

Streszczenie

Symbioza roślin bobowatych (*Fabaceae*) z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny (ryzobiami) zapewnia roślinom obfite źródło azotu, co sprawia, że ich uprawa może być niezależna od nawozów syntetycznych. Rośliny bobowate nie tylko wzbogacają glebę w związki azotowe, lecz także wpływają korzystnie na strukturę i właściwości fitosanitarne gleby, dzięki czemu niektóre ich gatunki znajdują zastosowanie w procesach rekultywacyjnych. Na terenach zdegradowanych wskutek działalności przemysłowej lub wydobywczej często dochodzi do akumulacji jonów metali ciężkich w glebie, co pociąga za sobą negatywne zmiany w składzie ilościowym i jakościowym mikroflory glebowej. Zubożenie lub spadek aktywności mikroflory glebowej zmniejsza skuteczność zabiegów rekultywacyjnych prowadzonych z udziałem roślin, co ma szczególne znaczenie w przypadku roślin bobowatych, w dużym stopniu uzależnionych od symbiozy z ryzobiami. Rozwiązaniem problemu może być używanie technik rekultywacyjnych wykorzystujących rośliny oraz kultury mikroorganizmów wspomagające wzrost roślin, charakteryzujące się podwyższonym poziomem odporności na działanie jonów metali ciężkich. W przypadku roślin bobowatych i ryzobiów uzasadnione jest także stosowanie dodatkowych stymulatorów procesów symbiotycznych, takich jak czynniki Nod, dzięki którym rośliny tworzą większą liczbę brodawek korzeniowych i mogą być zasiedlone przez większą liczbę symbiotycznych bakterii odpowiedzialnych za dostarczanie związków azotowych.

Celem pracy było stworzenie kolekcji szczepów ryzobiowych pochodzących z terenów skażonych jonami kadmu, cynku i ołowiu i wyselekcjonowanie szczepu, który byłby zdolny do efektywnego wspomaganie wzrostu roślinnego gospodarza w warunkach skażenia jonami Zn^{2+} , Cd^{2+} i/lub Pb^{2+} .

Stworzono kolekcję zawierającą 62 szczepy bakterii izolowanych z brodawek roślin bobowatych (koniczyna, komonica, przelot) zasiedlających hałdę odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu. Stosując techniki PCR-RFLP i AFLP wykazano duży stopień zróżnicowania genetycznego kolekcji. Badanie poziomu tolerancji szczepów na jony Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} wykonane trzema metodami (testy płytkowe, hodowlane, mikroskopowe) pozwoliło na wyselekcjonowanie 6 szczepów charakteryzujących się najwyższą opornością na badane jony metali ciężkich. Badania genetyczne z wykorzystaniem sekwencjonowania fragmentów 7 genów

metabolizmu podstawowego wykonane dla wybranych szczepów izolowanych z tkanek różnych roślinnych gospodarzy pozwoliły na zaklasyfikowanie tych szczepów jako *Rhizobium leguminosarum* lub *Agrobacterium* sp., a wyniki testów fizjologicznych (testy BIOLOG) były zgodne z wynikami badań genetycznych.

Na podstawie wyników testów laboratoryjnych badających wpływ wybranych szczepów na parametry symbiotyczne (liczba brodawek, masa roślin) wybrano szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 jako model do dalszych badań – był to szczep wykazujący wielokrotnie wyższą tolerancję na jony Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} niż szczepy laboratoryjne, zdolny do efektywnego brodawkowania koniczyny białej i czerwonej skutkującego istotnym zwiększeniem masy zakażonych roślin. Z hodowli szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 wyizolowano preparat zawierający czynniki Nod, a następnie w testach z użyciem roślin określono efektywną dawkę tego biopreparatu, powodującą istotne zwiększenie liczby brodawek na korzeniach traktowanych roślin.

Efekt działania szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 i pochodzącego z niego biopreparatu zbadano w doświadczeniach wazonowych w których zastosowano podłoża skażone różnymi stężeniami Zn^{2+} , Cd^{2+} i/lub Pb^{2+} . Wykazano, że zastosowanie *Rhizobium leguminosarum* TR4 lub *Rhizobium leguminosarum* TR4 i pochodzącego z niego biopreparatu zawierającego czynniki Nod istotnie zwiększa liczbę brodawek oraz świeżą masę korzeni i pędów inokulowanych roślin przy różnych stężeniach Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} , oraz w przypadku zastosowania mieszanego skażenia podłoża za pomocą Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} łącznie. Najlepszy efekt dotyczący brodawkowania i wzrostu roślinnego gospodarza obserwowano po inokulacji roślin szczepem i biopreparatem zawierającym czynniki Nod, zarówno w przypadku zastosowania skażenia podłoża jednym jak i trzema różnymi jonami metali ciężkich.

Zastosowanie szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 i jego czynników Nod umożliwiło wydatne zmniejszenie niekorzystnego efektu wywieranego na wzrost roślin przez jony Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} , dlatego można zasugerować stosowanie wspomnianego szczepu do produkcji biopreparatu przeznaczonego do inokulacji nasion różnych gatunków koniczyny używanej w praktykach bioremediacyjnych na terenach skażonych kadmem, cynkiem i/lub ołowiem. Z uwagi na możliwość praktycznego wykorzystania opisanych w pracy wyników, szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 i jego zastosowanie stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego P.424967 (Urząd Patentowy RP, 20.03.2018).