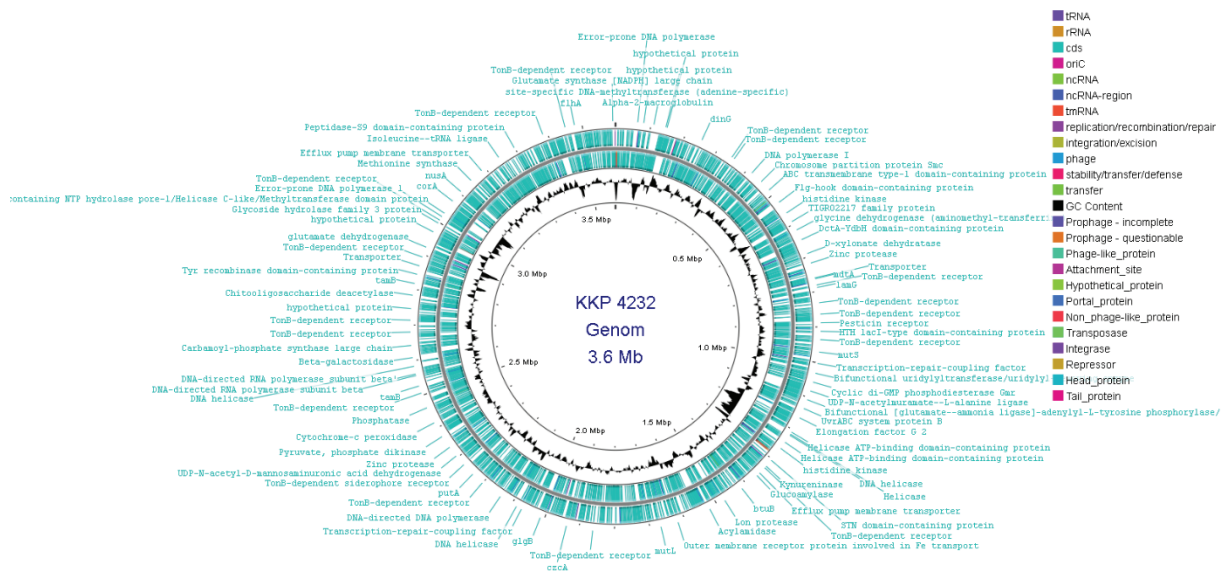
Analiza genów oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe wykazała ograniczoną liczbę determinant oporności, zlokalizowanych wyłącznie w chromosomach. W genomie *C. testosteroni* KKP 1144 zidentyfikowano cztery geny związane z opornością (w tym *adeF*, *fosA8* oraz *qacJ*), natomiast w genomie *Sphingomonas* sp. KKP 4232 wykryto dwa geny, w tym *adeF* oraz gen *vanY* należący do klastra *vanB*. Nie stwierdzono obecności genów oporności zlokalizowanych na plazmidach, co istotnie ogranicza ryzyko ich poziomego transferu w środowisku.

Oba genomy zawierały elementy mobilne, w tym geny związane z integracją, rekombinacją oraz transferem DNA, jednak ich liczba i rozmieszczenie były zgodne z profilem typowym dla środowiskowych bakterii glebowych. W genomie *C. testosteroni* KKP 1144 zidentyfikowano większą liczbę elementów mobilnych (170 cech), co koreluje z większym rozmiarem genomu i potencjałem adaptacyjnym tego szczepu. W obu genomach wykryto regiony profagowe (odpowiednio trzy w *C. testosteroni* i dwa w *Sphingomonas* sp.), jednak bez cech wskazujących na aktywną patogenność lub obecność wirulencyjnych czynników fagowych.

Strukturę genomów oraz rozmieszczenie elementów funkcjonalnych przedstawiono na mapach kołowych (**Rysunek 7 i Rysunek 8**), które ilustrują równomierne rozmieszczenie sekwencji kodujących oraz stabilny profil zawartości GC wzdłuż chromosomów obu szczepów.



Rysunek 7. Mapa kołowa genomu *Comamonas testosteroni* KKP 1144 (5,8 Mb) przedstawiająca rozmieszczenie sekwencji kodujących (CDS), genów RNA oraz profil zawartości GC. Wizualizację wykonano z wykorzystaniem narzędzia Proksee na podstawie adnotacji genomowej.



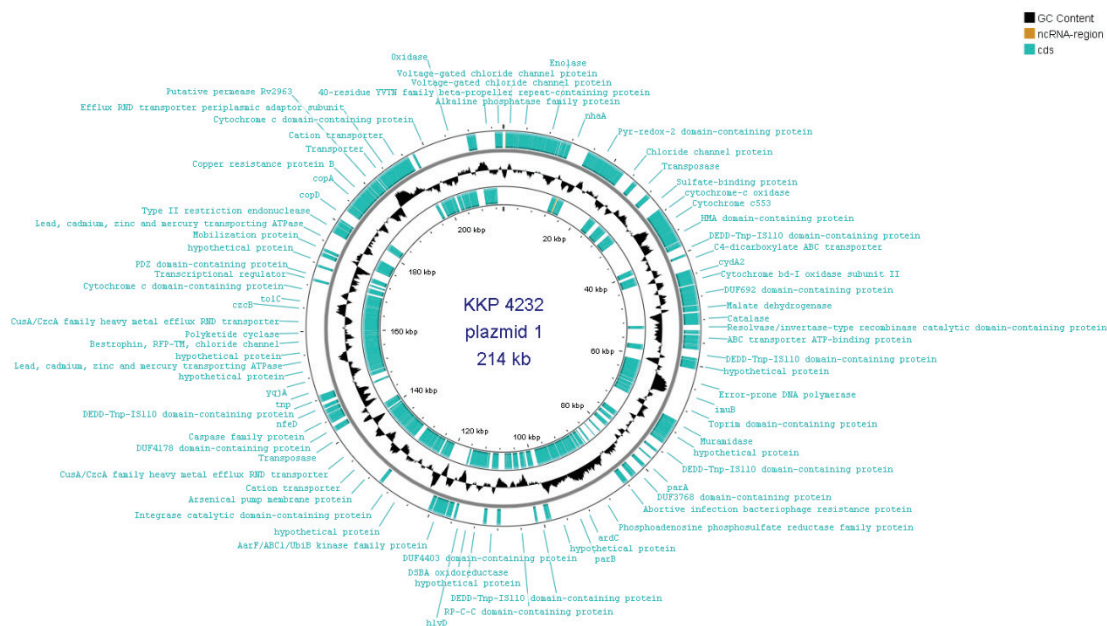
Rysunek 8. Mapa kołowa genomu *Sphingomonas* sp. KKP 4232 (3,6 Mb) z zaznaczeniem regionów kodujących, elementów RNA, sekwencji związanych z mobilnością genetyczną oraz profilu zawartości GC. Analizę i wizualizację przeprowadzono przy użyciu narzędzia Proksee.

Szczególną uwagę w analizie całogenomowej zwrócono na obecność oraz charakterystykę plazmidu zidentyfikowanego u szczepu *Sphingomonas* sp. KKP 4232. Plazmid ten stanowił istotny element dodatkowego potencjału funkcjonalnego badanego mikroorganizmu i charakteryzował się wyraźnym wzbogaceniem w geny związane z adaptacją do warunków środowiskowych.

Analiza adnotacji genów plazmidowych wykazała obecność licznych sekwencji kodujących białka zaangażowane w mechanizmy tolerancji na stres chemiczny, w tym przede wszystkim systemy transportowe oraz regulatory odpowiedzi na obecność potencjalnie toksycznych związków występujących w środowisku glebowym. Zidentyfikowano geny kodujące białka transportowe typu ABC oraz RND, które odpowiadają za aktywny eksport jonów metali ciężkich i innych substancji szkodliwych z wnętrza komórki, przyczyniając się do utrzymania równowagi jonowej i ochrony struktur komórkowych. Ponadto obecność genów kodujących enzymy oksydoredukcyjne oraz białka związane z odpowiedzią na stres oksydacyjny wskazuje, że plazmid pełni istotną rolę w neutralizacji reaktywnych form tlenu powstających w warunkach ekspozycji na związki chemiczne o charakterze stresogennym. Mechanizmy te są kluczowe dla przetrwania bakterii w środowiskach narażonych na zmienną presję chemiczną, takich jak gleby użytkowane rolniczo, gdzie mogą występować pozostałości nawozów mineralnych, środków ochrony roślin lub metali ciężkich.

Warto podkreślić, że zidentyfikowane geny plazmidowe nie są związane z opornością na antybiotyki o znaczeniu klinicznym, lecz reprezentują mechanizmy adaptacyjne typowe dla bakterii środowiskowych. Ich obecność należy interpretować jako element zwiększający zdolność szczepu *Sphingomonas* sp. KKP 4232 do funkcjonowania w warunkach stresu chemicznego, a nie jako czynnik ryzyka z punktu widzenia bezpieczeństwa biologicznego.

Łącznie, analiza funkcjonalna plazmidu wskazuje, że stanowi on istotny element zwiększający potencjał ekologiczny i adaptacyjny badanego szczepu, umożliwiając mu skuteczne zasiedlanie i utrzymywanie aktywności metabolicznej w glebach poddanych presji antropogenicznej. Obecność takich struktur genetycznych może mieć znaczenie w kontekście procesów bioremediacyjnych oraz stabilizacji mikrobiomu glebowego w środowiskach o podwyższonym obciążeniu chemicznym.



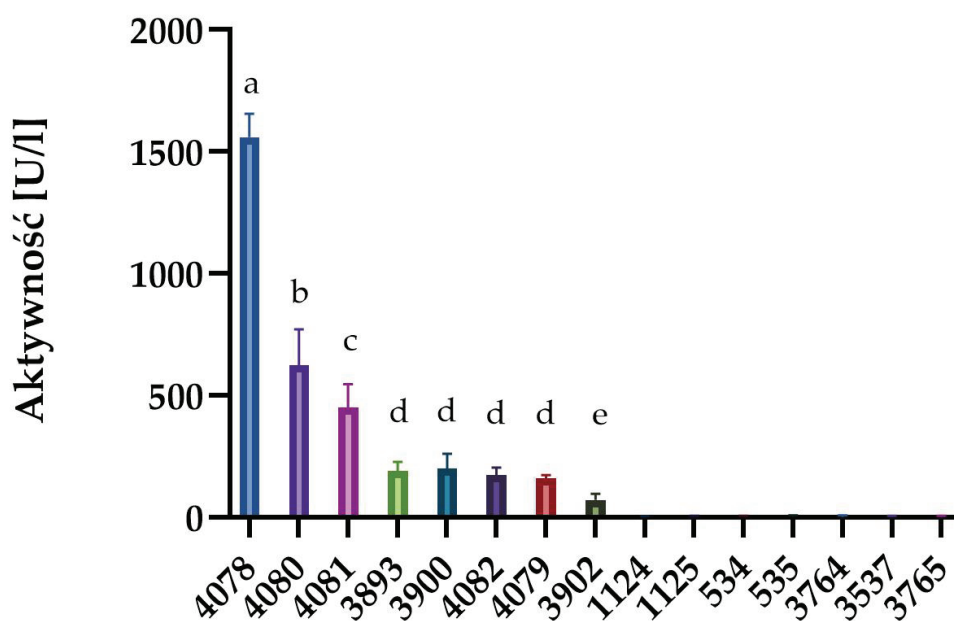
Rysunek 9. Mapa kołowa plazmidu 1 szczepu *Sphingomonas* sp. KKP 4232 (214 kb) przedstawiająca rozmieszczenie genów kodujących, elementów mobilnych oraz regionów związanych z replikacją i stabilnością plazmidu. Wizualizację wykonano z wykorzystaniem narzędzia Proksee.

Uzyskane wyniki wskazują, że plazmid szczepu *Sphingomonas* sp. KKP 4232 pełni kluczową rolę w adaptacji do stresu chemicznego środowiska glebowego, zwiększając jego potencjał funkcjonalny bez generowania zagrożeń związanych z rozprzestrzenianiem oporności na antybiotyki.

3.6. Aktywność enzymatyczna – lakazy

Na wykresie 1 przedstawiono wyniki screeningu aktywności lakazowej oznaczonej testem ABTS dla badanych szczepów bakterii i grzybów. W przypadku szczepów *Bacillus pumilus* aktywność enzymatyczną oznaczano na zawiesinie spor, natomiast dla *Pseudomonas putida* oraz grzybów z rodzaju *Trichoderma* – w płynie pohodowlanym (supernatancie). Najwyższą aktywność lakazową spośród wszystkich analizowanych mikroorganizmów wykazał szczep *B. pumilus* KKP 4078, dla którego odnotowano wartość aktywności przekraczającą 1500 U/L. Podwyższoną aktywność enzymatyczną stwierdzono również u szczepów *B. pumilus* KKP 4080 oraz KKP 4081, osiągających odpowiednio około 500–600 U/L oraz 400–500 U/L. Kolejne szczepy *B. pumilus* (KKP 3893, KKP 3900, KKP 4082, KKP 4079) charakteryzowały się umiarkowaną aktywnością lakazową, mieszczącą się w zakresie około

150–250 U/L, natomiast szczep *B. pumilus* KKP 3902 wykazywał jedynie niską aktywność enzymatyczną. W przypadku szczepów *P. putida* (KKP 1124 i KKP 1125) oraz grzybów z rodzaju *Trichoderma* (*T. harzianum* i *T. atroviride*) nie stwierdzono aktywności lakazowej w zastosowanych warunkach badawczych, co wskazuje na brak lub bardzo niski poziom wydzielanej aktywności enzymatycznej w płynie pochowalnym.

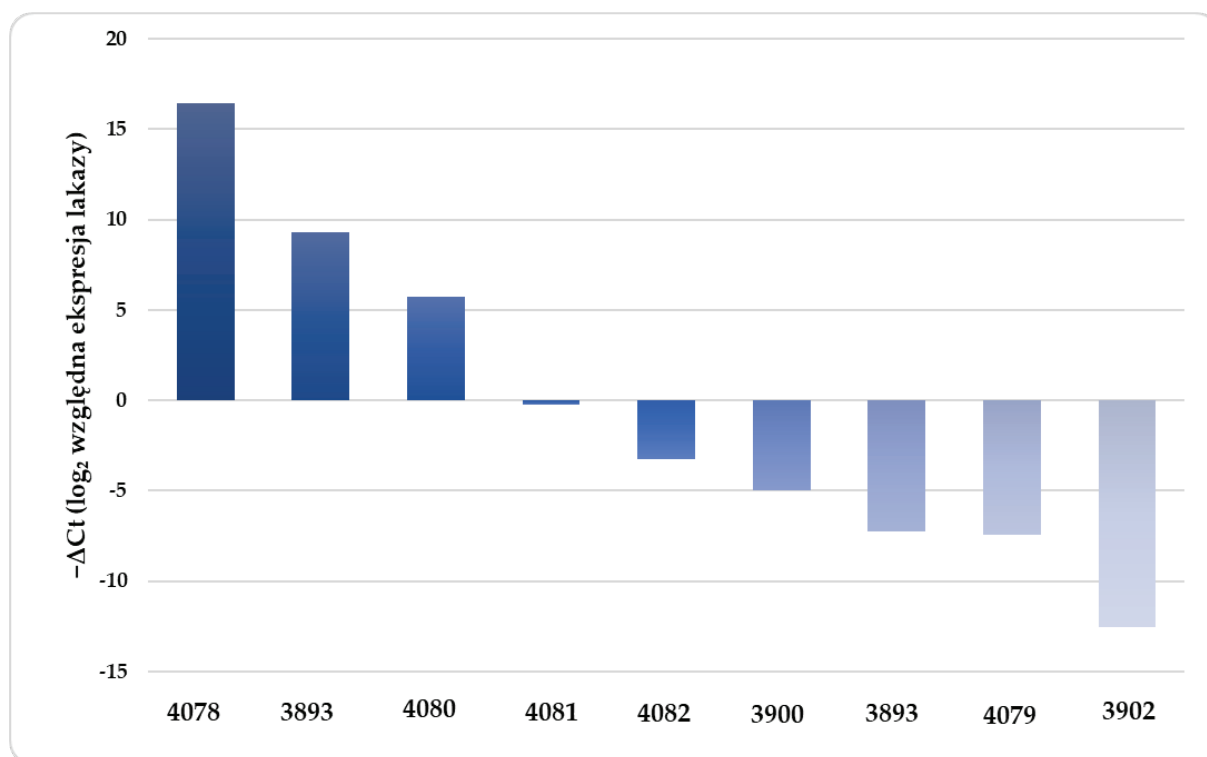


Rysunek 10. Screening aktywności lakazy metodą ABTS u wybranych szczepów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Trichoderma*.

Zaobserwowane zróżnicowanie aktywności lakazowej pomiędzy szczepami *B. pumilus* sugeruje istnienie różnic w zakresie potencjału enzymatycznego między badanymi szczepami. Wysoka aktywność ABTS u wybranych szczepów *B. pumilus* jest zgodna z doniesieniami literaturowymi wskazującymi na obecność lakazy *CotA* związanej z okrywą endospory, której aktywność ujawnia się w warunkach sporulacji. Brak aktywności u szczepów *Pseudomonas* i *Trichoderma* może natomiast wynikać z odmiennej regulacji ekspresji lakaz, konieczności indukcji enzymu lub specyfiki lokalizacji enzymatycznej (enzymy niewydzielane do podłoża w zastosowanych warunkach hodowli).

Szczepy, dla których w teście ABTS stwierdzono aktywność enzymatyczną, zostały następnie wykorzystane do analizy ekspresji genu kodującego lakazę metodą ilościowej

reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR). Do przeprowadzenia screeningu różnych izolatów zastosowano porównanie względnych poziomów ekspresji genu pomiędzy badanymi szczepami po normalizacji do genu referencyjnego (16S rRNA).



Rysunek 11. Względny poziom ekspresji genu lakazowego *CotA* u wybranych szczepów *Bacillus* spp. określony metodą RT-qPCR.

Uzyskane wyniki wykazały zauważalne zróżnicowanie poziomu ekspresji genu lakazowego pomiędzy badanymi szczepami *B. pumilus* (Wykres 2). Najwyższy poziom ekspresji odnotowano w szczepie *B. pumilus* KKP 4078, co korelowało z wysoką aktywnością enzymatyczną obserwowaną w teście ABTS. Podwyższoną ekspresję stwierdzono również w szczepach KKP 3893 oraz KKP 4080, natomiast szczepy KKP 4081, KKP 4082, KKP 3900, KKP 4079 oraz KKP 3902 charakteryzowały się niską ekspresją genu lakazowego, przy czym najniższe wartości odnotowano dla szczepu KKP 3902. Wyniki te wskazują, że aktywność lakazowa wykazana w teście ABTS znajduje częściowe odzwierciedlenie na poziomie transkrypcyjnym, przy jednoczesnym istnieniu różnic regulacyjnych pomiędzy szczepami, które mogą wynikać m.in. z mechanizmów potranslacyjnych lub różnic w stabilności enzymu.

Przeprowadzony dwuetapowy screening, obejmujący oznaczenie aktywności lakazowej metodą ABTS oraz porównawczą analizę ekspresji genów związanych z aktywnością lakazową, umożliwił zawężenie grupy badanych mikroorganizmów i wytypowanie szczepów *Bacillus pumilus* o najwyższym potencjale enzymatycznym. Uzyskane wyniki wskazują na wyraźne zróżnicowanie szczepowe w zakresie aktywności lakazowej, co uzasadnia dalszą selekcję najbardziej obiecujących izolatów. Brak wykrywalnej aktywności lakazowej u pozostałych szczepów może być związany z odmienną regulacją ekspresji genów, specyfiką lokalizacji enzymów lub koniecznością zastosowania warunków indukcyjnych. Zgromadzone dane stanowią podstawę do dalszych badań ukierunkowanych na optymalizację warunków indukcji lakaz oraz pogłębioną charakterystykę molekularną wybranych szczepów.

4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania obejmowały szeroki zakres analiz mikrobiologicznych i molekularnych, których celem była kompleksowa ocena potencjału funkcjonalnego, biokontrolnego oraz bezpieczeństwa biologicznego wybranych mikroorganizmów istotnych z punktu widzenia zrównoważonego rolnictwa, biotechnologii oraz przemysłu rolno-spożywczego. Zastosowane podejście umożliwiło równoległą analizę aktywności antagonistycznej, właściwości metabolicznych, profili antybiotykooporności, oddziaływania na mikrobiom gleby oraz cech genomowych wybranych szczepów środowiskowych.

Badania aktywności antagonistycznej wykazały wyraźne, szczepozależne różnice w zdolności hamowania wzrostu fitopatogenów roślinnych. Szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* wykazywały silną aktywność antagonistyczną wobec *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* oraz izolatów *Alternaria*, przy czym zakres i intensywność działania były zróżnicowane pomiędzy poszczególnymi szczepami. Uzyskane wyniki potwierdzają istotne znaczenie selekcji szczepowej w ocenie potencjału biokontrolnego grzybów antagonistycznych.

Równolegle przeprowadzone testy antypatogenowe bakterii wykazały, że szczepy z rodzaju *Bacillus* charakteryzują się silnym, lecz selektywnym spektrum działania wobec patogenów grzybowych, szczególnie *Botrytis cinerea* oraz *Alternaria alternata*. Bakterie fermentacji mlekowej wykazywały natomiast zróżnicowaną i wyraźnie szczepozależną aktywność antagonistyczną, ograniczoną głównie do wybranych izolatów *Alternaria*. Wyniki te wskazują, że LAB mogą pełnić funkcję uzupełniającą w strategiach biokontroli, podczas gdy szczepy *Bacillus* stanowią bardziej uniwersalne obiekty do dalszych badań aplikacyjnych.

Istotnym elementem badań była ocena zdolności bakterii fermentacji mlekowej do syntezy egzopolisacharydów. Uzyskane dane potwierdziły, że produkcja EPS ma charakter ściśle szczepozależny i nie jest cechą wspólną dla wszystkich izolatów danego gatunku. Identyfikacja szczepów o podwyższonym potencjale biosyntezy EPS ma znaczenie zarówno w kontekście zastosowań technologicznych, jak i dalszych badań funkcjonalnych, uzasadniając prowadzenie badań przesiewowych jako kluczowego etapu selekcji.

Analiza antybiotykooporności bakterii fermentacji mlekowej została przeprowadzona w dwóch odrębnych kontekstach badawczych. W przypadku szczepów LAB analizowanych pod kątem właściwości technologicznych i syntezy EPS, ocena profili oporności miała na celu weryfikację ich bezpieczeństwa jako potencjalnych szczepów aplikacyjnych. W tej grupie

obserwowano zróżnicowane, szczepowo-specyficzne profile oporności, co podkreśla konieczność indywidualnej oceny każdego szczepu przed jego zastosowaniem przemysłowym.

Równocześnie przeprowadzono analizę antybiotykooporności środowiskowych szczepów LAB, ukierunkowaną na ocenę ich potencjalnej roli w utrzymywaniu i rozprzestrzenianiu determinant oporności w ekosystemach rolniczych. W tej grupie część szczepów wykazywała fenotypową oporność na wybrane klasy antybiotyków, co wskazuje na potrzebę dalszych badań nad znaczeniem środowiskowych LAB jako elementu rezerwuaru oporności.

Analizy metagenomiczne wykazały, że inokulacja gleby wybranymi szczepami mikroorganizmów prowadziła do zróżnicowanych, szczepozależnych zmian w strukturze mikrobiomu glebowego. W niektórych wariantach obserwowano jedynie umiarkowaną modulację α - i β -różnorodności, przy zachowaniu profilu taksonomicznego charakterystycznego dla gleby, podczas gdy inne warianty prowadziły do wyraźniejszych przesunięć strukturalnych. Wyniki te podkreślają znaczenie doboru szczepów pod kątem ich kompatybilności z naturalnym mikrobiomem środowiskowym.

Uzupełnieniem badań były analizy całogenomowe szczepów *Comamonas testosteroni* KKP 1144 oraz *Sphingomonas* sp. KKP 4232, które umożliwiły ocenę ich potencjału adaptacyjnego oraz bezpieczeństwa biologicznego. Analizy nie wykazały obecności genów antybiotykooporności o znaczeniu klinicznym ani czynników wirulencji. Zidentyfikowany u *Sphingomonas* sp. KKP 4232 plazmid zawierał geny związane z tolerancją i metabolizmem związków chemicznych, co wskazuje na jego rolę w adaptacji środowiskowej oraz potencjalne znaczenie w procesach detoksykacji i bioremediacji.

Podsumowując, uzyskane wyniki dostarczają spójnej i wielowymiarowej charakterystyki badanych mikroorganizmów, wskazując na ich zróżnicowany potencjał biokontrolny, technologiczny i środowiskowy. Zastosowane podejście pozwoliło na równorzędną ocenę skuteczności oraz bezpieczeństwa biologicznego analizowanych szczepów, stanowiąc solidną podstawę do dalszych badań aplikacyjnych i wdrożeniowych.

5. Znaczenie praktyczne uzyskanych wyników

Przeprowadzone badania dostarczyły wyników o zróżnicowanym, lecz komplementarnym znaczeniu praktycznym, obejmującym obszary biokontroli fitopatogenów, bezpieczeństwa biologicznego mikroorganizmów, selekcji szczepów do zastosowań technologicznych oraz oceny wpływu inokulacji na mikrobiom glebowy. Uzyskane dane pozwalają nie tylko na identyfikację obiecujących szczepów do dalszych badań aplikacyjnych, lecz także na świadome wykluczenie mikroorganizmów, których zastosowanie mogłoby wiązać się z podwyższonym ryzykiem środowiskowym lub regulacyjnym.

Aktywność antagonistyczna jako kryterium selekcji biokontrolnej

Wyniki testów antagonistycznych jednoznacznie wskazują, że szczepy grzybów z rodzaju *Trichoderma* oraz bakterii z rodzaju *Bacillus* wykazują najwyższy i najbardziej stabilny potencjał biokontrolny wobec istotnych fitopatogenów roślinnych. Szczególnie istotne jest szerokie spektrum i powtarzalność działania szczepów *Trichoderma*, w tym zdolność zarówno do hamowania wzrostu patogenów, jak i ich przerastania, co stanowi kluczowe kryterium w praktycznej ochronie roślin. Uzyskane wyniki mają bezpośrednie zastosowanie na etapie selekcji kandydatów do biopreparatów, umożliwiając zawężenie dalszych badań do szczepów o najwyższej skuteczności i stabilności działania.

W przypadku bakterii fermentacji mlekowej wykazano wyraźnie szczepozależny i selektywny charakter aktywności antagonistycznej, ograniczony głównie do wybranych izolatów *Alternaria*. Wyniki te wskazują, że LAB nie powinny być traktowane jako główne czynniki biokontrolne, lecz mogą pełnić funkcję wspomagającą, np. w formulacjach wieloskładnikowych lub w zastosowaniach pośrednich, gdzie istotna jest lokalna modulacja mikroflory.

Egzopolisacharydy (EPS) – znaczenie technologiczne i selekcyjne

Badania zdolności szczepów LAB do syntezy egzopolisacharydów potwierdziły, że cecha ta ma charakter wyraźnie szczepowo-specyficzny i nie może być ekstrapolowana na poziomie gatunku. Z punktu widzenia praktycznego oznacza to, że jedynie część badanych szczepów może być rozważana jako potencjalne komponenty technologiczne, np. w procesach

fermentacyjnych, poprawie właściwości teksturalnych produktów lub stabilizacji matryc biologicznych.

Jednocześnie uzyskane wyniki pełnią istotną funkcję eliminacyjną, pozwalając na odrzucenie szczepów, które mimo przynależności do tej samej grupy taksonomicznej nie wykazują pożądanых cech funkcjonalnych. W praktyce ogranicza to koszty dalszych badań i zapobiega nieefektywnemu rozwijaniu szczepów o niskim potencjale aplikacyjnym.

Antybiotykooporność jako kryterium bezpieczeństwa i oceny ryzyka

Analiza antybiotykooporności wykazała, że jej znaczenie praktyczne wykracza poza prostą identyfikację genów oporności. Kluczowym aspektem okazał się charakter i potencjalna mobilność tych genów, a tym samym ryzyko ich poziomego transferu w środowisku lub w systemach produkcyjnych. W przypadku części szczepów LAB stwierdzono obecność genów oporności, które mogą stanowić potencjalne źródło transferu do innych mikroorganizmów, co istotnie ogranicza możliwość ich bezpiecznego zastosowania.

Z kolei szczepy pozbawione genów oporności lub wykazujące wyłącznie oporność intrinsiczną, niemobilną, mogą być traktowane jako bezpieczniejsze z punktu widzenia regulacyjnego i środowiskowego. Wyniki te jednoznacznie wskazują, że antybiotykooporność nie jest cechą drugorzędną, lecz kluczowym elementem oceny przydatności szczepów do zastosowań praktycznych, wymagającym każdorazowo analizy ryzyka transferu genów, a nie jedynie ich obecności.

Metagenomika jako narzędzie oceny wpływu inokulacji na mikrobiom gleby

Analiza metagenomiczna wykazała, że inokulacja wybranymi szczepami prowadziła do szczepo-zależnej modulacji mikrobiomu gleby, bez jednoznacznych oznak jego destabilizacji. Szczególnie istotne z praktycznego punktu widzenia jest stwierdzenie, że niektóre szczepy (*Bacillus subtilis* KKP 3894 i KKP 3901) modyfikowały strukturę mikrobioty w sposób umiarkowany, zachowując poziom różnorodności porównywalny z glebą kontrolną.

Wyniki te wskazują, że metagenomika może być skutecznym narzędziem wstępnej oceny bezpieczeństwa ekologicznego inokulantów, pozwalającym na identyfikację szczepów, które nie wywołują niepożądanego reorganizacji społeczności mikroorganizmów glebowych. Ma to

znaczenie praktyczne na etapie projektowania biopreparatów oraz w kontekście wymogów środowiskowych.

Analiza genomowa (WGS) i plazmidy – znaczenie środowiskowe i funkcjonalne

Sekwencjonowanie całogenomowe szczepów *Comamonas testosteroni* KKP 1144 oraz *Sphingomonas* sp. KKP 4232 dostarczyło danych istotnych z punktu widzenia bezpieczeństwa oraz funkcjonowania mikroorganizmów glebowych. Szczególnie istotne znaczenie praktyczne ma identyfikacja dużego plazmidu u *Sphingomonas* sp. KKP 4232, zawierającego geny związane z odpornością na związki chemiczne oraz adaptacją do warunków środowiskowych.

Obecność takich elementów wskazuje, że mikroorganizmy środowiskowe mogą pełnić rolę rezerwuarów genów adaptacyjnych, co ma znaczenie zarówno w kontekście bioremediacji, jak i oceny ryzyka rozprzestrzeniania cech środowiskowych w mikrobiomie gleby. Wyniki te podkreślają zasadność uwzględniania analiz genomowych w ocenie mikroorganizmów przeznaczonych do zastosowań środowiskowych.

Podsumowanie praktyczne

Łącznie, uzyskane wyniki mają istotne znaczenie praktyczne na etapie selekcji, kwalifikacji i eliminacji szczepów do dalszych badań aplikacyjnych. Badania pozwoliły na wskazanie mikroorganizmów o wysokim potencjale biokontrolnym, jednocześnie identyfikując ograniczenia związane z bezpieczeństwem biologicznym, ryzykiem transferu genów oraz wpływem na mikrobiom środowiskowy. Tak kompleksowe podejście stanowi solidną podstawę do dalszych prac rozwojowych, przy jednoczesnym zachowaniu zasad zrównoważonego i odpowiedzialnego wykorzystania mikroorganizmów.

Bibliografía

1. Aguirre-García, Y. L., Nery-Flores, S. D., Campos-Múzquiz, L. G., Flores-Gallegos, A. C., Palomo-Ligas, L., Ascacio-Valdés, J. A., Sepúlveda-Torres, L., & Rodríguez-Herrera, R. (2024). Lactic acid fermentation in the food industry and bio-preservation of food. *Fermentation*, 10(3), 168. doi:10.3390/fermentation10030168
2. Ayilara, M. S., & Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: The role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, Article 1183691. <https://doi.org/10.3389/fagro.2023.1183691>
3. Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. J. B. A. (2011). New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 29(1), 54-66.
4. Bengoa, A. A., Llamas, M. G., Iraporda, C., Dueñas, M. T., Abraham, A. G., & Garrote, G. L. (2018). Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiology*, 69, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.012>.
5. Bisanz, J. E. (2018). qiime2R: Importing QIIME2 artifacts and associated data into R sessions. <https://github.com/jbisanz/qiime2R>
6. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
7. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data | *Nature Methods*. (n.d.). Retrieved 12 January 2026, from <https://www.nature.com/articles/nmeth.3869>
8. De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in fermented foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 72–79. doi:10.1016/j.copbio.2019.12.020
9. Dhiman, K., & Verma, A. (2015). Optimization for laccase production by *Pseudomonas putida* LUA15.1 using response surface methodology. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(2), 1247–1256.
10. EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or s production organisms. *EFSA J.* (2018) 6:5206. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5206
11. EFSA. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the characterisation of microorganisms in support of the risk assessment of products used in the food chain. *EFSA* (2025), Adopted: 24 September 2025, *EFSA Journal*. 2025;23:e9705. | 1 of 38 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9705>
12. Elmansy, E. A., Elkady, E. M., Asker, M. S., Abdallah, N. A., Khalil, B. E., & Amer, S. K. (2023). Improved production of *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 exopolysaccharide (REPS) by optimization of process parameters through statistical experimental designs. *BMC microbiology*, 23(1), 361.
13. Elnahal, A.S.; El-Saadony, M.T.; Saad, A.M.; Desoky, E.S.; El-Tahan, A.M.; Rady, M.M.; AbuQamar, S.F.; El-Tarabily, K.A. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *Eur. J. Plant Pathol.* 2022, 162, 759–792.
14. Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. B. (2010). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1), 1–12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.006

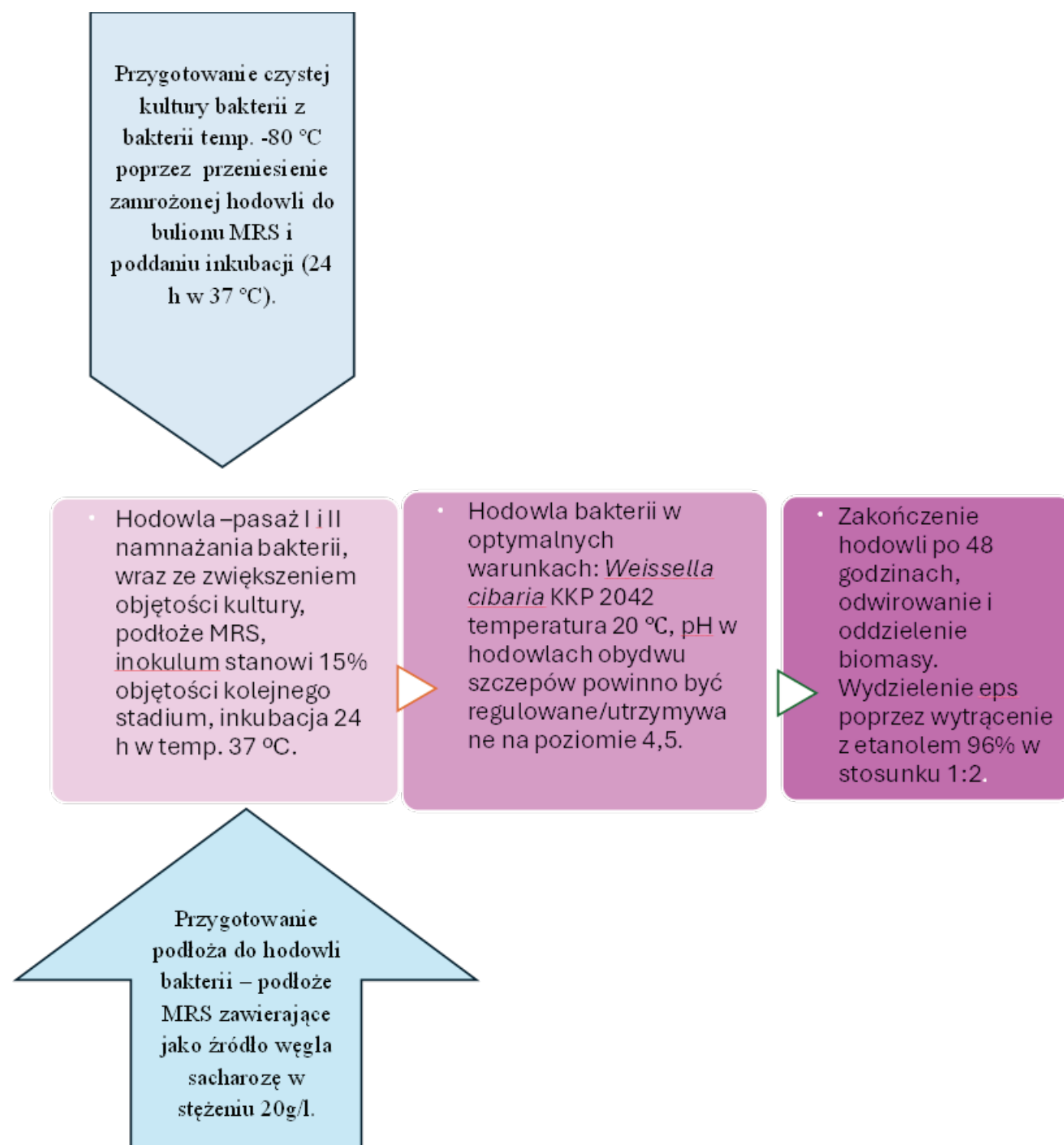
15. Jurášková, D., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11(2), 156.
16. Jurášková, D., Ribeiro, S. C., & Silva, C. C. (2022). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From biosynthesis to health-promoting properties. *Foods*, 11(2), 156. doi:10.3390/foods11020156
17. Klare I, Konstabel C, Muller-Bertlig S, Reissbrodt R, Huys G, Vancanneyt M, et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. *Appl Environ Microbiol.* (2005) 71:8982–6. doi: 10.1128/AEM.71.12.8982-8986.2005
18. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F. O, Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies, *Nucleic Acids Research*, Volume 41, Issue 1, 1 January 2013, Page e1, <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
19. Kuddus, M., Joseph, B., & Ramteke, P. W. (2013). Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(4), 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.06.002>
20. Kumar, R.; Farda, B.; Mignini, A.; Djebaili, R.; Koolman, L.; Paul, A.; Mondal, S.; Joel, J.M.; Pandit, A.; Panneerselvam, P.; et al. Microbial Solutions in Agriculture: Enhancing Soil Health and Resilience Through Bio-Inoculants and Bioremediation. *Bacteria* 2025, 4, 28.
21. Li, B., Jin, Z., Yang, F., Li, H., Liu, J., & Jiang, Z. (2024). Proteomic investigation reveals the role of bacterial laccase from *Bacillus pumilus* in oxidative stress defense. *Journal of Proteomics*, 292, 105047.
22. Loi, M., Fanelli, F., Zucca, P., Liuzzi, V. C., Quintieri, L., Cimmarusti, M. T., Monaci, L., Haidukowski, M., Logrieco, A. F., Sanjust, E., & Mulè, G. (2016). Aflatoxin B₁ and M₁ degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and redox mediators. *Toxins*, 8(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins8090243>
23. Madhuri, K. V., & Vidya Prabhakar, K. (2014). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Oriental journal of chemistry*, 30(3), 1401-1410.
24. McMahon, A. M., Doyle, A. M., Brooks, S. J., & O'Connor, K. E. (2007). Biochemical characterization of the coexisting tyrosinase and laccase in soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1435–1441.
25. McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217.
26. Metagenomic biomarker discovery and explanation—PubMed. (n.d.). Retrieved 12 January 2026, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21702898/>
27. Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., Belleggia, L., Maoloni, A., Cardinali, F., ... & Clementi, F. (2020). Selection of cereal-sourced lactic acid bacteria as candidate starters for the baking industry. *Plos one*, 15(7), e0236190.
28. Minervini, F., De Angelis, M., Surico, R. F., Di Cagno, R., Gänzle, M., & Gobbetti, M. (2010). Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.014>.
29. Nadarajah, K., & Abdul Rahman, N. S. N. (2023). The microbial connection to sustainable agriculture. *Plants*, 12(12), 2307. doi:10.3390/plants12122307
30. Netrusov, A. I., Liyaskina, E. V., Kurgaeva, I. V., Liyaskina, A. U., Yang, G., & Revin, V. V. (2023). Exopolysaccharide-producing bacteria: A review. *Microorganisms*, 11(6), 1541. doi:10.3390/microorganisms11061541

31. Netrusov, AI, Liyaskina, EV, Kurgaeva, IV, Liyaskina, AU, Yang, G. i Revin, VV (2023). Bakterie produkujące egzopolisacharydy: przegląd. *Mikroorganizmy* , 11 (6), 1541. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061541>
32. Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Borman, T., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., ... Weedon, J. (2025). *vegan: Community Ecology Package*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.vegan>
33. Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E., & Piekarska-Radzik, L. (2020). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains—Optimization of synthesis and extraction conditions. *Lwt*, 122, 109055.
34. Oleksy-Sobczak, M., Klewicka, E., & Piekarska-Radzik, L. (2020). Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *LWT – Food Science and Technology*, 122, 109055. doi:10.1016/j.lwt.2020.109055
35. Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., ... & Pepe, O. (2012). Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2737-2747.
36. Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521–542. doi:10.1590/S1516-89132007000300018
37. Paraschiv, G., Ferdes, M., Ionescu, M., Moiceanu, G., Zabava, B. S., & Dinca, M. N. (2022). Laccases—Versatile Enzymes Used to Reduce Environmental Pollution. *Energies*, 15(5), 1835. <https://doi.org/10.3390/en15051835>
38. Patadiya, Maheshwari R., Yatin Suthar, and Shilpa Gupte. "Production, Characterization and Evaluation of the Antioxidant Potential of Exopolysaccharide Produced by *Weissella cibaria* MHCH1." (2025): 352-371.
39. Prete, R., Alam, M. K., Perpetuini, G., Perla, C., Pittia, P., & Corsetti, A. (2021). Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: a sustainable tool for functional foods. *Foods*, 10(7), 1653.
40. Prete, R., Dell'Orco, F., Sabatini, G., Montagano, F., Battista, N., & Corsetti, A. (2024). Improving the antioxidant and anti-inflammatory activity of fermented milks with exopolysaccharides-producing *Lactiplantibacillus plantarum* strains. *Foods*, 13(11), 1663.
41. Ramos, IM, Seseña, S., Poveda, JM i in. Badanie szczepów bakterii kwasu mlekowego w celu poprawy właściwości jogurtu beztłuszczowego poprzez produkcję EPS in situ. *Food Bioprocess Technol* 16 , 2541–2558 (2023). <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03080-7>
42. Reiss, R., Ihssen, J., & Meyer, L. T. (2011). *Bacillus pumilus* laccase: Heat-stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology*, 11, Article 9.
43. Reitmeier, S., Hitch, T. C. A., Treichel, N., Fikas, N., Hausmann, B., Ramer-Tait, A. E., Neuhaus, K., Berry, D., Haller, D., Lagkouvardos, I., & Clavel, T. (2021). Handling of spurious sequences affects the outcome of high-throughput 16S rRNA gene amplicon profiling. *ISME Communications*, 1(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00033-z>
44. Sánchez-de Prager, M.; Cisneros-Rojas, C.A. Organic acids production by rhizosphere microorganisms isolated from a Typic Melanudands and its effects on the inorganic phosphates solubilization. *Acta Agronómica* 2017, 66, 241–247.
45. SILVA in 2026: A global core biodata resource for rRNA within the DSMZ digital diversity | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic. (n.d.). Retrieved 12 January 2026, from <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkaf1247/8326456>

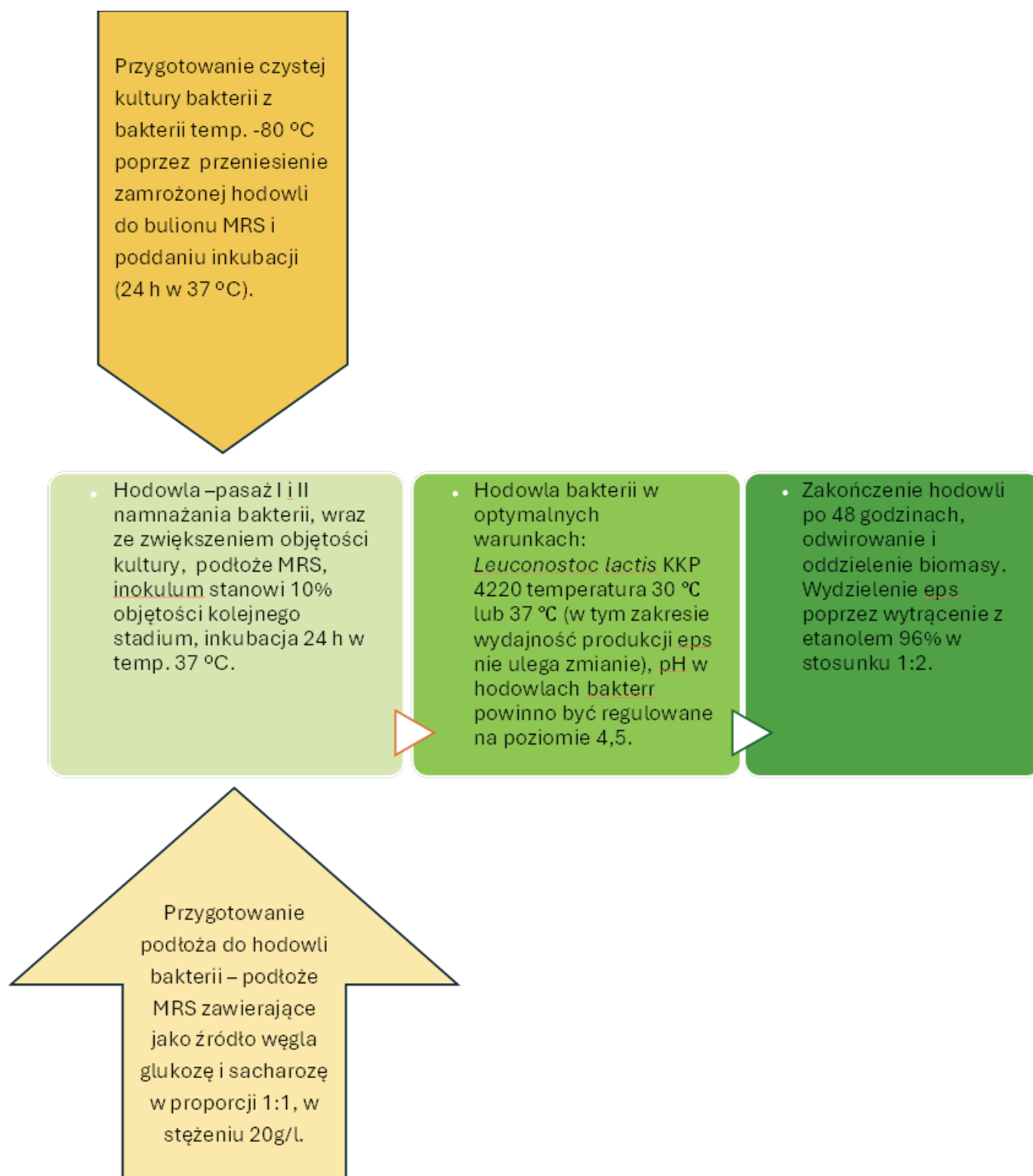
46. Stefańska, I., Kwiecień, E., Józwiak-Piasecka, K., Garbowska, M., Binek, M., & Rzewuska, M. (2021). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria strains of potential use as feed additives-the basic safety and usefulness criterion. *Frontiers in veterinary science*, 8, 687071.
47. Wang, J., Zhang, J., Guo, H., Cheng, Q., Abbas, Z., Tong, Y., & Zhang, R. (2023). Optimization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* R301 and its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Foods*, 12(13), 2481. doi:10.3390/foods12132481
48. Wang, J., Zhang, J., Guo, H., Cheng, Q., Abbas, Z., Tong, Y., & Zhang, R. (2023). Optimization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* R301 and its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Foods*, 12(13), 2481.
49. Xu, Q., Wang, M. M., Li, X., Ding, Y. R., Wei, X. Y., & Zhou, T. (2024). Antioxidant and anti-inflammatory activities and action mechanisms of exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* Z-1. *Food Bioscience*, 62, 105247.
50. Zarour, K., Zeid, A. F., Mohedano, M. L., Prieto, A., Kihal, M., & López, P. (2024). *Leuconostoc mesenteroides* and *Liquorilactobacillus mali* strains, isolated from Algerian food products, are producers of the postbiotic compounds dextran, oligosaccharides and mannitol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(4), 114.
51. Zhao, X., & Liang, Q. (2023). Optimization, probiotic characteristics, and rheological properties of exopolysaccharides from *lactiplantibacillus plantarum* MC5. *Molecules*, 28(6), 2463.

Załącznik A. Standardowe procedury operacyjne hodowli szczepów bakterii mlekowych

SOP A1. Hodowla *Weissella cibaria* KKP 2042



SOP A2. Hodowla *Leuconostoc lactis* KKP 4220



SOP A3. SOP-AMR-LAB-01

Określenie standardowych warunków operacyjnych oznaczania antybiotykooporności szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB)

Procedura oznaczania antybiotykooporności szczepów bakterii fermentacji mlekowej została przeprowadzona zgodnie ze standardowymi warunkami operacyjnymi, obejmującymi etapy przygotowania inokulum, zaszczepienia podłoża, inkubacji oraz odczytu wyników. Wszystkie analizy wykonano metodą fenotypową poprzez oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) przy użyciu pasków E-test. Profil antybiotykooporności określono na podstawie wytycznych EFSA.

1. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Przygotowanie inokulum do oznaczenia antybiotykooporności polegało na pobraniu pojedynczych kolonii szczepów bakterii fermentacji mlekowej z hodowli agarowej i zawieszeniu ich w jałowym roztworze soli fizjologicznej. Zawiesinę doprowadzano do zmętnienia odpowiadającego standardowi 0,5 McFarlanda.

2. Przygotowanie podłoża i zaszczepienie

Jałową wymazówkę zanurzano w przygotowanej zawieszynie bakteryjnej, a następnie wykonywano posiew powierzchniowy na podłożu MRS agar, prowadząc wymaz w trzech prostopadłych kierunkach w celu uzyskania jednorodnego wzrostu bakterii na całej powierzchni płytki.

3. Aplikacja pasków E-test

Po przeschnięciu powierzchni agaru na zaszczepione płytki nakładano paski E-test (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francja) zawierające odpowiednie antybiotyki: ampicylinę, gentamycynę, kanamycynę, klindamycynę, chloramfenikol, erytromycynę, streptomycynę, tetracyklinę oraz wankomycynę. Aplikację pasków przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta.

4. Inkubacja

Zaszczepione płytki inkubowano w warunkach beztlenowych przez 48 godzin w temperaturze 30°C.

5. Odczyt wartości MIC

Po zakończeniu inkubacji dokonywano odczytu minimalnego stężenia hamującego (MIC). Wartość MIC określano jako punkt przecięcia krawędzi elipsy zahamowania wzrostu bakterii z podziałką paska E-test.

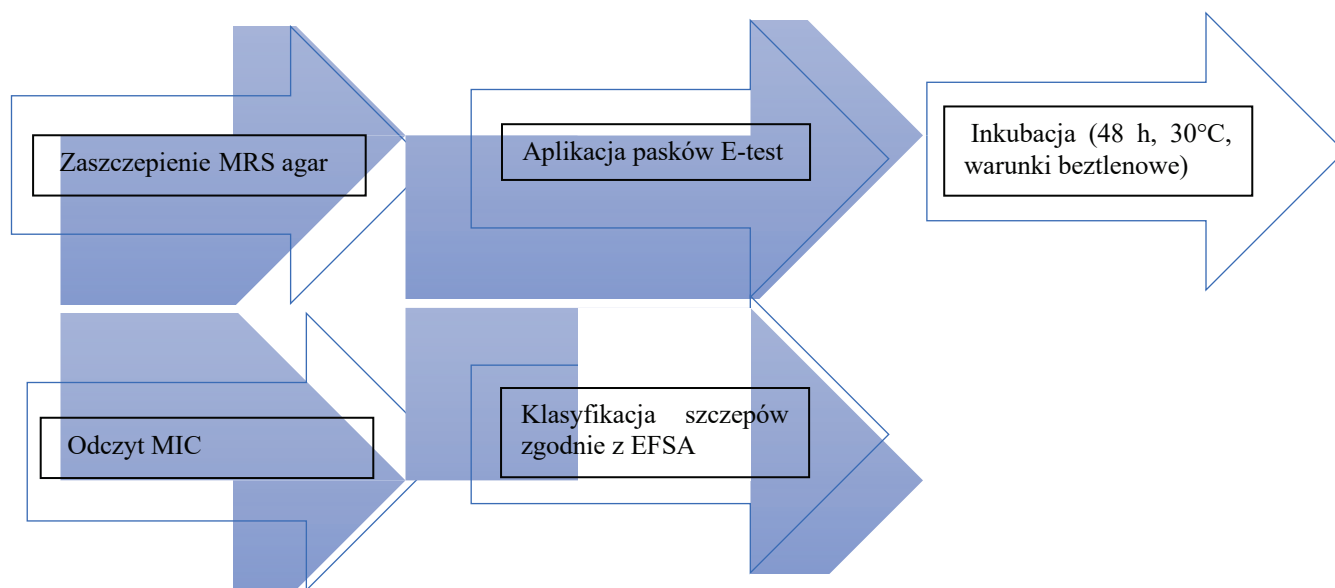
6. Powtórzenia i interpretacja wyników

Oznaczenia przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, przy czym każde powtórzenie obejmowało dwa pomiary (duplikaty). Szczepy bakterii fermentacji mlekowej klasyfikowano jako odporne na dany antybiotyk, jeśli uzyskane wartości MIC przekraczały wartości graniczne (breakpointy) ustalone przez EFSA.

Schemat 1. Standardowe warunki operacyjne oznaczania antybiotykooporności szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB)

Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej (0,5 McFarlanda)

- Zaszczepienie MRS agar
- Aplikacja pasków E-test
- Inkubacja (48 h, 30°C, warunki beztlenowe)
- Odczyt MIC
- Klasyfikacja szczepów zgodnie z EFSA



SOP A4. SOP-AMR-BAC-01

Określenie standardowych warunków operacyjnych oznaczania antybiotykooporności szczepów *Bacillus* spp.

Procedura oznaczania antybiotykooporności szczepów *Bacillus* spp. została przeprowadzona zgodnie ze standardowymi warunkami operacyjnymi, obejmującymi etapy przygotowania inokulum, zaszczepienia podłoża, inkubacji oraz odczytu wyników. Wszystkie analizy wykonano metodą fenotypową poprzez oznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) przy użyciu pasków E-test. Profil antybiotykoodporności określono na podstawie wytycznych EFSA.

1. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Przygotowanie inokulum do oznaczenia antybiotykooporności polegało na pobraniu pojedynczych kolonii szczepów *Bacillus* spp. z hodowli agarowej i zawieszeniu ich w jałowej soli fizjologicznej. Zawiesinę doprowadzano do zmętnienia odpowiadającego standardowi 0,5 McFarlanda.

2. Przygotowanie podłoża i zaszczepienie

Jałową wymazówkę zanurzano w przygotowanej zawieszynie bakteryjnej, a następnie wykonywano posiew powierzchniowy na podłożu AO (agar odżywczy), prowadząc wymaz w trzech prostopadłych kierunkach w celu uzyskania jednorodnego wzrostu bakterii na całej powierzchni płytki.

3. Aplikacja pasków E-test

Po przeschnięciu powierzchni agaru na zaszczepione płytki nakładano paski E-test (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francja) zawierające odpowiednie antybiotyki: ampicylinę, gentamycynę, kanamycynę, klindamycynę, chloramfenikol, erytromycynę, streptomycynę, tetracyklinę oraz wankomycynę. Aplikację pasków przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta.

4. Inkubacja

Zaszczepione płytki inkubowano w warunkach tlenowych przez 48 godzin w temperaturze 30°C.

5. Odczyt wartości MIC

Po zakończeniu inkubacji dokonywano odczytu minimalnego stężenia hamującego (MIC). Wartość MIC określano jako punkt przecięcia krawędzi elipsy zahamowania wzrostu bakterii z podziałką paska E-test.

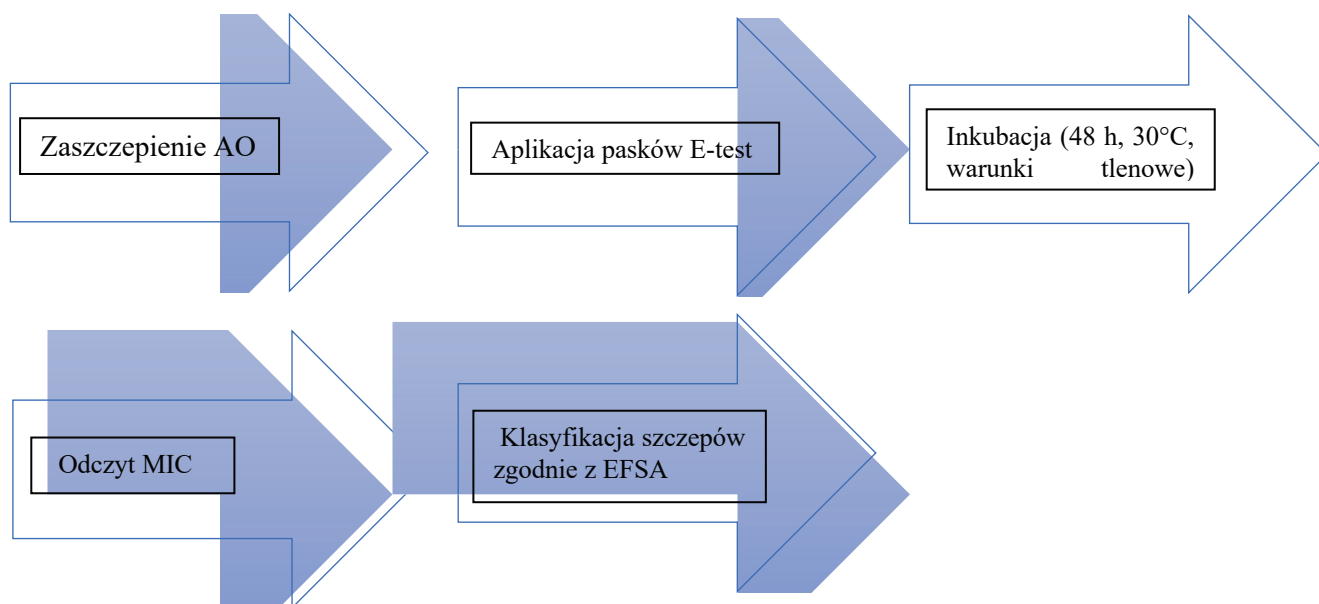
6. Powtórzenia i interpretacja wyników

Oznaczenia przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, przy czym każde powtórzenie obejmowało dwa pomiary (duplikaty). Szczepy *Bacillus* spp. klasyfikowano jako odporne na dany antybiotyk, jeśli uzyskane wartości MIC przekraczały wartości graniczne (breakpointy) ustalone przez EFSA.

Schemat 1. Standardowe warunki operacyjne oznaczania antybiooporności szczepów *Bacillus* spp.

Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej (0,5 McFarlanda)

- Zaszczepienie AO
- Aplikacja pasków E-test
- Inkubacja (48 h, 30°C, warunki tlenowe)
- Odczyt MIC
- Klasyfikacja szczepów zgodnie z EFSA



Załącznik B.

Tabela B1. Wyniki analizy genomowej bakterii fermentacji mlekowej pod względem obecności genów związanych z syntezą egzopolisacharydów (EPS)

gen	rodzaj produktu	produkt	<i>Lbp.</i> <i>plantarum</i> KKP 593	<i>Leu.</i> <i>citireum</i> KKP 4214	<i>W. cibaria</i> KKP 2042	<i>Lo.reuteri</i> KKP 1829	<i>P.acidilactici</i> KKP 2065
	acetylo- i fosfotransferazy	capsular polysaccharide phosphotransferase cps12A				+	
	acetylo- i fosfotransferazy	exopolysaccharide phosphotransferase cps2G family protein		+			
epsC	acetylo- i fosfotransferazy	serine O-acetyltransferase EpsC	+				
gtfB	chaperony	accessory Sec system glycosylation chaperone GtfB		+		+	+
gtfA	glikozylotransferazy	accessory Sec system glycosyltransferase GtfA				+	
gtfB	glikozylotransferazy	accessory Sec system glycosyltransferase GtfB		+			
cps2T	glikozylotransferazy	beta 1-4 rhamnosyltransferase Cps2T					+
	glikozylotransferazy	EpsD 1 protein			+		
epsG	glikozylotransferazy	EpsG family protein		+	+		
	glikozylotransferazy	EpsH 2 protein			+		
	glikozylotransferazy	EpsJ 1 protein			+		
epsL	glikozylotransferazy	EpsL protein			+		
bcsA	glikozylotransferazy	glycosyltransferase				+	
	glikozylotransferazy	glycosyltransferase 2-like domain-containing protein	+	+	+		+
	glikozylotransferazy	glycosyltransferase family 2 protein	+	+	+		+
	glikozylotransferazy	glycosyltransferase family 4 protein	+				
rfaJ	glikozylotransferazy	glycosyltransferase family 8 protein					+

	glikozylotransferazy	glycosyltransferase family A protein				+	
rfaB	glikozylotransferazy	glycosyltransferase, family 1	+				+
wcaA	glikozylotransferazy	glycosyltransferase, family 2	+				
	glikozylotransferazy	GtfI_1 protein				+	
	glikozylotransferazy	GtfI_2 protein				+	
	glikozylotransferazy	GtfI_3 protein				+	
gtf3	glikozylotransferazy	N-acetylglucosaminyltransferase					+
wbnH	glikozylotransferazy	O-antigen biosynthesis glycosyltransferase WbnH					+
wbnJ	glikozylotransferazy	O-antigen biosynthesis glycosyltransferase WbnJ					+
	glikozylotransferazy	priming glycosyltransferase, undecaprenyl-phosphate beta-glucosephosphotransferase	+				
wcaA	glikozylotransferazy	putative glycosyltransferase	+				
epsF	glikozylotransferazy	putative glycosyltransferase EpsF					+
epsH	glikozylotransferazy	putative glycosyltransferase EpsH					+
ykoT	glikozylotransferazy	putative glycosyltransferase YkoT					+
	przenośniki/flippazy	O-antigen flippase Wzx				+	
rfbX	przenośniki/flippazy	putative O-antigen transporter					+
cpsC	regulatory syntezy	capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsC	+	+	+		+
cps2a	regulatory syntezy	exopolysaccharide biosynthesis transcriptional activator EpsA					+
cpsD	regulatory syntezy	Tyrosine-protein kinase CpsD			+	+	+
dAP2	syntazy	dextranucrase	+			+	
gtfA	syntazy	sucrose phosphorylase					+

Załącznik C.

Tabela C1. Względna obfitość poszczególnych grup taksonomicznych mikroorganizmów glebowych (%) dla gleby K2M przed i po inokulacji szczepami bakteryjnymi.

Klasa bakterii	K2M-2042P	K2M-3894	K2M-3901	K2M-3905	K2M-4214	K-K2M
Alphaproteobacteria	25.54	28.12	29.15	25.80	26.70	31.13
Vicinamibacteria	12.10	11.95	11.50	11.24	11.55	13.02
Gammaproteobacteria	8.61	8.42	8.58	8.58	10.24	8.69
Acidobacteriae	10.35	10.75	11.26	10.45	9.22	9.49
Bacilli	8.06	7.29	7.52	8.08	6.09	10.41
Gemmatimonadia	9.70	6.61	5.81	9.37	6.37	2.66
Verrucomicrobiia	8.81	7.60	7.10	7.90	9.33	2.37
Planctomycetes	3.16	3.23	2.47	3.45	3.04	3.65
Phycisphaerae	3.03	3.33	2.81	3.34	2.52	3.07
KD4-96	2.62	3.14	3.41	2.44	3.05	2.88
Actinobacteria	1.14	1.61	1.39	1.26	1.47	2.03
Chloroflexia	1.40	1.18	1.15	1.38	1.32	1.47
Acidimicrobiia	0.70	1.06	1.50	0.91	1.37	1.68
Bacteroidia	0.61	0.63	0.70	0.55	1.25	1.13
Thermoleophilia	0.00	0.18	0.57	0.64	0.76	1.09
Nitrospiria	1.06	0.83	0.86	0.91	0.89	0.88
Myxococcia	0.00	0.13	0.08	0.00	0.07	0.75
TK10	0.28	0.43	0.48	0.34	0.65	0.54
Dehalococcoidia	0.00	0.48	0.44	0.19	0.31	0.20
Saccharimonadia	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.23
Clostridia	0.11	0.00	0.17	0.04	0.25	0.15
Actinomycetota (uncl.)	0.17	0.08	0.08	0.17	0.11	0.16
Gitt-GS-136	0.07	0.23	0.43	0.04	0.10	0.15
JG30-KF-CM66	0.00	0.16	0.07	0.05	0.22	0.06
Ktedonobacteria	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00
Anaerolineae	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00

Tabela C2. Względna obfitość poszczególnych grup taksonomicznych mikroorganizmów glebowych (%) dla gleby KC1 przed i po inokulacji szczepami bakteryjnymi.

Klasa bakterii	KC1-2042P	KC1-3894	KC1-3901	KC1-3905	KC1-4214	K-KC1
Alphaproteobacteria	27.35	22.18	25.16	27.76	27.76	30.90
Vicinamibacteria	18.92	21.49	20.09	18.72	18.45	18.76
Blastocatellia	5.16	7.66	6.72	6.74	5.83	7.67
Gammaproteobacteria	13.07	10.73	10.33	11.10	9.25	7.53
Planctomycetes	3.20	3.64	3.79	4.40	4.89	5.33
Acidobacteriae	5.18	4.62	5.26	4.23	5.44	5.33
Bacilli	4.53	3.92	3.80	2.10	4.07	4.24
Verrucomicrobiia	4.04	6.71	6.11	5.90	5.03	3.51
KD4-96	2.31	2.49	2.21	2.17	2.01	2.67
Nitrospiria	1.62	2.02	1.94	1.65	2.10	1.64
Gemmatimonadia	2.67	3.23	2.80	2.54	2.69	1.73
Bacteroidia	3.48	2.06	2.42	5.08	2.70	1.67
Acidimicrobiia	0.91	1.10	1.03	1.24	1.03	1.13
Chloroflexia	0.60	0.22	0.61	0.62	1.02	0.59
Thermoleophilia	0.36	0.23	0.42	0.18	0.51	0.24
MB-A2-108	0.57	0.44	0.51	0.56	0.55	0.46
Actinomycetota (uncl.)	0.29	0.61	0.21	0.38	0.12	0.40
Myxococcia	0.17	0.19	0.40	0.29	0.41	0.31
Dehalococcoidia	0.16	0.84	0.44	0.07	0.26	0.06
Subgroup 22	0.07	0.08	0.20	0.00	0.00	0.06
Polyangiia	0.16	0.10	0.04	0.00	0.00	0.00
Oligoflexia	0.31	0.00	0.17	0.13	0.00	0.00
Subgroup 5	0.07	0.25	0.20	0.07	0.17	0.00
Chlamydiia	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
niezidentyfikowane	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.03

Załącznik D.

Tabela D1. Zestawienie podstawowych parametrów genomowych, cech adnotacji oraz elementów związanych z opornością na substancje przeciwdrobnoustrojowe, mobilnością genetyczną i obecnością profagów w genomach szczepów *Comamonas testosteroni* KKP 1144 oraz *Sphingomonas* sp. KKP 4232, z uwzględnieniem chromosomów i plazmidów.

Kategoria	Parametr	KKP 1144		KKP 4342				
		Genom	Plazmid	Genom	Plazmid 1	Plazmid 2	Plazmid 3	Plazmid 4
Podstawowe informacje o genomie	Wielkość genomu (pz)	5 780 814	28 633	3 594 184	214 033	15 218	43 878	63 089
	Zawartość GC (%)	61,76	64,35	67,34	65,27	60,52	62,21	64,48
Adnotacja genomowa	Łączna liczba zannotowanych elementów	5 329	49	3 380	247	15	46	54
	Geny kodujące (CDS)	5 152	47	3 308	245	15	45	53
	tRNA	108	0	52	0	0	0	0
	tmRNA	1	0	1	0	0	0	0
	rRNA	27	0	6	0	0	0	0
	ncRNA	9	1	4	0	0	0	0
	Regiony ncRNA	31	1	8	2	0	1	1
	Loci CRISPR	0	0	0	0	0	0	0
	sORFs	0	0	0	0	0	0	0
	Luki (gaps)	0	0	0	0	0	0	0
	Początki replikacji (oriC / oriV / oriT)	1/0/0	0/0/0	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
Geny oporności	Łączna liczba wykrytych genów oporności	4	0	2	0	0	0	0
	Identyfikacja genów	adeF (2x), FosA8, qacJ		vanY gene in vanB cluster, adeF				
Mobilne Elementy Genetyczne	Łączna liczba elementów (mobileOG)	170	19	114	43	8	5	10
	Integracja/ekscyzja	81	7	45	29	3	3	6
	Replikacja/rekombinacja/naprawa	30	1	26	5	0	2	5
	Związane z fagiem	26	1	14	0	0	0	0
	Stabilność/transfer/obrona	8	3	10	4	3	0	0
	Transfer	25	7	19	5	2	0	5
Regiony profagowe	Liczba wykrytych regionów profagowych	3	0	2	0	0	0	0
	Geny związane z fagiem	131	0	40	0	0	0	0
	Łączna liczba elementów profagowych	134	0	42	0	0	0	0



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

ZM

**Zakład
Mikrobiologii**

Kierownik Zakładu

dr inż. Justyna Nasilowska

telefon: +48 22 606 36 74

e-mail:

justyna.nasilowska@ibprs.pl

ZF

**Zakład
Technologii
Fermentacji**

Kierownik Zakładu

dr rer. nat. inż. Renata Choińska

telefon: +48 22 606-36-47

e-mail:

renata.choinska@ibprs.pl

ZB

**Zakład
Biotechnologii**

Kierownik Zakładu

dr hab. Edyta Juszcuk-Kubiak,

prof. IBPRS-PIB

telefon: +48 603 507 330

e-mail:

edyta.juszcuk-kubiak@ibprs.pl