



Identyfikacja mikroorganizmów ze składowiska odpadów pohutniczych metodą sekwencjonowania 16S rDNA oraz genotypowanie szczepów metodą PCR MP.

Sylvia Siebielec¹, Grzegorz Siebielec²

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
¹Zakład Mikrobiologii Rolniczej
²Zakład Gleboznawstwa Erozi i Ochrony Gleb



Składowiska odpadów pohutniczych o ekstremalnych zawartościach cynku, ołowiu, kadmu i arsenu stanowią poważny problem na obszarze Górnego Śląska. Aktywność bakterii wiążących N jest bardzo ważna dla rozwoju pokrywy roślinnej na tych terenach. Próbkę glebową, z których wyizolowano bakterie, a następnie przeprowadzono ich identyfikację genetyczną, pobrano w roku 2016 z głębokości 0-20 cm w 3 powtórzeniach w wieloletnim doświadczeniu polowym (rekultywacja w 1997 r.) na składowisku w Piekarach Śląskich. Próbkę zostały pobrane z terenu podzielonego na 6 transektów oznaczających inną kombinacją dawek osadu ściekowego i wapna odpadowego.

Analiza mikrobiologiczna

- Ogólna liczebność bakterii wiążących azot wykonano na pożywce według Fengerlowa, 1965
- Płytki inkubowano w temperaturze 28°C, natomiast liczbę kolonii drobnoustrojów hodowanych na poszczególnych pożywkach określono po upływie 5 dni
- Następnie oznaczono liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk), które wyrosły na określonym podłożu na płytkach Petriego

Identyfikacja gatunkowa:

- **Izolacja genomowego DNA szczepów z pojedynczej kolonii**
- Izolacja została przeprowadzona z użyciem zestawu EXTRACTME GENOMIC DNA MICRO SPIN KIT
- **Amplifikacja PCR, oczyszczenie produktu PCR, elektroforeza agarozowa**
- Amplifikacja produktów w rejonie 16S rDNA ze starterami dającymi produkt PCR o wielkości ok. 1400 pz, została przeprowadzona z wykorzystaniem odczynników do reakcji PCR. Mieszaniny reakcyjne po reakcji PCR zostały rozdzielone w 1,5% żelu agarozowym w celu kontroli jakości amplifikowanych produktów. Produkty PCR zostały oczyszczone z wykorzystaniem zestawu EXTRACTME DNA CLEAN-UP KIT (BLIRT S.A.).
- **Sekwencjonowanie produktów PCR**
- Produkty PCR zostały zsekwencjonowane przy użyciu 3730 XL DNA Analyzer firmy Life Technologies (dwukierunkowe sekwencjonowanie)
- Wyniki zostały zanalizowane z wykorzystaniem bazy danych NCBI oraz oprogramowania BLAST.

Metoda PCR MP:

- **Izolacja DNA z bakterii.**
- DNA wyizolowano przy użyciu zestawu do izolacji totalnego DNA z bakterii EXTRACTME DNA BACTERIA KIT. Stężenie i czystość wyizolowanego DNA zostało określone przy użyciu spektrofotometru Nanodrop 1000. W wyniku izolacji uzyskiwano DNA genomowe w stężeniu od 10-200 ng/μl. Dodatkowo jakość DNA została potwierdzona metodą elektroforezy agarozowej.
- **Optymalizacja metody PCR MP dla szczepów *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas sp.*, *NBRC12994*, *Azomonas macrocytogenes*.**
- Dobrano optymalne warunki dla metody PCR MP, profil temperaturowo-czasowy oraz warunki rozdziału elektroforetycznego. W badaniach wykorzystano zestaw PCR MP KIT (BLIRT S.A.).
- Etap optymalizacji metody PCR MP przeprowadzono z użyciem szczepu referencyjnego *Azotobacter chroococcum*.
- **Różnicowanie metodą PCR MP**
- Wyizolowane DNA zostało poddane różnicowaniu metodą PCR MP z wykorzystaniem zestawu PCR MP KIT, stosując zoptymalizowane warunki temperaturowo-czasowe. Produkty PCR zostały rozdzielone w 6% żelu poliakrylamidowym (czas rozdziału 16h, 30V).
- **Analiza wyników typowania genetycznego metodą PCR MP**
- Wzory elektroforetyczne uzyskane metodą PCR MP porównano z zastosowaniem programu FQquest TM II. Wzory elektroforetyczne porównywane były względem siebie na podstawie markera wielkości DNA M100-1000 (BLIRT S.A.). Podobieństwo profili elektroforetycznych uzyskanych dla poszczególnych izolatów wyznaczono z zastosowaniem współczynnika podobieństwa Dice'a. Dendrogram skonstruowano z zastosowaniem metody UPGAMA.

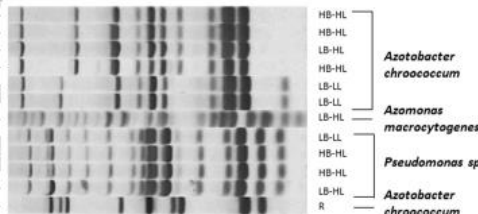
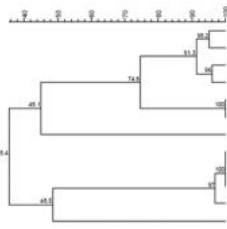
	Kombinacja		Identyfikacja gatunkowa
	Osad ściekowy	Wapno odpadowe	
0	Brak nawożenia	Brak nawożenia	Brak
I	150 t/ha	0	Brak
II	300 t/ha	0	Brak
III	150 t/ha	100 t/ha	<i>Azotobacter chroococcum</i>
IV	300 t/ha	100 t/ha	<i>Pseudomonas sp.</i>
V	150 t/ha	200 t/ha	<i>Azomonas macrocytogenes</i>
VI	300 t/ha	200 t/ha	<i>Azotobacter chroococcum</i>



Cieplarka do wzrostu bakterii



Kolonie bakterii *Azomonas macrocytogenes*



W wyniku różnicowania badanych szczepów metodą PCR MP uzyskano 7 różnych profili elektroforetycznych (podobieństwo <100%), zawierających od 9 do 23 prążków.

Całkowite genetyczne podobieństwo analizowanych szczepów wynosi 35,4%. Analiza statystyczna podobieństwa genetycznego pozwoliła wyodrębnić 8 grup genotypowych (poziom podobieństwa min 74,6%). W obrębie grup genotypowych poziom podobieństwa między różnymi genotypami nie przekraczał 90 %.

