

Streszczenie

Rośliny bobowate (*Fabaceae*) są organizmami odgrywającymi istotną rolę w życiu człowieka. Stanowią one bogate źródło białka, służą jako nawozy naturalne oraz polepszają żyzność gleb. W warunkach niedoboru azotu rośliny bobowate są zdolne do nawiązywania symbiozy z bakteriami glebowymi, które w procesie tzw. biologicznego wiązania azotu (ang. Biological Nitrogen Fixation, BNF), przekształcają wolny azot atmosferyczny w formy amonowe dostępne dla roślin. Do najważniejszej grupy mikroorganizmów zdolnej do przeprowadzania BNF należą bakterie z rodziny *Rhizobiaceae*, zwanymi powszechnie ryzobiami.

Na symbiozę pomiędzy roślinami bobowatymi a ryzobiami wpływa wiele czynników środowiskowych, takich jak: temperatura, pH, zasolenie gleby, potencjał oksydoredukcyjny oraz jony metali ciężkich. Wśród tych czynników najgroźniejszym w kontekście zanieczyszczenia środowiska oraz zdrowia człowieka są metale ciężkie, których obecność w glebie spowodowana jest głównie stale postępującą industrializacją oraz urbanizacją. Akumulacja metali ciężkich w roślinach uprawnych prowadzi do zahamowania ich wzrostu oraz symbiozy z bakteriami wiążącymi azot. Na szczególną uwagę zasługuje tutaj cynk, który w stężeniach fizjologicznych pełni rolę mikroelementu i jest niezbędny do prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania, zarówno roślin, jak i ryzobiów. Natomiast jego stężenie przekraczające zapotrzebowanie organizmów na ten pierwiastek prowadzi do zaburzeń w procesach metabolicznych zachodzących w komórkach. W konsekwencji może dochodzić do ich śmierci. Aby przetrwać niekorzystne warunki oraz zachować zdolność do nawiązywania interakcji symbiotycznych z roślinami, ryzobia wykształciły szereg mechanizmów obronnych, z których do najważniejszych należy zdolność produkcji oraz sekrecji do otoczenia znacznej ilości polisacharydu (EPS). Polimer ten stanowi naturalną barierę chroniącą bakterie wolnożyjące przed niekorzystnymi warunkami panującymi w glebie, a także jest niezbędnym czynnikiem umożliwiającym nawiązanie symbiozy z gospodarzem roślinnym. Co więcej, właściwości EPS dają możliwość na wykorzystanie ryzobiów w różnych technikach remediacyjnych, takich jak bioremediacja, czy też jako organizmy wspomagające wzrost roślin (ang. plant growth promoting rhizobacteria, PGPR).

Dotychczas nie przeprowadzono kompleksowych badań dotyczących wpływu jonów cynku na własności fenotypowe oraz symbiotyczne ryzobiów, a także niewiele jest informacji na temat roli, jaką może pełnić EPS w ochronie tych bakterii przed stresem wywołanym obecnością metali ciężkich w glebie. Dlatego też, przedmiotem badań opisanych w niniejszej rozprawie było ustalenie roli tego polimeru w adaptacji bakterii

Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* do stresu środowiskowego wywołanego obecnością jonów cynku oraz przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki wpływu jonów Zn^{2+} na komórki ryzobiów i układ symbiotyczny ryzobia-rośliny bobowate, a także określenie wydajności biosorpcji tych jonów przez cząsteczki EPS.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że obecność jonów Zn^{2+} negatywnie wpływa na wiele procesów fizjologicznych oraz własności fenotypowych komórek ryzobiów, ale również stymuluje ich mechanizmy ochronne. Wykazano, że jony cynku hamują wzrost badanych mikroorganizmów oraz wpływają negatywnie na ich przeżywalność, jak również powodują obniżenie ruchliwości i wydajności oddychania komórek ryzobiów. Ustalono, że spośród testowanych bakterii, najbardziej odporne na szkodliwe działanie cynku okazały się być szczepy, które produkowały zwiększoną ilość EPS [Rt24.2(pBA1) i Rt24.2(pBR1)] w porównaniu do szczepu dzikiego (Rt24.2). Ponadto, zaobserwowano, że obecność jonów Zn^{2+} w środowisku wzrostu stymuluje bakterie do zwiększonej produkcji EPS i innych polisacharydów powierzchniowych, tworzenia większej ilości biofilmu, a także działa na wzrost aktywności enzymów komórkowych odpowiedzialnych za usuwanie wolnych rodników. Stwierdzono także, że wpływ czynnika stresowego na właściwości fizykochemiczne komórek bakterii, szczególnie na ich ruchliwość elektroforetyczną, zależy od ilości syntetyzowanego EPS, fazy wzrostu bakterii, liczby martwych komórek oraz stężenia jonów cynku i pH środowiska. Wyniki badań pokazały również, że obecność jonów Zn^{2+} istotnie obniża efektywność symbiozy szczepów ryzobiowych z koniczyną łąkową, działając negatywnie zarówno na mikrosymbionta, jak i gospodarza roślinnego. Zauważono, że szczepy nadprodukujące EPS charakteryzowały się dużo lepszą adhezją do korzeni koniczyny oraz efektywnością symbiozy. Analizy mające na celu określenie wydajności biosorpcji jonów cynku przez EPS wyizolowany ze szczepu Rt24.2 wykazały, że polimer ten posiada dobre właściwości sorpcyjne.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że EPS pełni kluczową rolę w adaptacji wolnożyjących bakterii *R. leguminosarum* bv. *trifolii* do warunków stresowych wywołanych obecnością jonów cynku, jak również podczas ich symbiozy z koniczyną łąkową. Nadprodukcja EPS zapewnia ryzobiom skuteczniejszą adaptację do warunków stresowych, a także zwiększa możliwość ich zastosowania w procesach remediacji. Co więcej, dobre właściwości sorpcyjne EPS dają możliwość zastosowania go w biotechnologii, jako polimeru wydajnie wiążącego jony Zn^{2+} .

Słowa kluczowe: symbioza ryzobia-rośliny bobowate, metale ciężkie, cynk, egzopolisacharyd

Magdalena Kopyńska