



# Identyfikacja bakterii wiążących azot pochodzących ze składowiska odpadów pohutniczych metodą sekwencjonowania 16 S rDNA oraz genotypowanie szczepów metodą PCR MP



Sylvia Siebielec<sup>1</sup>, Grzegorz Siebielec<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy  
<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii Rolniczej  
<sup>3</sup>Zakład Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Granic



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 glebowe, 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 (rekułtywacja w 1997 r.) na składowisku w Piekarach Śląskich. Próbkę zostały pobrane z terenu podzielonego na 6 transektów oznaczających inną kombinację dawek osadu ściekowego i wapna odpadowego.

## Analiza mikrobiologiczna

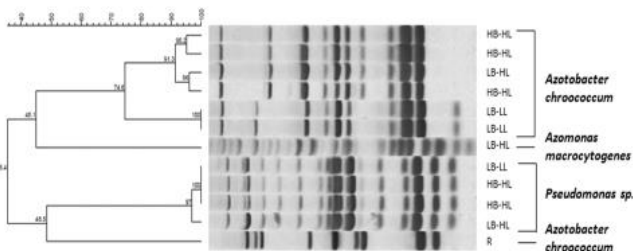
- > Ogólną liczebności bakterii wiążących azot wykonano na pożywce według Fenglerowa, 1965
- Identyfikacja gatunkowa:**
  - > Izolacja genomowego DNA szczepów z pojedynczej kolonii
  - > Amplifikacja PCR, oczyszczanie produktu PCR, elektroforeza agarozowa
  - > Sekwencjonowanie produktów PCR

## Metoda PCR MP:

- > Izolacja DNA z bakterii.
- > Optymalizacja metody PCR MP dla szczepów *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas* sp. NBRC12994, *Azomonas macrocytogenes*.
- > Różnicowanie metodą PCR MP.
- > Analiza wyników typowania genetycznego metodą PCR MP.

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

Calkowite genetyczne podobieństwo analizowanych szczepów wynosi 35,4%. Analiza statystyczna podobieństwa genetycznego pozwoliła wyodrębnić 5 grup genotypowych (poziom podobieństwa min 74,6%). W obrębie grup genotypowych poziom podobieństwa między różnymi genotypami nie przekraczał 90%.



	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</i> sp.
V	150 t/ha	1000 t/ha	<i>Azomonas macrocytogenes</i> <i>Pseudomonas</i> sp.
VI	300 t/ha	1000 t/ha	<i>Azotobacter chroococcum</i>