

# Kompleksowa charakterystyka szczepów bakteryjnych wyizolowanych z ryzosfery roślin rosnących na składowisku odpadów pohutniczych

Sylwia Siebielec<sup>1</sup>, Małgorzata Woźniak<sup>1</sup>, Artur Nowak<sup>2</sup>, Grzegorz Siebielec<sup>1</sup>, Piotr Sugier<sup>2</sup>, Jolanta Jaroszuk Ścisiel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa–Państwowy Instytut Badawczy w Puławach  
<sup>2</sup>Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie



**Projekt INNO-MIK tworzy innowacyjne technologie produkcji bionawozów, sięgając jednocześnie do podstaw zrównoważonego rolnictwa i rozwiązań opartych na naturze. Łączymy różne strategie przeciwdziałania suszy i wdrażania przyjaznego środowisku rolnictwa w jednej technologii: wykorzystanie potencjału bakterii wspomagających rozwój i odporność roślin, stymulacyjny efekt bionawozów oraz zwiększanie zdolności retencyjnych gleb poprzez wprowadzanie do niej materii organicznej. W projekcie rozwijamy technologie otrzymywania trzech rodzajów bionawozów na bazie: płynnego pofermentu oraz kompostu i toryfikatu w formie stałej, dla zapewnienia szerszego wykorzystania odpadów organicznych i zapewnienia szerszego wachlarza zastosowań tych innowacyjnych bionawozów. We wszystkich przypadkach bionawozy będą nośnikiem bakterii wspomagających rozwój roślin w warunkach suszy. **Odporność upraw na suszę i regeneracja gleb to większy potencjał produkcyjny rolnictwa i każdego gospodarstwa.****

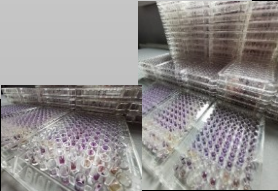
Celem badań była kompleksowa charakterystyka szczepów bakteryjnych wyizolowanych z ryzosfery roślin rosnących na zrekultywowanych, silnie zanieczyszczonych składowiskach odpadów pohutniczych. Szczepy zostały przebadane pod kątem szeregu mechanizmów potencjalnie promujących wzrost roślin. Aktywność szczepów oceniano na podstawie zdolności do syntezy związków podobnych do IAA (0 - 60,1 µg/ml); solubilizacji fosforanów (indeks SI 2,23 - 4,02); zdolności do wiązania azotu atmosferycznego (8,85 - 341. 9 mg/ml po 72 h), produkcji deaminazy ACC (0,81 - 5,61 µmol α-KB/mg białka h), polisacharydów (0,07 - 0,45 g EPS/L po 5 dniach) i rozwoju biofilmu (słaba do silnej produkcja biofilmu w zależności od dnia obserwacji). Dodatkowo przeprowadzono testy aktywności metabolicznej poszczególnych szczepów w oparciu o test GEN III MicroPlate. Przeprowadzone badania pozwoliły na pogrupowanie szczepów bakteryjnych pod względem zdolności do przeprowadzania określonych grup procesów. Badanie pokazuje, że odpady hutnicze mogą być źródłem szczepów należących do PGPR, które mogą być potencjalnie przydatne w opracowywaniu biopreparatów zwiększających wzrost roślin i odporność na stresy środowiskowe lub klimatyczne w rolnictwie i rekultywacji.

## Protokół prowadzonych badań:

- Pobieranie próbek bakterii, izolacja bakterii i ich przechowywanie,
- Identyfikacja bakterii,
- Profilowanie fenotypowe przy użyciu mikroplitek BiologTM GEN III,
- Synteza związków podobnych do IAA,
- Potencjał rozpuszczania fosforanów,
- Zdolność do wiązania azotu atmosferycznego,
- Zdolność do produkcji biofilmu i egzopolisacharydów.

Table. Identification of rhizosphere bacteria by 16S rRNA gene sequence analysis.

| Number | Isolate | Closest known relative     | Phylum          | GenBank  |
|--------|---------|----------------------------|-----------------|----------|
| 1      | LC6B    | Microvira sp               | Pseudomonadota  | PP529722 |
| 2      | LC6C    | Pseudomonas sp.            | Protoeobacteria | PP529723 |
| 3      | LC7     | Burkholderia sp.           | Protoeobacteria | PP529724 |
| 4      | LC8     | Pseudomonas caspiana       | Protoeobacteria | PP529725 |
| 5      | LC9     | Rhizobium leguminosarum    | Protoeobacteria | PP529726 |
| 6      | LC11    | Phyllobacterium sp.        | Pseudomonadota  | PP529727 |
| 7      | LC12    | Rhizobium jaguaris         | Protoeobacteria | PP529728 |
| 8      | LC13    | Rhizobium alarii           | Protoeobacteria | PP529729 |
| 9      | LC14    | Rhizobium alarii           | Protoeobacteria | PP529730 |
| 10     | LC16    | Phyllobacterium ifriqiense | Pseudomonadota  | PP529731 |
| 11     | LC17    | Olivibacter soli           | Bacteroidota    | PP529732 |
| 12     | LC18    | Mesorhizobium sp.          | Pseudomonadota  | PP529733 |
| 13     | LC19    | Pseudomonas sp.            | Protoeobacteria | PP529734 |
| 14     | LC21    | Pseudomonas sp.            | Protoeobacteria | PP529735 |
| 15     | LC22    | Inquilinus ginsengisoli    | Pseudomonadota  | PP529736 |



Laboratorium mikrobiologiczne IUNG-PIB



| Isolate no. | IAA-like compounds production (µg/mL) | Phosphate solubilization index of PSB (SI) | Zone size <sup>±</sup> |
|-------------|---------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|
| LC6B        | 10.39 <sup>bc</sup> ±2.91             | 2.66 <sup>bc</sup> ±0.15                   | middle                 |
| LC6C        | 0.00 <sup>a</sup> ±0.00               | 3.28 <sup>abc</sup> ±0.25                  | middle                 |
| LC7         | 1.35 <sup>a</sup> ±0.11               | 2.33 <sup>bc</sup> ±0.17                   | middle                 |
| LC8         | 12.24 <sup>bcd</sup> ±1.30            | 2.23 <sup>±</sup> ±0.06                    | middle                 |
| LC9         | 14.82 <sup>bcd</sup> ±1.08            | 2.43 <sup>bc</sup> ±0.13                   | middle                 |
| LC11        | 24.87 <sup>b</sup> ±3.67              | 3.16 <sup>abc</sup> ±0.55                  | middle                 |
| LC12        | 25.01 <sup>b</sup> ±7.53              | 2.31 <sup>bc</sup> ±0.17                   | middle                 |
| LC13        | 6.80 <sup>cd</sup> ±0.62              | 3.31 <sup>ab</sup> ±0.30                   | middle                 |
| LC14        | 2.90 <sup>cd</sup> ±0.14              | 2.26 <sup>bc</sup> ±0.21                   | middle                 |
| LC16        | 3.92 <sup>cd</sup> ±1.31              | 3.27 <sup>abc</sup> ±0.15                  | middle                 |
| LC17        | 8.99 <sup>cd</sup> ±1.20              | 2.56 <sup>bc</sup> ±0.20                   | middle                 |
| LC18        | 60.11 <sup>a</sup> ±0.02              | 4.02 <sup>a</sup> ±0.73                    | high                   |
| LC19        | 18.32 <sup>bc</sup> ±0.98             | 2.78 <sup>bc</sup> ±0.29                   | middle                 |
| LC21        | 11.11 <sup>bcd</sup> ±0.50            | 2.27 <sup>bc</sup> ±0.13                   | middle                 |
| LC22        | 10.67 <sup>bcd</sup> ±0.86            | 2.24 <sup>±</sup> ±0.13                    | middle                 |

Table. Production of indole-3-acetic acid (IAA)-like compounds and phosphate solubilisation activity by the tested strains. The values presented are means and standard deviations (SD; n = 3) and Indicators characterizing activity of the tested strains in the carbon utilization and diversity of carbon sources. Means and standard deviation (SD; n = 3) are presented.



| Isolate no. | Strain                     | AWCD                        | Shannon diversity index (H) | Evenness index (E)        | Simpson diversity index (D) |
|-------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| LC6B        | Microvira sp               | 26.37 <sup>cd</sup> ±6.06   | 3.88 <sup>de</sup> ±0.14    | 0.88 <sup>a</sup> ±0.02   | 0.97 <sup>a</sup> ±0.00     |
| LC6C        | Pseudomonas sp.            | 133.87 <sup>ab</sup> ±3.60  | 4.18 <sup>bcd</sup> ±0.01   | 0.93 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC7         | Burkholderia sp.           | 118.27 <sup>ab</sup> ±5.25  | 4.17 <sup>abcd</sup> ±0.01  | 0.95 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC8         | Pseudomonas caspiana       | 124.93 <sup>ab</sup> ±5.36  | 4.16 <sup>abcd</sup> ±0.02  | 0.93 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC9         | Rhizobium leguminosarum    | 41.00 <sup>cd</sup> ±8.82   | 4.46 <sup>a</sup> ±0.03     | 0.97 <sup>a</sup> ±0.00   | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC11        | Phyllobacterium sp.        | 56.05 <sup>cd</sup> ±7.03   | 3.95 <sup>cd</sup> ±0.15    | 0.89 <sup>cd</sup> ±0.00  | 0.97 <sup>bc</sup> ±0.00    |
| LC12        | Rhizobium jaguaris         | 15.03 <sup>cd</sup> ±2.48   | 3.69 <sup>cd</sup> ±0.10    | 0.85 <sup>cd</sup> ±0.01  | 0.96 <sup>cd</sup> ±0.00    |
| LC13        | Rhizobium alarii           | 113.15 <sup>ab</sup> ±5.40  | 4.16 <sup>abcd</sup> ±0.03  | 0.92 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC14        | Rhizobium alarii           | 88.25 <sup>bc</sup> ±5.90   | 4.00 <sup>bcd</sup> ±0.07   | 0.90 <sup>cd</sup> ±0.01  | 0.97 <sup>abc</sup> ±0.00   |
| LC16        | Phyllobacterium ifriqiense | 97.45 <sup>abc</sup> ±12.44 | 4.05 <sup>bcd</sup> ±0.10   | 0.91 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>abc</sup> ±0.00   |
| LC17        | Olivibacter soli           | 130.77 <sup>ab</sup> ±26.68 | 4.29 <sup>abc</sup> ±0.13   | 0.94 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC18        | Mesorhizobium sp.          | 95.71 <sup>abc</sup> ±11.82 | 4.18 <sup>abcd</sup> ±0.05  | 0.94 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC19        | Pseudomonas sp.            | 103.60 <sup>ab</sup> ±16.23 | 4.15 <sup>abcd</sup> ±0.09  | 0.91 <sup>cd</sup> ±0.01  | 0.98 <sup>abc</sup> ±0.00   |
| LC21        | Pseudomonas sp.            | 136.83 <sup>a</sup> ±8.85   | 4.21 <sup>abc</sup> ±0.03   | 0.94 <sup>abc</sup> ±0.00 | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |
| LC22        | Inquilinus ginsengisoli    | 40.43 <sup>a</sup> ±6.11    | 4.41 <sup>ab</sup> ±0.04    | 0.96 <sup>ab</sup> ±0.01  | 0.98 <sup>ab</sup> ±0.00    |

Kolekcja bakterii powstała w ramach realizacji projektu LIDER XII INNO-MIK



Badanie doniczkowe zostało przeprowadzone w 2022 roku w szklarni w celu oceny wpływu inokulacji gleby trzema wybranymi izolatami (LC7 - *Burkholderia* sp.; LC8 - *Pseudomonas caspiana*; LC11 - *Phyllobacterium* sp.). Doświadczenie przeprowadzono w kontrolowanych warunkach (dodatkowe oświetlenie i temperatura 27/20 C dzień/noc) w plastikowych doniczkach o pojemności 3 l z trzema powtórzeniami dla każdej kombinacji przy 2 poziomach wilgotności gleby. Gleba miała strukturę gliny piaszczystej, zawierała 0,69% węgla organicznego i charakteryzowała się neutralnym pH (6,5 w zawiesinie wodnej). Gleba miała średni poziom dostępnego fosforu (12,3 mg/100 g) zgodnie z metodą Egnera-Riehma. Ustalono dwa poziomy reżimu wilgotności, w tym warunki optymalne (Ctrl) (utrzymywane na poziomie 60% polowej zdolności zatrzymywania wody, FWHC) i deficyt wilgotności gleby (utrzymywany na poziomie 40% FWHC) przez cały czas trwania doświadczenia. Pšenica została wybrana jako roślina testowa jako uprawa o dużym znaczeniu zarówno w Polsce, jak i na świecie. Ponadto jest to uprawa wrażliwa na suszę, na którą znaczący wpływ mają niewystarczające opady w okresie wegetacji. Test doniczkowy był prowadzony przez 16 tygodni z trzema powtórzeniami dla każdej kombinacji. Każda doniczka została zaszczipiona szczepami bakteryjnymi zawieszonymi w 10mM MgSO4 (jednorodna gęstość komórek - 10<sup>7</sup> CFU/ml) w okresie kiełkowania (około 3 tygodnie po wysiewie) za pomocą 100 ml każdej zawiesiny bakteryjnej. Taką samą ilość sterylnego 10mM MgSO4 dodano do nieinokulowanych doniczek. Inokulację powtórzono 3 tygodnie później, stosując tę samą procedurę. Świeże kultury szczepów bakteryjnych hodowano w płynnych pożywkach. Hodowle zakładano na 24 godziny i inkubowano w temperaturze 28°C w inkubatorze New Brunswick Scientific (Excella E24 Incubator Shaker Series). Pięć mililitrów wstępnej hodowli zostało przeniesione do świeżego płynnego podłoża, odpowiedniego dla danego szczepu, i inkubowane przez 12 godzin w temperaturze 28°C. Następnie biomasa bakteryjną zebrano przez odwirowanie (6000 obr./min, 15 min), przemyto sterylnym 10 mM MgSO4 i ponownie zawieszono w 10 mM MgSO4 do OD660 1,0 (około 107 komórek na ml). Eksperyment trwał około 3 miesięcy, po tym czasie rośliny zostały zebrane, wysuszone, a korzenie i części nadziemne zważone. Próbkę gleby przeznaczono do analiz aktywności enzymów glebowych i wybranych parametrów chemicznych.