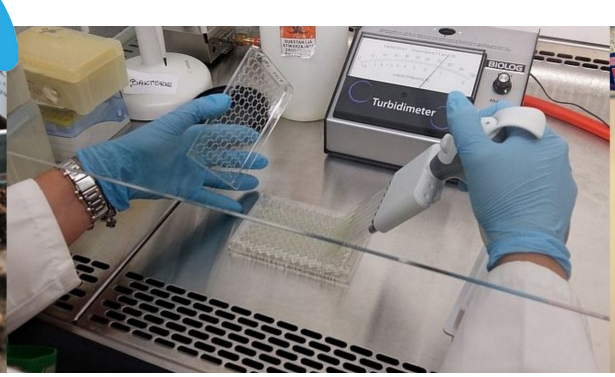
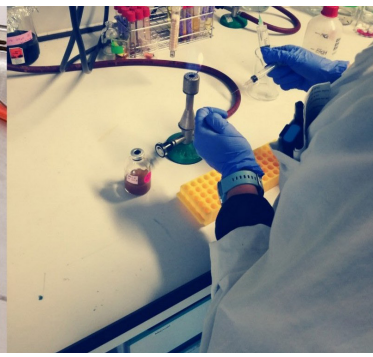
VI OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE

„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”

Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

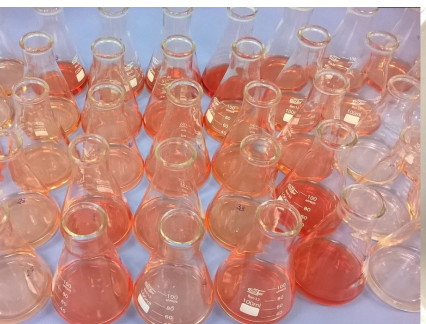
POSTERY

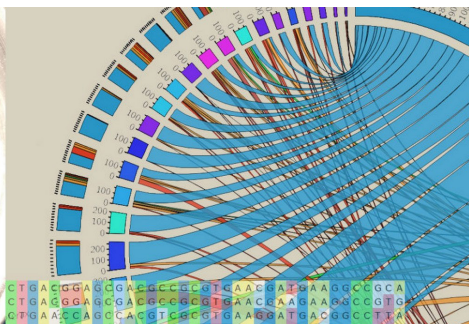




Ministerstwo
Edukacji i Nauki

Projekt realizowany w ramach programu **„Doskonała nauka”,** ustanowionego na podstawie art. 376 ust. 1 i ust. 2 pkt 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 poz. 478, 619 i 1630), dofinansowany ze środków budżetu państwa.





Ministerstwo Edukacji i Nauki

Projekt realizowany w ramach programu „Doskonała nauka”, ustanowionego na podstawie art. 376 ust. 1 i ust. 2 pkt 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 poz. 478, 619 i 1630), dofinansowany ze środków budżetu państwa

PROGRAM „Doskonała Nauka”

Nazwa zadania: VI OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”, Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

DOFINANSOWANIE

80 325 zł

CAŁKOWITA WARTOŚĆ

133 825 zł

CEL I ZAKRES KONFERENCJI

Celem Sympozjum jest przedstawienie najnowszych osiągnięć w badaniach z zakresu metagenomiki, metataksonomiki, metatranskryptomiki, metabolomiki, biologii molekularnej, oddziaływań pomiędzy mikro- i makroorganizmami w różnych środowiskach.

Badania „omiczne” w analizie próbek środowiskowych umożliwiają poznawanie nowych mikrobiomów, monitorowanie składu konsorcjum mikroorganizmów oraz badanie możliwości ich wykorzystania w rolnictwie i ochronie środowiska. Dotychczas, w każdej edycji konferencji uczestniczyło ponad stu naukowców specjalizujących się w badaniach z obszarów naukowych związanych z ekologią mikroorganizmów, fitopatologią, genetyką, mikrobiologią, ochroną środowiska oraz rolnictwem i ogrodnictwem. Podczas Sympozjum zostaną zaprezentowane oraz przedyskutowanie wyniki najnowszych badań metagenomicznych prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych, w tym także postęp w wykorzystaniu nowoczesnych metod badawczych. Ponadto, przedstawiona zostanie dotychczasowa wiedza na temat zastosowania narzędzi „omicznych” najnowszej generacji do analiz m.in. próbek glebowych. Narzędzia me-

tagenomiki umożliwiają testowanie wszystkich populacji mikroorganizmów, występujących w danym środowisku i nierozerwalnie wiążą się z badaniami z zakresu bioinformatyki i analizy danych.

Sympozjum to jest jedynym w Polsce, cyklicznym wydarzeniem naukowym obejmującym wiedzę na temat kompleksowego rozpoznania bioróżnorodności mikroorganizmów w różnych środowiskach. Zapewnia integrację społeczności naukowej, w tym wybitnych specjalistów w danej dziedzinie. Pozwala na przekazywanie sobie wzajemnie wiedzy i doświadczenia, umożliwia nawiązywanie wszechstronnej współpracy oraz pozwala na żywą dyskusję na temat najnowocześniejszych metod badawczych. To również doskonała możliwość do zaprezentowania wyników badań dla młodych adeptów nauki (magistrantów, doktorantów), którzy w miłej atmosferze i pod czujnym okiem profesorów mogą podzielić się swoimi odkryciami.

Niniejsza konferencja jest okazją do spotkania badaczy wykorzystujących w pracy różne techniki sekwencjonowania i umożliwi kontynuację dyskusji nad skutecznością i wiarygodnością stosowanych metod metagenomicznych w analizie próbek środowiskowych.

Patronat honorowy:

prof. dr hab. Wiesław Oleszek (Dyrektor IUNG-PIB, Puławy)
prof. dr hab. Teresa Doroszewska (Z-ca Dyrektora IUNG-PIB, Puławy)
prof. dr hab. Cezary Sławiński (Dyrektor IA PAN, Lublin)
prof. dr hab. Artur Zdunek (Z-ca Dyrektora IA PAN, Lublin)
ks. prof. dr hab. Mirosław Kalinowski
(Rektor Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego JanaPawła II, Lublin)
dr hab. Maciej Masłyk, prof. KUL (Dyrektor Instytutu Nauk Biologicznych, KUL, Lublin)
prof. dr hab. Radosław Dobrowolski
(Rektor Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie)
prof. dr hab. Anna Jarosz-Wilkołazka
(Dyrektor Instytutu Nauk Biologicznych, UMCS, Lublin)
dr hab. Joanna Czarnecka, prof. UMCS
(Dziekan Wydziału Biologii i Biotechnologii, UMCS, Lublin)
prof. dr hab. Agnieszka Gniazdowska (Dyrektor Instytutu Biologii, SGGW, Warszawa)

Komitet naukowy:

Przewodniczący:

prof. dr hab. Adam Jaworski (Uniwersytet Łódzki)

Członkowie:

prof. dr hab. Wiesław Barabasz, Uniwersytet Rolniczy, Kraków
dr hab. Mieczysław Kazimierz Błaszczyk, prof. SGGW, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa
dr hab. Justyna Bohacz, prof. UP, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin
dr hab. inż. Maria Chmiel, prof. UR, Uniwersytet Rolniczy, Kraków
prof. dr hab. Adam Choma, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn
prof. dr hab. inż. Krystyna Cybulska, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin
prof. dr hab. Hanna Dahm, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
dr hab. Łukasz Dziewit, Uniwersytet Warszawski, Warszawa
dr hab. Anna Gałązka, prof. IUNG, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB, Puławy
dr Weronika Goraj, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin
dr hab. Patrycja Golińska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
dr Agata Goryluk-Salmonowicz, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa
dr hab. Urszula Guzik, Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice
dr Karolina Furtak, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB, Puławy
prof. dr hab. Magdalena Frąc, Instytut Agrofizyki, PAN, Lublin
dr hab. Agnieszka Hanaka, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Katarzyna Hrynkiewicz, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
prof. dr hab. Monika Janczarek, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr hab. Jolanta Jaroszuk-Ściseł, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr hab. Jolanta Joniec, prof. UP, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin
dr hab. Iwona Komaniecka, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Małgorzata Jędryczka, Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań
dr hab. Michał Kalita, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Teresa Korniłłowicz-Kowalska, Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin
prof. dr hab. Jacek Kozdrój, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów
dr hab. Ewa Król, prof. UP., Uniwersytet Przyrodniczy, Lublin
dr hab. Piotr Krupa, prof. UJD, Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im. Jana Długosza w Częstochowie
dr hab. inż. Teresa Krzyśko-Łupicka, prof. UO, Uniwersytet Opolski, Opole
prof. dr hab. Jan Kucharski, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn
dr Agnieszka Kuźniar, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin
dr hab. Małgorzata Majewska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Wanda Małek, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Stefan Martyniuk, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB, Puławy
dr hab. Ewa Moliszewska, prof. UO, Uniwersytet Opolski, Opole
dr Anna Marzec-Grządziel, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – PIB, Puławy

dr hab. Andrzej Mazur, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Agnieszka Mrozik, Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice
dr hab. Alicja Niewiadomska, prof. UP, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
dr Artur Nowak, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr Karolina Oszust, Instytut Agrofizyki PAN, Lublin
dr Ewa Ozimek, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Zbigniew Paluszak, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy
prof. dr hab. Stanisław Pietr, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław
prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget, Uniwersytet Śląski, Katowice
dr hab. Magdalena Popowska, prof. UW, Uniwersytet Warszawski, Warszawa
prof. dr hab. Anna Skorupska, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Piotr Sobiczewski, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice
dr hab. Anna Szafranek-Nakonieczna, prof. KUL, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin
dr hab. Magdalena Szczech, prof. IO, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice
prof. dr hab. Arkadiusz Telesiński, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny, Szczecin
dr hab. Mariusz Trytek, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
prof. dr hab. Maciej Walczak, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń
dr hab. Sylwia Wdowiak-Wróbel, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr hab. Adrian Wiater, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr hab. Jerzy Wielbo, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr hab. Danuta Wojcieszyńska, prof. UŚ, Katedra Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice
dr hab. Małgorzata Wójcik, prof. UMCS, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
dr hab. Agnieszka Wolińska, prof. KUL, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin
dr Kinga Włodarczyk, Katolicki Uniwersytet Lubelski, Lublin
prof. dr hab. Jadwiga Wyszkowska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

PATRONAT HONOROWY

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów jednomyślnie podjął uchwałę nr 14-2022 r. w sprawie objęcia patronatem honorowym VI edycji Ogólnopolskiego Sympozjum Mikrobiologicznego pt. „Metagenomy różnych środowisk".
Prośbę o Honorowy Patronat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów nad Sympozjum podpisał Prezes PTM prof. dr hab. Stefan Tyski

POLSKIE TOWARZYSTWO MYKOLOGICZNE

Prośbę o Naukowy Patronat Polskiego Towarzystwa Mykologicznego nad Sympozjum popiera Zarząd PTMyk, którego Prezesem jest dr Julia Pawłowska

POLSKIE TOWARZYSTWO GENETYCZNE

Prośbę o Naukowy Patronat Polskiego Towarzystwa Genetycznego nad Sympozjum popiera Pani dr hab. Joanna Groszczyńska, prof. SGGW – Przewodnicząca Warszawskiego Oddziału PTG oraz prof. dr hab. Wanda Małek – Przewodnicząca Lubelskiego Oddziału PTG

POLSKIE TOWARZYSTWO FITOPATOLOGICZNE

Prośbę o Naukowy Patronat PTFit nad Sympozjum popiera
Pani dr hab. Ewa Król, prof. UP – Przewodnicząca Lubelskiego Oddziału PTFit

SPONSORZY WYDARZENIA

LISTA POSTERÓW

LISTA PREZENTACJI POSTEROWYCH:

1. Aleksandrowicz E.: *Mykotoksyny fuzaryjne w produktach przemiału ziarna jako wskaźnik jakości.`*
2. Baćmaga M., Wyszkowska J., Kucharski J., Borowik A.: *Rola typu siedliska leśnego w kształtowaniu właściwości mikrobiologicznych i enzymatycznych gleby.*
3. Banach A., Kuźniar A., Kruczyńska A., Jurczyk S., Sochaczewska A., Wolińska A.: *Wpływ nawożenia azotowego i sposobu uprawy na mikrobiom gleb rolniczych.*
4. Bohacz J., Możejko M.: *Kształtowanie się różnorodności grzybów glebowych pod wpływem wprowadzonego hydrolizatu keratynowego.*
5. Boros-Lajszner E., Wyszkowska J., Borowik A., Kucharski J.: *Oddziaływanie metali ciężkich na bakterie w ryzosferze Elymus elongatus i Zea mays.*
6. Brankiewicz A., Ważny R., Jędrzejczyk R.J., Domka A., Śmieszek O., Rozpądek P.: *Poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za uwalnianie fosforu z podłoża przez mikroorganizmy.*
7. Ciepiel J: *Otoczkowanie nasion - jak zapewnić lepszy start roślinie.*
8. Frąc M., Gryta A., Piotrowska-Długosz A.: *Analiza metataksonomiczna zbiorowisk grzybów w profilu gleby płowej pod uprawą pszenicy.*
9. Furtak K., Gałązka A., Grządziel J.: *Różnorodność mikrobiomu mady bardzo lekkiej z Małopolskiego Przełomu Wisły oraz jego reakcja na symulowaną powódź.*
10. Furtak K., Gałązka A., Gawryjołek K., Rutkowska A.: *Określenie wpływu mocznika wzbogaconego mikrobiologicznie na potencjał metaboliczny mikroorganizmów glebowych w uprawie pszenicy ozimej.*
11. Gałązka A., Marzec-Grządziel A., Grządziel J., Pawlik Ł.: *Techniki sekwencjonowania nowej generacji stosowane w badaniach nad wpływem grzybów na wietrzenie biologiczne.*
12. Gałązka A., Marzec-Grządziel A., Varsadiya M., Grządziel J., Pawlik Ł.: *Różnorodność i aktywność grzybów pod drzewami jako wskaźnik potencjalnego wietrzenia biologicznego i formowania gleby.*
13. Gałązka A., Marzec- Grządziel A., Varsadiya M., Niedźwiecki J., Gawryjołek K., Furtak K., Przybyś M., Grządziel J.*: Populacja grzybów związanych z korzeniami i ich potencjał metaboliczny w glebie ze strefy okołokorzeniowej olszy czarnej, brzozy brodawkowatej i sosny zwyczajnej.*
14. Gawryjołek K., Gałązka A., Furtak K.: *Porównanie aktywności enzymatycznej gleby uprawnej i leśnej.*
15. Gawryjołek K., Gałązka A., Feledyn-Szewczyk B.: *Zawartość ogólnych oraz łatwoekstrahowlnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w doświadczeniu z uprawą truskawki w systemie ekologicznym.*
16. Gawryjołek K., Gałązka A., Marzec- Grządziel A.: *Zróżnicowanie aktywności metabolicznej szczepów bakterii z rodzaju Pseudomonas.*
17. Gierut-Kot A., Kafel-Krawczyk I., Góralska K., Jopek M., Ambroziak K.: *Wykorzystanie właściwości biocontrol izolatów środowiskowych w warzywnictwie.*
18. Goraj W., Kuźniar A., Badaszek K., Podlewski J., Wolińska A.: *Analiza mikrobiomu serów długo-dojrzewających oraz sera pleśniowego produkowanego w Gospodarstwie Rolnym Ślesin.*
19. Gryta A., Siczek A., Feledyn-Szewczyk B., Frąc M.: *Bioróżnorodność metaboliczna zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających liście i owoce różnych odmian truskawki w nawadnianym i nienawadnianym ekologicznym systemie produkcji.*
20. Gustab M., Rozpądek P.: *Poprawa parametrów fizjologicznych roślin z gatunku Arabidopsis arenosa pod wpływem inokulacji z użyciem endofitycznych drożdży Sporobolomyces ruberrimus.*
21. Jach M.E., Kubiński K., Sajnaga E., Juda M., Malm A.: *Genetyczne aspekty wykorzystania L-karnityny do produkcji biomasy białkowej przez niekonwencjonalne drożdże Yarrowia lipolytica.*
22. Jałowiecki Ł., Borgula J., Płaza G., Harnisz M., Ciesielski S.*: Ścieki z komunalnej oczyszczalni ścieków jako źródło genów oporności na fluorochinolony: badania metagenomowe.*
23. Janczarek M., Kozieł M., Kalita M.: *Analiza molekularna genów uczestniczących w adaptacji bakterii Rhizobium leguminosarum do niskich temperatur.*

24. Jaroszuk-Ściseł J., Nowak A., Kutyrieva N., Perzanowski M., Słomka A.: *Potencjał stymulacyjny i bioremediacyjny niepatogenicznego, endofitycznego szczepu Fusarium oxysporum DEMFo14 zależny od warunków hodowli i obecności metalu ciężkiego (Cd, Pb, lub Zn).*
25. Joniec J., Nowak M., Kowalczyk K., Kwiatkowska E., Kwiatkowski C.: *Reakcja populacji mikroorganizmów glebowych na nawiezienie gleby odpadem popieczarkowym.*
26. Kalita M., Wdowiak-Wróbel S., Marek-Kozaczuk M., Sokołowski W., Di Iorio E., De Castro O., Manzo E.: *Analiza filogenetyczna endofitycznych promieniowców z rodzaju Micromonospora wyizolowanych z brodawek korzeniowych janowca barwierskiego (Genista tinctoria) rosnącego w południowych Włoszech.*
27. Konkel R., Fidor A., Grabski M., Toruńska-Sitarz A., Cegłowska M., Szubert K., Pyrć K., Mazur-Marzec H.: *Fantastyczne cyjanobakterie – jak je wykorzystać?*
28. Koper P., Żebracki K., Wójcik M., Marczak M., Mazur A.: *Pangenom bakterii z rodzaju Rhizobium.*
29. Kozieł M., Martyniuk S.: *Ocena wpływu inokulacji pszenicy ozimej wybranymi szczepami bakterii solubilizujących fosforany.*
30. Kozieł M., Martyniuk S.: *Występowanie bakterii z rodzaju Azotobacter w różnych typach i grupach granulometrycznych gleb w Polsce.*
31. Kozieł M., Martyniuk S.: *Zróżnicowanie zdolności szczepów bakterii solubilizujących fosforany do rozpuszczania fosforanu wapnia.*
32. Kurzylewska M., Dworaczek K., Turska-Szewczuk A.: *Różnorodność gatunków genomowych i profil patogenności Aeromonas so. serogrupy PGO1 izolowanych z tkanek ryb hodowlanych.*
33. Kuźniar A., Kruczyńska A., Jurczyk S., Banach A., Podlewski J., Słomczewski A., Wolińska A.: *Ograniczanie nawożenia azotowego zmienia sieci mikrobiomu w niszy rolniczej pod uprawą kukurydzy.*
34. Majewska M., Sitarz K., Adamczuk P, Nowak A..: *Gleby industrioziemne jako źródło mikroorganizmów o potencjale biotechnologicznym.*
35. Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Gawryjołek K., Furtak K., Grządziel J.: *Charakterystyka jakościowa i ilościowa bakterii obecnych w glebie ekosystemu leśnego i rolniczego.*
36. Marzec-Grządziel A., Gałązka A.: *Sekwencjonowanie pełnego genomu bakterii z rodzaju Achromobacter wyizolowanej z ryzosfery w uprawie kukurydzy.*
37. Mącik M., Gryta A., Sas-Paszt L., Frąc M.: *Ocena różnorodności genetycznej zbiorowisk bakterii w zdegradowanej glebie nawożonej fosforowym bionawozem.*
38. Nowak A., Tyśkiewicz R., Ozimek E., Jaroszuk-Ściseł J.: *Wpływ egzopolimerów (EPS) uzyskanych z hodowli Penicillium paneum Pp7 na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (CAT, APX, GPX) w tkankach pszenicy.*
39. Oleszek M., Kozachok S., Pecio Ł., Oszust K., Frąc M.: *Działanie specyficznych metabolitów wtórnych Solidago virgaurea przeciw Fusarium oxysporum i Neosartorya fischeri.*
40. Oszust K., Pinzari F., Frąc M.: *Wpływ wybranych barwników redoks na funkcjonalność izolatów z rodzajów Verticillum i Trichoderma – aspekt metodyczny.*
41. Panek J., Frąc M., Treder K., Pawłowska A., Michałowska D., Vink S.N., Falcão Salles J.: *Wpływ kontaminacji gleby patogenem na skład mykobiomu ryzosfery wybranych odmian ziemniaka.*
42. Pertile G., Frąc M.: *Wpływ octu drzewnego (łac. acetum pyro-lignosum) na wzrost grzyba fitopatogenicznego Botrytis cinerea.*
43. Pylak M., Oszust K., Panek J., Frąc M.: *Wpływ konsorcjum bakterii Arthrobacter sp., Pesudomonas sp. i Rhodococcus sp. na skład taksonomiczny zbiorowisk grzybów zasiedlających ryzosferę i fylosferę malin w doświadczeniu wazonowym.*
44. Pytlak A., Walkiewicz A., Kubaczyński A., Szafranek-Nakonieczna A.: *Metanotrofia w agroekosystemach – wpływ praktyk rolniczych na skład mikrobiomów glebowych.*
45. Sajnaga E., Skowronek M., Kalwasińska A., Lis M., Kazimierczak W., Jach M.E.: *Efekt odporności na nicienie entomopatogeniczne, a skład mikrobioty jelitowej na przykładzie larw owadów z rodziny Scarabaeidae.*
46. Sas-Paszt L., Trzciński P., Lisek A., Głuszek S., Górnik K., Sumorok B., Derkowska E., Frąc M., Przybył M., Weszczak K.: *Selekcja szczepów bakterii do hydropogonicznej uprawy sałaty rzymskiej.*
47. Serwecińska L., Urbaniak M., Mierzejewska E., Tołoczko W.: *Zmiany w strukturze taksonomicznej bakterii i genach lekooporności w glebie nawożonej osadem ściekowym.*

48. Siebielec S., Siebielec G., Ukalska-Jaruga A., Woźniak M., Lewicki A., Pulka J., Szufa S., Piersa P., Adrian Ł.: *Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania wzbogaconych mikrobiologicznie bionawozów wspomagających zrównoważoną produkcję roślinną i jej adaptację do zmian klimatu, INNO- MIK.*
49. Siebielec S., Siebielec G., Gmur D.: *Rola mikroorganizmów w immobilizacji i fitoekstrakcji pierwiastków ziem rzadkich.*
50. Siebielec S., Siebielec G., Ukalska-Jaruga A., Gałązka A., Pecio M., Grzęda E., Kozieł M., Urbaniak M.: *Aktywność mikrobiologiczna i plon roślin w glebie z dodatkiem egzogennej materii organicznej.*
51. Siebielec S., Siebielec G., Dach J., Janczak D., Mazurkiewicz J.: *Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania wzbogaconych mikrobiologicznie bionawozów wspomagających odporność warzyw w uprawie polowej na suszę, KOMPO-MIK.*
52. Siegieda D., Panek J., Frąc M.: *Porównanie metod do określania różnicowej obfitości mykobiomu w ekologicznej uprawie truskawki.*
53. Szadziul M., Goryluk-Salmonowicz A., Zalewska M., Popowska M.: *Wpływ presji antropogenicznej na bioróżnorodność gleb leśnych i ornych w Polsce.*
54. Szpilska K., Oszust K., Panek J., Gryta A., Pylak M., Frąc M.: *Diagnostyka molekularna grzybów z rodzaju Pezicula - kluczowych patogenów jabłek.*
55. Szumigaj-Tarnowska J., Augustyniak J., Uliński Z., Hreczuch W.: *Ocena rozwoju grzybów Trichoderma spp. w podłożu pieczarkowym poddanym dezynfekcji gazowym dwutlenkiem chloru.*
56. Tyśkiewicz R., Nowak A., Ozimek E., Patkowska E., Jaroszuk-Ściseł J.: *Indukcja odporności pszenicy przez wyizolowane z ryzosfery Scorzonera hispanica L. szczepy należące do trzech gatunków Trichoderma: T velutinum, T. brevicompactum, T. koningiopsis.*
57. Wdowiak-Wróbel S., Marek- Kozaczuk M., Karaś M., Kalita M., Sokołowkski W.: *Analiza filogenetyczna endofitycznych szczepów rodzaju Pseudomonas, wyizolowanych z brodawek korzeniowych Chamaecytisus albus.*
58. Wielkopolan B., Szabelska-Beręsewicz A., Krawczyk K., Obrępalska-Stęplowska A.: *Wpływ insektycydów na mikrobiom larw Oulema spp.*
59. Włodarczyk K., Wielbo J.: *Zróżnicowanie genetyczne populacji rizobiów funkcjonujących w warunkach wysokiej i niskiej konkurencji międzyszczepowej.*
60. Wójcik M., Koper P., Żebracki K., Marczak M., Mazur A.: *Bakterie symbiotyczne roślin z terenów nieuprawianych rolniczo jako źródło genów i funkcji metabolicznych przydatnych w promowaniu wzrostu roślin.*
61. Woźniak M., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Frąc M.: *Społeczność endofitów bakteryjnych związanych z liśćmi bioenergetycznych drzew – Paulownia elongata x fortunei.*
62. Woźniak M., Tyśkiewicz R., Marzec-Grządziel A., Gałązka A., Jaroszuk-Ściseł J.: *Potencjał bakterii endofitycznych do produkcji deaminazy ACC.*
63. Zborowska M., Wyszkowska J., Borowik A., Kucharski J.: *Różnorodność mikrobiomu w glebie zanieczyszczonej bisfenolem A obsianej rzepakiem jarym i kukurydzą.*
64. Zyzik M., Domka A., Rozpądek P.: *Aktywacja elongacji korzeni A. thaliana z udziałem szczepu Sporobolomyces ruberrimus jako przykład roli endofitów w promowaniu wzrostu roślin.*
65. Żebracki K., Koper P., Wójcik M., Marczak M., Mazur A.: *Globalna odpowiedź transkryptomu Rhizobium leguminosarum na stres środowiskowy.*

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA – PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY W PUŁAWACH

Mykotoksyny fuzaryjne w produktach przemiału jako wskaźnik jakości ziarna

Edyta Aleksandrowicz

Zakład Uprawy Roślin Zbożowych

Mykotoksyny *są to produkty wtórnego metabolizmu grzybów strzępkowych. Stanowią one zanieczyszczenia surowców i produktów przemysłu spożywczego oraz pasz i wywierają toksyczny wpływ na organizmy. Poziom zawartości mykotoksyn w ziarnie jest determinowany przez czynnik genetyczny oraz warunki pogodowe w czasie kwitnienia oraz w okresie żniw. Najważniejszymi mykotoksynami obecnymi w zbożach uprawianych w Polsce są deoksyniwalenol (DON), zearalenon (ZEA) i toksyna T-2/HT-2. Wszystkie te metabolity produkowane są przez grzyby z rodziny Fusarium.*

Celem badań było określenie zawartości mykotoksyn fuzaryjnych: deoksyniwalenolu (DON), zearalenonu (ZEA) i toksyny T-2/HT-2 w dwóch frakcjach przemiału: mące i otrębach u różnych odmian pszenicy ozimej , jarej i pszenżyta.

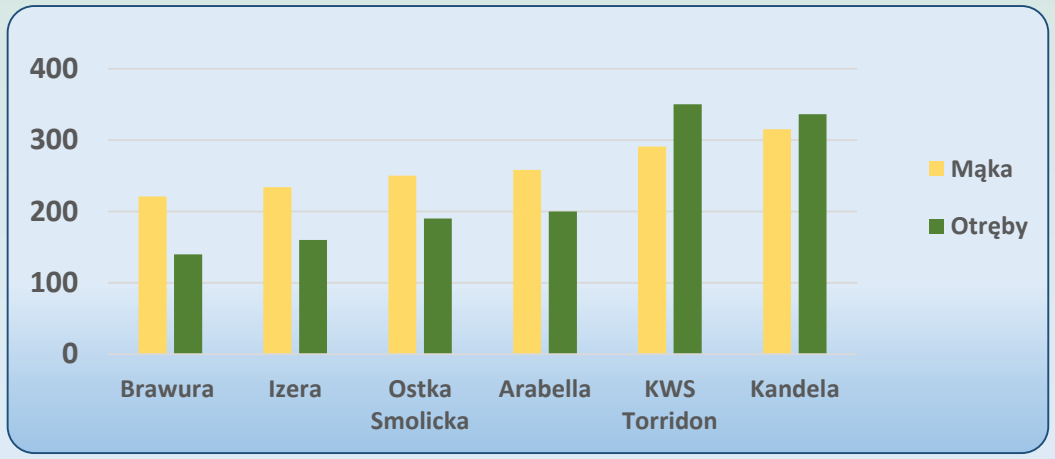
toksyna	odmiana	mąka	otręby
DON (µg kg^{-1})	Loft	200	331
	Speedway	224	204
	Belissa	206	267
	Pokusa	203	250
	Matrix	229	293
	Hyfi	246	311
	Rokosz	180	200
	Bamberka	800	1800*
	Galvano	300	500
	Credo	300	300
T-2/HT-2 (µg kg^{-1})	Loft	37	154*
	Speedway	<LOD (29ppb)	181*
	Belissa	46	329*
	Pokusa	<LOD (29ppb)	122*
	Matrix	35	131*
	Hyfi	40	163*
	Rokosz	<LOD (29ppb)	46
	Bamberka	<LOD (29ppb)	63
	Galvano	<LOD (29ppb)	<LOD (29ppb)
	Credo	<LOD (29ppb)	<LOD (29ppb)

Tab.1 Zawartość mykotoksyn w ziarnie pszenicy ozimej

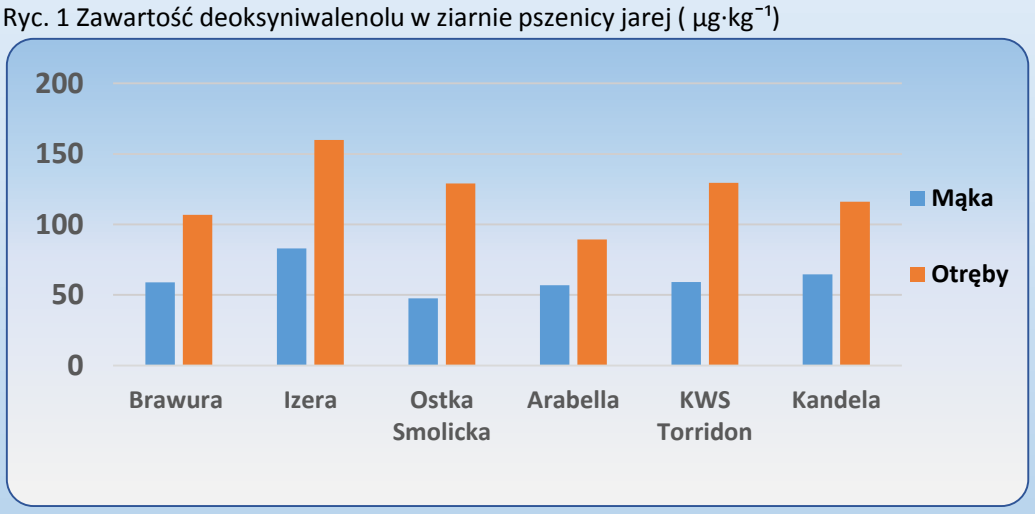
toksyna	odmiana	mąka	otręby
DON (µg kg^{-1})	BOH 2415	385	520
	Meloman	420	465
	Rotondo	604	589
	Trapero	271	198
T-2/HT-2 (µg kg^{-1})	BOH 2415	90,9	300,3*
	Meloman	76,7	107,6*
	Rotondo	65,3	144,4*
	Trapero	37,8	140,0*

Tab.2 Zawartość mykotoksyn w ziarnie pszenżyta.
Dopuszczalny poziom do spożycia: *DON 1250 µg kg^{-1} , * T-2/HT-2 100µg kg^{-1}

Materiał do badań stanowiły próby ziarna pochodzące z doświadczeń prowadzonych w roku 2018 w Stacji Doświadczalnej w Osinach i na mikropoletkach w Puławach należących do Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa–PIB w Puławach. Ziarno pochodziło z kłosów naturalnie zainfekowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium.* Ocena zawartości deoksyniwalenolu, zearalenonu oraz toksyny T-2/HT-2 w mące i otrębach została wykonana metodą immunoenzymatyczną ELISA przy użyciu testów ilościowych Veratox firmy Noack. .



Ryc. 1 Zawartość deoksyniwalenolu w ziarnie pszenicy jarej (µg·kg^{-1})



Ryc.2 Zawartość toksyny T-2/H-T2 w ziarnie pszenicy jarej (µg·kg^{-1})

Podsumowanie

Realizacja tematu miała charakter poznawczy określający czy istnieje zależność miedzy ilością mykotoksyn zawartych w poszczególnych częściach przemiału a odmianą. Stwierdzono, że zawartość mykotoksyn w poszczególnych frakcjach zależała od gatunku i odmiany. W danym roku badań zawartość zearalenonu we wszystkich badanych próbach była poniżej poziomu wykrywalności.

ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, e.aleksandrowicz@iung.pulawy.pl tel.: +81 4786 81

VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK” Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

Wpływ nawożenia azotowego i sposobu uprawy na mikrobiom gleb rolniczych

Artur Banach[1], Agnieszka Kuźniar[1], Anna Kruczyńska[1], Sara Jurczyk[2], Anna Sochaczewska[1], Agnieszka Wolińska[1]

[1] Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów, Konstantynów 1I, 20-708 Lublin
[2] Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Sztucznej Inteligencji, Konstantynów 1H, 20-708 Lublin

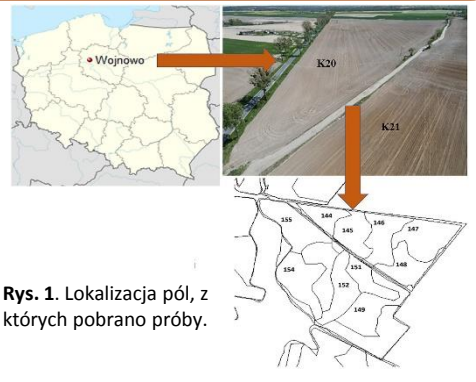
Celem pracy było określenie w jaki sposób uprawy (orkowa – bezorkowa) oraz wielkość nawożenia azotowego (0-250 kg N/ha) wpływają na skład mikrobiomu glebowego, w szczególności na rodzaje mikroorganizmów uczestniczących w wiązaniu azotu, podczas uprawy kukurydzy.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy stanowiły mikroorganizmy wyizolowane z 40 prób gleb pochodzących z areału CGFP sp. z o.o. (woj. kujawsko-pomorskie) (Rys. 1). Wytypowano 2 sąsiadujące pola, na których prowadzona była uprawa kukurydzy oraz 2 systemy upraw – **bezorkowy (B) i orkowy (O)** oraz nawożenie azotowe) **(0, 150, 200 i 250 kg N/ha)**. Próby pobrano w 2 okresach – **przed siewem (P)** oraz **po zbiorze (K) kukurydzy**.

Izolację DNA prowadzono przy zastosowaniu zestawu DNeasy Power Lyzer Power Soil Kit (Qiagen), przeprowadzono reakcję PCR hiperzmiennych regionów V3-V4 regionów genu 16S rRNA z wykorzystaniem primerów 27f i 1492r, a uzyskane amplikony poddano sekwencjonowaniu następnej generacji (Miseq Illumina, Genomed SA).

Wyniki poddano standardowej obróbce bioinformatycznej w celu klasyfikacji mikroorganizmów. Przyporządkowanie uzyskanych jednostek taksonomicznych do poszczególnych szlaków metabolicznych wykonano przy użyciu bazy Functional Annotation of Prokaryotic Taxa (FAPROTAX). Analizę statystyczną danych wykonano za pomocą pakietu SPSS 28 (IBM).



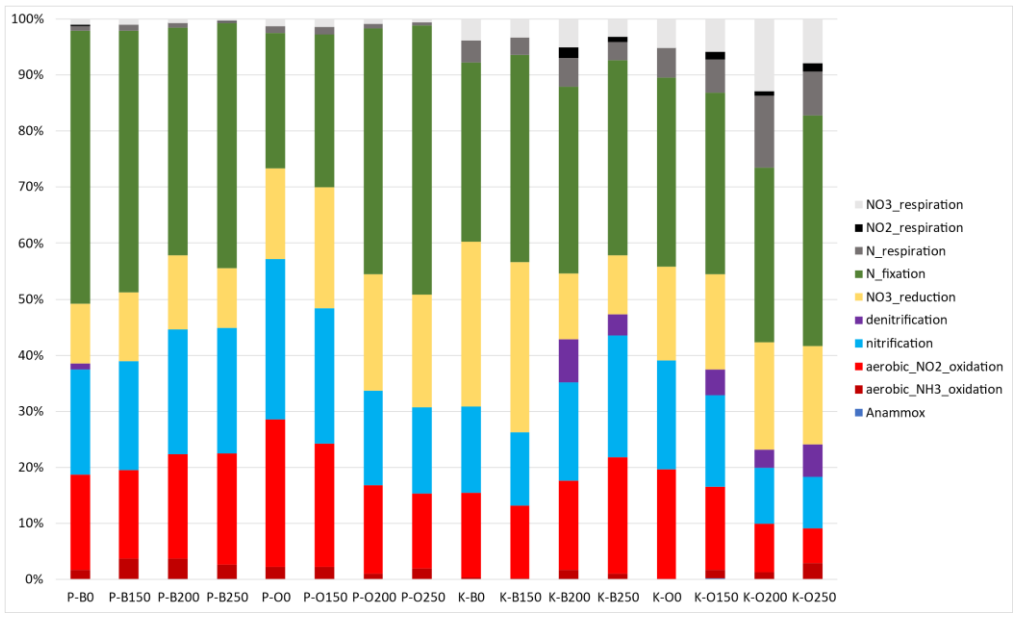
Rys. 1. Lokalizacja pól, z których pobrano próby.

WYNIKI

W oparciu o analizę taksonomiczną wykazano, iż znaczna część mikroorganizmów miała względną obfitość <1% (25% całego mikrobiomu), 51% to mikroorganizmy niesklasyfikowane, a **główne dominanty przed siewem** to przedstawiciele rodzajów: ***Sphingomonas* (6,8%), *Flavobacterium* (4,5%), *Arenimonas* (2,8%), *Stenotrophobacter* (1,5%), *Mucilaginibacter* (1,3%) i *Chryseolinea* (1,2%).** Mikrobiom badanych gleb ulegał przekształceniu w okresie prowadzonych badań, wykazując **większą różnorodność po zbiorze plonów** (p<0,001) oraz **w systemie bezorkowym** (p<0,001). Spośród bakterii wiążących azot (Rhizobiales i Burkholderiales) ***Hyphomicrobium* sp., *Methylobacterium* sp. oraz *Bradyrhizobium* sp. przeważały w uprawie bezorkowej** w początkowym okresie badań (p<0,001), podczas gdy **po zbiorze plonu zanotowano wyraźny wzrost liczebności *Devosia* sp., *Methylobacterium* sp., *Rhizobium* sp. oraz *Rhodopseudomonas* sp. w uprawie orkowej** (p<0,001).

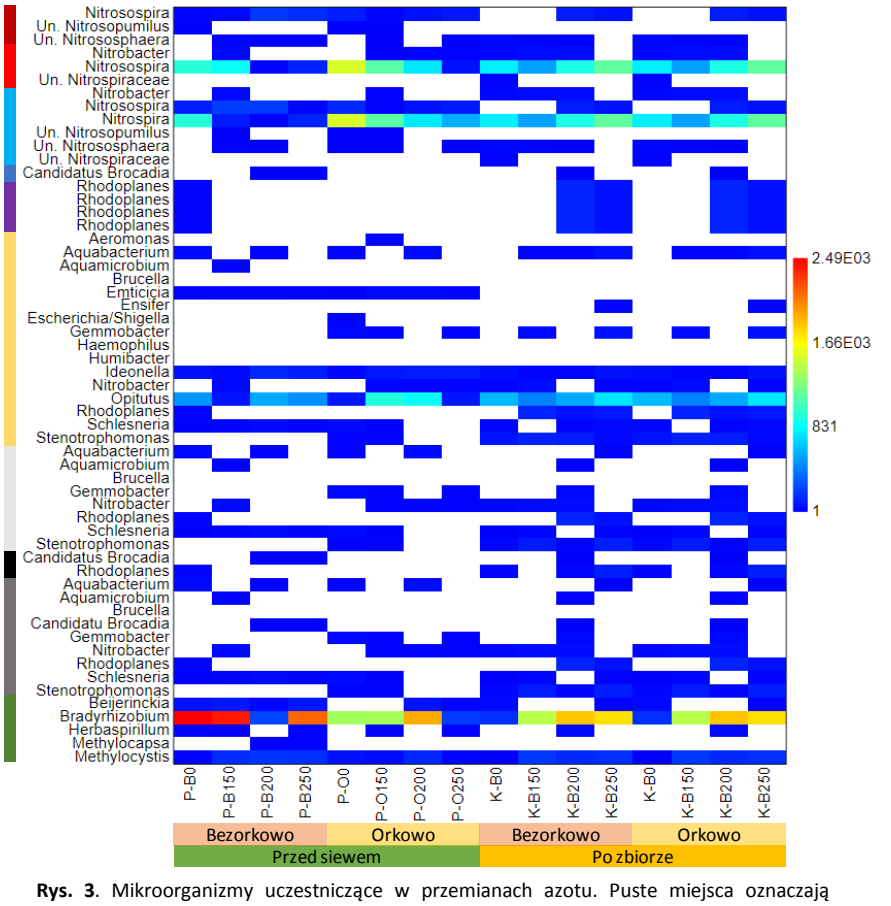
Na podstawie analizy funkcjonalnej wyodrębniono następujące szlaki metabolizmu azotu: Anammox, utlenianie amoniaku w warunkach tlenowych, utlenianie azotynów w warunkach tlenowych, nitryfikację, denitryfikację (całkowitą, azotanów, azotynów, tlenku azotu (I)), redukcję azotanów, respirację (azotu, azotanów i azotynów) oraz wiązanie azotu. Nie znaleziono mikroorganizmów uczestniczących w procesie amonifikacji azotanów i azotynów**. W początkowym etapie badań dominującym procesem w uprawie bezorkowej było wiązanie azotu (48,7%), następnie nitryfikacja (18,7%), utlenianie azotynów (17%), redukcja azotanów (10,7%). W uprawie orkowej, natomiast, dominowała nitryfikacja (28,6%), utlenianie azotynów (26,4%), wiązanie azotu (24,2%) i redukcja azotanów (16,3%)** (p<0,01). Warto nadmienić, że **nie obserwowano denitryfikacji w uprawie orkowej**, podczas gdy w uprawie bezorkowej względna obfitość izolatów uczestniczących w tym procesie wyniosła 1,1%. Pozostałe procesy cechowała niska względna obfitość izolatów (ok. 1%) (Rys. 2).

Analizując zmienność wyodrębnionych procesów w poszczególnych wariantach uprawy-nawożenia w dwóch okresach poboru prób wykazano spadek udziału mikroorganizmów w procesie wiązania azotu (uprawa bezorkowa – do 41% przy 200 kg N/ha) oraz jego przyrost w uprawie orkowej (podwojenie od dawki 200 kg N/ha). Jednocześnie obserwowano zanik denitryfikacji, zmiany intensywności nitryfikacji – wzrost w uprawie bezorkowej (23%) i spadek w orkowej (15%). W uprawie bezorkowej nastąpił wzrost utleniania NH_3 i NO_2, spadek redukcji NO_3 i procesów respiracji. W uprawie orkowej zaobserwowano odwrotne trendy – hamowanie utleniania NH_3 i NO_2, respiracji i stymulację redukcji NO_3. W obu przypadkach zmiany te były skorelowane z dawką nawozu (Rys. 2). Po zebraniu plonów obserwowano dalsze hamowanie wiązania N (32%), nitryfikacji (9%), procesów utleniania oraz nasilenie denitryfikacji (7%) oraz wiązania zredukowanych form azotu (do 13%). Zmiany te były wyraźniejsze w uprawie orkowej (p<0,01) (Rys. 2).



Rys. 2. Udział poszczególnych procesów przemian N w poszczególnych kombinacjach doświadczenia – P/K okres poboru prób, B/O – sposób uprawy, liczby – dawka nawożenia (kg N/ha).

Analizując rozpoznany **mikrobiom uczestniczący w przemianach N wyróżniono 28 szczepów** (Rys. 3), z których niektóre uczestniczyły w kilku procesach. Najliczniejszymi były: *Bradyrhizobium* sp., *Methylocystis* sp. (wiązanie N), *Nitrosospira* sp. (utlenienie NO_2 i nitryfikacja), *Nitrospira* sp. (nitryfikacja) oraz *Opitutus* sp. i *Ideonella* sp. (redukcja NO_3). *Nitrobacter* sp. uczestniczył w największej ilości procesów - utlenianiu i redukcji N, nitryfikacji i respiracji. Denitryfikatory reprezentował *Rhodoplanes* sp., a głównymi dominantami w procesach respiracji były *Schlesneria* sp. i *Stenotrophomonas* sp., a proces Anammox reprezentował *Candidatus Brocadia* (Rys.3).



Rys. 3. Mikroorganizmy uczestniczące w przemianach azotu. Puste miejsca oznaczają wartości zerowe, kolory po lewej przedstawiają przyporządkowanie szczepów do poszczególnych procesów.

WNIOSKI

1. **Badane gleby posiadały zróżnicowany mikrobiom uczestniczący w przemianach azotu.**
2. **W uprawie bezorkowej dominowały procesy wiązania azotu oraz jego utleniania, zaś w orkowej nitryfikacja, utlenianie i redukcja.**
3. **Po zebraniu plonu notowano aktywację nitryfikacji i respiracji oraz wyraźny spadek procesów utleniania, nitryfikacji i wiązania azotu.**
4. **Nawożenie stymulowało utlenianie i nitryfikację w uprawie bezorkowej, podczas gdy w uprawie orkowej redukcję i respirację; upływ czasu nasilał te zmiany.**
5. **Spośród zidentyfikowanych mikroorganizmów największą rolę odgrywały: *Bradyrhizobium* sp. (wiązanie N), *Nitrosospira* sp. (utlenienie NO_2 i nitryfikacja), *Nitrospira* sp. (nitryfikacja) oraz *Opitutus* sp. (redukcja NO_3).**
6. ***Nitrobacter* sp. uczestniczył w największej ilości przemian (utlenianie NO_2, redukcja NO_3, nitryfikacja, respiracja NO_2 i N).**
7. **W wyniku prowadzonej działalności rolniczej następowała aktywacja i dezaktywacja poszczególnych szczepów.**

Praca naukowa dofinansowana ze środków budżetu państwa w ramach programu **Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Nauka dla Społeczeństwa” nr projektu NdS/531260/2021/2021**, kwota dofinansowania 100%, całkowita wartość projektu 625 910,50 PLN. Autorzy dziękują Zarządowi CGFP Sp. z o.o. w Wojnowie za założenie pól doświadczalnych oraz udostępnienie prób do badań.

Rola typu siedliska leśnego w kształtowaniu właściwości mikrobiologicznych i enzymatycznych gleby

Małgorzata Baćmaga, Jadwiga Wyszkowska, Jan Kucharski, Agata Borowik

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii

Wstęp

Gleba jest jednym z najbardziej zróżnicowanych i złożonych systemów występujących w środowisku naturalnym. Jest ona fundamentem wszystkich ekosystemów lądowych, w którym zachodzi szereg reakcji powstawania i rozkładu wielu substancji chemicznych, przez co uczestniczy w obiegu składników pokarmowych i wody w przyrodzie. Te właściwości tworzą odpowiednie siedlisko do występowania organizmów żywych, a szczególnie specyficznych grup mikroorganizmów odpowiedzialnych za przebieg procesów biologicznych i biochemicznych gleby ekosystemów leśnych (Urbański i Jakubiak, 2017). Gleby ekosystemów leśnych charakteryzują się dużym zróżnicowaniem, co może wynikać z rzeźby terenu, rodzaju skały macierzystej, warunków wodnych czy różnorodności flory i fauny (Gömöryová i in. 2017; Matei i in. 2020).

Złożoność i zróżnicowanie gleb ekosystemów leśnych stało się przesłanką do przeprowadzenia badań, których celem było określenie liczebności, różnorodności i struktury zespołów bakterii oraz aktywności enzymów w glebach pochodzących z czterech typów siedliska (bór świeży – Fc, bór mieszany świeży – Fm, las mieszany świeży – Mf i lasy mieszany wilgotny – Mm).

Materiał i metodyka badań

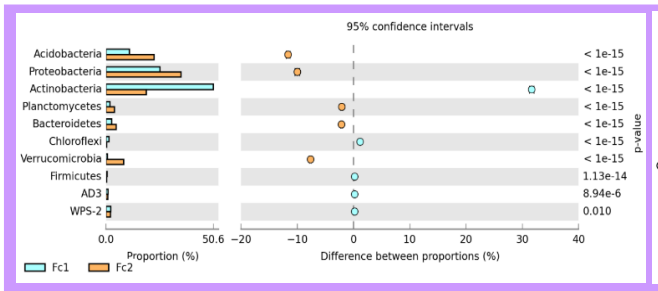
Badania zostały przeprowadzone na terenie Nadleśnictwa Stare Jabłonki w województwie warmińsko-mazurskim w północno-wschodniej części Polski. W listopadzie 2018 roku na terenie Nadleśnictwa wyznaczono 10 obszarów badawczych, z których pobrano próbki gleb do analiz mikrobiologicznych, enzymatycznych i fizykochemicznych. Materiał glebowy został pobrany z 4 wybranych siedlisk typu: bor świeży (Fc) – 2 powierzchnie badawcze, bór mieszany świeży (Fm) – 3 powierzchnie badawcze, las mieszany świeży (Mf) – 3 powierzchnie badawcze i las mieszany wilgotny (Mm) – 2 powierzchnie badawcze. Charakterystykę wybranych właściwości fizykochemicznych gleb przedstawiono w Tabeli 1. Właściwości mikrobiologiczne gleb określono na podstawie liczebności bakterii, indeksu rozwoju kolonii (CD) bakterii, wskaźnika ekofizjologicznej różnorodności (EP) bakterii, liczby kolonii bakterii wyrastających w określonych przedziałach czasowych (K_s) oraz analizy metagenomicznej. Oznaczono również metodami klasycznymi aktywność enzymów glebowych takich jak dehydrogenazy, katalaza, ureaza, fosfataza kwaśna, fosfataza alkaliczna, arylosulfataza i β-glukozydaza. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej oraz bioinformatycznej.

Tabela 1. Wybrane właściwości fizykochemiczne gleb.

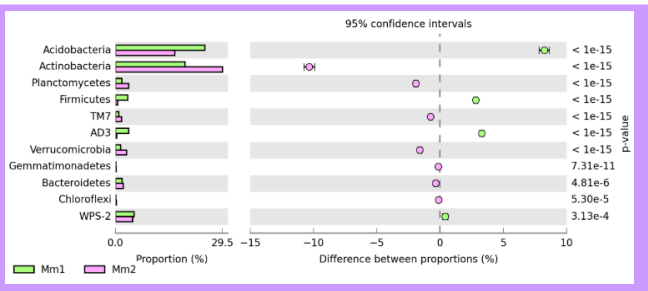
Typ siedliska	Podtyp gleby	pH_{KCl}	Hh	S	T	V (%)	C_{org}	$N_{ogólem}$
			mmol$^{(+)}$ kg^{-1}				g kg^{-1}	
Fc1	Dystric Albic Brunic Arenosols	3.67ab	84.00f	5.33e	89.33e	5.95de	23.50g	1.13g
Fc2	Dystric Albic Brunic Arenosols	2.93de	151.00d	22.00a	173.00c	12.70bc	61.80c	2.44c
Fm1	Dystric Albic Brunic Arenosols	3.33c	71.50g	8.67de	80.17e	10.76cd	22.00h	0.92g
Fm2	Dystric Albic Brunic Arenosols	2.73fg	159.50c	9.33de	168.83c	5.51e	47.00d	1.85d
Fm3	Dystric Albic Brunic Arenosols	2.83ef	131.00e	20.67ab	151.67d	13.62bc	42.40f	1.48f
Mf1	Brunic Arenosols	3.53b	71.50g	14.00cd	85.50e	16.33b	20.40i	0.94g
Mf2	Brunic Arenosols	3.73a	65.50h	21.33a	86.83e	24.52a	17.10j	1.11g
Mf3	Brunic Arenosols	3.03d	148.50d	19.33abc	167.83c	11.51bc	42.90e	1.68e
Mm1	Dystric/Eutric Gleysols	2.63g	230.00a	14.67bcd	244.67a	5.99de	109.30a	6.10a
Mm2	Gleyic Albic Podzols	2.93de	202.50b	25.33a	227.83b	11.12c	68.30b	3.81b

Objaśnienia: Fc – bór świeży; Fm – bór mieszany świeży; Mf – las mieszany świeży; Mm – las mieszany wilgotny; pH_{KCl} – odczyn gleby w 1 M KCl dm^{-3}; Hh – kwasowość hydrolityczna gleby; S – suma zasadowych kationów wymiennych; T – pojemność sorpcyjna gleby; V – wysycenie gleby kationami zasadowymi; C_{org} – zawartość węgla organicznego w glebie; $N_{ogólem}$ – zawartość azotu ogółem w glebie.

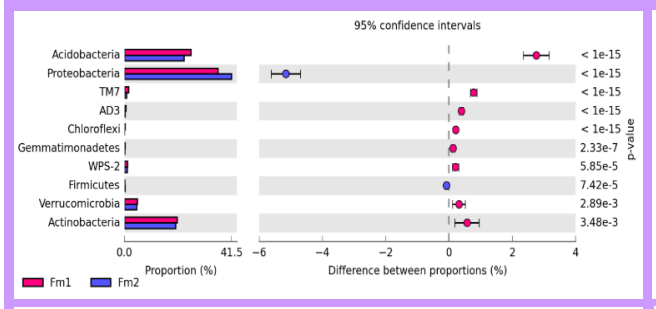
Wyniki

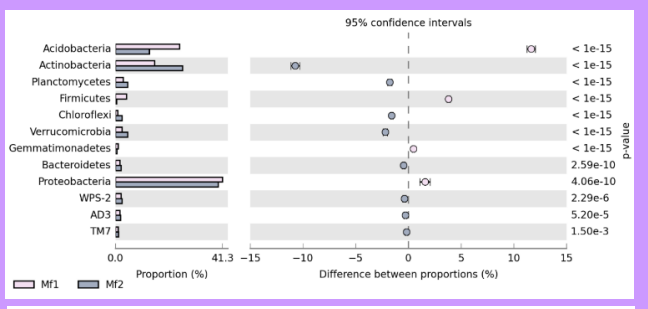


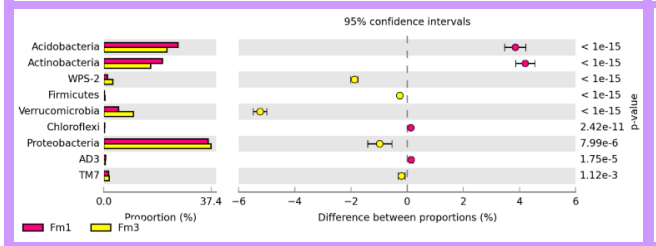
Rys. 1. Względna liczebność dominującego typu bakterii w glebach boru świeżego (Fc) z różnicą między proporcjami ≥ 1%.

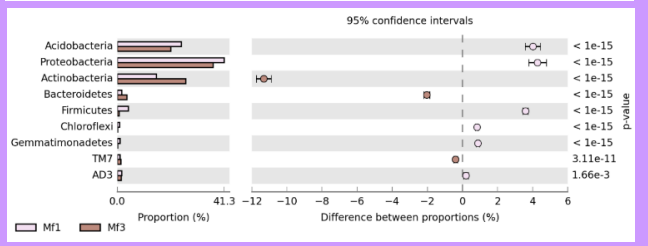


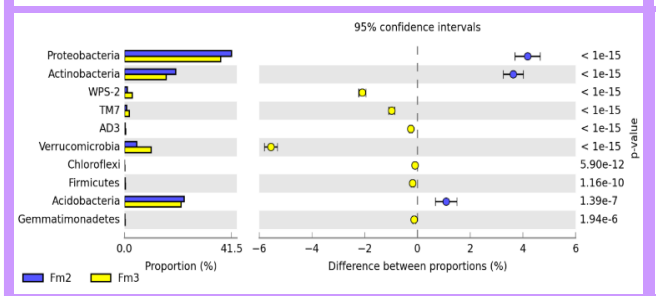
Rys. 3. Względna liczebność dominującego typu bakterii w glebach lasu mieszanego wilgotnego (Mm) z różnicą między proporcjami ≥ 1%.

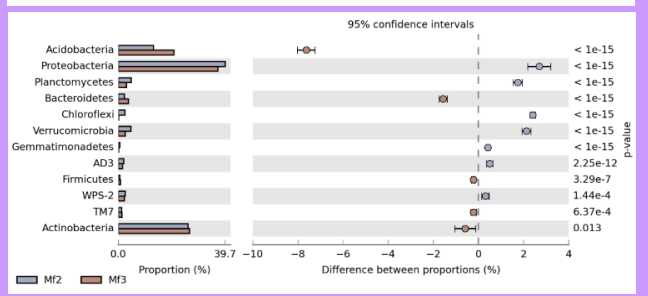






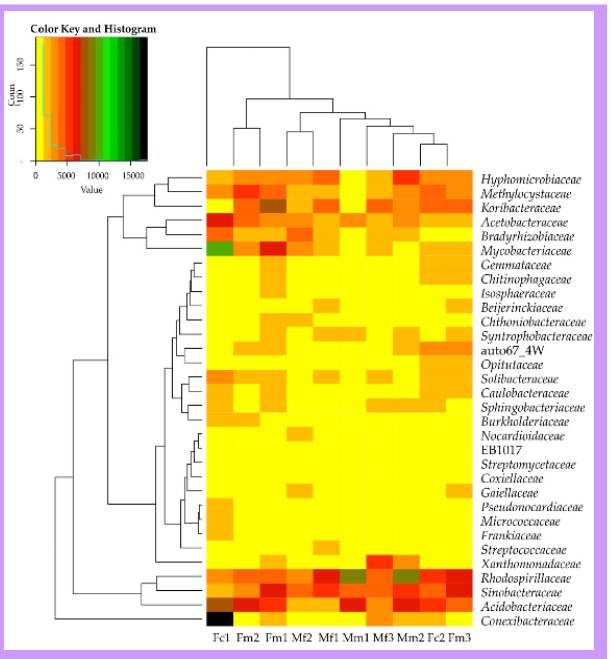




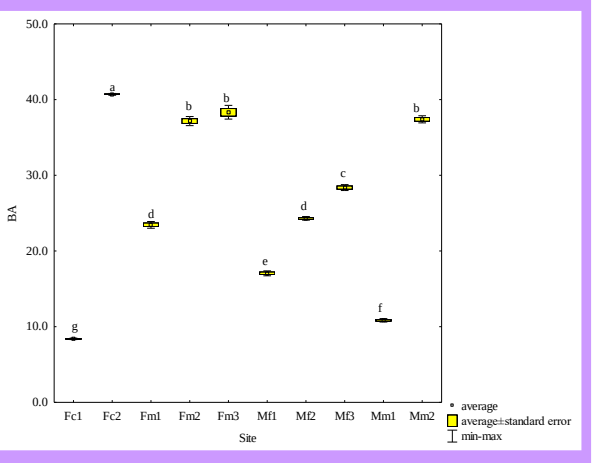


Rys. 2. Względna liczebność dominującego typu bakterii w glebach boru mieszanego świeżego (Fm) z różnicą między proporcjami ≥ 1%.

Rys. 4. Względna liczebność dominującego typu bakterii w glebach lasu mieszanego świeżego (Mf) z różnicą między proporcjami ≥ 1%.



Rys. 5. Względna liczebność dominującej rodziny bakterii w glebach z różnicą między proporcjami ≥ 1%.



Rys. 6. Biochemiczny indeks jakości gleb (BA).

Wnioski

1. Najwięcej bakterii organotroficznych i promieniowców namnażało się w glebie pochodzącej z boru mieszanego świeżego Fm.
2. Bakterie organotroficzne namnażały się w glebie szybciej niż promieniowce, co świadczy o ich przynależności do r-strategów, natomiast promieniowce reprezentowane były przez K-strategi.
3. W glebach najliczniej występowały bakterie z klas *Alphaproteobacteria* (typ *Proteobacteria*), kolejno *Actinobacteria* (typ *Actinobacteria*) i *Acidobacteriia* (typ *Acidobacteria*).
4. W obrębie phylum *Proteobacteria* dominowały bakterie z rodzaju *Rhodoplanes*, *Actinobacteria* – *Mycobacterium,* natomiast *Acidobacteria* – *Candidatus Solibacter*.
5. Biorąc pod uwagę biochemiczny wskaźnik jakości gleb BA najbardziej żyzna była gleba pochodząca z siedliska boru świeżego Fc2.
6. Siedliska pod względem aktywności biochemicznej można uszeregować następująco: Fc2 > Fm3 = Fm2 = Mm2 > Mf3 > Mf2 > Fm1 > Mf1 > Mm1 > Fc1.

Literatura

1. Gömöryová, E., Fleischer, P., Pichler, V., Homolák, M., Gere, R., Gömöry, D., 2017. Soil microorganisms at the windthrow plots: the effect of post-disturbance management and the time since disturbance. iForest 10, 515–521.
2. Matei, G.M., Matei, S., Mocanu, V., 2020. Assessing the role of soil microbial communities of natural forest ecosystem. EuroBiotech. J. 4, 1, 01–07.
3. Urbański, K., Jakubiak, M., 2017. Impact of land use on soils microbial activity. J. Water Land Dev. 35, 10–12, 249–257.

Kształtowanie się różnorodności grzybów glebowych pod wpływem wprowadzonego hydrolizatu keratynowego

Justyna Bohacz, Michał Możejko

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Agrobioinżynierii, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

WPROWADZENIE

Racjonalne nawożenie jest istotnym elementem aktualnej polityki dotyczącej gospodarki rolnej. Biorąc pod uwagę potencjalne negatywne oddziaływanie na środowisko nawozów chemicznych oraz wysokie ceny nawozów mineralnych poszukuje się alternatywnych bezpiecznych dla środowiska preparatów pochodzenia biologicznego, cechujących się wysokim potencjałem nawozowym i niskimi kosztami produkcji. Dlatego w odniesieniu do pozyskiwania takich preparatów ważna staje się idea zagospodarowania wartościowych odpadów pochodzenia przemysłowego. Do takich odpadów należą m.in. poprodukcyjne pióra kurcząt, które należą do odpadów wysokoazotowych i wysokosiarkowych. Niewielki procent ich racjonalnego zagospodarowania skłania do ukierunkowania wykorzystania tych odpadów m.in.. na cele praktyki rolniczej.

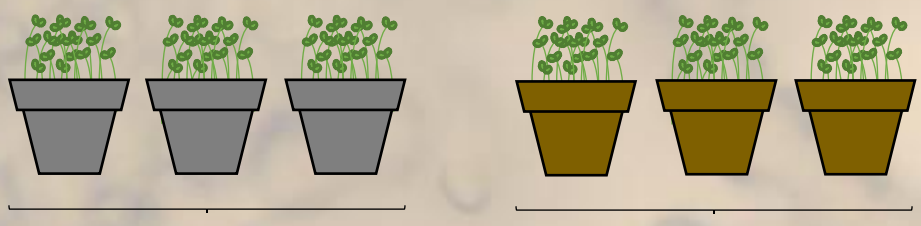
CEL PRACY

Celem pracy było określenie wpływu hydrolizatów otrzymanych na drodze grzybowej biodegradacji keratyny poprodukcyjnego pierza kurcząt przez grzyby *Arthroderma tuberculatum* wyizolowane gleby o stałym dopływie materii keratynowej na bioróżnorodność grzybów w glebie bielicowej z obsadą i bez obsady rzepaku *Brassica napus* var. *napus*.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiałem do badań były hydrolizaty wytworzone na drodze hydrolizy enzymatycznej poprodukcyjnego pierza kurcząt przez grzyba *Arthroderma tuberculatum* Kuehn zidentyfikowanego za pomocą tradycyjnych metod na podstawie cech makroskopowych i mikroskopowych oraz metodą PCR i sekwencjonowania nukleotydów z wykorzystaniem specyficznych starterów ITS1 i ITS4.

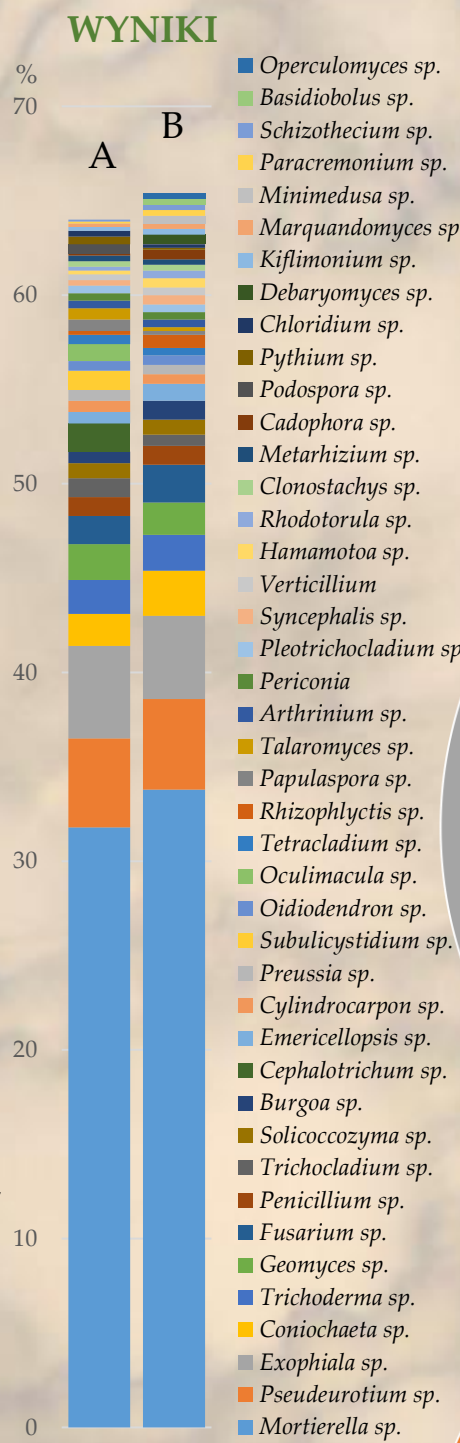
Doświadczenie prowadzono w wazonach, w warunkach szklarniowych. Okresowo glebę [(gleba o składzie granulometrycznym piasku gliniastego (Haplic Podzol) (zawartość Corg. 5,3 g·kg^{-1})] z obsadą roślin *Brassica napus* var. *napus* podlewano wodą (A) (kontrola) albo hydrolizatem (B). Okresowe oznaczanie liczebności grzybów prowadzono w terminie 0 tj. po 72 godz. od założenia doświadczenia (termin I), po 14 (termin II) oraz 30 tygodniach (termin III). Do oznaczenia bioróżnorodności grzybów we wczesnym okresie odziaływania hydrolizatu (termin I) zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) w odniesieniu do zmiennego regionu ITS1 na platformie Illumina MiSeq (Eurofins, Germany).

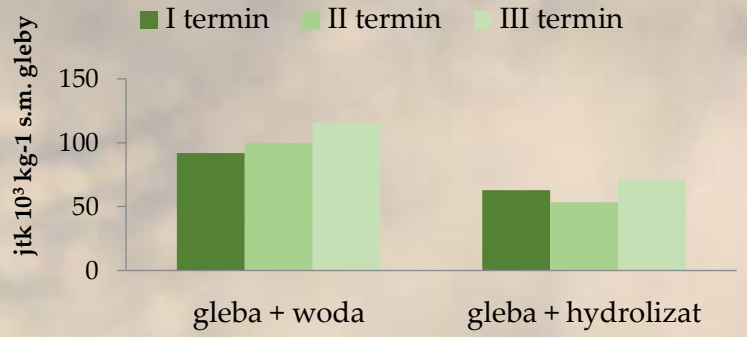


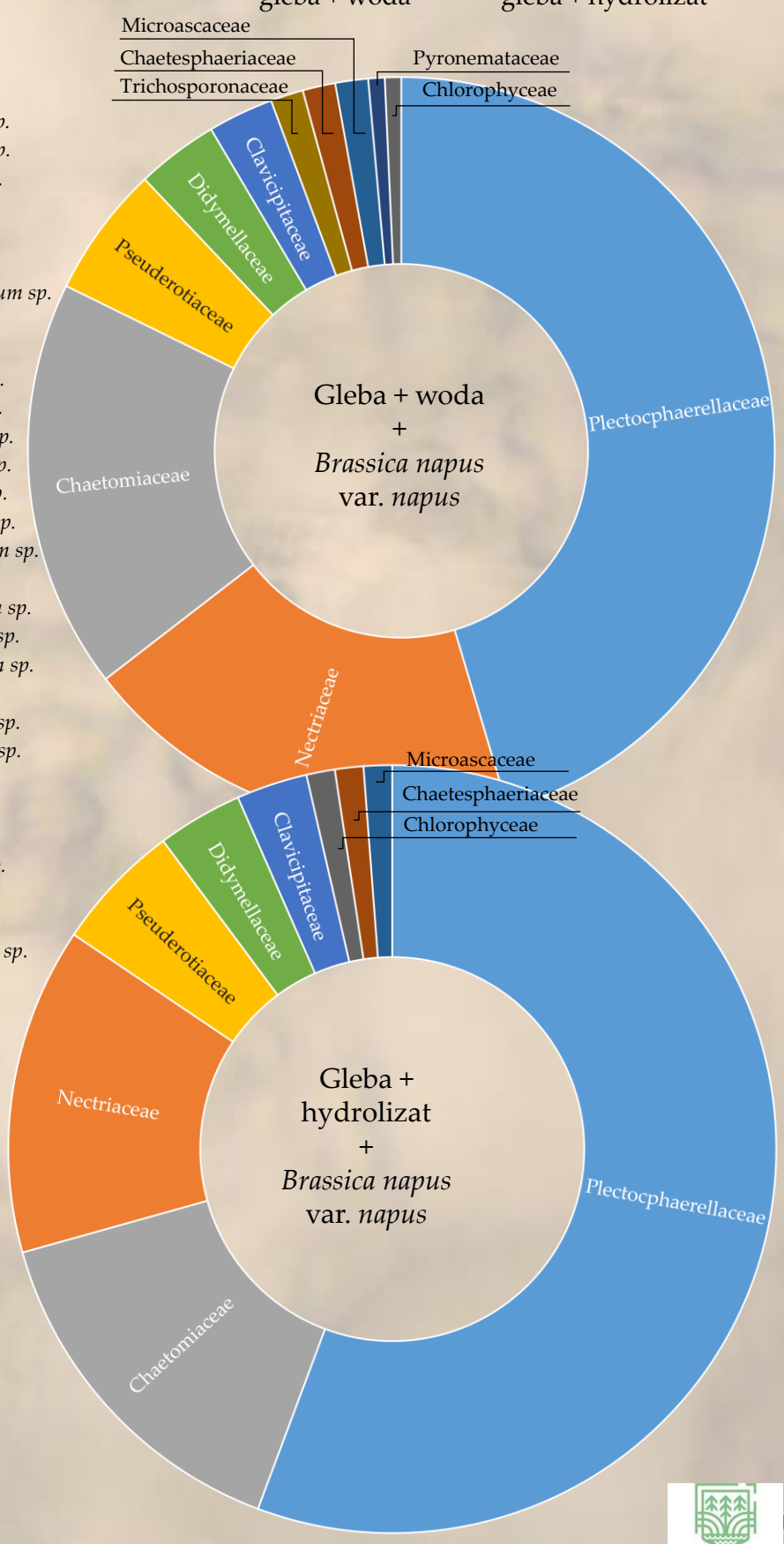
Gleba + woda + *Brassica napus* L. var *napus*

Gleba + hydrolizat keratynowy + *Brassica napus* L. var *napus*

WYNIKI







WAŻNIEJSZE WYNIKI I WNIOSKI

1. Wykazano, że nawożenie hydrolizatem keratynowym zwiększa pulę OTU w glebie oraz zmienia skład taksonomiczny grzybów.
2. W glebie nienawożonej hydrolizatem dominującym taksonem były rodziny Plecosphaerellaceae, Nectriaceae, Chaetomiaceae, które stanowiły odpowiednio 6,4%, 2,7% i 2,5 % całej puli OTU.
3. Po wprowadzeniu hydrolizatu zmniejszyła się rodzina Nectriaceae. Najliczniejszą część mykobiomu stanowiły grzyby z rodzaju *Mortierella* tj. 23,0% całej puli OTU w wariancie bez hydrolizatu i 23,2 % z hydrolizatem.
4. Dominującym gatunkiem była *Mortierella exigua*, której udział w puli OTU był stymulowany dodatkiem hydrolizatu (wzrost z 2,8% na 3.2% w puli OTU).
5. Grzyby te uznawane są jako bionawozy poprawiające wzrost roślin.

Badania finansowane ze środków Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Lublinie, Nr 8/2020/D/IN

ODDZIAŁYWANIE METALI CIĘŻKICH NA BAKTERIE W RYZOSFERZE *ELYMUS ELONGATUS* I *ZEA MAYS*

Edyta Boros-Lajszner, Jadwiga Wyszkowska, Agata Borowik, Jan Kucharski

Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

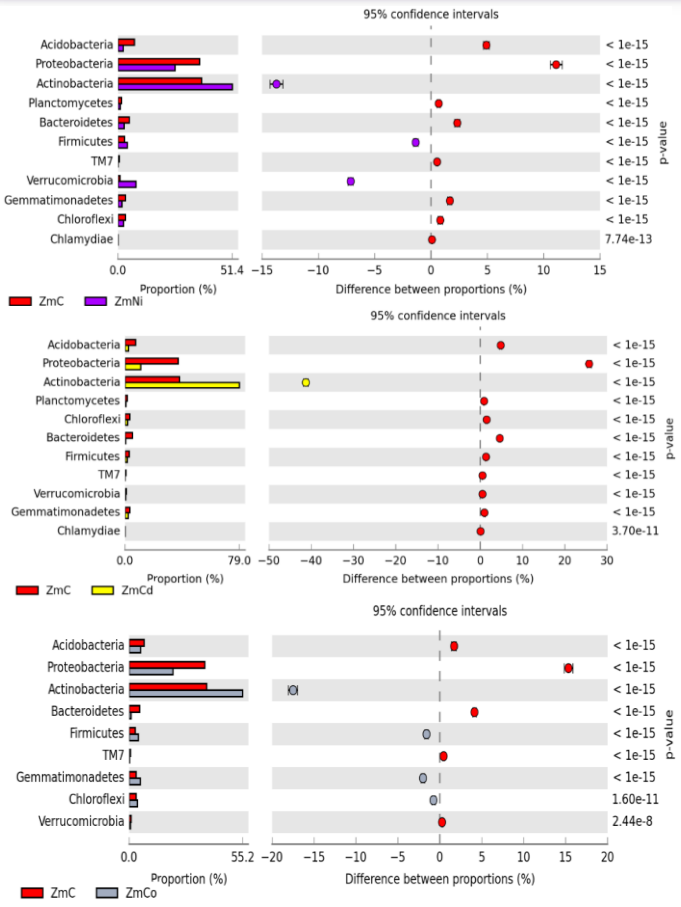
Wstęp

Bioróżnorodność bakterii jest złożona, wynika to z konkurencji między drobnoustrojami, jedne gatunki mogą hamować rozwój innych, ale również mogą współpracować z innymi organizmami wyższymi - roślinami. Analizując ten ostatni aspekt to drobnoustroje mogą nie tylko stymulować wzrost i rozwój roślin, zapobiegać chorobom, ale również zwiększać odporność roślin na stres wywołany czynnikami abiotycznymi, m.in. metalami ciężkimi. Ponadto różne konsorcja drobnoustrojów mogą dostosować się do określonych warunków środowiska, stanowiąc ogromny rezerwuar informacji genetycznej związanej z gospodarzami bytującymi w środowiskach narażonych na różne stresy biotyczne i abiotyczne. Sprawia to, że drobnoustroje mogą łatwiej adaptować się do warunków stresowych i powodować zmiany bioróżnorodności. Celem prezentowanych badań było określenie zmian powodowanych przez Ni^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} w różnorodności genetycznej bakterii w glebie, na której uprawiano *Elymus elongatus* i *Zea mays*.

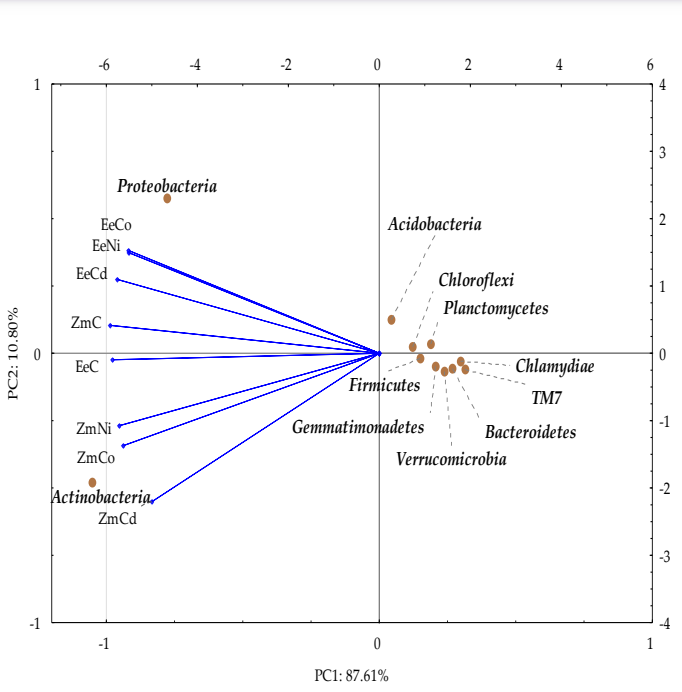
Metodyka

Badania wykonano w doświadczeniu wazonowym. Przeprowadzono je na glebie zanieczyszczonej niklem, kobaltem i kadmem w ilości Ni^{2+} – 400 mg kg^{-1} , Co^{2+} – 80 mg kg^{-1} i Cd^{2+} – 8 mg kg^{-1}. Roślinami doświadczalnymi były *Elymus elongatus* i *Zea mays*. Po ich zbiorze w materiale roślinnym i glebie oznaczono zawartość wyżej wymienionych metali ciężkich, a w glebie dodatkowo wykonano analizę metagenomiczną bakterii.

Wyniki



Rys. 1. Względna liczebność phylum bakterii z liczbą OTU ≥ 1% w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi

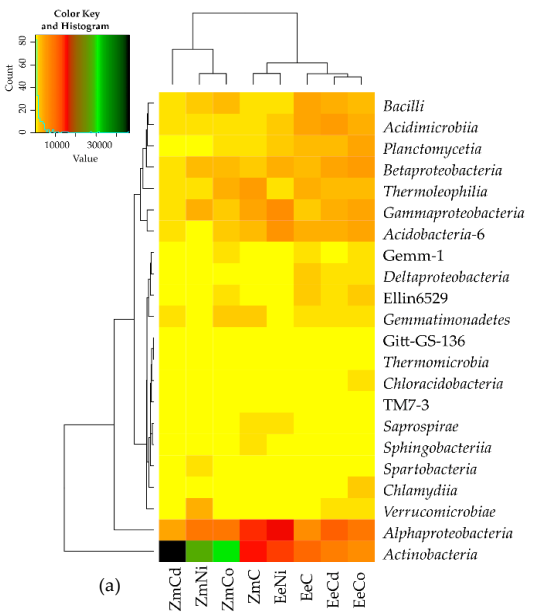


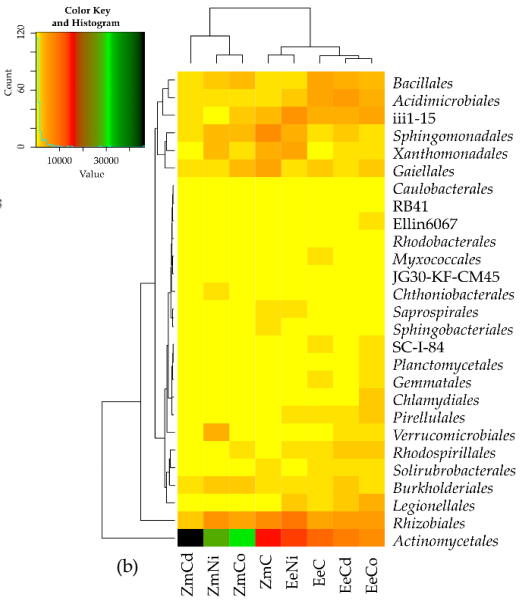
Rys. 2. Phylum bakterii w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi przedstawionych za pomocą PCA

Tabela 1. Różnorodność bakterii w glebach zanieczyszczonych metalami ciężkimi wyrażona wartością wskaźnika Shanonna (H')

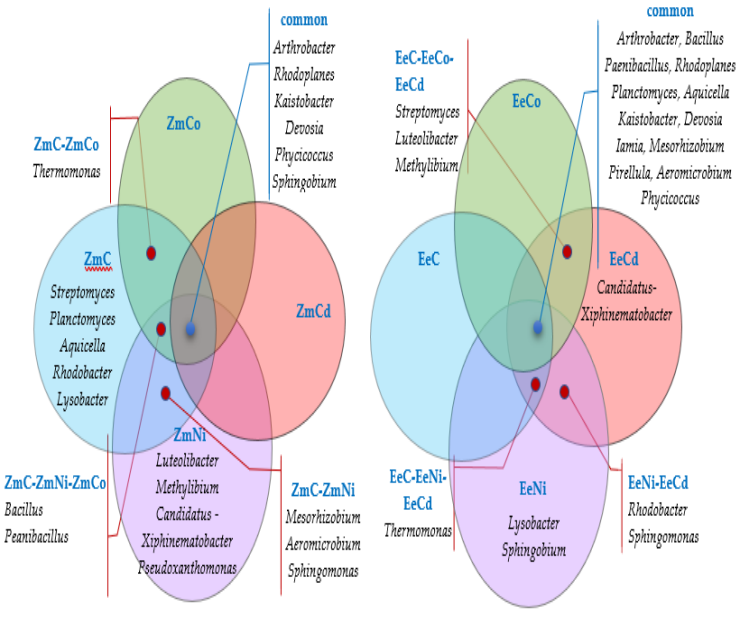
Taxon	Object							
	EeC	EeNi	EeCo	EeCd	ZmC	ZmNi	ZnCo	ZnCd
Pylum	2.02^{b}	1.78^{c}	2.16^{a}	2.00^{b}	1.67^{cd}	1.54^{d}	1.54^{d}	0.90^{e}
Class	3.08^{b}	2.60^{c}	3.18^{a}	3.04^{b}	2.51c	2.19^{d}	2.24^{d}	1.28^{e}
Order	3.19^{c}	3.00^{d}	3.43^{a}	3.35^{b}	2.86^{e}	2.39^{f}	2.45^{f}	1.38^{g}
Family	3.29^{a}	3.25^{a}	3.11^{b}	3.31^{a}	3.26^{a}	2.82^{cb}	2.72^{c}	1.84^{d}
Genus	2.01^{bc}	2.13^{b}	1.86^{c}	2.06^{bc}	2.19^{b}	2.37^{a}	1.93^{c}	1.55^{d}

Ee - *Elymus elongatus*; Zm – *Zea mays*; C – gleba kontrolna niezanieczyszczona metalami ciężkimi; Cd – gleba zanieczyszczona Cd^{2+}; Co – gleba zanieczyszczona Co^{2+}; Ni – gleba zanieczyszczona Ni^{2+}; a – g – grupy jednorodne





Rys. 3. Względna liczebność klas (a) i rzędów (b) bakterii z liczbą OTU ≥ 1% w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi



Rys. 4. Unikalne i wspólne rodzaje bakterii w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi (diagram Venn)

Wnioski

1. *Elymus elongatus* łagodziła w większym stopniu niż *Zea mays* zakłócenia w różnorodności bakterii wywołane przez metale ciężkie. Potwierdzają to wartości wskaźnika Shannona.
2. Najbardziej negatywne działanie spośród wszystkich badanych metali ciężkich na różnorodność bakterii na wszystkich poziomach taksonomicznych wywarł Cd^{2+} w ryzosferze *Zea mays*.
3. Bakterie z rodzaju *Arthrobacter*, *Rhodoplanes*, *Kaistobacter*, *Devosia* i *Phycicoccus* są mało wrażliwe na zanieczyszczenie gleby Ni^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} i wśród tych rodzajów należy poszukiwać gatunków przydatnych w remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

Poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za uwalnianie fosforu z podłoża przez mikroorganizmy

Aleksandra Brankiewicz[1], Rafał Ważny[1], Roman J. Jędrzejczyk[1], Agnieszka Domka[1], Oliwia Śmieszek[1], Piotr Rozpądek[1]

[1]Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

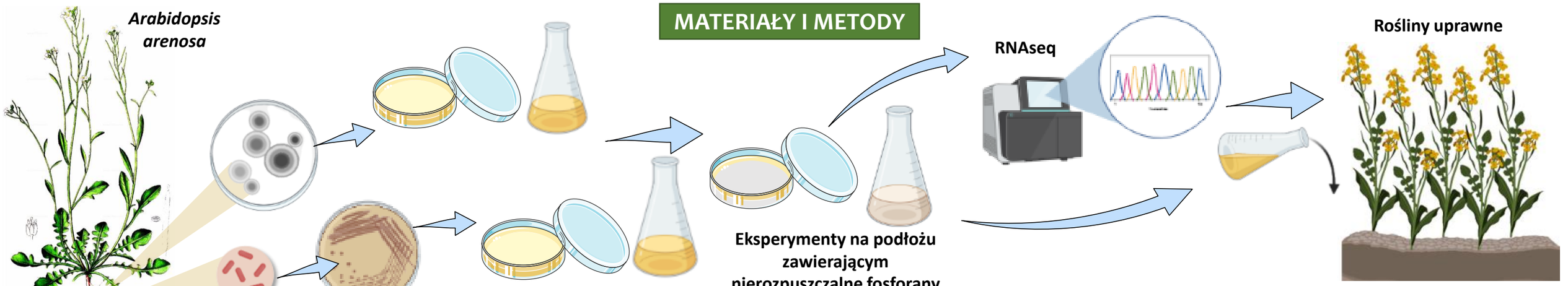
WSTĘP

Fosfor jest jednym z podstawowych makroelementów, niezbędnych do wzrostu i rozwoju roślin. Zasoby tego pierwiastka w glebie są ograniczone, stąd konieczne jest uzupełnianie jego niedoboru. Odbywa się to głównie przez stosowanie nawozów mineralnych na bazie fosforytów. Zmniejszające się światowe zasoby fosforytów skłaniają do poszukiwania alternatywnych źródeł zaopatrywania roślin w fosfor. Jednym z nich jest wykorzystanie mikroorganizmów do zwiększania przyswajania fosforu obecnego w glebie przez roślinę. Mechanizmy determinujące gospodarkę fosforową mikroorganizmów endofitycznych nie są dobrze poznane.

PODSUMOWANIE

1. Niespełna połowa ze zidentyfikowanych szczepów wykazał zdolności do rozpuszczania fosforanów nieorganicznych.
2. Zidentyfikowano dwa gatunki bakterii (*Pseudomonas koreensis* i *Lelliottia amnigena*), w obrębie których były szczepy zdolne do uwalniania fosforu oraz niewykazujące takich właściwości.

MATERIAŁY I METODY

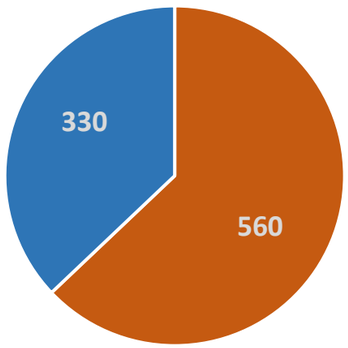


CELE PRACY

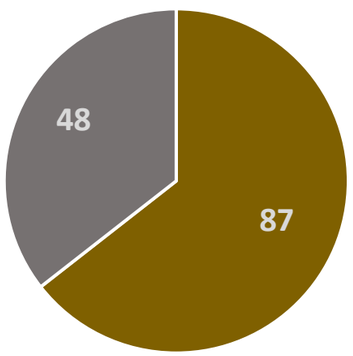
1. Izolacja i selekcja endofitycznych grzybów i bakterii zdolnych do rozpuszczania fosforanów obecnych w podłożu hodowlanym
2. Identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za gospodarkę fosforanową w mikroorganizmach
3. Czy wyselekcjonowane endofity zwiększają pobór fosforu przez rośliny?

WYNIKI

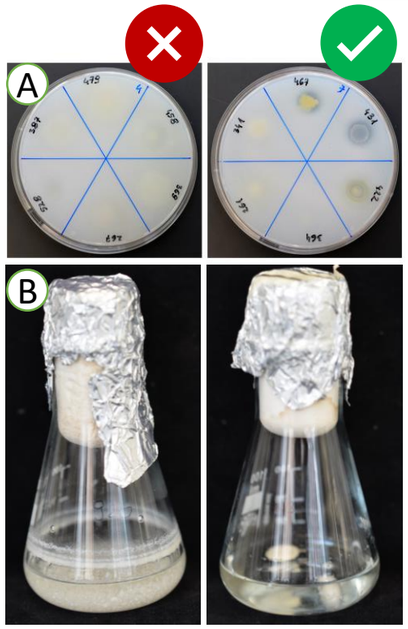
Liczba wyizolowanych szczepów mikroorganizmów



Liczba zidentyfikowanych taksonów mikroorganizmów



Bakterie (A) i grzyby (B) rozpuszczają fosforany w podłożu



Pseudomonas koreensis, gatunek w obrębie którego są szczepy wykazujące i niewykazujące zdolności do rozpuszczania fosforanów

Szczep	Eksp. 1	Eksp. 2	Eksp. 3	Eksp. 4	Eksp. 5	Eksp. 6
OP421	-++	+++	+++	++-	++-	+++
OP468	---	+++	+--	---	+--	---
OP472	+++	+++	+++	+++	+++	+++
OP473	---	---	---	---	+--	+++
OP484	+++	+++	+++	---	+++	+++
OP488	---	---	+--	+++	+++	+++
OP489	---	++-	++-	+--	---	---
OP501	---	---	---	---	---	---
OP519	+++	++-	+--	---	---	---
OP549	+++	+++	+++	+--	++-	+++
OP568	+++	---	+++	+--	++-	+++

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (2017/27/B/NZ8/01199)

Instytut Uprawy
Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy

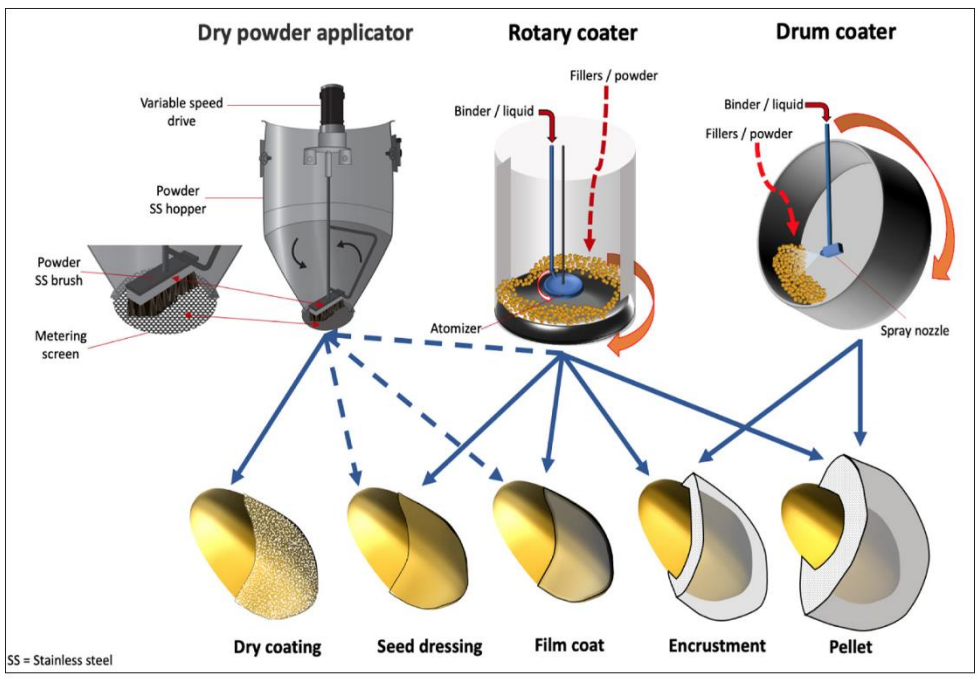
Otoczkowanie nasion- jak zapewnić lepszy start roślinie

Jarosław Ciepiel [1]
Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - PIB

Otoczkowanie to zabieg polegający na pokryciu nasion roślin uprawnych aktywnymi składnikami w celu poprawienia ich jakości oraz zwiększenia wydajności upraw. Zaprawianie nasion jest efektywne gdy jest dostosowane do celu otoczkowania, specyfikacji danej rośliny i środowiska w jakiej będzie się rozwijać.

Już 2000 lat temu w Chinach rolnicy pokrywali nasiona ryżu kulkami z błota podczas siewu na zalanych polach. W Indiach tradycją stało się stosowanie papki z krowiego łajna do granulowania nasion bawełny, aby ułatwić ich wysiew. W Europie w 1960r. komercyjne wykorzystanie na dużą skalę powlekanych nasion rozpoczęło się od wdrożenia techniki precyzyjnego siewu roślin szklarniowych. Stosowano wówczas siarczan miedzi, w którym moczono nasiona. Metoda ta jednak stawała się czasochłonna i uciążliwa ze względu na późniejsze suszenie ziaren. W połowie XX w. opracowano wiele technik otoczkowania, aby jak najskuteczniej poprawić stan produkcji rolnej. W kolejnych latach kontynuowano udoskonalanie technologii otoczkowania.

Sprzęt i sposoby powlekania nasion



Rys. 1. Typy urządzeń do otoczkowania nasion: aplikator suchego proszku, powlekarka obrotowa, powlekarka bębnowa. (Źródło: I. Afzal i.in. Modern seed technology: seed coating delivery systems for enhancing seed and crop performance, Aglicurture 10 (11), s. 526, 2020)

Dobór sprzętu i metody do powlekania uwarunkowany jest przede wszystkim dawką substancji czynnych, płynów i składników stałych stosowanych na jednostkę materiału siewnego. Obecnie stosuje się trzy główne typy urządzeń do powlekania nasion: do powlekania na sucho, rotacyjnego i granulowania. (rys. 1). Maszyny te, stosowane pojedynczo lub w niektórych przypadkach w kombinacji, tworzą pięć metod powlekania: na sucho proszkiem (dry coating), zaprawianiem nasion (seed dressing), powlekaniem filmem (film coat), inkrustowaniem (encrustment) i granulowaniem (pellet). Wspólnym celem wszystkich urządzeń i metod powlekania jest uzyskanie wysokiej równomierności nakładania i przylegania preparatu do nasion .

Literatura:
I. Afzal i.in.; Modern seed technology: seed coating delivery systems for enhancing seed and crop performance, Aglicurture 10 (11), s. 526, 2020
S. Pedrini i. in.; Seed coating: science or or marketing spin?, Trends in Plant Science vol 22, no 2, s. 106-116, 2017
K.K. Sharma i in.; Seed treatments for sustainable agriculture—A review. J. Appl. Nat. Sci. 2015, 7, 521–539

Cele otoczkowania nasion:

- Ochrona bakterii promujących wzrost i rozwój roślin (PGPR)
- Dostarczenie mikro- i makroelementów
- Ochrona przed ptakami i gryzoniami
- Dostarczenie regulatorów wzrostu
- Utrzymywanie wilgoci
- Dostarczanie tlenu
- Stymulacja i ułatwianie kiełkowania
- Zwiększenie masy lub wielkości nasion
- Dostarczenie selektywnych herbicydów

Materiały do zaprawiania nasion

Składniki aktywne	Ciecze	Cząstki stałe
Biostymulatory: • SYN, NP,BIO	Barwniki • SYN, NP	Spoiwa • Mąka sojowa NP
Roślinne składniki odżywcze • SYN, MIN	Wspomagacze • SYN	Wypełniacze (MIN) • Ziemia okrzemkowa • Węglan wapnia • Gips • Bentonit • Wermikulit • Talk • Zeolit • Krzemionka • Siarczan baru
Blokujące stres abiotyczny • SYN, BIO	Spoiwa (SYN) • Alkohol poliwinylowy • Polioctan winylu • Metyloceluloza • Karboksymetyloceluloza Spoiwa (NP) • Skrobia • Guma arabska	
Środki ochrony roślin • SYN, NP, BIO, MIN		
Szczepionki • BIO, MIN		

Tabela 1. Materiały stosowane do otoczkowania nasion. Skróty oznaczające pochodzenie materiału: SYN- syntetyczne substancje chemiczne, NP- produkty naturalne, BIO- biologiczne, MIN- mineralne (źródło: I. Afzal i.in. Modern seed technology: seed coating delivery systems for enhancing seed and crop performance, Agriculture, 10 (11), s. 526, 2020.)

Wnioski

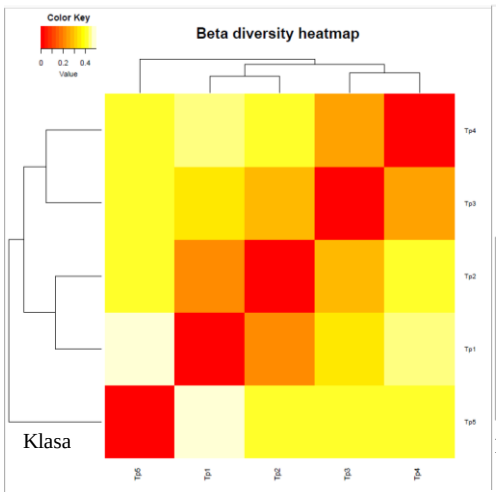
- Gospodarka nasienna jest nieodzownym elementem udanej produkcji roślinnej
- Powleczone nasiona dają lepszą wydajność upraw i mogą efektywniej konkurować z chwastami
- Powlekanie nasion jest postrzegane jako jeden ze sposobów, w jaki sadzonki mogą uzyskać lepszą "zdolność konkurencyjną"
- W uprawie roślin wczesny wzrost siewek ma ogromne znaczenie dla uzyskania optymalnych stanowisk i maksymalizacji plonów
- Powłoki nasienne powinny zostać opracowane jako narzędzie menegmentu, stanowiące integralny składnik poprawiający osadzanie nasion w szerokim zakresie warunków środowiskowych
- Aby uzyskać aktywny i efektywny jednolity wzrost siewek i roślin, technika granulowania nasion może przynieść wspaniałe efekty
- Barwienie nasion jest wymagane przez prawo, aby uniknąć przypadkowego użycia zaprawionych nasion jako żywności lub paszy, co jest praktyką stosowaną głównie przez przetwórców nasion

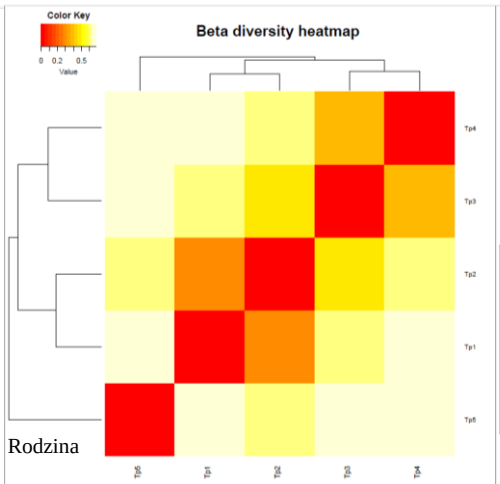
Analiza metataksonomiczna zbiorowisk grzybów w profilu gleby płowej pod uprawą pszenicy

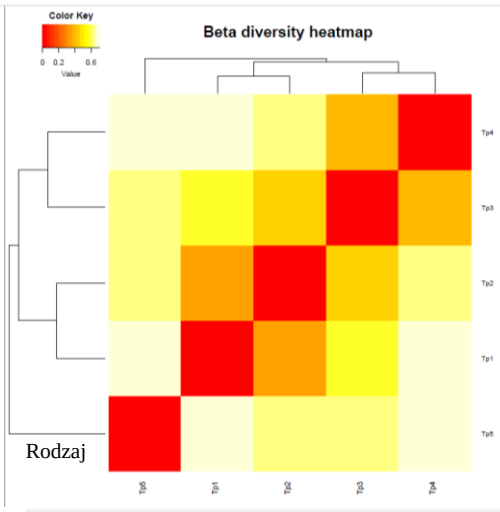
Magdalena Frąc*[1]; Agata Gryta[1], Anna Piotrowska-Długosz*[2]

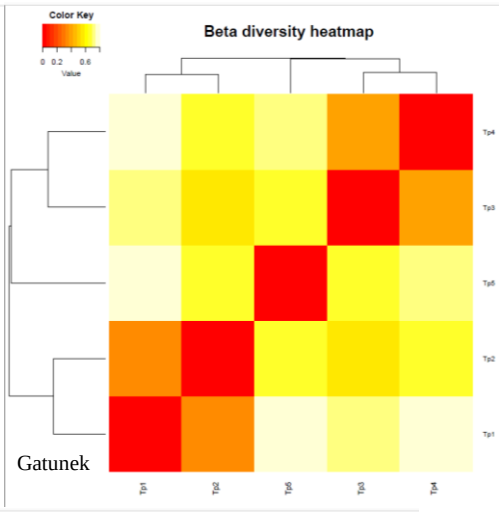
1 Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
2 Katedra Biogeochemii i Gleboznawstwa, Wydział Rolnictwa i Biotechnologii, Politechnika Bydgoska, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz
m.frac@ipan.lublin.pl

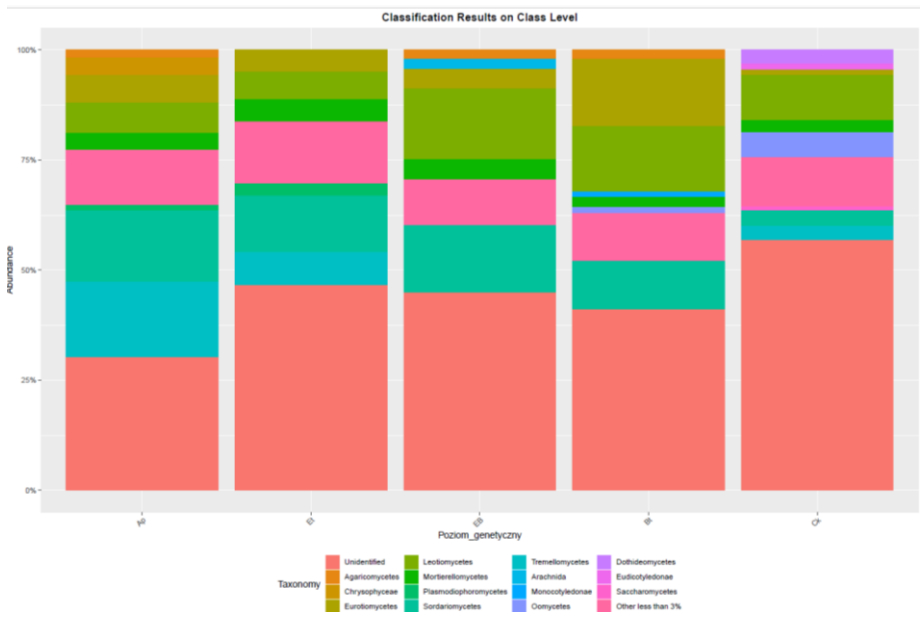
Pomimo wielu prac dotyczących mikrobiomu środowiska glebowego, zagadnienie to wymaga wciąż badań, zwłaszcza w kontekście rozpoznania zbiorowisk grzybów występujących w głębszych warstwach profilu glebowego. Celem badań było określenie zmian w składzie mikrobiomu grzybowego w profilu gleby płowej pod uprawą pszenicy. Próbki gleby pobrano z pięciu poziomów genetycznych profilu gleby płowej typowej: Ap, Eet, EB, Bt, Ck, które obejmowały odpowiednio następujące głębokości: 0-32, 32-46, 46-58, 58-135, >135 cm. Badania obejmowały określenie mykobiomu poszczególnych warstw profilu glebowego na podstawie sekwencjonowania regionu markerowego ITS1 badanych próbek z wykorzystaniem technologii Illumina MiSeq.

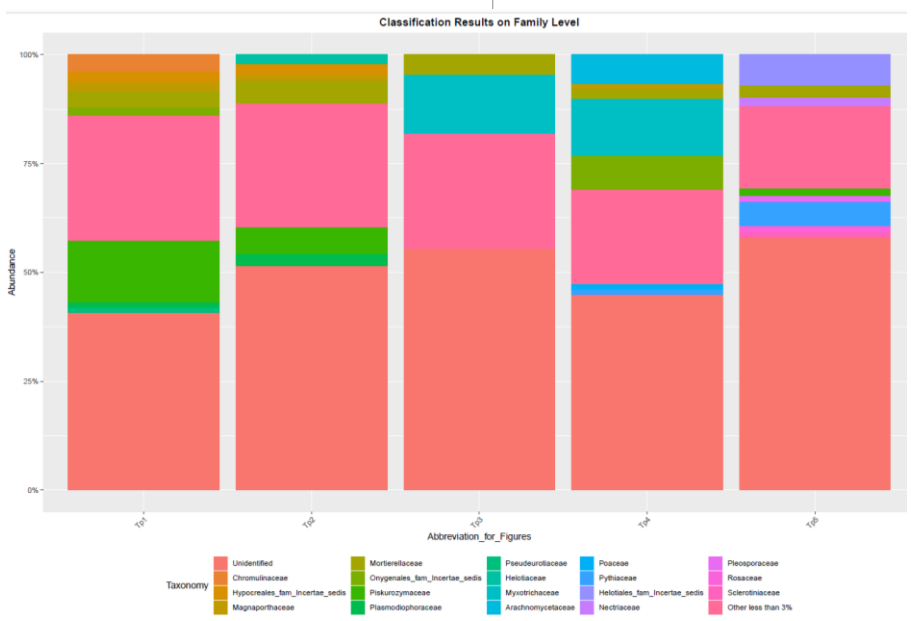












Analiza skupień wykazała, że próbki pobrane z wierzchnich warstw profilu glebowego (Ap, Eet) charakteryzowały się odmiennym mikrobiomem grzybów w porównaniu do głębszych poziomów (EB, Bt). Mykobiom najgłębszej warstwy gleby był odmienny od pozostałych lub grupował się w obrębie klastra (EB, Bt), w zależności od rozpatrywanego poziomu taksonomicznego. W wierzchnich warstwach gleby dominowały przedstawiciele klas Sordariomycetes i Tremellomycetes, a w głębszych Leotiomycetes i Eurotiomycetes. Ponadto, w najgłębszej warstwie stwierdzono występowanie przedstawicieli Dothideomycetes, Eudicotyledonae i Oomycetes.

Praca sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki, Opus 15, 2018/29/B/NZ9/00982

Różnorodność mikrobiomu mady bardzo lekkiej z Małopolskiego Przełomu Wisły oraz jego reakcja na symulowaną powódź

Furtak Karolina, Gałązka Anna, Grządziel Jarosław
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Badania wykonano w ramach realizacji dotacji dla młodych naukowców IUNG-PIBMNISW (2018): Wpływ letnich powodzi na zmiany bioróżnorodności strukturalnej i funkcjonalnej mikrobiomu wybranych mad rzecznych.

WPROWADZENIE

W prezentowanych badaniach dokonano analizy strukturalnej mikrobiomu mady bardzo lekkiej pochodzącej z Małopolskiego Przełomu Wisły (woj. lubelskie) oraz jego reakcji na warunki symulowanej powodzi.

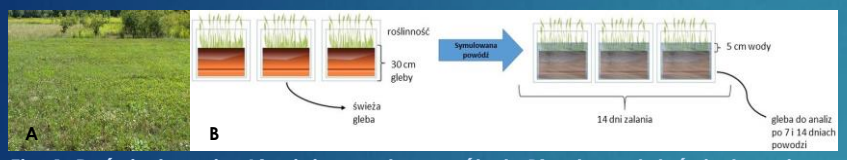


Fig. 1. Doświadczenie: A) miejsce poboru próbek; B) schemat doświadczenia

Tabela 1. Parametry fizyko-chemiczne badanej mady

Skład granulometryczny											
BN-78/9180-11				PTG 2008							
piaski	pyły	cz. spław.	gat.	piaski	pyły	ił	gat.	$N_{tot.}$ (%)	C_{tot} (%)	$C_{org.}$ (%)	Próchnica (%)
89	5	6	piasek słabo-gliniasty	92	8	0	piasek luźny	0,056± 0,004	0,622± 0,006	0,551± 0,021	0,951 ± 0,036

MATERIAŁ I METODY BADAWCZE

Materiał stanowiła gleba pobrana z miejscowości Janowiec w woj. Lubelskim (51°19'14.4"N 21°54'42.9"E). Miejsce poboru próbek to łąka (Fig. 1a), nieużytkowana rolniczo, położona za wałem przeciwpowodziowym, która stanowi naturalny teren zalewowy Wisły. Glebę scharakteryzowano jako madę bardzo lekką (Tabela 1).

Glebę pobrano w formie profilu glebowego o głębokości 25 cm wraz z roślinnością w trzech powtórzeniach i umieszczono w transparentnych, polipropylenowych pojemnikach o wymiarach 33 x 33 x 42 cm [1]. Następnie zalano wodą rzeczną na wysokość 5 cm nad powierzchnię gleby (Fig. 1b). Do analiz pobrano glebę świeżą, a następnie po 7 i 14 dniach zalania.

Strukturę społeczności bakteryjnej analizowano przy użyciu sekwencjonowania następnej generacji (Miseq, Illumina). Poszukując informacji w literaturze światowej, określono cechy wybranych bakterii [2].

WYNIKI

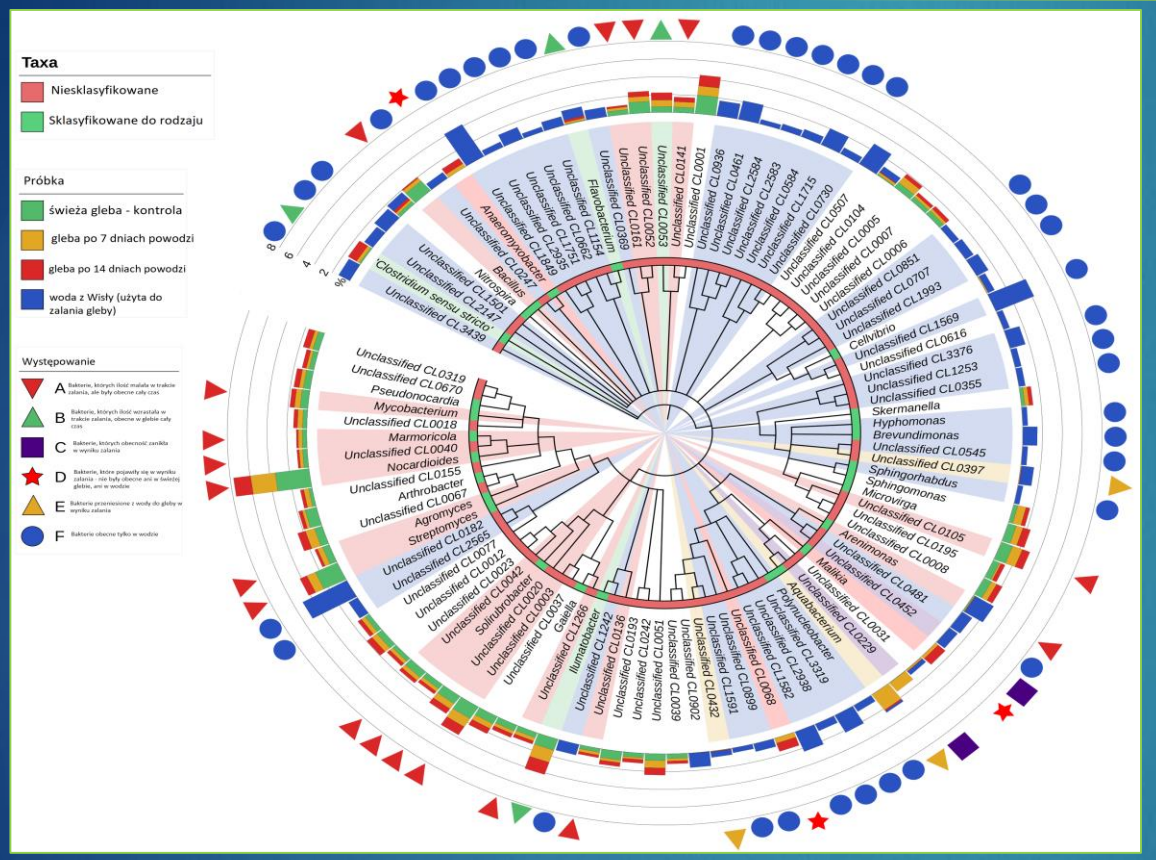


Fig. 2. Drzewo filogenetyczne dla rodzajów bakterii w madzie w symulowanych warunkach powodziowych. Wykres przedstawia względną liczebność (%) bakterii zidentyfikowanych (zielone oznaczenie na wewnętrznym okręgu) na poziomie rodzaju oraz niezidentyfikowanych (różowe oznaczenie na wewnętrznym okręgu) na każdym etapie doświadczenia (zielony słupek - kontrola, żółty słupek - gleba po 7 dniach zalania, czerwony słupek - gleba po 14 dniach zalania) oraz w wodzie (niebieski słupek).

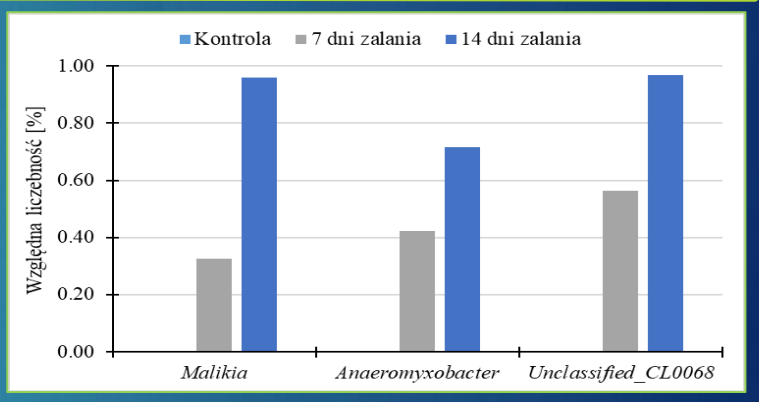


Fig. 3. Względna liczebność 3 rodzajów bakterii, które pojawiły się w glebie po zalaniu

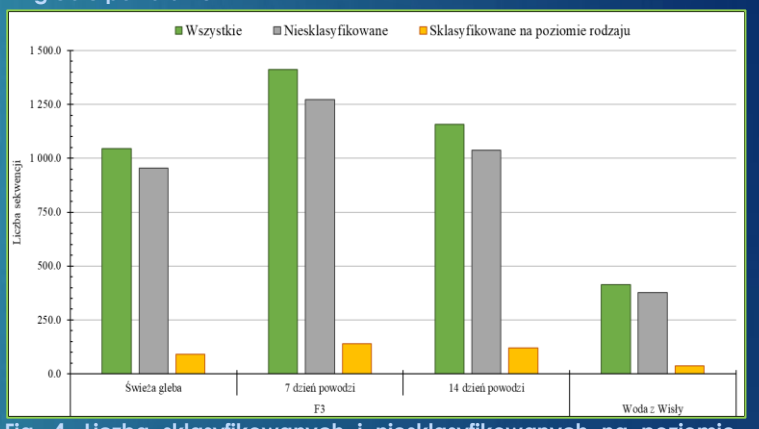


Fig. 4. Liczba sklasyfikowanych i niesklasyfikowanych na poziomie rodzaju sekwencji

Dwie bakterie niesklasyfikowane do rodzaju (tj. CL0229 i CL0452) całkowicie zanikły w wyniku zalania gleby.
W zalanej glebie odnotowano obecność bakterii naniesonych z wody: *Aquabacterium*, CL0397 i CL0432. Stwierdzono również wzrost liczebności bakterii z rodzajów Clostridium, *Flavobacterium*, *Ilumatobacter* oraz CL0053. Natomiast występowanie 18 bakterii, m.in. *Bacillus*, *Solirubrobacter*, *Arenimonas* oraz *Mycobacterium*, zmniejszyło się (Fig. 2).
Interesującą obserwacją jest pojawienie się w zalanej glebie bakterii, których nie wykryto wcześniej ani w wodzie, ani w glebie świeżej (Fig. 2 i 3). Bakterie te zidentyfikowano dopiero po 7 i 14 dniach zalania. Dwie z nich z nich to ***Anaeromyxobacter*** sp (0,42-0,72%) i ***Malikia*** sp. (0,33-0,95%), a trzecia, niezidentyfikowana do rodzaju, została oznaczona jako **CL0068** (0,56-0,97%).
Bakterie z rodzaju *Malikia* powszechnie występują w świeżych słodkich wodach, ale izolowano je również z osadów ściekowych. Bakterie opisane jako *CL0068* były wykrywane przez innych badaczy również w środowisku wodnym (ścieki, tereny podmokłe, woda rzeczna). Natomiast *Anaeromyxobacter* sp. to bakterie beztlenowe, tworzące przetrwalniki, wśród których są osobniki o zdolnościach dehalogennych.
Warto również zauważyć, że w wyniku analizy bioinformatyczne uzyskano dużą liczbę niesklasyfikowanych do rodzaju sekwencji – 1272 w 7 dniu zalania oraz 1037 w 14 dniu zalania – co stanowi kolejno 90,1 i 89,6% wszystkich uzyskanych odczytów (Fig. 4).

PODSUMOWANIE

Analiza wykazała, że nie tylko proporcje poszczególnych bakterii ulegają zmianie w wyniku zalania, ale również w glebie pojawiają się nowe rodzaje, zarówno wprowadzone przez wodę, jak i wybudzone z form nieaktywnych, zaś niektóre grupy mikroorganizmów wymierają.

Można jednoznacznie stwierdzić, że ekstremalne warunki wywołane symulowaną powodzią mają znaczący wpływ na mikroorganizmy glebowe bytujące w madzie bardzo lekkiej.

Literatura

[1] Furtak K., Grządziel J., Gałązka A., Niedźwiecki J. (2020). Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. Catena, 188, 104448.

[2] National Center for Biotechnology Information, NCBI database. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (accessed 10 July 2019).

Określenie wpływu mocznika wzbogaconego mikrobiologicznie na potencjał metaboliczny mikroorganizmów glebowych w uprawie pszenicy ozimej

Karolina Furtak[1*], Anna Gałązka[1], Karolina Gawryjołek[1], Agnieszka Rutkowska[2]
[1] Zakład Mikrobiologii Rolniczej, [2]Zakład Żywienia Roślin i Nawożenia
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, e-mail: *kfurtak@iung.pulawy.pl

WPROWADZENIE

Celem badań była ocena potencjału metabolicznego metodą Biolog® EcoPlate™ społeczności mikroorganizmów glebowych w uprawie pszenicy ozimej w zależności od dawki zastosowanego bionawozu wzbogaconego mikrobiologicznie.

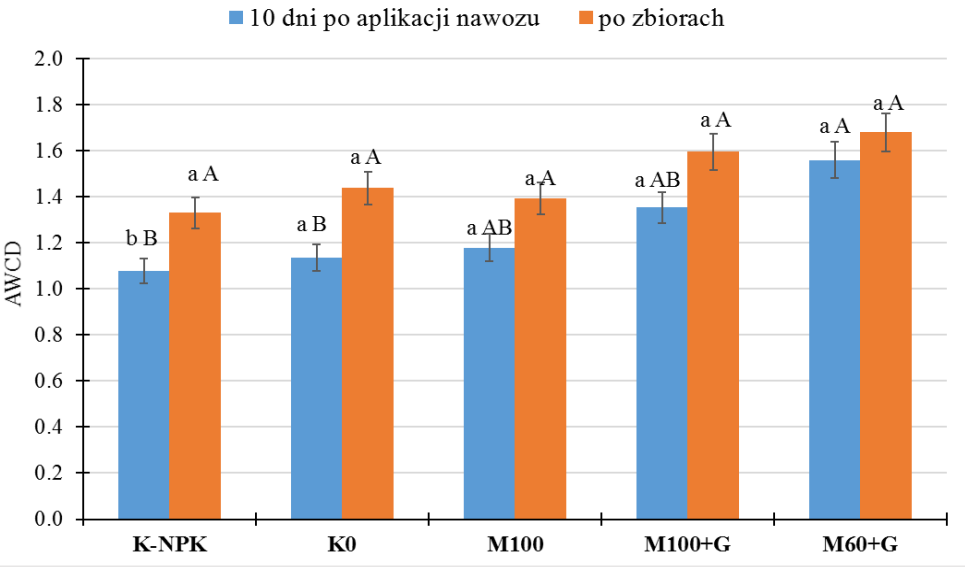
MATERIAŁY I METODY

Na polach doświadczalnych RZD IUNG-PIB w Baborówku (woj. wielkopolskie) zastosowano nowoopracowany opracowany bionawóz wytworzony z mocznika wzbogaconego pożytecznymi mikroorganizmami - grzybami. Uwzględnione zostały następujące obiekty doświadczalne:

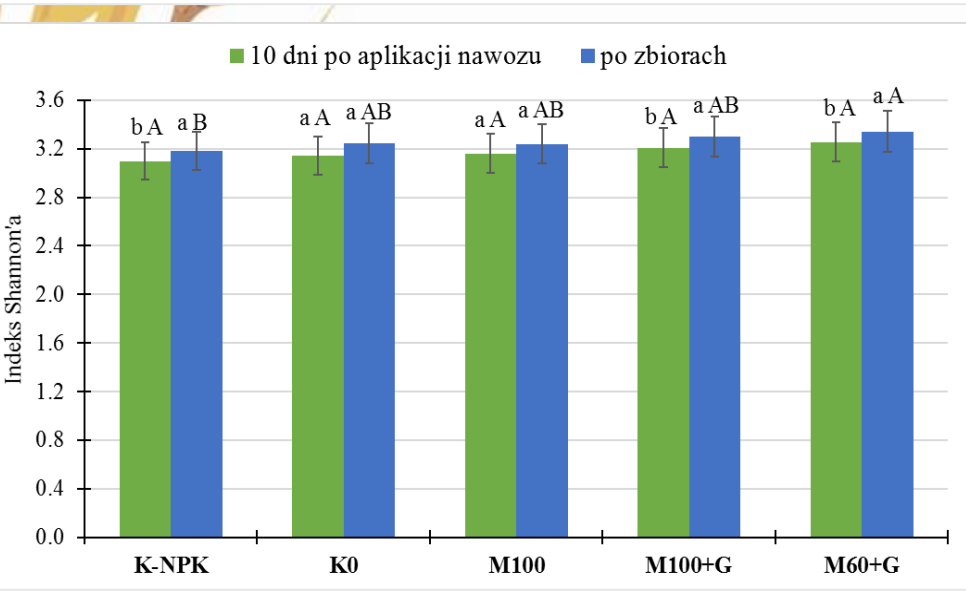
- kontrola bez nawożenia – **K0**;
- kontrola ze standardowym nawożeniem NPK – **K-NPK**;
- mocznik w dawce 100% – **M100**;
- mocznik w dawce 60% wzbogacony mikrobiologicznie – **M60+G**;
- mocznik w dawce 100% wzbogacony mikrobiologicznie – **M100+G**.

WYNIKI

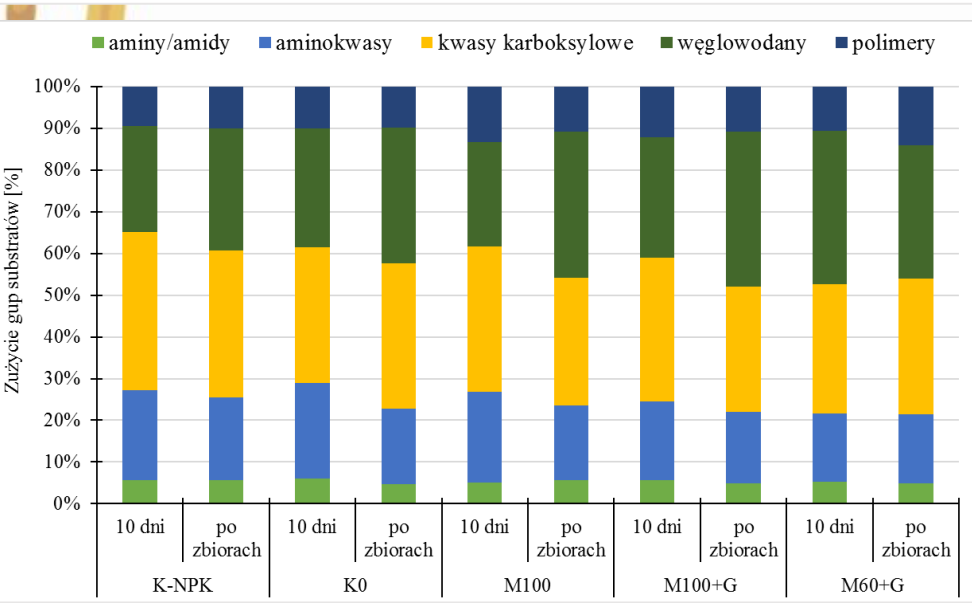
Zarówno indeks AWCD, jak i Shannon'a (**Wykres 1 i 2**) były najwyższe w przypadku zastosowania mocznika w dawce 60% wzbogaconego mikrobiologicznie. Jednakże uzyskane różnice nie są istotne statystycznie (przy $P \leq 0.05$). Uzyskane indeksy były wyższe po zbiorach pszenicy, ale istotne statystycznie różnice (przy $P \leq 0.05$) uzyskano tylko pomiędzy K-NPK w przypadku indeksy AWCD oraz K-NPK, M100+G i M60+G w glebie po 10 dni od aplikacji nawozu.
Zużycie węglowodanów (**Wykres 3**) było najwyższe w kombinacji M100+G (37,1-36,8%) w porównaniu z pozostałymi wariantami.



Wykres 1. Indeks AWCD (72h inkubacji płytek)
Wykres przedstawia średnie $n = 3$; małe litery „*a-b*" oznaczają wartości różne statystycznie między terminami poborów; duże litery „*A-B*" oznaczają wartości różne statystycznie między różnymi nawożeniami w jednym terminie poboru; test Tukey'a HSD, $P \leq 0.05$



Wykres 2. Indeks Shannon'a (72h inkubacji płytek)
Wykres przedstawia średnie $n = 3$; małe litery „*a-b*" oznaczają wartości różne statystycznie między terminami poborów; duże litery „*A-B*" oznaczają wartości różne statystycznie między różnymi nawożeniami w jednym terminie poboru; test Tukey'a HSD, $P \leq 0.05$



Wykres 3. Zużycie grup substratów [%] (72h inkubacji płytek)

Badania wykonano w ramach realizacji projektu BIO-FERTIL „Opracowanie technologii innowacyjnych nawozów mineralnych wzbogaconych mikrobiologicznie" BIOSTRATEG3/347464/5/INCBR/2017. Biostrateg, NCBR (2018-2021)

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

VI. Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne
„Metagenomy różnych środowisk”
23 – 24 czerwiec 2022

Porównanie aktywności enzymatycznej gleby uprawnej i leśnej

KAROLINA GAWRYJOŁEK, ANNA GAŁĄZKA, KAROLINA FURTAK

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, IUNG-PIB w Puławach, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

WSTĘP

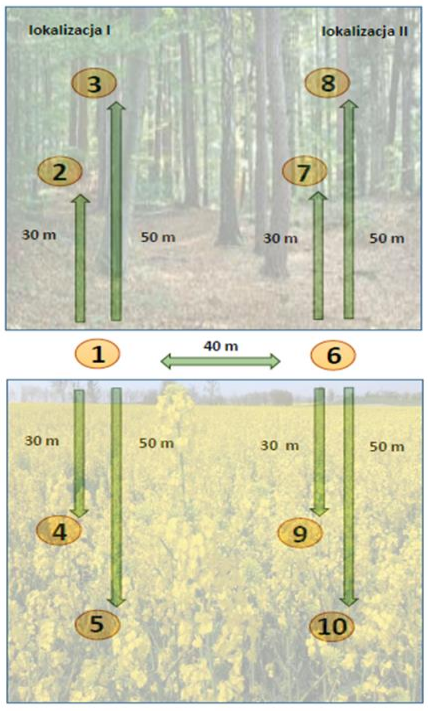
Ekosystemy leśne znacząco różnią się od rolniczych, w których dominującą rolę stanowi gospodarka rolna prowadzona przez człowieka. Ekosystemy leśne to kompleksy roślinności charakteryzujące się dużym udziałem drzew rosnących w zwarciu. Naturalny las jest najbardziej złożonym i najtrwalszym ekosystemem lądowym. Żyzność i produktywność ekosystemów zależą od intensywności procesów biochemicznych zachodzących w glebie, które są katalizowane przez enzymy w niej występujące. Ogólna aktywność enzymów jest uzależniona od parametrów fizykochemicznych środowiska takich jak: pH, temperatura, zawartość substancji organicznej oraz zawartość katalizatorów i inhibitorów, dlatego poziom aktywności enzymatycznej gleb stanowi czuły wskaźnik oceny ich żyzności i urodzajności oraz informuje o zmianach ekologicznych środowiska glebowego.

Celem badań było porównanie wskaźników jakości gleby (aktywności dehydrogenaz oraz fosfatazy kwaśnej i zasadowej), na przykładzie gleb użytkowanych rolniczo oraz gleb z ekosystemu leśnego.

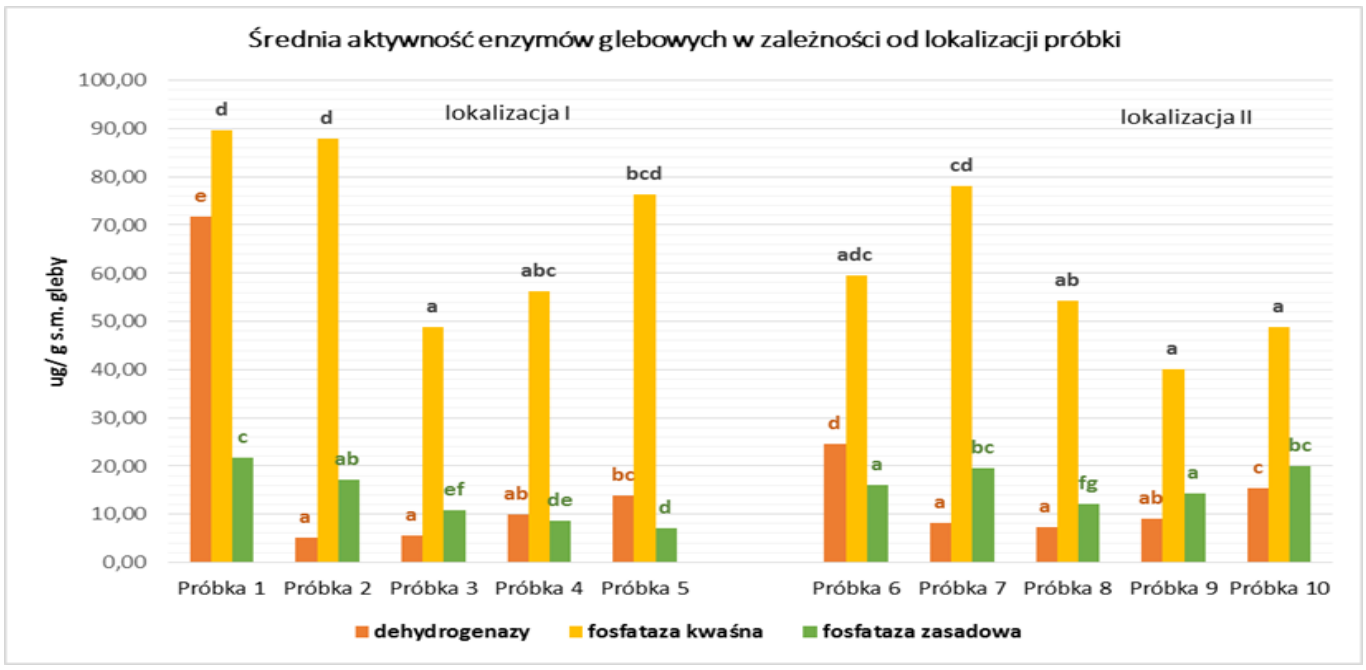
MATERIAŁY I METODY

Materiał glebowy stanowiły próbki pobrane z terenu RZD IUNG w Osinach według zamieszczonego schematu. Próbki pobrano z lasu liściastego oraz pola uprawnego (rzepak) położonego w jego bezpośrednim sąsiedztwie (Ryc.1.). Do analiz pobrano również próbki pochodzące z granicy pola i lasu.
Aktywność enzymów glebowych została zmierzona spektrofotometrycznie. Aktywność dehydrogenaz określono metodą opisaną przez Caside i inn.(1964). Aktywność fosfatazy kwaśnej i zasadowej określono przy udziale metody opisanej przez Tabatabai i inn. (1969).

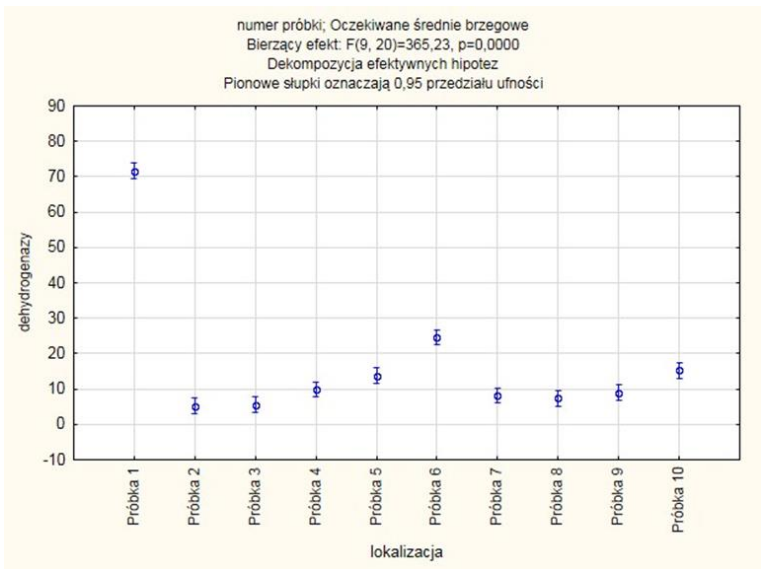
Ryc.1. Schemat doświadczenia



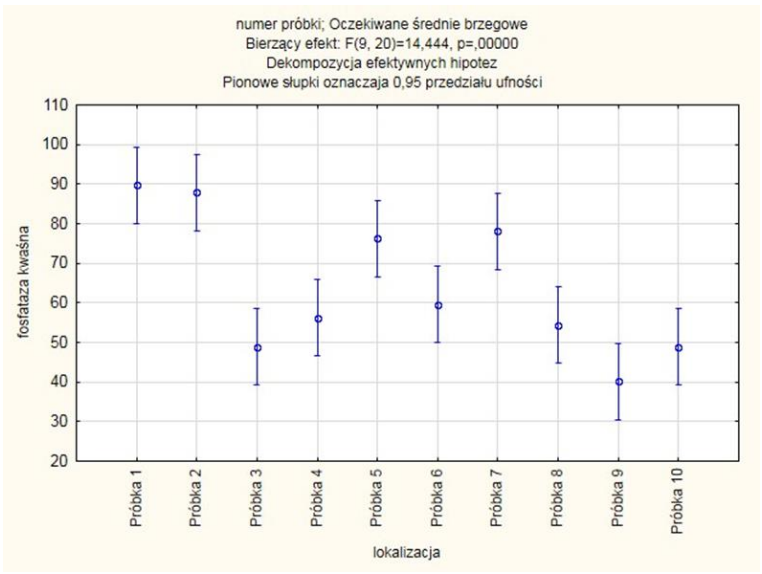
Ryc.2. Średnia aktywność enzymów glebowych w zależności od lokalizacji próbki. Wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie (test HSD Tukeya dla p<0,05)



Ryc.3. Średnia aktywność dehydrogenaz w zależności od lokalizacji próbki- jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA p<0,05



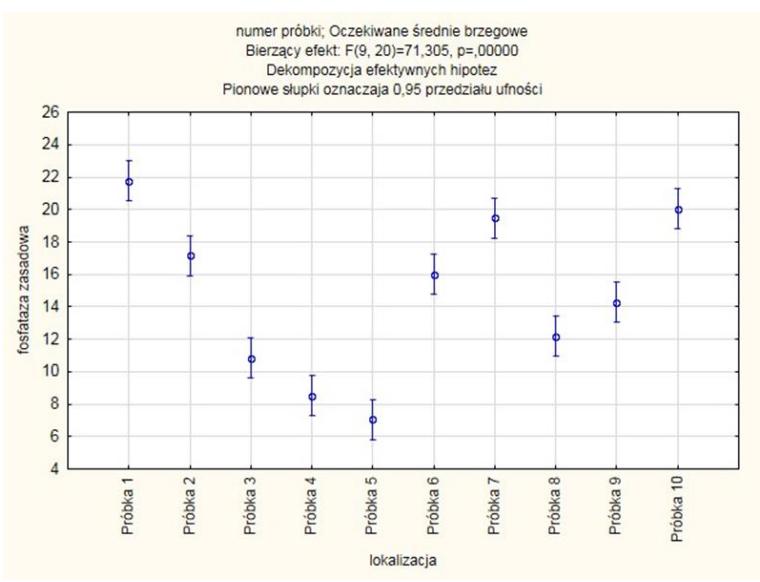
Ryc.4. Średnia aktywność fosfatazy kwaśnej w zależności od lokalizacji próbki- jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA p<0,05



Badania wykonano w ramach tematu statutowego 1.27 IUNG-PIB „Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych w ekosystemie leśnym i rolniczym

WYNIKI I PODSUMOWANIE

Na podstawie testu HSD Tukeya określono statystycznie istotne różnice w aktywności enzymów glebowych. Najwyższą aktywność dehydrogenaz uzyskano w próbkach pobranych z granicy pola uprawnego i lasu (Próbka 1 i 6). Statystycznie istotne wyższą aktywność dehydrogenaz uzyskano w próbkach pobranych z pola uprawnego (próbka 4 i 5 oraz 9 i 10) w porównaniu do próbek pobranych z terenu lasu (próbka 2 i 3) oraz 7 i 8). We wszystkich badanych próbkach najwyższą aktywnością odznaczała się fosfataza kwaśna. W większości przypadków wartość ta jest kilkukrotnie wyższa w porównaniu do aktywności pozostałych enzymów (wyjątek stanowi aktywność dehydrogenaz w próbce 1). Najwyższą aktywność fosfatazy kwaśnej w obrębie poszczególnych lokalizacji stwierdzono w próbkach pobranych z granicy (Próbka 1 i 6) oraz 30 m w głąb lasu (Próbka 2 i 7). W przypadku fosfatazy zasadowej również najwyższa aktywność w obrębie poszczególnych lokalizacji występuje w próbkach pobranych z granicy (Próbka 1 i 6) oraz 30 m w głąb lasu (Próbka 2 i 7) oraz w przypadku II lokalizacji także w próbce pobranej z pola uprawnego w odległości 50 m od granicy lasu (Próbka 10).



Ryc.4. Średnia aktywność fosfatazy zasadowej w zależności od lokalizacji próbki- jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA p<0,05

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

VI. Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne
„Metagenomy różnych środowisk”
23 – 24 czerwiec 2022

Zawartość ogólnych oraz łatwoekstrahowlnych białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w doświadczeniu z uprawą truskawki w systemie ekologicznym

[1]KAROLINA GAWRYJOŁEK, [1]ANNA GAŁĄZKA, [2]BEATA FELEDYN - SZEWCZYK

[1]Zakład Mikrobiologii Rolniczej, [2]Zakład Systemów i Ekonomiki Produkcji
IUNG-PIB w Puławach, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

WSTĘP

Białka glebowe spokrewnione z glomalinami stanowią kompleks powszechnie występujących glikoprotein, charakterystycznych pod względem budowy i właściwości fizykochemicznych. Białka te produkowane są przez grzyby mykoryzy arbuskularnej należące do rodzaju Glomus. Są to stabilne, nierozpuszczalne w wodzie i odporne na degradację cząstki, stabilizujące agregaty glebowe i chroniące je przed rozbiciem. Stabilność struktury gleby istotnie wpływa na charakter i zawartość materii organicznej w glebie. Użytkowanie gruntów i stosowanie szeregu zabiegów uprawowych ma wpływ na ilość i jakość materii organicznej gleby a tym samym na jej agregację.

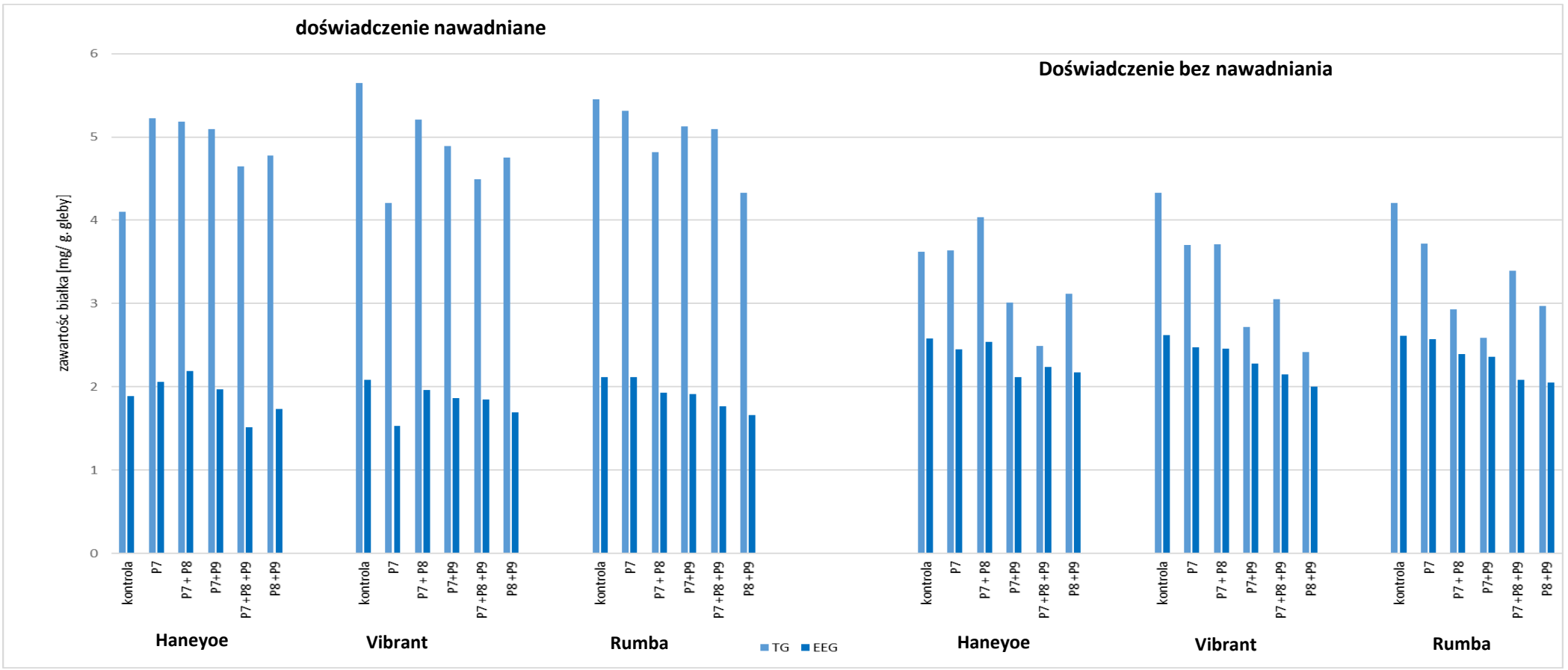
Celem badań było określenie zawartości ogólnych (T- GRSP) i łatwoekstrahowalnych (EE-GRSP) białek glebowych spokrewnionych z glomalinami w doświadczeniu z ekologiczną uprawą truskawki.

MATERIAŁY I METODY

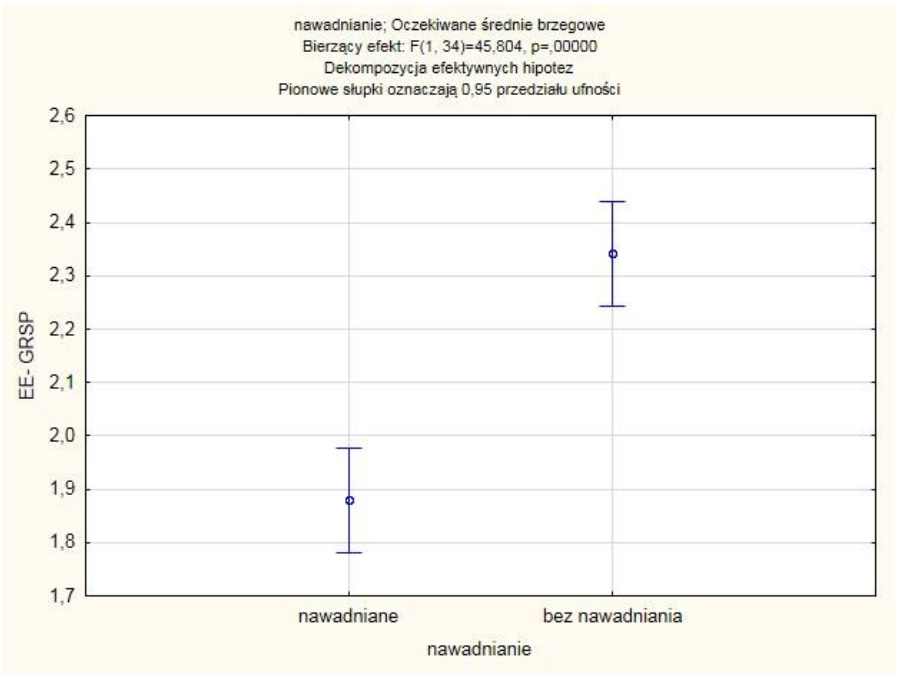
Badania przeprowadzone zostały na próbkach pochodzących z uprawy truskawki w systemie ekologicznym. W trakcie trwania doświadczenia na rośliny aplikowano preparaty bakteryjne na nośnikach stałych, które miały na celu biologiczną ochronę oraz zwalczanie patogenów grzybowych. W doświadczeniu wykorzystano trzy preparaty biologiczne (P7, P8 oraz P9) aplikowane pojedynczo lub w kombinacjach. Doświadczenie odejmowało 3 odmiany truskawki (Haneyoe, Vibrant oraz Rumba), a dodatkowym czynnikiem było nawadnianie. Próbki glebowe pobrane zostały po zbiorach owoców.

Ekstrakcję białek z gleby przeprowadzono za pomocą odpowiedniego buforu cytrynianowego w temperaturze 121 ^{o}C , a ich zawartość w otrzymanych ekstraktach oznaczono metodą Bradford. Do oceny istotności średnich zawartości poszczególnych białek glebowych zastosowano jednoczynnikowa analizę wariancji.

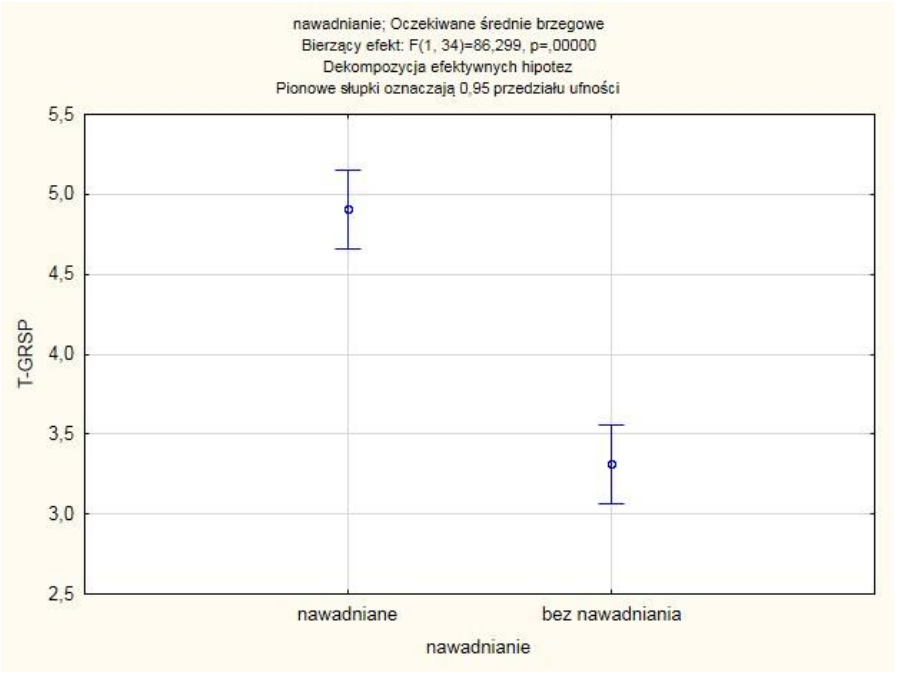
Ryc.1. Wykres przedstawiający zawartość białek glebowych w zależności od zastosowanych preparatów bakteryjnych, odmiany owoców oraz warunków doświadczenia



Ryc.2. Średnia zawartość EE-GRSP w zależności od warunków wodnych doświadczenia – jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA p<0,05.



Ryc.3. Średnia zawartość T-GRSP w zależności od warunków wodnych doświadczenia – jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA p<0,05.



Badania wykonano w ramach realizacji projektu EcoFruits. BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018

WYNIKI I PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę średnią zawartość glikoprotein stwierdzono wyższą wartość T-GRSP w próbkach pochodzących z uprawy nawadnianej, natomiast wyższe wartości EE- GRSP obserwowano w próbkach pochodzących z uprawy owoców, na której nie stosowano nawadniania (Rys.1.) Wyniki te różniły się istotnie statystycznie (Rys.2. oraz Rys.3.)

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic zawartości białek glebowych spokrewnionych z glomalinami pomiędzy stosowanymi preparatami oraz odmianami truskawki.

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa –
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

VI. Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne
„Metagenomy różnych środowisk”
23-24 czerwiec 2022

Zróżnicowanie aktywności metabolicznej szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas*

KAROLINA GAWRYJOŁEK, ANNA GAŁĄZKA, ANNA MARZEC - GRZĄDZIEL

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, IUNG-PIB w Puławach, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

WSTĘP

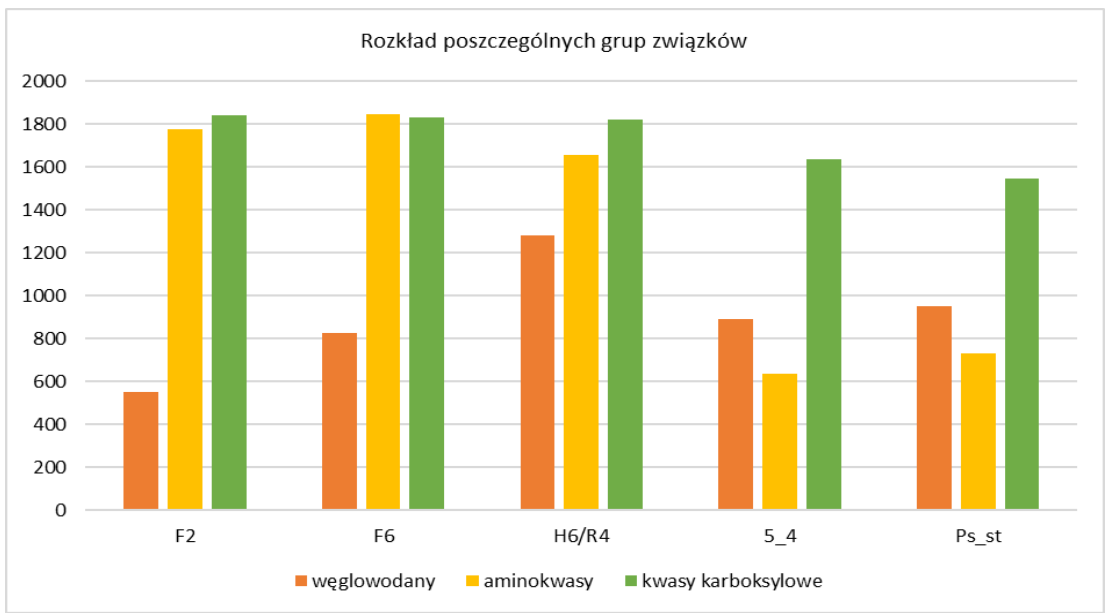
W warunkach naturalnych wzrost roślin wspomagany jest przez mikroorganizmy zasiedlające ryzosferę, poprzez bezpośrednie lub pośrednie oddziaływanie określane jako promowanie wzrostu. Bakterie z rodzaju Pseudomonas są powszechnie spotykane w ryzosferze roślin i część gatunków zaliczana jest do grupy PGPR (ang. Planth Growth Promoting Rhizobacteria). Pozytywny wpływ tych bakterii polega ograniczeniu szkodliwego działania fitopatogenów poprzez syntezę enzymów litycznych, antybiotyków, sideroforów oraz cyjanowodoru.

Celem badań było określenie potencjału metabolicznego szczepów bakterii z rodzaju Pseudomonas wyizolowanych z ryzosfery roślin, rosnących w różnych warunkach środowiska.

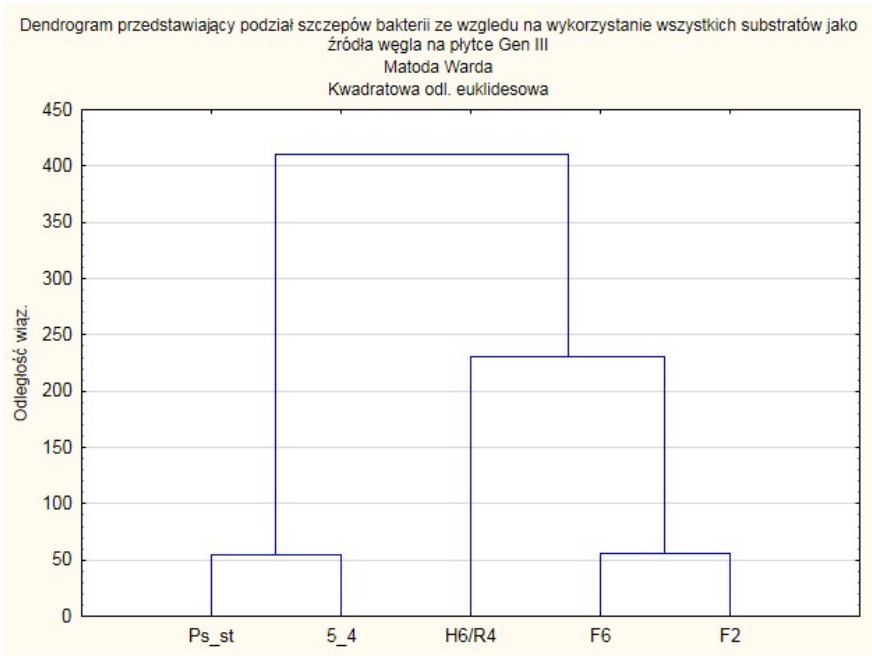
MATERIAŁY I METODY

Do doświadczenia wykorzystano szczepy bakterii z rodzaju Pseudomonas pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB w Puławach. Identyfikacja szczepów do rodzaju nastąpiła na podstawie sekwencjonowania genu 16S RNA metoda Sangera. Badania potencjału wykonano przy użyciu Systemu Biolog. Zawiesinę bakterii uzyskaną z czystej kolonii bakteryjnej naniesiono na 96 dołkowe płytki Gen III, służące do identyfikacji bakterii tlenowych. Utylizacja podłoża spowodowała wybarwienie substratu, a intensywność wybarwienia była proporcjonalna do zdolności rozkładu związku w danym dołku. Stopień zmętnienia zawiesiny mierzono spektrofotometrycznie w 24 godzinnych odstępach czasu. Na podstawie wyników wykonano mapy cieplne obrazujące zróżnicowanie poszczególnych szczepów w zależności od tempa i intensywności rozkładu poszczególnych związków po 96 godzinach inkubacji.

Ryc.1. Wykres przedstawiający rozkład poszczególnych grup związków przez szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* po 96 godzinach inkubacji



Ryc.5. Denbrogram przedstawiający rozkład poszczególnych grup związków przez szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* po 96 godzinach inkubacji

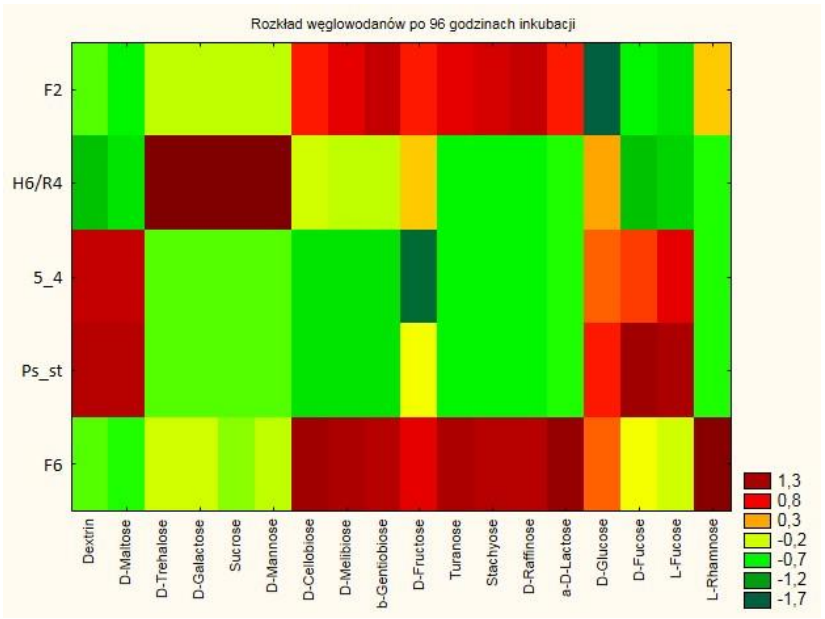


Badania realizowano w ramach projektu prac przedwdrożeniowych Inkubator Innowacyjności 4.0; nr 1/INiN 4.0/IUNG-PIB/2021-PIB na lata 2016-2020

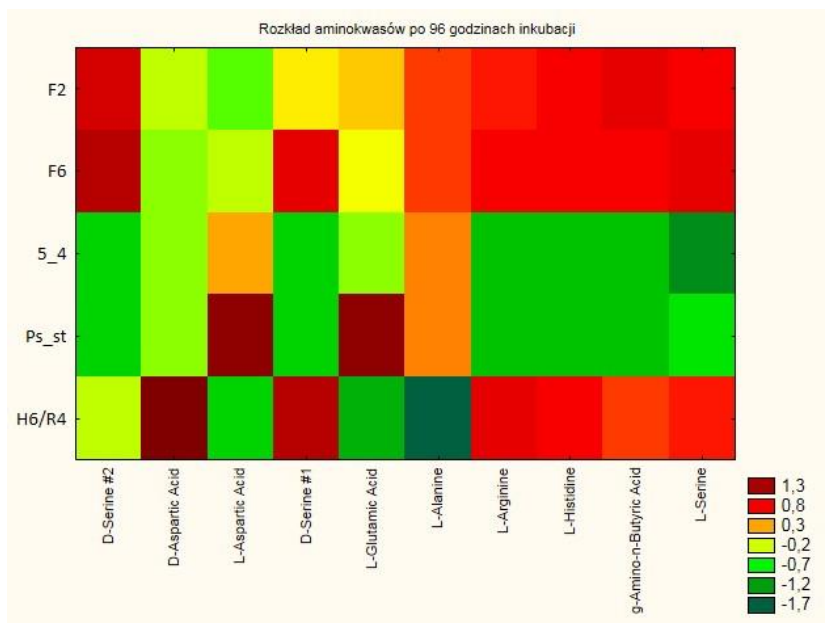
WYNIKI I PODSUMOWANIE

Pomiędzy szczepami bakterii występują różnice metaboliczne pod względem badanych cech mogące świadczyć o zdolnościach adaptacyjnych drobnoustrojów do warunków środowiskowych, w których aktualnie bytują. Na podstawie analizy skupień wydzielono 3 grupy pod względem intensywności rozkładu badanych związków. Szczep Ps.st odznaczał się wyższą aktywnością pod względem rozkładu kwasów karboksylowych w porównaniu do pozostałych badanych szczepów. Szczepy F2 i F6 wykazywały się wyższą aktywnością pod względem rozkładu węglowodanów oraz aminokwasów w porównaniu z pozostałymi szczepami.

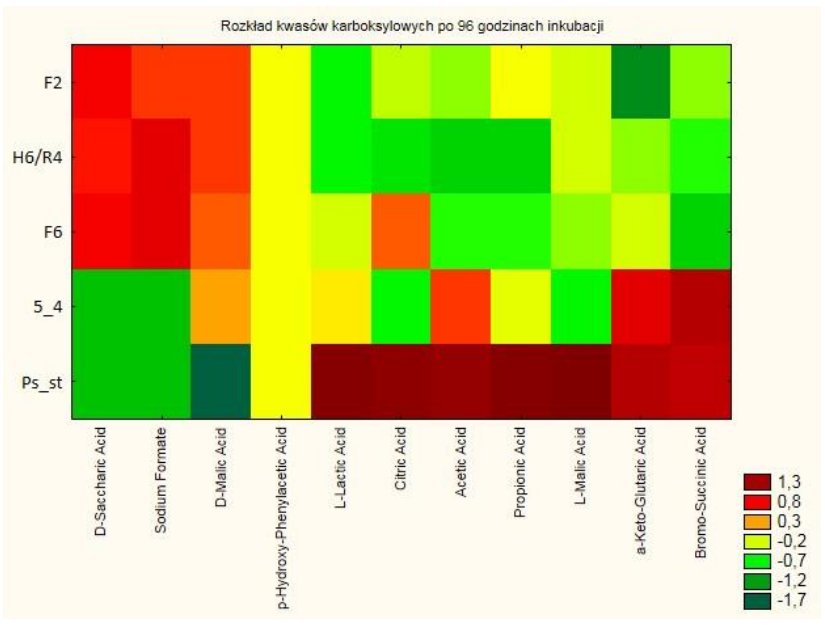
Ryc.2. Mapa cieplna obrazująca zróżnicowanie szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w przypadku wykorzystania do wzrostu węglowodanów po 96 godzinach inkubacji



Ryc.3. Mapa cieplna obrazująca zróżnicowanie szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w przypadku wykorzystania do wzrostu aminokwasów po 96 godzinach inkubacji



Ryc.4. Mapa cieplna obrazująca zróżnicowanie szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w przypadku wykorzystania do wzrostu kwasów tłuszczowych po 96 godzinach inkubacji



Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel.: +48 81 47 86 950, fax: +48 81 4786 900
iung@iung.pulawy.pl, www.iung.pulawy.pl

VI Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe „Metagenomy różnych środowisk”
Puławy, 23-24 czerwca 2022 r.
www.mikro-iung.pulawy.pl

Populacja grzybów związanych z korzeniami i ich potencjał metaboliczny w glebie ze strefy okołokorzeniowej olszy czarnej, brzozy brodawkowatej i sosny zwyczajnej

Anna Gałązka[1], Anna Marzec-Grządziel[1], Milan Varsadiya[2], Jacek Niedźwiecki[3], Karolina Gawryjołek[1], Karolina Furtak[1], Marcin Przybyś[4], Jarosław Grządziel[1]

[1]Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation (IUNG-PIB), Czartoryskich St. 8, 24-100 Puławy, [2]Department of Ecosystems Biology, University of South Bohemia in České Budějovice, [3]Department of Soil Science Erosion and Land Conservation, IUNG-PIB, [4]Department of Plant Breeding and Biotechnology, IUNG-PIB
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

WSTĘP

Ekosystemy leśne znacząco różnią się od rolniczych. Jednym z kluczowych elementów gleby, zarówno leśnej, jak i rolnej są mikroorganizmy glebowe. Grzyby stanowią nierozerwalną część środowiska glebowego i pełnią w nim szereg pozytywnych funkcji. Wpływają na funkcjonowanie ekosystemów, zdrowotność roślin oraz strukturę i produkcyjność gleby. W ekosystemach leśnych i rolniczych warunki edaficzne, rośliny i mikroorganizmy glebowe pozostają w ścisłej współzależności. Tworzenie się specyficznych cech siedlisk leśnych determinowane jest właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi gleby. Nieodłącznym składnikiem życia biologicznego gleb leśnych są grzyby, a wśród nich grupa tworząca związki symbiotyczne z drzewami leśnymi.

Celem badań było określenie strukturalnej i funkcjonalnej różnorodności biologicznej grzybów zasiedlających ryzosferę trzech wybranych gatunków drzew: Alnus glutinosa, Betula pendula i Pinus sylvestris.

METODYKA

Próbki gleby pobrano w 2019 i 2020 roku z lasu mieszanego zlokalizowanego w pobliżu Rolniczej Stacji Doświadczalnej IUNG-PIB w Osinach. Próbki pobrano z warstwy ryzosferowej drzew. Określono podstawowe parametry fizyko-chemiczne i biologiczne gleb. Najwyższą aktywność metaboliczną na płytkach FFPlates zaobserwowano w glebie pobranej spod olszy czarnej i brzozy brodawkowatej. Z kolei gleba pobrana spod sosny zwyczajnej charakteryzowała się znacznie mniejszą aktywnością biologiczną i niższym potencjałem metabolicznym.

WYNIKI

Tabela 1. Zawartość glomalin ogólnych (TG) i glomalin łatwoekstrachowalnych.

Sample	TG-GRSP	EEG-GRSP
2019		
Bp1	4.746 ± 0.381	3.537 ± 0.120
Bp2	6.366 ± 0.516	4.428 ± 0.258
Bp3	3.715 ± 0.459	3.074 ± 0.106
Ag1	5.890 ± 0.242	3.989 ± 0.241
Ag2	4.525 ± 0.281	3.430 ± 0.386
Ag3	4.112 ± 0.140	2.916 ± 0.261
Ps1	3.767 ± 0.544	3.068 ± 0.310
Ps2	4.875 ± 0.526	3.706 ± 0.116
Ps3	4.040 ± 0.429	2.730 ± 0.056
2020		
Bp1	4.910 ± 0.339	3.497 ± 0.032
Bp2	5.874 ± 0.421	3.940 ± 0.583
Bp3	5.202 ± 0.211	3.485 ± 0.141
Ag1	4.349 ± 0.527	3.353 ± 0.138
Ag2	3.912 ± 0.214	2.979 ± 0.147
Ag3	3.714 ± 0.053	2.658 ± 0.154
Ps1	4.215 ± 0.216	3.005 ± 0.261
Ps2	3.581 ± 0.464	2.586 ± 0.075
Ps3	4.038 ± 0.351	2.825 ± 0.126

Olcha czarna

Brzoza brodawkowata

Sosna zwyczajna

Fig. 1. Procentowy udział dominujących taksonów grzybowych w glebie na podstawie sekwencjonowania fragmentu ITS.

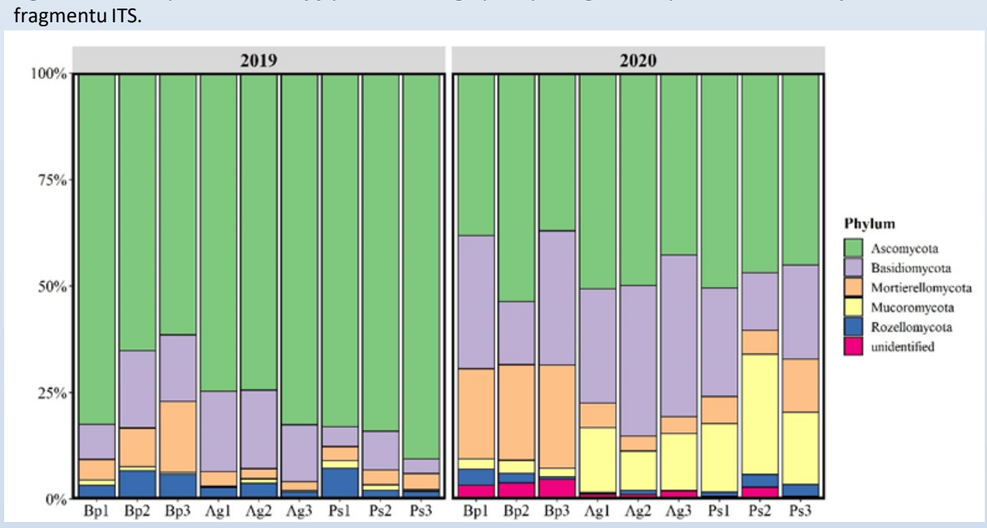
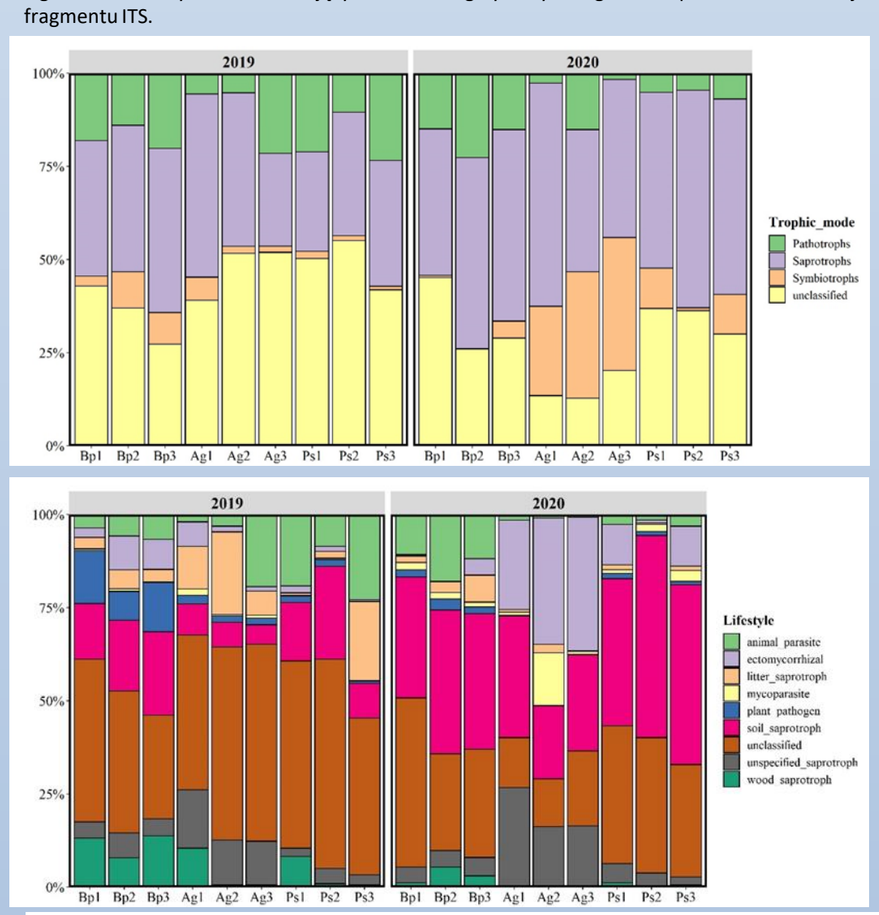
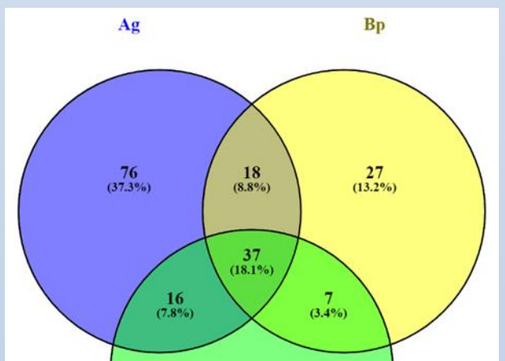
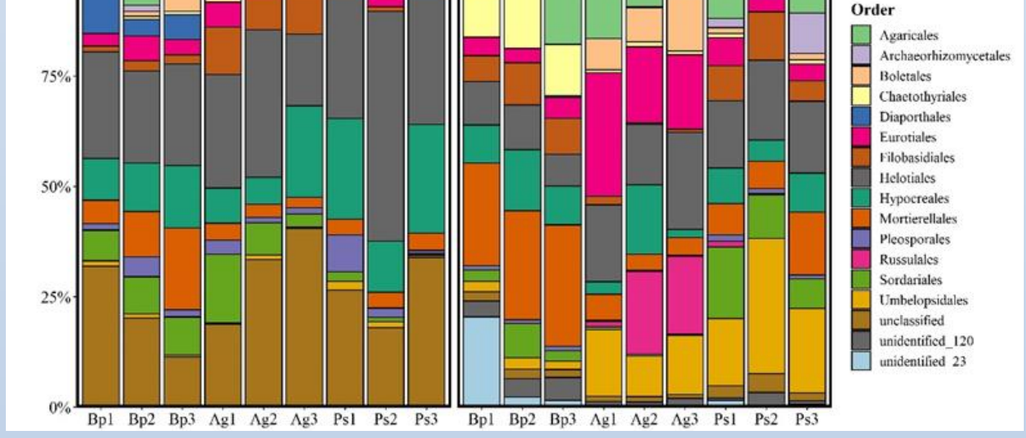
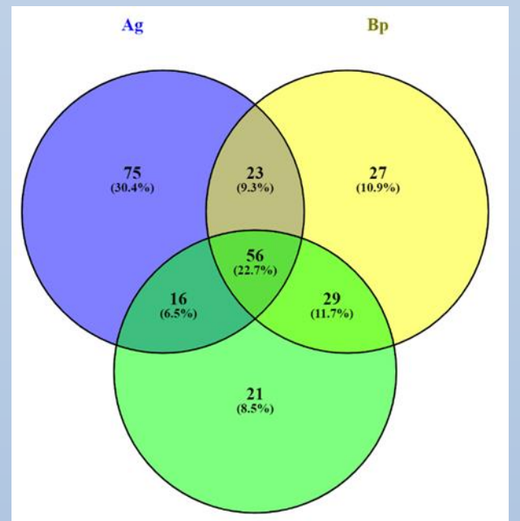


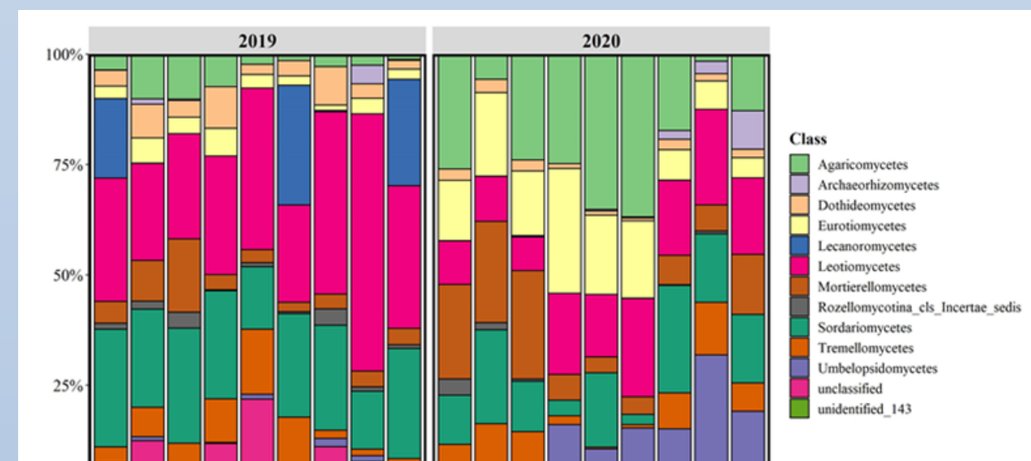
Fig. 2. Procentowy udział dominujących taksonów grzybowych w glebie na podstawie sekwencjonowania fragmentu ITS.

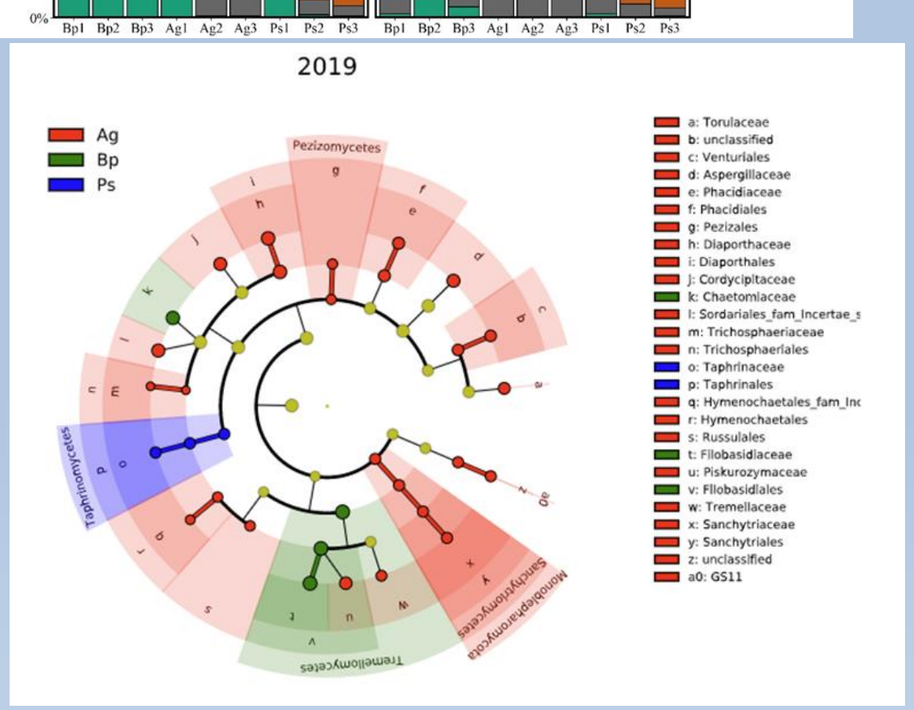


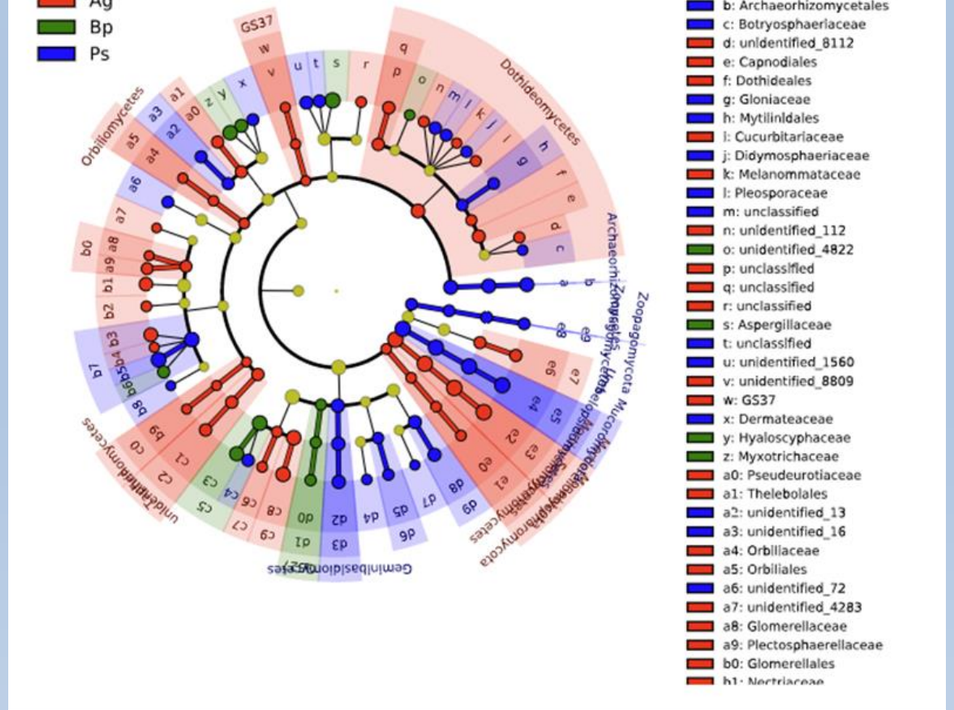












WNIOSKI Najwyższą aktywnością metaboliczną na płytach Biolog FFPlates charakteryzowała się gleba pobrana spod olchy czarnej i brzozy brodawkowatej. Z kolei gleba pobrana spod sosny zwyczajnej charakteryzowała się znacznie niższą aktywnością biologiczną i niższym potencjałem metabolicznym. Wyniki uzyskane na płytkach FFPlate również wykazały najwyższy potencjał metaboliczny grzybów w próbkach pobranych ze strefy korzeniowej olchy czarnej. Najlepiej metabolizowanym związkiem była L-Fenyloalanina, L-Asparagina, D-Mannitol oraz g-Hydroxy-Butyric Acid. Dominującymi klasami były: Leotiomycetes, Mortierellomycetes, Lecanomycetes oraz Sordariomycetes.

Badania wykonano w ramach realizacji tematu nr 1.27 „Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych w ekosystemie leśnym i rolniczym”, (2019-2021).

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel.: +48 81 47 86 950, fax: +48 81 4786 900
iung@iung.pulawy.pl, www.iung.pulawy.pl

VI Ogólnopolskie Sympozjum Naukowe „Metagenomy różnych środowisk”
Puławy, 23-24 czerwca 2022 r.
www.mikro-iung.pulawy.pl

Różnorodność i aktywność grzybów pod drzewami jako wskaźnik potencjalnego wietrzenia biologicznego i formowania gleby

Anna Gałązka[1], Anna Marzec-Grządziel[1], Milan Varsadiya[2], Jarosław Grządziel[1], Łukasz Pawlik[3]

[1]Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation (IUNG-PIB), Czartoryskich St. 8, 24-100 Puławy, [2]Department of Ecosystems Biology, University of South Bohemia in České Budějovice, [3]Institute of Earth Sciences, Faculty of Natural Sciences, University of Silesia in Katowice, Będzińska 60, 41-200 Sosnowiec, Poland; e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

WSTĘP

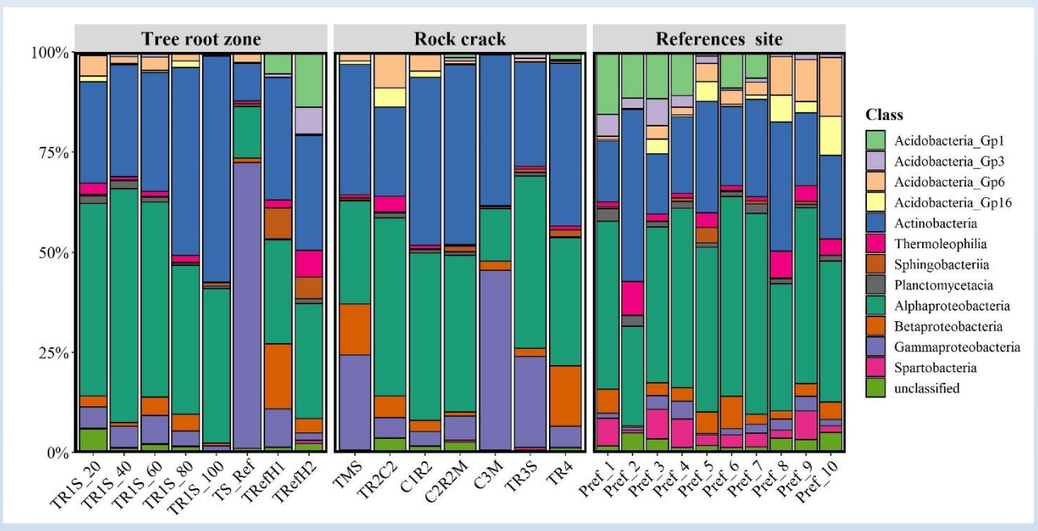
W niniejszym opracowaniu pytamy, jaki jest poziom aktywności mikrobiologicznej w systemach korzeniowych drzew i jak może ona wpływać na wietrzenie biologiczne, w tym strukturę i metabolizm bakterii. Obszarem zainteresowania (AOI) był przełom rzeki Poprad w południowej części Beskidu Sądeckiego. Pasmo górskie należy do Zewnętrznych Karpat Zachodnich i jest zbudowane głównie ze skał fliszowych, składających się z piaskowców, mułowców i zlepieńców.

Celem badań była ocena w jaki sposób czynniki biologiczne, w tym bakterie, działające na krytycznym styku biosfery ze środowiskiem abiotycznym, kształtują ewolucję gleby.

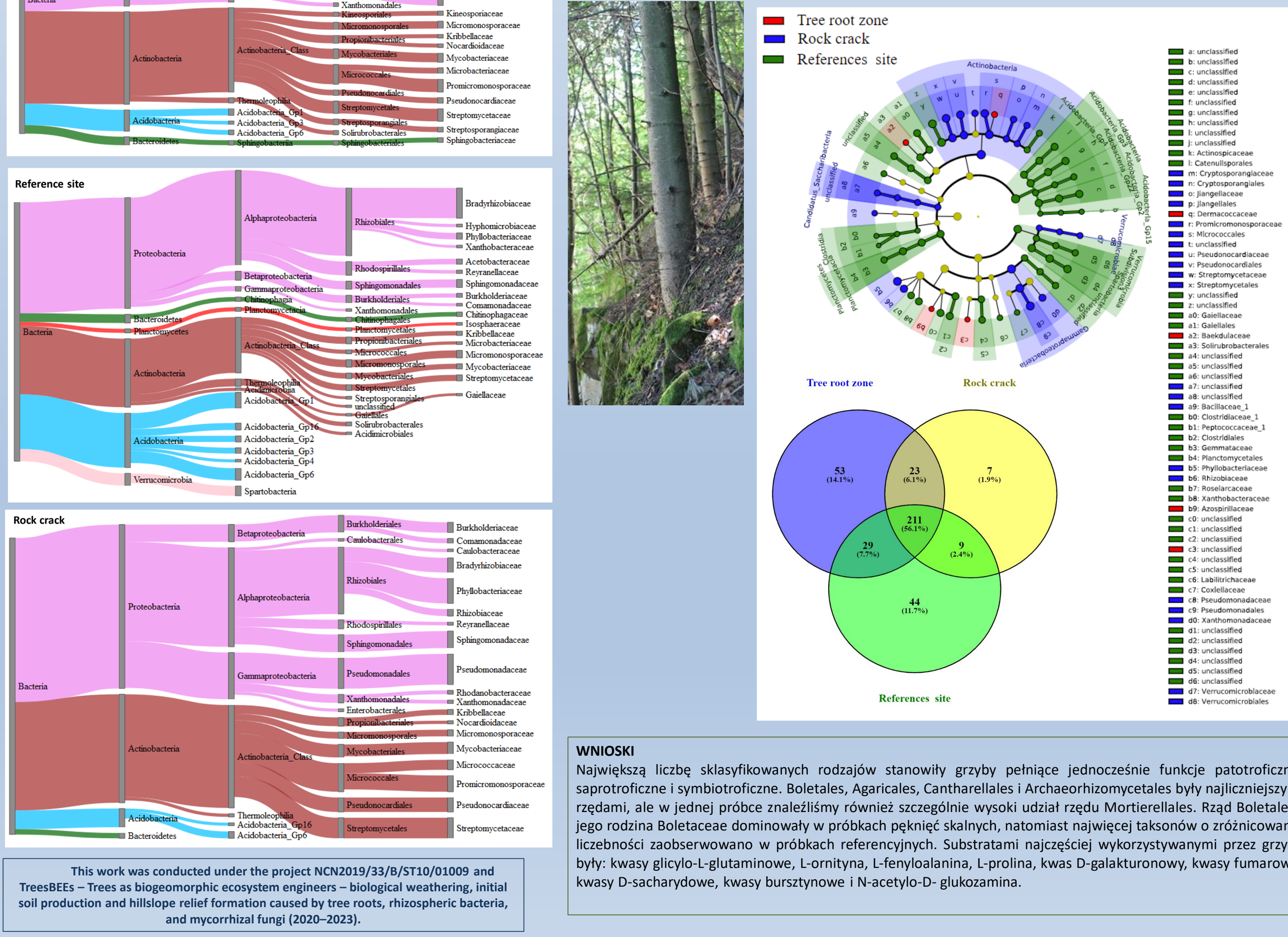
METODYKA

Próbki gleby pobrano z rysosfery drzew, miejsc referencyjnych oraz z zwietrzelin skalnych w 2021 r. Określono zróżnicowanie strukturalne grzybów (NGS, 16S rRNA) oraz ocenę profilu metabolicznego gleb (ECOPlates). Obszarem zainteresowania (AOI) był przełom rzeki Poprad w południowej części Beskidu Sądeckiego. Pasmo górskie należy do Zewnętrznych Karpat Zachodnich i jest zbudowane głównie ze skał fliszowych, składających się z piaskowców, mułowców i zlepieńców. Obszar jest nadal aktywny neotektonicznie. Teren badań znajduje się na stromej stronie doliny skierowanej na północ; ok. 250 m od rzeki Poprad.

WYNIKI



Symbol	Description	Group
TR1S_20	T – tree, R – root, S - soil	TRS
TR1S_40	T – tree, R – root, S - soil	TRS
TR1S_60	T – tree, R – root, S - soil	TRS
TR1S_80	T – tree, R – root, S - soil	TRS
TR1S_100	T – tree, R – root, S - soil	TRS
TMS	T – tree, M – mycorrhiza, S - soil	TMS
TR2C2	T – tree, R – root, C – rock crack	TRC
C1R2	R – root, C – rock crack	TRC
C2R2M	R – root, C – rock crack, M - mycorrhiza	CM
C3M	C – rock crack; M - mycorrhiza	CM
TR3S	T – tree, R – root, S – soil	TRS
TS_Ref	T – tree, Ref – referancyjna, S - gleba	Tref
TR4	T – tree, R – root	TRS
TRef H1	T – tree, R – root	Tref
TRef H2	T – tree, R – root	Tref
Pref_1	P - soil pit	Pref
Pref_2	P - soil pit	Pref
Pref_3	P - soil pit	Pref
Pref_4	P - soil pit	Pref
Pref_5	P - soil pit	Pref
Pref_6	P - soil pit	Pref
Pref_7	P - soil pit	Pref
Pref_8	P - soil pit	Pref
Pref_9	P - soil pit	Pref
ref_10	P - soil pit	Pref



This work was conducted under the project NCN2019/33/B/ST10/01009 and TreesBEEs – Trees as biogeomorphic ecosystem engineers – biological weathering, initial soil production and hillslope relief formation caused by tree roots, rhizospheric bacteria, and mycorrhizal fungi (2020–2023).

WNIOSKI

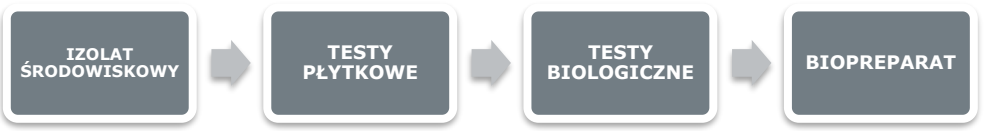
Największą liczbę sklasyfikowanych rodzajów stanowiły grzyby pełniące jednocześnie funkcje patotroficzne, saprotroficzne i symbiotroficzne. Boletales, Agaricales, Cantharellales i Archaeorhizomycetales były najliczniejszymi rzędami, ale w jednej próbce znaleźliśmy również szczególnie wysoki udział rzędu Mortierellales. Rząd Boletales i jego rodzina Boletaceae dominowały w próbkach pęknięć skalnych, natomiast najwięcej taksonów o zróżnicowanej liczebności zaobserwowano w próbkach referencyjnych. Substratami najczęściej wykorzystywanymi przez grzyby były: kwasy glicylo-L-glutaminowe, L-ornityna, L-fenyloalanina, L-prolina, kwas D-galakturonowy, kwasy fumarowe, kwasy D-sacharydowe, kwasy bursztynowe i N-acetylo-D- glukozamina.

WYKORZYSTANIE WŁAŚCIWOŚCI BIOCONTROL IZOLATÓW ŚRODOWISKOWYCH W WARZYWNICTWIE

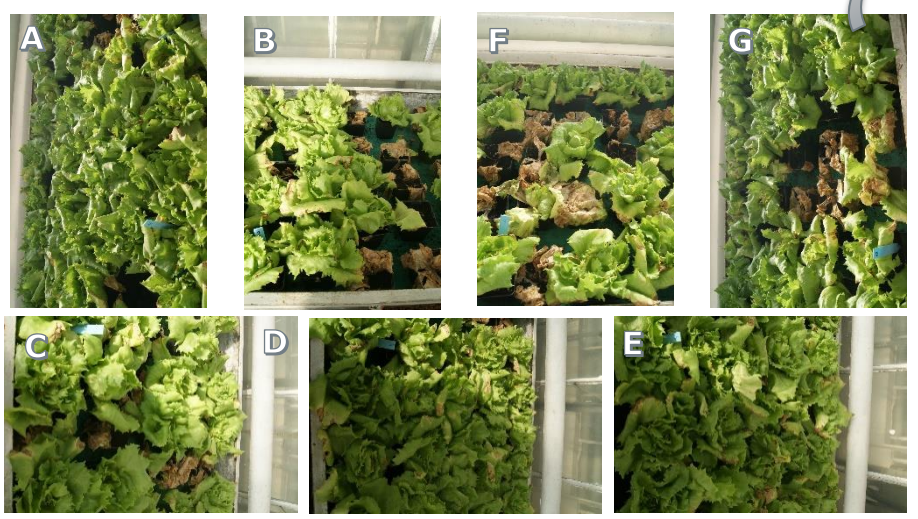
Anna Gierut-Kot[1], Ilona Kafel-Krawczyk[1], Katarzyna Góralska[1], Magdalena Jopek[1], Krzysztof Ambroziak[1]
Intermag sp. z o.o. - Dział Badań i Rozwoju

Celem eksperymentu była ocena skuteczności preparatów mikrobiologicznych na bazie pojedynczych izolatów środowiskowych 8/6, A12B (*Bacillus amyloliquefaciens*) oraz B134 (*Paenibacillus polymyxa*) w ograniczeniu chorób grzybowych oraz wywołanych przez pierwotniaki u roślin warzywnych. W warunkach szklarniowych zostały zbadane następujące choroby i wywołujące je patogeny: zgnilizna twardzikowa sałaty (*Sclerotina sclerotiorum*), kiła kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) oraz fuzarioza papryki (*Fusarium oxysporum*).

Nasiona poszczególnych roślin warzywnych wysiano do skrzynek wysiewnych, a następnie przepikowano do multiplatów z zakażonym podłożem. Warzywa traktowano trzykrotnie preparatami mikrobiologicznymi INTERMAG oraz produktami firm, które są traktowane jako standardy w zwalczaniu poszczególnych chorób. Użyto standardy oparte na bakteriach (B), grzybach (G) oraz substancjach chemicznych (Ch)



WYNIKI



Rys.1. Porażenie zgnilizną twardzikową sałaty roślin potraktowanych biopreparatami. A- kontrola (-), B- kontrola (+), C- B134, D-8/6, E- A12B, F- preparat konkurencyjny 5, G- Preparat konkurencyjny 8.

Tab.1. Wpływ badanych preparatów na wzrost roślin i ograniczenie zgnilizny twardzikowej w uprawie sałaty.

	Badane kombinacje	Zgnilizna twardzikowa sałaty (*Sclerotina sclerotiorum*) Badane parametry					
		% skuteczności	% skuteczności	% skuteczności	% skuteczności	Sucha masa części nadziemnej [g]	Sucha masa korzeni [g]
		22,11,2021	29.11.2021	06.12.2021	16.12.2021		
1	Kontrola niezakażona	-	-	-	-	25,25 f	4,79 d
2	Kontrola zakażona	-	-	-	-	11,50 bc	1,91 a
3	B134	68,4	24,7%	6,6%	6,7%	13,75 bcd	2,19 a
4	8/6	100%	99,3	96,2%	80,3%	24,75 ef	4,61 cd
5	A12B	100%	100%	98,4%	76,7%	24,50 ef	3,71 bcd
6	Standard 2 (B)	100%	98,2%	81,3	67,4	23,75 ef	3,53 b
7	Standard 3 (B)	59,5%	64,6%	59,9	51,3	19,25 de	3,23 b
8	Standard 4 (G)	95,9%	88,8%	82,3%	66,3	22,0 ef	3,54 b
9	Standard 5 (B)	83,8%	24,7%	-	-	10 b	1,77 a
10	Standard 6 (B)	100%	70%	64,3%	49,2%	16,25 cd	3,38 b
11	Standard 8 (B)	5,4%	22,3%	8,8%	-	3,0 a	1,51 a
12	Standard 9 (G)	100%	100%	100%	85,5%	13,5 bc	3,81 bcd
13	Standard 10 (Ch)	100%	100%	100%	85%	15,5 bcd	4,02 bcd

Tab.2. Wpływ badanych preparatów na wzrost roślin i ograniczenie fuzariozy w uprawie papryki.

	Badane kombinacje	Fuzarioza papryki (*Fusarium oxysporum*) Badane parametry						
		% skuteczności	% skuteczności	% skuteczności	% skuteczności	Średnia liczba roślin porażonych n = 5	Wysokość końcowa roślin [cm]	% Ograniczenie liczby jtk *F.oxysporum*
		15.11.2021	22.11.2021	29.11.2021	7.12.2021	7.12.2021	10.12.2021	
1	Kontrola niezakażona	-	-	-	-	0,0 a	122,2 abc	-
2	Kontrola zakażona	-	-	-	-	3,5 cd	101,1 a	-
3	B134	-	-	-	-	4,5 d	112,9, abc	-
4	8/6	100%	87.5%	90,9%	57,1%	1,5 b	173,1 d	46,9
5	A12B	50%	37,5%	9,1%	7,1%	3,25 cd	138,8 cd	4,6
6	Standard 2 (B)	-	-	-	-	3,75 cd	140,9 bcd	0,0
7	Standard 3 (B)	-	-	-	-	3,75 cd	101,4 a	0,0
8	Standard 4 (G)	50%	50%	36,4%	7,1%	3,25 cd	164,4 d	13,6
9	Standard 5 (B)	50%	62,5%	54,5%	35,7%	2,25 bc	162,9 d	12,1
10	Standard 6 (B)	100%	50%	45,5%	14,3%	3,0 bd	144,1 cd	4,3
11	Standard 7 (G)	50%	75%	54,5%	-	3,5 cd	144,5 cd	2,7
12	Standard 8 (B)	-	-	9,1	-	3,5 cd	107,4 ab	0,0

Rys.2. *Fusarium oxysporum* – badanie antybiozy metodą płytkową

Tab.3. Wpływ badanych preparatów na wzrost roślin i ograniczenie kiły w uprawie kapusty.

	Badane kombinacje	Kiła kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) Badane parametry			
		% skuteczności (korzenie)	% skuteczności (korzenie)	Średnia liczba roślin porażonych n = 10	Średnia waga roślin [g]
		24.02.2022	24.03.2022	24.03.2022	24.03.2022
1	Kontrola niezakażona	-	-	0,0 a	77,18 d
2	Kontrola zakażona	-	-	6,5 d	53,26
3	B134 doglebowo	79,30	53,56	4,25 c	67,73 c
4	A12b doglebowo	36,79	-	2,75 b	71,08 c
5	8/6 doglebowo	14,90	22,16	2,75 b	70,55 c
6	B134 multiplaty	42,50	29,29	3,0 b	71,65 c
7	A12b multiplaty	53,54	49,78	4,5 c	48,28 a
8	8/6 multiplaty	82,79	62,33	5,0 c	53,61 b
9	Standard 1 (Ch)	5,25 b	51,70	6,75 d	47,98 a

W przypadku kiły kapusty oraz fuzariozy papryki najsilniejsze właściwości biocontrol wykazuje izolat 8/6, odpowiednio 62,3-82,8% oraz 57,1-100% skuteczności.

Izolat B134 najsilniej działa na zahamowanie choroby wywołanej przez *Plasmodiophora brassicae* (53,6-79,3%) gdy został zastosowany doglebowo.

Zgniliznę w uprawie sałaty istotnie statystycznie zwalcza zarówno izolat 8/6 oaz A12B (80,3-100% i 76,7-100%). Bardzo wysoką skuteczność wykazuje również Standard 9 oraz Standar 10, jednakże trzeba zaznaczyć, że nie są to produkty na bazie bakterii, lecz grzybów oraz substancji chemicznych.

WNIOSKI

Badane izolaty wykazują bardzo silne właściwości biocontrol, a produkty na ich bazie mogą stanowić konkurencję dla powszechnie stosowanych produktów na rynku. Dodatkowo działały stymulująco na wzrost roślin warzywnych.

INTERMAG

Analiza mikrobiomu serów długo-dojrzewających oraz sera pleśniowego produkowanych w Gospodarstwie Rolnym Ślesin

Weronika Goraj[1], Agnieszka Kuźniar[1], Klaudia Badaszek[1], Jacek Podlewski[2], Agnieszka Wolińska[1]

[1] Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1 I, 20-708 Lublin, weronika.goraj@kul.pl.

[2] Fundacja Potulicka, Wojnowo 5, 86-014 Sicienko.

WSTĘP

Mikrobiom sera odgrywa kluczową rolę w procesie produkcji i dojrzewania serów w istotny sposób wpływając na ich właściwości organoleptyczne i fizykochemiczne.
W skład mikrobiomu serów wchodzą dwie podstawowe grupy: mikrobiota starterowa (zasadnicza i pomocnicza) i mikrobiota niestarterowa.
Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe umożliwia kompleksowe rozpoznanie mikrobiomu serów, uwzględniając wpływ procesów produkcyjnych, warunków klimatycznych, zmienności sezonowej, wykorzystanego mleka surowego lub pasteryzowanego i wielu innych czynników które mogą mieć wpływ na mikrobiom jakość serów.

CEL PRACY

Celem pracy była charakterystyka taksonomiczna mikrobiomu serów długo-dojrzewających oraz sera pleśniowego produkowanych przez Gospodarstwo Rolne Ślesin.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy stanowiły 4 rodzaje serów:

- Dworski (D) - dojrzewający 3 miesiące,
- Hrabiny (H) – dojrzewający 6 miesięcy,
- Hrabiego Kazimierza (Hk) - dojrzewający 12 miesięcy
- ser pleśniowy (P)

Rys. 1 Materiał badawczy - sery dostępne w Spiżarni Hrabiny Potulickiej oraz dojrzewalnia serów długo-dojrzewających należąca do Gospodarstwa Rolnego Ślesin.

Do produkcji serów wykorzystane zostały następujące kultury startowe:

- **ser Dworski** – kultura starterowa DL 3,5 OMEGA: *Lactococcus Crémoris et Lactococcus Lactis* i *Lactococcus Diacetilactis, Leuconostoc cremoris, Lactococcus Thermophilus* oraz DL-1 YOTA 1 zawierająca gazujące szczepy *Propionibacterium*.
- **ser Hrabiny** – kultura starterowa DL 3,5 OMEGA: *Lactococcus Crémoris et Lactococcus Lactis* i *Lactococcus Diacetilactis, Leuconostoc cremoris, Lactococcus Thermophilus* oraz DL-1 YOTA 2: niegazujące szczepy *Propionibacterium*
- **ser Hrabiego Kazimierza** – kultura starterowa DL 3,5 KAPPA 1: *Streptococcus thermophiles, Lactobacillus delbrueckii* i *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* oraz DL-1 YOTA 2: niegazujące szczepy *Propionibacterium*.
- **ser pleśniowy** – kultura starterowa zawierająca: *Lactococcus lactis* i *Streptococcus salivarius subsp. Thermophiles* oraz kultura SIGMA 15 będąca skoncentrowaną mieszanką sporów *Penicillum Roqueforti*.

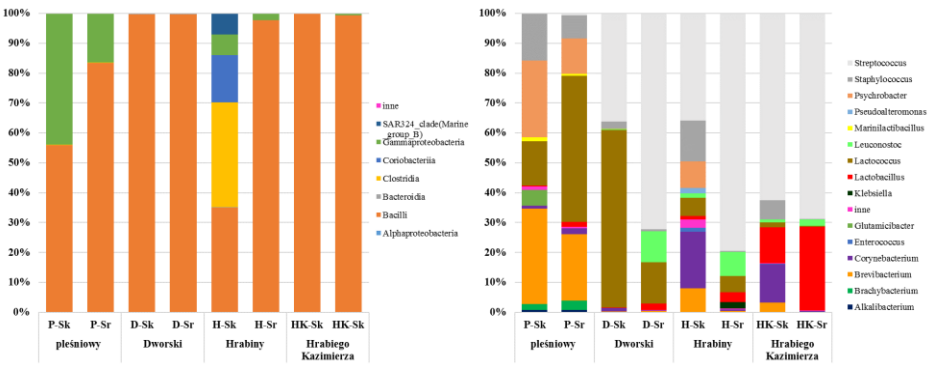
Materiał pobrano ze środka serów **(Sr)** oraz z okolic skórki **(Sk).** DNA genomowe wyizolowano zestawem Genomic Mini AX Food (A&A Biotechnology). **Społeczność bakterii oraz grzybów została określona poprzez sekwencjonowanie następnej generacji (MiSeq Illumina, Genomed S.A.).**

Literatura:
Juszczuk-Kubiak, E., et al. 2021. Technologie" food-omics" w profilowaniu metagenomu żywności. Postępy Mikrobiologii, 60(1).
Yeluri Jonnala, B., et al. 2018. Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. Frontiers in microbiology, 9, 1020.
https://spizarniahrabiny.pl/

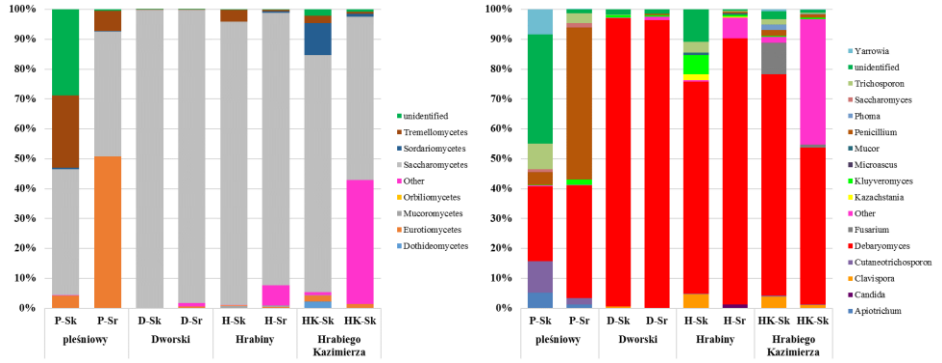
Badania sfinansowane przez Fundację Potulicką (1/6-40-21-10-0603-0018-0049).
Autorzy dziękują Zarządowi Fundacji Potulickiej oraz Panu Jerzemu Dejkowi za udostępnienie prób do badań.

WYNIKI

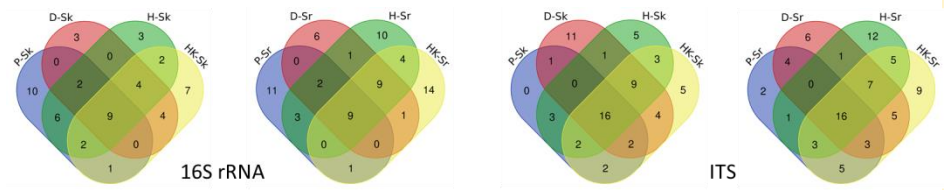
Mikrobiom serów tworzyły zarówno mikroorganizmy będące kulturami starterowymi (*Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus, Penicillium, Saccharomyces*), jak i inne mikroorganizmy, rozwijające się intensywnie podczas dojrzewania serów, które stanowiły 40-94%. W serze pleśniowym były to mikroorganizmy z rodzajów: *Brevibacterium*, *Lactococcus*, *Psychrobacter*, *Debaryomyces*, *Cutaneotrichosporon* a w pozostałych serach m.in.: *Corynebacterium*, *Leuconostoc*, *Debaryomyces* oraz *Streptococcus* (Rys. 2-4).



Rys. 2 Względna obfitość dominujących (stanowiących więcej niż 0,5% społeczności) bakterii na poziomie klasy i rodzaju (%) zidentyfikowanych w serach. Pozostałe taksony zebrano w kategorii inne.



Rys. 3 Względna obfitość dominujących (stanowiących więcej niż 0,5% społeczności) grzybów na poziomie klasy i rodzaju (%) zidentyfikowanych w serach. Pozostałe taksony zebrano w kategorii inne.



Rys. 4 Diagramy Venna przedstawiające wspólne rodzaje bakterii oraz grzybów dla okolic skórki (Sk) i środkowej części (Sr) poszczególnych serów.

WNIOSKI

1. **Analizowane sery były zróżnicowane pod względem struktury społeczności bakterii i grzybów.**
2. **Jakościowy i ilościowy skład mikrobiomu serów różnił się zależnie od miejsca pobrania próby (okolice skórki lub środek sera).**
3. **W serach dojrzewających liczba taksonów na poszczególnych poziomach taksonomicznych wzrastała wraz z długością czasu dojrzewania serów.**
4. **W serach dojrzewających (Dworski, Hrabiny, Hrabiego Kazimierza) wśród bakterii dominował rodzaj *Streptococcus*, który zidentyfikowano w każdej z prób, zarówno w próbie ze skórki jak i ze środka sera.**
5. **Dominującym rodzajem grzybów we wszystkich analizowanych próbach serów długo-dojrzewających był rodzaj *Debaryomyces*.**
6. **W serze pleśniowym dominującym rodzajem grzybów był rodzaj *Penicillium*, natomiast dominującymi rodzajem bakterii był rodzaj *Lactococcus* (środek) oraz *Brevibacterium* (skórka).**

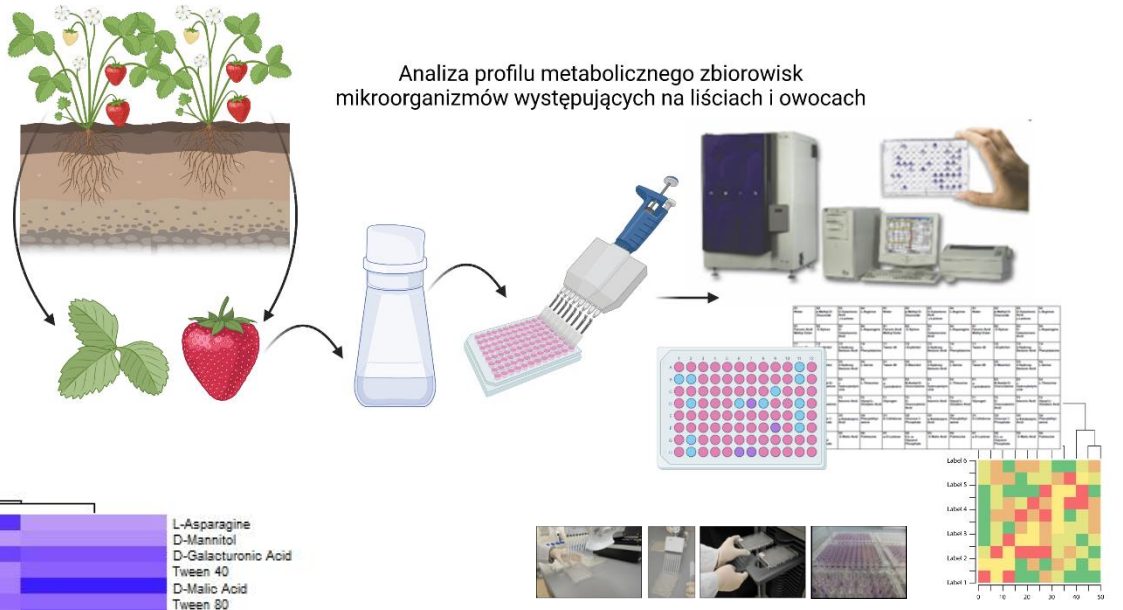
Bioróżnorodność metaboliczna zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających liście i owoce różnych odmian truskawki w nawadnianym i nienawadnianym ekologicznym systemie produkcji

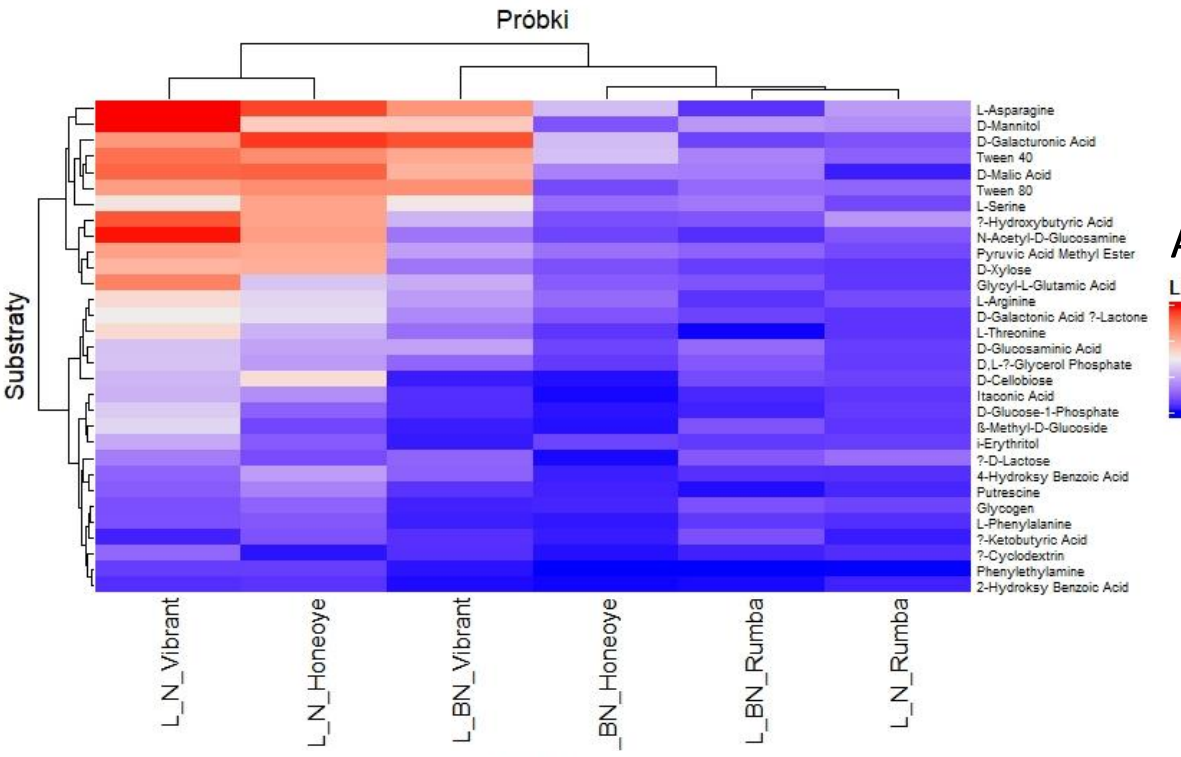
Agata Gryta*[1], Anna Siczek[1], Beata Feledyn-Szewczyk[2], Magdalena Frąc**[1]

1 Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
2 Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Systemów i Ekonomiki Produkcji Roślinnej, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
a.gryta@ipan.lublin.pl; ** m.frac@ipan.lublin.pl

Profil metaboliczny mikroorganizmów zasiedlających liście i owoce truskawki jest niedostatecznie rozpoznany, a może stanowić istotny czynnik w ochronie roślin i przedłużeniu trwałości owoców. Celem badań było określenie zmian bioróżnorodności metabolicznej zbiorowisk mikroorganizmów występujących na liściach i owocach różnych odmian truskawek w zależności od nawadniania w ekologicznym systemie produkcji. Badania obejmowały określenie intensywności wykorzystania substratów węglowych należących m.in. do węglowodanów, kwasów organicznych, aminokwasów z wykorzystaniem systemu Biolog®.

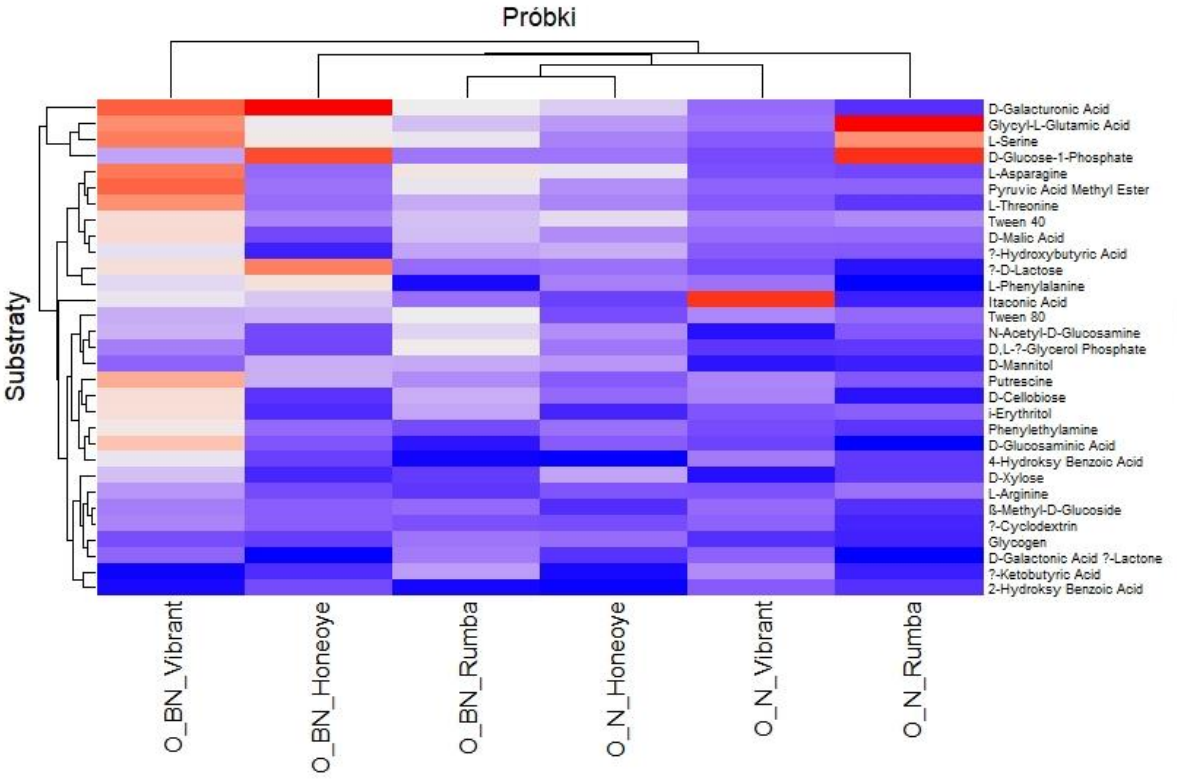
W celu określenia aktywności mikroorganizmów zasiedlających badane próbki liści i owoców zostały wykorzystane płytki BIOLOG ECO Plates, umożliwiające ocenę aktywności metabolicznej zbiorowisk na podstawie stopnia wykorzystania różnych substratów, źródeł węgla umieszczonych w dołkach płytki. Zaszczepione zawiesiną mikroorganizmów płytki inkubowano w temperaturze 24°C przez 192 godziny. Stopień zużycia substratów węglowych określano na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali 590 nm w odstępach 24-godzinnych.





A

Wyniki analizy skupień wykorzystania poszczególnych substratów węglowych przez zbiorowiska mikroorganizmów występujące na A) liściach, B) owocach truskawki w zależności od odmiany (Vibrant, Rumba, Honeoye) oraz warunków nawodnienia plantacji (z nawadnianiem – N, bez nawadniania – BN).



B

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowane wykorzystanie testowanych związków przez zbiorowiska występujące w liściach i owocach oraz pomiędzy odmianami roślin truskawki.
Najwyższy poziom wykorzystania substratów, zwłaszcza L-asparaginy, kwasu D-galakturonowego, D-mannitolu oraz kwasu D-jabłkowego, stwierdzono w liściach odmiany Honeoye i Vibrant uprawianych w systemie nawadnianym.
Największą aktywność metaboliczną zbiorowisk mikroorganizmów występujących na owocach zaobserwowano w odmianie Vibrant w systemie bez nawadniania. Natomiast najniższy stopień wykorzystania substratów stwierdzono w przypadku zbiorowisk występujących na owocach uprawianych w systemie nawadnianym.

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu BIOSTRATEG, numer umowy BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018

Poprawa parametrów fizjologicznych roślin z gatunku *Arabidopsis arenosa* pod wpływem inokulacji z użyciem endofitycznych drożdży *Sporobolomyces ruberrimus*

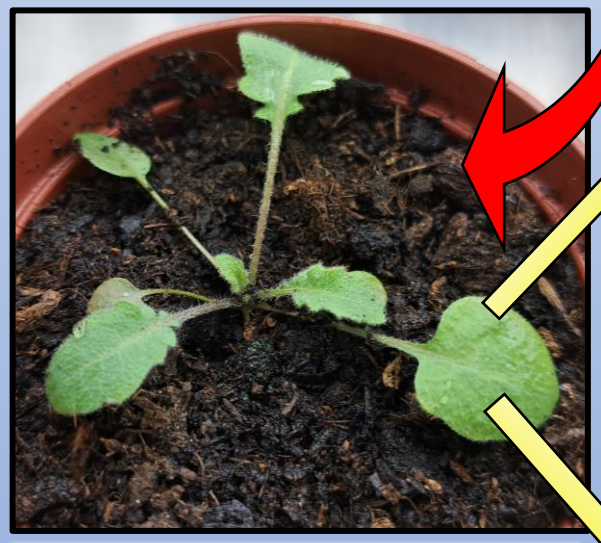
Maciej Gustab, Piotr Rozpądek

Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie,
Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków, Polska

Badania finansowane z grantu NCN, OPUS-17, 2019/33/B/NZ9/01372

Sporobolomyces ruberrimus

Inokulacja



Arabidopsis arenosa

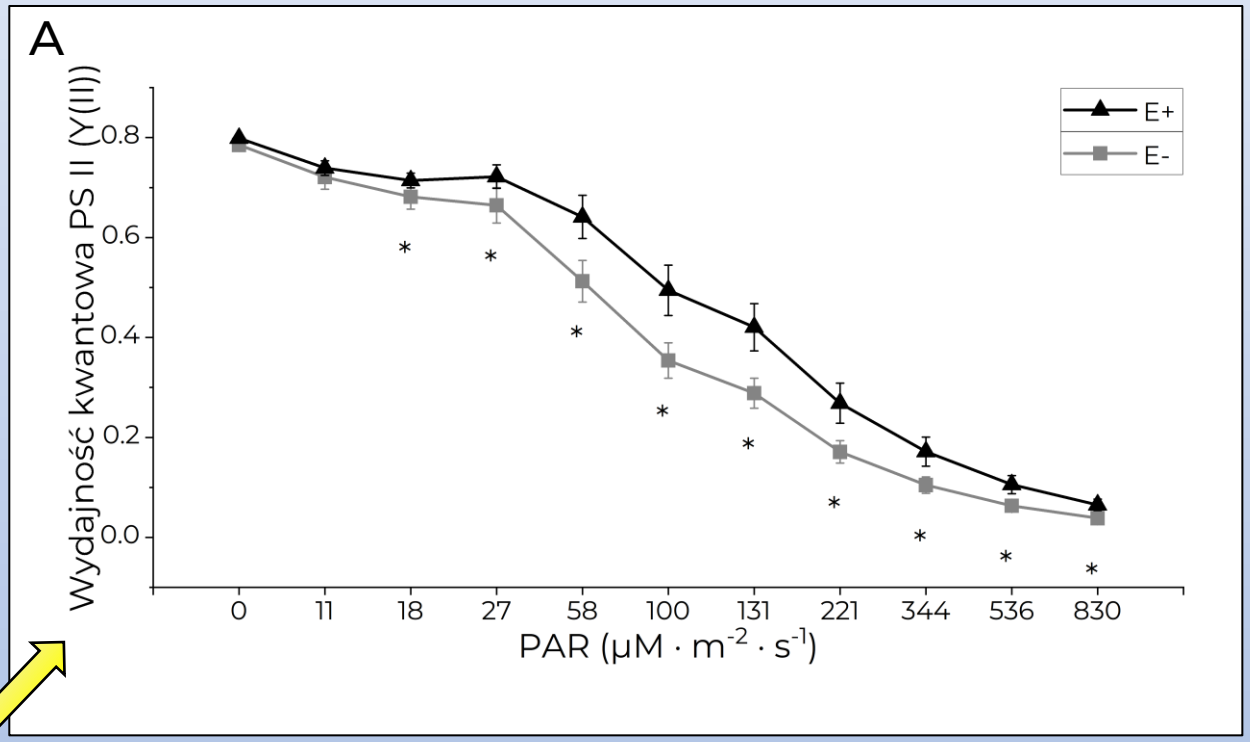


Fig. A Wydajność kwantowa PS II (Y(II)) na podstawie pomiarów krzywej świetlnej u inokulowanych (E+) i nieinokulowanych (E-) roślin z gatunku *A. arenosa*. Analiza statystyczna przy pomocy testu t-Studenta, gwiazdki oznaczają p<0,05.

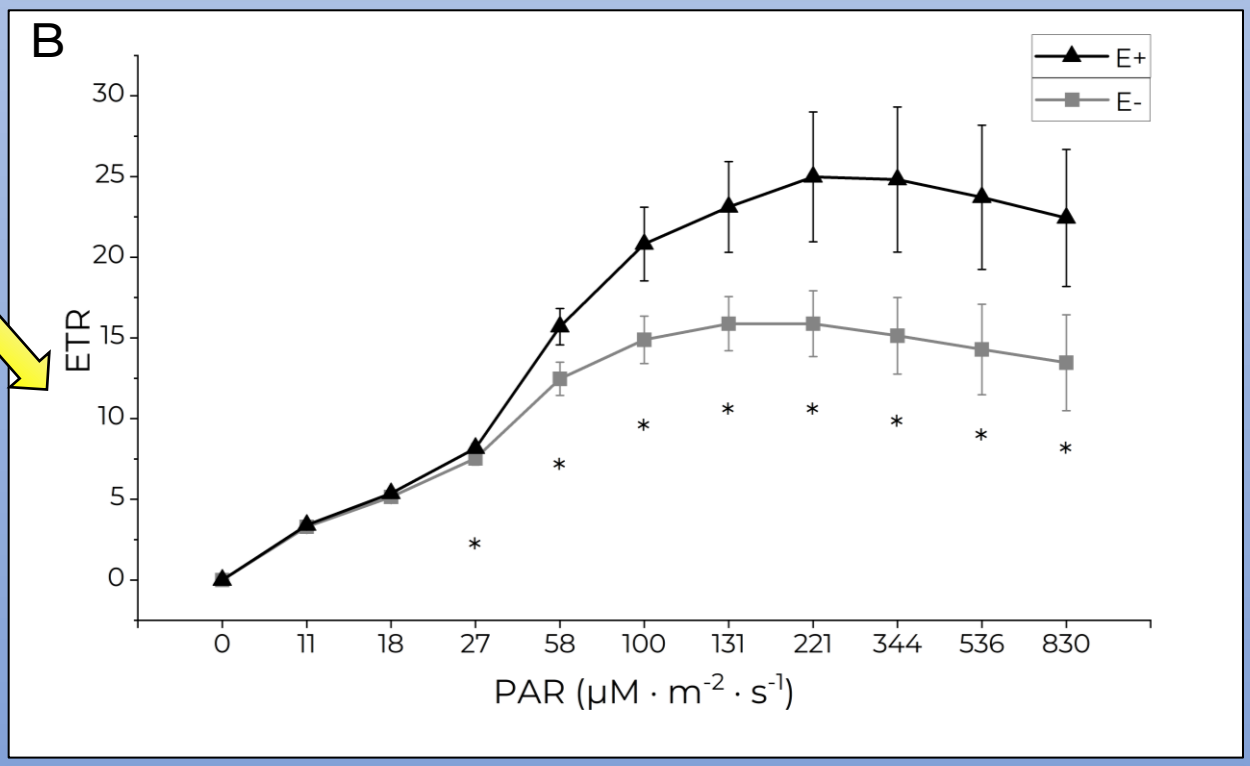


Fig. B Współczynnik niecyklicznego transportu elektronów (ETR) na podstawie pomiarów krzywej świetlnej u inokulowanych (E+) i nieinokulowanych (E-) roślin z gatunku *A. arenosa*. Analiza statystyczna przy pomocy testu t-Studenta, gwiazdki oznaczają p<0,05.

Sporobolomyces ruberrimus to gatunek drożdży naturalnie występujących w tkankach Rzeżusznika piaskowego (*Arabidopsis arenosa*). Wcześniejsze badania wykazały jego ochronny wpływ na rośliny rosnące na podłożu silnie zanieczyszczonym metalami, w tym na *A. arenosa* i blisko spokrewnioną z nią *A. thaliana*.

Co więcej, zaobserwowano, że inokulacja z użyciem wyłącznie tego gatunku drożdży znacząco **poprawiła wszystkie parametry wydajnościowe fotoukładu II** (PS II) w pomiarach fluorescencji chlorofilu A u *A. arenosa*. Wybrane parametry przedstawiono na Fig. A i B. Nie zaobserwowano takiego efektu w przypadku *A. thaliana*. Niemniej *S. ruberrimus* może stanowić ważny gatunek do wykorzystania w biotyzacji wybranych gatunków roślin.

Kolejnym krokiem w przedstawionych badaniach będzie sprawdzenie, jak inokulacja z użyciem *S. ruberrimus* wpływa na wymianę gazową i wzrost biomasy u *A. areonsa*. Wyższa wydajność fotosyntezy może korzystnie wpływać na zwiększenie asymilacji dwutlenku węgla (CO_2) z atmosfery oraz wzrost plonów roślin uprawnych.

GENETIC ASPECTS OF USING L-CARNITINE FOR THE PRODUCTION OF PROTEIN BIOMASS BY THE UNCONVENTIONAL YARROWIA LIPOLYTICA YEAST

Monika Elżbieta Jach*, Konrad Kubiński*, Ewa Sajnaga*, Marek Juda^, Anna Malm^

*The John Paul II Catholic University of Lublin, Konstantynów 1i, 20-708 Lublin, Poland

^Medical University of Lublin, Chodźki 1, 20-093 Lublin, Poland

Introduction

L-carnitine or γ-trimethylamino-β-hydroxybutyric acid is a ubiquitous water-soluble quaternary amine compound. It is synthesized by most eukaryotic organisms, including some yeast, from amino acids: lysine as a precursor and methionine or S-adenosyl methionine as a methyl donor. In humans, endogenous synthesis of L-carnitine occurs chiefly in the liver. However, it must be complemented through dietary uptake. Since it is regarded to be a quasi-nutrient or conditionally essential nutrient, L-carnitine deficiencies sometimes cause life-threatening disorders. As an important factor in cellular metabolism, L-carnitine binds fatty acids and transfers them to the mitochondria for β-oxidation required for generation of energy. Without L-carnitine, the mitochondrial inner membrane is impermeable to fatty acids. L-carnitine transports long- to short-chain fatty acids out of the peroxisome, where β-oxidation is started, into the mitochondria, where the process is completed, by reversible esterification of the β-carbon hydroxylgroup with a fatty acid to form *O*-acyl-carnitine.

Aim of research

Two *Y. lipolytica* strains, namely the industrial A-101 strain and the standard reference strain from the American Type Culture Collection (ATCC), were examined for L-carnitine content in their biomasses depending on the medium, fat-rich biofuel waste, and fatty acid-poor YPD medium. Subsequently, the genes responsible for the production of L-carnitine were identified.

Methods

Y. lipolytica was cultured in two culture media: an industrial fat-rich SK medium and the chemically defined fatty acid-poor YPD medium (Difco). The SK medium is a waste from biofuel production, which is normally used by Skotan S.A for production of *Y. lipolytica* A-101 biomass rich in nutritional elements for commercial use. Biofuel is made through chemical reaction of vegetable oil with ethanol producing fatty acid esters (long-chain alkyl (methyl, ethyl, or propyl) esters). Crude biofuel waste consists of a mixture of vegetable oils with *degumming* and glycerol fractions (from 2% to 7% wt/wt). The sterile media were also supplemented with $FeSO_4$, trimethyllysine hydrochloride, and L-ascorbic acid.

Results

Free L-carnitine was detected in the biomass of both *Y. lipolytica* strains cultured in the YPD medium in the different culture conditions. The obtained biomasses of *Y. lipolytica* strains enriched in L-carnitine exhibit different sensitivities to temperature and pH.

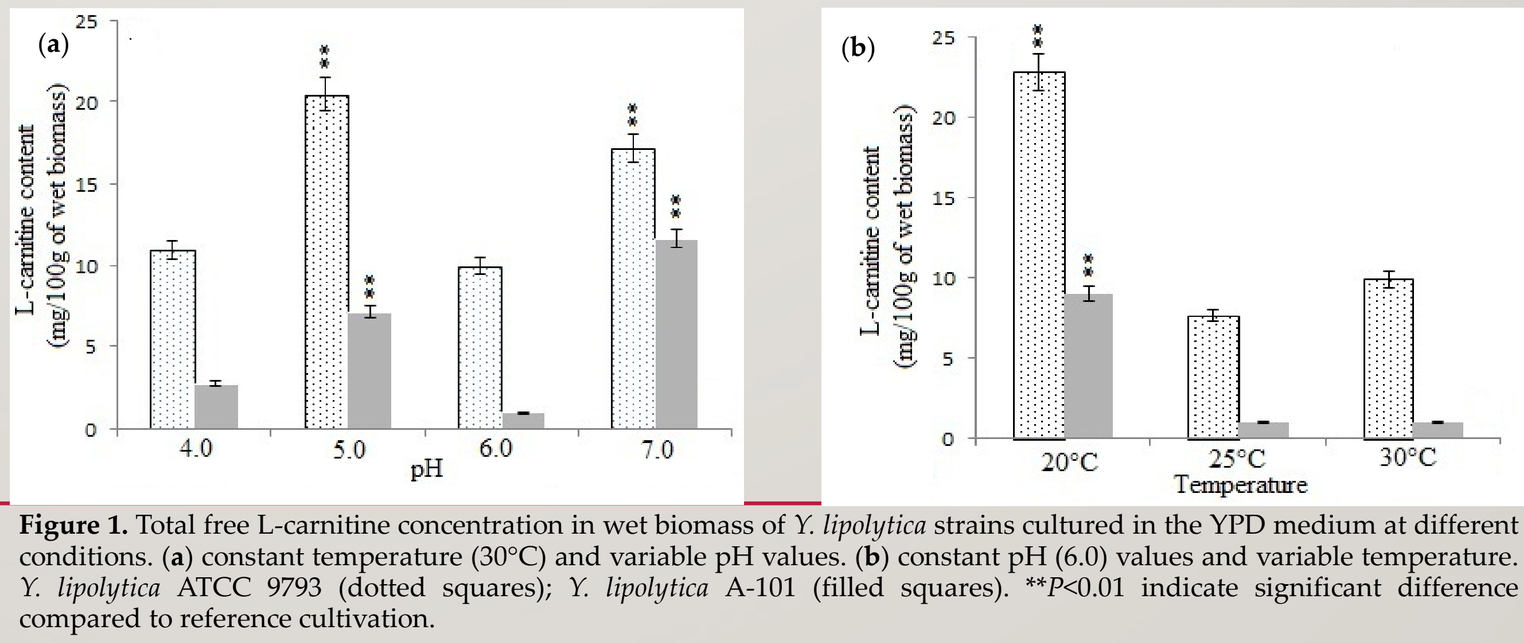


Figure 1. Total free L-carnitine concentration in wet biomass of *Y. lipolytica* strains cultured in the YPD medium at different conditions. (**a**) constant temperature (30°C) and variable pH values. (**b**) constant pH (6.0) values and variable temperature. *Y. lipolytica* ATCC 9793 (dotted squares); *Y. lipolytica* A-101 (filled squares). ***P*<0.01 indicate significant difference compared to reference cultivation.

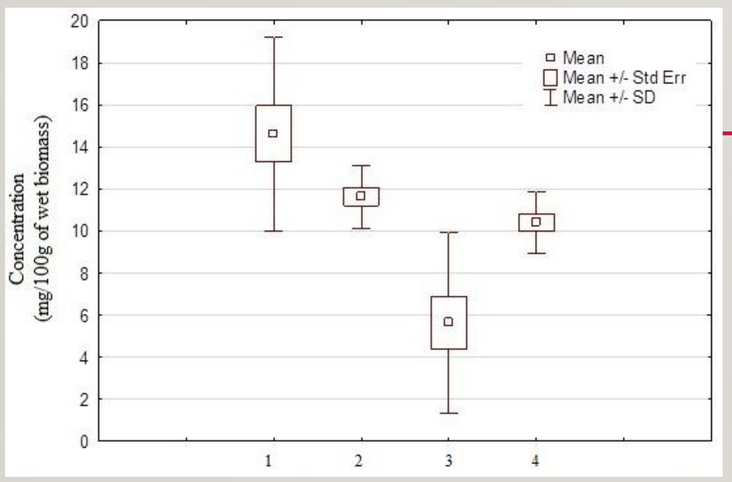


Figure 2. Average values of L-carnitine and protein production by *Y. lipolytica* A-101 and ATCC 9793 strains growing on YPD medium, shown as irrespective of the culture parameters. 1. L-carnitine concentration in *Y. lipolytica* ATCC 9793 biomass. 2. Protein content in *Y. lipolytica* ATCC 9793 biomass. 3. L-carnitine concentration in *Y. lipolytica* A-101 biomass. 4. Protein content in *Y. lipolytica* A-101 biomass.

Another oleaginous yeast *C. albicans* can synthesize carnitine *de novo*. Mutant strains with deletion of one of four genes determining the L-carnitine synthesis, were incapable of utilizing either acetate or ethanol as carbon therefore did not grow on fatty acids or their grow were strongly reduced. Identified enzymes involved in the carnitine biosynthesis pathway were, in sequence:

- trimethyllysine dioxygenase,
- hydroxytrimethyllysine aldolase,
- trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase,
- butyrobetaine dioxygenase.

Irrespective of the culture parameters, both of the strains produced comparable concentration of proteins but it existed significant difference in production of L-carnitine between these strains. *Y. lipolytica* ATCC 9793 produced significantly more L-carnitine in comparison with A-101 strain.

Medium	L-carnitine concentration (mg/100g wet biomass) Mean ± Standard deviation (SD)			
	Y. lipolytica A-101		*Y. lipolytica* ATCC 9793	
	Biofuel waste	YPD medium	Biofuel waste	YPD medium
unsupplemented	<1.00	2.80 ± 0.05	<1.00	9.93 ± 0.50
supplemented trimethyllysine (0.01 g/L), iron(II) (0.001 g/L), L-ascorbic acid (0.002 g/L)	<1.00	9.80 ± 0.49 **	<1.00	10.99 ± 0.55
supplemented trimethyllysine (0.1 g/L), iron(II) (0.01 g/L), L-ascorbic acid (0.002 g/L)	<1.00	10.74 ± 0.52 **	<1.00	12.41 ± 0.62 **

Table 1. L-carnitine concentration in the wet biomass of *Yarrowia lipolytica* strains cultured in biofuel waste and YPD medium. ***P* < 0.01 indicates significant difference compared with the reference unsupplemented cultivation. The yeast were cultivated 12 h, at 30° C, pH 6.0, 12 h.

Candida albicans gene	Gene product	*Yarrowia lipolytica* homologous sequences	Sequence identity of translated DNA sequences [%]
orf19.4316	trimethyllysine dioxygenase	YALI0C10604	49,2
orf19.6306	trimethylaminobutyraldhyde dehydrogenase	YALI0C03025	48.2
		YALI0E00264	48.6
orf19.6305	hydroxytrimethyllysine aldolase	YALI0A21417	50.6

Table 2. *Yarrowia lipolytica* and *Candida albicans* homologous sequences, essential for L-carnitine synthesis, sharing more than 40% identity.

Conclusion

- ✓ *Y. lipolytica* is genetically adapted for the biosynthesis of L-carnitine *de novo*
- ✓ The yeast is able to utilize almost the entire pool of free L-carnitine for its growth and protein production

VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

Analiza molekularna genów uczestniczących w adaptacji bakterii *Rhizobium leguminosarum* do niskich temperatur

Monika Janczarek[1], Marta Kozieł[1], Michał Kalita[2]

[1]Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, [2]Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail: monika.janczarek@mail.umcs.pl

Wstęp

Bakterie z rodzaju *Rhizobium* posiadają zdolność nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi i przekształcania azotu atmosferycznego do form azotu dostępnych dla roślin. Wiele czynników środowiskowych, do których należy, m.in. niska temperatura, ma wpływ na efektywność symbiozy. W adaptacji do stresu niskich temperatur są zaangażowane białka CSP (*cold-shock proteins*).

Metody

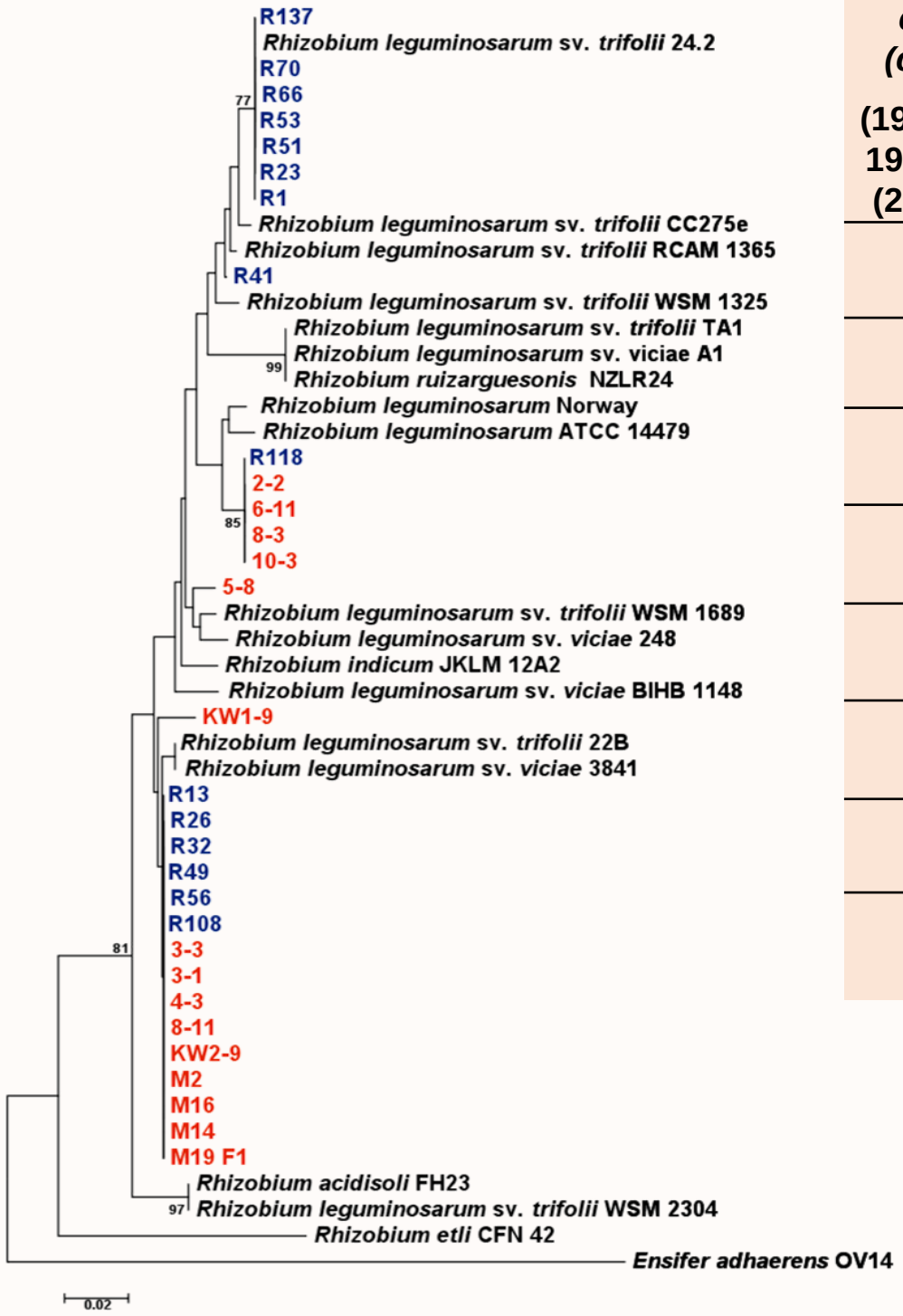
Analizę homologii sekwencji genów *csp* pomiędzy analizowanymi szczepami przeprowadzono z wykorzystaniem algorytmu BLAST. Dla genu *cspA* skonstruowano drzewo filogenetyczne za pomocą programu MEGAX.

Cel

Celem badań była analiza molekularna genów *csp* symbiotycznej bakterii *R. leguminosarum*.

Wyniki

Przeprowadzono analizę molekularną genów *csp,* występujących u symbiotycznej bakterii *R. leguminosarum*. W genomie tej bakterii zidentyfikowano pięć genów *csp,* które wykazują podobieństwo sekwencji do genów uczestniczących w adaptacji do stresu zimna u innych bakterii symbiotycznych. Geny *csp* kodują białka o niskiej masie cząsteczkowej (~10 kDa). Analiza molekularna tych genów wykazała bardzo duże podobieństwo ich sekwencji nukleotydowych (od 95% do 100%). Spośród nich, gen *cspA* koduje główne białko ryzobiów, które uczestniczy w adaptacji do niskiej temperatury (Rys. 1, tabela 1).



Rys.1. Drzewo filogenetyczne NJ skonstruowane w oparciu o sekwencje *cspA* mikrosymbiontów *T. pratense* pochodzących z klimatu subpolarnego (kolor niebieski) i umiarkowanego (kolor czerwony) oraz szczepów referencyjnych (kolor czarny). Drzewo skonstruowane przy użyciu metody Neighbor-Joining (wartości w węzłach prezentują współczynnik poparcia).

Tabela 1. Podobieństwo sekwencji nukleotydowych (% identyczności sekwencji) genów *csp* szczepów należących do *R. leguminosarum*

Rhizobium leguminosarum bv. trifolii 4B					
csp1 (cspA) **(1952218-1952427) (210 nt)**	***csp2*** **(92650270–2650465) (196 nt)**	***csp3*** **(795230–2795415) (186 nt)**	***csp4*** **(428766–428829) (64 nt)**	***csp5*** **(1186146–1186199) (54 nt)**	**Homologia do szczepów *R. leguminosarum***
100	99	100	100	100	Rt24.2
99	99	100	100	100	ATCC1447911
97	99	96	98	100	WSM1689
97	99	99	100	98	TA1
97	99	nd	98	98	Rlv248
97	99	99	nd	100	WSM1325
97	99	97	nd	98	Rlv3841
96	98	95	98	98	WSM2304

Wnioski

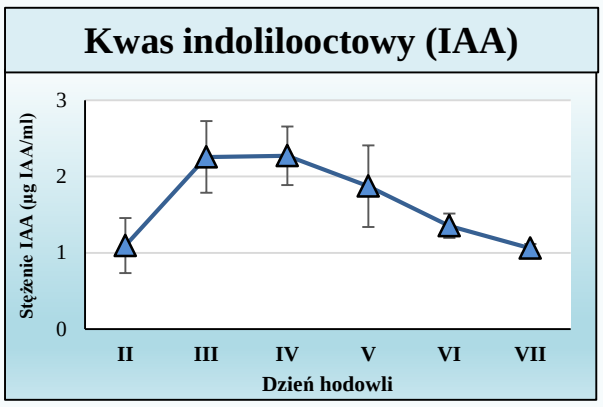
Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że bakterie symbiotyczne należące do gatunku *R. leguminosarum* mają bardzo dobrze rozwiniętą sieć regulatorową, która zapewnia im bardzo efektywne przystosowanie do stresu zimna.

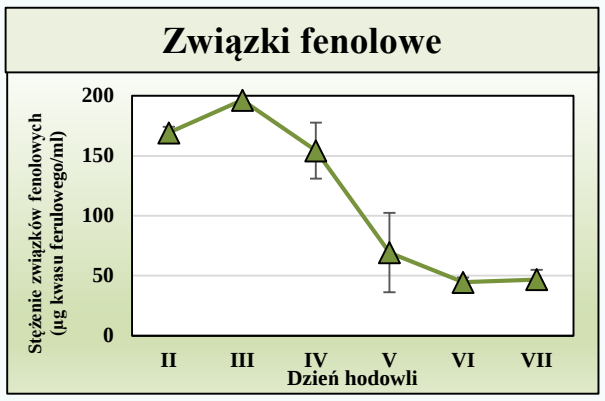
Badania były prowadzone w ramach projektu NCN OPUS (nr 2018/31/B/NZ9/00663)

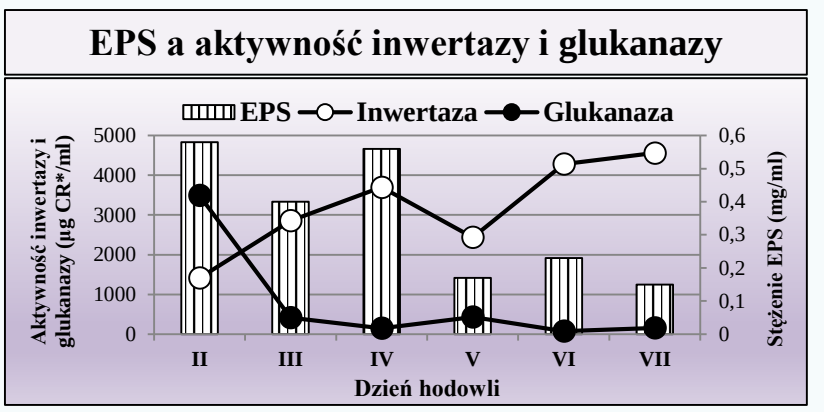
Potencjał stymulacyjny i bioremediacyjny niepatogenicznego, endofitycznego szczepu *Fusarium oxysporum* DEMFo14 zależny od warunków hodowli i obecności metalu ciężkiego (Cd, Pb lub Zn)

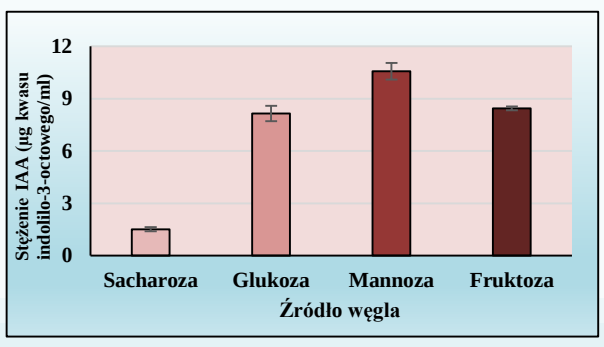
Jolanta Jaroszuk Ściseł[1], Artur Nowak[1], Nataliia Kutyrieva[2], Michał Perzanowski[1], Anna Słomka[1]
[1]*Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,*
[2]*Zakład Mikrostruktury i Mechaniki Biomateriałów, Instytut Agrofizyki PAN w Lublinie*

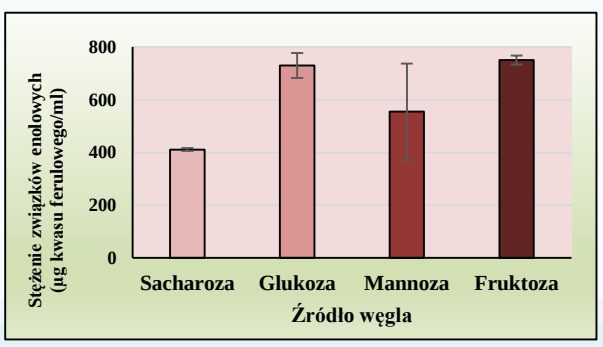
Niepatogeniczny szczep *Fusarium oxysporum* DEMFo14 (sekwencja ITS MH681144) wyizolowany z ryzosfery zdrowego żyta (*Secale cereale* L.) wykazywał zależną od źródeł C (sacharoza, glukoza, fruktoza, mannoza) i N (pepton, ekstrakt drożdżowy, azotan i siarczan amonu) w podłożu i zmienną w czasie (2.-7. dzień inkubacji) zdolność do syntezy **kwasu indolilooctowego (IAA)** i **związków fenolowych** oraz silnie **skorelowaną z aktywnością inwertazy i glukanazy**, bardzo efektywną w całym okresie hodowli syntezę **egzopolimerów (EPS)**.

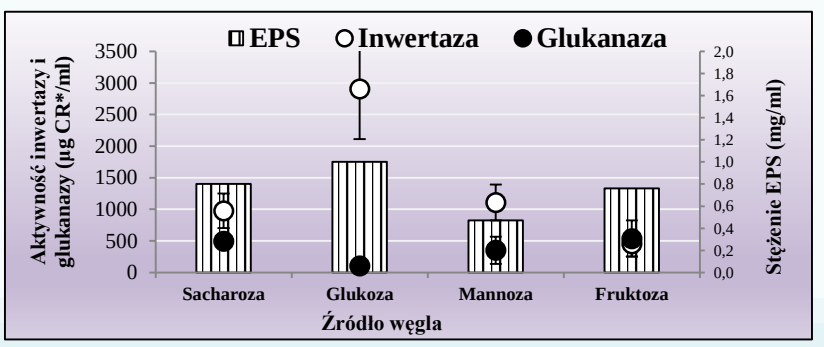


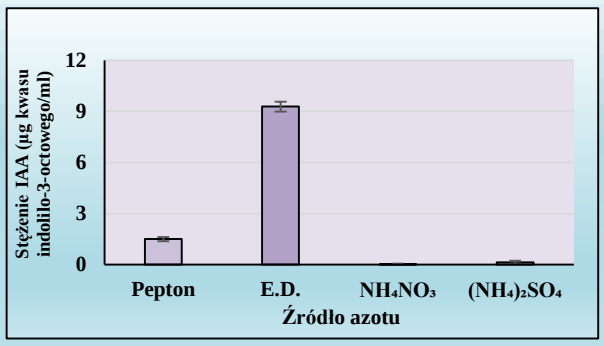


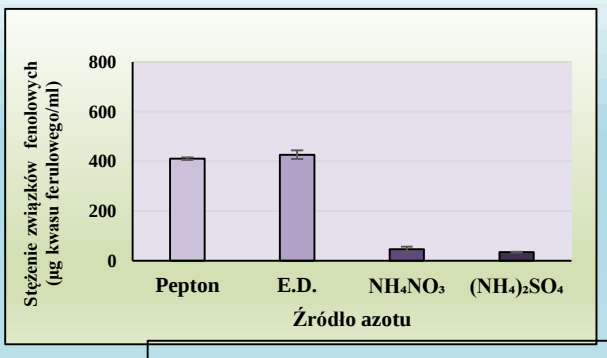


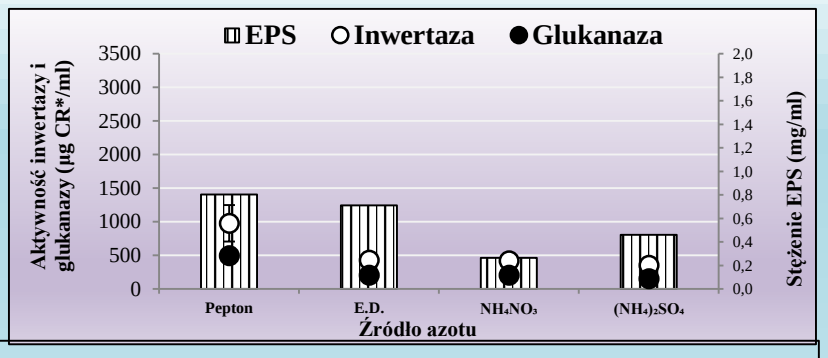




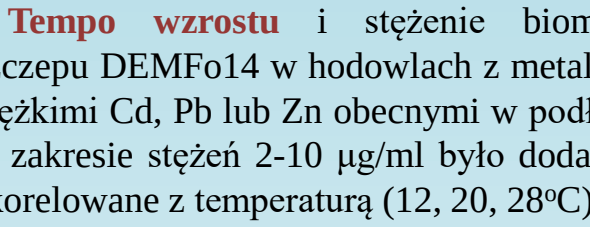






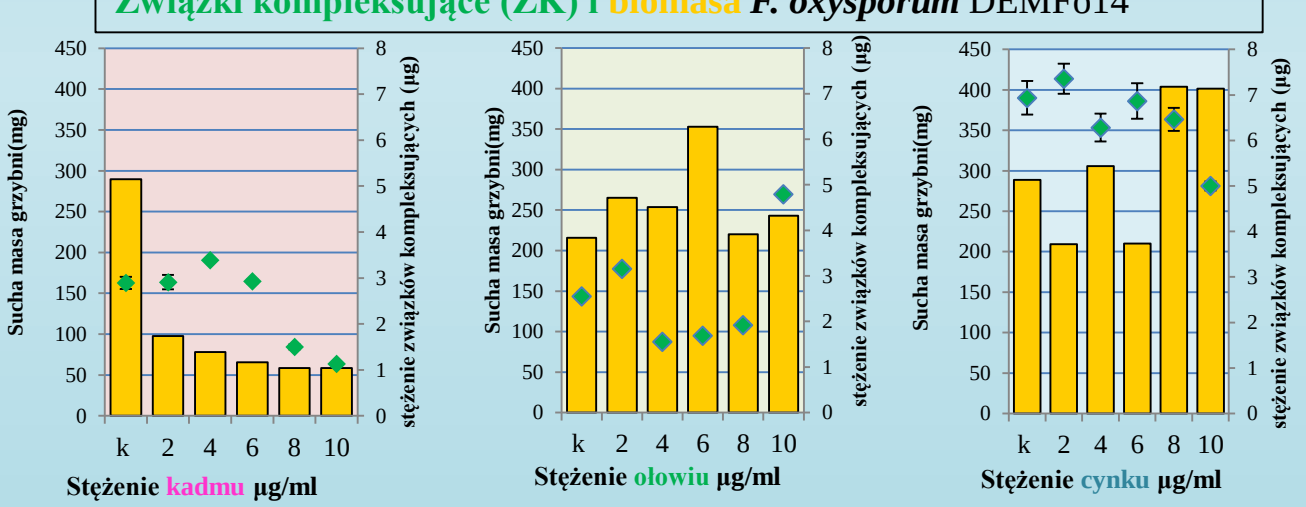


Tempo wzrostu i stężenie biomasy szczepu DEMFo14 w hodowlach z metalami ciężkimi Cd, Pb lub Zn obecnymi w podłożu w zakresie stężeń 2-10 µg/ml było dodatnio skorelowane z temperaturą (12, 20, 28°C).

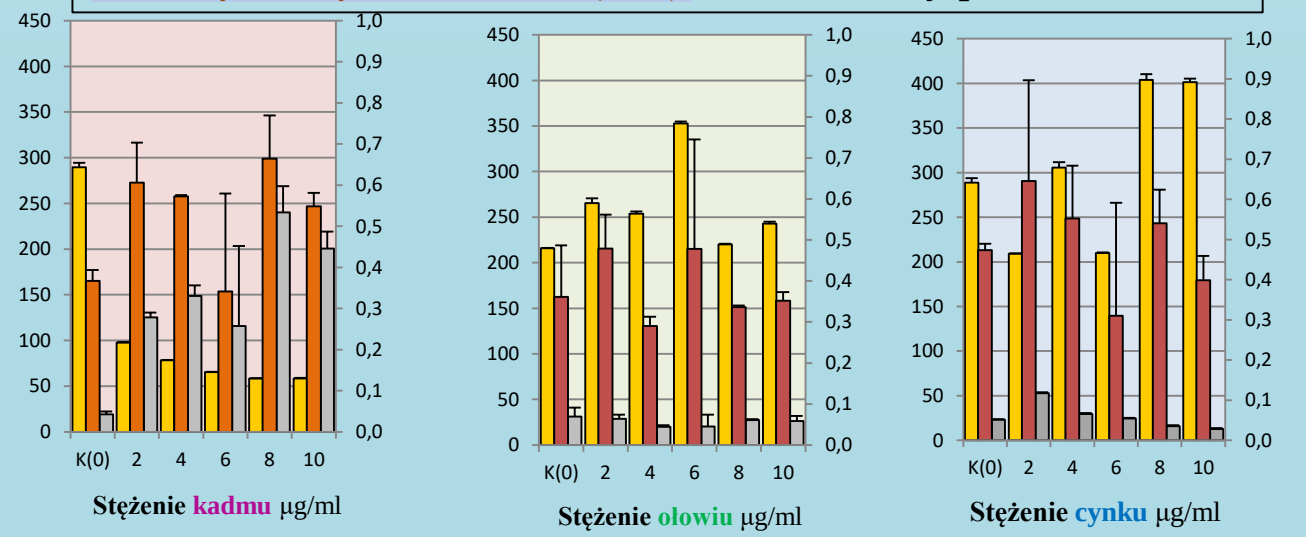


W hodowlach z metalami szczep *F. oxysporum* DEMFo14 syntetyzował **związki kompleksujące (ZK)** oraz **egzopolimery (EPS).**
W obecności Cd stężenie stężenie ZK było 5-krotnie niższe a stężenie EPS nawet 5-krotnie wyższe niż w hodowlach z cynkiem i ołowiem.

Związki kompleksujące (ZK) i biomasa *F. oxysporum* DEMFo14



Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) i biomasa *F. oxysporum* DEMFo14



Badania zostały sfinansowane z subwencji statutowej UMCS

Ścieki z komunalnej oczyszczalni ścieków jako źródło genów oporności na fluorochinolony: badania metagenomowe

„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK" 2022

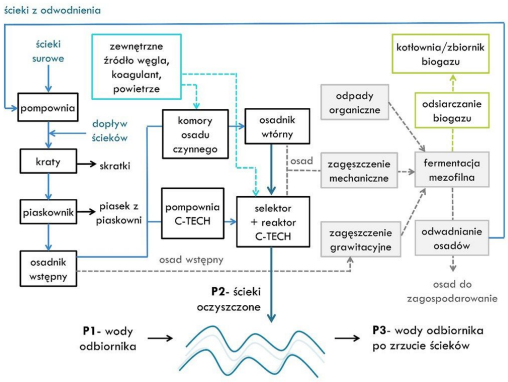
Łukasz Jałowiecki[1], Jacek Borgulat[1], Grażyna Płaza[1], Monika Harnisz[2], Sławek Ciesielski[2]

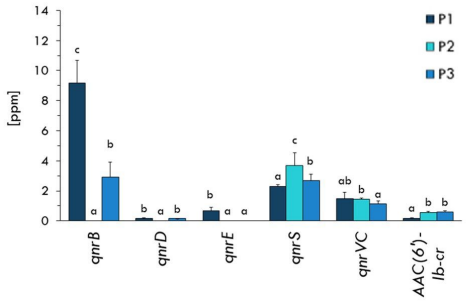
[1]Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Kosshuta 6, 40-844 Katowice
[2]Uniwersytet Warmińsko Mazurski w Olsztynie, Wydział Nauk o Środowisku,
Katedra Inżynierii Ochrony Wód i Mikrobiologii Środowiskowej ul. Prawocheńskiego 1, 10-719 Olsztyn

WPROWADZENIE

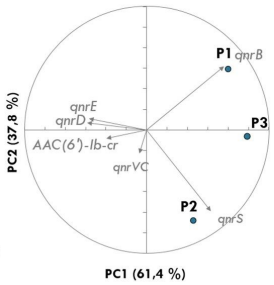
Jedną z konsekwencji nadużywania antybiotyków w sektorze zdrowia i rolnictwa oraz zanieczyszczenia środowiska antybiotykami jest wzrost częstości występowania bakterii przenoszących oporność na antybiotyki (ARBs) i genów oporności na antybiotyki (ARGs), które są określane jako nowe zanieczyszczenia środowiska. Uważa się, że wody powierzchniowe, na które oddziałują ścieki z oczyszczalni ścieków i z przemysłu farmaceutycznego, stanowią centralny punkt transportu i rozprzestrzeniania się ARBs i ARGs. Szczególną uwagę zwraca się na geny chinolonów i karbapenemów, ponieważ mają one wysoki potencjał rozwoju oporności. Istnieją trzy mechanizmy oporności na chinolony kodowane plazmidowo (PMQR): geny *qnr*, które chronią fluorochninole przed inhibicją, wariant acylotransferazy aminoglikozydowej (*AAC(6')-Ib-cr*) inaktywujący fluorochinolony przez acetylację oraz geny *QepA* i *OqxAB* związane z pompą efflux.

Celem pracy była analiza i ocena wpływu ścieków pochodzących z komunalnej oczyszczalni ścieków na występowanie plazmidowych genów oporności na chinolony (PMQR) w wodach odbiornika.





Liczba genów w poszczególnych próbkach [ppm] (n=3, średnia ±odch. st., test Fishera, $p<0,05$)



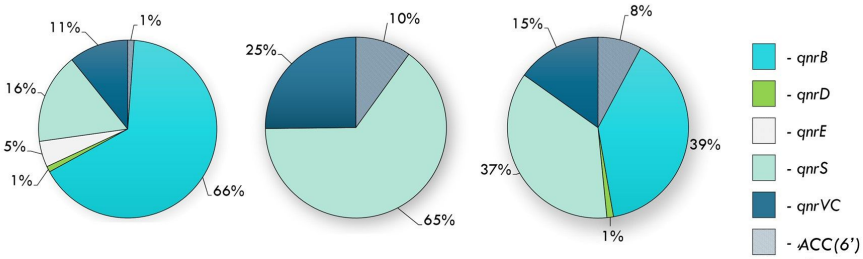
Analiza PCA podobieństwa pobranych wód pod kątem występowania genów oporności na fluorochinolony

METODYKA

Próbki wód oraz ścieków pobierano z 3 punktów. Metagenomowe DNA izolowano przy pomocy zestawu Power Water kit (MoBio Laboratories Inc., CA, United States). Biblioteki DNA przygotowano z użyciem zestawu TruSeq DNA PCR-Free i sekwencjonowano z wykorzystaniem aparatu NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA, United States). Filtracja danych w postaci plików FASTQ została przeprowadzona z wyorzystaniem Trimmomatic v 0.39 natomiast odczyty były parowane za pomocą programu PANDAseq. Geny kodujące oporność na fluorochinolony identyfikowano za pomocą BLASTx z wykorzystaniem bazy danych Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD).

(Po lewej) Schemat oczyszczalni oraz miejsca poboru prób.
P1, P2 i P3 - punkty poboru

WYNIKI



P1 - wody odbiornika przed zrzutem ścieków | **P2 - ścieki oczyszczone** | **P3 - wody odbiornika po zrzucie ścieków**

Udział poszczególnych genów oporności na fluorochinolony (PMQR) w wodach z różnych punktów poboru prób

W ściekach oczyszczonych oraz w wodach odbiornika stwierdzono występowanie następujących genów: *AAC(6')-Ib-cr*, *qnrS i qnrVC*. Nie wykryto natomiast genów związanych z pompami efflux - *QepA* i *OqxAB*. Wśród genów *qnr* wykryto *qnrS* z dominującymi *qnrS2* i *qnrS6* oraz *qnrVC* z dominującymi *qnrVC4* i *qnrVC6*. Liczba determinantów warunkujących oporność na chinolony była niższa w ściekach oczyszczonych (6 ppm = genów/1 mln odczytów) w porównaniu do wód odbiornika (P1- 19 ppm; P2 – 9 ppm).

WNIOSKI

- **Analiza wykazała większe zróżnicowanie i większą liczbę genów oporności na chinolony w wodach odbiornika niż w ściekach oczyszczonych**
- **Przeprowadzone badania wykazały, że wody odbiornika są większym źródłem genów oporności na chinolony niż ścieki oczyszczone, co świadczy o tym, że mikrobiom wód odbiornika jest bardziej zróżnicowany strukturalnie i funkcjonalnie, co warunkuje większą mobilność genów oporności na badane geny**

Badania sfinansowano w ramach grantu z Narodowego Centrum Nauki (grant nr 2017/26/M/NZ9/00071)

Reakcja populacji mikroorganizmów glebowych na nawiezienie gleby odpadem popieczarkowym

Jolanta Joniec[1], Michał Nowak[2], Krzysztof Kowalczyk[2], Edyta Kwiatkowska[1], Cezary Kwiatkowski[3]

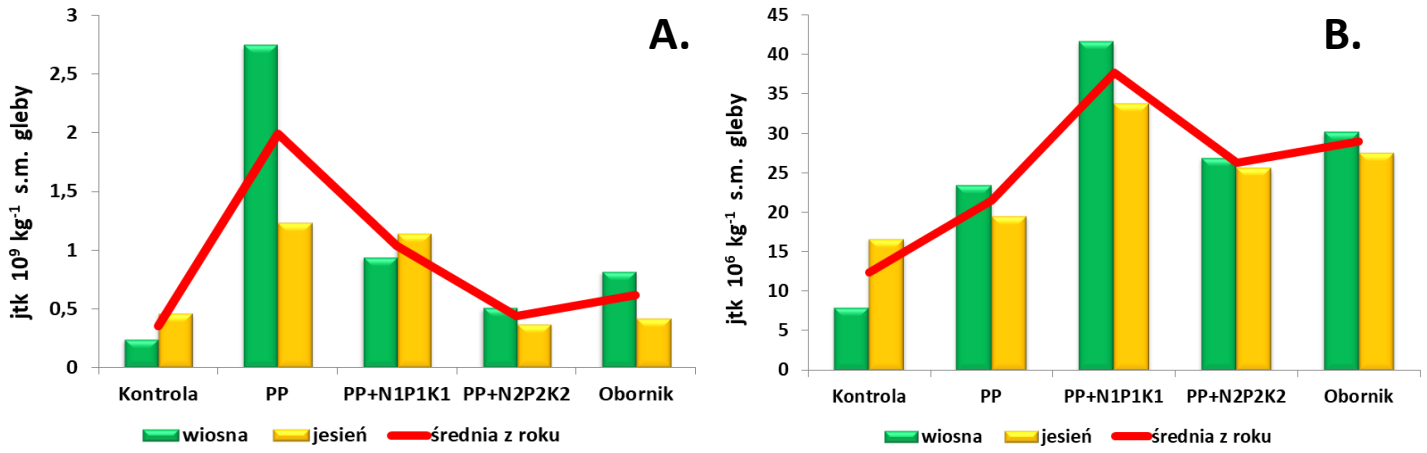
[1] Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin
[2] Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin
[3] Katedra Herbologii i Technik Uprawy Roślin, Zakład Agroturystyki i Rozwoju Obszarów Wiejskich, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Prowadzone w pierwszym roku badania miały na celu poznanie reakcji populacji drobnoustrojów glebowych na wprowadzenie w różnych wariantach w tym z NPK (N1P1K1 i N2P2K2) podłoża po uprawie pieczarek (PP) oraz porównanie jej z reakcją na nawiezienie gleby obornikiem.

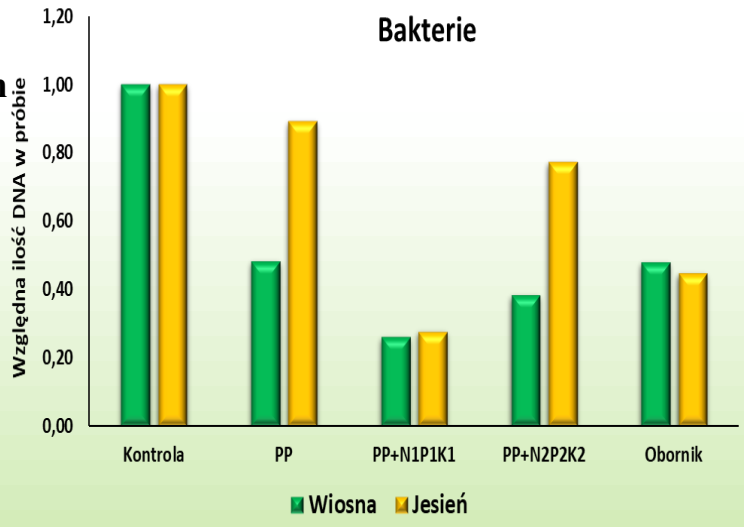
Próbki gleby pobierano dwukrotnie w 1-szym roku tj. w czerwcu i październiku. W ramach analiz określano:

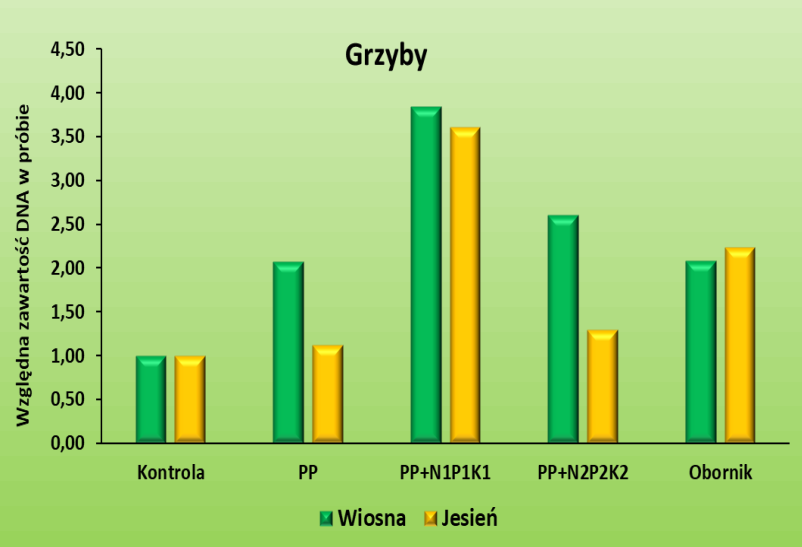
- **liczebność bakterii proteolitycznych**
- **liczebność grzybów proteolitycznych**
- **nasilenie amonifikacji i nitryfikacji**
- **aktywność ureazy**

W badaniach przeprowadzono również ilościową ocenę populacji mikroorganizmów z zastosowaniem metod molekularnych. W tym celu z każdej badanej próby wyizolowano całkowity DNA i określono jego ilość, czystość i integralność. Wyizolowany DNA wykorzystany został jako matryca do analiz ilościowych techniką qPCR z zastosowaniem specyficznych sekwencyjnie primerów. Ocenę przeprowadzono w oparciu o wyniki uzyskane na drodze amplifikacji sekwencji genów kodujących 16S rRNA w przypadku bakterii oraz 18S rRNA w przypadku grzybów.



Rys. 1. Liczebność bakterii (A) i grzybów (B) proteolitycznych w glebie.

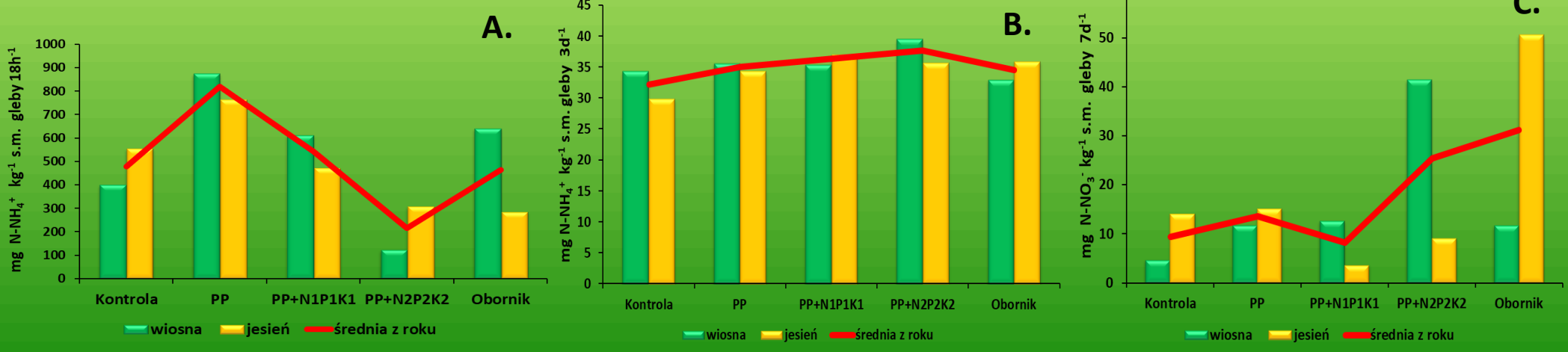




PODSUMOWANIE

Zastosowanie podłoża popieczarkowego spowodowało nasilenie amonifikacji, nitryfikacji, aktywności ureazy oraz rozwoju bakterii i grzybów proteolitycznych. Na ogół parametry te były wyższe w obiektach z odpadem zastosowanym łącznie z NPK niż z samym odpadem. Ponadto mikroorganizmy silniej zareagowały na zastosowanie podłoża niż obornika.

Wyniki dotyczące zawartości DNA bakterii wykazały, że dodatek zarówno odpadu popieczarkowego we wszystkich kombinacjach jak i obornika, spowodował spadek tego parametru. Najmniej korzystne okazało się zastosowanie odpadu łącznie z N1P1K1. W przypadku grzybów zawartość DNA wykazywała odwrotną tendencję niż DNA bakterii, tj. we wszystkich obiektach z odpadem i obornikiem parametr ten kształtował się na wyższym poziomie. W kombinacji z N1P1K1 przyjął najwyższe wartości.



Rys. 2. Aktywność ureazy (A), amonifikacji B) i nitryfikacji (C) w glebie

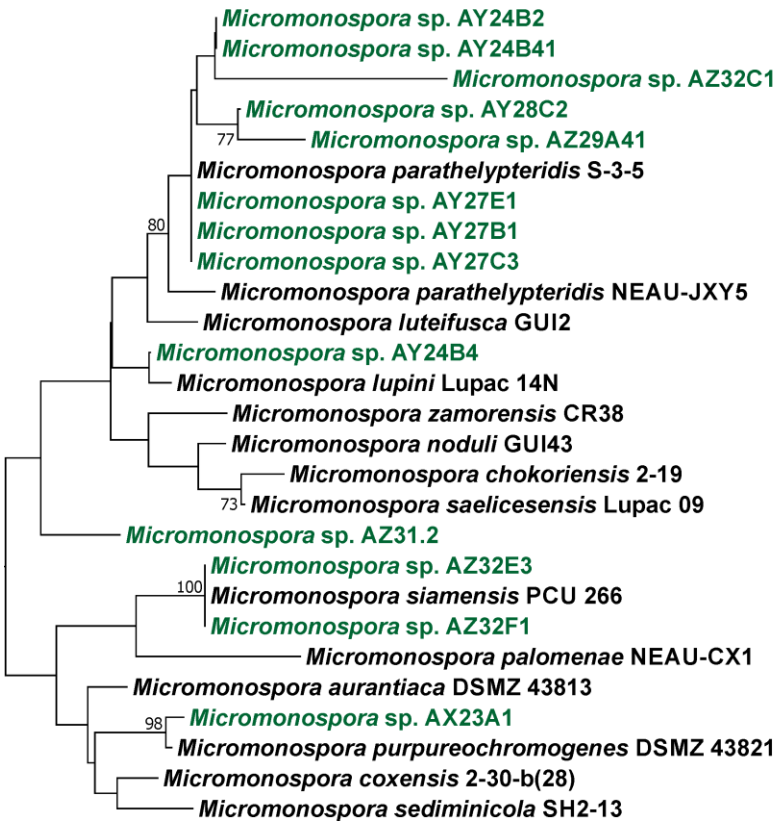
Analiza filogenetyczna endofitycznych promieniowców z rodzaju *Micromonospora* wyizolowanych z brodawek korzeniowych janowca barwierskiego (*Genista tinctoria)* rosnącego w południowych Włoszech

Michał Kalita[1], Sylwia Wdowiak-Wróbel[1], Monika Marek-Kozaczuk[1], Wojciech Sokołowski[1], Emanuela Di Ioro[2], Olga De Castro[2], Eleonora Manzo[2]

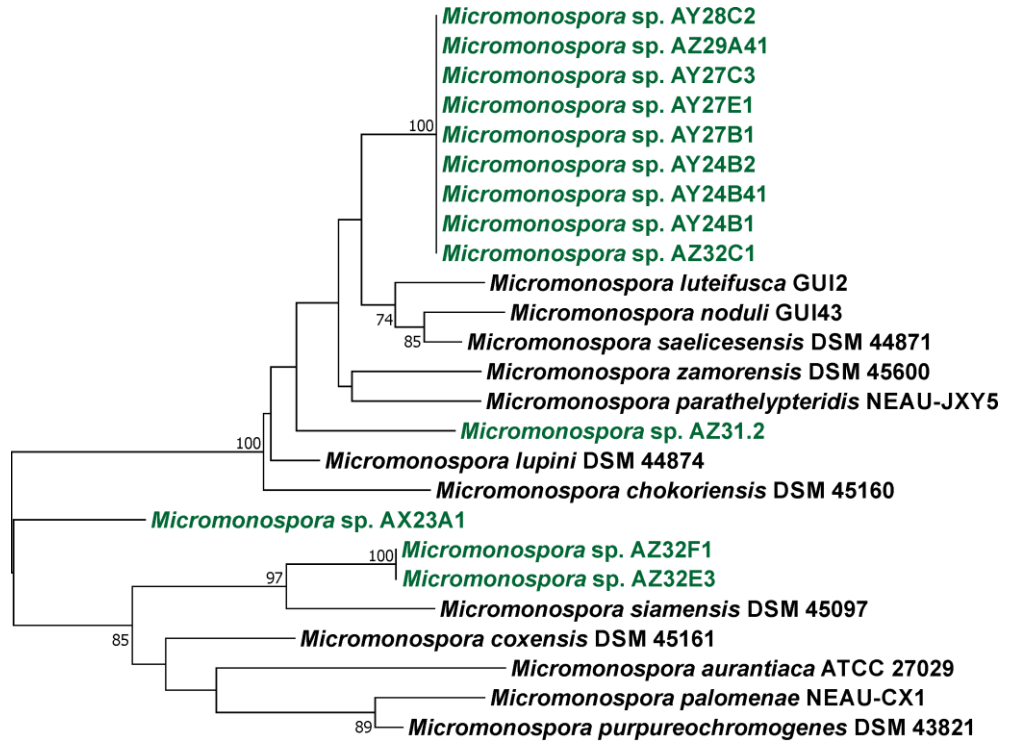
[1]Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, [2]Dipartimento di Biologia, Orto Botanico, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy

Wstęp. Pogląd, że brodawki tworzone na korzeniach roślin bobowatych zasiedlane są jedynie przez ryzobia, czyli bakterie wiążące azot atmosferyczny w układzie symbiotycznym z gospodarzem roślinnym, utrzymywał się przez wiele lat. Włączenie metod molekularnych do badań nad składem populacji mikroorganizmów różnych siedlisk wykazało, że zróżnicowanie bakterii tworzących mikrobiom brodawek korzeniowych jest znacznie bogatsze niż dotychczas sądzono. Jedną z takich nieryzobiowych grup bakterii zasiedlających brodawki korzeniowe roślin bobowatych są promieniowce.

Materiały i metody. Badaniami objęto izolaty z brodawek korzeniowych pobranych z janowca barwierskiego (*G. tinctoria*) rosnącego w południowych Włoszech, w regionie La Valle d'Ansanto (40° 58' 30'' N, 15° 8' 31,' E). Z wyprowadzonych kultur bakteryjnych izolowano DNA genomowy, który wykorzystano w reakcji PCR z uniwersalnymi starterami dla genu kodującego 16S rRNA oraz starterami dla sekwencji genu *gyrB*. Odczytane sekwencje porównywano z zasobami bazy NCBI Nucleotide z wykorzystaniem narzędzia BLAST. Sekwencje nukleotydowe 16S rDNA oraz *gyrB* wykorzystano do skonstruowania drzew filogenetycznych metodą Maximum Likelihood.



Rys. 1. *Drzewo filogenetyczne sekwencji genu kodującego 16S rRNA szczepów z rodzaju Micromonospora, wyizolowanych z brodawek korzeniowych G. tinctoria (zaznaczonych na zielono) oraz znanych gatunków promieniowców, najbliżej spokrewnionych z badanymi izolatami.*



Rys. 2. *Drzewo filogenetyczne sekwencji fragmentu genu gyrB badanych izolatów z rodzaju Micromonospora, wyizolowanych z brodawek korzeniowych G. tinctoria (zaznaczonych na zielono) oraz blisko spokrewnionych z nimi gatunków.*

Wyniki i wnioski.

- Analiza filogenetyczna sekwencji 16S rDNA badanych izolatów potwierdziła ich przynależność do rodzaju *Micromonospora* oraz wykazała, że szczepy te nie tworzą na skonstruowanym drzewie jednorodnej grupy. Promieniowce wyizolowane z brodawek korzeniowych *G. tinctoria* wykazują pokrewieństwo z kilkoma różnymi gatunkami rodzaju *Micromonospora* (Rys. 1).

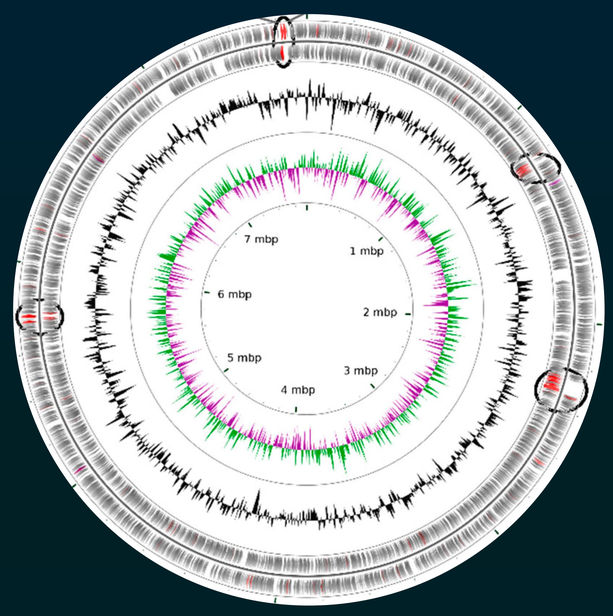
- Wyniki analizy porównawczej sekwencji fragmentu genu *gyrB* badanych izolatów i referencyjnych szczepów *Micromonospora* sugerują, że reprezentują one nowe gatunki w obrębie tego rodzaju. Stopień podobieństwa sekwencji genu *gyrB* między badanymi szczepami a znanymi gatunkami wynosił poniżej 98.5%, którą to wartość w przypadku rodzaju *Micromonospora* powszechnie przyjmuje się jako wskaźnik odrębności gatunkowej analizowanych izolatów. Badane izolaty brodawkowe tworzą na drzewie filogenetycznym fragmentu genu *gyrB* odrębne względem siebie i znanych gatunków grona lub gałęzie (Rys. 2), co dodatkowo wspiera wniosek o ich przynależności do nieopisanych dotychczas gatunków rodzaju *Micromonospora*.

Fantastyczne cyjanobakterie – jak je wykorzystać?

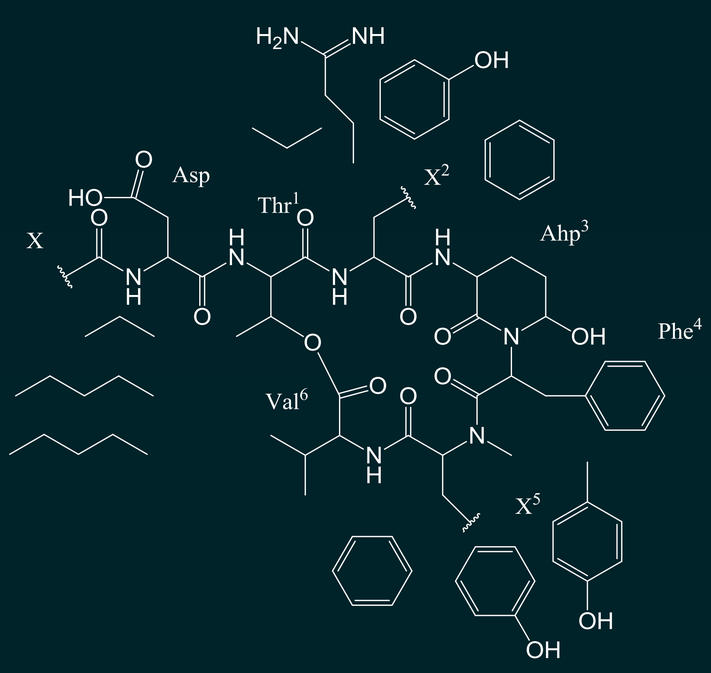
Robert Konkel[1], Anna Fidor[1], Michał Grabski[2] Anna Toruńska-Sitarz[1], Marta Cegłowska[3], Karolina Szubert[1], Krzysztof Pyrć[4], Hanna Mazur-Marzec[1]

1 Zakład Biotechnologii Morskiej, Instytut Oceanografii, Uniwersytet Gdański, Al. Marszałka Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia.
2 Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
3 Zakład Chemii i Biochemii Morza, Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk, Powstańców Warszawy 55, 81-712 Sopot
4 Pracownia Wirusologii, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, Poland

Nostoc edaphicum CCNP 1411 został wyizolowany z Zatoki Gdańskiej. Genetyczne badania przeprowadzone przez Michała Grabskiego wykazały, że na genom *N. edaphicum* składa się 5 plazmidów i chromosom na którym obecne są 4 miejsca odpowiedzialne za syntezę nierybosomalną. Sinice odpowiedzialne są za produkcję metabolitów wtórnych, wśród nich znajduje się wiele związków o unikalnej strukturze. Badania przeprowadzone przy użyciu LC-MS/MS oraz NMR wykazały produkowanie przez *N. edaphicum* CCNP1411 przynajmniej 4 klas związków – cyjanopeptolin, nostocyklopeptydów, anabaenopeptyn i kryptoficyn.

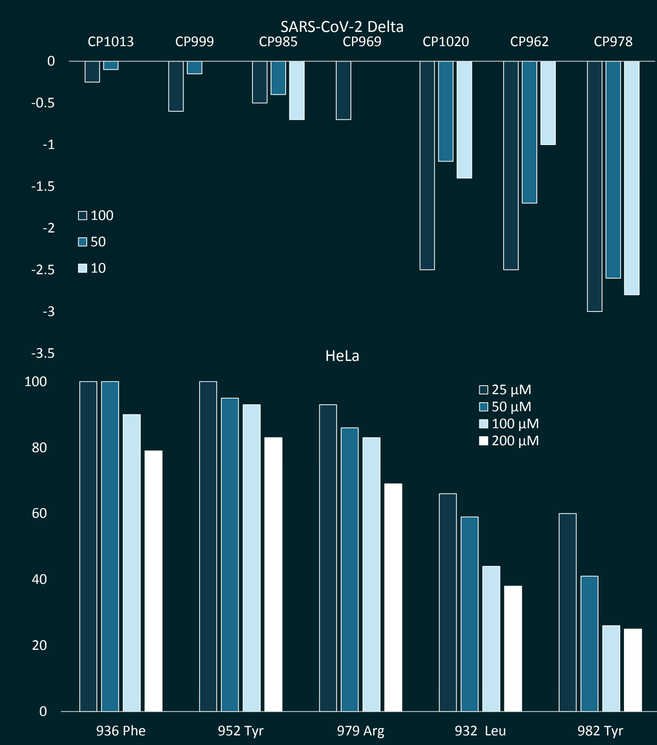


CYJANOPEPTOLINY

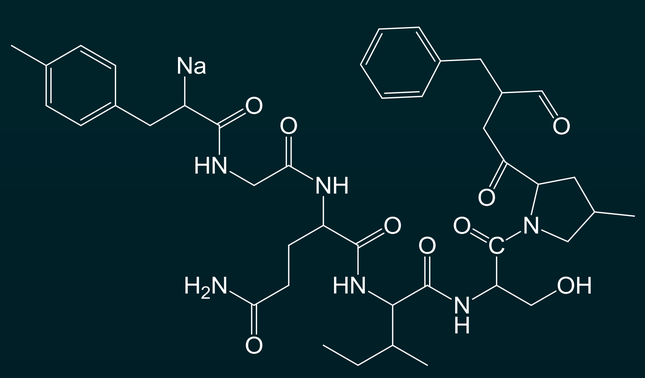


Cyjanopeptoliny (CP) to jedne z najczęściej występujących peptydów sinicowych, z których wiele jest inhibitorami proteaz serynowych. Niektóre warianty CP są również silnie toksyczne dla organizmów wodnych, zwłaszcza małych skorupiaków. W naszych pracach wykazaliśmy aktywność Cyjanopeptolin względem linii komórkowych (HeLa), wirusów oddechowych (SARS-CoV-2) oraz proteaz (trypsyna, chymotrypsyna). Aktywność zależała od aminokwasu w pozycji 2.

		Arg	Tyr	Leu	Phe	Met
OA	MeHty	1048	1056	1005	1039	1023
	MeTyr	1034	1042	991	1025	1009
	MePhe	1018	1025	975	1009	993
HA	MeHty	1020	1027	977	1011	995
	MeTyr	1006	1013	963	997	981
	MePhe	990	998	947	981	965
BA	MeHty	992	999	949	983	967
	MeTyr	978	985	935	969	953
	MePhe	962	969	919	953	937
EA	MeHty	964	972	921	955	939
	MeTyr	950	958	907	942	925
	MePhe	934	942	891	925	909

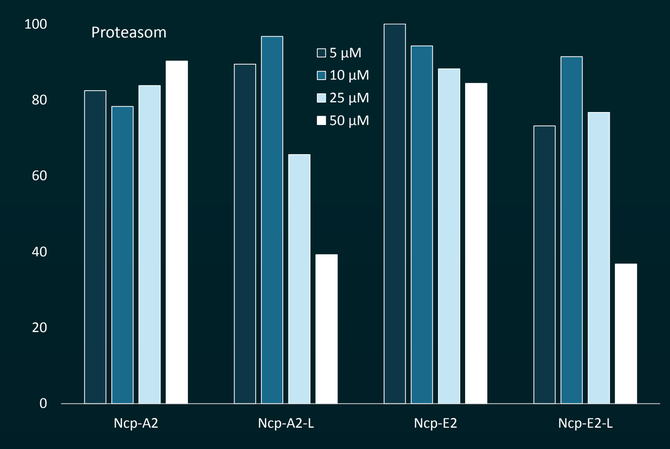


NOSTOCYKLOPEPTYDY

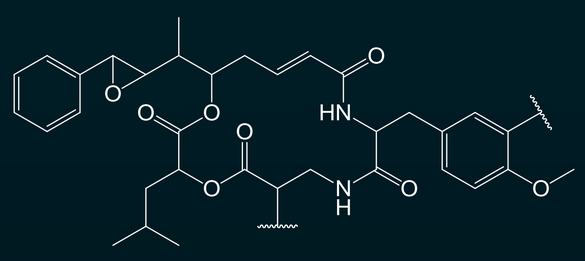


Nostocyklopeptydy (Ncps) są peptydami produkowanymi wyłącznie przez sinice z rodzaju Nostoc. Dotychczas tylko trzy analogi strukturalne, Ncp-A1, Ncp-A2 i Ncp-M1 zostały zidentyfikowane.
Liniowe nostocyklopeptydy (Ncp-E2L, Ncp-A2L) hamowały aktywność chymotrypsynopodobną proteasomu 20S w odróżnieniu od formy cyklicznej (Ncp-A2), która hamowała aktywność trypsynopodobną proteasomu 20S.

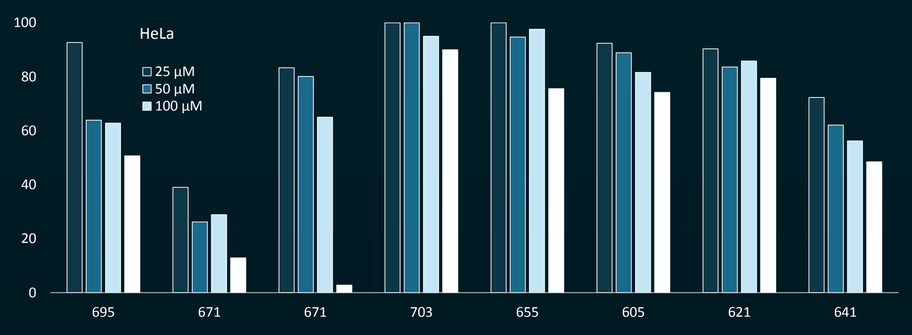
Ncp	E4	**A1**	**A2**	**E1**	**E2**	**E3**
Cykliczny		757	791	777	743	
Liniowy	677	775	809	795	761	743
Liniowy uwodniony		793	827	813	779	



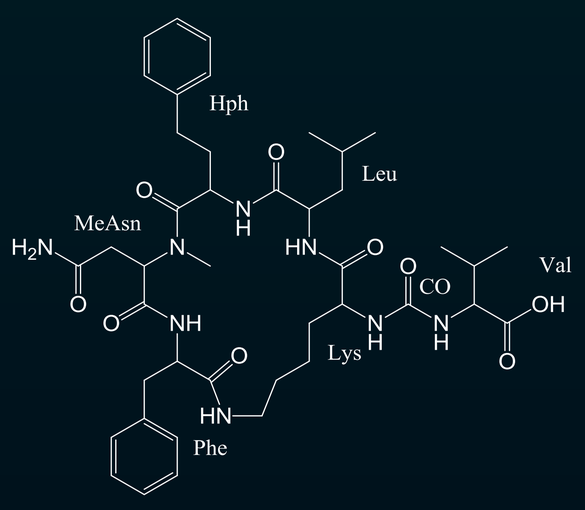
KRYPTOFICYNY



Kryptoficyny są silnymi związkami przeciwnowotworowymi. Cp-52 osiągnęła II stopień badań klinicznych, niestety została odrzucona przez jej skutki uboczne. Obecnie w badaniach klinicznych testowany jest koniugat Cp-przeciwciało.
Związki wyizolowane z *N. edaphicum* należą do nowych, nie opisanych wcześniej strukturalnych wariantów.
W testach *in vitro* wykazywały aktywność względem linii nowotworowej HeLa, przy braku aktywności względem innych linii.



ANABAENOPEPTYNY



Anabaenopeptyny (AP) są szeroko rozpowszechnioną i zróżnicowaną grupą związków produkowanych przez cyjanobakterie. AP należą do znanych inhibitorów proteaz i fosfataz.
Dotychczas opisano 155 strukturalnych wariantów anabaenopeptyn. Spośród nich – 38 jest produkowanych przez sinice z rodzaju Nostoc. *Nostoc edaphicum* CCNP1411 produkuje 4 analogi AP, z których 3 należą do wcześniej nie opisanych związków.

AP836	Val – CO – Lys – Leu – Hty – MeAsn – Phe
AP834	Leu – CO – Lys – Leu – Hph – MeAsn – Phe
AP820	Val – CO – Lys – Leu – Hph – MeAsn – Phe
AP806	Val – CO – Lys – Leu – Hph – Asn – Phe

Metabolity produkowane przez sinice to związki o unikalnej strukturze i aktywności biologicznej. Choć w odbiorze społecznym związki sinicowe są uznawane za toksyczne, to w rzeczywistości ich działanie może być istotne zarówno dla funkcjonowania środowiska, jak i człowieka.
Badania sekwencji całego genomu N. edaphicum wykazały istnienie 4 klastrów syntetazy peptydów nierybosomalnych, zawierające potencjalne geny kodujące enzymy biorące udział w syntezie 4 grup związków. Badania metabolitów produkowanych przez ten szczep prowadzone z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mass (MS/MS) potwierdziły istnienie 4 grup peptydów, charakteryzujących się ciekawą aktywnością: cyjanopeptoliny (aktywność względem komórek nowotworowych HeLa, inhibicja proteaz i aktywność względem SARS-CoV2), nostocyklopeptydy (inhibicja proteasomu 20S, zahamowanie Quorum Sensing), kryptoficyny (aktywność względem komórek nowotworowych HeLa), anabaenopeptyny (inhibicja proteaz).

Pangenom bakterii z rodzaju *Rhizobium*

Piotr Koper, Kamil Żebracki, Małgorzata Marczak, Magdalena Wójcik, Andrzej Mazur
Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-031 Lublin

Cel pracy

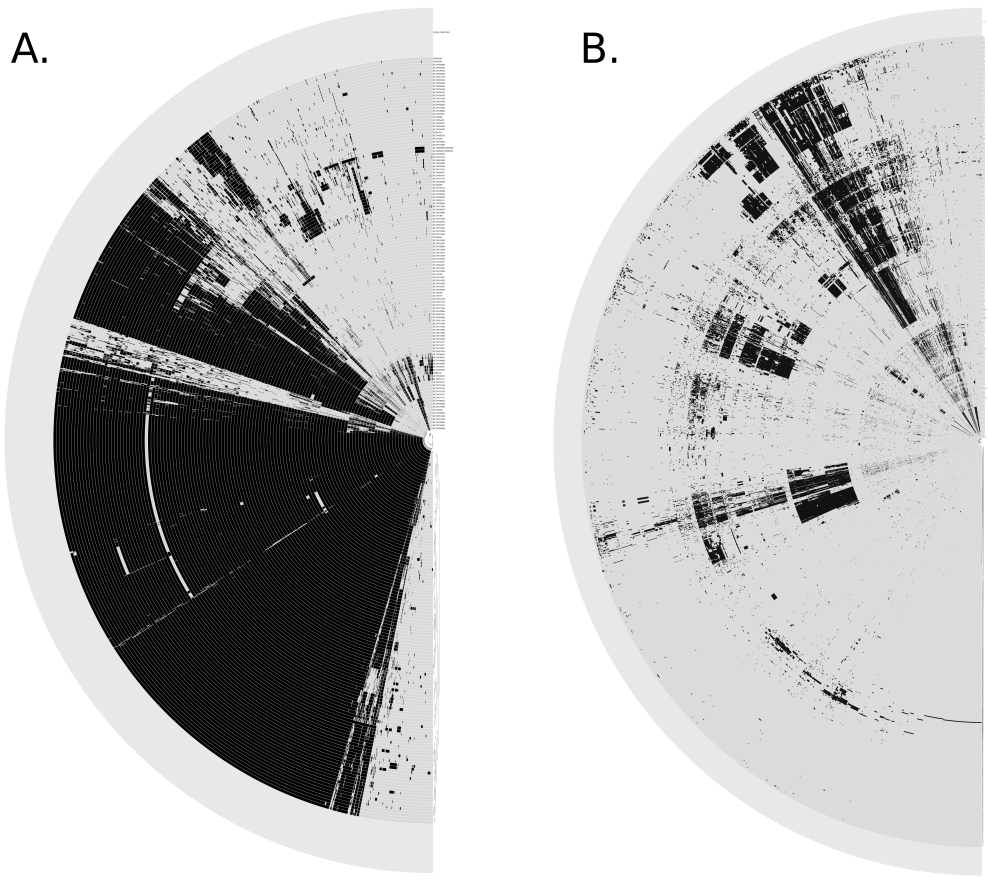
Celem pracy była analiza funkcjonalna **pangenomu** bakterii z rodzaju ***Rhizobium*** z uwzględnieniem unikalnej struktury genomów tej grupy bakterii.

Wstęp

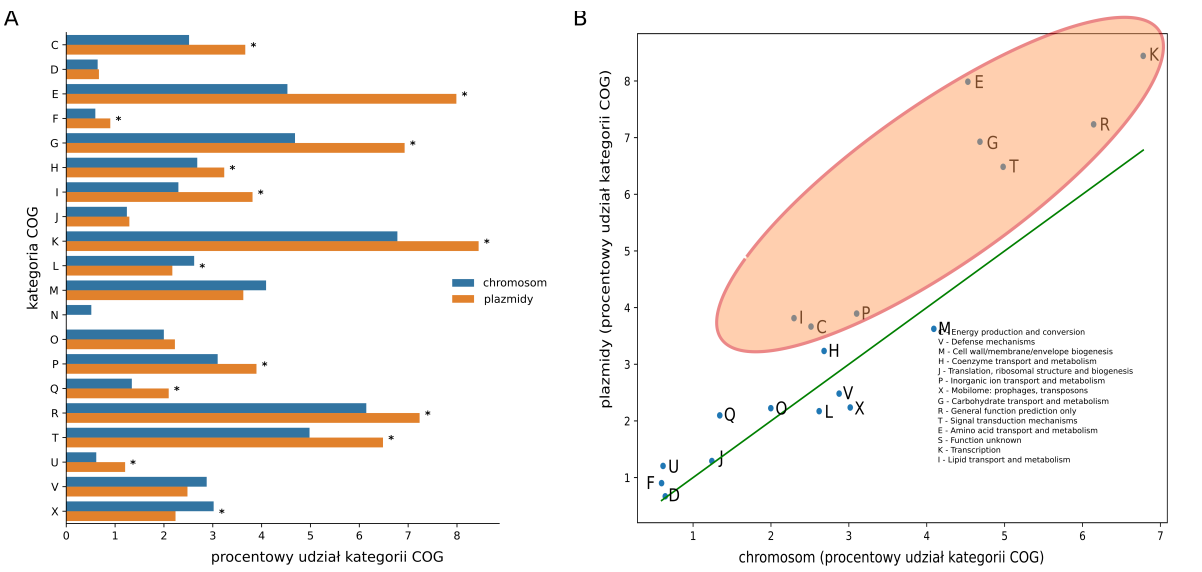
Rizobia stanowią unikalną grupę bakterii glebowych tworzących symbiozę z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*). Unikalna jest również **struktura ich genomów**, które są **wieloreplikonowe**, z dużymi plazmidami (nawet > **1 Mpz**). Struktura genomów rizobiów odzwierciedla ich wymagający tryb życia w złożonym **środowisku glebowym** - w stanie **ciągłej konkurencji i oligotrofii** oraz przechodzenia w stan endosymbiotyczny. Stale rosnąca ilość wysokiej jakości danych sekwencyjnych genomów rizobiów, pozwoliła na analizy dystrybucji funkcjonalnej informacji genetycznej w obrębie replikonów, w ujęciu pangenomowym.

Metody

Z publicznie dostępnych baz danych pobrano sekwencje **kompletnych genomów** bakterii z rodzaju ***Rhizobium,*** w których wyodrębniono poszczególne replikony. Z wykorzystaniem oprogramowania **anvi'o** (ang. *analysis and visualization platform for microbial 'omics*) zbudowano trzy zestawy danych pangenomowych: **pangenom** obejmujący **pełne genomy, pangenom chromosomalny i pangenom plazmidów** (Ryc. 1). Procedura określenia pangenomu obejmowała serię wzajemnych porównań sekwencji aminokwasowych poszczególnych CDS-ów każdego z genomów, następnie stworzenie klastrów sekwencji z wykorzystaniem algorytmu MCL i określenie odległości euklidesowych wektorów wystąpienia każdego z klastrów sekwencji w poszczególnych genomach.
W obrębie przygotowanych zbiorów danych **wyznaczono genom rdzeniowy i dodatkowy,** stosując kryterium częstości występowania genów w analizowanych replikonach odpowiednio **>95% i <=95%.** Wszystkie uzyskane klastry genów zaadnotowano **względem bazy COG** (ang. *Cluster of Orthologs*).



Rycina 1.
Wizualizacja pangenomu A. chromosomów i B. plazmidów pochodzących z analizowanych 121 pełnych genomów rodzaju *Rhizobium* przygotowana z użyciem narzędzia anvi'o. Poszczególne okręgi symbolizują analizowane replikony, natomiast promienie odpowiadają wyznaczonym klastrom genów. Czarny blok oznacza obecność reprezentanta danego klastra w przedstawianym genomie.



Procentowy udział poszczególnych kategorii COG w pangenomie dodatkowym chromosomów i plazmidów pochodzących z genomów rodzaju *Rhizobium*.
A. Wykres słupkowy obrazujący procentowy udział kategorii COG w analizowanych pangenomach. Porównania, których różnice były istotne statystycznie (p-value < 0,05) oznaczono gwiazdką.
B. Wykres kropkowy obrazujący relację pomiędzy procentowym udziałem poszczególnych kategorii COG w pangenomie dodatkowym chromosomów (oś x) i plazmidów (oś y). Czerwoną elipsą zaznaczono kategorie COG, których procentowy udział w pangenomie plazmidów jest znacząco wyższy.

Wyniki

Pangenom rodzaju **Rhizobium** obejmuje **58036** klastrów genowych. W przypadku **chromosomów** było to **33020** a dla **replikonów pozachromosomalnych - 32276**.
Dane literaturowe wskazują, że w przypadku genomów wieloreplikonowych obserwuje się **zróżnicowanie funkcjonalne pomiędzy poszczególnymi kategoriami replikonów**, które nie polega jedynie na wzbogaceniu replikonów pozachromosomalnych **we frakcję pangenomu dodatkowego**. Aby potwierdzić taką zależność w pangenomie ***Rhizobium*** porównano pod względem funkcjonalnym frakcję pangenomu dodatkowego pomiędzy chromosomem i plazmidami.
Z zastosowaniem testu Fischer'a dla wariancji w dużej próbie potwierdzono istotne różnice w procentowym **udziale poszczególnych kategorii COG** pomiędzy pangenomem dodatkowym **plazmidów i chromosomów** (Ryc. 2). W genomie plazmidowym znacząco częściej występowały **geny zaangażowane w transport i metabolizm aminokwasów i cukrów (G, E)**, jak również kodujące białka odpowiedzialne za **przepływ informacji w komórce (T) i regulację ekspresji innych genów (K)**. Z kolei w chromosomach częściej ulokowane były geny odpowiedzialne za replikację i rekombinację DNA,

Wnioski

1. Większa częstość występowania w genomie plazmidowym *Rhizobium* genów, których kategorie COG wiąże się z adaptacją środowiskową potwierdzają hipotezę, zgodnie z którą duże replikony pozachromosomalne odrywają istotną rolę w przystosowaniu do zajmowanej niszy ekologicznej i jest to podstawowy element ewolucyjny kształtujący ich profil funkcjonalny.
2. Wzbogacenie plazmidów we frakcję genów związanych z regulacją transkrypcji, pozwala przypuszczać, że w podzielonych genomach istnieje zwiększone zapotrzebowanie na procesy regulacji ekspresji informacji genetycznej, która wskutek dystrybucji na kilka replikonów jest w przypadku plazmidów, w mniejszym stopniu zintegrowana z całością genomu.

Badania realizowane w ramach Statutowego Projektu Badawczego nr 1.22 (2018-2021)

VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK” Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

OCENA WPŁYWU INOKULACJI PSZENICY OZIMEJ WYBRANYMI SZCZEPAMI BAKTERII SOLUBILIZUJĄCYMI FOSFORANY

Monika Kozieł, Stefan Martyniuk

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786950, e-mail: mmaczka@iung.pulawy.pl

WPROWADZENIE:

Mikroorganizmy PSM przyczyniają się do zwiększania plonów wielu roślin, poprzez hydrolizę nieprzyswajalnych form fosforu obecnych w glebie w formy dostępne, które mogą być wykorzystane przez rośliny. Liczne badania potwierdzają, że zastosowanie PSB jako bionawozów poprawia wzrost, plon i jakość takich roślin uprawnych jak: orzech włoski, kukurydza, soja, burak cukrowy, ciecierzyca, orzeszki ziemne, ryż, pomidor, pszenica.

CEL PRACY

Celem badań było sprawdzenie oddziaływania wybranych szczepów PSB na kiełkowanie nasion pszenicy ozimej, a także ocena wpływu hodowli bakteryjnych na wzrost roślin w wazonach z piaskiem wzbogaconym pożywką mineralną zawierającą nierozpuszczalny $Ca_3(PO_4)_2$.

MATERIAŁY I METODY

W badaniach wykorzystano 27 szczepów bakterii solubilizujących fosforany pochodzących z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB w Puławach. Szczepy wyizolowano z prób glebowych pochodzących z krajowego monitoringu chemizmu gleb i przechowywano na skosach agarowych w temperaturze 4 °C.

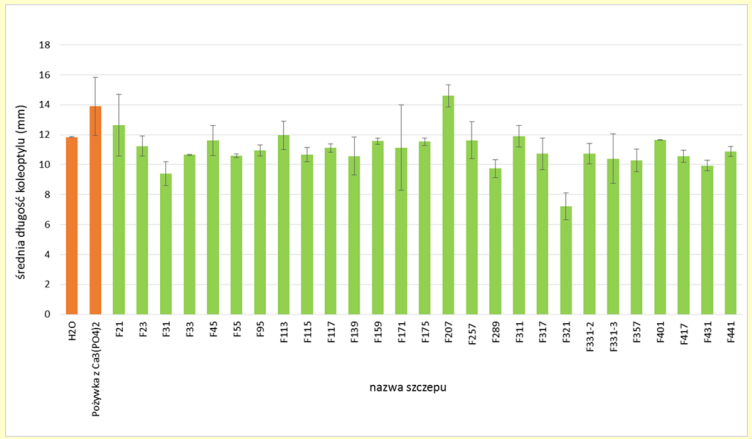
Wpływ szczepów PSB na wzrost siewek pszenicy

Szczepy bakteryjne hodowano na płynnej pożywce Pikovskaya w temperaturze 28°C. Po 72h hodowli otrzymane zawiesiny każdego szczepu bakterii wykorzystano do inokulacji nasion pszenicy (odmiana Memory). Nasiona wykładano na sterylną bibułę filtracyjną umieszczoną w szalkach Petriego (po 25 nasion na płytkę), a następnie inokulowano 3 ml przygotowanych poszczególnych hodowli bakteryjnych rozcieńczonych w stosunku 1:10. Dla każdego szczepu wykonano 3 powtórzenia. Próbkę kontrolną stanowiły nasiona inokulowane wodą destylowaną oraz płynną, rozcieńczoną (1:10) pożywką zawierającą $Ca_3(PO_4)_2$. Płytki inkubowano w temperaturze 23°C przez 72 godzin, po czym dokonano pomiaru długości koleoptyli i korzonków.

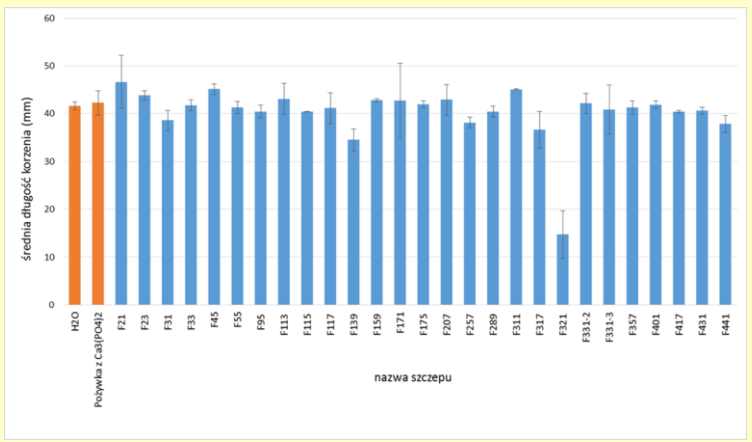
Wpływ inokulacji szczepami PSB na wzrostu pszenicy w doświadczeniu wazonowym

W warunkach doświadczenia wazonowego analizowano wpływ 27 szczepów bakterii solubilizujących fosforany na wzrost pszenicy ozimej (odmiana Memory). W badaniach jako podłoże wykorzystano sterylny piach wymieszany z nierozpuszczalnym fosforanem wapnia ($Ca_3(PO_4)_2$) w stosunku 200:1 (g/g). W wazonach o pojemności 500 cm^3 wysiano po 10 sztuk nasion pszenicy, które następnie zaszczepiono 1ml odpowiedniej hodowli bakteryjnej. Kontrolę stanowiły rośliny inokulowane H_2O destylowaną oraz płyną pożywką z dodatkiem $Ca_3(PO_4)_2$. Doświadczenie prowadzono w pokoju fitotronowym, w temperaturze 22°C, z zastosowaniem sztucznego oświetlenia przy 12-godzinnym fotoperiodzie. Wazony podlewano wodą destylowaną tak, aby piach był stale wilgotny. Doświadczenie założono w 3 powtórzeniach (3 x 10 nasion/1 ml hodowli bakteryjnej). Po 4 tygodniach oceniono świeżą i suchą masę części nadziemnych i korzeni roślin w stosunku do kontroli.

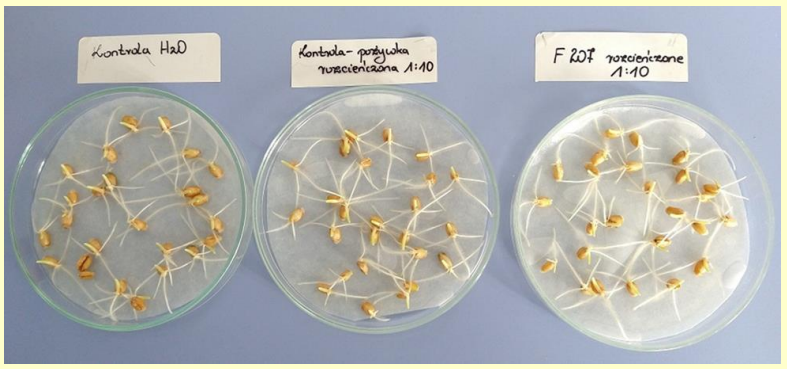
WYNIKI



Wykres 1. Wpływ hodowli bakterii PSB na długość koleoptylu (mm)

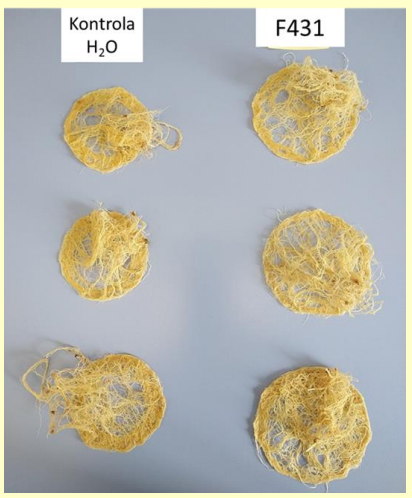


Wykres 2. Wpływ hodowli bakterii PSB na długość korzenia (mm)



Zdjęcie 1. Wpływ inokulacji szczepem **F207 (*Pseudomonas azotoformans*)** na długość koleoptyli i korzeni siewek pszenicy ozimej

- Większość badanych gatunków bakterii korzystnie oddziaływała na kiełkowanie nasion pszenicy i wzrost siewek. Wyjątkiem był gatunek *Pseudonana syringae*, który wyraźnie hamował wzrost siewek rośliny testowej.
- Spośród analizowanych szczepów bakterii solubilizujących fosforany najkorzystniejszy wpływ **na stymulację wzrostu koleoptylu** siewek pszenicy zaobserwowano w przypadku rozcieńczonej hodowli szczepu **F207 (*Pseudomonas azotoformans*)**.
- Stymulujący wpływ inokulacji rozcieńczonymi hodowlami szczepów: **F21 (*Phyllobacterium trifolii*), F23 (*Phyllobacterium ifriqiyense*), F45 (*Inquilinus ginsengisoli*), F113 (*Collimonas arenae*), F159 (*Paraburkholderia ginsengisoli*), F171 (*Pseudonana arsenicoxydans*), F207 (*Pseudomonas azotoformans*) oraz F311 (*Phyllobacterium myrsinacearum*)** zaobserwowano **na wzrost korzeni**.



Zdjęcie 2. Korzenie pszenicy ozimej (odmiana Memory) bez inokulacji (kontrola H_2O) i korzenie pszenicy szczepionej izolatem **F431 (*Pseudomonas helmanticensis*)**

- W przeprowadzonym doświadczeniu wazonowym analizowano wpływ badanych szczepów na świeżą i suchą masę części nadziemnych i korzeni pszenicy ozimej.
- Zaszczepienie nasion pszenicy bakteriami solubilizującymi fosforany na ogół nie miało istotnego wpływu na plonowanie i wzrost korzeni tej rośliny.
- **Największą średnią masę części nadziemnych** uzyskano dla szczepów **F55 (*Sphingomonas panacis*), F207 (*Pseudomonas azotoformans*) oraz F417 (*Paraburkholderia fungorum*)**, natomiast **najwyższą wartość średniej masy korzeni** uzyskano w przypadku szczepu **F21 (*Phyllobacterium trifolii*) i F431 (*Pseudomonas helmanticensis*)**.
- W przypadku **średniej suchej masy części nadziemnych najwyższy** wynik zanotowano dla szczepów **F21 (*Phyllobacterium trifolii*), F55 (*Sphingomonas panacis*), F159 (*Paraburkholderia ginsengisoli*), F171 (*Pseudonana arsenicoxydans*) i F175 (*Paraburkholderia caledonica*)**. **Największa średnia wartość suchej masy korzeni** pszenicy charakteryzowała rośliny zaszczepione szczepami **F257 (*Bacillus ginsengihumi*), F331-2 (*Paraburkholderia caledonica*) i F431 (*Pseudomonas helmanticensis*)**.

VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

Występowanie bakterii z rodzaju *Azotobacter* w różnych typach i grupach granulometrycznych gleb w Polsce

Monika Kozieł, Stefan Martyniuk

**Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy,
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland,
email: mmaczka@iung.pulawy.pl**

WSTĘP

Skład granulometryczny gleb mineralnych ma duży wpływ na ich właściwości fizyczne i chemiczne. Gleby zawierające więcej frakcji pylasto-ilastych, np. części spławialnych, są zwykle żyźniejsze, mają korzystniejszą strukturę gruzełkową i większą pojemność wodno-sorpcyjną, są bogatsze w substancje humusowe i mają korzystniejszy odczyn (wyższe pH), niż gleby ubogie w te frakcje, np. lekkie gleby piaszczyste. Wymienione czynniki wpływają również korzystnie na życie biologiczne gleb, w tym na mikroorganizmy, także z rodzaju *Azotobacter*, bowiem w glebach gliniastych o większej zawartości części spławialnych znajdowano znacznie częściej i liczebniejsze populacje tych bakterii, niż w mniej żyznych glebach piaszczystych.

MATERIAŁY I METODY

W przeprowadzonych badaniach korzystano z kolekcji gleb (**1140 prób glebowych**) Zakładu Gleboznawstwa Erozji i Ochrony Gruntów IUNG-PIB w Puławach. Pracownicy wymienionego zakładu przeprowadzili też klasyfikację gleboznawczą badanych gleb.

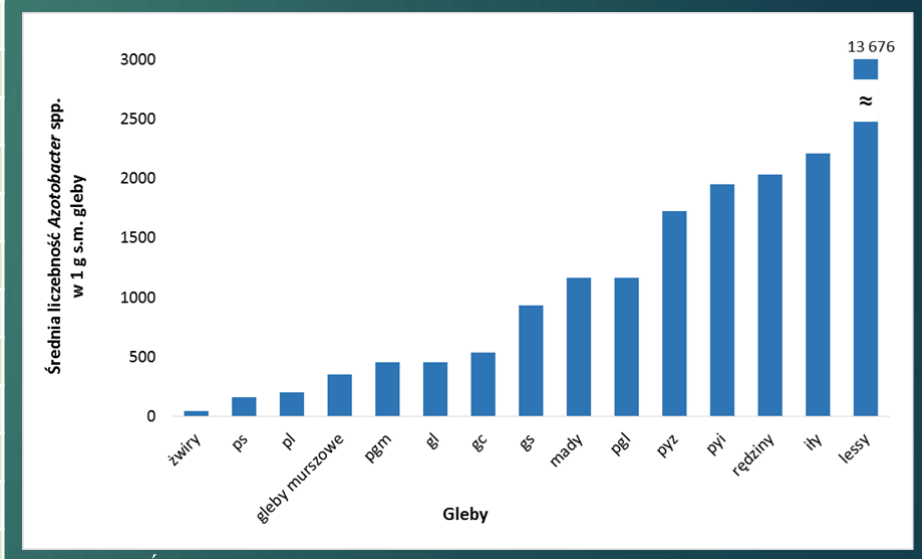
Ogólną liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter* w próbach glebowych oznaczono metodą płytkową serii rozcieńczeń, wysiewając odpowiednio rozcieńczone zawiesiny badanych gleb na płytki z pożywką Jensena. Po 5 dniach inkubacji płytek w 28°C oznaczono liczebność (jtk) komórek bakterii. Liczebność komórek bakterii przeliczono na 1 gram powietrznie suchej masy gleb.

WYNIKI

Tabela 2. Występowanie i liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter* w różnych typach i grupach granulometrycznych badanych gleb w Polsce (n = 1140)

Typ lub grupa granulometryczna (gatunek gleby)	Liczba badanych gleb (n)	Liczba gleb z (+) lub bez (-) Azotobacter spp.	pH w H_2O	Zakres liczebności jtk Azotobacter spp. w 1 g s.m. gleby (średnie)
Gleby murszowe (M)	26	10 + (38%) 16 -	5,7 – 6,9 4,8 – 5,4	3 – 1740 (351)
Rędziny (R)	18	16 + (89%) 2 -	6,8 – 7,3 5,7	5 – 11000 (2035)
Mady (F)	22	15 + (68%) 7 –	5,8 – 6,9 5,4 – 6,6	3 – 8500 (1162)
Lessy (L)	41	24 + (60%) 17 –	5,9 – 7,4 4,0 – 6,8	5 – 297750 (13676)
Żwiry (ż)	13	4 + (30%) 9 –	5,5 – 5,8 4,1 - 4 ,2	8 – 65 (44)
Piaski luźne (pl)	39	3 + (8%) 36 –	4,9 – 6,9 4,3 – 6,5	5 – 625 (204)
Piski słabogliniaste (ps)	146	28 + (19%) 118 –	5,2 – 7,7 4,0 – 7,2	3 – 775 (158)
Piaski gliniaste lekkie (pgl)	271	88 + (32%) 183 –	4,8 – 7,7 3,2 - 7,0	3 – 40000 (1165)
Piaski gliniaste mocne (pgm)	194	92 + (47%) 102 –	5,2 – 7,8 4,5 – 6.9	3 – 2017 (451)
Gliny lekkie (gl)	169	99 + (59%) 70 –	5,1 – 7,4 3,7 – 6,6	3 – 12500 (456)
Gliny średnie (gs)	49	31 + (63%) 18 –	5,3 – 6,9 4,4 – 5,9	3 – 12925 (930)
Gliny ciężkie (gc)	14	11 + (79%) 3 –	5,3 – 6,9 5,3 – 5,4	8 – 1968 (536)
Pyły zwykłe (pyz)	96	47 + (49%) 49 –	5,1 – 7,5 4,3 – 6,6	3 – 45800 (1725)
Pyły ilaste (pyi)	23	15 + (65%) 8 –	5,8 – 6,8 4,7 – 5,2	3 – 19950 (1950)
Iły (i)	19	10 + (53%) 9 –	5,8 – 6,8 4,7 – 5,2	3 – 4980 (2213)

Gleby pod względem właściwości fizycznych scharakteryzowane zostały głównie w oparciu o ich uziarnienie (skład granulometryczny) wg normy BN-78/9180-11, co pozwoliło na wyodrębnienie **12 grup granulometrycznych** (gatunków gleb), od bardzo lekkich piasków luźnych (pl) do glin ciężkich (gc) i iłów (i). Badaniami objęto również gleby zaliczone do **4 typów** tj. gleby murszowe (M), mady (F), rędziny (R) i lessy (L)



Wykres 1. Średnia liczebność jtk bakterii *Azotobacter* spp. w badanych typach i grupach granulometrycznych gleb

- Bakterie z rodzaju *Azotobacter* występują we wszystkich badanych grupach gleb (rodzaje, gatunki), ale w obrębie tych grup procent gleb zasiedlonych przez azotobactera jest bardzo zróżnicowany i waha się od 8% i 19% w przypadku piasków luźnych i piasków słabogliniastych do około 80% i 90% w przypadku glin ciężkich i rędzin.
- Liczebność *Azotobacter* spp. w glebach zasiedlonych przez te bakterie jest bardzo zróżnicowana w obrębie każdej analizowanej grupy gleb i waha się od kilku komórek (jtk) do kilkuset tysięcy jtk w 1 gramie gleby. Największą liczebność stwierdzono w niektórych glebach lessowych, pyłach zwykłych i piaskach gliniastych lekkich, odpowiednio 297 750, 45 800 i 40 000 jtk/g.
- Największą średnią liczebnością *Azotobacter* spp. charakteryzują się lessy, iły, rędziny i pyły ilaste, odpowiednio 13 676, 2213, 2035 i 1950 jtk/g, a najmniejszą żwiry, piaski słabogliniaste i piaski luźne, odpowiednio 44, 158 i 204 jtk/g.

Badania realizowane w ramach Statutowego Projektu Badawczego nr 1.22 (2018-2021)

VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK” Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

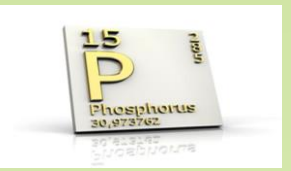
Zróżnicowanie zdolności szczepów bakterii solubilizujących fosforany do rozpuszczania fosforanu wapnia

Monika Kozieł, Stefan Martyniuk

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, tel. (0-81) 4786950, e-mail: mmaczka@iung.pulawy.pl

Wstęp

Mikroorganizmy biorą udział w transformacjach nieorganicznych i organicznych związków fosforu (P) w glebie. Do podstawowych mechanizmów mikrobiologicznego uruchamiania P należą: uwalnianie kationów wodorowych (H+), produkcja kwasów organicznych oraz biosynteza fosfataz.



Cel badań

Celem badań było określenie wydajności solubilizacji $Ca_3(PO_4)_2$ przez 27 szczepów bakteryjnych wyizolowanych z gleb pochodzących z różnych rejonów Polski. W badaniach zastosowano metodę płytkową pozwalającą na obserwowanie stref przejaśnienia powstających wokół kolonii formowanych na pożywce zawierającej nierozpuszczalny $Ca_3(PO_4)_2$ jako jedyne źródło P.
Oceniono również efektywność rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$ dla tych samych szczepów bakterii solubilizujących fosforany namnożonych w pożywce płynnej metodą kolorymetryczną (metoda molibdenianowa). Zasada spektrofotometryczna oznaczania fosforanów polega na tworzeniu w roztworze kwaśnym kwasu fosforomolibdenowego $H_7(P)MoO_2(O_4)_6$ o żółtym zabarwieniu, który ulega redukcji pod wpływem chlorku cyny (II), tworząc związek kompleksowy błękit molibdenowy o intensywnym niebieskim zabarwieniu. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do zawartości fosforanów.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano 27 szczepów bakterii solubilizujących fosforany pochodzących z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB w Puławach. Szczepy wyizolowano z prób glebowych pochodzących z krajowego monitoringu chemizmu gleb i przechowywano na skosach agarowych w temperaturze 4°C.

Zdolność wyizolowanych szczepów PSB do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego sprawdzano w trzech powtórzeniach na podłożu Pikovskaya [Pikovskaya, 1948]. Na pożywce wykonywano posiew punktowy bakterii za pomocą sterylnej ezy. Po 14 dniach inkubacji w temp. 28°C mierzono średnicę kolonii bakterii oraz stref przejaśnień, które powstały w wyniku uwolnienia fosforu z jego nierozpuszczalnej soli $Ca_3(PO_4)_2$. Zdolność badanych bakterii do solubilizacji fosforanu wyrażono jako wskaźnik solubilizacji (SI), który oszacowano na podstawie stosunku średnicy halo (HD) do średnicy kolonii (CD).

$$SI = \frac{\text{średnica kolonii+średnica strefy halo}}{\text{średnica kolonii}}$$

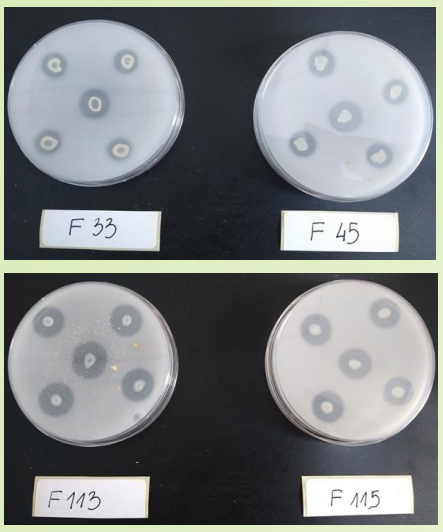
Ocenę efektywności rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$ prowadzono na płynnej pożywce Pikovskaya [Pikovskaya, 1984]. Kolbki z 25 ml pożywki zaszczepionej czystymi kulturami bakterii solubilizującymi fosforany umieszczano na wytrząsarce w temperaturze 28°C na okres 72h. Po upływie 24h, 48h, 72h hodowle bakteryjne odwirowano przy 13000 rpm przez 20 minut, a w supernatancie oznaczano zawartość jonów fosforanowych kolorymetryczną metodą, wykorzystującą tworzenie błękitu fosforomolibdenowego [Lityński i in., 1976]. Do kolb miarowych o pojemności 50 ml dodano po 10 ml badanego supernatantu, a następnie po 1 ml roztworu molibdenianu sodu i 0,25 ml roztworu chlorku cyny. Zawartość kolb dopełniono do kreski wodą destylowaną i dokładnie wymieszano. Po upływie 10-12 minut dokonano pomiaru absorbancji przy długości fali λ = 690 nm. Oznaczenie wykonano w 3 powtórzeniach dla każdego szczepu.

Wyniki

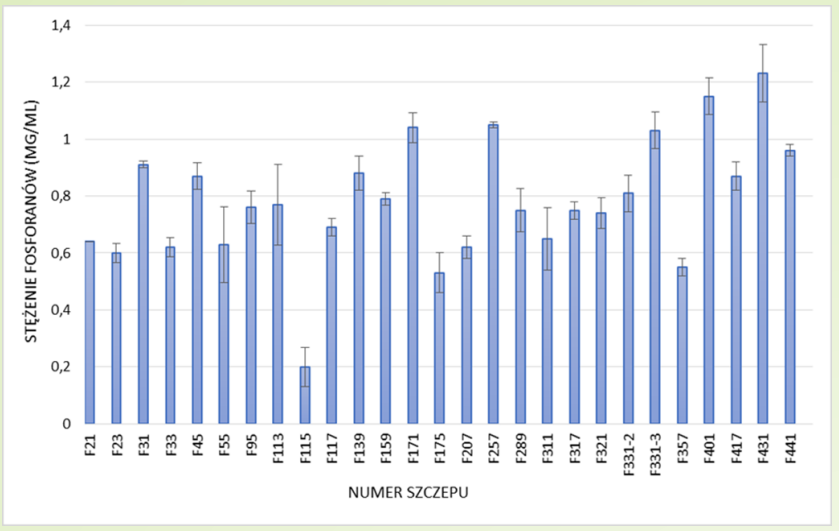
Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie izolaty tworzyły przejaśnienia na pożywce Pikovskaya, co świadczy o zdolności tych bakterii do rozpuszczania fosforanów i uwalniania fosforu z jego nierozpuszczalnej soli. Zgodnie z klasyfikacją Berraquero i in. [1976] pięć izolatów zostało sklasyfikowanych jako szczepy o średnim stopniu ($2 < SI \leq 4$) solubilizacji, natomiast pozostałe dwadzieścia dwa zostało zaklasyfikowanych jako solubilizatory o niskim stopniu ($SI < 2$) rozpuszczalności fosforanu. Największe strefy przejaśnień (SI = 2,33 mm) obserwowano u szczepu **F171** należącego do gatunku ***Pseudomonas arsenicoxydans***.

Tabela 1. Indeks solubilizacji fosforanów wyliczony dla badanych szczepów

Numer szczepu	SI
F21	1,25 ± 0
F23	1,44 ± 0,10
F31	1,80 ± 0,02
F33	1,50 ± 0,07
F45	1,73 ± 0,11
F55	1,13 ± 0,02
F95	1,25 ± 0,13
F113	2,0 ± 0
F115	1,89 ± 0,10
F117	2,27 ± 0,12
F139	2,17 ± 0,14
F159	1,22 ± 0,18
F171	2,33 ± 0,14
F175	2,08 ± 0,14
F207	1,34 ± 0,08
F257	1,36 ± 0,13
F289	1,74 ± 0,15
F311	1,56 ± 0,14
F317	1,44 ± 0,14
F321	1,35 ± 0,07
F331-2	1,73 ± 0,12
F331-3	1,31 ± 0,10
F357	1,2 ± 0
F401	1,84 ± 0,02
F417	1,15 ± 0,06
F431	1,49 ± 0,27
F441	1,27 ± 0,14



Zdjęcie 1. Strefy przejaśnień wokół kolonii szczepów PSB



Wykres 1. Efektywność rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$ przez wyodrębnione szczepy PSB po 72h inkubacji w 28°C

Rozpuszczanie fosforanu trójwapniowego badano w pożywce płynnej, oznaczając stężenie jonów PO_4^{3-} metodą spektrofotometryczną po 24h, 48h i 72h inkubacji w 28°C. Sprawdzono efektywność rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$ dla 27 szczepów PSB. Wszystkie szczepy w pożywce płynnej wykazywały zdolność do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego. Wśród rodzajów, które charakteryzowały się najwyższą zdolnością do rozpuszczania $Ca_3(PO_4)_2$ znalazły się ***Pseudomonas*** (F171, 431), ***Phyllobacterium*** (F331-3), ***Inquilinus*** (F401), ***Bacillus*** (F257). Najniższą zdolność do rozpuszczania fosforanu trójwapniowego wykazał szczep F115 należący do rodzaju ***Inquilinus***.

Podsumowanie

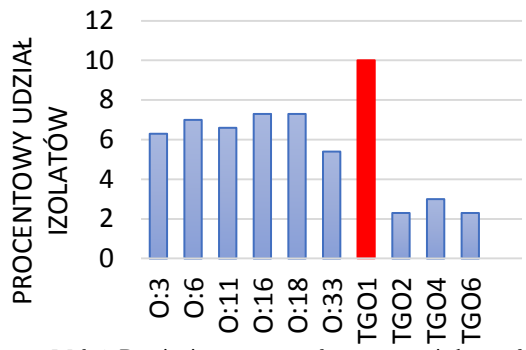
Badane gatunki bakterii różniły się znacznie pod względem intensywności rozpuszczania trójfosforanu wapnia w podłożu płynnym, a najefektywniejszymi pod tym względem były gatunki: *Pseudomonas arsenicoxydans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas helmanticensis*, *Inquilinus ginsengisoli* i *Paraburkholderia caledonica*.

RÓŻNORODNOŚĆ GATUNKÓW GENOMOWYCH I PROFIL PATOGENNOŚCI *AEROMONAS* SP. SEROGRUPY PGO1 IZOLOWANYCH Z TKANEK RYB HODOWLANYCH

VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

Maria Kurzylewska[1], Katarzyna Dworaczek[1], Anna Turska-Szewczuk[1]
[1]Uniwesrytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytutu Nauk Biologicznych, Katedra Genetyki i Mikrobiologii

Wstęp Bakterie z rodzaju *Aeromonas* to Gram-ujemne pałeczki będące główną przyczyną śnięcia ryb w gospodarstwach rybackich. Ich głównym czynnikiem wirulencji jest lipopolisacharyd, składający się z lipidu A, rdzenia i O-antygenu. Ze względu na unikalną budowę, nawet w obrębie szczepów, łańcuch O-swoisty pełni rolę antygenu powierzchniowego i determinuje swoistość serologiczną bakterii. Znane są dwa systemy klasyfikowania pałeczek *Aeromonas*, utworzone w oparciu o specyficzne determinanty antygenu somatycznego.W systemie identyfikacji serologicznej *Aeromonas* wyróżniamy: (a) 44 ustalone grupy serologiczne (schemat NIH Sakazaki i Shimada, 1984); (b) ~53 tymczasowych grup serologicznych (Ameryka, Azja, Thomas 1990); (c) nieokreśloną ilość grup tymczasowych TG (ang. PG -provisional group) charakterystycznych dla obszarów geograficznych (np. w Polsce PGO1-PGO20, Kozińska 2009, PIW-PIB).



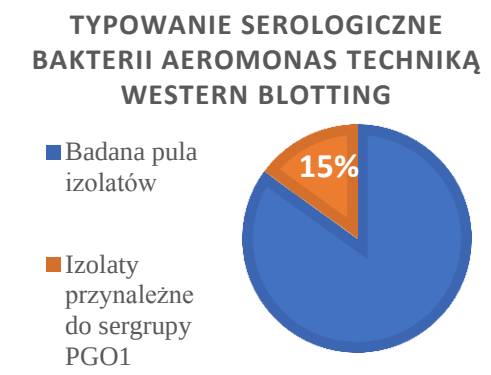
Wyk.1. Dominujące grupy serologiczne pomiędzy izolatami uzyskanymi od karpia i pstrąga (Kozińska 2009)

Celem badań było określenie występowania gatunków genomowych oraz charakterystyka profilu patogenności szczepów *Aeromonas* sp., serogrupy PGO1, dominującej wśród mezofilnych aeromonadów, izolowanych od ryb hodowlanych w Polsce

Materiały i metody Badaniami objęto 34 izolaty *Aeromonas* sp. Typowanie serologiczne przeprowadzono metodą aglutynacji i potwierdzono techniką Western blotting. Identyfikację gatunkową oparto na analizie sekwencji i polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP). Profil patogenności izolatów, obejmujący zdolność do syntezy toksyn i enzymów, określono na podstawie analizy fenotypu i genotypu.

Badania serologiczne

Na podstawie typowania serologicznego z wykorzystaniem testów aglutynacji z inaktywowanymi termicznie izolatami oraz surowicą, określono przynależność do 15% (6 izolatów) do serogrupy PGO1, co potwierdzono wykorzystując Western blotting.

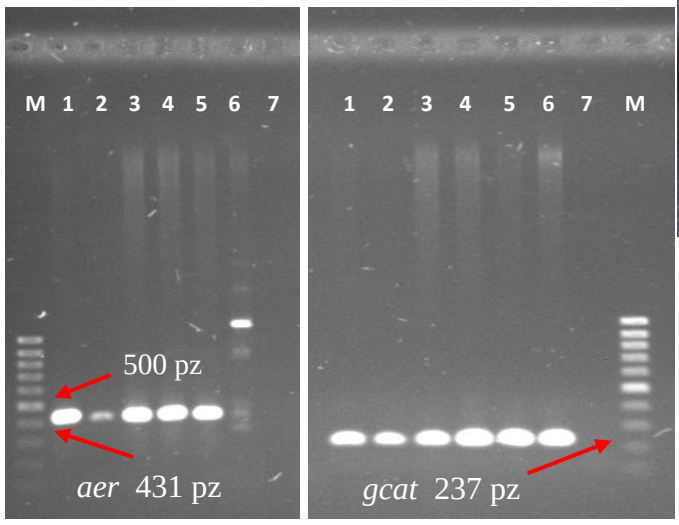


Wyniki

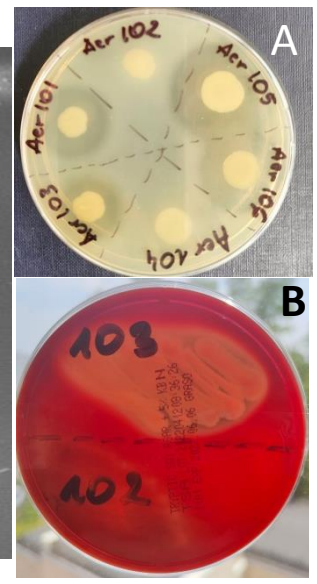
Identyfikacja gatunkowa

Identyfikacja gatunkowa			
No	Szczep	Analiza sekwencji 16S	Analiza polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP)
1	Aer101	*A. veronii* bv. *sobria*	*A. veronii* bv. *sobria*
2	Aer102	*A. veronii* bv. *sobria*	*A. veronii* bv. *sobria*
3	Aer103	*A. enecheleia*	*A. salmonicida/ A. bestiarum*
4	Aer104	*A. veronii* bv. *sobria*	*A. veronii* bv. *sobria*
5	Aer105	*A. hydrophila*	*A. hydrophila*
6	Aer106	*A. veronii* bv. *sobria*	*A. veronii* bv. *sobria*

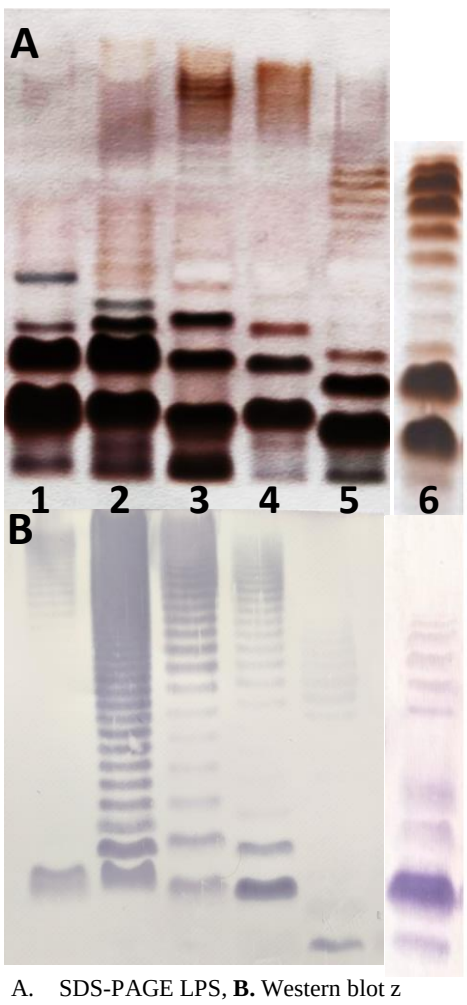
Profil patogenności izolatów



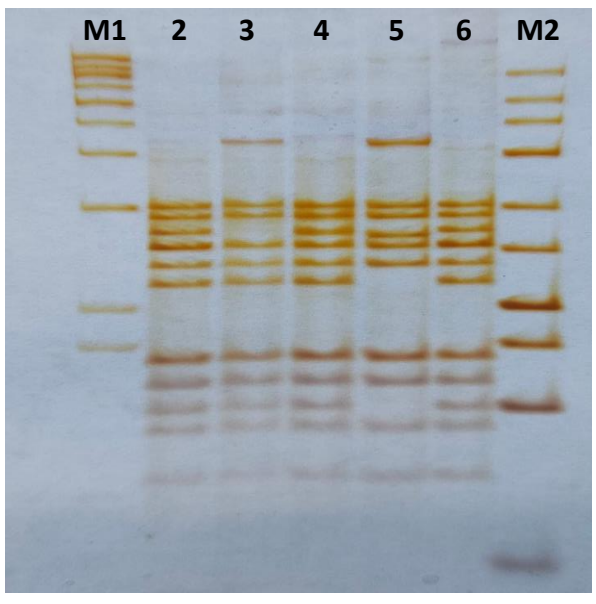
Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR
M – Marker,1. Aer101, 2. Aer102, 3. Aer106, 4. Aer103, 5. Aer104, 6. Aer105, 7. K-kontrola negatywna.



A. Aktywność proteolityczna izolatów na podłożu stałym z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka.
B. Aktywność hemolityczna bakterii oznaczona na agarze TSB z 5% krwią baranią.



A. SDS-PAGE LPS, **B.** Western blot z referencyjną surowicą odpornościową PGO1. Studzienka 1. Aer103, 2. Aer102, 3. , 4. Aer105 , 5. Aer104, 6. Aer101



Analiza polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP)

Szczep	Aktywność hemolityczna	Aktywność proteolityczna		Profil genetyczny					
		K	Ż	*aer*	*ast*	*gcat*	*act*	*ser*	*alt*
Aer101	*α*	+	++	+	-	+	+	+	-
Aer102	*β*	+	+	+	-	+	+	+	+
Aer103	*α*	+	++	+	-	+	+	+	+/-
Aer104	*β*	+	+	+	-	+	+	+	+
Aer105	*β*	+	++	+/-	-	+	+/-	+	-
Aer106	*β*	+	++	+	-	+	+	-	+

K – aktywność kazeinolityczna, Ż – aktywność żelatynolityczna, gen: *aer* –aerolizyny, *ast* – ciepłostabilnej cytotonicznie enterotoksyny, *gcat* – acetylotransferazy glicerofosfolipid: cholesterol, *act* – cytotoksycznej enterotoksyny, *ser* – proteazy serynowej, *alt* - ciepłolabilnej cytotonicznie enterotoksyny.

Wnioski

- Izolaty, na których przeprowadzono badania należą do serogrupy PGO1, co potwierdzono metodą aglutynacji i Western blotting.
- Analiza sekwencji genu 16S rRNA wykazała, że badane szczepy reprezentują gatunki genomowe *A. veronii* bv. *sobria*, *A. encheleia* i *A. hydrophila*. Natomiast analiza polimorfizmu genu 16S rRNA (PCR-RFLP) potwierdziła identyfikację gatunkową izolatów, z wyjątkiem szczepu Aer103, który określono jako należący do *A. salmonicida* lub *A. bestiarum*. Niezgodność w identyfikacji sugeruje konieczność zastosowania innej metody (MLST – multi-lucus sequence typing) do potwierdzenia przynależność gatunkowej szczepu.
- W obrębie serogrupy PGO1 zidentyfikowano różne gatunki genomowe *Aeromonas* sp. charakteryzujące się odmiennymi profilami patogenności.
- Badane bakterie wytwarzają enzymy i toksyny bakteryjne co wiąże się z ich wirulencją.
- Typ hemolizy nie jest powiązany z serogrupą.
- Szczepy *Aeromonas* wykazują aktywność proteolityczną (żelatynolityczną i kazeinolityczną), co zostało potwierdzone fenotypowo i genotypowo.
- Zdolność do produkcji enzymów rozkładających białka nie jest powiązana z gatunkiem bakterii.

Literatura
1. Kozińska A. Genotypowa i serologiczna analiza krajowych izolatów mezofilnych *Aeromonas* sp. w aspekcie chorobotwórczości i rodzaju objawów chorobowych wywołanych przez ryby, 2009, PIWet-PIB, Puławy.
2. Nawaza et al. Detection and characterization of virulence gene and integrons in *Aeromonas veronii* izolated form catfish, *Food* Microbiology, 27,237-331.

Ograniczanie nawożenia azotowego zmienia sieci mikrobiomu w niszy rolniczej pod uprawą kukurydzy

Agnieszka Kuźniar[1], Anna Kruczyńska[1], Sara Jurczyk[3], Artur Banach[1], Jacek Podlewski[2], Andrzej Słomczewski[2], Agnieszka Wolińska[1]

[1]Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin
[2]Fundacja Potulicka, Wojnowo
[3]Katedra Sztucznej Inteligencji, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Lublin

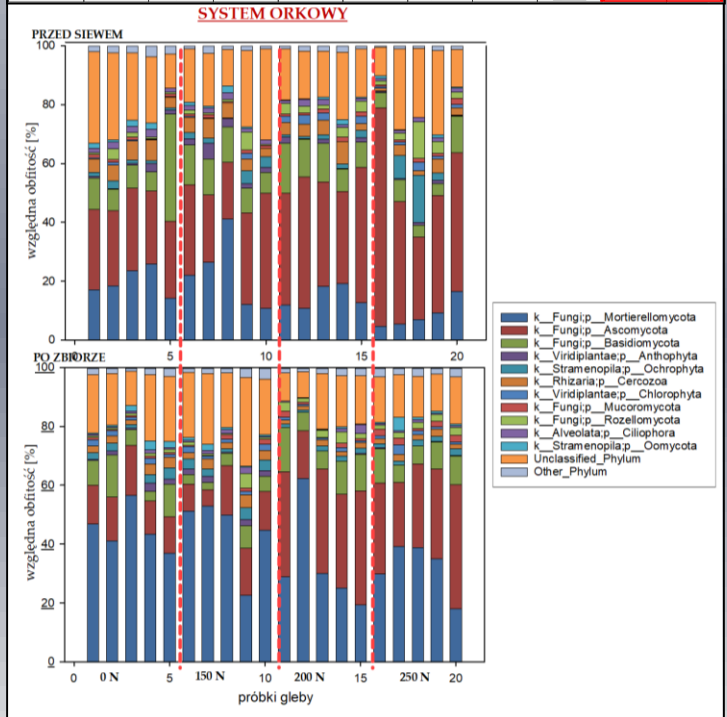
Cel badań

Analiza mikrobiomu bakteryjnego i mykobiomu grzybowego w glebach rolniczych w odpowiedzi na 4 różne dawki azotu (0, 150, 200 i 250 $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$) w glebie pod uprawą kukurydzy w systemie orkowym i bezorkowym

Wzbogacenie gleby azotem pod uprawą kukurydzy spowodowało zmiany struktury sieci mykobiomu glebowego. Odnotowano, obniżenie (↓) względnej obfitości przy zastosowaniu 250 $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$. Wyznaczono, że wartość ta jest statystycznie istotna dla tej dawki N (ANOVA, *p*=0,000; Rys. 1). Sieci mykobiomu w uprawie orkowej charakteryzowały się mniejszą dynamiką zmian odnośnie struktury. Zdecydowanie odmiennie na ilość stosowanego N reagował mykobiom w glebie spod uprawy kukurydzy w systemie bezorkowym (Rys. 4).

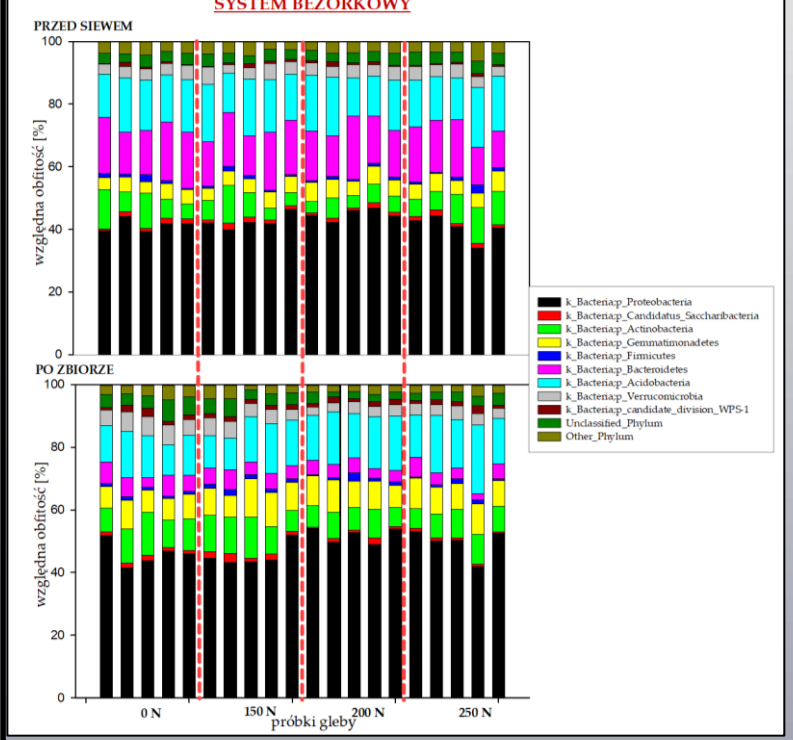
dawka N $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$	Mortierellomycota		Ascomycota		Basidiomycota		Mucoromycota		Rozellomycota	
0	↑	25,158	↓	-12,624	↓	-5,288	↓	-0,326	↓	-0,524
150	↑	21,792	↓	-16,482	↓	-6,032	↓	0,044	↓	-0,268
200	↑	18,608	↓	-7,482	↓	-1,650	↓	-0,128	↓	-0,33
250	↑	23,658	↓	-15,470	↑	1,948	↓	0,802	↓	-2,466

SYSTEM ORKOWY



Dawka N $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$	Proteobacteria		Actinobacteria		Firmicutes		Bacteroidetes		Acidobacteria		Verrucomicrobia	
0	↑	4,724	↑	2,032	↓	-0,176	↓	-10,810	↓	-3,352	↑	2,016
150	↑	2,977	↑	3,542	↑	0,431	↓	-11,047	↓	-3,047	↑	0,455
200	↑	7,182	↑	2,497	↑	0,382	↓	-11,748	↑	0,390	↓	-0,719
250	↑	9,129	↓	-0,462	↓	-0,272	↓	-11,277	↑	1,100	↓	-0,202

SYSTEM BEZORKOWY



Rys. 2 Zidentyfikowany mikrobiom bakterii w badanych glebach uprawianych bezorkowo.

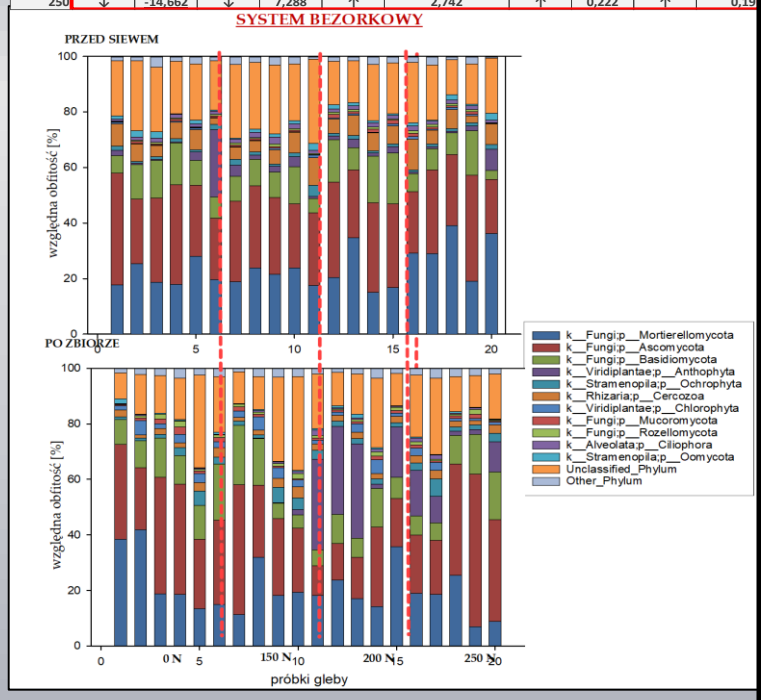
Odnotowano, że dynamika zmian mykobiomu w glebie uprawianej bezorkowo była istotna statystycznie istotna w obrębie kladów grzybów: Mortierellomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota, odpowienio ANOVA p=0,000; p=0,300; p=0,000; p=0,077 (Rys. 2). Wzbogacenie gleby N pod uprawą kukurydzy spowodowało zmiany struktury sieci mikrobiomu bakteryjnego. Odnotowano, wzrost względnej obfitości przy zdecydowanie obniżonej dawce azotu o 40%, co sugeruje, że zubożenie stosowania N wpłynęło korzystnie (↑) na bakterie należące do typu Firmicutes (pomimo braku statystycznego wpływu), zarówno w systemie orkowym, jak i bezorkowym. Stosowanie N w dawce 250 $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$ w uprawie bezorkowej kukurydzy spowodowało, że względne bogactwo sieci bakterii zostało obniżone (↓), szczególnie z typów Actinobateria, Verrucomicrobia (ANOVA, p=0,01; Rys. 2). Powyższe zmiany sugerują, że mikrobiomy rolnicze w różnych niszach hodowlanych są ekologicznie interaktywne

Materiały i metody

Przedmiot badań stanowiło zbadanie reakcji mikrobiomu rolniczego na 4 różne dawki azotu (N; 0, 150, 200 i 250 $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$) w glebie pod uprawą kukurydzy w systemie orkowym i bezorkowym. Gleba była pobierana w dwóch okresach: przed siewem kukurydzy (kwiecień 2021) oraz po jej zbiorze (listopad 2021). Całkowite DNA z gleby izolowano komercyjnym zestawem DNeasy PowerLyzer PowerSoil (QIAGEN). Izolaty DNA analizowano pod kątem czystości i ilości dsDNA (double strand DNA) z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej (BioSpectrometer, EPPENDORF) oraz metody fluorymetrycznej z wykorzystaniem zestawów Qubit dsDNA HS and BR Assay i Qubit (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Izolaty DNA glebowego były również analizowane pod kątem amplifikowalności w reakcji PCR ze starterami dla bakterii (fragment genu 16S rRNA - 27F/518R) oraz dla grzybów region ITS (startery ITS1/ITS4) oraz REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (MERCK). Odpowiedź mikrobiomu rolniczego wyznaczono stosując technikę sekwencjonowania następnej generacji amplikonów 16S i ITS (MiSeq Illumina, Genomed, Warszawa). Otrzymano odczyty o wielkości 250 par zasad w trybie sparowanych końców z każdego izolatu. Sekwencje analizowano bioinformatycznie z wykorzystaniem pakietów DADA2 (v.1.12), DECIPHER oraz Phyloseq w środowisku programistycznym R. Klasyfikację taksonomiczną przeprowadzono z wykorzystaniem aktualnych baz referencyjnych: RDP (v.138), SILVA (v.132) oraz UNITE.

dawka N $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$	Mortierellomycota		Ascomycota		Basidiomycota		Mucoromycota		Rozellomycota	
0	↑	4,694	↑	1,582	↓	-0,142	↑	0,952	↑	0,732
150	↓	-2,324	↑	4,440	↑	4,004	↑	0,732	↑	0,444
200	↓	-3,698	↓	-10,082	↓	-3,268	↑	0,906	↑	0,444
250	↓	-14,662	↓	7,288	↑	2,742	↑	0,222	↑	0,19

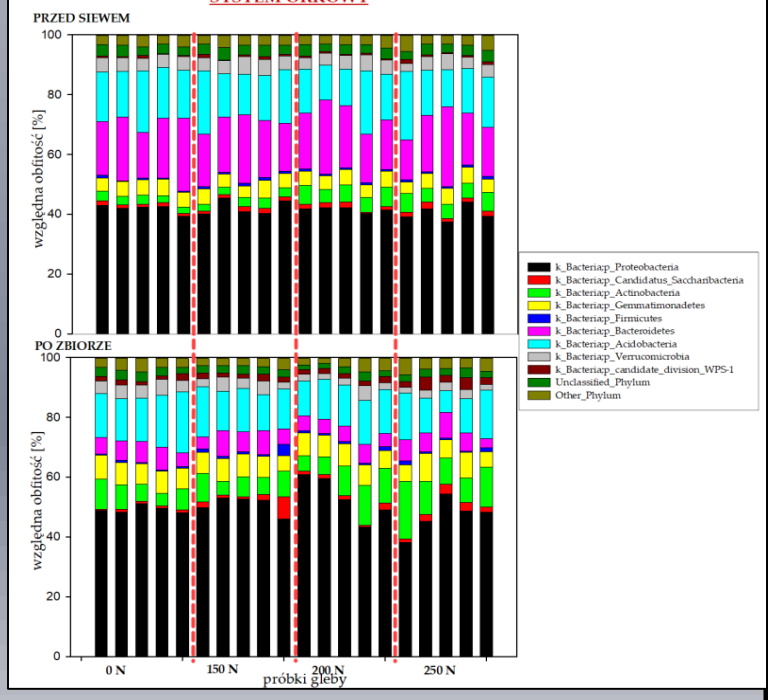
SYSTEM BEZORKOWY



Rys. 2 Zidentyfikowany mykobiom w badanych glebach uprawianych bezorkowo.

Dawka N $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$	Proteobacteria		Actinobacteria		Firmicutes		Bacteroidetes		Acidobacteria		Verrucomicrobia	
0	↑	7,346	↑	4,395	↔	0,003	↓	-13,601	↓	-0,775	↓	-0,114
150	↑	8,572	↑	4,123	↑	0,634	↓	-12,368	↓	-2,503	↓	-1,325
200	↑	11,498	↑	3,639	↔	0,089	↓	-14,236	↓	-1,425	↓	-1,742
250	↑	6,590	↑	6,772	↔	0,036	↓	-12,223	↓	-4,022	↓	-1,611

SYSTEM ORKOWY



Rys. 2 Zidentyfikowany mikrobiom bakterii w badanych glebach uprawianych orkowo.

Wnioski

1. **Sieci mikrobiomu badanych gleb w obrębie dwóch amplikonów 16S rRNA i ITS zostały zmienione pod wpływem średniej (200 $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$) i wysokiej dawki N (250 $kg^{-1}ha^{-1}rok^{-1}$) .**
2. **Najsilniej na nawożenie N zareagowały sieci grzybów (Mortierellomycota, Ascomycota, Basidiomycota, Mucoromycota , Rozellomycota) w glebie uprawianej w systemie bezorkowym.**
3. **W obrębie bakterii zmiany dotyczyły szczególnie typów: Actinobateria, Firmicutes, Verrucomicrobia .**

Praca dofinansowana ze środków budżetu państwa w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Nauka dla Społeczeństwa" nr projektu NdS/531260/2021/2021, kwota dofinansowania 100%, całkowita wartość projektu 625 910,50 PLN.
Autorzy dziękują za udostępnienie materiału do badań CGFP.

Porównanie wrażliwości zidentyfikowanych genetycznie grzybów z rodzaju *Neosartorya* na wybrane ekstrakty roślinne

Maj, W.[1], Pertile, G.[1], Frąc, M[1].
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland
w.maj@ipan.lublin.pl, g.pertile@ipan.lublin.pl, m.frac@ipan.lublin.pl

Wstęp

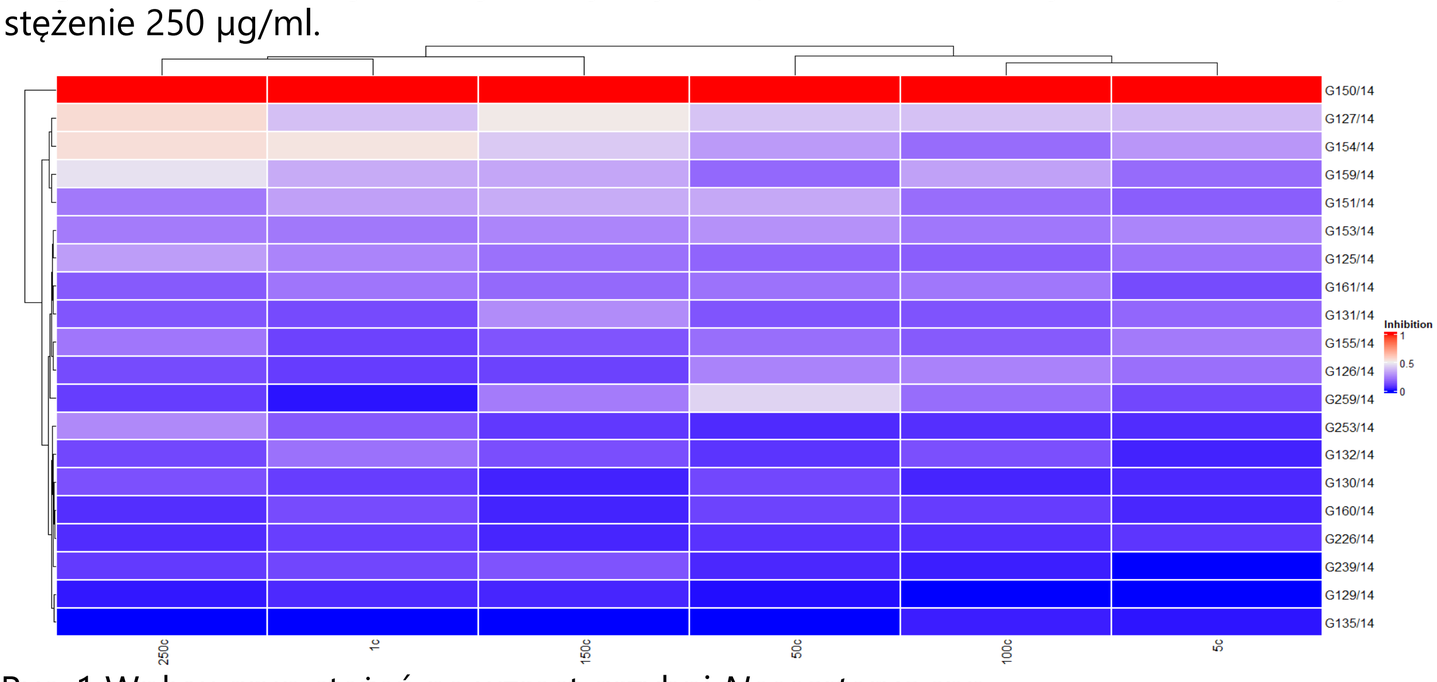
Polska jest jednym z liderów rynku produkcji owoców jagodowych w UE i na świecie. Pozycja ta wymaga od producentów i przetwórców owoców monitorowania jakości ich surowców. Owoce mogą być zasiedlone lub zanieczyszczone przez mikroorganizmy, które wykształciły przystosowania umożliwiające im przetrwanie w niekorzystnych warunkach. Jednymi z głównych zagrożeń dla produkcji żywności są grzyby termooporne, które mogą przetrwać późniejszą obróbkę termiczną, także pasteryzację. Właściwości metaboliczne, morfologiczne i genetyczne *Neosartorya* spp., czyli formy teleomorficznej *Aspergillus* spp., ulegają zmianom, co może mieć wpływ na ich odporność na środki konserwujące, jakość surowców, zdrowie roślin i różnorodność mikrobiologiczną gleby. Ze względu na generowanie przez konwencjonalne systemy ochrony upraw zanieczyszczenia środowiska poszukiwane są alternatywne metody ochrony produkcji żywności i upraw, między innymi wykorzystujące naturalne ekstrakty roślinne jako środki ochrony.

Metodyka badań

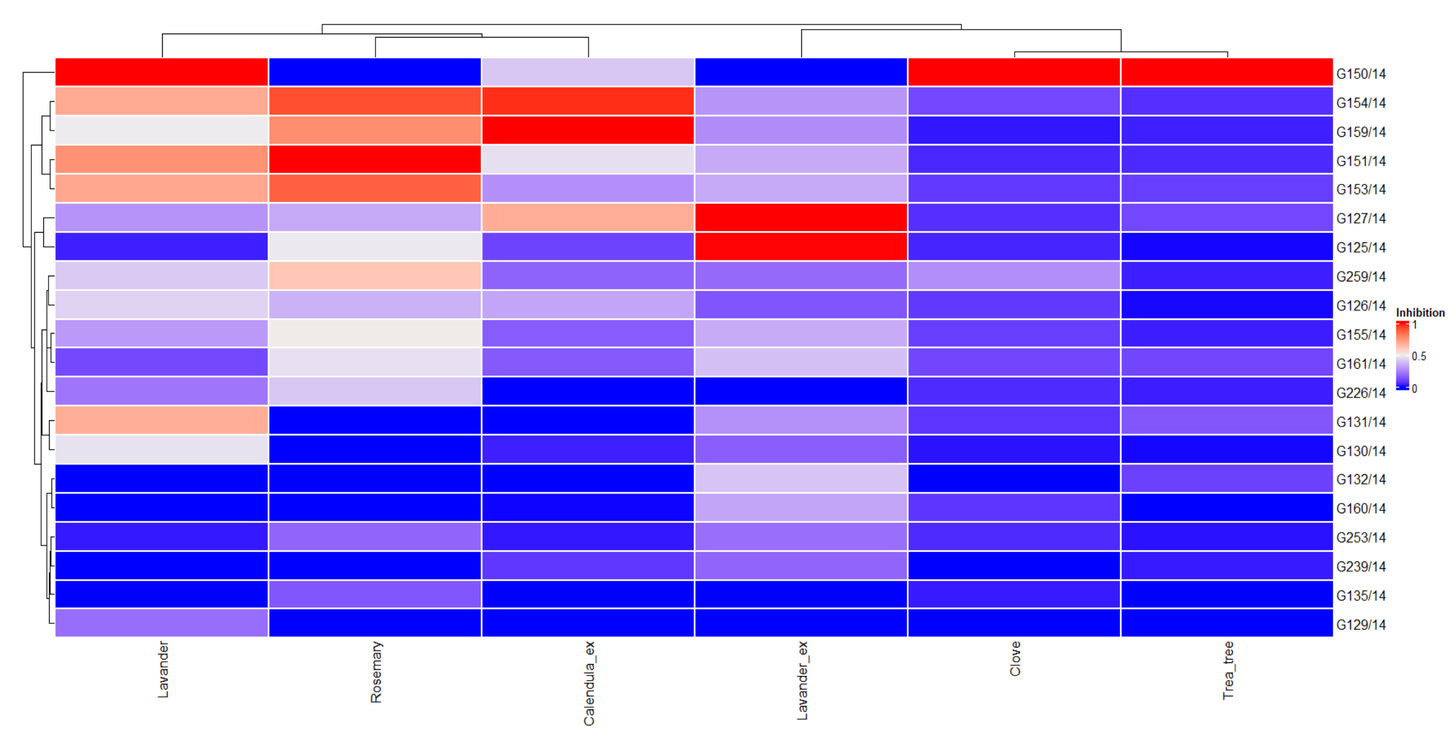
Dokonano przeglądu literatury na temat właściwości antymikrobiologicznych roślin oraz ich ekstraktów (suchych oraz olejów). Na podstawie tych danych oraz eksperymentów skriningowych (testy inhibicji z wykorzystaniem metody dyfuzyjno-krążkowej lub studzienkowej) wybrano najbardziej efektywne substancje oraz ich stężenia. Na tej podstawie do dalszych testów inhibicji z wykorzystaniem krążków bibułowych nasączanych 30 µg/ml wodnych ekstraktów badanych w poszczególnych stężeniach, wyselekcjonowano suchy ekstrakt z kwiatu lawendy, suchy ekstrakt z nagietka, a także olejki: lawendowy, drzewa herbacianego, goździkowy i rozmarynowy, w stężeniach 1mg/ml, 150µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml, 5µg/ml, 2,5µg/ml. Krążki wykładano na płytki Petriego z podłożem PDA z dodatkiem antybiotyków (tetracyklina, streptomycyna) zaszczepionych 300µl inokulum poszczególnych testowanych izolatów grzybów. W celu uzyskania homogennej zawiesiny inokulum, askospory grzybów zebrane z wcześniejszej hodowli na podłożu stałym, zawieszano w płynie FF do uzyskania gęstości 75% transmitancji, którą mierzono za pomocą turbidymetru.

Wyniki

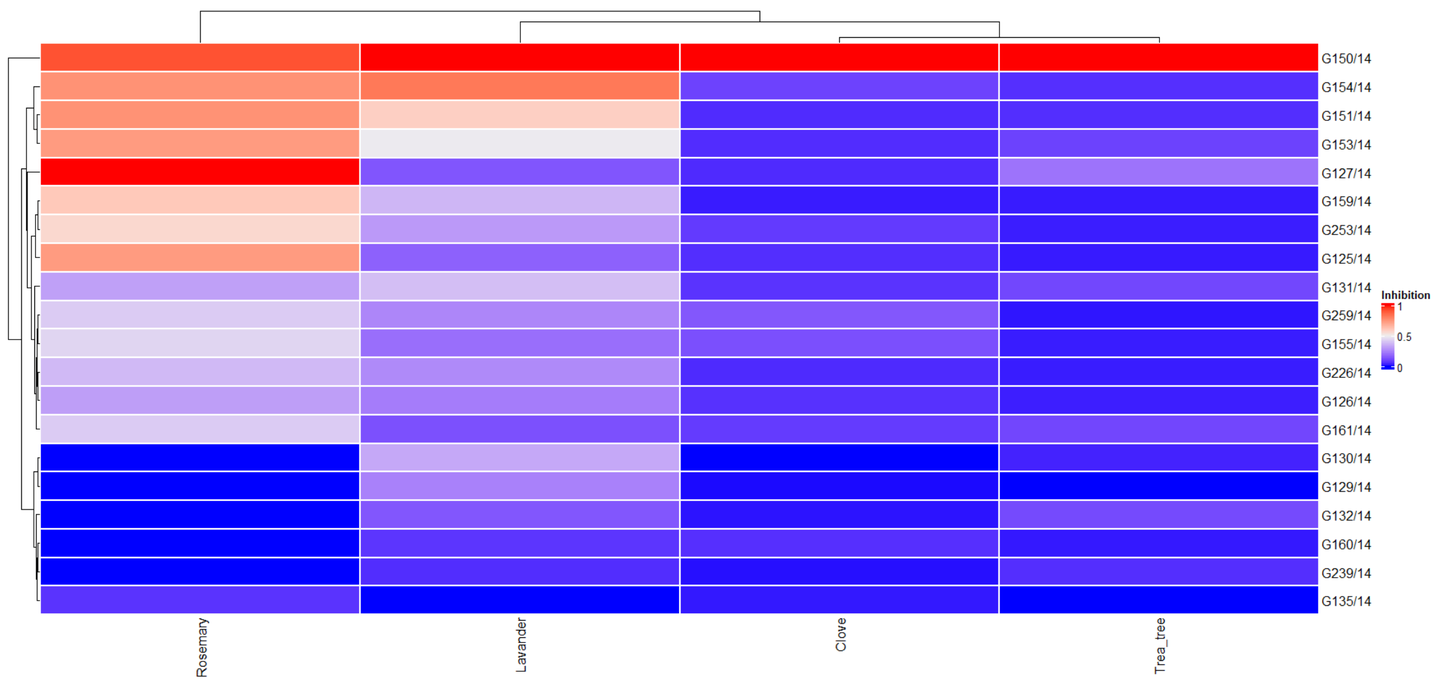
Na podstawie pomiarów stref inhibicji, wygenerowano „heatmapy" obrazujące wrażliwość poszczególnych izolatów grzybów na testowane ekstrakty i ich stężenia. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano wyodrębnienie 5 grup grzybów o zróżnicowanej wrażliwości na testowane ekstrakty. Największą inhibicję wzrostu grzybni powodowały ekstrakty w postaci olejów, szczególnie rozmarynowy. Pomimo tego, iż w pierwszym dniu hodowli olejki goździkowy i drzewa herbacianego wykazały silne działanie hamujące, to kolejnych dniach eksperymentu efekt ten ulegał obniżeniu. Najbardziej efektywnym stężeniem testowanych ekstraktów było stężenie 250 µg/ml.



Ryc. 1 Wpływ grup stężeń na wzrost grzybni *Neosartorya* spp.



Ryc. 2 Wpływ olejów i ekstraktów na wzrost grzybni *Neosartorya* spp.



Ryc. 3 Wpływ olejów na wzrost grzybni *Neosartorya* spp.

NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania zostały sfinansowane przez Polskie Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu Preludium Bis-2, numer umowy 2020/39/O/NZ9/03421.

INSTYTUT AGROFIZYKI PAN

Gleby industrioziemne jako źródło mikroorganizmów o potencjale biotechnologicznym

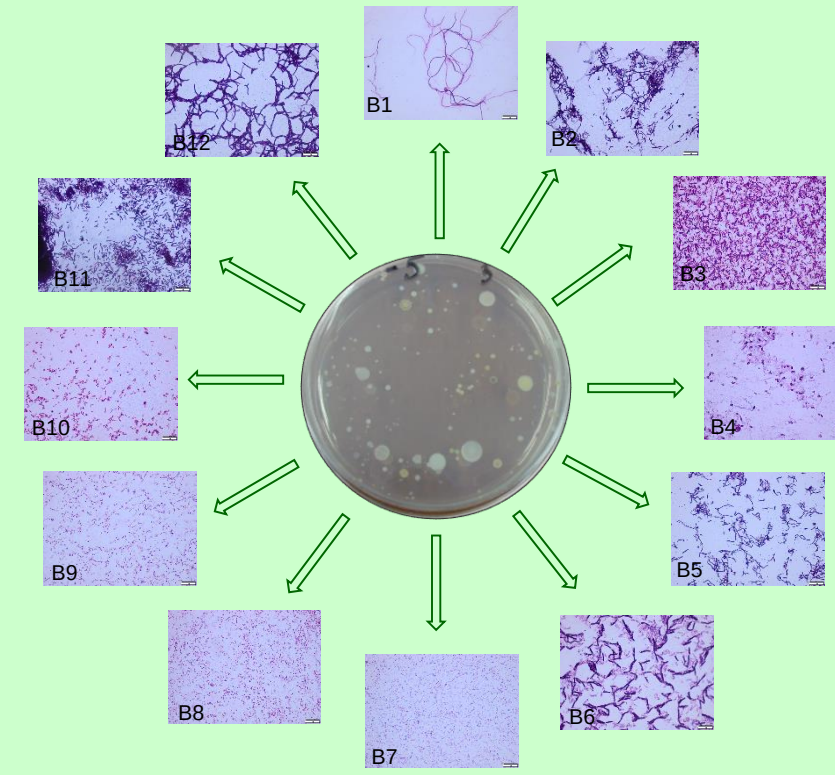
Majewska Małgorzata, Kamila Sitarz, Piotr Adamczuk, Artur Nowak

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, malgorzata.majewska@mail.umcs.pl

Gmina Bolesław koło Olkusza leży na obszarze występowania złóż cynku i ołowiu eksploatowanych przez Zakłady Górniczo-Hutnicze "Bolesław". Wiele hałd i zwałowisk w wyniku naturalnej sukcesji zostało zasiedlone przez roślinność, a inne zostały objęte programem rekultywacji środowiska. Materiał zgromadzony na tych hałdach zawiera kadm, ołów, cynk i żelazo w bardzo wysokim stężeniu (odpowiednio 235-396, 2917-5748, 43512-71451, 39511-79710 mg kg^{-1} sm gleby). Mimo tych ekstremalnie trudnych warunków jest to siedlisko bardzo bogate florystycznie i mikrobiologicznie.

Ogólna liczebność mikroorganizmów zasiedlających warstwę powierzchniową gleby (0-15 cm) wynosiła $4{,}91 \cdot 10^7$ jtk g^{-1} sm. Analiza najliczniej występujących mikroorganizmów w glebie wykazała, że w zespole bakterii dominował *Sphingobium aromaticiconvertens* (70%), *Arthrobacter* sp. (20%), *Bacillus* sp. (5%), *Streptomyces* sp. (3%) i *Brevundimonas aurantiaca* (1%). Najliczniej występującym przedstawicielem grzybów był *Clonostachys rosea*.

.



***Bacillus* sp.** – szczep wykazywał wysokie podobieństwo do *B. acideceler, B. solisilvae, B. luciferensis.* Są to gatunki PGPB, zdolne do wiązania N_2 solubilizacji minerałów fosforanowych, produkcji fitohormonów, związków przeciwdrobnoustrojowych, enzymów hydrolitycznych, degradacji pestycydów. Mogą indukować odporność ogólnoustrojową (ISR) i zwiększać tolerancję na stres abiotyczny.

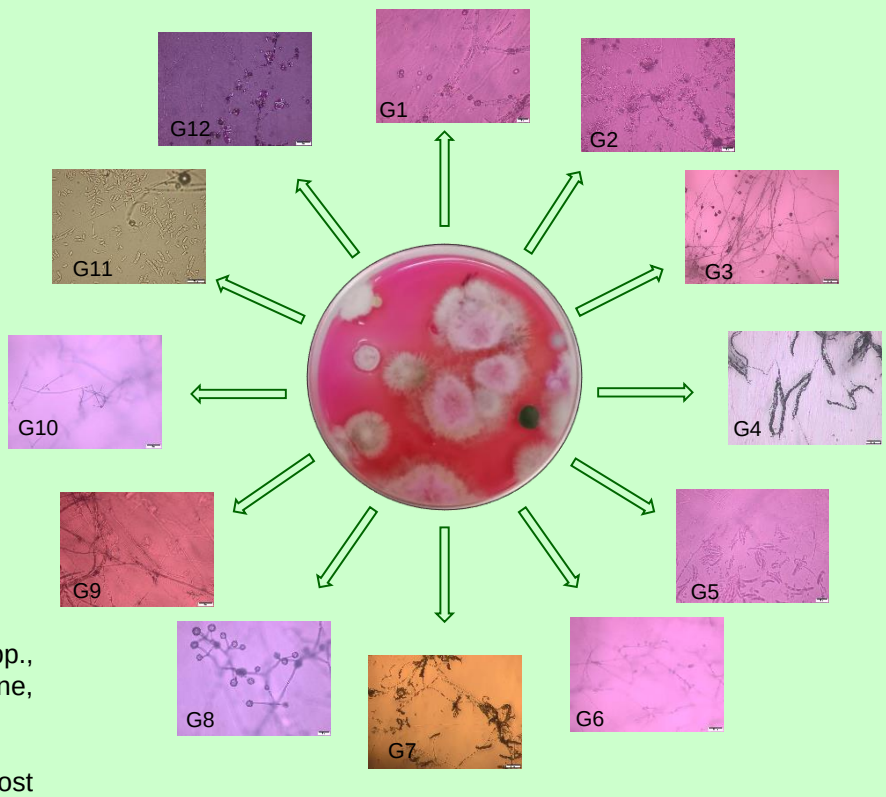
***Streptomyces* sp.** – mikroorganizmy PGP, antagonistyczne względem *Fusarium* spp., syntetyzują związki antybiotyczne i fitohormony, degradują węglowodory aromatyczne, rozpuszczają minerały fosforanowe oraz wiążą N_2.

Brevundimonas aurantiaca – obniża toksyczność metali ciężkich i stymuluje wzrost roślin w glebach skażonych, wykazuje wysoką aktywność katalazową.

Clonostachys rosea – saprofit/endofit hamujący zarodnikowanie *Botritis cinerea.*

Sphingobium aromaticiconvertens – degradacja węglowodorów poliaromatycznych.

***Arthrobacter* sp**. – szczep wykazywał wysokie podobieństwo do *A. ginsengisoli, A. oxydans, A. sulfonivorans, Pseudoarthrobacter siccitolerans*. Ten rodzaj bakterii zaliczany jest grupy PGPB, zdolnych do solubilizacji minerałów fosforanowych, wiązania N_2 i stymulacji wzrostu roślin.



Analiza mikroorganizmów dominujących zasiedlających glebę popraną z hałdy odpadów przemysłowych (Bolesław, k. Olkusza), ich charakterystyka oraz procentowy udziału w zespole mikroorganizmów zostały wykonane przez firmę NEXBIO Sp. z o.o. z Lublinie.
Określenie przynależności rodzajowej/gatunkowej na podstawie analizy sekwencji DNA wykonano po wydzieleniu bakterii i grzybów z gleby metodami hodowlanymi, a następnie poddaniu ich procedurze ekstrakcji.

Techniki sekwencjonowania nowej generacji stosowane w badaniach nad wpływem grzybów na wietrzenie biologiczne

Anna Marzec-Grządziel[1], Anna Gałązka[1], Jarosław Grządziel, Łukasz Pawlik[2]

1 Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej , ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, agrzadziel@iung.pulawy.pl
2 Instytut Nauk o Ziemi 41-200 Sosnowiec, ul. Będzińska 60, Uniwersytet Śląski

Badania wykonano w ramach projektu: NCN 2019/33/B/ST10/01009

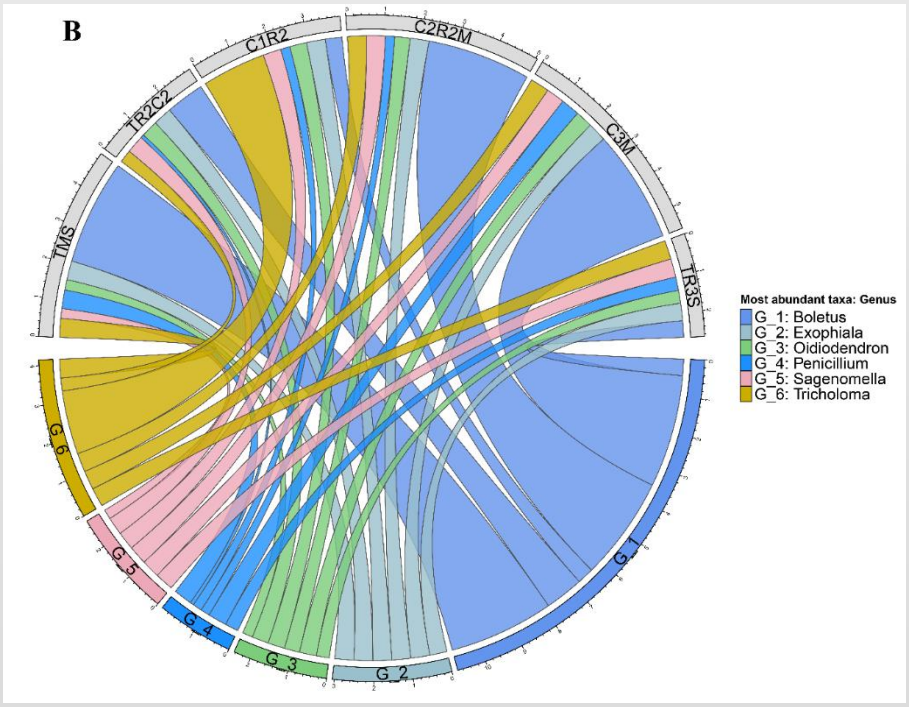
Naturalne ekosystemy leśne to wielowarstwowe zwarte zbiorowiska roślinne, w których dominującą formacją są drzewa. Ze względu na wiele funkcji, jakie pełnią lasy, ważne jest utrzymanie ich zróżnicowanego składu gatunkowego. Jednym z podstawowych elementów siedlisk leśnych jest gleba, której kluczowym elementem są mikroorganizmy, stanowiące nieodłączną część środowiska i pełniące w nim szereg pozytywnych funkcji. Analiza wskaźników aktywności biologicznej gleb w celu oceny ich jakości jest powszechnie stosowana, zwłaszcza w odniesieniu do gleb użytkowanych rolniczo. Różnorodność genetyczna mikroorganizmów w glebie może być analizowana w celu poznania ogólnej lub dogłębnej struktury mikrobiologicznej danego ekosystemu. Metody sekwencjonowania następnej generacji są stosowane w celu poznania ogólnej struktury społeczności mikrobiologicznej i wszelkich zachodzących w niej zmian. W środowisku leśnym wskaźniki te są obecnie wykorzystywane w bardzo ograniczonym zakresie. Nie ma wystarczającej wiedzy na temat charakterystyki jakościowej i ilościowej bakterii obecnych w glebie siedlisk leśnych.

Głównym celem badań była ocena wpływu grzybów występujących w środowisku na proces wietrzenia biologicznego. Obszar poboru próbek znajdował się w przełomie rzeki Poprad w południowej części Beskidów. Próbki gleby pobrano w 2021 roku. Próbki gleby pobrano w październiku 2020 roku z trzech typów miejsc: 1) strefa korzeniowa drzew, 2) szczeliny skalne, 3) miejsce referencyjne (Rysunek 2, Tabela 1).

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

- Pakiet DADA2 v.1.8 (Callahan i in., 2016) w R v.3.4.3 (R Core Team, 2016) – uzyskanie wariantów sekwencji amplikonów (ASVs)
- Baza Unite, klasyfikator Naïve Bayesian Classifier (Wang i in., 2007) – przypisanie taksonomii
- Pakiet microeco (v.0.7.1) (Liu i in., 2021) – analiza wskaźników bioróżnorodności alfa, analiza LEfSe, analizy korelacji, analiza RDA
- PICRUSt 2.0, system linux – profil funkcjonalny zbiorowisk grzybów

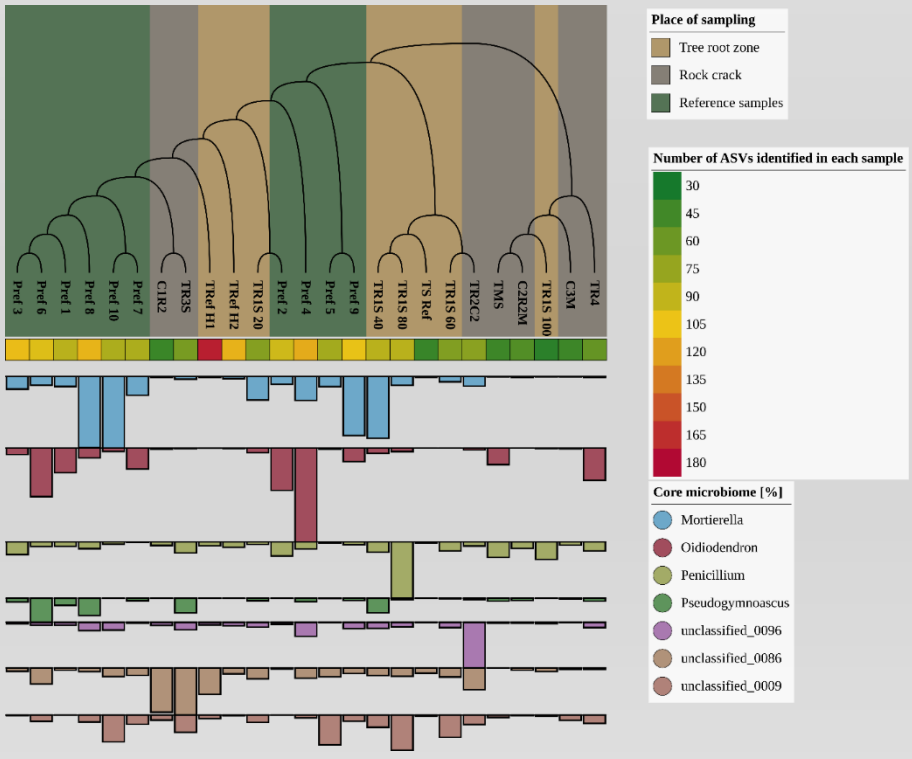
Najliczniejszymi taksonami na poziomie rodzaju występującymi w próbkach pobranych ze strefy korzeniowej drzew były: *Boletus*, *Discosia*, *Exophiala*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Pseudotomentella*, *Tricholoma* i *Wilcoxina*. W próbkach ze szczelin skalnych były to: *Boletus*, *Exophiala*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Sagenomella* i *Tricholoma* (Ryc.2).



Ryc.2 Chord diagram na podstawie analizy metataksonomicznej genu ITS rRNA dla próbek pobranych ze szczeliny skalnej. Górna część diagramów przedstawia symbole próbek. Dolna część diagramu przedstawia zidentyfikowane rodzaje występujące w analizowanych próbkach średnio w ponad 2%

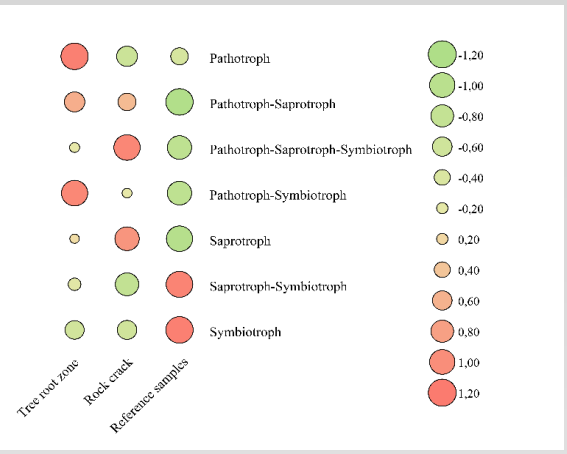
Analiza danych z sekwencjonowania grzybów wykazała obecność 304 wariantów sekwencji amplikonów (ASVs) należących do 200 różnych taksonów na poziomie rodzaju, z których nie udało się sklasyfikować 96 ASV.

Najliczniej występującymi taksonami na poziomie typu były Basidiomycota, następnie Ascomycota i Mortierellomycota. Mikrobiom rdzeniowy grzybów reprezentował 7 ASVs (Ryc.1). Analiza bioinformatyczna poszczególnych próbek wykazała obecność 77 unikalnych grzybowych ASVs, z których największą liczbę stwierdzono w próbce T_Ref_H1 (47 ASVs, 27,485% próbki). Analizowana spulowanych próbek (szczelina skalna, strefa korzeniowa, próby referencyjne) ujawniła obecność 137 unikatowych ASVs, z których najwięcej obecne było w próbkach strefy korzeniowej. Mikrobiom rdzeniowy stanowiło 92 ASVs.



Ryc.1 Drzewo filogenetyczne oparte na analizie metataksonomicznej genu ITS rRNA. Mapa cieplna przedstawia liczbę ASV zidentyfikowanych w każdej próbce, wykres słupkowy przedstawia częstość występowania taksonów z podstawowego rodzaju w każdej próbce [%]

Największą średnią liczbę sklasyfikowanych rodzajów stanowiły grzyby pełniące jednocześnie funkcje patotrofu, saprotrofu i symbiotrofu (25,229% wszystkich próbek). Patotrofy stanowiły średnio 0,272% każdej próby, saprotrofy - 9,487%, a symbiotrofy - 13,006%. Próbki pobrane ze strefy korzeniowej drzew i szczeliny skalnej charakteryzowały się najwyższym składem grzybów z funkcją patotrofów, saprotrofów i symbiotrofów (24,263%, 52,037%). W próbkach referencyjnych pobranych z miejsc bez objawów wietrzenia biologicznego najliczniej występowały grzyby o funkcji symbiotroficznej (31,601%) (Ryc. 3).



Ryc.3 Mapa cieplna przedstawiająca funkcje sklasyfikowanych rodzajów. Wyniki przedstawiają próbki spulowane w oparciu o miejsce poboru. Dane przedstawione na wykresie są normalizowane i skalowane.

Charakterystyka jakościowa i ilościowa bakterii obecnych w glebie ekosystemu leśnego i rolniczego

Anna Marzec-Grządziel[1], Anna Gałązka[1], Karolina Gawryjołek[1], Karolina Furtak[1], Jarosław Grządziel

1 Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej , ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, agrzadziel@iung.pulawy.pl

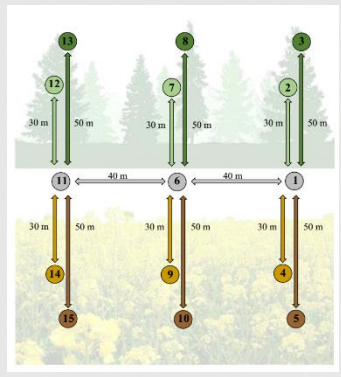
Badania wykonano w ramach temat statutowego 1.27 IUNG-PIB „*Charakterystyka strukturalna i funkcjonalna bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych w ekosystemie leśnym i rolniczym*”

Naturalne ekosystemy leśne to wielowarstwowe zwarte zbiorowiska roślinne, w których dominującą formacją są drzewa. Ze względu na wiele funkcji, jakie pełnią lasy, ważne jest utrzymanie ich zróżnicowanego składu gatunkowego. Jednym z podstawowych elementów siedlisk leśnych jest gleba, której kluczowym elementem są mikroorganizmy, stanowiące nieodłączną część środowiska i pełniące w nim szereg pozytywnych funkcji. Analiza wskaźników aktywności biologicznej gleb w celu oceny ich jakości jest powszechnie stosowana, zwłaszcza w odniesieniu do gleb użytkowanych rolniczo. Różnorodność genetyczna mikroorganizmów w glebie może być analizowana w celu poznania ogólnej lub dogłębnej struktury mikrobiologicznej danego ekosystemu. Metody sekwencjonowania następnej generacji są stosowane w celu poznania ogólnej struktury społeczności mikrobiologicznej i wszelkich zachodzących w niej zmian. W środowisku leśnym wskaźniki te są obecnie wykorzystywane w bardzo ograniczonym zakresie. Nie ma wystarczającej wiedzy na temat charakterystyki jakościowej i ilościowej bakterii obecnych w glebie siedlisk leśnych.

Głównym celem pracy była charakterystyka funkcjonalna i genetyczna bakterii w glebach leśnych i rolniczych oraz porównanie tych środowisk pod względem aktywności biologicznej. Próbki pobrano latem 2019 r. z lasu (głębokość ok. 10-20 cm) i przyległego pola uprawnego (0-30 cm), zgodnie z przedstawionym schematem (ryc. 1). Próbki gleby przesiano i przygotowano do dalszej analizy. Bioróżnorodność genetyczną bakterii określono przy użyciu technik sekwencjonowania nowej generacji.

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

- Pakiet DADA2 v.1.8 (Callahan i in., 2016) w R v.3.4.3 (R Core Team, 2016) – uzyskanie wariantów sekwencji amplikonów (ASVs)
- Baza RDP, klasyfikator Naïve Bayesian Classifier (Wang i in., 2007) – przypisanie taksonomii
- Pakiet phyloseq – usunięcie sekwencji sklasyfikowanych jako niebakteryjne (mitochondrialne i chloroplastowe)
- Pakiet microeco (v.0.7.1) (Liu i in., 2021) – analiza wskaźników bioróżnorodności alfa, analiza LEfSe, analizy korelacji, analiza RDA
- PICRUSt 2.0, system linux – profil funkcjonalny zbiorowisk bakterii

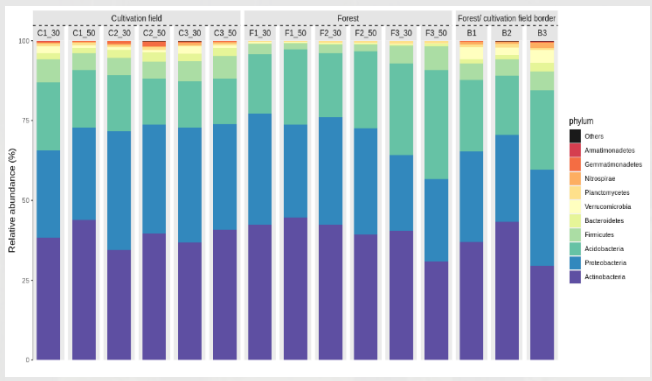


Ryc.1 Schemat poboru próbek

Analiza danych z sekwencjonowania bakterii wykazała obecność 439 wariantów sekwencji amplikonów (ASVs), z których 292 zidentyfikowano na poziomie rodzaju. Na poziomie rodzaju nie sklasyfikowano 147 ASV. Najliczniejszym zidentyfikowanym rodzajem był *Mycobacterium*, a następnie *Streptomyces*, *Nocardioides* i *Sphingomonas* (ryc. 2).

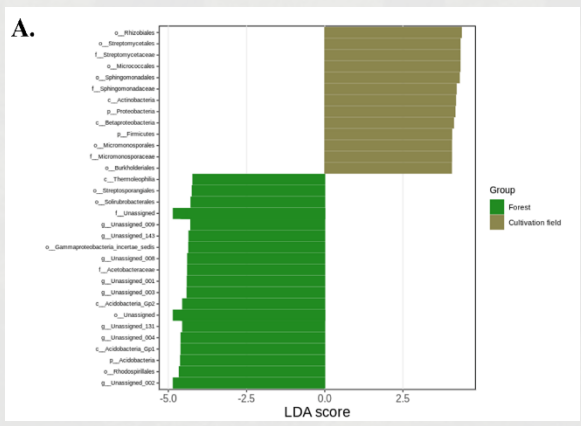
Najwięcej taksonów przypisanych zostało do rodziny *Acetobacteraceae*, *Nocardioidaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Bacillaceae*, *Streptomycetaceae* i *Mycobacteriaceae*. Analizowane ASVs najliczniej klasyfikowane były do typu Actinobacteria, następnie Proteobacteria, Acidobacteria i Firmicutes (ryc. 3). Odsetek sklasyfikowanych ASVs był najwyższy w próbkach z pola uprawnego (64,147%+/-1,187), w porównaniu z próbkami z granicy lasu i pola (60,233%+/-3,092) oraz z lasu (41,323%+/-2,671). Wskaźniki bioróżnorodności wykazały różnice między próbkami z 3 różnych miejsc poboru. Próbki z pola uprawnego charakteryzowały się najwyższymi wartościami analizowanych indeksów, próbki z lasu natomiast charakteryzowały się najniższą różnorodnością.

Ryc.2 Skład taksonów na poziomie rodzaju



Ryc.3 Skład taksonów na poziomie typu

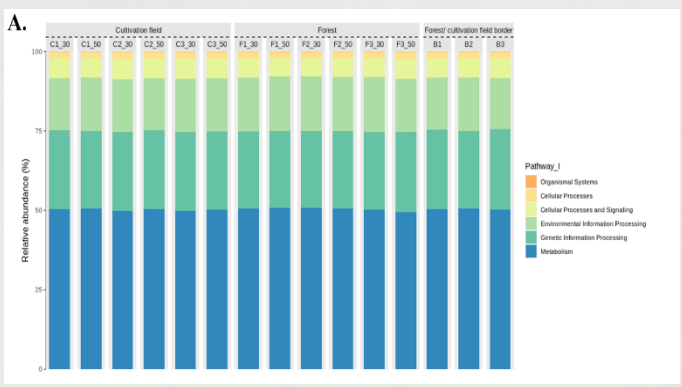
Analiza LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) wykazała, które taksony decydowały o różnicach między próbkami pochodzącymi ze środowiska naturalnego (las), a środowiskiem poddanym wpływom agronomicznym (pole uprawne). Zaobserwowano większą liczbę taksonów występujących w statystycznie większej ilości w próbkach z lasu w porównaniu z próbkami z pola uprawnego. Do gromady, której liczebność była wyższa w próbkach leśnych, można zaliczyć Acidobacteria. W próbkach z pola uprawnego zaobserwowano większą liczebność bakterii Firmicutes. Na poziomie rodzaju, większą liczebność w próbkach leśnych zaobserwowano dla bakterii zaklasyfikowanych do *Roseiarcus* i *Acidiferrimicrobium* (ryc. 4).



Ryc. 4. Analiza LEfSe pokazująca różnice między wynikami metataksonomicznymi z próbek leśnych i z pola uprawnego

Analiza zbiorcza przeprowadzona z uwzględnieniem miejsca pobrania próbek wykazała występowanie 148 unikalnych bakteryjnych ASVs, z których większość była obecna w próbkach z pola uprawnego, a mikrobiom rdzeniowy był reprezentowany przez 107 ASVs.

Największą liczebność zaobserwowano dla genów kodujących białka zaangażowane w procesy metaboliczne. Największą liczbę zidentyfikowanych genów zaobserwowano dla procesów związanych z: przetwarzaniem informacji środowiskowej - transport błonowy; metabolizmem węglowodanów, aminokwasów, kofaktorów, witamin, nukleotydów, energii, lipidów, terpenoidów, poliketydów i ksenobiotyków; przetwarzaniem informacji genetycznej - translacja, replikacja, naprawa, transkrypcja, składanie, sortowanie i degradacja (ryc. 5).



Ryc.5 Analiza PICRUSt 2.0 – przewidywanie profilu metabolicznego

Sekwencjonowanie pełnego genomu bakterii z rodzaju *Achromobacter* wyizolowanej z ryzosfery w uprawie kukurydzy

Anna Marzec-Grządziel[1], Anna Gałązka[1]

1 Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy, Zakład Mikrobiologii Rolniczej , ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, agrzadziel@iung.pulawy.pl

Badania realizowano w ramach projektu prac przedwdrożeniowych Inkubator Innowacyjności 4.0; nr 1/ININ 4.0/IUNG-PIB/2021

Izolacja nowych szczepów bakteryjnych z naturalnego środowiska może doprowadzić do wykrycia mikroorganizmów o potencjalnym znaczeniu praktycznym. Charakterystyka takich mikroorganizmów może być prowadzona klasycznymi metodami mikrobiologicznymi oraz metodami biologii molekularnej. Klasyczne metody mikrobiologiczne obejmują hodowlę badanych mikroorganizmów na podłożach selektywnych lub w odpowiednio dobranych warunkach inkubacji. Nowoczesną odmianą takich metod są analizy wykorzystujące techniki mikromacierzy, pozwalające jednocześnie na określenie wzrostu badanego szczepu w kilkunastu – kilkudziesięciu różnych warunkach (różne źródła azotu, węgla, pH, zasolenie, substancje bakteriostatyczne/ bakteriobójcze).

Metody biologii molekularnej wykorzystywane są do charakterystyki genetycznej badanych izolatów. Obecnie badania nad nowo wykrytymi mikroorganizmami opierają się w dużej mierze na technikach sekwencjonowania. Techniki klasyczne typu sekwencjonowanie Sanger pozwala na analizę filogenetyczną badanego szczepu, przypisanie go do rodzaju. Ogromne możliwości daje sekwencjonowanie pełnego genomu, które może dostarczyć wielu informacji na temat pochodzenia szczepu, jego przynależności taksonomicznej czy charakterystyki fenotypowej. Połączenie analiz genomu z technikami mikromacierzy pozwala na dogłębną charakterystykę analizowanej bakterii.

Głównym celem pracy była charakterystyka genetyczna bakterii wyizolowanej z endosfery korzeniowej kukurydzy. Analizowana bakteria pochodziła z banku mikroorganizmów Zakładu Mikrobiologii Rolniczej IUNG-PIB. Analiza sekwencjonowania Sanger pozwoliła na przypisanie bakterii do rodzaju *Achromobacter*. W celu sekwencjonowania całego genomu wykonano: hodowla płynna w podłożu LB; izolacja DNA komercyjnie dostępnym zestawem do izolacji DNA z hodowli bakteryjnych; określenie stężenia oraz jakości uzyskanego izolatu DNA. Sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie zewnętrznej (Eurofins Genomics, Germany). Sekwencjonowanie prowadzono w technologii Illumina NovaSeq 6000, Paired end Read, 2 x 150 bp. Uzyskano 3 698 490 000 nt w 12 328 300 odczytach.

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA

LINUX:

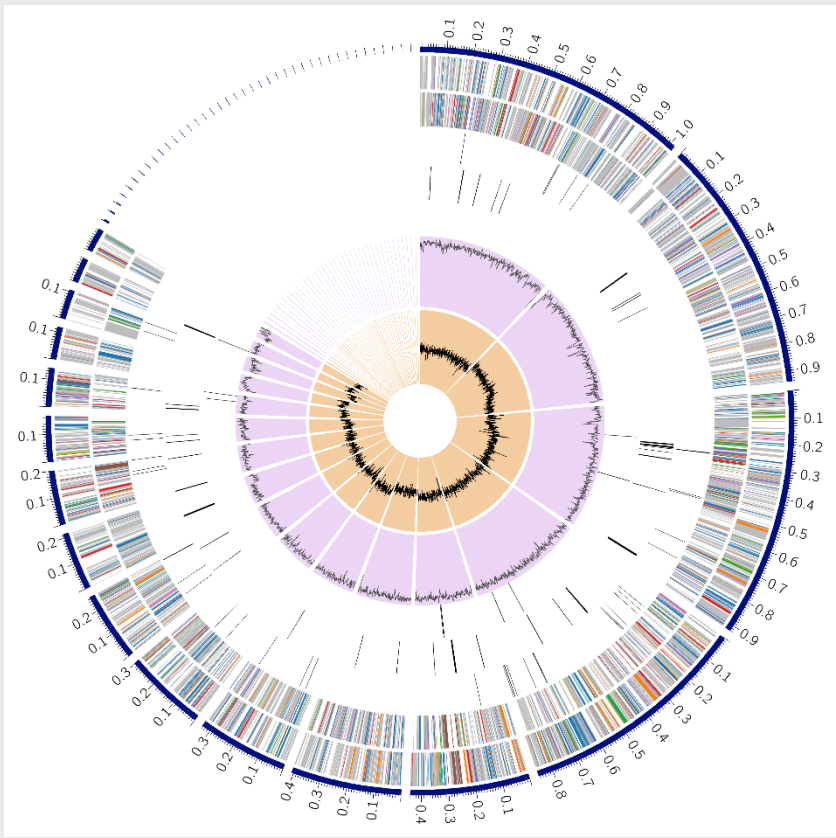
- Trim Galore – usunięcie sekwencji adapterów
- Assembly Unicycler – uzyskanie k-mer(ów) oraz kontigów

Uzyskano 57 kontigów, N50: 855 260, długość: 6 651 435; najdłuższy kontig: 1 018 060 (Ryc.1)

- GlimmerHMM, Quast – wygenerowanie listy potencjalnych genów
- BlastN, MetaQuast – przyrównanie do genomu referencyjnego

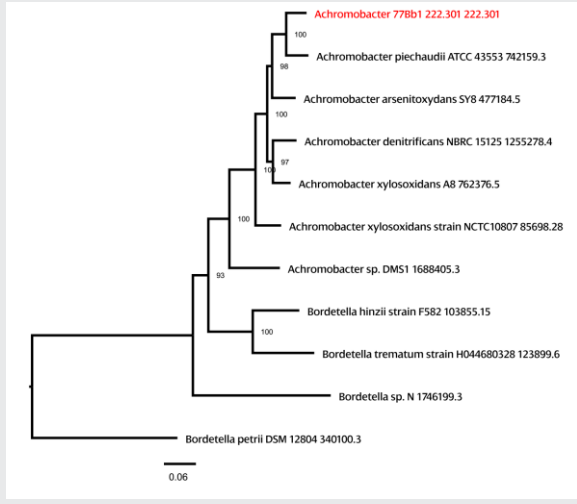
PATRIC 3.6.12:

- Wygenerowanie listy potencjalnych genów CDS (6026), tRNA (55), rRNA (4), białek z przypisanymi funkcjami (4855) oraz potencjalnych białek (1171), opracowanie graficzne



Ryc.1 Wykres typu *circos* obrazujący liczbę oraz długość analizowanych kontigów, CDS na nici forward, CDS na nici reverse, geny RNA, CDS przypisane do genów oporności na antybiotyki, CDS przypisane do genów wirulencji, zawartość GC, stosunek G/C (w kolejności od zewnątrz do środka)

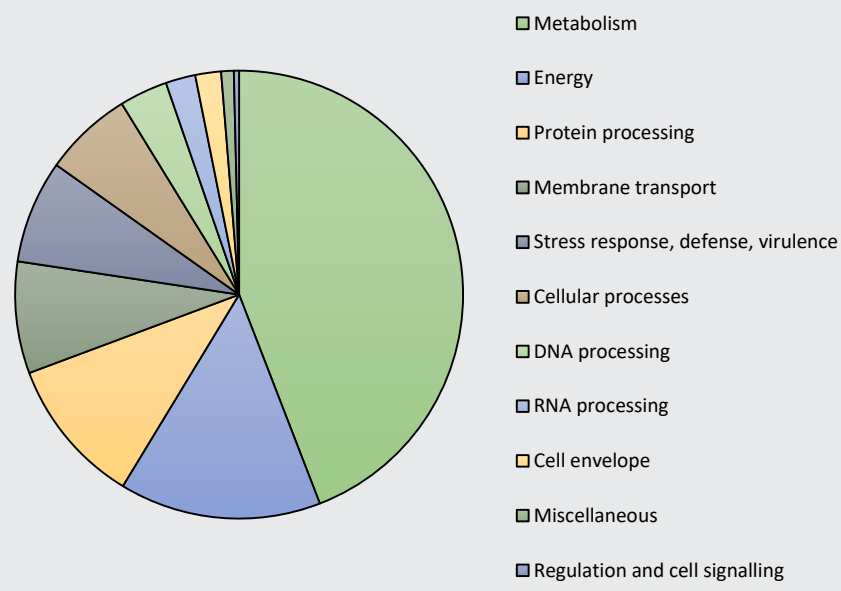
Analiza bioinformatyczna uzyskanego genomu bakteryjnego pozwoliła na określenie 6026 regionów kodujących. Sekwencja genu 16S rRNA, kodująca małą podjednostkę rybosomalną pozwoliła na przypisanie analizowanego genomu do rodzaju *Achromobacter* (Ryc.2).



Ryc.2 Drzewo filogenetyczne wykonane na podstawie sekwencji 16S rRNA

W genomie analizowanej bakterii znaleziono 56 genów kodujących czynniki oporności na antybiotyki, 10 genów kodujących czynniki wirulencji, oraz 7 genów odpowiedzialnych za syntezę białek będących elementami docelowymi dla leków (Ryc.1).

Wykazano obecność genów kodujących 4855 białek z przypisanymi funkcjami, oraz 1171 hipotetycznych białek. Sklasyfikowane białka tworzyły 301 subsystemów, biorących udział w przebiegu 136 ścieżek metabolicznych. Najwięcej genów brało udział w szlakach metabolicznych, najmniej w procesach regulacji i przekazywania sygnałów komórkowych (Ryc.3).



Ryc.3 Liczba genów zaangażowanych w analizowane procesy metaboliczne

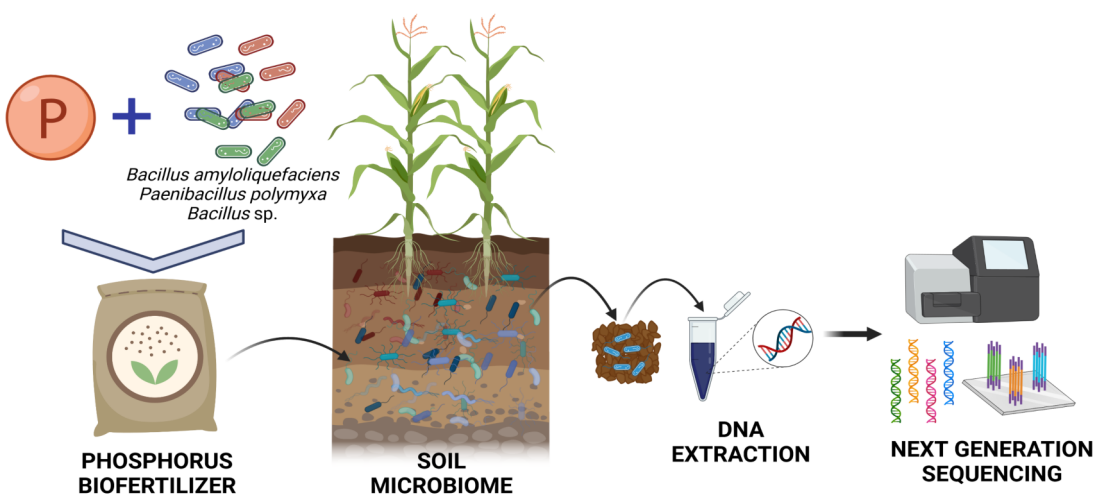
Ocena różnorodności genetycznej zbiorowisk bakterii w zdegradowanej glebie nawożonej fosforowym bionawozem

Mateusz Mącik[1], Agata Gryta[1], Lidia Sas-Paszt[2], Magdalena Frąc[1]
1. Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk
2. Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

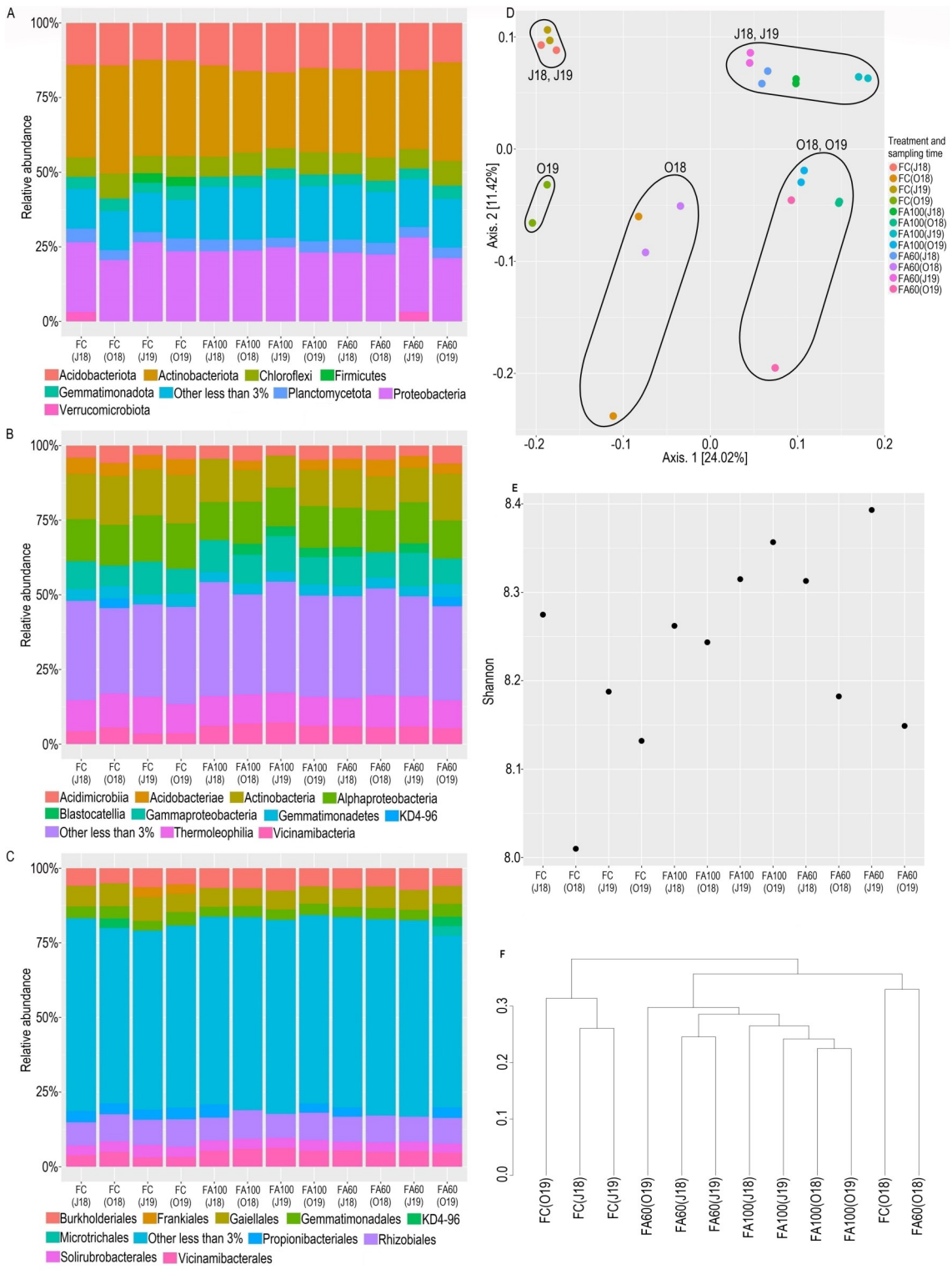
WPROWADZENIE

Aktywność i bioróżnorodność mikroorganizmów stanowią czuły wskaźnik produktywności i żyzności gleb uprawnych. Nie ulega wątpliwości, że wysoka bioróżnorodność wśród zbiorowisk bakterii glebowych pozwala na zachowanie wysokiej jakości mikrobiomu odpornego na stresy środowiskowe, co jednocześnie przyczynia się do poprawy zdrowia gleb. Ze względu na nieoceniony wkład bakterii w utrzymanie równowagi ekologicznej w glebie, badania nad strukturą mikrobiomu stanowią fundamentalny element prac na rzecz rozwoju zrównoważonych praktyk rolniczych opartych na wykorzystaniu preparatów i nawozów pochodzenia mikrobiologicznego. Aplikacja bionawozów i biopreparatów zawierających pożyteczne szczepy mikroorganizmów jest także uzasadniona w przypadku rolnictwa regeneracyjnego, którego celem jest odtworzenie oraz zachowanie wysokiego potencjału produkcyjnego gleby.

MATERIAŁY I METODY



WYNIKI



Rys. 1. Zmiany w różnorodności genetycznej zbiorowisk bakterii pod wpływem fosforowego bionawozu. Wyjaśnienia: FC-dawka optymalna bez wzbogacenia mikrobiologicznego, FA100-dawka optymalna wzbogacona mikrobiologicznie, FA60-dawka zredukowana o 40% wzbogacona mikrobiologicznie, J18-czerwiec 2018, O18-październik 2018, J19-czerwiec 2019, O19-październik 2019.

- Na poziomie typu gleba była zdominowana przez Actinobacteriota (25.43%-36.21%), Proteobacteria (20.56%-26.59%), Acidobacteriota (12.38%-16.55%) i Chloroflexi (5.81%-8.37%) . Względna obfitość Acidobacteriota była wyższa we wszystkich wariantach FA100 oraz FA60 w porównaniu do gleby kontrolnej (Rys. 1A).
- Dominujące klasy obejmowały Alphaproteobacteria (12.74%-15.52%), Actinobacteria (10.58%-16.33%), Gammaproteobacteria (6.92%-11.83%) oraz Thermoleophilia (9.37%-12.38%). Aplikacja bionawozu zwiększyła względną obfitość Blastocatellia w wariantach FA100(O18, J18, O19) oraz FA60(J18, J19) (Rys. 1B).
- Na poziomie rzędu dominowały Rhizobiales (7.64%-9.58%), Gaiellales (5.85%-7.94%), Burkholderiales (5.09%-7.54%), Vicinamibacteriales (3.16%-6.31%), Gemmatimonadales (3.25%-4.48%) i Solirubrobacterales (3.00%-4.16%). Zaobserwowano wzrost względnej obfitości Burkholderiales i Vicinamibacterales w wariantach FA100 i FA60 w czasie trwania doświadczenia (Rys. 1C).
- Analiza PCoA, na podstawie odległości Braya-Curtisa, wskazała na wyraźne grupowanie próbek gleby w zależności od wariantu nawożenia i terminu. Próbki zebrane w terminach J18 i J19 były wyraźnie oddzielone od próbek zebranych na jesieni (O18, O19). Zaobserwowano również odseparowanie wariantów FA100 i FA60 od gleby kontrolnej w terminach J18, J19 i O19. Warianty FC(O18) and FA60(O18) utworzyły jedną grupę, natomiast druga składała się z wariantów FA100(O18) and FA100 -FA60(O19) (Rys. 1D).
- Dendrogram UPGMA wskazał na grupowanie próbek w zależności od wariantu nawożenia. Warianty FA100 oraz FA60 z wszystkich terminów (z wyjątkiem FA60(O18)) utworzyły jedną grupę, w obrębie której warianty FA100 były oddzielone od wariantów FA60 (Rys. 1F).
- Aplikacja fosforowego bionawozu spowodowała zmiany we wskaźniku różnorodności Shannona (H). Wyższe wartości H, w porównaniu do kontroli, zaobserwowano w wariantach FA60(J18), FA100-FA60(O18), FA100-FA60(J19) and FA100-FA60(O19). Najwyższe wartości H zanotowano dla wariantu FA60(J19) (Rys. 1E).

PODSUMOWANIE

Zmiany we względnej obfitości zbiorowisk bakterii na różnych poziomach taksonomicznych mogą wynikać z konkurencji o niszę ekologiczną, zakłócenia równowagi w glebie po aplikacji bionawozu zawierającego aktywne mikroorganizmy oraz oddziaływań pomiędzy mikrobiomem rdzeniowym a bakteriami dostarczonymi w bionawozie. Proteobakteria i Actinobacteria występują powszechnie w glebach, natomiast Acidobacteriota zasiedlają kwaśne i ubogie w składniki mineralne środowiska i są zaangażowane w rozkład materii organicznej i obieg pierwiastków. Wzrost wartości wskaźnika Shannona w wybranych wariantach FA100 i FA60 wskazuje na wzrost różnorodności, co może być związane z udziałem mikrobiomu charakteryzującego się większą odpornością na stresy środowiskowe i działalność patogenów. Grupowanie próbek gleby w analizach PCoA i UPGMA wskazuje na wrażliwość mikrobiomu nie tylko na sposób nawożenia, ale również na termin poboru.

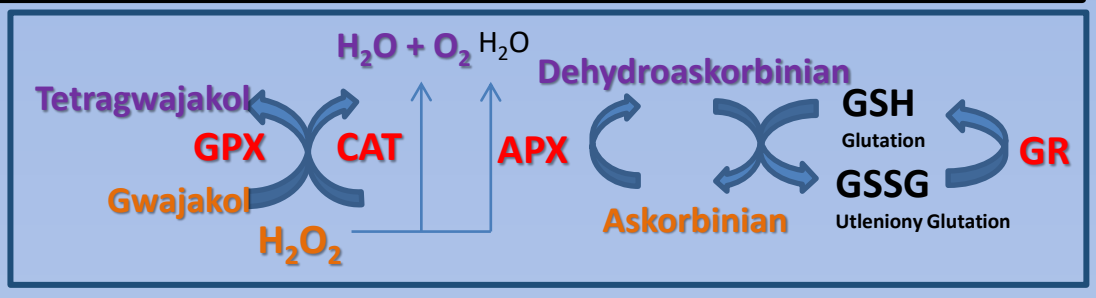
Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu BIOSTRATEG, numer umowy BIOSTRATEG3/347464/5/NCBR/2017

Wpływ egzopolimerów (EPS) uzyskanych z hodowli *Penicillium paneum* Pp7 na aktywność enzymów antyoksydacyjnych (CAT, APX, GPX) w tkankach pszenicy

Artur Nowak[1], Renata Tyśkiewicz[2], Ewa Ozimek[1], Jolanta Jaroszuk-Ściseł[1]
[1]*Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, UMCS, Lublin*
[2]*Laboratorium Analityczne, Sieć Badawcza Łukasiewicz–Instytut Nowych Syntez Chemicznych, Puławy*

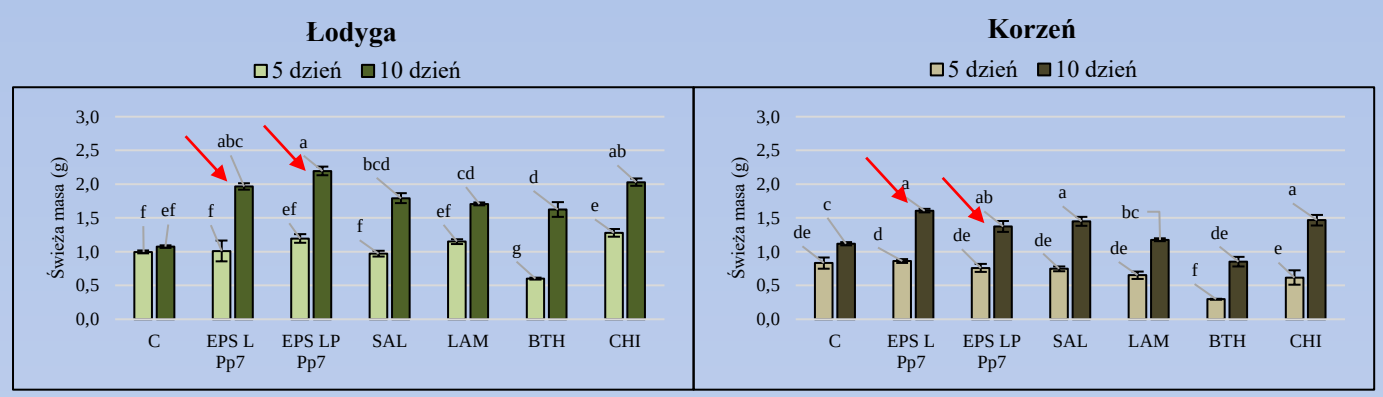
Wstęp

Reaktywne formy tlenu (ROS) są substancjami toksycznymi, wywołującymi uszkodzenia oksydacyjnie komórek roślinnych w różnych warunkach stresu środowiskowego, takich jak zasolenie, susza, zimno, metale ciężkie, promieniowanie UV, jak i mikrobiologicznego wywołanego przez mikroorganizmy fitopatogeniczne. Do związków tych zalicza się $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$, H_2O_2 i $^1O_2$ [1]. Jednakże ROS odgrywają również ważną rolę sygnalizacyjną w roślinach, kontrolując takie procesy, jak wzrost, rozwój, a zwłaszcza reakcje na bodźce biologiczne i środowiskowe [2]. Aby zapewnić przetrwanie, rośliny musiały rozwinąć wydajną maszynerię antyoksydacyjną, która składa się z dwóch elementów: (1) składników enzymatycznych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), **katalaza (CAT)**, **peroksydaza askorbinowa (APX)**, **peroksydaza gwajakolowa (GPX)**, reduktaza glutationowa (GR), monodehydroascorbatereduktaza (MDHAR) i reduktaza dehydroascorbatereduktaza (DHAR) [Rys. 1.]; (2) antyoksydanty nieenzymatyczne, takie jak kwas askorbinowy (AA), zredukowany glutation (GSH), α-tokoferol, karotenoidy, flawonoidy i kosmoazoteprolina [3]. W stymulowaniu odporności roślin na stres oksydacyjny interesujące wydaje się wykorzystanie polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS), wytwarzanych przez grzyby. EPS w swojej budowie zawierają rdzeń cukrowy, który zostaje rozpoznany przez receptory roślin, wpływając na wiele szlaków metabolicznych, w tym na poziom takich enzymów jak: katalaza, peroksydaza askorbinowa i peroksydaza gwajakolowa [4,5].

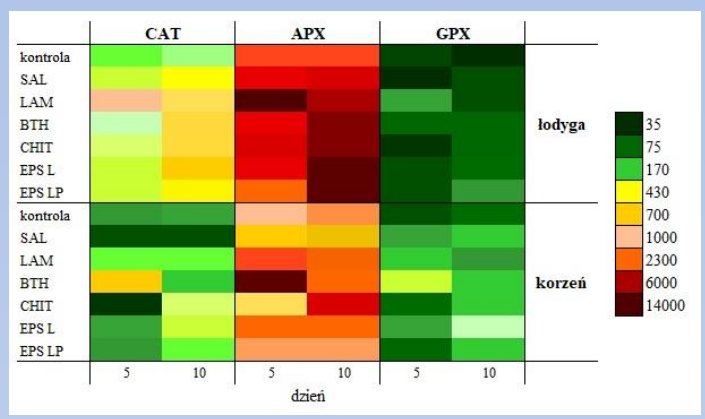


Rysunek 1. Skrócony model usuwania ROS w komórkach roślinnych z wyszczególnieniem katalazy (CAT), peroksydazy askorbinowej (APX), peroksydazy gwajakolowej (GPX) i reduktazy glutationowej (GR).

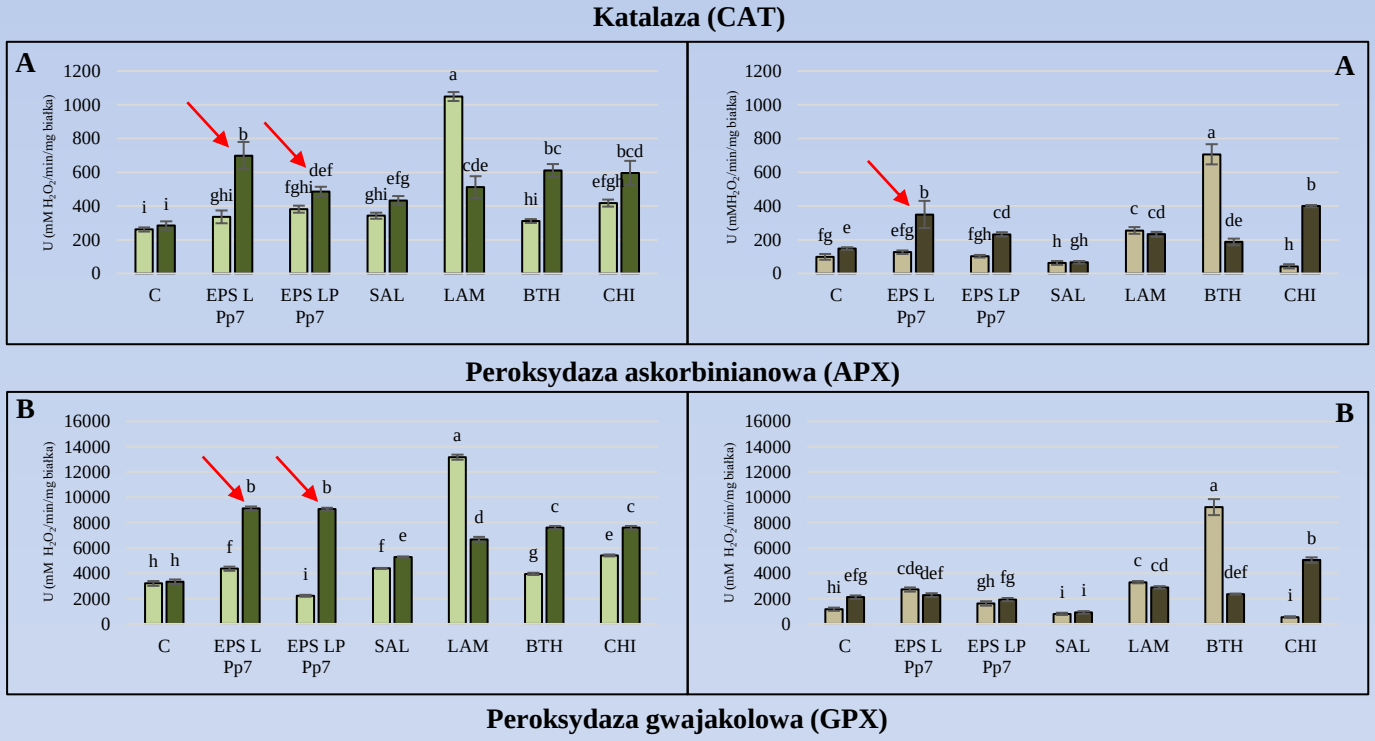
Wyniki



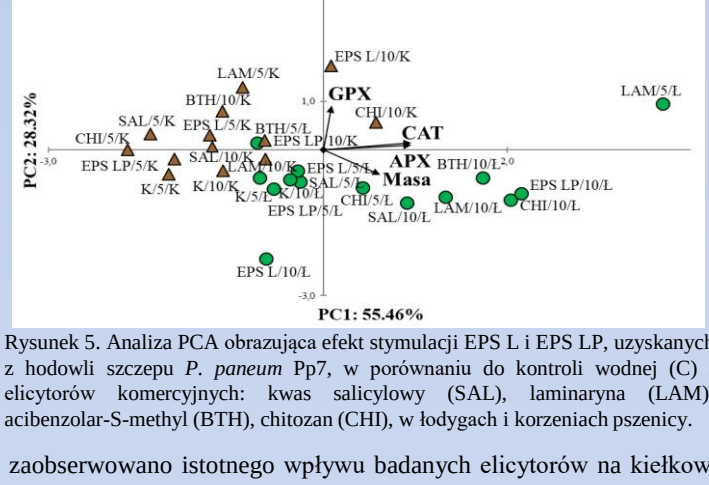
Rysunek 2. Świeża masa łodyg i korzeni po stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI).



Rysunek 3. Mapa cieplna obrazująca efekt stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI), w łodygach i korzeniach pszenicy.



Rysunek 4. Aktywność katalazy (A), peroksydazy askorbinianowej (B) i peroksydazy gwajakolowej (C) po stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI), w łodygach i korzeniach pszenicy.



Rysunek 5. Analiza PCA obrazująca efekt stymulacji EPS L i EPS LP, uzyskanych z hodowli szczepu *P. paneum* Pp7, w porównaniu do kontroli wodnej (C) i elicytorów komercyjnych: kwas salicylowy (SAL), laminaryna (LAM), acibenzolar-S-methyl (BTH), chitozan (CHI), w łodygach i korzeniach pszenicy.

Nie zaobserwowano istotnego wpływu badanych elicytorów na kiełkowanie nasion pszenicy. Po stymulacji EPS L i EPS LP, świeża masa łodyg wzrastała 2-krotnie, a korzeni 1,5-krtonie w 10 dniu wzrostu siewek, w porównaniu do kontroli wodnej (C) [Rys. 2].

Za pomocą mapy cieplnej zobrazowano zależność między poziomem enzymów antyoksydacyjnych po stymulacji badanymi elicytorami, a kontrolą wodną. Wpływ EPS L i LP na aktywność enzymatyczną był często podobny do elicytorów komercyjnych lub wyższy, jak w przypadku APX w łodygach lub GPX w korzeniach pszenicy [Rys. 3].

Najwyższy wzrost aktywności CAT obserwowano w łodygach pszenicy po 10. dniach inkubacji w wyniku inokulacji nasion EPS L (700 U) i LP (500 U). Co ważne aktywność ta była porównywalna do elicytorów komercyjnych. Z kolei aktywność CAT w korzeniach wzrastała do poziomu 300 U w obecności EPS L i 200 U w obecności EPS LP [Rys 4A].

Uzyskane EPS L i LP powodowały 3-krotny wzrost aktywność APX (~9000U) w łodygach po 10. dniach inkubacji. Była to wartość wyższa niż w przypadku stymulacji BTH, SAL i CHI. Nie obserwowano natomiast istotnego wpływu na poziom APX w korzeniach pszenicy [Rys. 4B].

Aktywność GPX po stymulacji badanymi elicytorami była 2-4-krotnie wyższa w korzeniach pszenicy niż w łodygach. Najistotniej na poziom GPX oddziaływał EPS L (300U) po 10. dniach inkubacji [Rys. 4C].

Analiza Głównych Składowych (PCA) [Rys. 5] wykazała, że zastosowane EPS wpływały na wzrost aktywności enzymów markerowych szlaków odporności roślin podobnie jak elicytory komercyjne oraz silniej niż kontrola wodna. Co więcej, EPS LP zwiększał istotnie świeżą masę łodyg pszenicy, podobnie jak elicytory CHI, SAL i BTH.

Materiały i Metody

W badaniach wykorzystano szczep *Penicillium paneum* Pp7 wyizolowany z gleby Spitsbergenu i przyporządkowany do gatunku na podstawie analizy sekwencji ITS1 i ITS4, porównując wyniki z bazą danych UNITE przy pomocy programu BLAST. Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) uzyskano z 6 dniowej hodowli na podłożu Czapek-Dox z 3% sacharozą i 0,75% peptonem w 20°C, 120 rpm, poprzez precypitację alkoholową 1:1. Połowę uzyskanych EPS poddano procesowi oczyszczania poprzez odbiałczanie (proteinaza K) i dializę. Uzyskane EPS liofilizowano uzyskując 2 frakcje: EPS L – polimery „surowe" i EPS LP – polimery „odbiałczane". Aktywność enzymów antyoksydacyjnych badano w korzeniach i łodygach siewek pszenicy (*Triticum aestivum*) odmiany Arkadia. Siewki inkubowano w obecności 0,05% zawiesin uzyskanych EPS oraz elicytorów komercyjnych: kwasu salicylowego (SAL), laminaryny (LAM), acibenzolar-S-methylu (BTH), chitozanu (CHI), przez okres 5. i 10. dni w temp. 20°C. Enzymy ekstrahowano 50 mM buforem fosforanowym o pH 7.5, z dodatkiem 1mM EDTA, 1mM PMSF, 5mM askorbinian sodu i 1% PVPP.

Aktywność enzymatyczną wyrażano w U (mM H_2O_2/tetra-gwajakolu/min/mg białka):

A. katalaza (CAT) - H_2O_2 rozłożonego przez okres 3 minut w buforze fosforanowym o pH 7.0;
B. peroksydaza askorbinianowa (APX) - H_2O_2 rozłożonego w obecności kwasu askorbinowego przez okres 3 minut w buforze fosforanowym o pH 7.0;
C. peroksydazę gwajakolową (GPX) - tetragwajakolu powstałego w wyniku transformacji gwajakolu przez okres 1 minuty w buforze fosforanowym pH 6.5.

Wniosek

Uzyskane polimery EPS L i LP z hodowli szczepu *P. paneum* wpływały na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach pszenicy. Efektywność stymulacji odporności badanymi polimerami była na poziomie elicytorów komercyjnych. Proces odbiałczania EPS nie wpływał w istotny sposób na efektywność indukcji odporności.

Literatura

1. Caverzan A., Casassola A., Brammer S.P., Reactive oxygen species and antioxidant enzymes involved in plant tolerance to stress, Chapter 20 in Abiotic and Biotic Stress in Plants: Recent Advances and Future Perspectives, InTech, 2016, 463-480
2. Das K., Roychoudhury A., Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, Front. Environ. Sci., 2014, 2(53)
3. Małecka A., Tomaszewska B., Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne, Postepy Biol Komorki, 2005, 32(2), 311-325
4. Li P., Haiyu L., Jiajia M., Weibo S., Xiaohan W., Shiqiong L., Youliang P., Ligang Z. Effects of oligosaccharides from endophytic *Fusarium oxysporum* Dzf17 on activities of defense-related enzymes *in Dioscorea zingiberensis* suspension cell and seedling cultures. Electron J. Biotechnol. 201, 17(4), 156–161
5. Chandrasekar B., Wanke A., Wawra S., Saake P., Mahdi L., Charura N., Neidert M., Mallisic M., Thiele, M., Dama, M. et al. Fungi hijack a ubiquitous plant apoplastic endoglucanase to release a ros scavenging β-glucan decasaccharide to subvert immune responses. Plant Cell, 2022, 00, 1-20

Działanie specyficznych metabolitów wtórnych *Solidago virgaurea* przeciw *Fusarium oxysporum* i *Neosartorya fischeri*

Marta Oleszek[1,2], Solomiia Kozachok[1], Łukasz Pecio[1,3], Karolina Oszust[2], Magdalena Frąc[2]
[1]Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Polska
[2]Institytut Agrofizyki, Polskiej Akademii Nauk, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Polska
[3]Uniwersytet Medyczny, Chodźki 1, 20-093 Lublin, Polska

Nawłoć pospolita, *Solidago virgaurea* L. (Asteraceae) jest rośliną wieloletnią, rosnącą naturalnie w Europie. Jej części naziemne zawierają znaczne ilości specyficznych metabolitów wtórnych o działaniu biologicznie aktywnym z grup: saponin, glikozydowych pochodnych kwasu benzoesowego, flawonoidów, kwasów fenolowych.

Materiał badawczy – suszona i zmielona część nadziemna *Solidago virgaurea* pozyskana z firmy zielarskiej Kawon-Hurt Company, Polska.

Cel badań – charakterystyka specyficznych metabolitów wtórnych, obecnych w zielu nawłoci pospolitej oraz ocena ich właściwości przeciwgrzybowych przeciwko *Fusarium oxysporum* i *Neosartorya fischeri*

Metodyka

Ekstrakcja – ekstrakt surowy (CE)

- 70% MeOH, 3 x 900 ml,
- 20 min., 25℃, ultradźwięki

Oczyszczanie ekstraktu surowego – ekstrakt oczyszczony (PE)

- SPE, złoże C18
- 0.1 % kwas mrówkowy w wodzie
- 0.1 % kwas mrówkowy w
- 95% metanolu

Frakcjonowanie – 6 frakcji metabolitów wtórnych F1-F6

Chromatograf semi-preparatywny Gilson

Złoże LH20, 0.1% kw. mrówkowy w 95% metanolu, przepływ 2.5 ml min^{-1}

Charakterystyka fitochemiczna otrzymanych frakcji

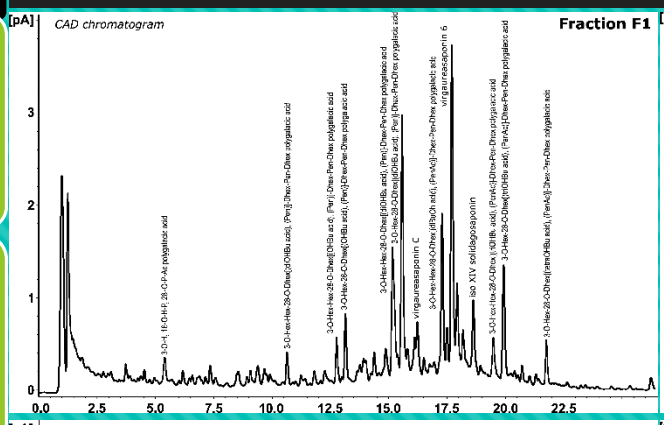
- Brucker UHPLC-CAD/QTOF-MS/MS

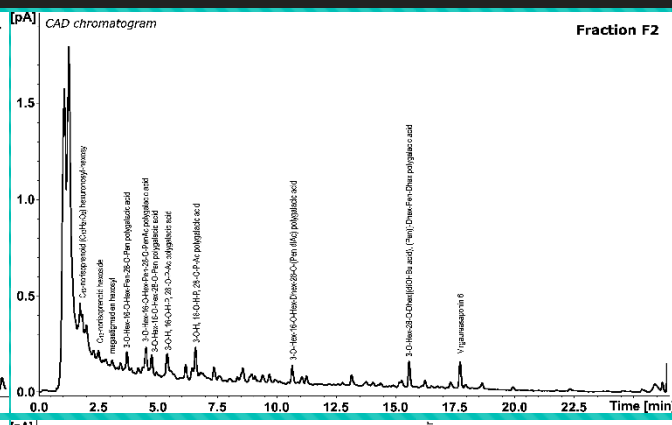
Aktywność przeciwgrzybowa

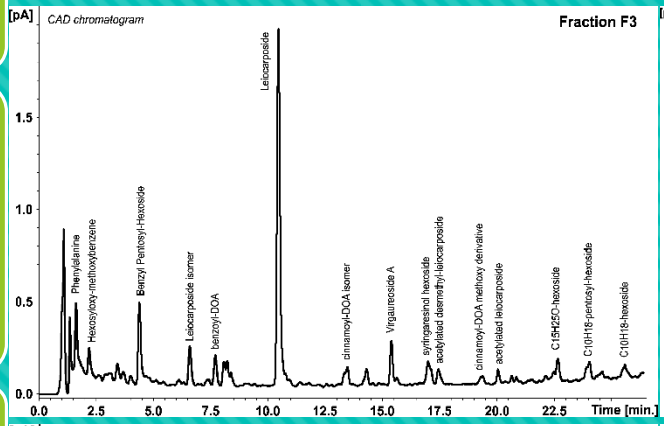
Fusarium oxysporum, Neosartorya fischeri

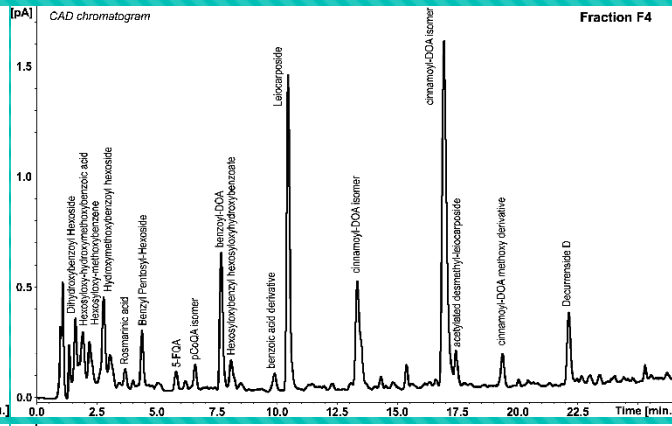
Biolog MT2

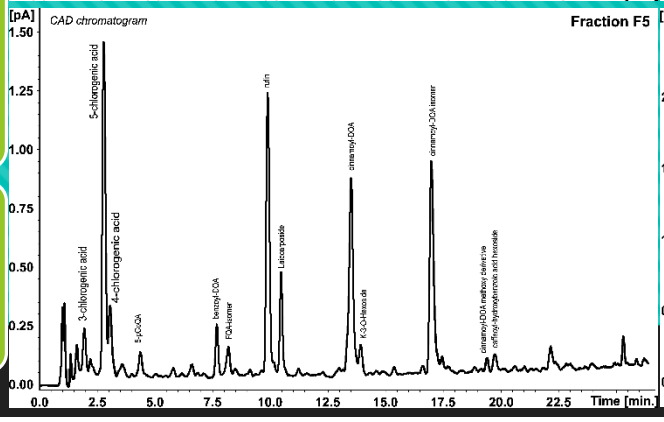
Wyniki metabolity wtórne *S.virgaurea*

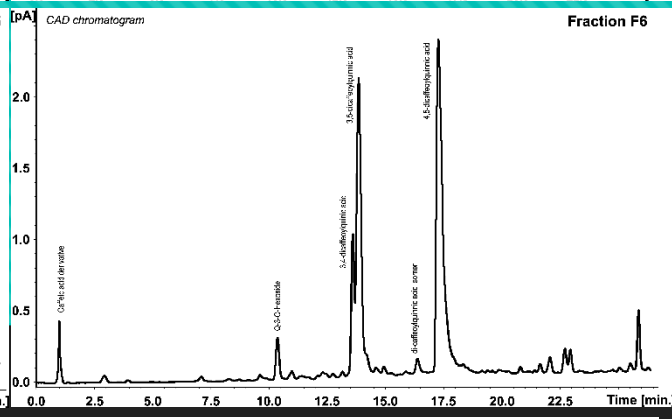




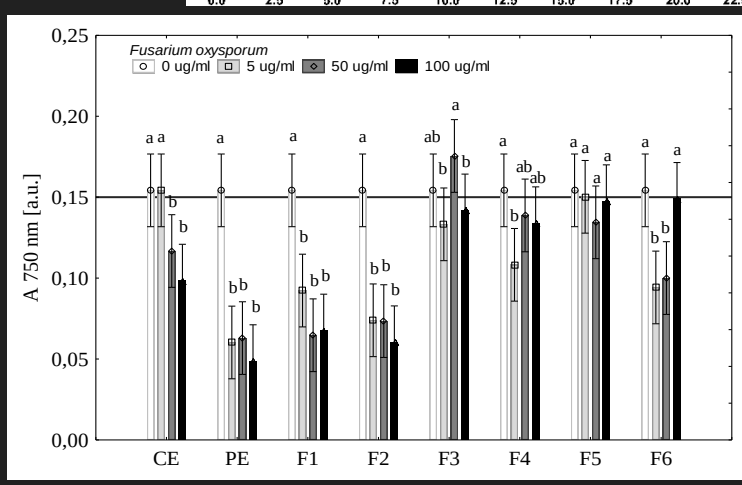


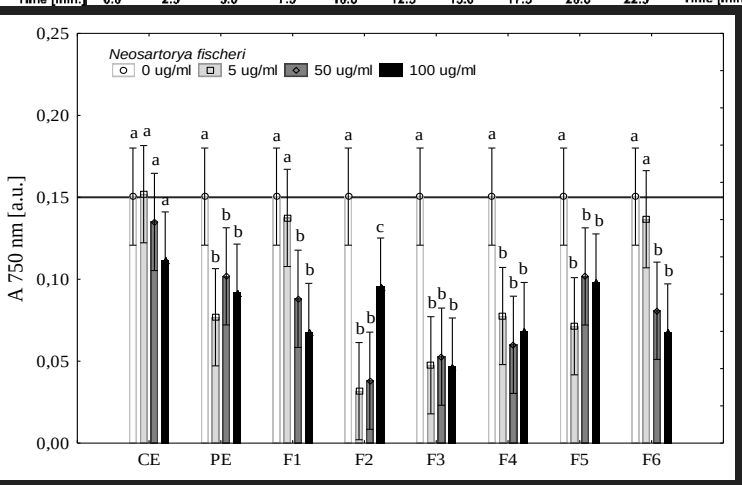






Wyniki
Aktywność Przeciwgrzybowa





Podsumowanie i wnioski

Związki obecne w ekstrakcie powodują istotną inhibicję wzrostu badanych grzybów. Jak wykazała analiza wpływu poszczególnych frakcji, najbardziej skuteczna przeciwko *N. fischeri* okazała się frakcja F3 zawierająca glikozydy kwasu benzoesowego, takie jak lejokapozyd i wirgaureozyd. Najsilniejszą inhibicję wzrostu *F.oxysporum* zaobserwowano po zastosowaniu frakcji saponinowej (F1).

The influence of selected redox dyes on the functionality of *Verticillium* and *Trichoderma* genera – a methodical aspect

Karolina Oszust*[1], Flavia Pinzari[2], Magdalena Frąc[1]

[1] Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin, Poland, **corresponding author: k.oszust@ipan.lublin.pl*
[2] Institute for Biological Systems (IBS), Council of National Research of Italy (CNR), Area della Ricerca di Roma 1, via Salaria Km 29,300, 00015 Monterotondo (RM), Italy

Abstract

The research goal was to **determine the redox dye type and its concentration** that reasonably and comparably reacts to the respiratory activity of *Verticillium* spp. and *Trichoderma* spp. isolates in the presence of a **model nitrogen source** ($(NH_4)NO_3$). Therefore, the commercial **D, E, and F Biolog™ redox mix dyes**, and 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (**TTC**; Tetrazolium chloride), Iodonitrotetrazolium chloride (**INT**), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (**MTT**) suspensions were evaluated in selected concentrations and their nutritive/toxic effects were described. The **1% F and 0.5% D Biolog™ dyes** were found to be the most appropriate for the **evaluation** of isolates belonging to the ***Verticillium* and *Trichoderma* genus**, using **Biolog™ PM-nitrogen plate** respiratory assays, for their extended functional evaluation.

Methods & Materials

Fungal isolates
The four isolates of *Verticillium* sp. G293/18 (V1) (GenBank: MT133324.1), G296/18 (V2) (GenBank: MT133320.1), G299/18 (V3) (GenBank: MT133319.1), G319/18 (V4) (GenBank: MT133325.1), and the four of *Trichoderma* sp. G63/18 (T1) (GenBank: MT558561), G64/18 (T2) (GenBank: MT558562), G70/18 (T3) (GenBank: MW233578.1), G78/18 (T4) (GenBank: MW205829.1) were tested as biological replications. These isolates were previously characterized.

Redox dyes
The six redox dyes D, E, and F Biolog™ (marked further as D, E, and F dyes, respectively), and 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC, Tetrazolium chloride) (Chemat, Gdańsk, Poland), 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium (INT, Iodonitrotetrazolium chloride) (Chemat, Gdańsk, Poland), and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT, Thiazolyl blue tetrazolium bromide) (Chemat, Gdańsk, Poland) were tested. Different concentrations of the dye type were investigated following the nutrition and toxicity tests.

Nutrition test
The nutrition test was performed in 0.9% NaCl. Sterile transparent 96-well microplates were inoculated with a volume of 180 µl of fungal spores suspended in 0.9% NaCl (73% Transmittance). Next, 20 µl of 10x concentrated dyes were added and mixed precisely to obtain final concentrations: 0.1% 0.5%, 1% and 2% of D, E, F dyes, or 0.1% 0.5% and 1% of MTT, TTC and INT dyes. The 0% dye addition (20 µl 0.9% NaCl) was the control for each dye. The 10x concentrated stock of D, E, and F dyes was prepared using 0.9% NaCl, while MTT, TTC, and INT dyes were prepared using 0.1 M HCl 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) solution. All ingredients were filtered through a syringe filter. Analyses were performed in three technical replications. The prepared microplate cultures with dyes addition were incubated in dark for ten days at 24°C. Every 24 hrs fungal functional response to dyes was measured. Absorbance readings were performed using Biolog™ MicroStation (Hayward, Canada) at 750 nm wavelength.

Model nitrogen substrate-based medium
The preliminary step was carried out, where a model nitrogen substrate concentration was established. The Ammonium nitrate ($(NH_4)NO_3$) (Sigma Aldrich™, Saint Louis, Missouri, USA) was proposed in the presented research. The following final concentrations: 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% and 0% (the control) were tested in the three media: PM3,5-8 inoculating fluid (PM) according to Biolog™ (Hayward, Canada) preparation protocol, IF-FF inoculating fluid (FF) (Biolog™, Hayward, Canada) and 0,9% NaCl (NaCl) each. The final concentrations of ingredients in PM were as follows: FF-IF 0.833x mM, D-glucose 100 mM, potassium phosphate (pH6.0) 5 mM, sodium sulfate 2 mM. Sterile transparent 96-well microplates were inoculated with a volume of 90 µl of fungal spores already suspended on a particular medium (73% T) and 10 µl of 10x concentrated $(NH_4)NO_3$ suspended in the tested media. The total volume of 100 µl was mixed thoroughly by pipetting. Analyses were performed in three technical replications. All ingredients were filtered through a syringe filter. Such prepared in microplates cultures were incubated in dark for ten days at 24°C. Every 24 hrs fungal absorbance readings were performed using Biolog™ MicroStation (Hayward, Canada) at 750 nm wavelength.

Toxicity test
The toxicity test was performed on a selected and described above PM medium with 0.1% $(NH_4)NO_3$ addition and the set of the redox dyes. Sterile transparent 96-well microplates were inoculated with a volume of 180 µl of fungal spores suspended in the 0.1% $(NH_4)NO_3$-PM medium (73% T). Then 20 µl of 10x concentrated dyes set with 0.1% $(NH_4)NO_3$ were added and mixed precisely to obtain final concentrations: 0.1% 0.5%, 1%, or 0.01% 0.05% and 0.1% of MTT and INT. The 10x concentrated stock of D, E, and F dyes were prepared using 0.9% NaCl, while MTT and INT by using 0.1 M HCl 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) solution. Analyses were performed in three technical replications. Such prepared microplate' cultures with different dyes supplementation were incubated in dark for ten days at 24°C. Absorbance readings were performed every 24 hrs using Biolog™ MicroStation (Hayward, Canada) at 490 nm and 750 nm wavelengths.

Statistics
An analysis of variance (ANOVA) with the comparisons of the mean values (of ten-day readings) between dyes concentrations was used with Tukey's post hoc honestly significant differences (HSD) at $p < 0.05$. Statistica 13.1 software (StatSoft®, Tulsa, Oklahoma, USA) was used. The analysis was performed using every 10-days readings. The PRIMER-e v. 7 software (Albany, Auckland, New Zeland) was used for isolates clustering following Euclidean distance and Multidimensional Scaling analysis (MDS) for visualizing the level of similarity of individual isolates depending on their reaction to nitrogen concentration or the dye`s dataset.

Introduction

Some species of the ***Verticillium*** fungal genus are **key soil-borne pathogens** of soft fruits. Due to consumers' rising interest in organic farming products, there is a need for natural plant protection products based on antagonistic microorganisms, limiting the damage caused by *Verticillium* on some fresh products. Among the fungi already in use for **biological control** of fungal pathogens, the most significant interest is invariably in ***Trichoderma*** isolates. This is due to their strong aggressiveness against phytopathogens (mycoparasitism, antibiosis, competition), effective stimulation of plant growth and defense mechanisms, and the ability to modify the rhizosphere microbiome. The mechanism of action of *Trichoderma* spp. against phytopathogens that has been least studied and described in the literature is **competition for nutrients**.

Phenotype MicroArray™ system (PM) can be efficiently applied to study the fungal use of different substrates as carbon or nitrogen sources. It is a sensitive, reliable, and repeatable method based on **functional fingerprinting**. However**, nitrogen is considered only marginally** compared to carbon sources, even if its presence is necessary for fungal conidiation and chlamydospores production. Nitrogen has an impact on fungal species' competitiveness in any ecological niche. Fungal phenotypic diversity is usually described based on differences in substrate catabolism or biomass production, but these parameters **are rarely combined and considered together**. The increase in fungal biomass can occur with the consumption of a small amount of substrate, corresponding to a condition of high metabolic efficiency. Conversely, an increased respiratory response of a fungus combined with low biomass production in the corresponding well can potentially **indicate a stressful condition**.

Nevertheless, the Phenotype MicroArray™ system **is not commercially supplied with a redox dye responsive to the respiratory activity** of fungi. Therefore, its addition was determined experimentally. Since redox dyes can be **toxic** to some fungal species or fungi can easily **use them as carbon sources** for biomass production, the research goal was to indicate the particular redox dye and its concentration with **the least nutritive and toxic effects**, and simultaneously a reasonable color formation enabling to quantify the respiratory processes and thus extend the functional evaluation of *Verticillium* and *Trichoderma* genera.

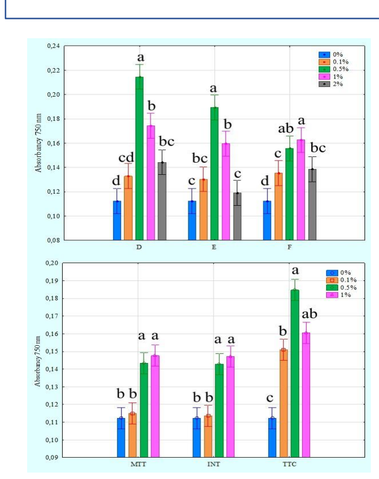


Figure 1. The nutritive effect of selected redox dyes on fungal growth in 0.9% NaCl medium, based on dyes` concentrations following 750 nm absorbance readings a) Biolog™ redox dyes, b) other dyes. *Explanations*: redox dyes D, E, and F Biolog™ (marked as D, E, and F, respectively), and 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC, Tetrazolium chloride), 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium (INT, Iodonitrotetrazolium chloride), and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT, Thiazolyl blue tetrazolium bromide). *Statistics*: ANOVA with Tukey's post hoc honestly significant differences (HSD) at $p < 0.05$; mean values and standard deviation bars are presented; n = 3; different small letters above bars indicate significant differences among different nitrogen concentrations for each redox dye type

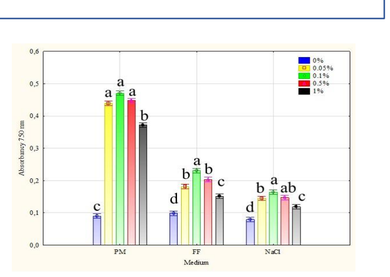


Figure 2. The biomass production in selected media of all tested *Verticillium* spp. and *Trichoderma* spp. isolates depending on the $(NH_4)NO_3$ concentrations based on absorbance readings at 750 nm.

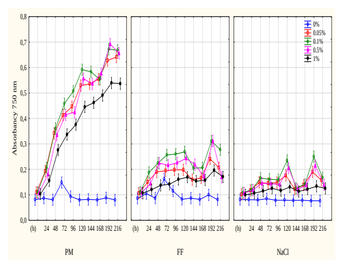


Figure 3. The rate of fungal growth within the 24-hrs in selected media of all tested *Verticillium* spp. and *Trichoderma* spp. isolates depending on the $(NH_4)NO_3$ concentrations based on absorbance readings at 750 nm.

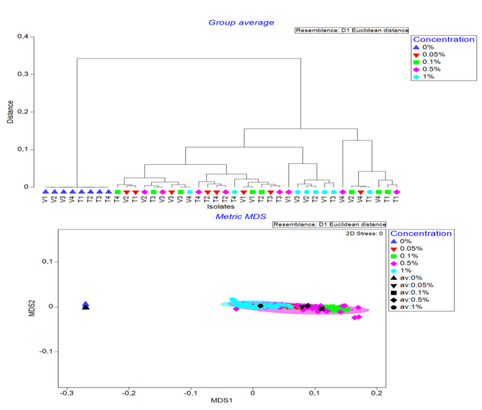


Figure 4. The diversity of *Verticillium* spp. (V1-V4) and *Trichoderma* spp. (T1-T4) individual isolates in terms of the biomass production (based on absorbance readings at 750 nm) depending on their reaction to different $(NH_4)NO_3$ concentrations in PM medium a) the clustering following the Euclidean distance; b) the metric Multidimensional Scaling analysis (MDS) based on the Euclidean distance.

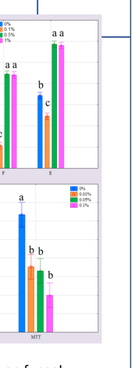


Figure 5. The toxicity effect of selected redox dyes on fungal growth in 0.1% $(NH_4)NO_3$-PM medium, based on dyes` concentrations following 750 nm absorbance readings, a) and b) and respiration based on absorbance 490 nm readings, c) and d). *Explanations*: redox dyes D, E, and F Biolog™ (marked as D, E, and F, respectively), and 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium (INT, Iodonitrotetrazolium chloride), and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT, Thiazolyl blue tetrazolium bromide). *Statistics*: ANOVA with Tukey's post hoc honestly significant differences (HSD) at $p < 0.05$; mean values and standard deviation bars are presented; n = 3; different small letters above bars indicate significant differences among different nitrogen concentrations for each redox dye type

Table 1. The toxicity dyes test schema**.** *Explanations*: V/T (x) - *Verticillium* spp./*Trichoderma* spp. (isolate acronym); Biolog™ redox dyes D, E, and F (marked as D, E, and F, respectively), and 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium (INT, Iodonitrotetrazolium chloride), and 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT, Thiazolyl blue tetrazolium bromide) with their different concentrations; n=3.

V/T (x)	dye	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	D	0.1%	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%	0.5%	1%	1%	1%
B	E	0.1%	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%	0.5%	1%	1%	1%
C	F	0.1%	0.1%	0.1%	0.5%	0.5%	0.5%	1%	1%	1%
D	INT	0.01%	0.01%	0.01%	0.05%	0.05%	0.05%	0.1%	0.1%	0.1%
E	MTT	0.01%	0.01%	0.01%	0.05%	0.05%	0.05%	0.1%	0.1%	0.1%

Results & Discussion

Achieving the overall aim of the work required ensuring that the proper dye is not toxic to fungi and simultaneously dye is not used as a carbon source to produce their biomass. An especially negative situation is where it is little or no additional carbon source available. Therefore, **the nutritive and toxicity effects** were tested. Appropriately, in the nutrition test, the expected convenient output was when fungi are relatively not capable to increase their biomass production. Therefore, the experiment was performed using saline as a low substrate medium.

Conversely, in the **toxicity test**, the expected positive result was the dye does not inhibit fungal growth significantly in the medium, where normally (without the dye added) the biomass production is observed. Since the medium would be eventually suitable for biomass density measurements, it was assumed the adequate one should meet the translucence conditions. Namely, it must transmit light on a level that allows measuring the rate of fungal growth. Therefore, the appropriate one was at the beginning selected in **the model medium and nitrogen selection step.** Importantly, simultaneous observation of color formation correlating with the respiratory processes of the examined should be possible. Additionally, obtaining sensible and reliable results in the toxicity test required attention paid to designating such a medium and nitrogen concentration that the tested fungi differentiate bare minimum. Thus, isolates' diversity was described.

The nutritive effect of selected redox Biolog™ dyes (Figure 1a) and other dyes (MTT, INT, TTC) (Figure 1b) on fungal growth in the low substrate (0.9% NaCl) medium, based on dyes` concentrations are presented. An evident nutritive effect was noted for 0.5% and 1% of all dyes types and 0.1 % of F and TTC, and 2% of F dye. No nutrition phenomena (a significant biomass production increase) was met for 0.1% D, E, F, MTT, and INT dyes addition. Since the TTC dye addition caused the nutritive effect in any tested concentration the TTC was excluded from the next main step of the experiments (the toxicity test).

In Figure 2. there are biomass production results in selected media of all tested *Verticillium* spp. and *Trichoderma* spp. isolates depending on the $(NH_4)NO_3$ concentrations presented. When comparing media, the greatest growth of fungi was noted for PM medium. Thus, the highest values of optical density (at 750 nm) were found for 0.05%, 0.1% and 0.5% nitrogen concentration. These were statistically higher than 1% and 0% (control). As it was predicted NaCl medium provoked the smallest biomass production. It was a trend noticed that for all tested media 0.1% nitrogen addition caused the greatest fungal biomass production.

Figure 3. shows the rate of fungal growth within the 24-hrs readings. The 0.1% $(NH_4)NO_3$-PM medium is once again the most noticeable with distinguished dynamics of fungal growth. These results allowed us to preliminarily point out the 0.1% $(NH_4)NO_3$-PM medium as the model one for the toxicity test.

Figure 4. presents the diversity of *Verticillium* spp. (V1-V4) and *Trichoderma* spp. (T1-T4) individual isolates in terms of biomass production (based on absorbance readings at 750 nm) depending on their reaction to different $(NH_4)NO_3$ concentrations in PM medium. Both presented graphs indicate the diversity among tested isolates occurred. All tested isolates cultured in control conditions (0%) were separated as well as most isolates cultured with 1% nitrogen addition. 0.05%, 0.1% and 0.5% nitrogen addition do not implicate clustering (Fig. 4a). However, the data transformation using the MDS analysis emphasized and confirmed that 0.1% nitrogen addition provokes quite similar fungal biomass production. It is because 0.1% nitrogen cultured isolates create the most compacted group compering to the other nitrogen concentrations, and what is more, the average value of biomass production for 0.1% has the most positive influence on MDS1.

Toxicity test results are presented in Figure 5. Firstly, the trend is the same for respiratory and biomass production functionality for all redox dyes tested. The predicted toxic influence, when Biolog™ dyes were considered, was met only for the lowest dyes concentration (0.1%). For higher concentrations (0.5% and 0.1%) the opposite effect was noted. Inevitably, increased production of biomass and respiratory activity were observed, especially much higher for E dye than D or F dyes.

As for MTT and INT, the general trend was that all proposed dye doses were toxic (0.01%, 0.05%, and 0.1%) since the inhibition of the fungal growth was noted, even 0.01% and 0.05% these were doses 10x lowered compering to the nutritional test. For 0.1% MTT and INT dose, the same significant inhibitory effect was also previously met. It indicates that MTT and INT are generally toxic for tested *Verticillium* spp. and *Trichoderma* spp. isolates, irrespectively to the used medium. This toxicity reached the point that fungi did not reach the positive readings with the threshold. In the PM methods (e.g. FF plates), it is A≥0.25. MTT and INT have failed to meet the requirements for redox dyes for the PM technic. For Biolog™ dyes potentially F and D. Substantially, 0.5% D and 1% F Biolog™ dyes could be acceptable for extended functional PM-nitrogen plate applications. This was confirmed by the satisfactory color formation presented in pictures collected in Figure 6.

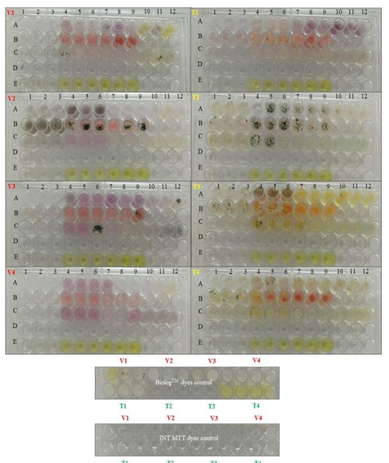


Figure 6. The color formation in the toxicity dyes test carried out in a 0.1% $(NH_4)NO_3$-PM medium**.** *Explanations*: *Verticillium* spp. (V1-V4) and *Trichoderma* spp. (T1-T4) isolates, Biolog™ redox dyes D, E, and F a) fungi + dyes, b) controls - fungi without dye; n=3. For dyes arrangement in a particular plate please see Table 1.

Conclusions

The 1% F and 0.5% D Biolog™ dyes were found to be the most appropriate for the functional evaluation of isolates belonging to the *Verticillium* and *Trichoderma* genus, using Biolog™ PM-nitrogen plate respiratory assays, for their extended functional evaluation

Acknowledgement

This paper was co-financed by The National Science Centre in the frame of the MINIATURA scientific activity, contract number 2021/05/X/NZ9/00341
and by The National Centre for Research and Development in the frame of the project BIOSTRATEG, contract number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR /2018

Wpływ kontaminacji gleby patogenem na skład mykobiomu ryzosfery wybranych odmian ziemniaka

Jacek Panek[1]*, Magdalena Frąc[1], Krzysztof Treder[2], Anna Pawłowska[2], Dorota Michałowska[2], Stefanie N. Vink[3] , Joana Falcão Salles[3]

[1]Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

[2]Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii, 76-009 Bonin

[3]Department of Microbial Ecology, Center for Evolutionary and Ecological Studies, University of Groningen, 9700 CC, Groningen, The Netherlands

* j.panek@ipan.lublin.pl

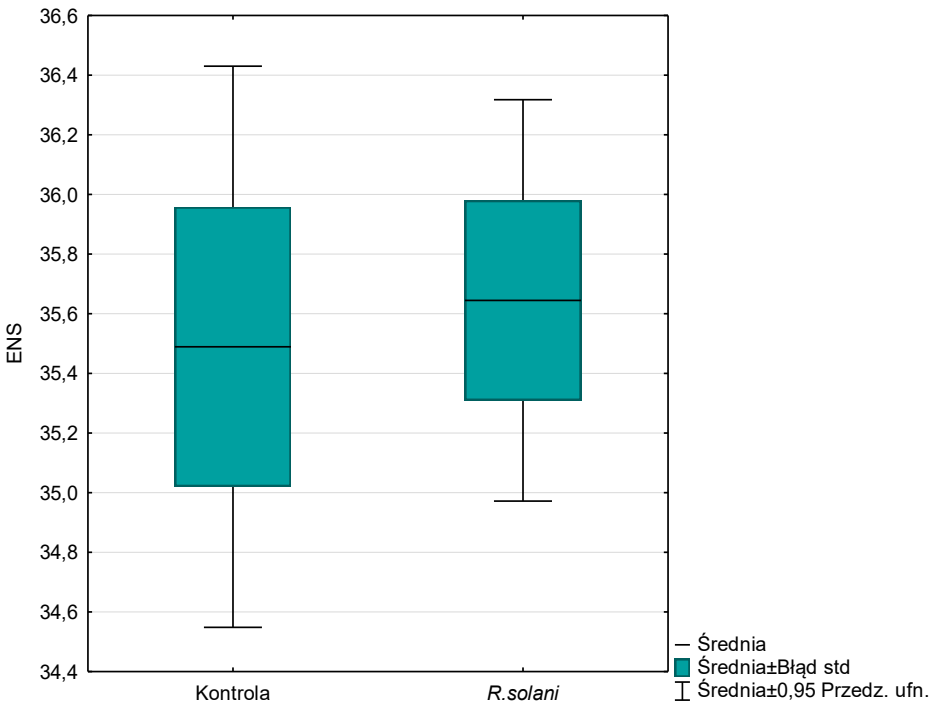
Ziemniak jest jedną z najpowszechniej uprawianych roślin na świecie, a Polska znajduje się wśród krajów o najwyższej produkcji tej rośliny w Unii Europejskiej. W ostatnich latach obserwuje się znaczny wzrost powierzchni upraw ziemniaków. Jednakże ze względu na zmieniające się warunki klimatyczne, powodujące wzrost podatności roślin na choroby, między innymi pochodzenia grzybowego, wymagania zrównoważonego rolnictwa i preferencje konsumentów, konieczne jest poszukiwanie odmian ziemniaków, które w naturalny sposób wchodzą w interakcje z pożytecznymi mikroorganizmami glebowymi oraz cechują się zwiększoną odpornością na choroby.

CEL BADAŃ

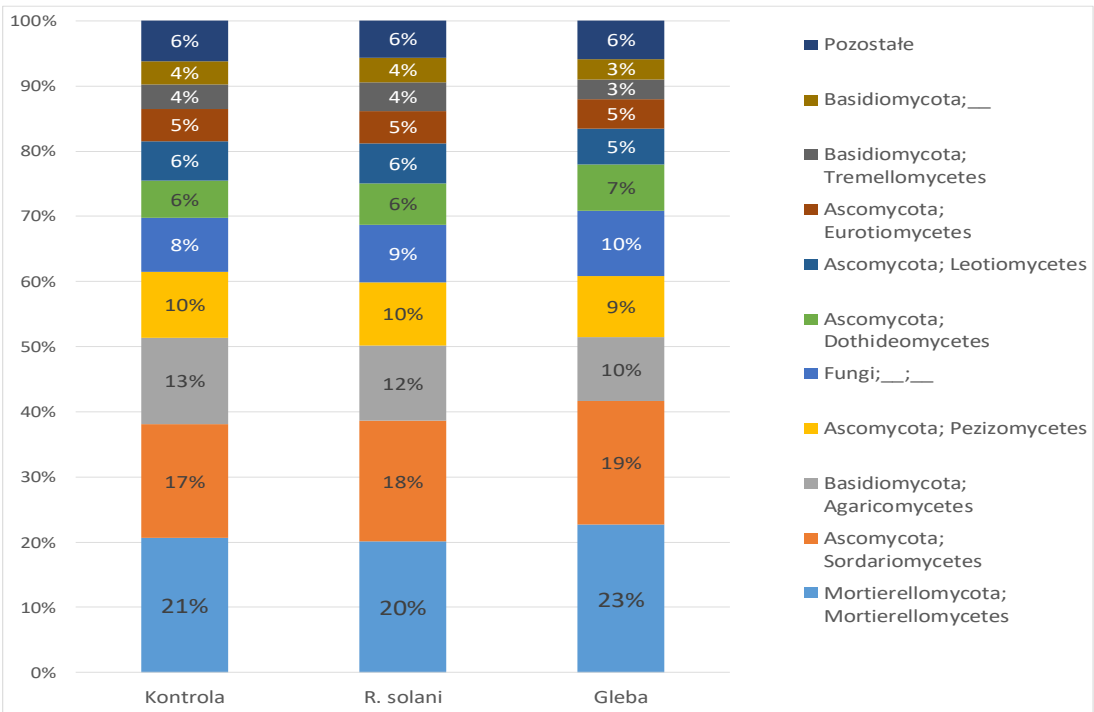
Celem badań było określenie zmian składu mykobiomu ryzosfery wybranych odmian ziemniaka pod wpływem kontaminacji gleby patogenem *Rhizoctonia solani*.

METODY

Próbki ryzosfery pobrano po 19 tygodniach wzrostu w wazonach. Badano 51 odmian ziemniaka oraz glebę kontrolną bez rośliny. Doświadczenie prowadzono w wariancie kontrolnym oraz wariancie, w którym gleba została zakażona patogenem, w 3 powtórzeniach. Zsekwencjonowano region markerowy ITS2 badanych próbek z wykorzystaniem technologii Illumina MiSeq. Uzyskane sekwencje analizowano w środowisku QIIME2, zaś identyfikację taksonomiczną wariantów sekwencji amplikonów (ASV) prowadzono w oparciu o bazę danych UNITE 8.2.



Rys. 1 Zmiana bioróżnorodności mykobiomu ryzosfery ziemniaków pod wpływem kontaminacji gleby przez R. solani



Rys. 2 Skład mykobiomu ryzosfery wybranych odmian ziemniaka w oparciu o analizę sekwencji ITS2

WYNIKI

W wyniku wstępnej analizy nie zaobserwowano istotnych różnic we wskaźniku bioróżnorodności ani w składzie mykobiomu pomiędzy wariantem kontrolnym, a infekowanym patogenem.

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu ERA-NET SusCrop, numer umowy SUSCROP/I/ POTATOMETABIOME/01/2019

INSTYTUT AGROFIZYKI PAN

The influence of pyroligneous acid (lat. *acetum pyro-lignosum*) application on the growth of *Botrytis cinerea* pythopathogen

Giorgia Pertile, Magdalena Frąc

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
e-mail: g.pertile @ipan.lublin.pl, m.frac@ipan.lublin.pl

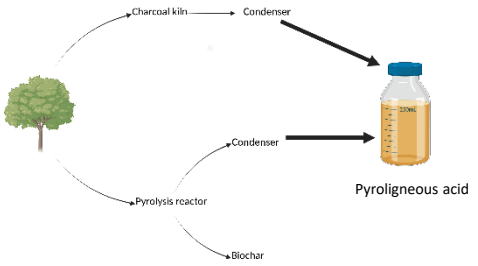
INSTITUTE OF AGROPHYSICS PAS

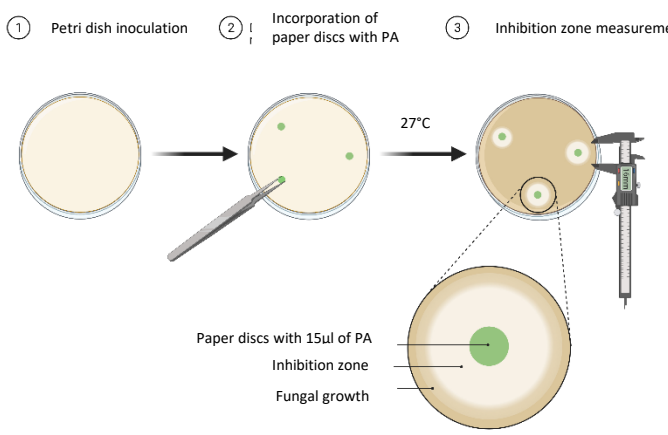
INTRODUCTION

In recent years, climate change has been challenging the achievement of high product quality and quantity to meet growing global demand. These phenomena adversely affect crops by bringing long periods of drought alternating with short periods of rain, creating favourable environments for the proliferation of pathogenic fungi. To protect the environment, the EU has drafted new decrees to safeguard the environment around us, encouraging the production of organic products without the use of pesticides or chemicals, leading to the origin of organic farming. In recent years, Poland has focused heavily on berry production, contributing 40% of the harvested area and yield in European strawberry production (FAOSTAT, 2022). Lately, due to climate change, farmers have found problems in stopping the proliferation of pathogenic fungi that lead to serious losses in the quality and quantity of the final product. *Botrytis cinerea* has considered the second most important phytopathogen. It is an economically important fungus, as it settles in the flower and does not appear until the fruit is fully ripe. In this project, we want to analyse a natural substance to slow down or stop the growth of *B. cinerea*. Recently, attention has begun to shift to the use of pyroligneous acid (PA, lat. *acetum pyro-lignosum*) because of its antimicrobial and antifungal properties (Grewal A. et al 2018). PA is a substance that can be obtained from the distillation of vapours obtained from the pyrolysis of wood (to obtain charcoal or biochar). This substance has already been tested against other fungi, such as *Alternaria mali*, *Trametes versicolor, Aspergillus niger* and *A. fumigatus* (Jung K.-H., 2007 and Suresh G. et al., 2019).
Our research aims to analyse six different concentrations of pyroligneous acid within an inhibition test towards three different *Botrytis cinerea* strains isolated from strawberry plants.

MATERIALS AND METHODS

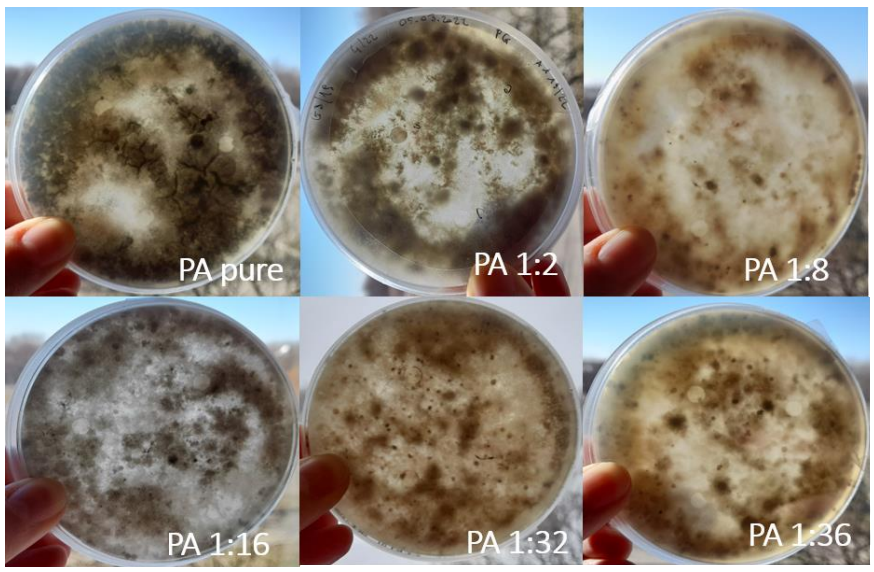
We pre-cultured in Potato Dextrose Agar medium (PDA) the three different strains of *B. cinerea* (G275/18, G323/18, and G3/19) at 27°C. After 5 days, we transferd a quarter of the fungal mycelium from the Petri dish into FF-inoculating fluid and measured the transmittance at 75% by turbinimeter (BIOLOG, USA). In each Petri dish, we spreaded 300 µl of the homogenised mycelium (at 75% of transmittance) and later applied 15 µl of the different PA concentrations (pure PA, 1:2, 1:8, 1:16, 1:32, and 1:36) to the culture media on three sterile paper disc.
Pyroligneous acid (PA) dilutions were prepared by using PA previously filtered through a 0.2 µm filter and then preparing the various dilutions with denaturalised sterile water. All plates were incubated at 27°C and every 24 hours the inhibtion zone was measured and photos taken.





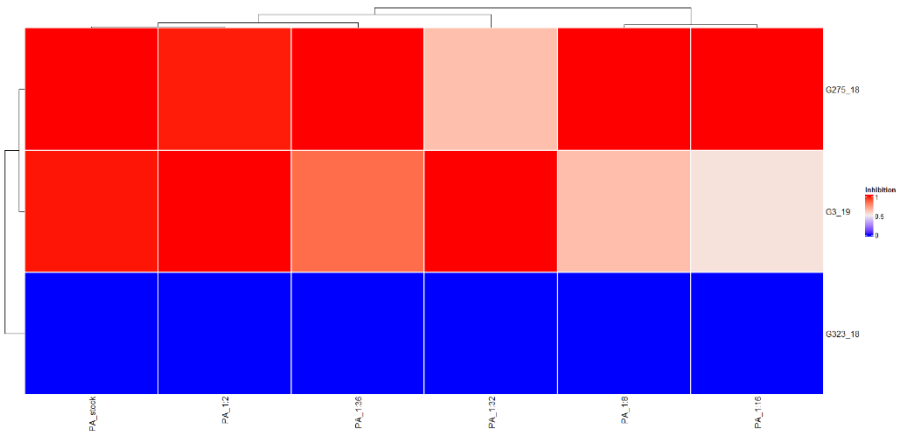
RESULTS

After 7 days of sampling, we could see how the application of pyroligneous acid can influence the growth of *Botrytis cinerea*. From the photos, we can see that this substance did not lead to clear creation of inhibition zones without mycelium growth around the paper disc. Starting with the application of the highest concentration, it can be observed that at any concentration applied, minimal inhibition of fungal mycelium growth can be observed.
A zone of inhibition can be considered as such when a fungus fails to grow in the area adjacent to the application of the test substance, but an inhibiting effect can also be the manifestation of a low-density mycelium, as this too can be considered a negative aspect on fungal growth. In fact, in our case at the end of the sampling, we noticed the formation of large areas where the mycelium growth was less dense, compared to normal growth. This can be seen very well by comparing the fungus exposed to a dilution of 1:8 versus pure PA.
By representing the measurements of the zones of inhibition by heatmaps, we can observe the separation of the dilution analysed into two large groups. The first group consists of pure PA, PA 1:2, and PA 1:36 where the greatest inhibition can be observed while the second group consists of two dilutions of PA at 1:8 and 1:16 where only one fungal strain is highly affected by the application of this substance. Then there is a final dilution (PA at 1:32) that is somewhere in between the two groups describe above. During sampling, we observed that a strain of *B. cinerea* G323/18 presented fast growth and no strong inhibition compared to the other two strains. In fact, this strain showed a zone di inhibition for pure PA (8.06 mm) and PA 1:2 (8.89 mm). In comparison, the other two strains presented inhibition zones from a maximum of 15 mm to a minimum of 7 mm.
Another thing that can be observed in the photos is that PA diluted with water can lead to a better inhibiting effect on mycelium growth as the aqueous solvent can allow for better dispersion leading to an effect not only at the point of application but also at other points. This observation is very noticeable when looking at photos comparing pure PA to any diluted PA.



CONCLUSION

This preliminary experiment confirmed the antifungal effects of pyroligneous acid. Analysing these 6 different dilutions of PA, we observed not a strong inhibition leading to destabilisation of the pathogenic fungus responding with no growth of the mycelium. In our case, we noticed a response from the fungus by changing the density of the mycelium, thus thinking of an interference of the substance on the normal metabolism of *B. cinerea*.



FAOSTAT (https://www.fao.org/faostat/en/#compare)
Grewal A., Abbey L., Rao Gunupuru L. (2018) Production, prospects and potential application of pyroligneous acid in agriculture. J Anal Appl Pyrolysis 135: 152-159
Jung K.-H. (2007) Growth inhibition effect of pyroligneous acid on pathogenic fungus, *Alternaria mali*, the agent of Alternaria blotch of apple. Biotechnol Bioprocess Eng 12: 318-322.
Suresh G., Pakdel H., Rouissi T., Kaur Brar S., Fliss I., Roy C. (2019) In vitro evaluation of antimicrobial efficacy of pyroligneous acid from softwood mixture. Biotechnol Res Innov 3: 47-53.

EcoFruits

This work was co-supported by The National Science Centre within the framework of the Miniatura-5, contract number DEC-2021/05/X/NZ9/01672 and The National Centre for Research and Development, the BIOSTRATEG programme, contract number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018

MINIATURA 5

Wpływ konsorcjum bakterii *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. i *Rhodococcus* spp. na skład taksonomiczny zbiorowisk grzybów zasiedlających ryzosferę i fylosferę malin w doświadczeniu wazonowym

Michał Pylak, Karolina Oszust, Jacek Panek, Magdalena Frąc
Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin; m.pylak@ipan.Lublin.pl; m.frac@ipan.lublin.pl

INSTYTUT AGROFIZYKI PAN

Wprowadzenie

Biopreparaty mikrobiologiczne stymulują **wzrost roślin** oraz **systemiczną odporność** na niekorzystne warunki środowiska. Mogą pozytywnie wpływać także na mikroorganizmy glebowe oraz zwiększać ilość dostępnych dla roślin **mikro i makro składników**.

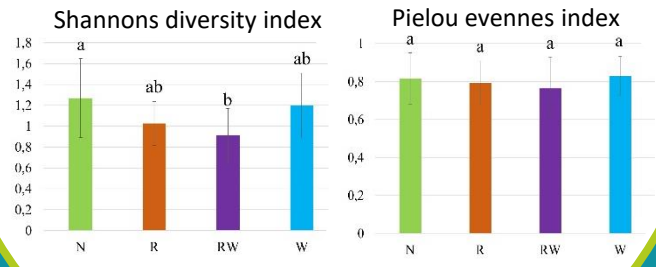
Naturalizacja to proces wprowadzania **rodzimych** mikroorganizmów do gleb uprawnych. Niezwykle istotne jest, aby wprowadzane bakterie i grzyby pochodziły **z takich samych roślin jak te na których będą stosowane**, oraz aby pochodziły z podobnej strefy klimatycznej. Zapewnia to ich maksymalną skuteczność w hamowaniu wzrostu **lokalnie występujących fitopatogenów.**

Materiały i metody

Doświadczenie wazonowe prowadzono w temperaturze **21°C** przy zachowaniu cyklu dnia i nocy o długościach **16 godzin dnia i 8 godzin nocy.** Doświadczenie trwało **8 tygodni.** Inokulum bakteryjne nanoszono **podczas sadzenia, podczas podlewania lub oboma sposobami.** Wykorzystano inokulum bakterii ***Arthrobacter* sp., *Pseudomonas* sp. i *Rhodococcus* spp.** wyizolowanych z **ryzosfery malin leśnych** i posiadających zdolność **hamowania wzrostu wybranych fitopatogenów.**

Wyniki

Zaobserwowano spadek wskaźnika różnorodności Shannona dla obiektów grzybowych po zastosowaniu naturalizacji. Wskaźnik równości Pielou dla tych próbek pozostał bez zmian.

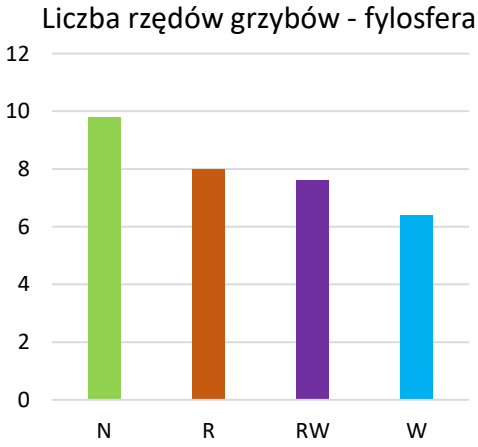


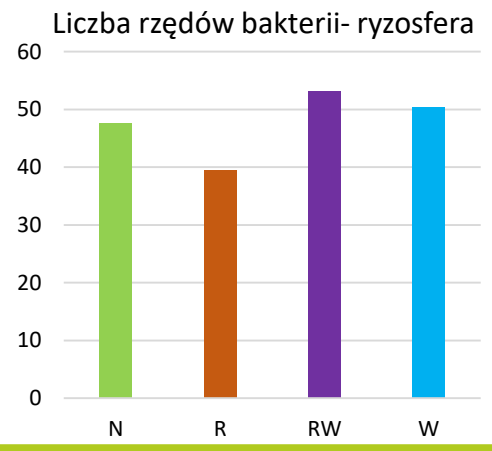
Materiały i metody

Aplikację inokulum patogenów przeprowadzono **podczas sadzenia** oraz **4 tygodnie później.**

Z próbek **ryzosfery** i **fylosfery** wyizolowano DNA, które poddano analizie różnorodności mikroorganizmów z użyciem sekwencjonowania następnej generacji **NGS,** środowisk **QIIME2.**

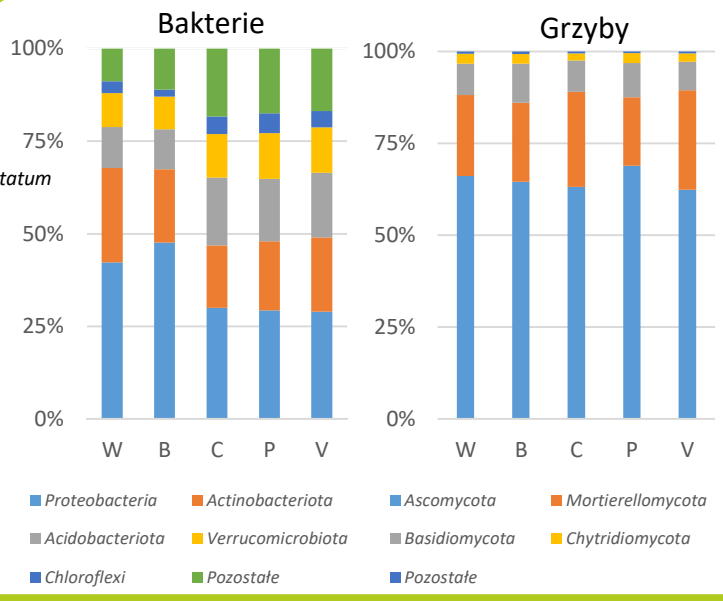
Wyniki





N – Bez naturalizacji
R – Naturalizacja korzeni
RW – Naturalizacja łączona
W – Podlewanie naturalizacyjne

W – Bez patogenów
B – *Botrytis cinerea*
C – *Colletotrichum acutatum*
P – *Phytophthora* sp.
V – *Verticillium* sp.



Wnioski

Ponad 75% bakterii i 95% mikroorganizmów grzybowych należało do odpowiednio 4 i 3 gromad. Dla bakterii były to *Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota* i *Verrucomicrobiota*. Dla grzybów były to *Ascomycota, Mortierellomycota* and *Basidiomycota.* Aplikacja inokulum spowodowała zmniejszenie wskaźnika różnorodności Shannona oraz liczby rzędów grzybów, co może wskazywać na przeciwgrzybicze działanie konsorcjum pożytecznych bakterii.

Finansowanie

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu BIOSTRATEG, numer umowy BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018

METANOTROFIA W AGROEKOSYSTEMACH – WPŁYW PRAKTYK ROLNICZYCH NA SKŁAD MIKROBIOMÓW GLEBOWYCH

Anna Pytlak[1], Anna Walkiewicz[1], Adam Kubaczyński[1], Anna Szafranek-Nakonieczna[2]

[1] Zakład Biogeochemii Środowiska Przyrodniczego,
Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
[2] Katedra Biologii i Biotechnologii Mikroorganizmów, Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu,
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów 1i, 20-708 Lublin

Wprowadzenie: metan należy do najważniejszych gazów szklarniowych obecnych w atmosferze. Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny wzrost stężenia tego gazu uważany jest za jedną z głównych przyczyn postępujących zmian klimatycznych. Czynnikiem obniżającym poziom atmosferycznego metanu jest aktywność bakterii metanotroficznych zasiedlających środowiska glebowe. Warunki bytowania tych mikroorganizmów w agroekosystemach uzależnione są od sposobu gospodarowania glebą oraz nawożenia. Dostępne badania wskazują, iż użytkowanie rolnicze w sposób istotny wpływa na pochłanianie metanu przez gleby (Szafranek-Nakonieczna i in. 2019, Kravchenko i in., 2017). Jednak pomimo wielu dekad badań w tym obszarze, wciąż nie zostało określone jaki dokładnie wpływ na skład społeczności bakterii metanotroficznych mają poszczególne zabiegi agrotechniczne. Zestawienie dostępnych informacji na temat wpływu praktyk rolniczych przedstawiono poniżej.

Nawożenie mineralnymi formami azotu: w glebach ubogich w azot, nawożenie wpływa stymulująco na aktywność społeczności metanotroficznych, a niski poziom tego pierwiastka jest podawany jako jeden z głównych czynników limitujących aktywność metanotroficzną w glebie. Jednocześnie mocznik jest uważany za nawóz niesprzyjający metanotrofii, z powodu obecności azotu w formie amidowej. W glebie przechodzi ona w formę amonową. Ze względu na podobnę strukturę, NH^+_4 konkuruje z metanem powodując inhibicję monooksygenazy metanowej. Zhang i in. (2018) wykazali iż nawożenie mineralne miało negatywny wpływ na obecność ***Methylosinus i Methylococcus.*** Van Dijk i in. (2021), analizując poszczególne formy azotu zauważyli natomiast pozytywny wpływ dodatku NH^+_4 na obecność ***Methylosarcina***, a Li i in. (2021) na obecność ***Methylocapsa***. Z kolei ***Methylosinus*** i ***Methylocysis*** były częściej reprezentowane w glebach o wyższym stężeniu NO_3^- (Li i in., 2021).

Nawożenie organiczne: zmienia fizyczne i chemiczne parametry gleby w zakresie determinowanym właściwościami samego dodatku, stosowanymi zabiegami, typem gleby i klimatem (Rayne i Aula, 2020). Nawozy organiczne regulują warunki bytowania metanotrofów stanowiąc źródło N, C i mikroelementów, poprawiając retencję wody poprzez zwiększanie zawartości materii organicznej oraz zmieniając pH gleby w kierunku zarówno zakwaszania jak i alkalizacji. Zauważono, że dodatek kompostu stymulował wzrost ***Methylocaldum*** (Brezinger i in. 2021). Obornik wykazywał zaś negatywny wpływ na ***Methylocaldum***, ***Methylococcus*** (Zhang i in. 2018), a zwiększona obecność przedstawicieli ***Methylococcaceae*** powodowała obniżenie emisji metanu ze stałego obornika podczas jego przechowywania (Chen i in. 2014). Istotny udział obornika w obiegu metanu powoduje, że prócz praktyk rolniczych, obok nawożenia, należy kontrolować również sposób i warunki jego przechowywanie.

Dodatek biowęgla: sprzyja sekwestracji C oraz poprawia strukturę i właściwości gleby tj.: pH, natlenienie, polową pojemność wodną (PPW), zawartość organicznego węgla (C_{org}) i azotu (N) (Luo i in., 2016; Paetsch i in., 2018). Te pozytywne zmiany parametrów glebowych wpływają na stan mikrobioty glebowej, szczególnie na różnorodność i liczebność zbiorowisk metanotroficznych. Wykazano m. in., że wzbogacenie gleby biowęglem ze zrębków drzewnych w dawce 30 Mg ha^{-1} doprowadziło do skutecznego i trwałego zwiększenia liczebności bakterii metanotroficznych z rodzju ***Methylocystis***, co miało również swoje odzwierciedlenie w poprawie szybkości utlenieania metanu (Kubaczyński i in., 2022). Także Huang i in., 2019 odnotowali związek między zwiększoną liczebnością bakterii z rodziny ***Methylocystaceae,*** a poprawą utleniania metanu w glebie, przy czym biowęgiel jednocześnie ograniczał liczebność przedstawicieli ***Methylophilaceae*** i ***Methylococcaceae***.

Proponowane kierunki badań: pomimo ogromnego znaczenia, wciąż niewiele projektów badawczych dedykowanych jest tej grupie mikroorganizmów. Mając na względzie rozwój technik badawczych w zakresie biologii molekularnej, do zdobycia głębszej wiedzy na temat funkcjonowania bakterii metanotroficznych w agroekosystemach mogłyby przyczynić się prace uwzględniające:

- **analizę składu społeczności mikroorganizmów, w oparciu o geny markerowe, charakterystyczne dla bakterii metanotroficznych (np. pmoA),**
- **analizę metatranskryptomów glebowych, pozwalające na uwidocznienie zmian na poziomie metabolicznym,**
- **badania modelowe, wskazujące na wpływ środków agrochemicznych (np. herbicydów) na bakterie metanotroficzne.**

Literatura

Brenzinger i in. 2021 https://doi.org/10.1007/S00374-021-01599-5/FIGURES/6; Chen i in. 2014 https://doi.org/10.1111/1574-6941.12417; Huang i in. 2019 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133594; Kravchenko 2017 https://doi.org/10.1007/978-3-319-49727-3_10; Kubaczyński i in. 2022 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151259; Li i in. https://doi.org/10.1038/s41598-021-84422-3; Luo i in. 2016 https://doi.org/10.1007/s11368-016-1483-5; Paetsch 2018 https://doi.org/10.1038/s41598-018-25039-x; Rayne i in. 2020 https://doi.org/10.3390/soilsystems4040064; Szafranek-Nakonieczna i in. 2019. https://doi.org/10.1007/s00248-018-1248-3; van Dijki i in. 2021 https://doi.org/10.1007/s00374-021-01579-9; Zhang i in. 2018 https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.02.01

Praca powstała częściowo w wyniku realizacji projektu badawczego nr 2021/41/B/NZ9/03130, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz projektu ReLive współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu ERA-NET 2021 Joint Call on Circularity.

Efekt odporności na nicienie entomopatogeniczne a skład mikrobioty jelitowej na przykładzie larw owadów z rodziny *Scarabaeidae*

Ewa Sajnaga[1*]; Marcin Skowronek[1]; Agnieszka Kalwasińska[2]; Magdalena Lis[1], Waldemar Kazimierczak[1]; Monika Elżbieta Jach [3]
[1] Katedra Biomedycyny i Nauk o Środowisku KUL Lublin; [2] Katedra Mikrobiologii Środowiskowej i Biotechnologii UMK, Toruń; [3] Katedra Biologii Molekularnej KUL, Lublin

Streszczenie

W oparciu o hipotezę, że skład mikrobioty żywiciela może mieć związek z cechą odporności na nicienie entomopatogeniczne (EPN), porównaliśmy mikrobiotę bakteryjnej jelita środkowego larw odpornych na EPN i larw kontrolnych dwóch gatunków chrząszczy stosując sekwencjonowanie nanoporowe.

Mikrobiota bakteryjna jelita środkowego osobników odpornych w stosunku do kontroli wykazywała niższy lub niezmieniony wskaźnik bioróżnorodności w przypadku, odpowiednio, *Amphimallon solstitilae* i *Melolontha melolontha*. U obydwu badanych gatunków stwierdzono także różnice w strukturze społeczności bakteryjnej jelita, co dotyczyło głównie zmian w ilości niektórych rodzajów bakterii.

Przeprowadzane badania mają charakter wstępny i wymagają kontynuacji, jednak wskazują na przydatność analiz metataksonomicznych do badania związków miedzy mikrobiotą owadów a odpornością na EPN, co w przyszłości może zaowocować opracowaniem lepszych metod biokontroli szkodliwych owadów.

Wstęp

Larwy owadów z rodziny *Scarabaeidae* są żerującymi w glebie szkodnikami roślin, które zwalcza się m.in. przy użyciu nicieni entomopatogenicznych (EPN) jako biopreparatów. Jelito owada jest zasiedlone przez bogatą społeczność mikroorganizmów, która zapewnia szereg korzyści gospodarzowi, w tym ochronę przed patogenami. Symbionty jelitowe wykorzystują do tego celu różne mechanizmy.

Celem pracy było zbadanie czy istnieje związek między składem mikrobioty jelitowej larw a cechą odporności na infekcję przez nicienie entomopatogeniczne (EPN) na przykładzie dwóch gatunków owadów: guniaka czerwczyka (*Amphimallon solstitile*) i chrabąszcza majowego (*Melolontha melolontha*) . Analizie poddano owady kontrole (13 osobników – guniak czerwczyk; 14 - chrabąszcz majowy) oraz odporne na nicienie (15 osobników - guniak czerwczyk; 13 - chrabąszcz majowy) [Sajnaga et al. 2021; Sajnaga et al. 2022]

Praca ta stanowi kontynuację wcześniejszych badań, w której z jelita środkowego chrabąszcza majowego wyizolowano szereg gatunków bakterii wykazujących właściwości antagonistyczne w stosunku do symbiontów bakteryjnych nicieni, które następnie zidentyfikowano [Skowronek et al. 2020; Skowronek et al. 2021].

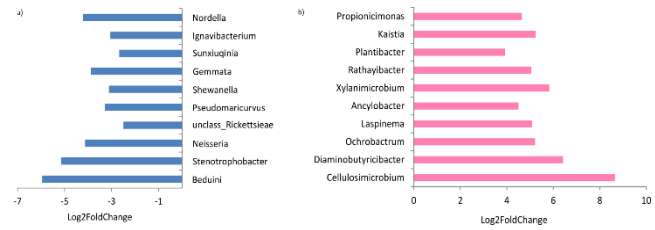
Materiały i metody

W pracy porównywano skład mikrobioty jelitowej grupy owadów kontrolnych z wyselekcjonowana grupą owadów niewrażliwą na nicienie. Larwy owadów pochodziły z regionu Lubelszczyzny. W laboratorium część losowo wybranych larw poddano ekspozycji na różne gatunki EPN, a osobniki które nie uległy zakażeniu stanowiły grupę odporną na EPN. Larwy, które nie były pooddawane ekspozycji stanowiły grupę kontrolną.
Skład mikrobioty jelitowej określono poprzez sekwencjonowanie nanoporowe (GridION X5, Oxford Nanopore Technologies) przeprowadzone w firmie genXone). Analizie poddano fragment genu 16S rRNA zawierający wysoce zmienne domeny V3-V8 o długości ok. 1000 pz.

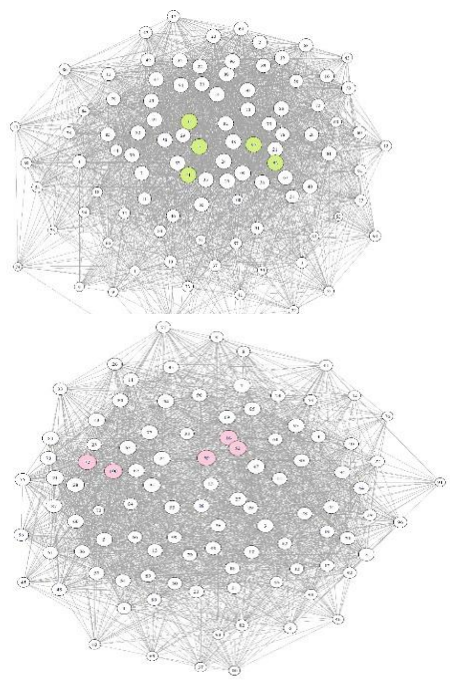
Analizę bioróżnorodności mikrobioty przeprowadzono za pomocą programów: R phylosec, R vegan i Past. Sieci mikrobiomu konstruowano przy użyciu pakietów igraph, qgraph, vegan i MCL w programie R metodą SparCC, zaś do analizy różnicowej zawartości taksonów zastosowano program DESeq2.

Tabela 1. Analiza mikrobioty guniaka czerwczyka - wskaźniki bioróżnorodności

Wskaźniki	Kontrola	Odporne	Rodzaj statystyki	Wartość	P-wartość
	N=13	N=15			
Sobs	1055	865	t	1.94	0.064
Shannon	4.36	3.53	t	2.82	0.013
Simpson	8.21	6.29	Mann-Whitney U	56	0.059
Evenness	8.79	5.71	Mann-Whitney U	40	0.009



Rys. 2. Analiza mikrobioty guniaka czerwczyka przy użyciu programu DESeq2 – wykresy przestawiają rodzaje bakterii których ilość była znacząca różna pomiędzy badanymi grupami

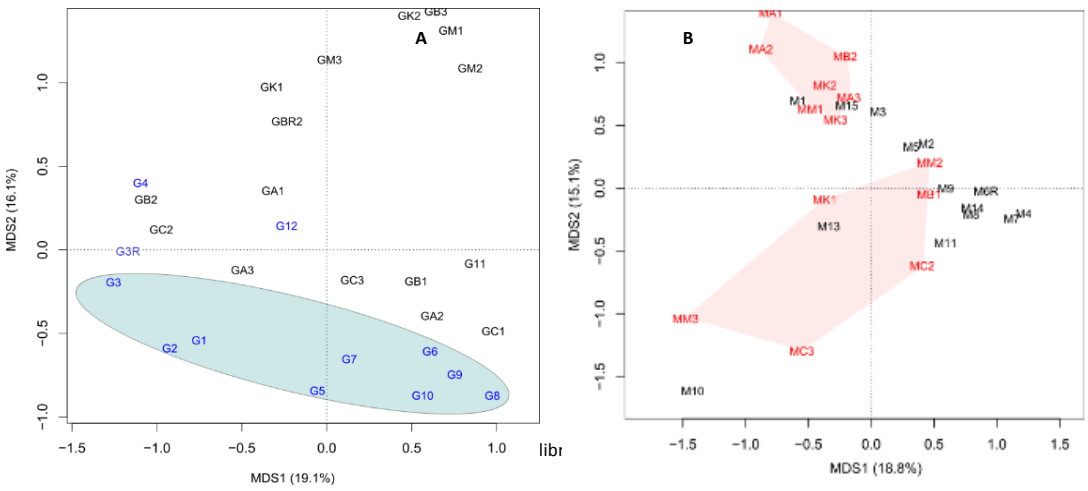


Rys 3. Sieci mikrobioty na poziomie rodzajów dla próbek z guniaka czerwczyka; A – grupa kontrolna; B – grupa odporna na nicienie

Wyniki

Mikrobiota jelita środkowego grupy larw odpornych na nicienie w porównaniu do larw kontrolnych wykazywała znaczne różnic pod względem bioróżnorodności oraz składu taksonów :

- wskaźniki równocenności Shannon-Wiener i Evenness były: 1/ znacząco wyższe w grupie larw kontrolnych niż odpornych na nicienie - w przypadku guniaka czerwczyka (Tabela 1); 2/ nie wykazywały różnic – w przypadku chrabąszcza majowego;
- Analiza PCoA i ANOSIM wyodrębniła grupę larw z grupy kontrolnej, które grupują się razem, co oznacza, że skład ich bakterii jelitowych jest odmienny od pozostałych larw u obydwu badanych gatunków owadów (Rys. 1);
- Analiza DESeq2 wykazała, że grupa larw odpornych na nicienie różniła się zawartością wielu rodzajów bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej u obydwu badanych gatunków owadów (Rys. 2);
- Sieci mikrobioty wraz z gatunkami kluczowymi były inne dla każdej z badanej grup owadów u obydwu badanych gatunków owadów (Rys. 3).



Rys 1. Analiza różnorodności mikrobioty za pomocą PCoA ; A - guniak czerwczyk; B – chrabąszcz majowy chrabąszcz majowy

Conclusions

Mikrobiota jelita środkowego grupy larw odpornych na nicienie różniła się pod względem zawartości niektórych gatunków bakterii w porównaniu do larw kontrolnych i częściowo bioróżnorodności.

- Różnice te mogą stanowić podłoże różnej podatności owadów na infekcję nicieniami;
- Możliwe jest także, że zaobserwowane różnice w składzie mikrobioty są następstwem ekspozycji larw odpornych na nicienie;
- Aby wyjaśnić związek między mikrobiotą jelitową owadów a cechą odporności na owady należy rozszerzyć badania o inne metody, np. testoweanie odporności owadów z zastosowanie antybiotyków w celu eliminacji bakterii jelitowych.

***Kontakt**

Ewa Sajnaga
Katedra Biomedycyny i Nauk o Środowisku
Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
Email: esajnaga@kul.pl
Phone: 81 4545636

Literatura:

Skowronek M., Sajnaga E., Pleszczyńska M., Kazimierczak W., Lis M., Wiater A. 2020. Int. J. Mol. Sciences 21, 580; doi:10.3390/ijms21020580

Skowronek M., Sajnaga E., Pleszczyńska M., Kazimierczak W., Lis M., Wiater A. 2021. . Int. J. Mol. Sciences, 22, 12005; doi:10.3390/ijms222112005

Sajnaga E., Skowronek M., Kalwasińska A., Kazimierczak W., Ferenc K., Lis M., Wiater A. 2021. Pathogens 10, 396; doi:10.3390/pathogens10040396

Sajnaga E., Skowronek M., Kalwasińska A., Kazimierczak W., Lis M. Jach ME, Wiater A. 2022. Int. J. Environm. Res. Public Health 19, 3480; doi:10.3390/ijerph19063480

Granty:

Badania były częściowo finansowana z grantu NCN nr 2016/21/B/NZ9/01865

© Poster Template by Genigraphics® 1.800.790.4001 www.genigraphics.com

SELEKCJA SZCZEPÓW BAKTERII DO AKWAPONICZNEJ UPRAWY SAŁATY RZYMSKIEJ

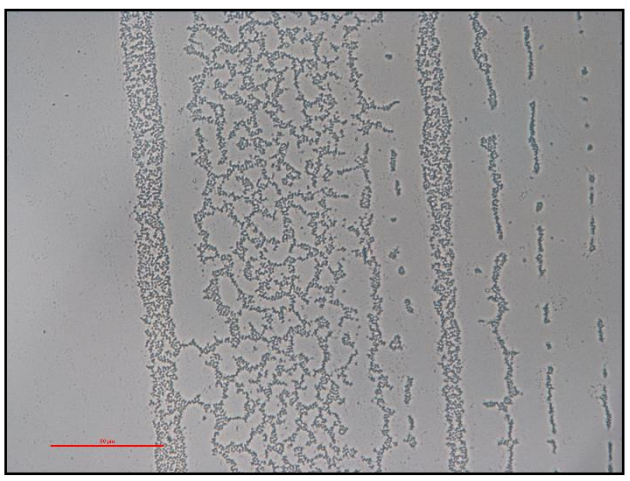
Lidia Sas-Paszt, Paweł Trzciński, Anna Lisek, Stanisław Kaniszewski, Sławomir Głuszek, Krzysztof Górnik, Beata Sumorok, Edyta Derkowska, Mateusz Frąc, Michał Przybył, Krzysztof Weszczak
Instytut Ogrodnictwa-PIB, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
e-mail: Lidia.Sas@inhort.pl

WSTĘP

Opracowano innowacyjny system całorocznej produkcji sałaty rzymskiej i hodowli ryb słodkowodnych, przy wykorzystaniu technologii akwaponicznej i konsorcjów pożytecznych mikroorganizmów. Celem badań była selekcja szczepów bakterii przeznaczonych do stymulacji wzrostu, plonowania i ochrony roślin sałaty rzymskiej przed wybranymi patogenami w uprawie akwaponicznej.

MATERIAŁY I METODY

Izolaty bakterii uzyskano z próbek osadów odchodów ryb i z gleby ryzosferowej roślin sałaty w uprawie akwaponicznej. Charakterystyka izolatów obejmowała właściwości udostępniania jonów fosforu, degradacji chityny, syntezy sideroforów, IAA, dehydrogenaz w obecności NH_4Cl oraz antagonizmu wobec *Phytophthora cactorum*. Wyselekcjonowane izolaty zidentyfikowano na podstawie sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA, poprzez porównanie uzyskanych sekwencji z danymi zgromadzonymi w bazie NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov).



Fot. 1. Komórki szczepu RXAAC *(Klebsiella* sp.). Preparat utrwalony alkoholem metylowym. Materiał pochodzący z 24 godzinnej hodowli, 26°C, pożywka PCA.

PODSUMOWANIE

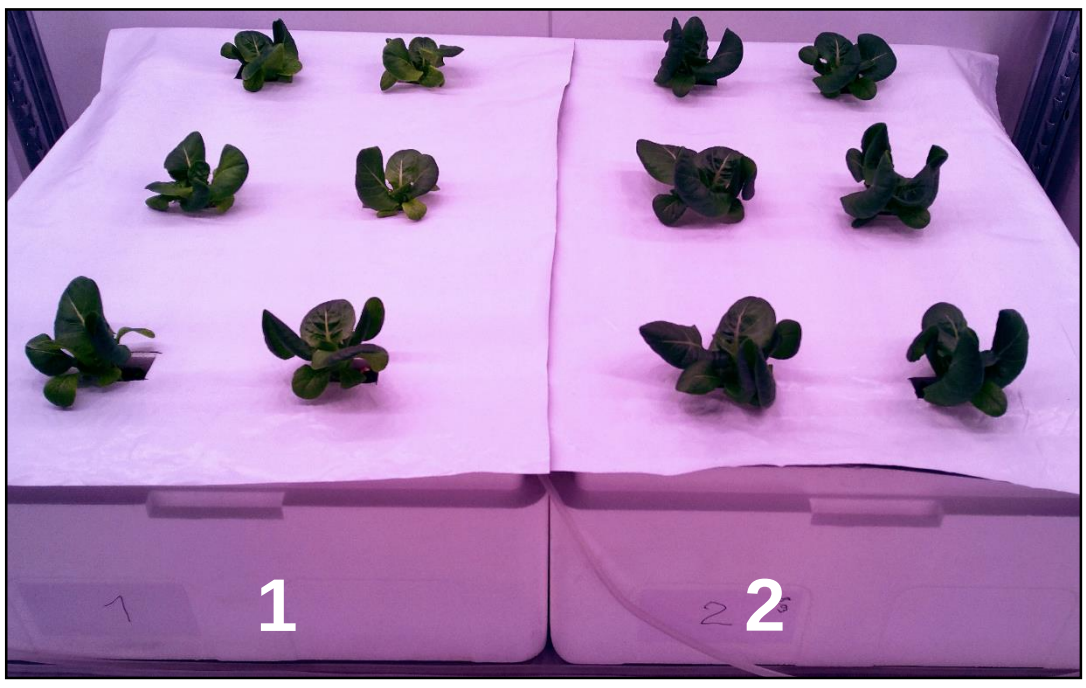
1. **Wyselekcjonowano 15 szczepów bakterii o działaniu biostymulującym i ochronnym w akwaponicznej uprawie roślin sałaty rzymskiej oraz utleniających toksyczne dla ryb i korzeni roślin jony amonowe (z wody i filtrów) do formy azotanowej.**
2. **Wyselekcjonowane najbardziej wartościowe szczepy bakterii są komponentami konsorcjów mikrobiologicznych do hodowli ryb i akwaponicznej uprawy sałaty rzymskiej: konsorcjum do rozkładu odchodów rybich oraz dwa konsorcja do stymulacji wzrostu i ochrony roślin sałaty rzymskiej w uprawie akwaponicznej.**

WYNIKI

Spośród 153 izolatów bakterii wyselekcjonowano 15 najlepszych szczepów z gleby ryzosferowej roślin sałaty rzymskiej, o właściwościach formowania biomasy w obecności chlorku amonu, zwiększania przyswajania jonów fosforu przez rośliny, degradacji chityny koloidalnej, syntezy sideroforów, IAA oraz zdolności do ograniczania występowania patogena *Phytophthora cactorum*. Na podstawie analizy genu 16S rRNA określono przynależność izolatów bakterii do rodzajów: *Amnimonas*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Nocardia*, *Chryseobacterium*, *Sediminibacterium*, *Gemmobacter*, *Bacillus*, *Priestia*, *Glutamicibacter*, *Cytobacillus*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Peribacillus/Brevibacterium*.

Tabela 1. Charakterystyka i identyfikacja wyselekcjonowanych szczepów bakterii przeznaczonych do uprawy akwaponicznej roślin sałaty rzymskiej

Cecha	Liczba izolatów	Identyfikacja
Udostępnianie fosforu	11	*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Priestia* sp., *Peribacillus* sp./ *Brevibacterium* sp.
Degradacja chityny	11	*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Priestia* sp.
Synteza sideroforów	13	*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Priestia* sp., *Glutamicibacter* sp., *Cytobacillus* sp.
Synteza IAA	11	*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Priestia* sp., *Glutamicibacter* sp., *Cytobacillus* sp., *Peribacillus* sp./ *Brevibacterium* sp.
Antagonizm do *P. cactorum*	8	*Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Priestia* sp., *Peribacillus* sp./ *Brevibacterium* sp.
Formowanie biomasy w obecności chlorku amonu	15	*Amnimonas*, *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Sediminibacterium*, *Gemmobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*
Synteza dehydrogenaz w obecności chlorku amonu	2	*Klebsiella* sp.



Fot. 2. Rośliny sałaty rzymskiej uprawiane w systemie akwaponicznym, przy świetle niebieskim (13 dzień uprawy). 1 - rośliny kontrolne, 2 - rośliny inokulowane szczepami bakterii *Klebsiella* sp. (RXAAC, RXBAB).

Projekt współfinasowany przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020. Działanie 1.1 Umowa nr POIR.01.01.01-00-0579/19-00 z dnia 26.11.2019
Tytuł projektu: „Plantlab – innowacyjny system całorocznej produkcji sałaty rzymskiej oraz ryb słodkowodnych przy wykorzystaniu technologii aquaponicznej."

VI Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne *„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK" 2022*

„Zmiany w strukturze taksonomicznej bakterii i genach lekooporności w glebie nawożonej osadem ściekowym - badania wstępne"

Liliana Serwecińska[1], Magdalena Urbaniak[1,2] , Elżbieta Mierzejewska[2], Wojciech Tołoczko[3]

[1] Europejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii, Polska Akademia Nauk, ul.Tylna 3, 90-364 Łódź

[2] Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

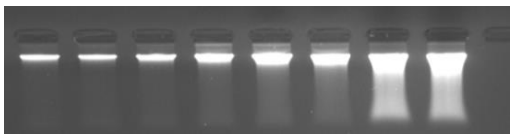
[3] Katedra Geografii Fizycznej, Wydział Nauk Geograficznych, Uniwersytet Łódzki, ul.Narutowicza 88, 90-139 Łódź

WSTĘP

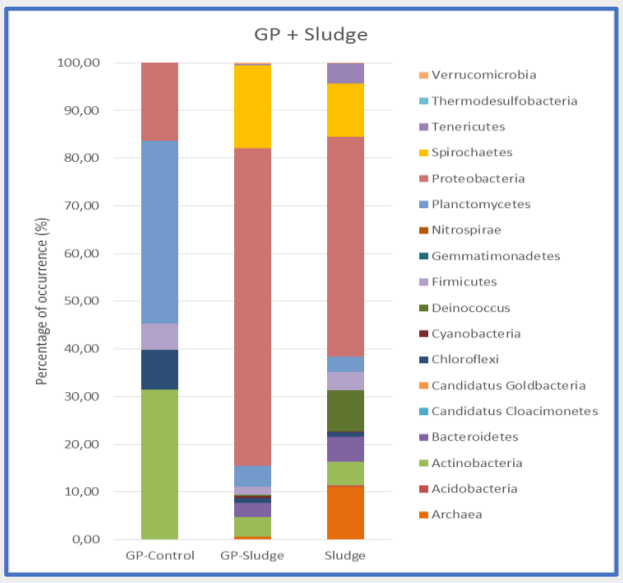
Rosnąca ilość wytwarzanych ścieków i jednocześnie osadów ściekowych sprawia, że zagadnienie prawidłowej gospodarki osadami stanowi ważny element badań środowiskowych. Jedną z zalecanych metod zagospodarowania osadów ściekowych jest wykorzystanie rolnicze, ze względu na obecność w nich biogenów poprawiających plony roślin. Mikroorganizmy glebowe zapewniają prawidłowe funkcjonowanie gleby, a wszelkie zmiany w populacji bakteryjnej mogą wpływać na istotne właściwości gleby, zatem charakterystykę mikrobiomu można wykorzystać jako wskaźnik biologiczny do oceny zmian zachodzących w glebie wzbogaconej osadami. Ponadto liczne badania wykazują, że proces oczyszczania ścieków powoduje wzrost liczby ARB (antibiotic resistant bacteria) i ARG (antibiotic resistant genes), z uwagi na jednoczesną obecność szeregu drobnoustrojów i mieszaniny antybiotyków oraz ich metabolitów w osadzie czynnym. Dlatego osady ściekowe wykorzystywane do nawożenia gleby, mogą stanowić zagrożenie dla środowiska oraz zdrowia ludzi i zwierząt.

REZULTATY

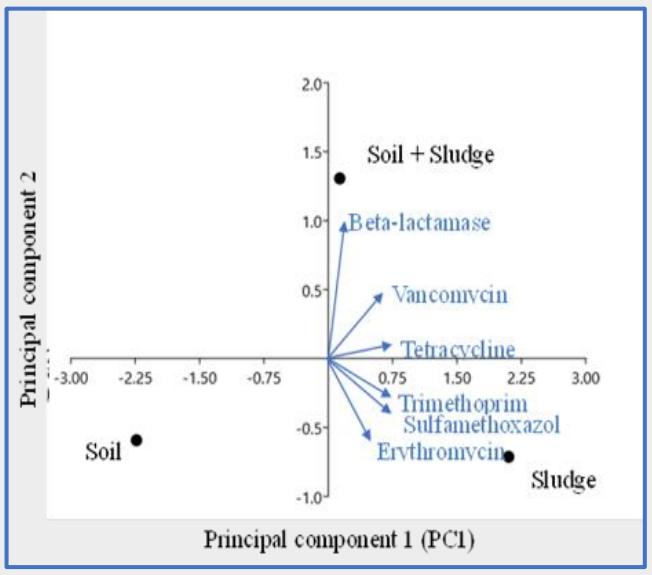
We wstępnych badaniach metagenomowych, stanowiących część szerszego projektu, stwierdzono znaczne zmiany w charakterystyce taksonomicznej gleby nawożonej osadami ściekowymi w porównaniu do próbek kontrolnych. Po upływie 6 tygodni od dodania osadów (w dawce 9 t/ha) utrzymywała się zmieniona struktura taksonomiczna mikrobiomu gleby wzbogaconej w porównaniu do gleby kontrolnej. Stwierdzono znaczny wzrost liczebności Proteobakterii, uważanych za tę grupę mikroorganizmów, wśród której występuje wiele patogenów ludzi i zwierząt. W glebie nawożonej wzrosła też znacznie liczebność Spirochaetes, a także Bacteroidetes będących głównym składnikiem flory jelitowej. Z kolei znacząco zmalała liczebność takich bakterii jak Planctomycetes, Actinobacteria i Chloroflexi, pełniących ważne funkcje biologiczne w środowisku glebowym. Wyniki Analizy Głównych Składowych (PCA) wskazują na różnice w zawartości niektórych genów kodujących oporność na leki antybakteryjne, takie jak tetracyklina, wankomycyna, erytromycyna, β-laktamy, sulfonamidy czy trimetoprim w glebie wzbogaconej osadami w porównaniu do próbki gleby



Ryc.1. DNA izolowane z próbek. (kanały: 1-3 gleba, 4-6 gleba +osad, 7-8 osad)



Ryc.2. Struktura taksonomiczna próbki gleby nawożonej osadem ściekowym – GP-sludge, w porównaniu do próbek kontrolnych (GP-Gleba, Sludge- osad)



Ryc.3. Analiza głównych składowych (PCA) wykazała różnice w zawartości genów kodujących oporność na wybrane grupy antybiotyków w badanych próbkach w porównaniu z kontrolą (gleba nienawożona) (wyniki uzyskane po 6 tygodniach stosowania osadu ściekowego do gleby)

METODY

Eksperyment polowy przeprowadzono w donicach zawierających po 1 kg gleby, którą nawożono osadem ściekowym w dawce 9 ton na hektar (zgodnie z polskimi i europejskimi normami). Próbki do analiz pobierano na głębokości 10 cm, w czasie 0 i po upływie 6 tygodni , eksperymenty zostały przeprowadzone w trzech powtórzeniach. Izolacje genomowego DNA wykonano według procedury producenta FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Stężenie i czystość DNA oszacowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i absorbancji w ultrafiolecie (Multiscan Sky, Thermo Scientific Inc.). Analizy metagenomowe przeprowadzono według Arango-Argoty i in. 2018, Buckfink i in. 2015, Wood i in. 2014.

LITERATURA

- Arango-Argoty G, Garner E, Pruden A, et al. 2018. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. Microbiome 6 (23), 1–15
- Buckfink B, Xie C, Huson DH, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIA-MOND. Nat. Methods 12, 59–6
- Wood DE, Salzberg S, Kraken L, 2014. Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biol.; 15(3):R46.Epub2014/03/04

Badania finansowane z projektu pt. Zmiany zespołów mikroorganizmów, oporności na antybiotyki i właściwości fizykochemicznych gleby nawożonej komunalnymi osadami ściekowymi. NCN 2020/39/B/NZ9/01772

VI Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne *„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK" 2022*

„Zmiany w strukturze taksonomicznej bakterii i genach lekooporności w glebie nawożonej osadem ściekowym - badania wstępne"

Liliana Serwecińska[1], Magdalena Urbaniak[1,2] , Elżbieta Mierzejewska[2], Wojciech Tołoczko[3]

[1] Europejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii, Polska Akademia Nauk, ul.Tylna 3, 90-364 Łódź

[2] Katedra UNESCO Ekohydrologii i Ekologii Stosowanej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

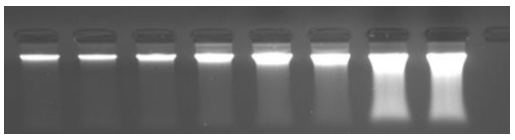
[3] Katedra Geografii Fizycznej, Wydział Nauk Geograficznych, Uniwersytet Łódzki, ul.Narutowicza 88, 90-139 Łódź

WSTĘP

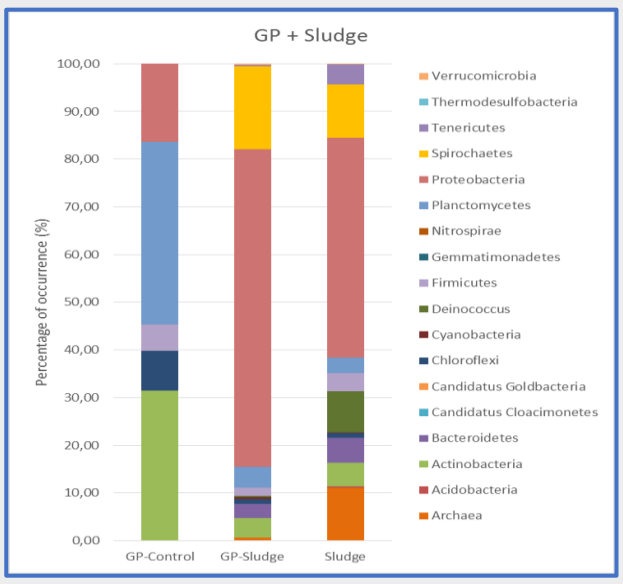
Rosnąca ilość wytwarzanych ścieków i jednocześnie osadów ściekowych sprawia, że zagadnienie prawidłowej gospodarki osadami stanowi ważny element badań środowiskowych. Jedną z zalecanych metod zagospodarowania osadów ściekowych jest wykorzystanie rolnicze, ze względu na obecność w nich biogenów poprawiających plony roślin. Mikroorganizmy glebowe zapewniają prawidłowe funkcjonowanie gleby, a wszelkie zmiany w populacji bakteryjnej mogą wpływać na istotne właściwości gleby, zatem charakterystykę mikrobiomu można wykorzystać jako wskaźnik biologiczny do oceny zmian zachodzących w glebie wzbogaconej osadami. Ponadto liczne badania wykazują, że proces oczyszczania ścieków powoduje wzrost liczby ARB (antibiotic resistant bacteria) i ARG (antibiotic resistant genes), z uwagi na jednoczesną obecność szeregu drobnoustrojów i mieszaniny antybiotyków oraz ich metabolitów w osadzie czynnym. Dlatego osady ściekowe wykorzystywane do nawożenia gleby, mogą stanowić zagrożenie dla środowiska oraz zdrowia ludzi i zwierząt.

REZULTATY

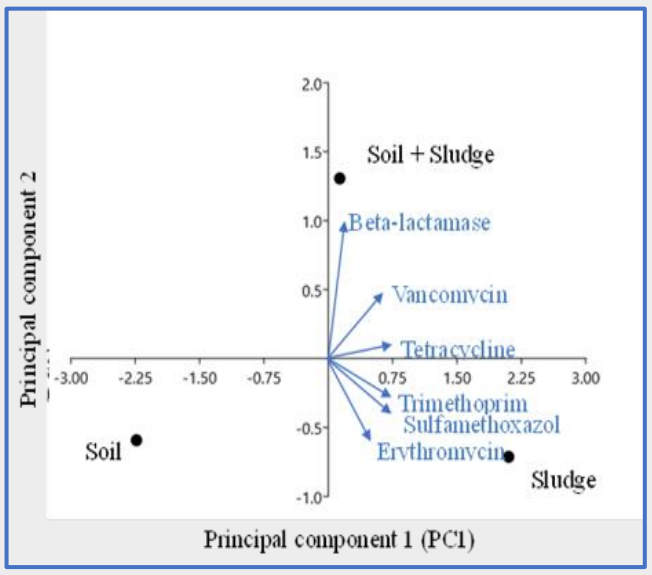
We wstępnych badaniach metagenomowych, stanowiących część szerszego projektu, stwierdzono znaczne zmiany w charakterystyce taksonomicznej gleby nawożonej osadami ściekowymi w porównaniu do próbek kontrolnych. Po upływie 6 tygodni od dodania osadów (w dawce 9 t/ha) utrzymywała się zmieniona struktura taksonomiczna mikrobiomu gleby wzbogaconej w porównaniu do gleby kontrolnej. Stwierdzono znaczny wzrost liczebności Proteobakterii, uważanych za tę grupę mikroorganizmów, wśród której występuje wiele patogenów ludzi i zwierząt. W glebie nawożonej wzrosła też znacznie liczebność Spirochaetes, a także Bacteroidetes będących głównym składnikiem flory jelitowej. Z kolei znacząco zmalała liczebność takich bakterii jak Planctomycetes, Actinobacteria i Chloroflexi, pełniących ważne funkcje biologiczne w środowisku glebowym. Wyniki Analizy Głównych Składowych (PCA) wskazują na różnice w zawartości niektórych genów kodujących oporność na leki antybakteryjne, takie jak tetracyklina, wankomycyna, erytromycyna, β-laktamy, sulfonamidy czy trimetoprim w glebie wzbogaconej osadami w porównaniu do próbki gleby



Ryc.1. DNA izolowane z próbek. (kanały: 1-3 gleba, 4-6 gleba +osad, 7-8 osad)



Ryc.2. Struktura taksonomiczna próbki gleby nawożonej osadem ściekowym – GP-sludge, w porównaniu do próbek kontrolnych (GP-Gleba, Sludge- osad)



Ryc.3. Analiza głównych składowych (PCA) wykazała różnice w zawartości genów kodujących oporność na wybrane grupy antybiotyków w badanych próbkach w porównaniu z kontrolą (gleba nienawożona) (wyniki uzyskane po 6 tygodniach stosowania osadu ściekowego do gleby)

METODY

Eksperyment polowy przeprowadzono w donicach zawierających po 1 kg gleby, którą nawożono osadem ściekowym w dawce 9 ton na hektar (zgodnie z polskimi i europejskimi normami). Próbki do analiz pobierano na głębokości 10 cm, w czasie 0 i po upływie 6 tygodni , eksperymenty zostały przeprowadzone w trzech powtórzeniach. Izolacje genomowego DNA wykonano według procedury producenta FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). Stężenie i czystość DNA oszacowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym i absorbancji w ultrafiolecie (Multiscan Sky, Thermo Scientific Inc.). Analizy metagenomowe przeprowadzono według Arango-Argoty i in. 2018, Buckfink i in. 2015, Wood i in. 2014.

LITERATURA

- Arango-Argoty G, Garner E, Pruden A, et al. 2018. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. Microbiome 6 (23), 1–15
- Buckfink B, Xie C, Huson DH, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIA-MOND. Nat. Methods 12, 59–6
- Wood DE, Salzberg S, Kraken L, 2014. Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biol.; 15(3):R46.Epub2014/03/04

Badania finansowane z projektu pt. Zmiany zespołów mikroorganizmów, oporności na antybiotyki i właściwości fizykochemicznych gleby nawożonej komunalnymi osadami ściekowymi. NCN 2020/39/B/NZ9/01772

Opracowanie INNOwacyjnej technologii wytwarzania wzbogaconych MIKrobiologicznie bionawozów wspomagających zrównoważoną produkcję roślinną i jej adaptację do zmian klimatu" projekt finansowany z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (NCBR) w ramach konkursu Lider XII (2022-2024).

Nr LIDER/36/0184/L-12/20/NCBR/2021

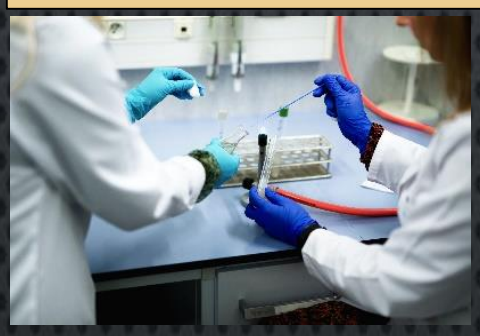
Przyszłość naszej planety i bezpieczeństwo żywnościowe ludzi wymagają nowego spojrzenia na wiele gałęzi gospodarki. Zmniejszenie stosowania chemikaliów, recykling węgla i składników nawozowych, dbałość o gleby, produkcja zdrowej żywności i przeciwdziałanie suszy to podstawowe wyzwania, przed którymi stoi rolnictwo. Aby pomóc osiągnąć te cele, projekt **INNO-MIK** tworzy innowacyjne technologie produkcji bionawozów, sięgając jednocześnie do podstaw zrównoważonego rolnictwa i rozwiązań opartych na naturze.

Kierownik projektu:
•mgr inż. Sylwia Siebielec - IUNG-PIB
Zespół naukowo-badawczy:
•dr Aleksandra Ukalska – Jaruga - IUNG-PIB
•mgr Małgorzata Martyna Woźniak - IUNG-PIB
•dr Andrzej Lewicki - UP Poznań
•dr Jakub Pulka - UP Poznań
•dr inż. Szymon Szufa - Politechnika Łódzka
•dr inż. Łukasz Adrian - Politechnika Łódzka
•mgr inż. Piotr Piersa - Politechnika Łódzka
Zespół doradczy
•dr hab. Grzegorz Siebielec, prof. IUNG-PIB
•prof. dr hab. Jacek Dach UP Poznań

Zdjęcia własne wykonane w ramach projektu LIDER XII, INNO_MIK

Tworzymy interdyscyplinarny zespół, który skupia pełnych energii specjalistów w zakresie mikrobiologii, biologii, biotechnologii, ochrony środowiska, inżynierii środowiska oraz analityki chemicznej.

Aktualnie realizujemy I etap prac, który obejmuje prace laboratoryjne. Wstępna kolekcja **bakterii jest testowana pod względem efektywności** procesów wspierających rozwój i odporność roślin.



Bakterie solubilizujące fosforany

Już w lipcu zaczynamy kolejne etapy naszych badań. Etap 2: **Wybór optymalnego składu inokulum** dla wspomagania roślin w warunkach suszy. Etap 3: **Fermentacja** metanowa jako metoda produkcji płynnego nośnika dla dedykowanych bakterii. Etap 4: **Kompostowanie i toryfikacja** biomasy jako metody produkcji stałego nośnika dla dedykowanych bakterii.

Nasz projekt łączy 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. Odporność upraw na suszę i regeneracja gleb to większy potencjał produkcyjny rolnictwa i każdego gospodarstwa.

Zachęcamy do odwiedzania naszej strony internetowej **www.inno-mik.pl**, oprócz informacji na temat projektu, będzie można zapoznać się z aktualnymi pracami prowadzonymi w naszym laboratorium badawczym.

Rola mikroorganizmów w immobilizacji i fitoekstrakcji pierwiastków ziem rzadkich.

Sylwia Siebielec, Grzegorz Siebielec, Dominika Gmur

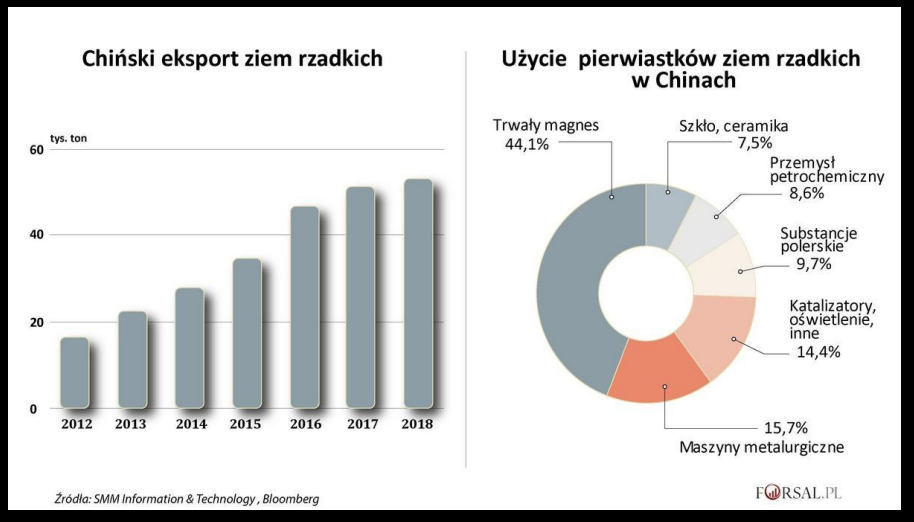
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

Projekt NCN **OPUS**, nr projektu **2019/35/B/ST10/03244**.

Pierwiastki ziem rzadkich (REE) to jednorodna grupa 17 pierwiastków chemicznych do której zaliczane są wszystkie lantanowce (lantan, cer, prazeodym, neodym, promet, samar, europ, gadolin, terb, dysproz, holm, erb, tul, iterb i lutet) i dwa **skandowce** (skand i itr). Pierwiastki te zakwalifikowano do wspólnej grupy ze względu na podobne właściwości fizykochemiczne oraz częste współwystępowanie w minerałach. **Pierwiastki ziem rzadkich są kluczowe** dla wielu nowoczesnych gałęzi przemysłu, w tym chemii, elektroniki użytkowej, czystej energii, transportu, opieki zdrowotnej czy lotnictwa. Zainteresowanie tymi metalami wynika z ich specyficznych właściwości, dlatego znalazły one zastosowanie w nowoczesnych technologiach. W ostatnich latach pierwiastki ziem rzadkich stały się interesującym obiektem licznych prac badawczych.

Zasoby pierwiastków ziem rzadkich

- Jak wynika z badań naukowych szacuje się, iż Chiny dysponują największymi naturalnymi zasobami pierwiastków ziem rzadkich i realizują ponad 90% światowego zapotrzebowania na surowce ziem rzadkich.
- Polska nie posiada własnych zasobów surowcowych REE. Ich występowanie w postaci ubogich złóż ogranicza się do rejonu Szklarskiej Poręby, Sudetów oraz okolic Białegostoku.
- Wzrastające zapotrzebowanie na strategiczne zasoby, np. pierwiastki ziem rzadkich (REE) wywołane rozwojem technologicznym społeczeństwa, powodują wzrost intensywności ich wydobycia i przeróbki. W konsekwencji coraz większe ilości tych pierwiastków są uwalnianie do środowiska przyrodniczego. Może to stanowić potencjalne zagrożenie dla jakości środowiska, a nawet zdrowia ludzi istnieją również przesłanki o pozytywnym znaczeniu pierwiastków ziem rzadki na plon i rozwój roślin. Jednocześnie z uwagi na ich ograniczone zasoby należy opracować skuteczne sposoby ich odzyskiwania.



Największe zasoby pierwiastków ziem rzadkich
Źródło: https://whatnext.pl/poznalismy-nowe-zrodlo-metali-ziem-rzadkich-ktore-sa-niezwykle-potrzebne/

Celem strategicznym projektu NCN jest rozwój wiedzy na temat biodostępności i ekotoksyczności REE, Sb i V w połączeniu z ich zawartościami w glebie i odpadach, sposobów niwelowania ich toksyczności oraz określenie możliwości ich przyrodniczego odzysku poprzez fitoekstrakcję.

W realizacji badań istotną rolę odgrywają zagadnienia mikrobiologiczne. Do celów szczegółowych projektu należą między innymi:

- określenie ryzyka związane z zanieczyszczeniem poszczególnych elementów środowiska przez REE, Sb i V, w tym ich wpływu na życie biologiczne gleby,
- ocena roli mikroorganizmów w fitoremediacji gleb i odpadów skażonych REE, Sb i V,
- zrozumienie roli mikroorganizmów w optymalizacji fitoekstrakcji tych pierwiastków.

Aktualnie prowadzone prace w ramach projektu

- Aktualnie prowadzimy badania w warunkach laboratoryjnych oraz szklarniowych. Testy laboratoryjne mają na celu określenie toksyczności poszczególnych pierwiastków oraz odpadów zawierających REE, Sb i V dla aktywności enzymatycznej gleb oraz liczebności i różnorodności bakterii.
- Doświadczenia szklarniowe pomogą wybrać rośliny najbardziej przydatne do fitoekstrakcji badanych pierwiastków oraz określić zależność pomiędzy aktywnością mikrobiologiczną podłoża a rozwojem roślin i poziomem akumulacji pierwiastków w roślinach. W dalszej fazie testowana będzie możliwość stymulacji fitoekstrakcji i fitostabilizacji REE, Sb i V za pomocą wybranych szczepów bakterii.

Doświadczenie w trakcie realizacji HALA WEGETACYJNA IUNG-PIB
Czerwiec 2022

Zadanie realizujemy w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki. "Badanie środowiskowych skutków występowania pierwiastków ziem rzadkich oraz antymonu i wanadu w glebach i odpadach"; 2019/35/B/ST10/03244. Okres realizacji: 2020 – 2023. Kierownik projektu dr hab. Grzegorz Siebielec, prof. IUNG.

Aktywność mikrobiologiczna w glebie z dodatkiem egzogennej materii organicznej.

Sylwia Siebielec[1], Grzegorz Siebielec[1], Aleksandra Ukalska-Jaruga[1], Anna Gałązka[1], Monika Pecio[1], Emilia Grzęda[1], Monika Koziel[1], Magdalena Urbaniak[2]

[1]Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
[2]Europejskie Regionalne Centrum Ekohydrologii - Polskiej Akademii Nauk

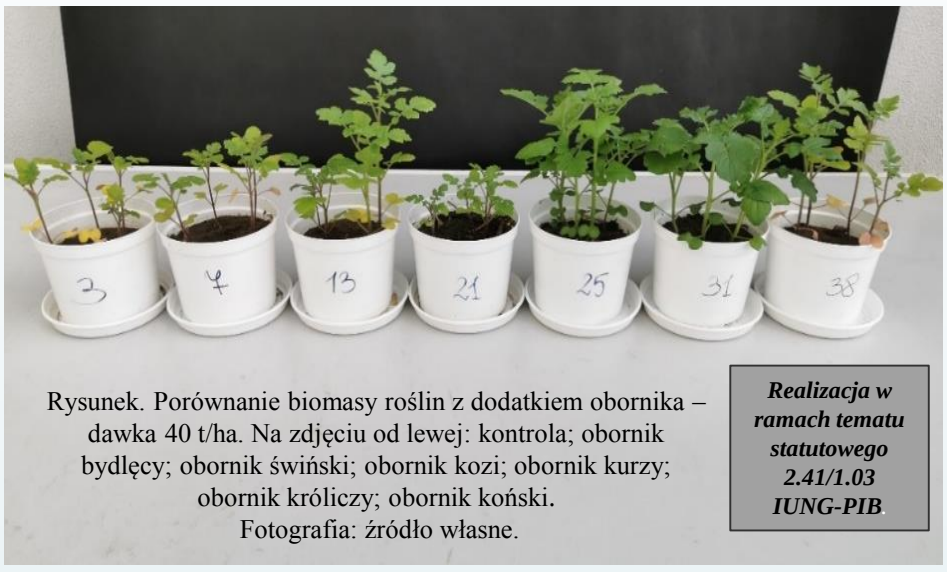
VI. OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM MIKROBIOLOGICZNE
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

- W okresie letnim przeprowadzono szklarniowe doświadczenie wazonowe w hali wegetacyjnej IUNG-PIB. Eksperyment został przeprowadzony w doniczkach z tworzywa sztucznego o pojemności 3L na glebie o uziarnieniu piasku gliniastego, o zawartości węgla organicznego 0.69% oraz pH mieszonym w zawiesinie wodnej 6,4. Gleba charakteryzowała się średnią zasobnością w przyswajalny fosfor (12,1 mg 100g-1) wg metody Egnera-Rhiema. Testowane partie obornika pochodziły z gospodarstw produkcyjnych zlokalizowanych w województwie lubelskim. Osady denne pobrano ze stawów zlokalizowanych w obszarze miejskim i wiejskim a osady ściekowe sprowadzono z dwu komunalnych oczyszczalni ścieków, położonych w województwie wielkopolskim i lubelskim w miastach o liczbie mieszkańców, odpowiednio 8 tys. (osad ściekowy I) i 47 tys. (osad ściekowy II). Osady pobierano po ich odwodnieniu w prasie. Podstawowe właściwości badanych materiałów organicznych przedstawiono w tabeli.
- Do doniczek nasypano glebę w ilości 1300 g a następnie dodano egzogenną materię organiczną w postaci obornika lub osadów dennych i ściekowych oraz dokładnie wymieszano. Następnie podlano do wilgotności zbliżonej do 60% polowej pojemności wodnej. Po 2 tygodniach wysiano nasiona roślin. Do gleby zaaplikowano obornik oraz osady w dwóch dawkach, odpowiadających 20 i 40 tonom suchej masy nawozu na ha. Kontrolę stanowiła gleba nawożona saletra amonową w ilości odpowiadającej 170 kg N na ha. Doświadczenie obejmowało 2 różne warianty tych samych kombinacji nawożenia: z roślinnością oraz bez roślin. Rośliną testowaną w doświadczeniu była gorczyca (Sinapis alba L.), należąca do rodziny kapustowatych.

Celem pracy była ocena wpływu dodatku różnych rodzajów obornika, komunalnych osadów ściekowych i osadów dennych na aktywność biochemiczną i enzymatyczną gleb (dehydrogenaz, fosfatazy kwaśnej i zasadowej).

Tabela . Charakterystyka chemiczna dodatków doglebowych testowanych w doświadczeniu wazonowym

Dodatek organiczny	Zawartość węgla (C)	Zawartość skł. nawoz.			Zawartość metali śladowych			
		Azot	Fosfor	Potas	Cynk	Ołów	Kadm	Chrom
	[%]	[%]	[%]	[%]	[mg kg^{-1}]	[mg kg^{-1}]	[mg kg^{-1}]	[mg kg^{-1}]
Obornik bydlęcy	41,8	2,06	0,62	5,37	147	1,6	0,35	4,7
Obornik świński	30,1	2,26	1,62	7,18	195	5,6	0,37	21,4
Obornik kozi	38,5	2,35	0,99	5,75	93	2,1	0,25	9,9
Obornik kurzy	17,6	1,75	0,74	1,04	342	86,6	0,63	63,1
Obornik króliczy	37,1	3,25	1,36	7,62	206	2,4	0,45	10,3
Obornik koński	35,9	2,43	1,29	4,18	121	2,3	0,32	10,2
Osad d.wiejski	1,2	0,07	0,03	0,09	7	4,8	0,07	5,7
Osad d.miejski	1,9	0,10	0,03	0,03	65	17,7	0,22	21,2
Osad ściekowy I	27,3	3,55	2,74	0,36	344	11,1	0,53	96,4
Osad ściekowy II	32,7	5,24	1,28	0,23	1309	16,8	1,06	65,4



Rysunek. Porównanie biomasy roślin z dodatkiem obornika – dawka 40 t/ha. Na zdjęciu od lewej: kontrola; obornik bydlęcy; obornik świński; obornik kozi; obornik kurzy; obornik króliczy; obornik koński.
Fotografia: źródło własne.

Realizacja w ramach tematu statutowego 2.41/1.03 IUNG-PIB.

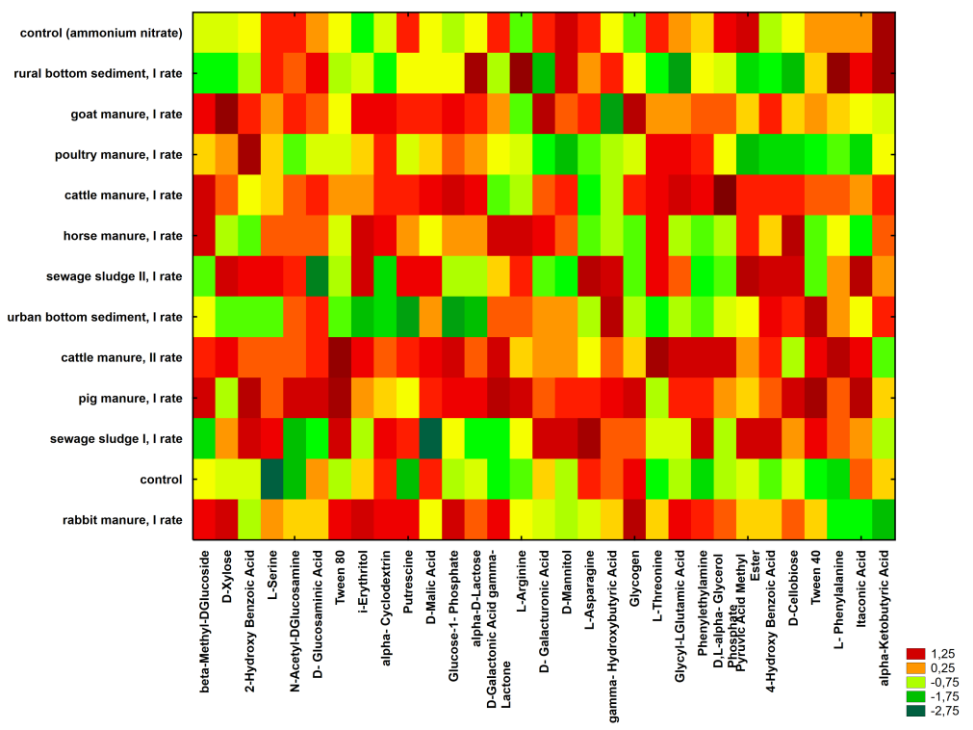
Tabela . Aktywności enzymatyczne w wariancie z roślinami jako efekt dodatku egzogennej materii organicznej – dawka 20 t ha^{-1} (I rate)

KOMBINACJA	aktywność fosfatazy kwaśnej	aktywność fosfatazy zasadowej	aktywność dehydrogenaz
	[µg PNP g s.m^{-1} h^{-1}]	[µg PNP g s.m^{-1} h^{-1}]	[TTC g s.m^{-1} h^{-1}]
KONTROLA nawożona, ammonium nitrate	60,1^{b}	89,3^{ac}	41,8^{abcd}
Obornik bydlęcy, Cattle manure	55,3^{b}	95,3^{ab}	62,3^{ab}
Obornik świński, Pig manure	52,1^{b}	88,8^{ac}	51,8^{abcd}
Obornik kozi, Goat manure	51,3^{b}	96,6^{ab}	69,4^{a}
Obornik kurzy, Poultry manure	59,3^{b}	118,8^{b}	73,9^{a}
Obornik króliczy, Rabbit manure	49,3^{b}	100,1^{ab}	57,3^{abd}
Obornik koński, Horse manure	54,8^{b}	84,1^{ac}	62,8^{ab}
Osad denny wiejski, U. bottom sed.	49,0^{b}	80,1^{ac}	27,1^{cd}
Osad denny miejski, R. bottom sed.	53,7^{b}	69,7^{c}	20,6^{c}
Osad ściekowy I, Sewage sludge I	45,9^{b}	94,9^{ab}	33,93^{bcd}
Osad ściekowy II, Sewage sludge II	93,5^{a}	98,9^{ab}	73,5^{a}

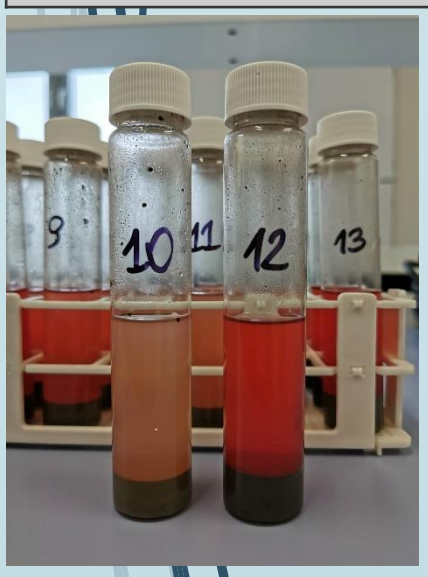
Tabela. Zmiany różnorodności metabolicznej drobnoustrojów w glebach z dodatkiem egzogennej materii organicznej

	AWCD 590	H'	E	R
Control (ammonium nitrate)	1,826^{ab}	3,338^{abc}	0,985^{ab}	29,667^{ab}
Cattle manure, I Rate	2,047^{ab}	3,392^{c}	0,991^{ab}	30,667^{b}
Cattle manure, II Rate	2,060b^{ab}	3,385^{c}	0,989^{ab}	30,667^{b}
Pig manure, I rate	2,066b^{ab}	3,374^{bc}	0,986^{ab}	30,667^{b}
Goat manure, I rate	2,032^{ab}	3,387^{c}	0,989^{ab}	30,667^{b}
Poultry manure, I rate	1,790^{ab}	3,378^{bc}	0,993b^{ab}	30,000^{ab}
Rabbit manure, I rate	2,010^{ab}	3,379^{bc}	0,987^{ab}	30,667^{b}
Horse manure, I rate	1,860^{ab}	3,312^{abc}	0,984^{ab}	29,000^{ab}
Urban bottom sediment, I rate	1,669^{a}	3,258^{a}	0,978^{a}	28,000^{ab}
Rural bottom sediment, I rate	1,834^{ab}	3,322^{abc}	0,980^{ab}	29,667^{ab}
Sewage sludge I, I rate	1,856^{ab}	3,339^{abc}	0,979^{a}	30,333^{ab}
Sewage sludge II, I rate	1,922^{ab}	3,292^{ab}	0,992^{ab}	27,667^{a}
Control	1,717^{ab}	3,295^{ab}	0,982^{ab}	28,667^{ab}

Rysunek. Średnie wykorzystanie grup substratów węglowych na podstawie odczytów w 144 h inkubacji.



- ✓ W największym stopniu aktywność enzymatyczną gleby stymulował jeden z komunalnych osadów ściekowych. Efekt zastosowania osadów ściekowych był jednak zróżnicowany. Wpływ osadów ściekowych na aktywność biologiczną gleby będzie zatem zależał od charakterystyki chemicznej poszczególnych osadów.
- ✓ Osady denne hamowały aktywność enzymatyczną gleb, niezależnie od ich pochodzenia. Było to najprawdopodobniej związane z obecnością szerokiej gamy zanieczyszczeń chemicznych.
- ✓ Porównując poszczególne rodzaje obornika, wykazano silny efekt stymulacji aktywności enzymatycznej gleb po zastosowaniu obornika kurzego.
- ✓ Największe średnie wykorzystanie grup substratów węglowych przez bakterie odnotowano w glebie z dodatkiem obornika bydlęcego (II dawka) i obornika świńskiego (I dawka).



Rolnicze wykorzystanie osadów ściekowych jest jednym z możliwych sposobów ich utylizacji. Charakterystyka osadów ściekowych zależy od jakości ścieków i rodzaju stosowanych procesów oczyszczania. Będąc bogatymi w organiczne związki i nieorganiczne składniki odżywcze roślin, osady ściekowe mogą być alternatywą dla obornika, o ile poziom potencjalnie toksycznych zanieczyszczeń jest niski.

Opracowanie innowacyjnej technologii wytwarzania wzbogaconych mikrobiologicznie bionawozów wspomagających odporność warzyw w uprawie polowej na suszę – KOMPO-MIK

Sylwia Siebielec[1], Grzegorz Siebielec[1], Jacek Dach[2], Damian Janczak[2], Jakub Mazurkiewicz[2]

[1]Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
[2]Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Udział gospodarstw **dotkniętych suszą** w najbardziej niekorzystnych sezonach wegetacyjnych jest niezwykle duży a udział gmin, w których wykazywana jest susza, sięga w krytycznych okresach 90%.

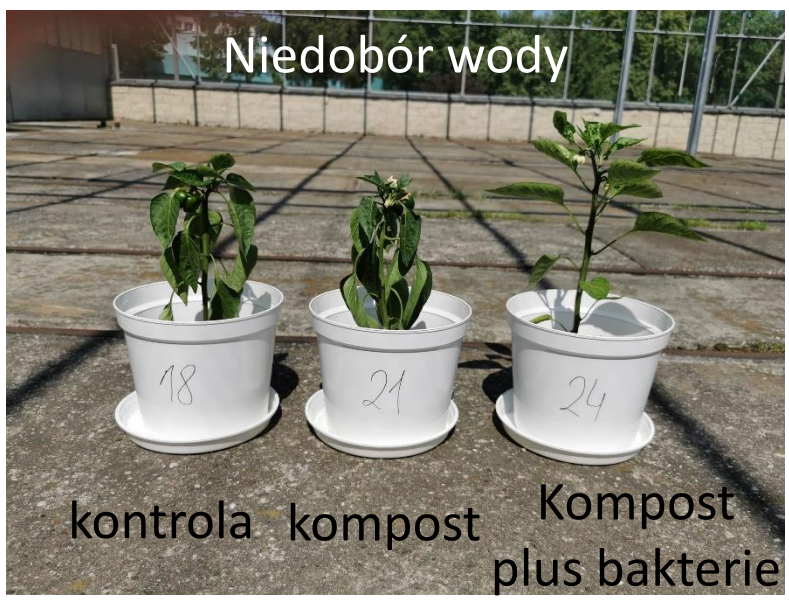
Fakt ten oznacza, że suszą może być w niektórych latach dotkniętych nawet do 9 mln ha. W najbardziej niekorzystnych latach spadek plonu niektórych roślin może wynosić kilkadziesiąt procent. Ilość gospodarstw rolnych wynosi obecnie 1 425 tys., co stanowi bardzo duży potencjalny rynek odbiorców bionawozów, zakładając, że większość producentów rolnych jest zainteresowana **utrzymaniem poziomu materii organicznej** w glebie i żyznością gleb.

W odniesieniu do bionawozów dedykowanych uprawom warzyw selerowatych i papryki, w Polsce w przeciągu ostatnich 15 lat produkcja papryki rozwinęła się na szeroką skalę. Z uwagi na wysoką towarowość produkcji oraz wrażliwość na niedobór wody u obu roślin, producenci tych warzyw będą mogli być **potencjalnie zainteresowani bionawozami** wytwarzanymi rozwijaną technologią.

Prace prowadzone w ramach projektu

- Wybór i selekcja bakterii oraz określenie ich przynależności rodzajowej
- Kompostowanie jako metoda produkcji stałego nośnika dla dedykowanych mikroorganizmów
- Opracowanie technologii inokulacji kompostu bakteriami z uwzględnieniem ich granulowania
- Testowanie bionawozów inokulowanych mikroorganizmami wspomagającymi rozwój roślin w warunkach szklarniowych

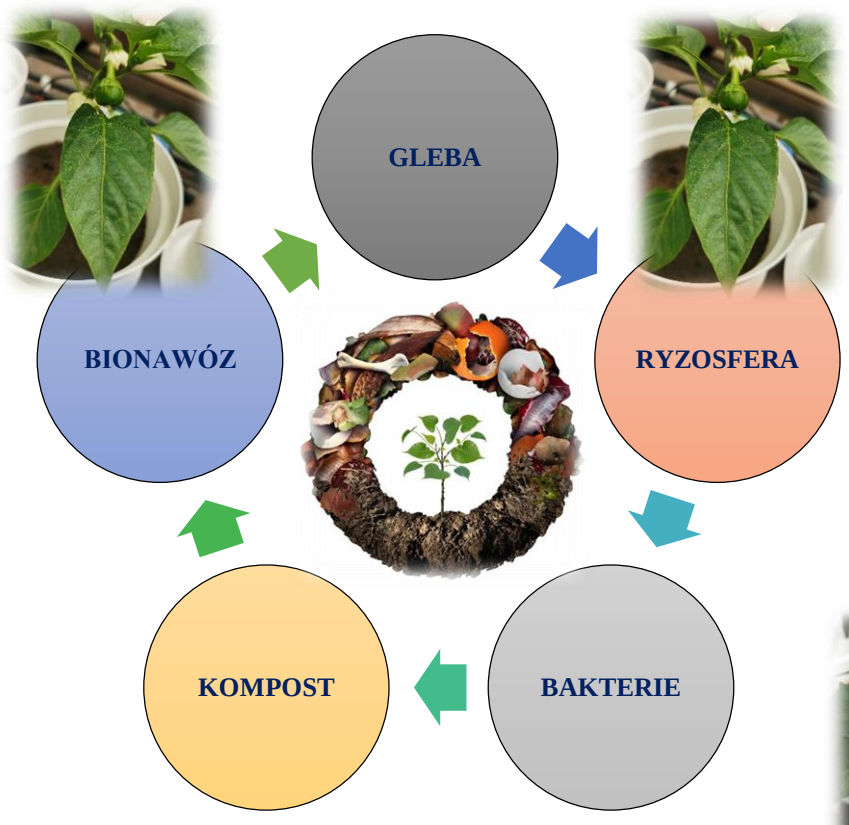
Doświadczenie w trakcie realizacji - hala wegetacyjna IUNG-PIB maj/czerwiec 2022



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII ROLNICZEJ, IUNG - PIB
ZAKŁAD GLEBOZNAWSTWA EROZJI I OCHRONY GRUNTÓW, IUNG-PIB
(Zdjęcia własne wykonane w ramach projektu)

Bakterie zastosowane w doświadczeniu wazonowym pochodziły z kolekcji wyizolowanej w ramach projektu UMO-2015/17/N/ST10/03182 oraz ryzosfery papryki i selera naciowego.

Kompostowanie jest naturalnym procesem opartym na aktywności drobnoustrojów i rozkładzie martwej materii organicznej w warunkach tlenowych. Wykorzystanie kompostu jako bionawozu niesie za sobą wiele korzyści, natomiast na właściwości i efekty stosowania kompostu mają wpływ wykorzystany surowiec, sposób kompostowania, przechowywanie i stosowanie kompostu.



Zalety kompostowania

- ✓ Zdrowsza gleba
- ✓ Zdrowsze rośliny
- ✓ Odzysk składników nawozowych
- ✓ Większe plony roslin uprawnych
- ✓ Zmniejszenie ilości odpadów
- ✓ Metody przyjazne środowisku
- ✓ Opłacalność w procesie powstawania kompostu

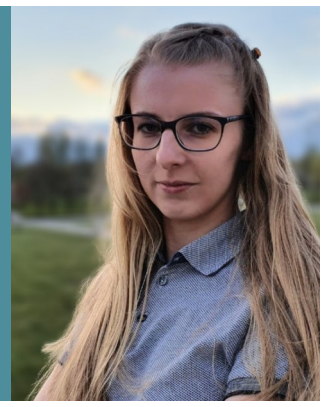
Gleba jest kluczowym zasobem a wtórne wykorzystanie składników nawozowych i materii organicznej kluczowym działaniem dla możliwości osiągnięcia ambitnych celów Europejskiego Zielonego Ładu (EZŁ). Efektywnym narzędziem dla realizacji zamierzeń EZŁ powinny być bezpieczne bionawozy.

Program „Inkubator Innowacyjności 4.0” realizowany w ramach ustanowionego przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego projektu pozakonkursowego pn. „Wsparcie zarządzania badaniami naukowymi i komercjalizacją wyników prac B+R w jednostkach naukowych i przedsiębiorstwach”, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014–2020 (Działanie 4.4).

Comparing Differential Abundance (DA) methods for mycobiome in organic cultivation of strawberry

Dominika Siegieda*, Jacek Panek, Magdalena Frąc

Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4 Street, 20-290 Lublin
e-mail: d.siegieda@ipan.lublin.pl



INTRODUCTION

Organic agriculture is gainig popularity globally in recent years. European Union's initiative EU Biodiversity Strategy for 2030 focuses on increasing the area of organic farming and reducing pesticide use. Analyzing the differences and finding differentially abundant taxa between healthy and unhealthy mycobiome of plants can help to understand which fungi are the most connected with plant health. This, in result, can help to improve pesticide-reduced and sustainable agriculture. Multiple methods are used in the literature for DA (differential abundance) analyses, yet, there is no consensus on which method is optimal for microbiome and mycobiome data in particular sample type and dataset.

METHODS

DNA isolation from bulk soil, rhizosphere soil, roots and shoots from organic plantations of strawberry

ITS1 amplification and Illumina MiSeq amplicon sequencing (pairend, 2x300)

Processing of the data in QIIME 2 environment (taxonomy based on UNITE database)

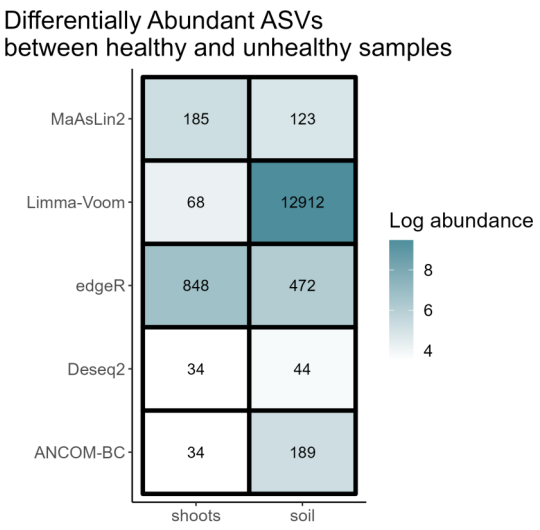
Comparing DA methods (Limma-Voom, MaAsLin2, edgeR, ANCOM-BC, DESeq2) in RStudio

CONCLUSION

Different methods of DA testing between healthy and unhealthy samples yielded various number of taxa in both, soil and shoot samples. It is important to remember, that using only one method can find true associatins, but also false positives. For DA analysis, it might be resonable to use two or more methods in order to reduce the impact of false positives on analysis results.

RESULTS

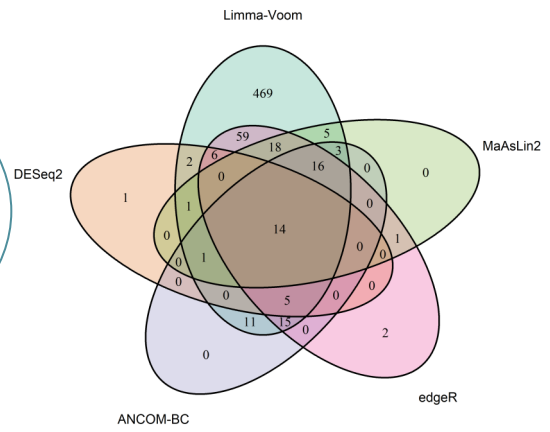
Different methods od DA analysis harvested different number of signifficantly different ASVs between healthy and unhealthy bulk soil and shoots of strawberry samples. **Deseq2** found the smallest number of ASVs in both sample types, and **Limma-Voom** and **edgeR** found the biggest number of ASVs in soil and shoot samples, respectively. Limma-Voom found 86% of ASVs significantly different in soil samples—it has been known for poorly controlling false-discovery rate in some studies.

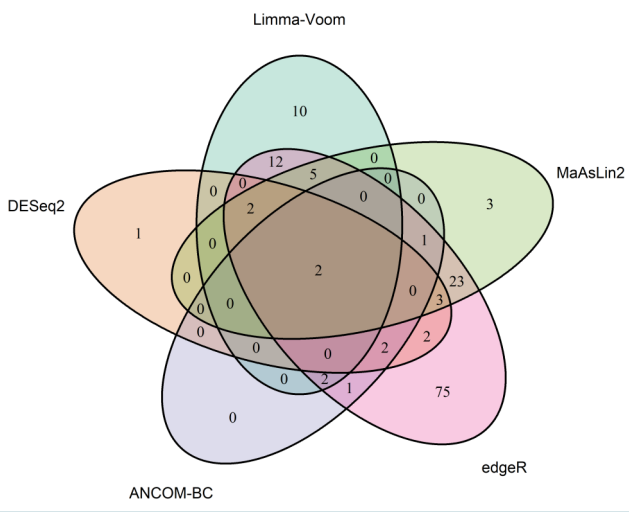


After collapsing idetification to genus level, we identified 15 genera that were Differentially Abundant between healthy and unhealthy samples of bulk soil that were common for all 5 models.

Common for all models for bulk soil:

- *Pseudozyma* sp.
- Chaetosphaeria
- unclassified Ascomycota
- *Pleotrichocladium* sp.
- unclassified Fungi
- unclassified Sclerotiniaceae
- *Mortierella* sp.
- *Acremonium* sp.
- *Dactylaria* sp.
- unclassified Nectriaceae
- unclassified Hypocreales
- *Tetracladium* sp.
- *Solicoccozyma* sp.
- unclassified Onygenales
- *Phialocephala* sp.





Only 2 genera were Differentially Abundant between healthy and unhealthy samples of shoots for all 5 models.

Common for all models for shoots:

- unclassified Mycosphaerellaceae
- *Sporobolomyces* sp.

INSTYTUT AGROFIZYKI PAN

The National Centre for Research and Development

EcoFruits

The research is funded by The National Centre for Research and Development in frame of the project BIOSTRATEG, contract number BIOSTRATEG3/344433/16/NCBR/2018.

Wpływ presji antropogenicznej na bioróżnorodność gleb leśnych i ornych w Polsce

Szadziul M., Goryluk-Salmonowicz A., Zalewska M., Popowska M.

Zakład Fizjologii Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wprowadzenie

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR, ang. *antimicrobial resistance*), która występuje zarówno w środowisku klinicznym, jak i naturalnym, stanowi przedmiot wielu prac badawczych, jednak dotychczas zagadnieniem narastającej antybiotykooporności zajmowano się głównie z perspektywy medycyny i weterynarii.

Według Światowej Organizacji Zdrowia rozwiązanie problemu AMR wymaga holistycznego podejścia, tzw. „One Health", które wskazuje na powiązanie i wzajemne oddziaływanie na siebie trzech sfer: ludzkiej, weterynaryjnej i środowiskowej. Jest to istotne w kontekście zwiększonej urbanizacji oraz intensywnej chemizacji rolnictwa, które prowadzą do zanieczyszczenia i degradacji środowiska.

Gleby stanowią środowisko dla najbogatszych biocenoz na Ziemi i są kluczowe w produkcji żywności. Antybiotykooporne bakterie (ARB, ang. *antibiotic resistant bacteria*) oraz geny oporności na antybiotyki (ARG, ang. *antibiotic resistance genes*) przedostają się do gruntów m.in. wraz z odchodami zwierząt. Mogą one później zostać przeniesione z powrotem na ludzi i zwierzęta przez bakterie patogenne a w trakcie całego procesu istnieje prawdopodobieństwo ewolucji ARB oraz nabycia przez nie nowych mechanizmów oporności poprzez horyzontalny transfer genów.

Wiedza na temat dalszych losów ARB i ARG uwolnionych do środowiska oraz ich interakcji z mikroorganizmami autochtonicznymi jest wciąż niepełna. Pewne jest, że warunki środowiskowe i właściwości ekologiczne mogą wpływać na funkcjonowanie ARB i ARG w środowisku. Według postawionej hipotezy wysoka naturalna różnorodność biologiczna ekosystemów ma posiadać kluczowe znaczenie dla ograniczania rozprzestrzeniania się AMR w środowisku. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki wstępnej analizy mikrobiologicznej różnorodności wybranych gleb leśnych i ornych w Polsce. Na podstawie tych rezultatów środowiska o różnych poziomach bioróżnorodności zostaną wytypowane do dalszych eksperymentów dotyczących relacji pomiędzy bioróżnorodnością a rozpowszechnianiem się AMR w środowisku.

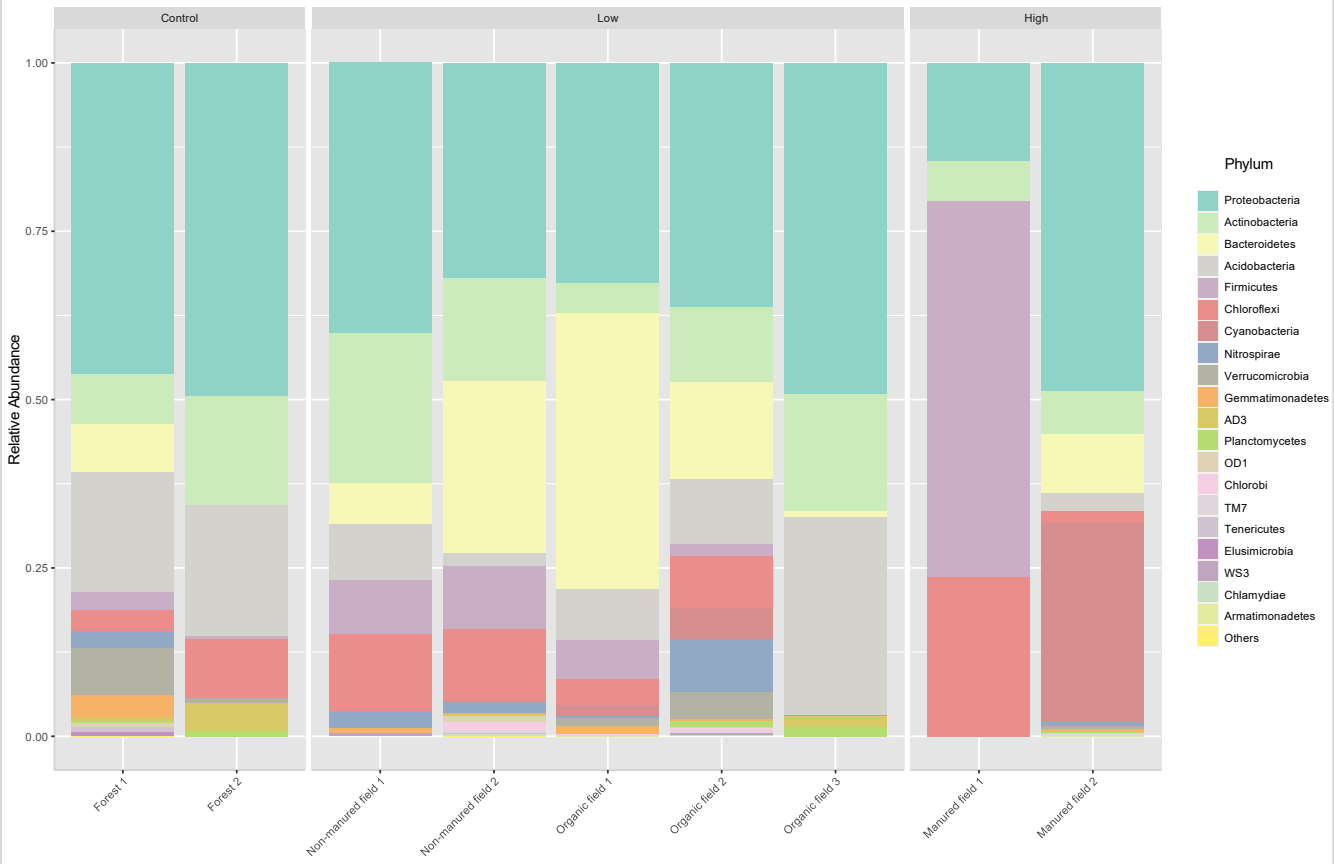
Cel pracy

Analiza mikrobiologicznej różnorodności badanych ekosystemów glebowych charakteryzujących się różnym poziomem presji antropogenicznej.

Metody

Próbki gleb leśnych i ornych pobrano z wybranych lokalizacji i podzielono na 3 kategorie: próby pobrane z gleb, na których nie był wywierany wpływ antropogeniczny (‚Control'; lasy n=2), próby pochodzące z gleb, gdzie ten wpływ był niski (‚Low'; pola nienawożone n=2, gleby organiczne n=3) oraz próby, gdzie ten wpływ był wysoki (‚High'; pola nawożone n=2).

DNA wyizolowano z wykorzystaniem zestawu Dneasy PowerSoil Pro i poddano sekwencjonowaniu region zmienny V3-V4 genu dla 16S rRNA na platformie Illumina MiSeq. Uzyskane dane sekwencjonowania zostały przeanalizowane w programie Qiime2 z wykorzystaniem narzędzia DADA2 do kontroli jakości sekwencji oraz bazy danych genów 16S rRNA Greengenes w celu klasyfikacji taksonomicznej. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej: indeks Chao1 i Shannon oraz PCoA (principal coordinates analysis), a także wizualizacji z wykorzystaniem MicrobiomeAnalyst.



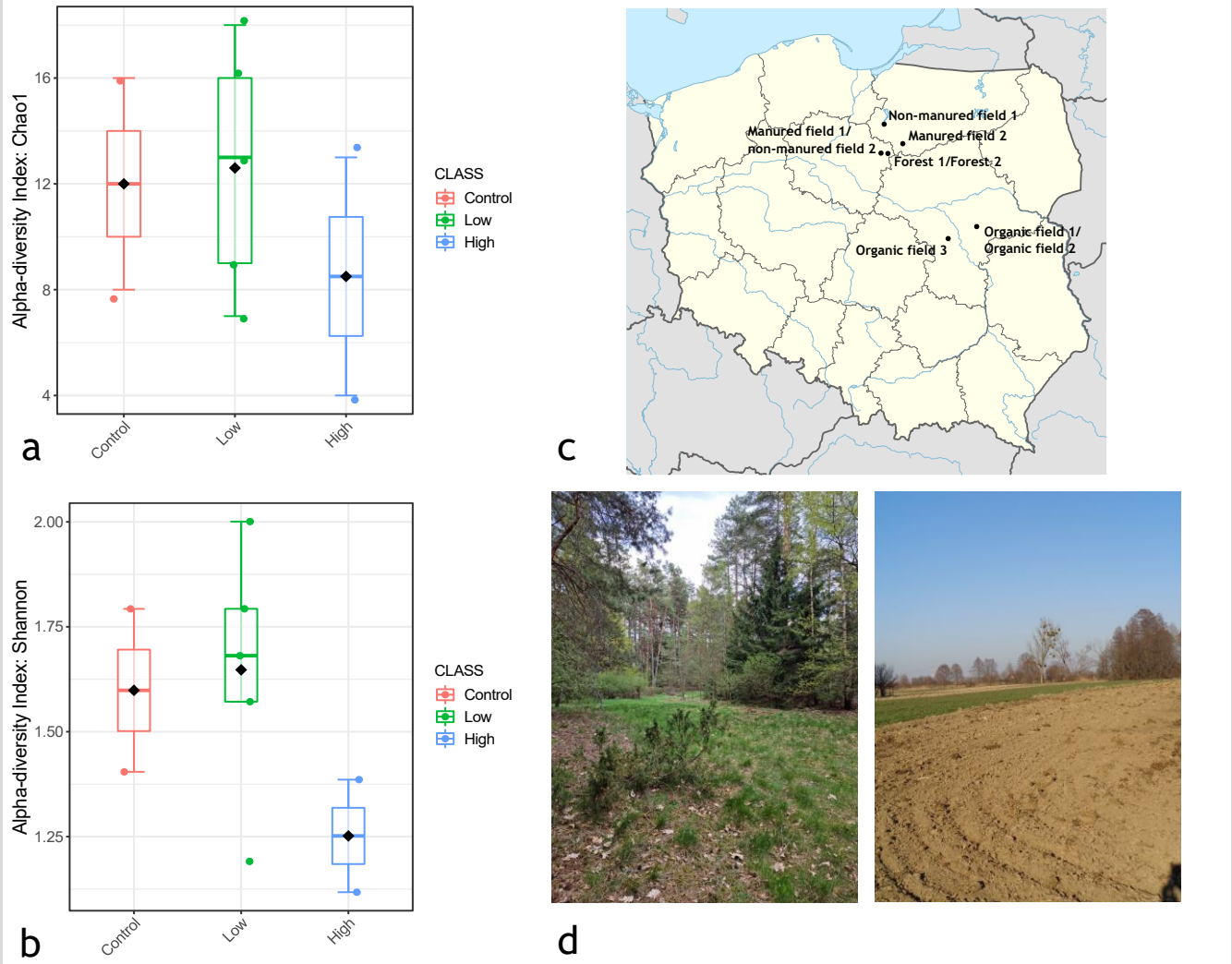
Rys. 1. Skład mikrobiomu badanych prób na poziomie typu przedstawiony jako względna ilość typów w próbie [%].

Wyniki i wnioski

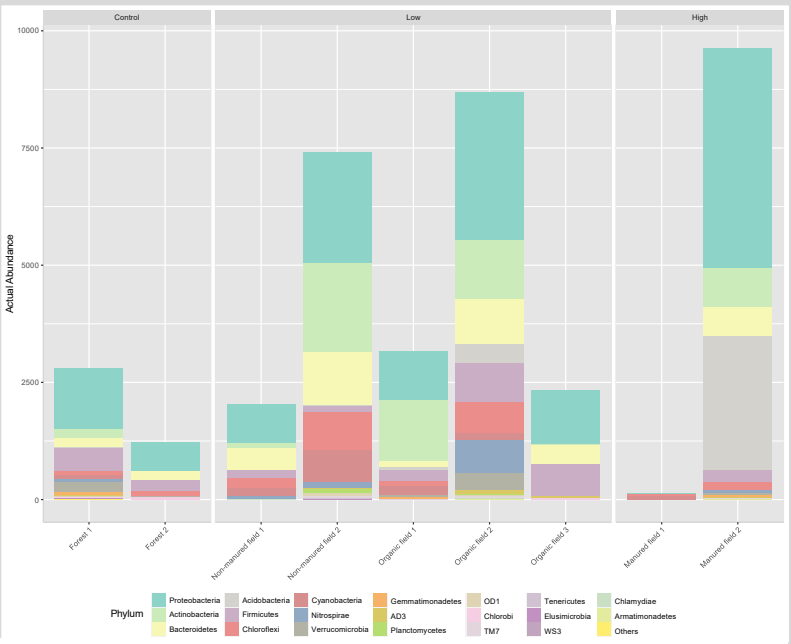
Skład mikrobiomu badanych gleb jest zróżnicowany, a wewnątrz badanych grup zaobserwowano duże rozbieżności dla poszczególnych prób, zwłaszcza w przypadku gleb o wysokiej presji antropogenicznym. W glebach kontrolnych dominowały typy *Proteobacteria* (46-49%) i *Acidobacteria* (18-19%). W glebach z grupy o niskim wpływie antropogenicznym najpowszechniej występowały bakterie typów *Proteobacteria* (30-48%), *Bacteroidetes* (1-41%) i *Actinobacteria* (4-22%). W glebach o wysokim wpływie obecne były głównie bakterie typów *Proteobacteria* (14-45%) i *Firmicutes* (0-56%) (Rys.1 i 2).

Przeprowadzone analizy statystyczne nie pozwalają na stwierdzenie występowania różnic w bioróżnorodności pomiędzy badanymi próbami w zależności od występowania presji antropogenicznej. Mikrobiomy gleb o zbliżonym poziomie presji antropogenicznej cechują się różnymi poziomami bioróżnorodności. Analiza z wykorzystaniem indeksów Chao1 (p-value=0,5794, Kruskal-Wallis) i Shannon (p-value=0,20874, Kruskal-Wallis) oraz PCoA (p-value<0,095; ANOSIM, Bray-Curtis) nie wykazała różnic na poziomie typów bakterii pomiędzy zróżnicowaniem mikrobiologicznym badanych społeczności (Rys. 3). W celu uwidocznienia potencjalnej relacji pomiędzy presją antropogeniczną a bioróżnorodnością potrzebne są dalsze badania, uwzględniające większą pulę badanych gleb o zbliżonych właściwościach, poddanych różnym poziomom presji antropogenicznej, oraz szerszy kontekst obejmujący wpływ innych czynników, jak rodzaj gleby, czy właściwości fizykochemiczne, na bioróżnorodność. W tym aspekcie istotne są również wymagania pokarmowe danych rodzajów bakterii, w tym patogennych.

Gleby leśne i orne o różnych poziomach bioróżnorodności będą wybrane do dalszych badań dotyczących wpływu różnorodności biologicznej na rozpowszechnianie się AMR w środowisku. Zakładają one dalszy monitoring bioróżnorodności, analizy rezystomu środowisk oraz eksperymenty w mikrokosmosach, w ramach których badana będzie przeżywalność dodawanych do gleb ARB oraz transfer przenoszonych przez nie ARG.



Rys. 3. Różnorodność alfa – indeks Chao1 dla badanych środowisk z podziałem na grupy o różnym wpływie antropogenicznym (a) (p-value=0,5794, Kruskal-Wallis); wskaźnik różnorodności Shannona dla badanych prób z podziałem na grupy o różnym wpływie antropogenicznym (b) (p-value=0,20874, Kruskal-Wallis); mapa lokalizacji miejsc poboru prób (c); zdjęcia poglądowe miejsc poboru (d)



Rys. 2 . Skład mikrobiomu badanych prób na poziomie typu przedstawiony według rzeczywistej ilości odczytów

Informacje o projekcie

Badania są prowadzone w ramach projektu międzynarodowego pt. „ANTIVERSA - Bioróżnorodność jako ekologiczna bariera dla rozprzestrzeniania się istotnej klinicznie oporności na antybiotyki w środowisku" (BiodivERsA Call 2018, Kierownik Projektu – dr hab. Magdalena Popowska, prof. ucz., nr Umowy NCN: UMO-2019/32/Z/NZ8/00011).

NARODOWE CENTRUM NAUKI

biodiversa

ANTIVERSA Bacterial diversity against AMR

ZFB

Diagnostyka molekularna grzybów z rodzaju *Pezicula* sp. – kluczowych patogenów jabłek

Klaudia Szpilska, Karolina Oszust*, Jacek Panek, Agata Gryta, Michał Pylak, Magdalena Frąc

Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin,

e-mail*: k.oszust@ipan.lublin.pl

Wprowadzenie

Sektor produkcji jabłek pełni ważną rolę w gospodarce naszego kraju. Polska jest bowiem jednym z największych producentów jabłek w Europie w związku z tym wielkość i jakość produkcji należą do priorytetowych zagadnień, na których koncentrują się producenci jabłek. Sadownicy borykają się jednak m.in. z problemem chorób przechowalniczych. Do chorób tych należy gorzka zgnilizna jabłek powodowana przez grzyby z rodzaju *Pezicula* sp. *sensu lato* (syn. *Neofabraea* sp.). Ze względu na latentny charakter gorzkiej zgnilizny trudno jest ocenić jakość jabłek podczas zbioru, ponieważ objawy choroby pojawiają się dopiero podczas przechowywania owoców w chłodniach. Do zakażenia dochodzi kilka miesięcy wcześniej, jeszcze w okresie wzrostu owoców. Źródłem infekcji są zarodniki przenoszone wraz z kroplami deszczu na zranione owoce i korę. Pierwsze objawy choroby na jabłkach są widoczne w postaci małych, brunatnych plam, które powiększają się i łączą ze sobą. Ze względu na długość okresu w jakim mogą wystąpić objawy choroby, niezbędne jest opracowanie czułego i dokładnego narzędzia diagnostycznego służącego do identyfikacji tych patogenów grzybowych.

Materiały i metody

Dokonano przeglądu literatury na temat metod diagnostyki molekularnej grzybów należących do rodzaju *Pezicula* sp. (Tabela 1). Gariépy i in. zaprojektowali startery specyficzne dla gatunku do wykrywania *Pezicula* spp./ *Neofabraea* spp. metodą multipleksowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a następnie zostały one zmodyfikowane i ulepszone przez kolejnych badaczy [1]. Inni naukowcy z kolei opracowali startery PCR w oparciu o sekwencje *β*-tubuliny w celu identyfikacji gatunku *Pezicula* sp. [2].

Tabela 1. Przegląd metod diagnostyki molekularnej grzybów należących do rodzaju *Pezicula* sp.

Starter	Orientacja	Sekwencje starterów (5'-3')	Metoda izolacji czystego szczepu	Metoda izolacji DNA (kit)	Amplifikacja	Literatura
RCAf	F	GACGACCGCATCACCAACATC	Pozyskane z kolekcji kultur	MagPure Fungal DNA TL kit	94°C 1 min, 35 cykli w 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min	[1]
RCAr	R	TGAATCCCTGACACCAACACG				
N/P	F	CTT TCT CCG TTG TCC CAT CC	Pobrano fragmenty tkanki ze zmienionego chorobowo jabłka	Promega SP fungal DNA kit	94°C 2 min; 98°C 10 s, 57°C 30 s, 30 cykli w 72°C 30 s, 72°C 5 min	[2]
N/P	R	GAACATTGCGCATCTGGTCC				
UP18S42	F	CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC	Pobrano tkanki z jabłek z widocznymi objawami gorzkiej zgnilizny, a następnie wyizolowano pojedyncze zarodniki	Qiagen	95°C 2 min, 35 cykli w 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 45 s, 72°C 7 min	[3]
LO28S22	R	GTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATG				
mrSSU1	F	AGCAGTGAGGAATATTGGTC			Warunki amplifikacji zostały ustalone na podstawie protokołu Pe sicov a et al. (2017)	
mrSSU3R	R	ATGTGGCACGTCTATAGCCC				
Bt-T2m-UP	F	CAACTGGGCTAAGGGTCATT			Warunki amplifikacji zostały ustalone na podstawie protokołu De Jong et al. (2001)	
Bt-LEV-LO1	R	GTGAACTCCATCTCGTCCATA				
EF1-983F	F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT			Warunki amplifikacji zostały ustalone na podstawie protokołu Rehner and Buckley (2005)	
EF1-2218R	R	ATGACACCRACRGCRACRGTYTG				
Neo_mal-loTub-262	R	GACAGCCAACTTGCGG	Pozyskane z kolekcji kultur	AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep kit (Axygen) (zmieniony został czas inkubacji - z 15 min na 35 min)	94°C 3 min, 30 cykli w 94°C 30 s, 56°C 60 s, 72°C 60 s, 72°C 5 min	[4]
Neo_per-loTub-382	R	GGGTCGAACATCTGTTGT				
Neo_spnov-loTub-319	R	TGGTGAGAGGAGCGAAC				
Neo_alba3	R	AATATTAGCAGGATATCTCTTCAAG				
Neofab_uni	F	AACTTTCTCCGTTGTCCCATC				
UN-UP18S-42	F	GGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC				
UN-LO28S576B	R	CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG				

N/P – nie podano; F – starter forward; R – starter reverse

Wnioski

Analiza dostępnej literatury wskazuje na potrzebę opracowania sposobu wczesnej detekcji grzybów powodujących gorzką zgniliznę jabłek już w okresie przechowywania zebranych owoców. Pomimo wielu opracowanych starterów specyficznych priorytetem pozostaje ciągły rozwój narzędzi diagnostycznych w celu zapobiegania rozprzestrzeniania się patogenów grzybowych z rodzaju *Pezicula* sp.

Literatura

1. Lin H. doi: https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0448
2. Cao D. doi: 10.4236/aim.2013.31009
3. Carneiro A. C. doi: 10.1094/PDIS-04-21-0687-RE
4. Michalecka M. doi: https://doi.org/10.1111/ppa.12449

Praca finansowana przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu LIDER XII, numer umowy LIDER/7/0054/L-12/20/NCBR/2021

Ocena rozwoju grzybów *Trichoderma* spp. w podłożu pieczarkowym poddanym dezynfekcji gazowym dwutlenkiem chloru

Joanna Szumigaj-Tarnowska[1], Joanna Augustyniak[1], Zbigniew Uliński[1], Wiesław Hreczuch[2]
[1]Instytut Ogrodnictwa-Państwowy Instytut Badawczy, Pracownia Uprawy Warzyw i Grzybów Jadalnych, Skierniewice
[2]Mexeo Instytut Technologiczny, Kędzierzyn-Koźle
joanna.tarnowska@inhort.pl

WSTĘP

Uprawa pieczarki prowadzona jest w warunkach wysokiej wilgotności i temperatury, co sprzyja występowaniu wielu chorób grzybowych. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* powodują tzw. zielone pleśnie i mogą przyczynić się wysokich strat plonów. Największe straty wywoływane są przez agresywne szczepy *T. aggressivum*, gdy rozwój zielonej pleśni nastąpi po wysiewie grzybni pieczarki do podłoża (Fot. 1). Produkcja podłoża pieczarkowego i zapobieganie rozwojowi choroby jest bardzo ważnym elementem w procesie uprawowym tych grzybów. Obecnie jedynym z zabiegów ograniczającym ryzyko infekcji podłoża przez grzyby *Trichoderma* jest dezynfekcja zakładu .

Fot.1. Podłoże pieczarkowe porażone przez *Trichoderma aggressivum*

CEL BADAŃ

Celem pracy była ocena wpływu zabiegu gazowania dwutlenkiem chloru podłoża pieczarkowego II fazy na rozwój zielonej pleśni wywoływanej przez grzyby *Trichoderma* sp.

MATERIAŁY I METODY

I etap - Ocena wpływu izolatów *Trichoderma spp.* pozyskanych ze środowiska uprawowego pieczarki na rozwój grzybni pieczarki po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego fazy II i fazy III

Doświadczenie prowadzono w klimatyzowanej hali, zapewniając warunki odpowiednie dla rozwoju pieczarki. Podłoże fazy II w ilości 500 g umieszczono w słoikach o pojemności 1000 ml, dodano grzybnię pieczarki w ilości 0,5 g, a następnie zainfekowano grzybnią *Trichoderma* sp.
Ocena przerostu grzybni pieczarki przez 10 dni:

0 – brak przerostu podłoża przez grzybnię pieczarki, rozwój zielonej pleśni w podłożu
1 – słaby rozwój grzybni pieczarki, widoczny rozwój zielonej pleśni,
2 – widoczny niewielki rozwój grzybni pieczarki, ale obecne też miejsca bez przerostu,
3 – wyraźny rozwój grzybni pieczarki, podłoże prawidłowo przerośnięte w całej objętości.

Na przerośnięte podłoże nakładano ziemię okrywową i przez kolejne 10 dni obserwowano przerost okrywy przez grzybnię pieczarki, a następnie plon*.

Podłoże fazy III zainfekowano grzybnią *Trichoderma* sp., następnie nakładano okrywę i obserwowano rozwój grzybni pieczarki w okrywie i plon pieczarki.

* Ocena rozwoju grzybni i plonu pieczarki:

0 – brak przerostu okrywy przez grzybnię pieczarki, rozwój zielonej pleśni w podłożu
1 – słaby rozwój grzybni pieczarki, widoczny rozwój zielonej pleśni, pojedyncze grzyby
2 – pieczarki z objawami porażenia (plon),
3 – rozwój grzybni pieczarki i prawidłowy plon owocników

Na podstawie badań określono wpływ izolatów *Trichoderma* na rozwój pieczarki w zależności od terminu infekcji podłoża pieczarkowego (fazy II i fazy III).

II etap – Ocena rozwoju *Trichoderma aggressivum* i *Trichoderma* sp. w podłożu fazy II poddanym gazowaniu dwutlenkiem chloru – doświadczenie doniczkowe

Podłoże pieczarkowe fazy II po wsianiu grzybni pieczarki i zainfekowaniu izolatami *Trichoderma* spp. poddano zabiegowi gazowania dwutlenkiem chloru o stężeniu ClO_2 - 1000 ppm, przez 60 minut. Następnie prowadzono obserwacje przerostu okrywy grzybnią pieczarki według oceny jak w etapie I, a następnie rozwój i plon pieczarki.

Na podstawie zebranego plonu pieczarek obliczano stopień porażenia uprawy w zależności od izolatu *Trichoderma* spp. i zabiegu gazowania.

WYNIKI

I etap - Ocena wpływu izolatów *Trichoderma spp.* na rozwój grzybni pieczarki po zainfekowaniu podłoża pieczarkowego fazy II i fazy III

W Tabeli 1 przedstawiono wyniki oceny rozwoju grzybni pieczarki po zainfekowanu podłoża fazy II przez izolaty grzybów *Trichoderma* sp. oraz pieczarki po zainfekowaniu podłoża fazy III.

Tabela 2. Ocena rozwoju grzybni pieczarki w podłożu fazy II oraz pieczarki po zainfekowaniu podłoża fazy III.

Izolat	Faza II	Faza III	Średnia	Uwagi
22.03	2*	2,3	2.15	Izolat nieagresywny, ale wywołujący objawy plamistości
15.03	0	0	0	Izolat agresywny
Th 20	0	1.3	0.65	Izolat agresywny
26.05	1	0.7	0.85	Izolat agresywny
22.07	1	1	1.0	Izolat agresywny
11.02	1	1	1.0	Izolat agresywny
Th3	3	3	3.0	Izolat nieagresywny
12.04	1.3	0.3	0.8	Izolat agresywny
Th 19	3	3	3	Izolat nieagresywny
Th13	3	3	3	Izolat nieagresywny
CBS	0	1.7	0.85	Izolat agresywny

* wyniki są średnią z trzech powtórzeń

II etap - Ocena rozwoju *Trichoderma aggressivum* i *Trichoderma* sp. w podłożu fazy II poddanym gazowaniu dwutlenkiem chloru

Do badań wykorzystano dwa izolaty, które wybrano na podstawie wyników z etapu pierwszego, tj. izolat agresywny (IA) oraz izolat nieagresywny (N). Wyniki obserwacji rozwoju grzybni pieczarki i plonu owocników po zainfekowaniu izolatami *Trichoderma* sp. i zagazowaniu podłoża zawiera tabela 2.

Tabela 2. Ocena rozwoju grzybni pieczarki oraz plon pieczarki po zainfekowaniu podłoża fazy II i poddanym gazowaniu.

Izolat	Ocena przerostu podłoża	Rzut I / średnia liczba owocników	Rzut II / średnia liczba owocników	Rzut III / średnia liczba owocników
Kontrola	3,0	438,4 / 27,4	176,6 / 11,5	147,2 / 9,2
Izolat nieagresywny	3,0	345,6 / 21,6	272,2 / 17,0	115,5 / 7,2
Izolat nieagresywny + gaz	3,0	313,6 / 19,6	176,3 / 11,0	112,4 / 7,0
Izolat agresywny	3,0 (Fot.2)	- (Fot. 3)	-	-
Izolat agresywny + gaz	1,0 (Fot. 4)	-	-	-

Fot. 2. Przerost podłoża po 14 dniach

Fot. 3. Zielona pleśń na okrywie po 6 dniach – brak owocników

Fot. 4. Zielona pleśń na podłożu po 12 dniach przerastania

WNIOSKI

1. Stopień porażenia podłoża pieczarkowego przez izolaty *Trichoderma* sp. zależał od ich biotypu.
2. Zainfekowanie podłoża pieczarkowego, zarówno fazy II, jak i fazy III, izolatem agresywnym *Trichoderma* sp. powoduje zahamowanie rozwoju pieczarki i brak plonu owocników.
3. Nasilenie rozwoju zielonej pleśni w uprawie pieczarki następuje po nałożeniu okrywy na podłoże.
4. Gazowanie podłoża pieczarkowego zainfekowanego *Trichoderma aggressivum* nie ograniczyło rozwoju zielonej pleśni, a nawet nasilało jej rozwój.

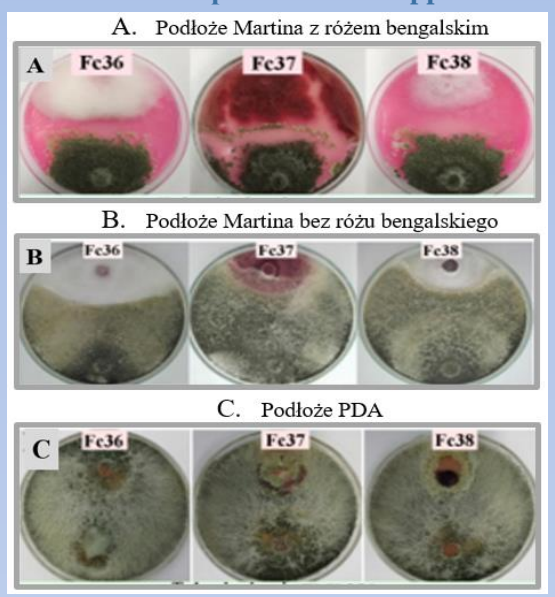
Badania zrealizowano w ramach projektu pt.: Innowacyjna, mykoselektywna okrywa oraz podłoże do uprawy pieczarek" współfinansowanego ze środków EFRR.

Indukcja odporności pszenicy przez wyizolowane z ryzosfery *Scorzonera hispanica* L. szczepy należące do trzech gatunków *Trichoderma*: *T velutinum, T. brevicompactum, T. koningiopsis*

Renata Tyśkiewicz[1], Artur Nowak[2], Ewa Ozimek[2], Elżbieta Patkowska[3], Jolanta Jaroszuk Ściseł[2]
[1]*Laboratorium Analityczne, Sieć Badawcza Łukasiewicz, Instytut Nowych Syntez Chemicznych w Puławach,* [2]*Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,* [3]*Katedra Ochrony Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

Wyizolowane z ryzosfery *Scorzonera hispanica* szczepy *Trichoderma* spp.: *T. velutinum* TvSk68 *T. brevicompactum* TbSk5, *T. koningiopsis* TkSk356 (numery sekwencji ITS odpowiednio MH 651384, MH651383, MH651382) silnie hamowały *in vitro* wzrost *Fusarium* spp. Okazały się mykopasożytami fitopatogenicznych dla pszenicy grzybów *Fusarium* spp.: *F. graminearum* Fc36, *F. culmorum* Fc 37, i *F. oxysporum* Fc38 i odznaczały się wysoką aktywnością chitynolityczną i glukanolityczną w hodowlach ze ścianą komórkową *F. culmorum.*

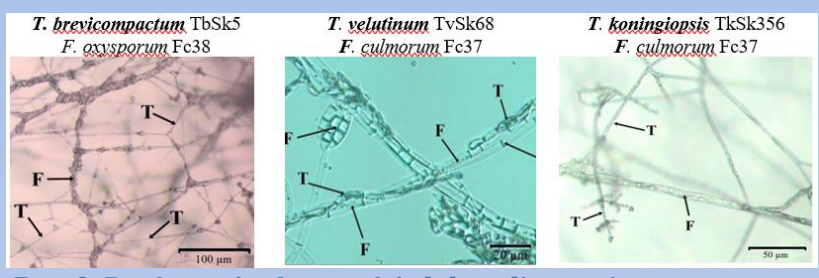
Rys. 1. Makroskopowy obraz interakcji TkSk356 i szczepów *Fusarium* spp.



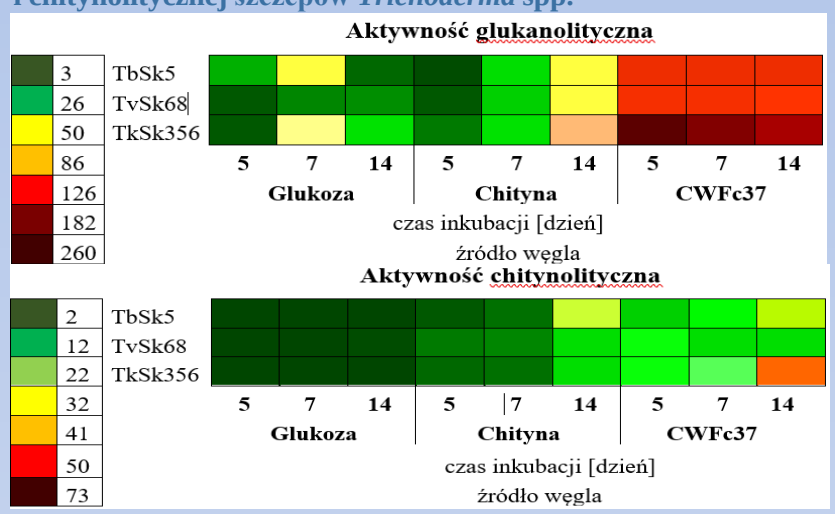
Tab. 1. Sumaryczny efekt biotyczny i redukcja wielkości kolonii szczepów *Fusarium* spp.

Nazwa szczepu *Trichoderma*	Sumaryczny efekt biotyczny			Procentowa redukcja wielkości kolonii [%]		
	Fc36	Fc37	Fc38	Fc36	Fc37	Fc38
Podłoże Martina z różem bengalskim						
TbSk5	+2	+5	+3,5	56	63	66
TvSk68	+6	+6,5	+6	82	88	85
TkSk356	0	0	0	0	0	0
Podłoże Martina bez różu bengalskiego						
TbSk5	+5	+4	+7	78	70	68
TvSk68	+4	+4,5	+6	53	61	66
TkSk356	+5,5	+8	+7,5	60	83	81
Podłoże PDA						
TbSk5	+7	+6	+6	83	77	68
TvSk68	+5	+7	+6	76	83	71
TkSk356	+7,5	+8	+7	87	84	88

Rys. 2. Mikroskopowy obraz interakcji mykopasożytniczej *Trichoderma* spp. – *Fusarium* spp.



Rys. 3. Porównanie aktywności glukanolitycznej i chitynolitycznej szczepów *Trichoderma* spp.

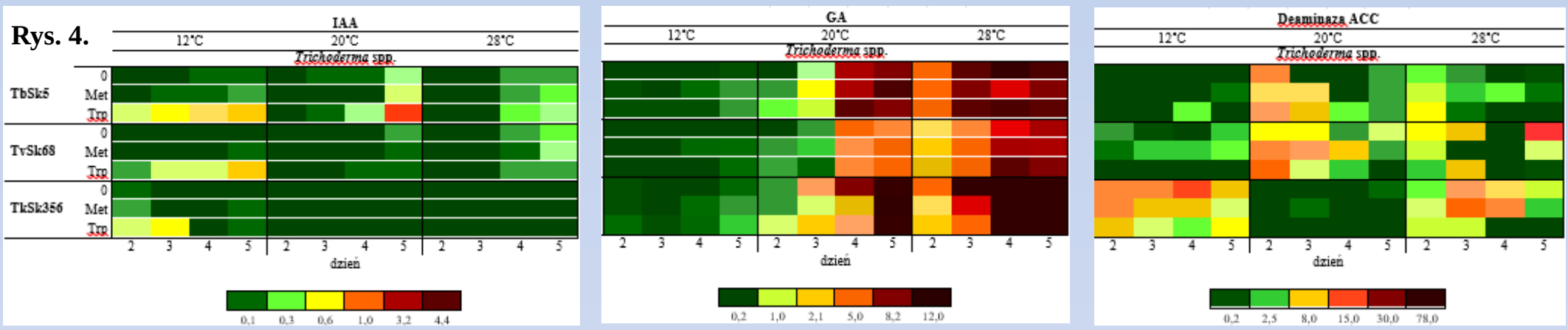


Tab. 2. Indeks NOI wyliczony w teście BiologFF wskazywał na wspólne zasiedlanie niszy z *F. culmorum*.

F. graminearum Fc36		*F. culmorum* Fc37		*F. oxysporum* Fc38	
Para szczepów	NOI	Para szczepów	NOI	Para szczepów	NOI
TbSk5(A)-Fc36(B)	0,00	TbSk5(A)-Fc37(B)	0,90	TbSk5(A)-Fc38(B)	0,66
TvSk68(A)-Fc36(B)	0,00	TvSk68(A)-Fc37(B)	1,00	TvSk68(A)-Fc38(B)	0,72
TkSk356(A)-Fc36(B)	0,00	TkSk356(A)-Fc37(B)	0,92	TkSk356(A)-Fc38(B)	0,64

Szczepy *Trichoderma* spp. wytwarzały kwas indolilooctowy i giberelinowy oraz posiadały aktywność deaminazy ACC (Rys. 4.)

Rys. 4.



W siewkach pszenicy po inokulacji nasion szczepami *Trichoderma* spp. wykrywano wyższą niż w kontroli wodnej i z komercyjnymi elicytorami (np. BTH, i chitozanem) aktywność wielu enzymów markerowych indukcji odporności np. liazy fenyloalaninowej (Tab. 3.), glukanazy (Tab. 4.).

Tab. 3. Aktywność liazy fenyloalaninowej (PAL) [nM kwasu transcynamonowego/h/mg białka]

Elicytor		5 dzień inkubacji		10 dzień inkubacji	
		Łodyga	Korzeń	Łodyga	Korzeń
kontrole	K	439,16	424,02	303,29	236,41
	BTH	440,85	1011,26	218,74	596,91
	CHITOZAN	559,47	1259,86	301,61	170,37
szczepy	TkSk356	652,02	628,88	481,23	225,89
	TvSk68	591,44	717,22	1183,30	505,15
	TbSk5	1198,45	228,84	417,29	580,93

Tab. 4. Aktywność glukanazy (GLUK) [nM glukozy/min/mg białka]

Elicytor		5 dzień inkubacji		10 dzień inkubacji	
		Łodyga	Korzeń	Łodyga	Korzeń
kontrole	K	3,21	4,07	3,13	5,88
	BTH	5,23	56,35	1,74	14,46
	CHITOZAN	1,82	6,70	7,35	4,12
szczepy	TkSk356	43,98	59,28	45,25	73,92
	TvSk68	73,33	72,61	35,72	78,96
	TbSk5	30,20	44,14	33,08	31,54

Szczepy *Trichoderma* spp. stymulowały wzrost łodyg i korzeni 5- i 10-dniowych siewek pszenicy (Tab. 5.)

Tab. 5. Świeża masa łodyg i korzeni siewek pszenicy [g; % wobec kontroli wodnej]

Elicytor		5 dzień inkubacji				10 dzień inkubacji			
		Łodyga		Korzeń		Łodyga		Korzeń	
		Masa [g]	% wobec H_2O	Masa [g]	% wobec H_2O	Masa [g]	% wobec H_2O	Masa [g]	% wobec H_2O
kontrole	K	0,59	100	0,66	100	1,07	100	1,02	100
	BTH	0,57	112	0,20	32	1,62	151	0,85	84
	CHITOZAN	1,28	257	0,62	94	2,07	193	1,34	132
szczepy	TkSk356	0,62	125	0,52	80	1,21	114	1,05	104
	TvSk68	0,72	146	0,63	97	1,48	138	1,14	112
	TbSk5	0,52	100	0,42	65	1,49	139	0,69	67

Wybrany do dalszych testów szczep TvSk68 ograniczał liczebność *F. culmorum* w ryzosferze i ryzoplanie siewek pszenicy (Tab. 6.)

Tab. 6.

Nazwa szczepu	Liczebność szczepów [LOG_{10} JTK]			
	Ryzoplana		Ryzosfera	
	Inokulacja			
TvSk68	5,9		6,3	
Fc37	6,1		6,0	
	Ko-inokulacja			
	TvSk68	Fc37	TvSk68	Fc37
TvSk68+Fc37	5,7	4,0	6,0	4,8

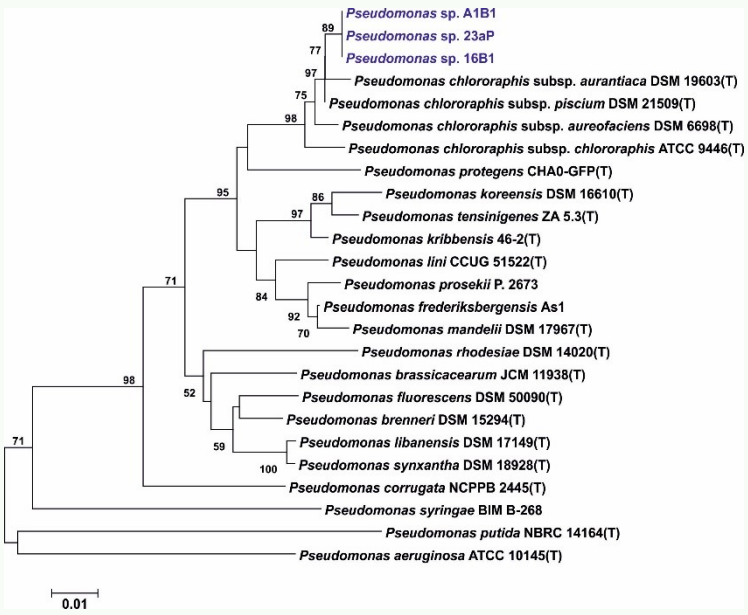
Badania zostały sfinansowane z subwencji statutowej UMCS

Analiza filogenetyczna endofitycznych szczepów rodzaju *Pseudomonas*, wyizolowanych z brodawek korzeniowych *Chamaecytisus albus*

Sylwia Wdowiak-Wróbel[1], Monika Marek-Kozaczuk[1], Magdalena Karaś[1], Michał Kalita[1], Wojciech Sokołowski[1]
Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wprowadzenie: Typowe formy interakcji między roślinami, a mikroorganizmami można podzielić na komensalne, mutualistyczne lub patogenne. Do mutualistycznych oddziaływań zaliczyć możemy interakcje z udziałem bakterii endofitycznych. Grupa bakterii endofitycznych najliczniej reprezentowana jest przez przedstawicieli rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas*. Część szczepów reprezentujących rodzaj *Pseudomonas* wykazuje zdolność do syntezy związków o charakterze przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym. Mogą więc być wykorzystane, jako potencjalne czynniki w biokontroli.

Cel: Badaniami objęto trzy szczepy (A1B1; 23aP; 16B1) wyizolowane z brodawek korzeniowych rośliny bobowatej - *Chamaecytisus albus* (szczodrzeniec zmienny), gatunku znajdującego się pod ścisłą ochroną na terytorium Polski (Ryc. 1). Celem badań było ustalenie, na podstawie analizy porównawczej sekwencji genów metabolizmu podstawowego (*recA, rpoB, gyrB*), pozycji taksonomicznej i relacji filogenetycznych badanych izolatów bakteryjnych.



Ryc. 2 Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie porównania sekwencji genów ***rpoB*** izolatów oraz szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Filogram otrzymany został przy użyciu metody ,,Neighbour-joining". Przy węzłach zostały przedstawione wartości procentowe ,,bootstrap" dla 1000 powtórzeń.

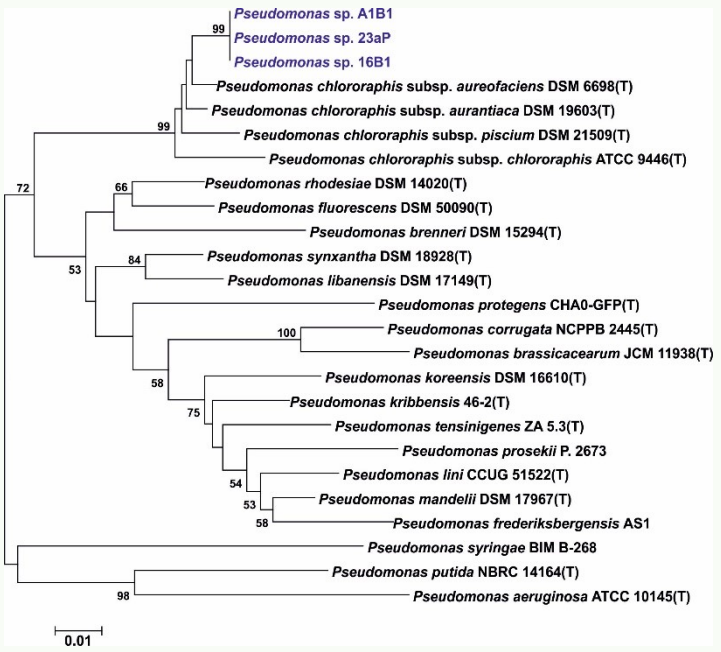
Materiały i metody: Wyizolowano materiał genetyczny 3 izolatów bakteryjnych standardową metodą z użyciem tiocyjanianu guanidyny, a następnie amplifikowano fragmenty genów metabolizmu podstawowego *rpoB*, *recA* i *gyrB* zgodnie z procedurami podanymi w literaturze (Gomila i in. 2015; Mukhia i in. 2022). Po zsekwencjonowaniu amplikonów, przeprowadzono ich analizy porównawcze z sekwencjami szczepów referencyjnych dostępnych w bazie danych GenBank, przy użyciu programów: Chromas, ClustalX2, GeneDoc, MegaX.

Wyniki: Analiza porównawcza dla genu *rpoB* wykazała małe zróżnicowanie genetyczne badanych szczepów. Sekwencje genu *rpoB* izolatów wykazały duże podobieństwo do sekwencji szczepów należących do rodzaju *Pseudomonas*. Utworzyły one wspólne grono ze szczepami reprezentującym gatunek *Pseudomonas chlororaphis* (Ryc. 2).

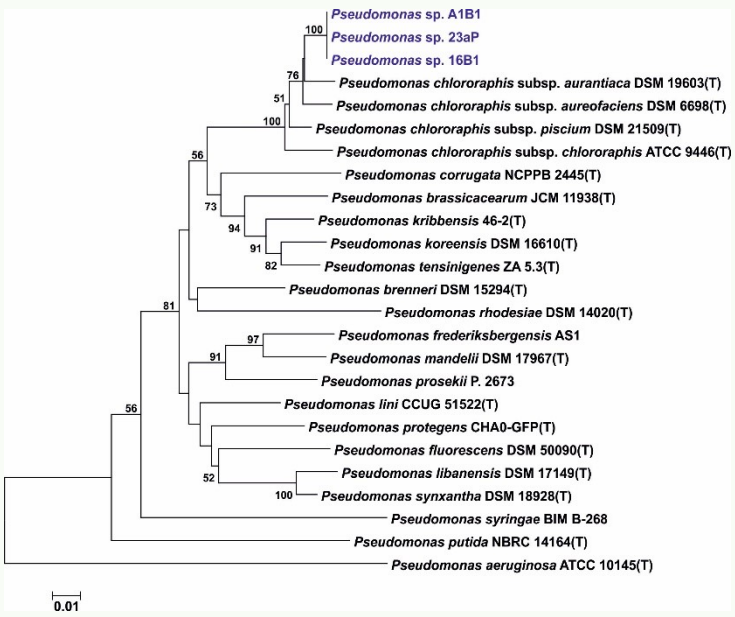
Analiza porównawcza sekwencji genów *recA i gyrB* badanych szczepów również wykazała małe zróżnicowanie genetyczne izolatów. Podobnie, jak miało to miejsce w przypadku analizy porównawczej dla genu *rpoB*, badane szczepy wykazały duże podobieństwo genetyczne sekwencji do bakterii gatunku *Pseudomonas chlororaphis* (Ryc. 3 i 4).

Literatura
Gomila, M et al. "Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*" Frontiers in microbiology 6 214. 18, 2015, doi:10.3389/fmicb.2015.00214
Mukhia, S et al. "Multilocus sequence based identification and adaptational strategies of *Pseudomonas* sp. from the supraglacial site of Sikkim Himalaya" PLOS ONE 17(1): e0261178, 2022, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261178

Ryc. 1 ***Chamaecytisus albus (https://rzadkierosliny.mnkd.pl/)***



Ryc. 3 Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie porównania sekwencji genów ***recA*** izolatów oraz szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Filogram otrzymany został przy użyciu metody ,,Neighbour-joining". Przy węzłach zostały przedstawione wartości procentowe ,,bootstrap" dla 1000 powtórzeń.



Ryc. 4 Drzewo filogenetyczne utworzone na podstawie porównania sekwencji genów ***gyrB*** izolatów oraz szczepów referencyjnych z bazy danych GenBank. Filogram otrzymany został przy użyciu metody ,,Neighbour-joining". Przy węzłach zostały przedstawione wartości procentowe ,,bootstrap" dla 1000 powtórzeń.

Wnioski: Analiza porównawcza sekwencji trzech genów metabolizmu podstawowego wykazała, że wyizolowana grupa endofitów szczodrzeńca zmiennego reprezentuje rodzaj *Pseudomonas*. Wszystkie badane szczepy wykazały bardzo duże podobieństwo sekwencji genów *gyrB*, *recA* oraz *rpoB* (odpowiednio: 96,3-98,6%, 96-99,3%, 97,6-99,4% podobieństwa) do gatunku *Pseudomonas chlororaphis.* Ponadto uzyskane rezultaty badań wskazują, że szczepy mogą reprezentować odrębny podgatunek w obrębie gatunku *Pseudomonas chlororaphis*.

Wpływ insektycydów na mikrobiom larw *Oulema* spp.

Beata Wielkopolan[1], Alicja Szabelska-Beręsewicz[2], Krzysztof Krawczyk[3], Aleksandra Obrępalska-Stęplowska[1]
[1]Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań, [2]Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań, [3]Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Plewiska

Wstęp

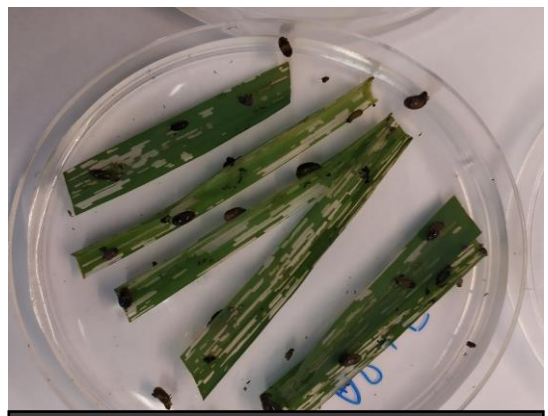
Bakterie zasocjowane z owadami (symbionty) mają ważne znaczenie dla ewolucji owadów i/lub ich nawyków żywieniowych. Mogą między innymi uczestniczyć w oddziaływaniu roślina – owad, detoksykacji ksenobiotyków, czy w rozwoju odporności owadziego gospodarza na insektycyd. Związek pomiędzy owadem a jego mikrobiomem jest mało poznany dla wielu gatunków owadów, w tym skrzypionki zbożowej (*Oulema melanopus*, Coleoptera, Chrysomelidae) – ważnego szkodnika zbóż. Zarówno osobniki dorosłe jak i larwy uszkadzają rośliny zbóż, przy czym larwy są uważane za główne stadium szkodliwe i są obiektem zabiegów insektycydowych. Stosowanie insektycydów z różnych grup chemicznych jest główną metodą kontrolowania populacji skrzypionki zbożowej. Jednak ochrona chemiczna stosowana obecnie i w przyszłości może nie być tak skuteczna jak dawniej. Intensywne i częste stosowanie tych samych organicznych pestycydów może prowadzić do rozwoju odporności owada na insektycydy. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania alternatywnych, bardziej przyjaznych dla środowiska metod zwalczania szkodników owadzich.

Celem badań było sprawdzenie, czy skład bakterii związanych z larwami *O. melanopus* ulega zmianom w odpowiedzi na zabiegi insektycydowe.

Metodyka

Zbiór larw z pola

Potraktowanie larw insektycydami (trzy substancje czynne: flonikamid, chloropiryfos, cypermetryna w trzech dawkach 10, 1 i 0.1µg/ml) oraz wodą (kontrola)



Ocena liczby martwych owadów po 24 i 48 godzinach

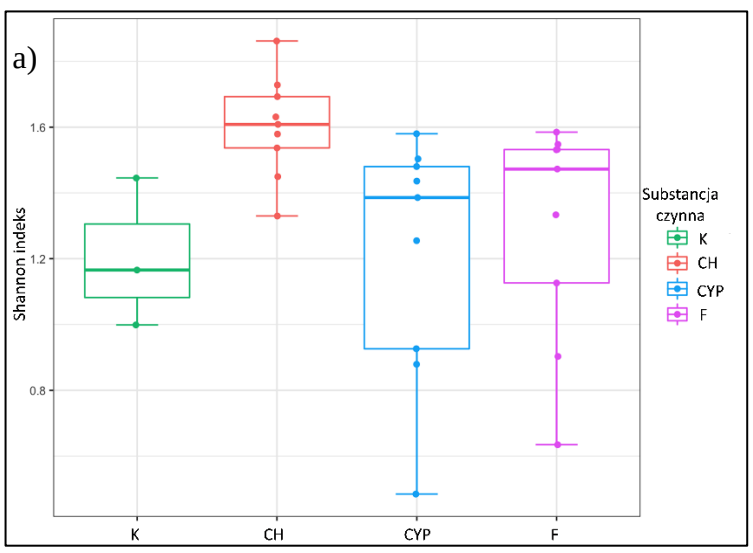
Izolacja DNA z larw

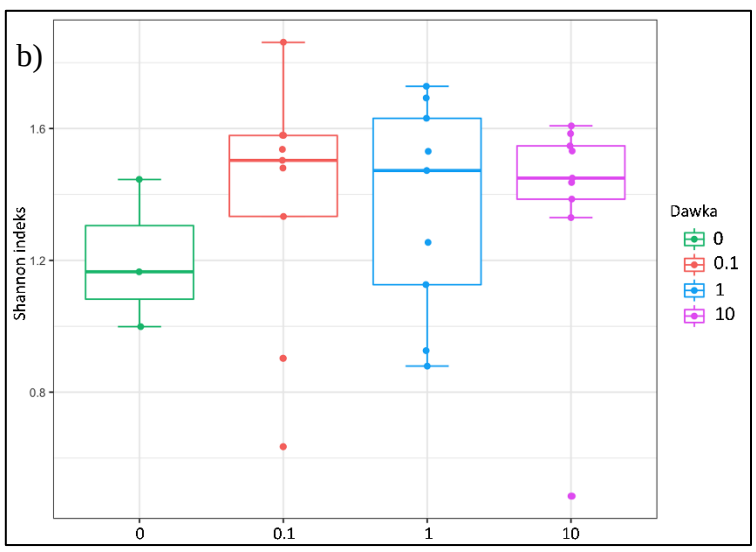
Scharakteryzowanie profilu bakteryjnego larw z każdego wariantu doświadczenia poprzez sekwencjonowanie genu 16S rRNA w regionie V3-V4

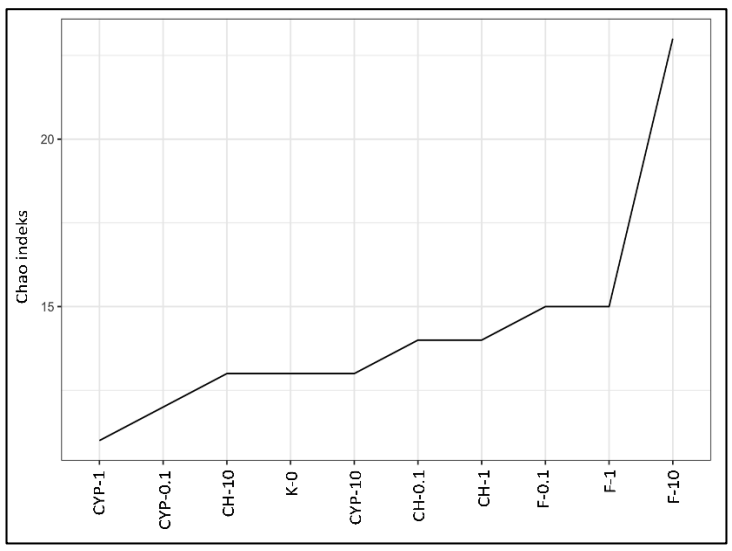
Analiza taksonomiczna uzyskanych odczytów DNA przy użyciu algorytmu Kraken 2 zaimplementowanego w oprogramowaniu OmicsBox

Analiza statystycznych

Wyniki

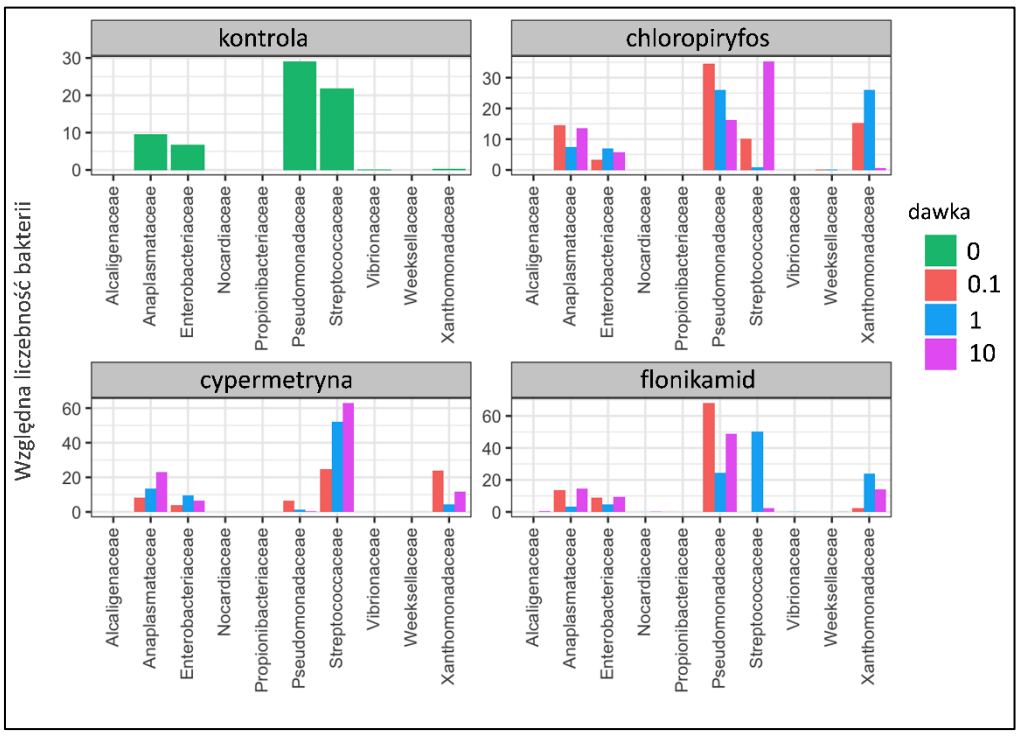






Wyk. 1 Różnorodność bakterii (alpha diversity – indeks Shannon) dla poziomu taksonomicznego rodzina w zależności od **a)** zastosowanej substancji czynnej insektycydu oraz **b)** jej dawki. K-kontrola (woda), CH-chloropiryfos, CYP-cypermetryna, F-flonikamid.

Wyk. 2 Różnorodność bakterii (indeks Chao) dla poziomu taksonomicznego rodzina w zależności od zastosowanej substancji czynnej insektycydu oraz jej dawki. K-kontrola (woda), CH-chloropiryfos, CYP-cypermetryna, F-flonikamid.



Wyk. 3 Względna liczebność bakterii u larw skrzypionek w zależności od zastosowanej substancji czynnej insektycydu oraz jej dawki.

- Dla zmiennej substancja czynna insektycydu odnotowano, że średnie wartości dla traktowań insektycydem, szczególnie dla substancji czynnej chloropiryfos były wyższe w porównaniu do kontroli (**Wyk. 1a**),
- Dla zmiennej dawka substancji czynnej insektycydu ogólna tendencja w średnich wartościach dla wszystkich traktowań oprócz kontroli jest wyrównana, przy czym najwięcej obserwacji odstających z wyższymi i niższymi wartościami odnotowano dla dawki 0.1µg/ml (**Wyk. 1b**),
- Największą bioróżnorodność bakterii dla poziomu taksonomicznego rodzina odnotowano dla wszystkich zastosowanych dawek substancji czynnej – flonikamid (**Wyk. 2**),
- Dla wszystkich traktowań insektycydem odnotowano znacznie wyższą względną liczebność bakterii należących do rodziny Xanthomonadaceae w porównaniu do kontroli (**Wyk. 3**). Ponadto odnotowano wyższą liczebność względną Streptococcaceae dla traktowania cypermetryną oraz bakterii należących do rodziny Pseudomonadaceae i Streptococcaceae dla substancji czynnej flonikamid.

Wnioski

- Traktowanie insektycydem wpłynęło na zwiększenie bioróżnorodności bakterii związanych z larwami skrzypionek na poziomie rodzina,
- Zwiększenie liczebności bakterii z rodziny Xanthomonadaceae, Streptococcaceae ,oraz Pseudomonadaceae po potraktowaniu insektycydem może sugerować, że niektóre gatunki bakterii wymienionych rodzin odgrywają istotną rolę w adaptacji larw do zastosowanych insektycydów,
- Uzyskana wiedza pozwoli zrozumieć udział bakterii w metabolizmie insektycydów oraz ich rolę w rozwoju oporności owada na insektycydy.

Badania sfinansowano z grantu 2020/37/N/NZ9/02577

VI Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

Społeczności endofitów bakteryjnych związanych z liśćmi bioenergetycznych drzew - *Paulownia elongata* x *fortunei*

Małgorzata Woźniak[1*], Anna Marzec-Grządziel[1], Anna Gałązka[1], Magdalena Frąc[2]

[1]Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, e-mail: *m.wozniak@iung.pulawy.pl; [2]Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk, ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin

WSTĘP

Paulownia to bioenergetyczne drzewo liściaste, które w sprzyjających warunkach osiąga wysokie tempo wzrostu (gatunek szybkorosnący). Wszystkie żywe organizmy, w tym rośliny, są skolonizowane przez różnorodną i złożoną populację mikroorganizmów. Analiza struktury i funkcji mikrobiomu endofitycznego pozwala na poznanie ekologii mikroorganizmów oraz może stanowić podstawę do opracowania strategii zarządzania uprawami bioenergetycznymi.

CEL BADAŃ

Celem niniejszych badań była ocena struktury i funkcjonalnej różnorodności zbiorowisk bakterii endofitycznych związanych z liśćmi *Paulownia elongata* x *fortunei* w oparciu o sekwencjonowanie fragmentów V5-V7 genu 16S rRNA oraz analizę Biolog EcoPlates..

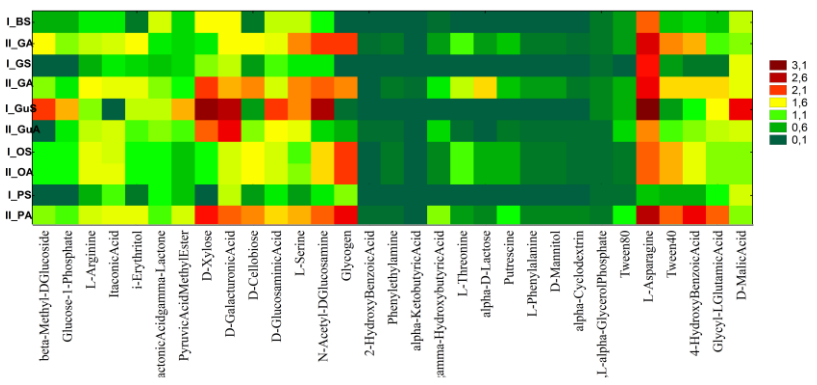
MATERIAŁY I METODY

Tabela 1. Lista próbek liści *Paulownia*

Nr.	Lokalizacja	Termin poboru	Skrót
1.	Barciany	Lato	I_BS
2.		Jesień	II_BA
3.	Granice	Lato	I_GS
4.		Jesień	II_GA
5.	Gubin	Lato	I_GuS
6.		Jesień	II_GuA
7.	Otrebusy	Lato	I_OS
8.		Jesień	II_OA
9.	Podkampinos	Lato	I_PS
10.		Jesień	II_PA

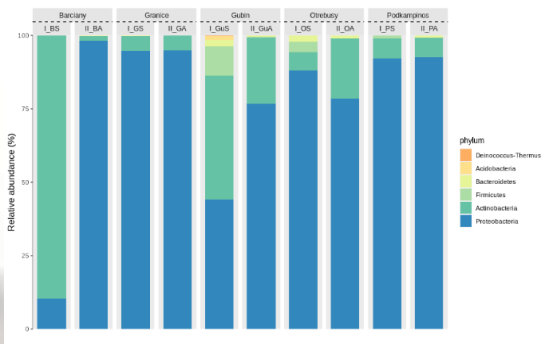
- ❖ Sterylizacja powierzchniowa tkanek liści *Paulownia;*
- ❖ Oznaczenie funkcjonalnego zróżnicowania zbiorowisk drobnoustrojów we wszystkich próbkach liści przeprowadzono przy użyciu Biolog EcoPlates;
- ❖ Izolacja genomowego DNA ;
- ❖ Sekwencjonowanie NGS fragmentów genu 16S rRNA (V5-V7);
- ❖ Analiza bioinformatyczna ASVs (Amplicon sequence variants);

WYNIKI I PODSUMOWANIE



Ryc.1. Heatmapa obrazująca profile metaboliczne społeczności bakterii z liści *Paulownia*

W pracy analizowano skład bakteryjny próbek liści *Paulowni* z różnych lokalizacji zarówno w okresie letnim, jak i jesiennym. Względne liczebności 6 najliczniejszych typów przedstawiono na rycinie 2. Wyniki wykazały, że wśród społeczności bakterii w próbkach liści pobranych w obu sezonach ze wszystkich miejscowości dominowały bakterie sklasyfikowane do typu Proteobacteria i Actinobacteria.



Ryc.2. Histogram przedstawiający endomikrobiom liści *Paulownia*

Aby zilustrować wyniki metody Biolog i profile metaboliczne, wzory wykorzystania 31 substratów węglowych przedstawiono w postaci wykresu heatmapy (ryc. 1). Największe bogactwo funkcjonalne wśród badanych endofitów zaobserwowano dla społeczności bakterii z próbki liści wyselekcjonowanej z Granic w okresie jesiennym. Ogólnie, zbiorowiska drobnoustrojów we wszystkich próbkach liści wykazywały podobny trend wykorzystania substratów. Warto podkreślić, że L-asparagina, kwas D-galakturonowy i N-acetylo-D to związki, które są najintensywniej metabolizowane przez mikroorganizmy we wszystkich próbkach, niezależnie od sezonu pobierania próbek (ryc. 1).

Bakterie sklasyfikowane do typu Proteobacteria i Actinobacteria stanowiły dominujące typy mikrobiomu liści *Paulownia*. Analiza profili metabolicznych na podstawie Biolog EcoPlates™ wykazała, że społeczności bakterii endofitycznych charakteryzowały się najwyższą aktywnością metaboliczną w stosunku do kwasów karboksylowych i aminokwasów.

Badania finansowano ze środków projektu NCN-Preludium, nr projektu UMO-2016/23/N/NZ9/02157.

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowy Instytut Badawczy

VI Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne
„METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK"
Puławy, 23-24 czerwca 2022 roku

Potencjał bakterii endofitycznych do produkcji deaminazy ACC

Małgorzata Woźniak[1*], Renata Tyśkiewicz[2], Anna Marzec-Grządziel[1], Anna Gałązka[1], Jolanta Jaroszuk-Ściseł[3]

[1]Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa–Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, e-mail: *m.wozniak@iung.pulawy.pl;
[2]Laboratorium Analityczne, Łukasiewicz–INS, al. Tysiąclecia Państwa Polskiego 13a, 24-110 Puławy,
[3]Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

WSTĘP

- **Globalne zmiany klimatu to problem o najwyższym priorytecie**, zwiększający częstotliwość występowania ekstremalnych warunków pogodowych i mający wpływ na produkcję roślinną na całym świecie.
- **Stres w rolnictwie** został zidentyfikowany jako czynniki zewnętrzne, które mogą powodować nieprawidłowości w cyklu upraw.

- Jednym z mechanizmów stymulowania wzrostu roślin w warunkach stresowych jest zdolność bakterii do produkcji **enzymu deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (deaminaza ACC),** który reguluje syntezę etylenu przez metabolizowanie ACC (cząsteczka prekursorowa etylenu w roślinach wyższych).
- **Etylen** jest ważnym hormonem roślinnym, którego większe ilości hamują wzrost wegetatywny roślin. Roślinny poddane warunkom stresowym produkują etylen w dużych stężeniach. Obecność bakterii syntetyzujących deaminazę ACC, jest korzystna dla roślin w warunkach stresowych

CEL BADAŃ

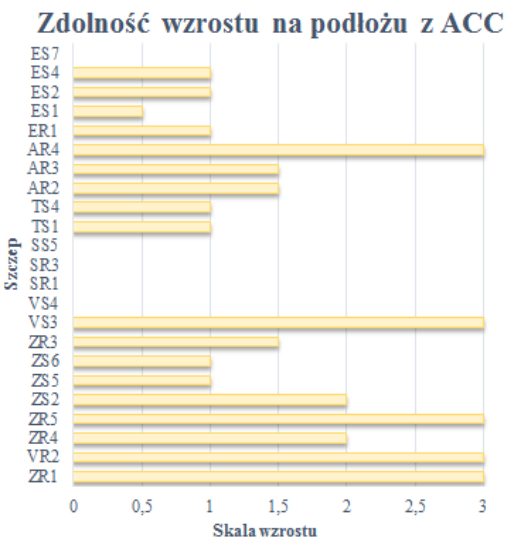
Celem niniejszego badania była wstępna selekcja szczepów bakterii endofitycznych produkujących enzym deaminazę ACC (kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego), który reguluje poziom inhibitora wzrostu roślin – etylenu i zwiększa tolerancję roślin na stres.

MATERIAŁY I METODY

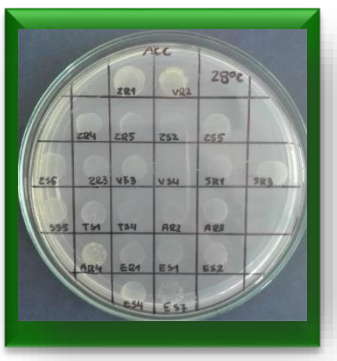
Badania przeprowadzono na 23 szczepach bakterii endofitycznych zidentyfikowanych genetycznie w oparciu o analizę porównawczą sekwencji genu 16S rRNA . Wstępną selekcję szczepów wykonano w oparciu o klasyczną technikę płytek agarowych na podłożu zawierającym ACC jako jedyne źródło azotu. Następnie przeprowadzono amplifikację genu *acd*S (kodującego deaminazę ACC) techniką real-time PCR. Do amplifikacji genu wykorzystano startery F1936* i F1939*.

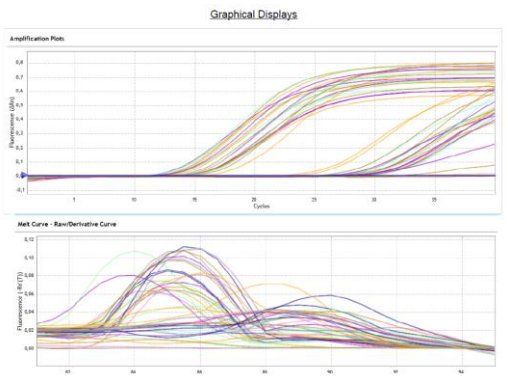
WYNIKI

Badane izolaty oceniono pod względem wzrostu na podłożu agarowym Dworkin-Foster zawierającym jako jedyne źródło azotu – ACC.



Zastosowano 3 stopniową skalę oceny wzrostu bakterii. Wyniki przedstawiono na wykresie.





Krzywe wygenerowane podczas reakcji PCR w czasie rzeczywistym: krzywa amplifikacji oraz krzywa topnienia produktów qPCR

Szczep		Cq	Tm
ZR1	*Novosphingobium resinovorum*	23,17	88
ZR3	*Delftia acidovorans*	26,03	90
ZR4	*Delftia acidovorans*	29,25	89,5
ZR5	*Stenotrophomonas* sp.	27,39	87,5
ZS2	*Delftia acidovorans*	29,44	89
ZS5	*Delftia acidovorans*	30,03	89
ZS6	*Delftia* sp.	29,08	89
VR2	*Variovorax paradoxus*	27,34	81
VS3	*Rhizobium sp.*	28,24	81
VS4	*Delftia acidovorans*	27,27	89
SR1	*Delftia* sp.	29,87	85
SR3	*Delftia acidovorans*	33,47	81
SS5	*Delftia acidovorans*	36,65	89
TS1	*Delftia acidovorans*	30,12	86
TS4	*Delftia acidovorans*	27,07	90
ER1	*Comamonas koreensis*	26,04	85,5
ES1	*Rhizobium* sp.	24,16	85,5
ES2	*Stenotrophomonas maltophilia*	28,05	89
ES4	*Brevundimonas* sp.	28,38	89,5
ES7	*Brevundimonas* sp.	29,65	90

PODSUMOWANIE

Na podstawie otrzymanych wyników analizy real-time PCR stwierdzono obecność genu acdS u wszystkich badanych szczepów, natomiast na podłożu agarowym z ACC, 5 izolatów nie wykazywało cech wzrostu. Wykonane testy jakościowe zostaną potwierdzoną również analizą ilościową. Celem dalszych badań będzie dokładne określenie potencjału biotechnologicznego wyizolowanych szczepów w promowaniu wzrostu i rozwoju roślin m.in. zdolności do wiązania azotu atmosferycznego, zdolność do wytwarzania kwasu indolilo-3-octowego.

Badania sfinansowano z tematu 1.21 „Identyfikacja molekularna i biochemiczna bakterii endofitycznych i ich zastosowanie w promowaniu wzrostu roślin", realizowanego w ramach działalności Statutowej IUNG-PIB oraz tematu UMCS BS-P-11-010-18-2-06 .

Bakterie symbiotyczne roślin z terenów nieuprawianych rolniczo jako źródło genów i funkcji metabolicznych przydatnych w promowaniu wzrostu roślin

Magdalena Wójcik, Piotr Koper, Kamil Żebracki, Małgorzata Marczak, Andrzej Mazur
Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wprowadzenie i cel pracy

Globalny wzrost liczby ludności wymusza zwiększanie produkcji roślin. Poprawę produktywności plonów można osiągnąć m. in. poprzez zwiększenie tolerancji roślin na niekorzystne warunki. Ważnym elementem tej strategii jest promowanie korzystnych relacji rośliny-mikroorganizmy. Symbiotyczne rizobia będąc ważnym składnikiem mikrobiomu ryzosfery rośliny bobowatych, wykorzystywanych do produkcji żywności dla ludzi jak i pasz zwierzęcych, uniezależniają je od nawożenia azotowego.

Celem pracy była weryfikacja hipotezy, że rizobia wyizolowane z roślin rosnących na nieuprawianych rolniczo terenach, mogą wykazywać pewne unikalne cechy metaboliczne, które nie uległy przekształceniu w skutek praktyk rolniczych. Takie bakterie lub ich aktywne metabolicznie geny mogą być użyteczne w perspektywie ich zastosowania w promowaniu wzrostu roślin.

Wyniki i wnioski

Punktem wyjścia do badań było profilowanie mikrobiomu gleby z ryzosfery roślin rosnących na nieuprawianych rolniczo terenach. Profilowanie oparto na analizie NGS zmiennego regionu V3-V4 16S rRNA w porównaniu do gleby rolniczej. Acidobacteria, Actinobacteria i Proteobacteria dominowały w obu badanych typach gleby ryzosferowej koniczyny, jednak ich proporcje były nieznacznie zmienione (Fig. 1A). Ponadto na poziomie rzędu, w ryzosferze koniczyny pochodzącej z gleby nieuprawianej rolniczo wykazano wyższą zawartość bakterii promujących wzrost roślin (PGPB) (Fig. 1B). Analiza statystyczna danych NGS potwierdziła wysoki stopień zróżnicowania mikrobiom ryzosfery koniczyny rosnącej na gruntach rolnych (B1-B3) jak i nieuprawianych rolniczo (A1-A3), parametry te były porównywalne dla obu typu gleb (Tab. 1).

Następnie z brodawek korzeniowych koniczyny białej i koniczyny łąkowej (czerwonej) z terenów BPN (dla których wykonano profilowanie mikrobiomu) wyizolowano 15 szczepów oznaczonych odpowiednio KB3-KB12 i KC2-KC8. Analiza filogenetyczna sekwencji genu 16S rRNA oraz *nodA* potwierdziła przynależność badanych izolatów do rodzaju *Rhizobium*. Izolaty różniły się istotnie pod względem liczby i wielkości plazmidów (od 0.085 Mpz dla szczepu KB3 do 1.145 Mpz dla szczepów KC2, KC4, KC5, KC7).

Tabela 1. Statystyka odczytów sekwencji uzyskanych w analizie NGS profilowania mikrobiomu gleby ryzosferowej koniczyny z gleby uprawnej vs. rosnącej na terenach nieuprawianych. Dla każdego profilu mikrobiomu wykonano trzy powtórzenia biologiczne (A1-A3, B1-B3). 46.2% sekwencji wejściowych zostało przypisanych do jednostek OTUs i taksonów. W analizie zidentyfikowano łącznie 889 OTU, 100% wykrytych OTU zostało przypisanych do taksonów.

Mikrobiom ryzosfery koniczyny	Sample name	Liczba uzyskanych odczytów	Liczba strymowanych odczytów	Liczba odczytów po usunięciu sekwencji chimeryczynch	Liczba sekwencji przypisanych do OTU	Liczba sekwencji przypisanych do taksonów	Chao1	Simpson	Shannon
Gleba rolna	A1	142741	142728	142202	67660	67660	42,2	0,892	3,242
	A2	117392	117378	117294	62174	62174	51,8	0,898	3,302
	A3	133225	133216	132867	55417	55417	41,2	0,890	3,222
Gleba nieuprawiana rolniczo	B1	154950	154933	154578	68491	68491	48,6	0,896	3,282
	B2	126259	126253	125933	53292	53292	47,6	0,894	3,262
	B3	135907	135896	135600	67351	67351	42,2	0,892	3,242

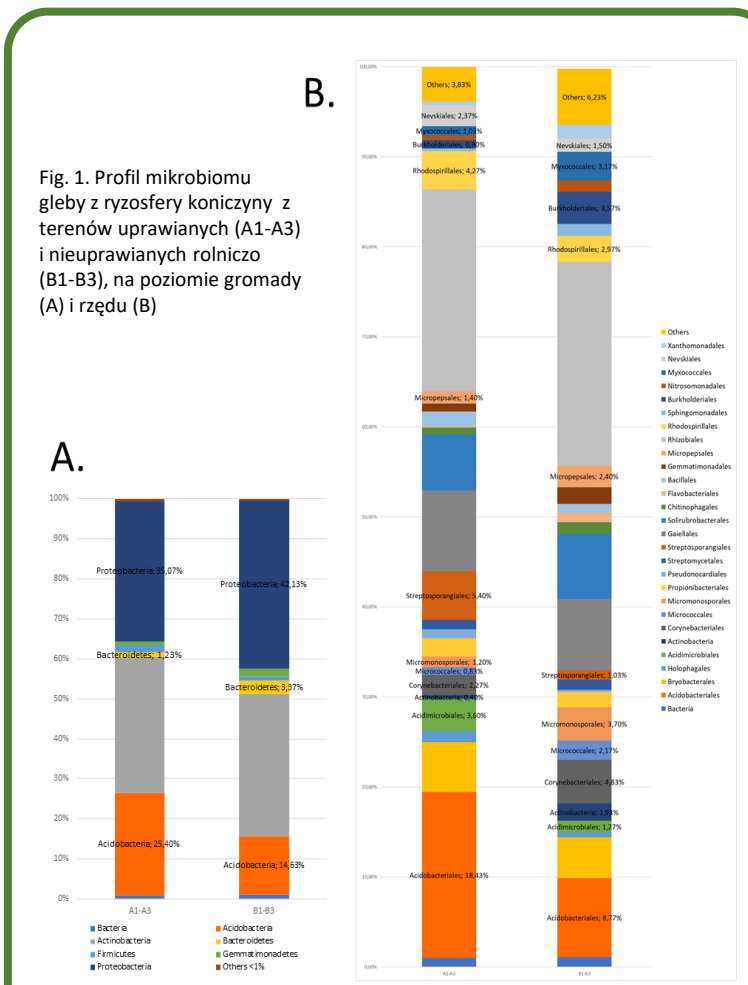


Fig. 1. Profil mikrobiomu gleby z ryzosfery koniczyny z terenów uprawianych (A1-A3) i nieuprawianych rolniczo (B1-B3), na poziomie gromady (A) i rzędu (B)

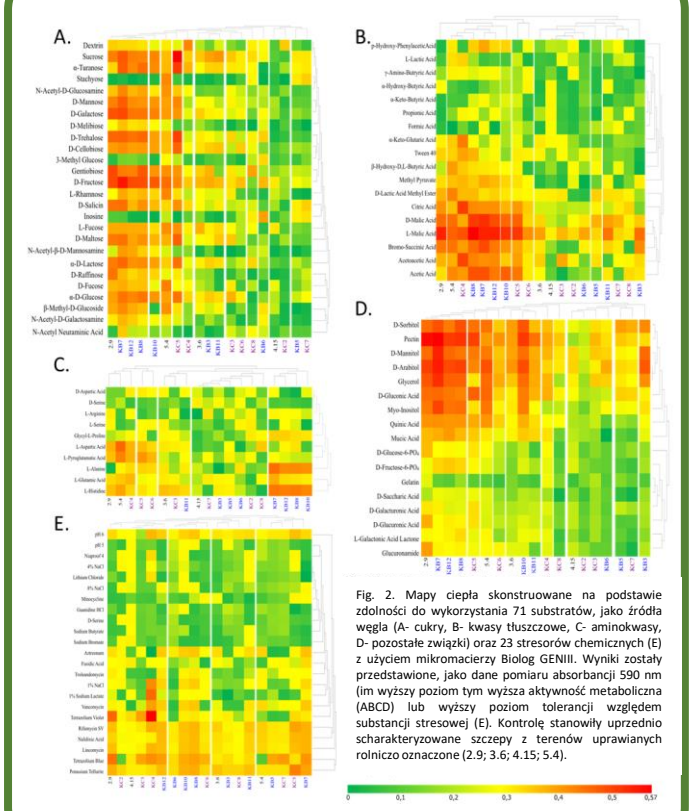


Fig. 2. Mapy ciepła skonstruowane na podstawie zdolności do wykorzystania 71 substratów, jako źródła węgla (A- cukry, B- kwasy tłuszczowe, C- aminokwasy, D- pozostałe związki) oraz 23 stresorów chemicznych (E) z użyciem mikromacierzy Biolog GENIII. Wyniki zostały przedstawione, jako dane pomiaru absorbancji 590 nm (im wyższy poziom tym wyższa aktywność metaboliczna (ABCD) lub wyższy poziom tolerancji względem substancji stresowej (E). Kontrolę stanowiły uprzednio scharakteryzowane szczepy z terenów uprawianych rolniczo oznaczone (2.9; 3.6; 4.15; 5.4).

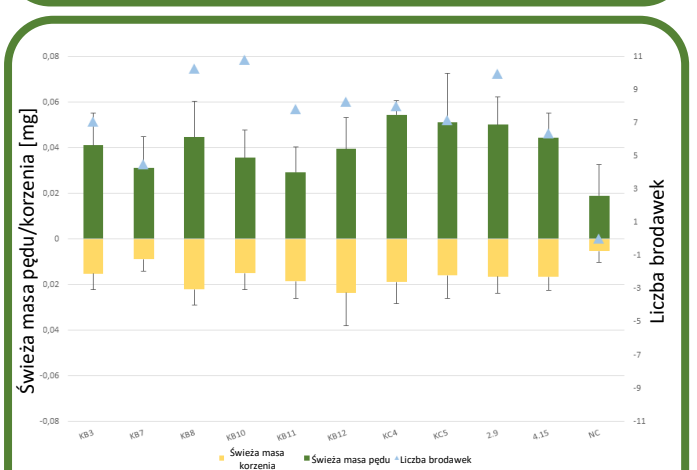


Fig. 3. Właściwości symbiotyczne mikrosymbiontów koniczyny białej i łąkowej wyrażone jako ilość brodawek, masa pędu i korzenia. NC – kontrola negatywna, rośliny niezakażane bakteriami

Kluczowym etapem badań było wyznaczenie profilu metabolicznego izolatów, z wykorzystaniem mikromacierzy BiOLOG GEN III, które pozwalają określić zdolność wykorzystywania 74 różnych źródeł węgla oraz wrażliwość bakterii na 23 stresory chemiczne. Wykazano, że szczepy KB7, KB8, KB10, KB12, KC4, KC5 charakteryzowały się duża zdolnością do wykorzystania różnorodnych źródeł węgla i energii, a także wyższą tolerancją na stresory chemiczne (Fig. 2).

Aktywność symbiotyczną izolatów określono w testach roślinnych, w których kontrolę stanowiły szczepy z gleby uprawianej rolniczo oznaczone 2.9 i 4.15 oraz rośliny niezakażane bakteriami (NC).

Aktywne metabolicznie izolaty KC4, KC5 wykazywały najwyższą wydajność symbiotyczną. Świeża masa pędów roślin inokulowanych szczepami KB3, KB7, KB8, KB10, KB11, KB12 również była istotnie wyższa w porównaniu do roślin niezaszczepionych (Fig. 3).

Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę o wysokim potencjale metabolicznym badanych izolatów i ich zdolnościach w promowaniu wzrostu roślin.

Sfinansowano ze środków projektu badawczego dla młodych naukowców Instytutu Nauk Biologicznych UMCS MN/2021/4

Zróżnicowanie genetyczne populacji rizobiów funkcjonujących w warunkach wysokiej lub niskiej konkurencji międzyszczepowej

Karolina Włodarczyk, Jerzy Wielbo

Katedra Genetyki i Mikrobiologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wstęp: Biopreparaty zawierające w swoim składzie żywe komórki rizobiów są od dziesięcioleci używane w uprawie licznych gatunków roślin bobowatych. Ich stosowanie ma na celu umożliwienie roślinom nawiązanie wysokoefektywnej symbiozy z bakteriami, których obecność i funkcjonowanie w brodawkach korzeniowych dostarcza roślinnemu gospodarzowi związków azotu niezbędnych do wzrostu i wydajnego plonowania.

Brodawki korzeniowe powstają w trakcie wieloetapowego procesu odbywającego się z udziałem mikrosymbiontów i ich roślinnego gospodarza. Obejmuje on między innymi powstanie nowych merystemów w korzeniach, kolonizację tkanek roślinnych przez rizobia oraz rozwój wyspecjalizowanych struktur składających się na dojrzałą brodawkę korzeniową, w której odbywa się redukcja azotu cząsteczkowego. W trakcie tego procesu o miejsce w rozwijających się brodawkach mogą rywalizować liczne szczepy obecne w ryzosferze - zarówno symbionty, jak i niesymbiotyczne endofity.

Cechy rizobiów takie jak zdolność do wydajnej redukcji azotu cząsteczkowego oraz zdolność do kolonizacji brodawek korzeniowych nie są ze sobą skorelowane. Mimo że wysoka wydajność bakteryjnej redukcji azotu atmosferycznego jest korzystna dla roślin, symbiotyczne rizobia kolonizujące brodawki, podobnie jak szczepy obecne w ryzosferze, w większości wykazują przeciętną lub niską wartość tej cechy. Z tego powodu w uprawie roślin bobowatych często stosuje się biopreparaty zawierające wyselekcjonowane szczepy zdolne do wysokowydajnej redukcji azotu cząsteczkowego - także w przypadku prowadzenia upraw na glebach zawierających rizobia. Większość polskich gleb jest zasiedlona przez zróżnicowane populacje rizobiów o wysokiej liczebności, dlatego można przyjąć, że główną przyczyną często obserwowanego braku pozytywnego efektu inokulacji roślin przy pomocy zastosowanego biopreparatu jest niezdolność wprowadzonego szczepu do kolonizacji brodawek, spowodowana jego niską konkurencyjnością w stosunku do szczepów autochtonicznych.

Prowadzone od lat badania nad cechami związanymi z wykształceniem wysokich zdolności konkurencyjnych rizobiów na razie nie pozwalają na jednoznaczne wskazanie tych, które przesądzają o sukcesie szczepu w procesie kolonizacji brodawek korzeniowych. Wskazuje się między innymi na zdolność do chemotaktycznej reakcji na wydzieliny korzeniowe roślin, zdolność do wykorzystania określonych związków jako źródeł węgla, azotu i energii, zdolność do syntezy sygnałów molekularnych działających na rośliny czy powiązania z bakteryjnym systemem *quorum sensing*, jednak brak kompleksowych badań dostarczających danych na temat wkładu tych cech w wykształcenie obserwowanego poziomu konkurencyjności szczepu. Poznanie istotności poszczególnych składowych wpływających na zdolności kompetycyjne rizobiów byłoby bardzo pomocne w procesie izolacji i selekcji szczepów przeznaczonych do produkcji biopreparatów stymulujących wzrost roślin bobowatych, ponieważ mogłoby wskazać genetyczne determinanty cech, które (oprócz wysokiej wydajności redukcji azotu cząsteczkowego) powinny posiadać takie szczepy, a to minimalizowałoby ryzyko produkcji biopreparatów na bazie szczepów wysokowydajnych lecz o niskiej konkurencyjności.

Cel pracy: Celem pracy było określenie zróżnicowania i podobieństwa genetycznego szczepów należących do 4 populacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Rizobia wszystkich czterech populacji pochodziły z tego samego środowiska glebowego, jednak były izolowane różnymi metodami, dzięki czemu uzyskano dwie populacje izolowane w warunkach wysokiej konkurencji (izolaty z brodawek, które zasiedliły nieliczne szczepy z dużej grupy obecnych w ryzosferze – po etapie intensywnej konkurencji międzyszczepowej w trakcie kolonizacji tkanek roślinnych), oraz dwie populacje izolowane w warunkach braku konkurencji: pochodzącą wprost z gleby, oraz pochodzącą z brodawek korzeniowych, których zasiedlenie nie wiązało się z konkurencją międzyszczepową (niewielka liczba komórek podanych do ryzosfery roślin umożliwiała zasiedlenie brodawek wszystkim szczepom, które weszły w kontakt z roślinami).

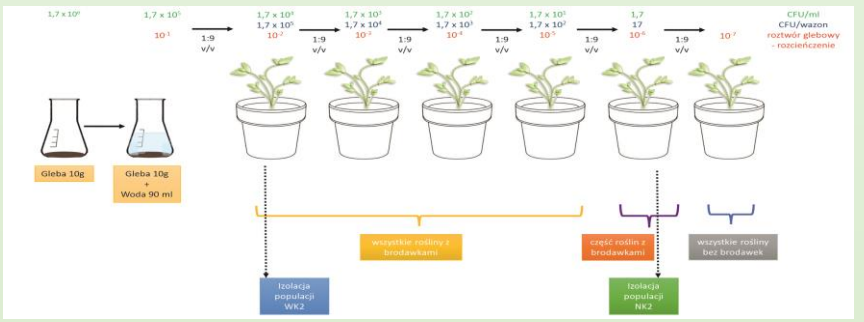
Materiały i metody: Rizobia wykorzystane w badaniach pochodziły z gleby ugorowanej, w której liczebność *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* oznaczono metodą biotestu MPN (ang. *most probale number*) wynosiła 1,7 x 10^6 komórek/g gleby. Ogółem zbadano 77 szczepów *R. leguminosarum* bv. trifolii należących do 4 populacji: WK1 (18 szczepów), WK2 (19 szczepów), NK1 (20 szczepów) i NK2 (20 szczepów) (Tab. 1).

Populację WK1 izolowano z brodawek korzeniowych koniczyny czerwonej (*Trifollium pratense*) rosnącej na w.w. glebie, natomiast populację NK1 izolowano z wodnego wyciągu otrzymanego z tej gleby. Populacje WK2 oraz NK2 izolowane były z brodawek korzeniowych koniczyny czerwonej użytej w bioteście MPN oszacowującym liczbę *R. leguminosarum* bv. *trifolii* w glebie – z roślin, u których kolonizacja brodawek przebiegła w warunkach wysokiej konkurencji (WK2) lub przy jej braku (NK2) (Rys. 1).

Z czystych kultur badanych izolatów izolowano całkowite DNA, a następnie przeprowadzono reakcję BOX-PCR z zastosowaniem startera BOX1AR (5'-CtCCGGCAAGGCGACGCTGAC-3') i warunków amplifikacji: wstępna denaturacja – 3 min, 95°C; denaturacja – 1 min, 94°C; przyłączanie startera – 1 min, 53°C; wydłużanie produktu – 8 min, 65 °C; końcowe wydłużanie – 4 min, 65 °C; liczba cykli: 35. Uzyskane amplikony były rozdzielane elektroforetycznie w żelu agarozowym (1,5%), w buforze TBE, przy 140V przez 1,5 godz. Otrzymane profile amplifikacyjne analizowano przy użyciu programu BioD1++, a dendrogram opisujących podobieństwo genetyczne badanych szczepów wykonano z wykorzystaniem metody UPGMA.

Populacja	Szczepy	Charakterystyka populacji
WK1	BRC2, BRC3, BRC4, BRC5, BRC6, BRC8, BRC9, BRC10, BRC11, BRC12, BRC13, BRC14, BRC15, BRC16, BRC17, BRC18, BRC19, BRC20	Szczepy izolowane z brodawek korzeniowych koniczyny rosnącej na niesterylnej glebie zawierającej około 1,7 x 10^6 komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* / g gleby; wysoki poziom konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych
WK2	AA1, AA2, AA4, AA5, BB1, BB2, BB3, BB5, BB6, CC1, CC3, CC4, CC5, DD1, DD2, DD3, DD6, DD7, DD8	Szczepy izolowane z brodawek korzeniowych koniczyny rosnącej na sterylnym piasku, zakażonej wyciągiem glebowym zawierającym około 1,7 x 10^6 komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* / ml; wysoki poziom konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych
NK1	GLA2, GLA4, GLA5, GLA7, GLA8, GLA9, GLA11, GLA12, GLA14, GLA15, GLA17, GLA18, GLA19, GLA21, GLA23, GLA24, GLA25, GLA26, GLA28, GLA29	Szczepy izolowane z wyciągu glebowego zawierającego około 1,7 x 10^6 komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii*; brak konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych
NK2	A1, A2, A3, A4, A5, B3, B4, B6, B7, C1, C3, C4, C5, C6, C7, D1, D2, D3, D4, D5	Szczepy izolowane z brodawek korzeniowych koniczyny rosnącej na sterylnym piasku, zakażone wyciągiem glebowym zawierającym około 2 komórek *R. leguminosarum* bv. *trifolii* / ml; brak (bardzo niski poziom?) konkurencji w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych

Tab1. Charakterystyka badanych szczepów



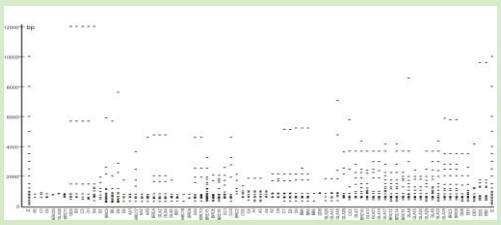
Rys.1 Schemat biotestu MPN opisujący pochodzenie populacji WK2 i NK2

	Populacja				RAZEM grupa
	WK1	WK2	NK1	NK2	
	Wysoka konkurencja		Brak konkurencji		
	Liczba szczepów należących do grup pochodząca z danej populacji				
Grupa 1	3	1	1	8	13 (100%)
	(31%)		(69%)		
Grupa 2a	9	8	3	3	23 (100%)
	(74%)		(26%)		
Grupa 2b	6	10	16	9	41 (100%)
	(39%)		(61%)		

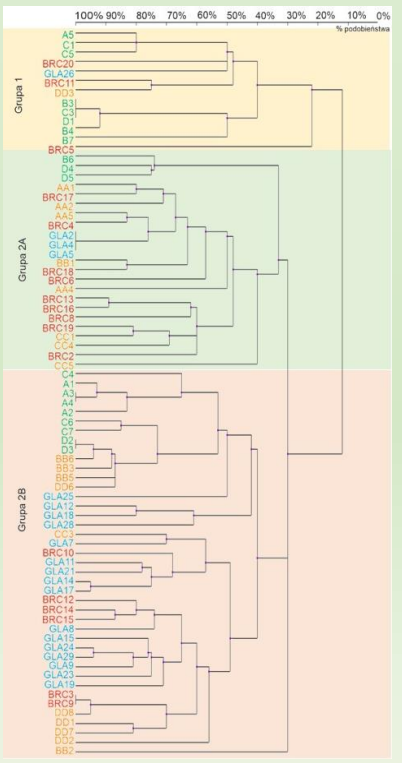
Tab2. Udział szczepów należących do badanych 4 populacji w grupach (kladach) dendrogramu

	Populacja			
	WK1	WK2	NK1	NK2
	Liczba szczepów należących do grup pochodząca z danej populacji (% całkowitej liczby szczepów populacji)			
Grupa 1	3 (17%)	1 (5%)	1 (5%)	8 (40%)
Grupa 2a	9 (50%)	8 (42%)	3 (15%)	3 (15%)
Grupa 2b	6 (33%)	10 (53%)	16 (80%)	9 (45%)
RAZEM populacja	18 (100%)	19 (100%)	20 (100%)	20 (100%)

Tab3. Udział szczepów pochodzących z populacji o różnym nasileniu konkurencji międzyszczepowej w poszczególnych grupach (kladach) dendrogramu



Rys. 2 Profile BOX-PCR uzyskane dla badanych szczepów



Rys. 3 Genetyczne podobieństwo badanych szczepów oszacowane z zastosowaniem metody BOX-PCR

Wyniki: W wyniku amplifikacji metodą BOX-PCR uzyskano produkty o wielkości od ok. 260 pz do ok. 12000 pz; w zależności od szczepu otrzymywano od 2 do 16 amplikonów (Rys. 2). Analiza porównawcza profili restrykcyjnych pozwoliła na stworzenie dendrogramu przedstawiającego podobieństwo genetyczne profili BOX-PCR badanych izolatów, dzięki któremu można podzielić badane szczepy na 3 grupy: Grupę 1, Grupę 2a oraz Grupę 2b (Rys. 3).

Widoczne na dendrogramie grupowanie szczepów nie pozwala na dokładne rozdzielenie szczepów należących do różnych populacji, jednak można zauważyć pewne zależności: 50% szczepów populacji WK1 zostało zgrupowanych w kladzie „Grupa 2a", a 80% szczepów populacji NK1 – w kladzie „Grupa 2b". Z kolei tylko 1 szczep do populacji WK2 znalazł się w Grupie 1, i tylko 3 szczepy należące do populacji NK2 – w Grupie 2a (Tab. 2).

Biorąc pod uwagę klasyfikację badanych populacji jako „pozyskane ze środowiska po etapie intensywnej konkurencji międzyszczepowej w trakcie zakażania gospodarza" (WK1, WK2) można zauważyć znaczną dysproporcję dotyczącą grupowania szczepów: 74% szczepów stanowiących klad „Grupa 2a" to szczepy z populacji „z konkurencją" (WK1 i WK2), natomiast 69% szczepów kladu „Grupa 1" oraz 61% „Grupa 2b" to szczepy z populacją „bez konkurencji" (NK1 i NK2) (Tab.3).

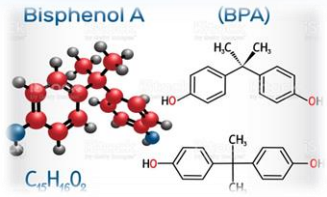
Podsumowanie: Zastosowana technika badania zróżnicowania genetycznego badanych izolatów (BOX-PCR) nie wykorzystuje markerów genetycznych związanych z właściwościami kompetycyjnymi rizobiów wyrażającymi się podczas kolonizacji brodawek roślinnego gospodarza, pozwalając jedynie na przybliżone oszacowanie podobieństwa porównywanych genomów. Jednak otrzymany wynik lokujący większość szczepów populacji „z konkurencją" w grupach innych niż większość szczepów populacji „bez konkurencji" pozwala na przypuszczenie, że genomy szczepów „konkurencyjnych" różnią się od „niekonkurencyjnych" – być może wskutek obecności określonych genów/sekwencji/regionów genetycznych. Możliwe, że sekwencjowanie oraz wykonanie analizy porównawczej sekwencji całych genomów szczepów należących do tych populacji pozwoliłoby na wskazanie tych genów/sekwencji/regionów genetycznych związanych z konkurencyjnością. Takie dane byłby cenna wskazówką możliwą do wykorzystania w procesie selekcji szczepów wysokowydajnych w redukcji azotu cząsteczkowego – i zarazem wysokokonkurencyjch w procesie zasiedlania brodawek korzeniowych roślinnego gospodarza.

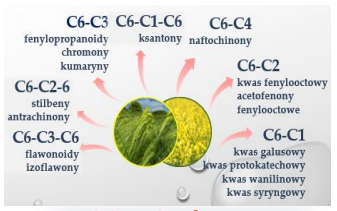
Różnorodność mikrobiomu w glebie zanieczyszczonej bisfenolem A obsianej rzepakiem jarym i kukurydzą

Magdalena Zaborowska, Jadwiga Wyszkowska, Agata Borowik, Jan Kucharski
Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

WYDZIAŁ ROLNICTWA I LEŚNICTWA

WSTĘP



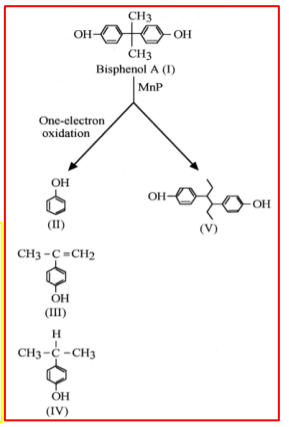


Struktura chemiczna bisfenolu A (2,2-bis(4-hydroksyfenylo) propanu) z podstawionymi dwiema fenolowymi grupami hydroksylowymi w pozycji para warunkuje jego dobrą reaktywność związaną z substytucją elektrofilową, przekształcaniem w etery, estry i sole oraz uleganie substytucji elektrofilowej takiej jak sulfonowanie, alkilowanie i nitrowanie.

Przewiduje się, że w 2022 roku, w Europejskim Obszarze Gospodarczym, roczna stopa produkcji lub importu BPA będzie wynosiła $10.6 \cdot 10^9$ kg

Grupa hydroksylowa BPA wchodzi w reakcje z jonami lub związkami binarnymi w glebie, tworząc estrogeny zmieniające mobilność BPA w układzie gleba – roślina. W tkankach roślin BPA jest szybko metabolizowany w procesie glikozylacji bądź syntezy wysoce polarnych produktów polimerowych.

Za proces biodegradacji bisfenolu A odpowiadają monooksygenazy: hydroksylaza fenolowa, pochodne cytochromu P-450; dioksygenazy: katecholowa 1,2-dioksygenazy, katecholowa 2,3-dioksygenaza oraz enzymy ligninolityczne: peroksydaza ligninowa, lakkaza, peroksydaza manganowa.



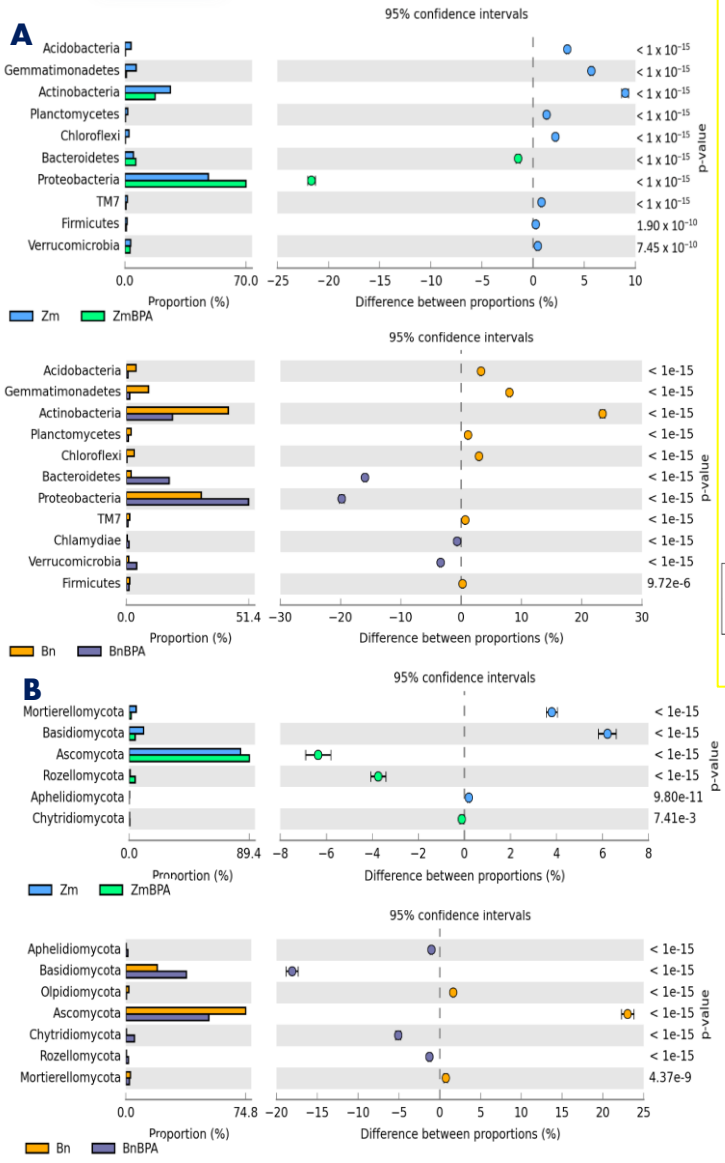
Cel badań

Brak szerokiej puli danych stanowiących matrycę do kształtującej się oceny skali potencjalnie inhibicyjnego oddziaływania BPA na mikrobiom glebowy, przyczynił się do ukonstytuowania celu badań. W przeprowadzonym eksperymencie określono wpływ BPA na liczebność i bioróżnorodność drobnoustrojów poszerzony o analizę wpływu tego bisfenolu na wzrost i rozwój rzepaku jarego (Brassica naupus) oraz kukurydzy (Zea mays).

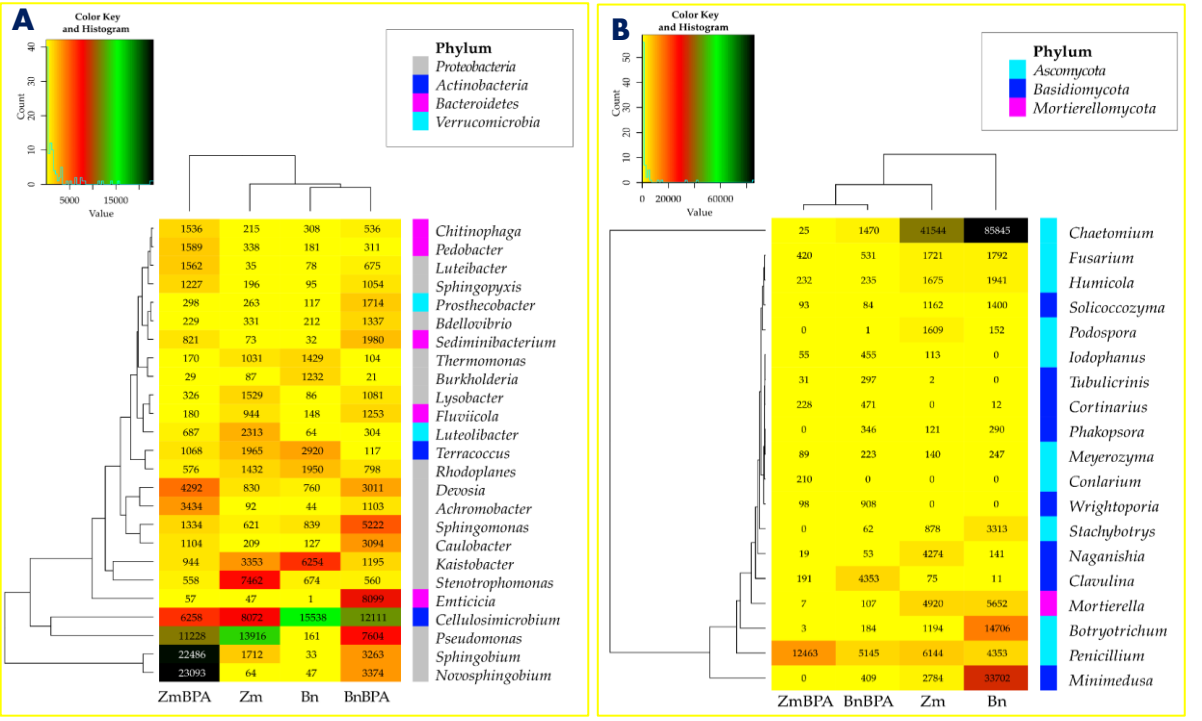
Materiały i Metody

Badania wykonano w doświadczeniu wazonowym, aplikując do gleby następujące ilości BPA: 0, 10, 100, 1000 mg BPA kg^{-1} s.m. gleby. Skład mikrobiomu gleby oznaczono metodą hodowlaną i metagenomiczną. Kondycję gleby zweryfikowano określając wartości wskaźników: rozwoju kolonii (CD) i ekofizjologicznej różnorodności (EP) mikroorganizmów, tolerancji mikroorganizmów i roślin (TI_{BPA}), stosunku masy części nadziemnych do korzeni roślin (PR) oraz zieloności liści SPAD.

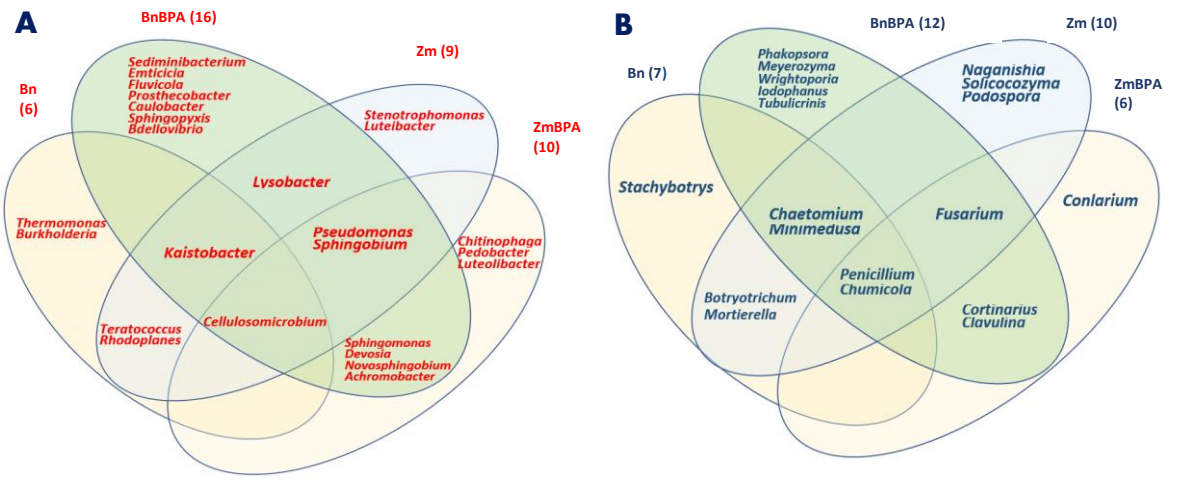
Wyniki



Rys. 1. Porównanie względnej liczebności OTU ≥ 1% phylum bakterii (A) i grzybów (B) w glebie zanieczyszczonej BPA, obsianej rzepakiem jarym (Bn) i kukurydzą (Zm)



Rys. 2. Liczebność OTU ≥ 1% rodzajów bakterii (A) i grzybów (B) w glebie zanieczyszczonej BPA, obsianej Bn i Zm



Rys. 3. Liczba unikalnych i wspólnych rodzajów bakterii (A) i grzybów (B) w glebie zanieczyszczonej BPA, obsianej Bn i Zm

Wnioski

1. Analiza metagenomiczna wykazała, że *Proteobacteria* były dominującym phylum bakterii, a *Ascomycota* grzybów. Niezależnie od gatunku uprawianej rośliny, związek fenolowy zmniejszał obfitość OTU *Actinobacteria*.
2. Wyłoniono również mikroorganizmy o potencjale bioremediacyjnym w stosunku do BPA, do których należą bakterie z rodzaju *Novosphingobium* i *Sphingomonas*, oraz grzyby z rodzaju *Penicillium*.
3. Reprezentantami mikroorganizmów najwrażliwszych na presję związku fenolowego okazały się *Stenotrophomonas* i *Cellulosimicrobium* wśród bakterii i *Chaetomium* wśród grzybów.
4. Stres biotyczny związany z ingerencją BPA wywołał zróżnicowane reakcje, zarówno wśród bakterii, promieniowców jak i grzybów. Zmieniał strukturę mikroorganizmów ze strategii k na strategię r.
5. Wrażliwość kukurydzy oraz rzepaku jarego na BPA wyklucza te gatunki z grupy roślin uprawnych skutecznie przywracających homeostazę gleby zanieczyszczonej tym związkiem fenolowym.

Aktywacja elongacji korzeni *Arabidopsis thaliana* z udziałem szczepu *Sporobolomyces ruberrimus* jako przykład roli endofitów w promowaniu wzrostu roślin

Magdalena Zyzik*, Agnieszka Domka, Piotr Rozpądek

Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

WSTĘP

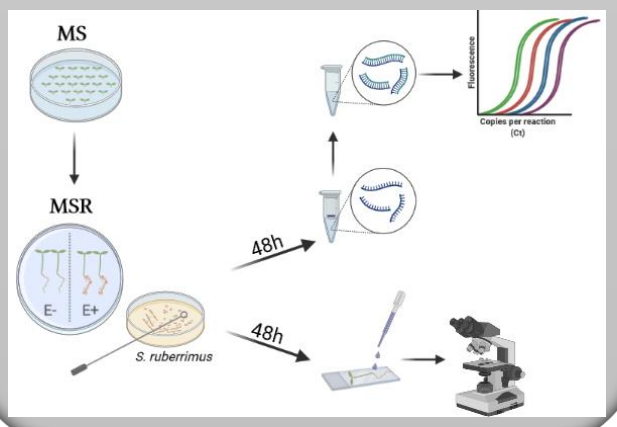
Udostępnianie związków mineralnych, biosynteza regulatorów wzrostu czy też hamowanie rozwoju patogenów roślinnych stanowią główne strategie promowania wzrostu roślin z udziałem PGPM [1]. Wykazano, iż *Sporobolomyces ruberrimus* stymuluje wzrost rośliny m.in. poprzez oddziaływanie na proces elongacji komórek korzenia, co szczególnie widoczne jest w przypadku włośników a co przyczynia się do znacznej rozbudowy powierzchni chłonnej korzenia i sprzyja wydajniejszemu poborowi wody i związków mineralnych z gleby [2]. Synergistyczne działanie etylenu oraz auksyn jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju strefy włośnikowej korzenia [3]. Z kolei z przeprowadzonych w ostatnim czasie badań wynika, iż podczas interakcji pomiędzy rośliną a endofitem dochodzi do zmian na poziomie fitohormonalnym.

CEL

Zbadanie podłoża molekularnego interakcji pomiędzy rośliną a endofitem, ze szczególnym uwzględnieniem sygnalizacji fitohormonalnej za pośrednictwem mutantów *Arabidopsis*, inhibitorów sygnalizacji zależnej od auksyn (NPA) oraz zależnej od etylenu (ACC) a także porównawczej analizy ekspresji genów pomiędzy 2 ekotypami wykazującymi odmienny fenotyp w interakcji z endofitem.

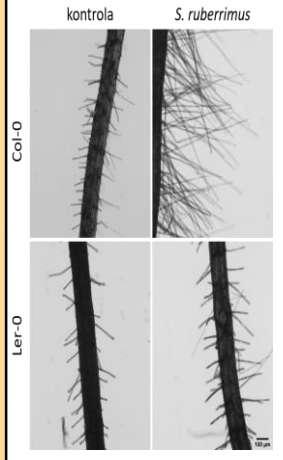
METODY

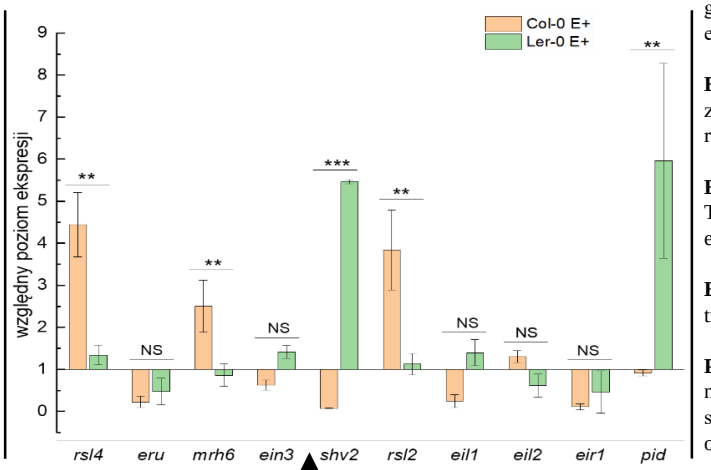
Kultury *in vitro* roślin *A. thaliana* prowadzono od 5 do 7 dni na pożywce MS. Po tym czasie przenoszono je na pożywkę ubogą w fosfor MSR i inokulowano. Po upływie 48 h siewki badanych mutantów oraz typu dzikiego Col-0 (w przypadku zastosowania NPA i inhibitora syntazy ACC) barwiono błękitem toluidyny i obserwowano strefy włośnikowe pod mikroskopem. Rośliny nieinokulowane stanowiły kontrolę. W przypadku ekotypów Col-0 i Ler-0 izolowano RNA z korzeni a następnie poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji. Uzyskane cDNA posłużyło jako matryca w reakcji *qPCR*. Analizę ekspresji genów przeprowadzono z wykorzystaniem metody Pfaffla. *tua5*, *gapc1* oraz *At4g26410* stanowiły geny referencyjne natomiast rośliny nieinokulowane stanowiły kalibrator.



WYNIKI

Analiza ekspresji genów zaangażowanych w sygnalizację fitohormonalną oraz w rozwój włośników





RSL2, RSL4
główne regulatory elongacji włośników

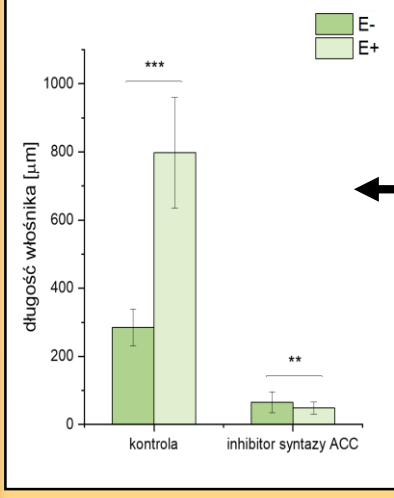
ERU, MRH6, SHV2
zaangażowane w rozwój włośników

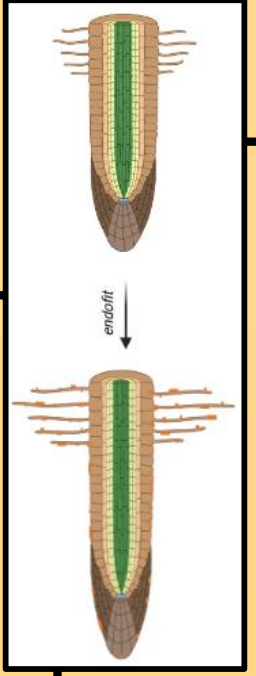
EIN3, EIL1, EIL2
TFs zależne od etylenu

EIR1/PIN2
transporter auksyn

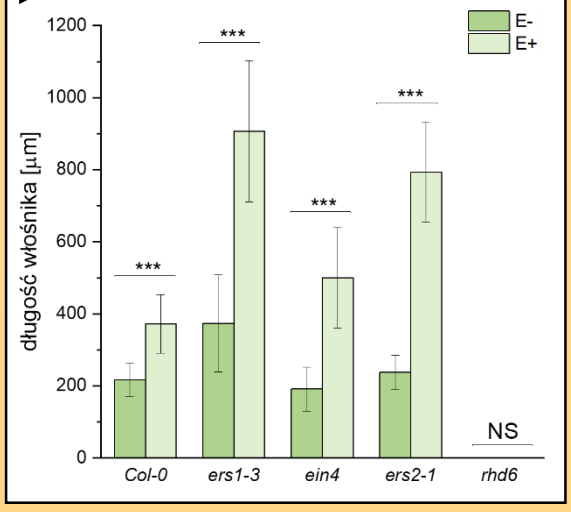
PID
negatywny regulator sygnalizacji zależnej od auksyn

Badanie roli etylenu

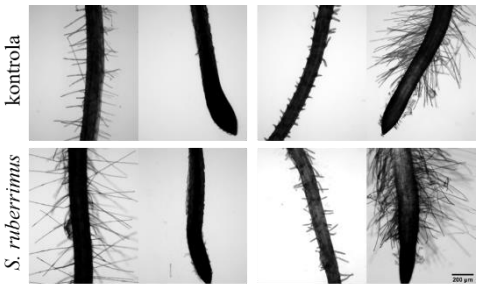


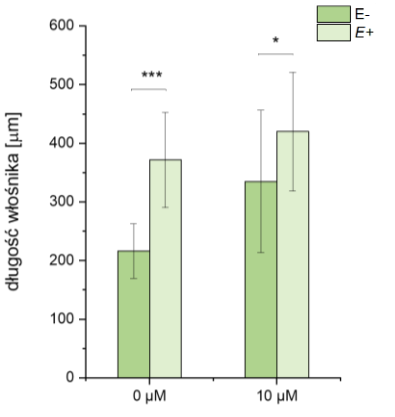


Badanie roli receptorów etylenowych (*ERS1*, *EIN4*, *ERS2*) oraz głównego regulatora procesu inicjacji włośników (*RHD6*)



Badanie roli polarnego transportu auksyn





WNIOSKI

- Pojedyncze receptory etylenowe nie ogrywają kluczowej roli w oddziaływaniu endofita na elongację komórek korzenia.
- Interakcja pomiędzy rośliną a *S. ruberrimus* nie oddziałuje na proces różnicowania komórek włośnikowych.
- W interakcji rośliny z *S. ruberrimus* polarny transport auksyn jest niezbędny dla prawidłowego wykształcenia strefy
- włośnikowej.

  Prawidłowa sygnalizacja zależna od auksyn oraz/i od etylenu są niezbędne dla stymulacji wydłużeniowego wzrostu komórek korzenia

Badania finansowane z grantu NCN, OPUS-17, 2019/33/B/NZ9/01372

[1] Woźniak, M., & Gałązka, A. (2019). The rhizosphere microbiome and its beneficial effects on plants–current knowledge and perspectives. *Post Microbiol*, *58*(1), 59-69. [2] Gilroy, S., & Jones, D. L. (2000). Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in plant science*, *5*(2), 56-60. [3] Muday, G. K., Rahman, A., & Binder, B. M. (2012). Auxin and ethylene: collaborators or competitors?. *Trends in plant science*, *17*(4), 181-195. *adres korespondencyjny: magdalena.zyzik@student.uj.edu.pl

Globalna odpowiedź transkryptomu *Rhizobium leguminosarum* na stres środowiskowy

Kamil Żebracki, Piotr Koper, Magdalena Wójcik, Małgorzata Marczak, Andrzej Mazur

Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Wprowadzenie i cel pracy

Rizobia to bakterie występujące w glebie w postaci wolno żyjącej (saprofitycznej) oraz symbiotycznej – w brodawkach korzeniowych roślin bobowatych. W procesie symbiozy rizobia redukują azot atmosferyczny, dostarczając go roślinom w formie związków łatwo przyswajalnych. Warunki środowiskowe, które panują w glebie, często prowadzą do ograniczenia wzrostu i prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów. Do głównych czynników wpływających na symbiozę pomiędzy rizobiami a roślinami bobowatymi należą: temperatura, pH, zasolenie gleby, wilgotność oraz zawartość składników odżywczych.

Celem badań było określenie globalnej odpowiedzi transkryptomu modelowego szczepu bakterii *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (RtTA1) na zróżnicowane warunki stresowe (niskie pH i zawartość składników odżywczych).

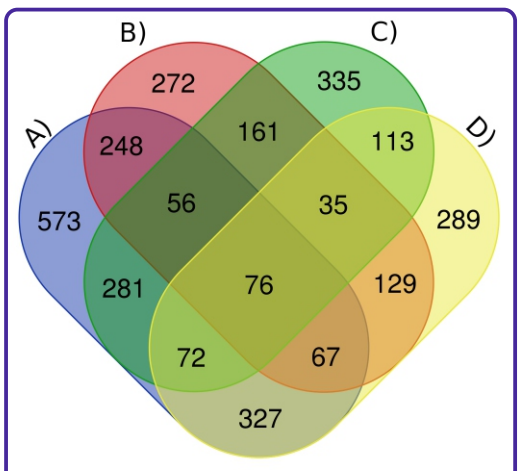
Wyniki i wnioski

Przeprowadzono wysokoprzepustowe sekwencjonowanie typu RNA-Seq całkowitego RNA wyizolowanego z komórek RtTA1 rosnących w podłożach minimalnym: M1 i pełnym: 79CA oraz o różnym odczynie pH (neutralnym: pH=7 i kwaśnym: pH=5 dla każdej z zastosowanych pożywek). Uzyskane surowe odczyty zostały przycięte i odfiltrowane (Cutadapt), a następnie zmapowane do genomu referencyjnego (Bowtie 2). Wykorzystując narzędzia DESeq2, *limma*, NOISeq oraz edgeR w transkryptomach RtTA1 wytypowano geny, których poziom ekspresji w badanych warunkach uległ istotnej zmianie (DEG, ang. *differentially expressed genes*) (zastosowane progi minimalne: *p*-adj. < 0,05; $-1 \leq \log_2 FC \geq 1$; CPM ≥ 1). **Wykazano, że każdy ze zbadanych wariantów hodowli skutkuje istotną zmianą poziomu ekspresji dużej liczby genów** (15–24% wszystkich genów kodujących białka w RtTA1), wśród których w większości (poza wariantem A) **przeważają geny, które uległy represji (Tabela I).**

Tabela I Liczba DEG uzyskanych w analizie transkryptomów komórek RtTA1 rosnących w różnych warunkach. Zbiór wyłonionych DEG stanowi część wspólną wyników uzyskanych z użyciem wszystkich czterech metod statystycznych. W nawiasach podano jaki % wszystkich genów kodujących białka w RtTA1 stanowią DEG

Wariant eksperymentalny	Całkowita liczba DEG	Liczba DEG, które uległy indukcji	Liczba DEG, które uległy represji
A) 79CA/pH=7 vs. M1/pH=7	1700 (24%)	880	820
B) 79CA/pH=5 vs. M1/pH=5	1044 (15%)	504	540
C) 79CA/pH=7 vs. 79CA/pH=5	1129 (16%)	546	583
D) M1/pH=7 vs. M1/pH=5	1108 (16%)	508	600

Analiza wspólnych i unikalnych DEG dla różnych wariantów hodowli wykazała, że w reakcji na głodzenie bakterii (niezależne od pH) uczestniczy 447 genów, odpowiedź na kwaśne pH (niezależnie od pożywki) wymusza zmianę poziomu ekspresji 296 genów, zaś wspólna pula genów odpowiedzi na stres pH i głodzenie to 76 DEG **(Rys. 1)**. **Wśród DEG nie wykryto genów typowo związanych z tolerancją rizobiów na kwaśne środowisko**, takich jak geny *actA*, *actRS*, *actP*, *phrR*, *lpiA*, *chvGI*, *lpiA*, czy *bra*D, jak również genów bezpośrednio zaangażowanych w biosyntezę powierzchniowych polisacharydów, które stanowią istotny czynnik protekcyjny rizobiów przed niekorzystnymi warunkami.

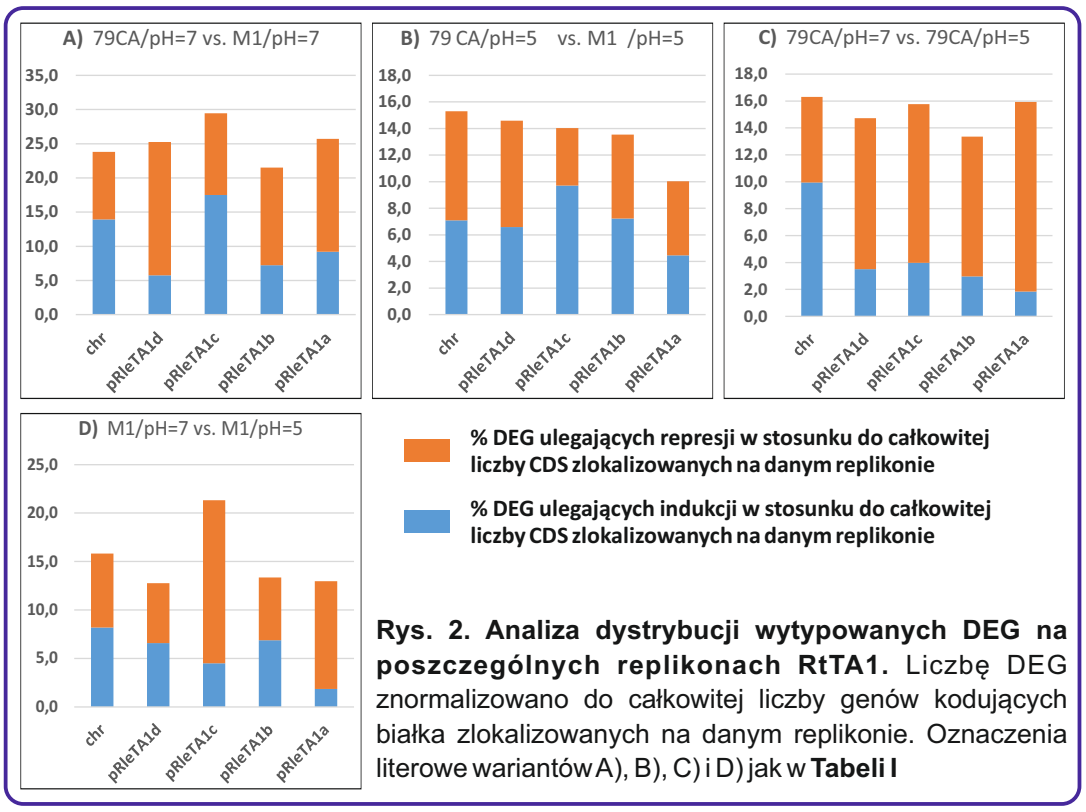


Rys. 1. Diagram Venna obrazujący grupowanie DEG wspólnych dla poszczególnych wariantów wzrostu bakterii. Oznaczenia literowe wariantów A), B), C) i D) jak w **Tabeli I**

W każdym z analizowanych wariantów DEG były rozproszone na wszystkich 5 replikonach RtTA1 (większość na chromosomie), ale co warte podkreślenia **duża liczba DEG była ulokowana na plazmidach** (30,1–33,2% wszystkich DEG) **(Rys. 2), co potwierdza, że tzw. genom zapasowy RtTA1 odgrywa istotną rolę w reakcji komórki na stres środowiskowy.**

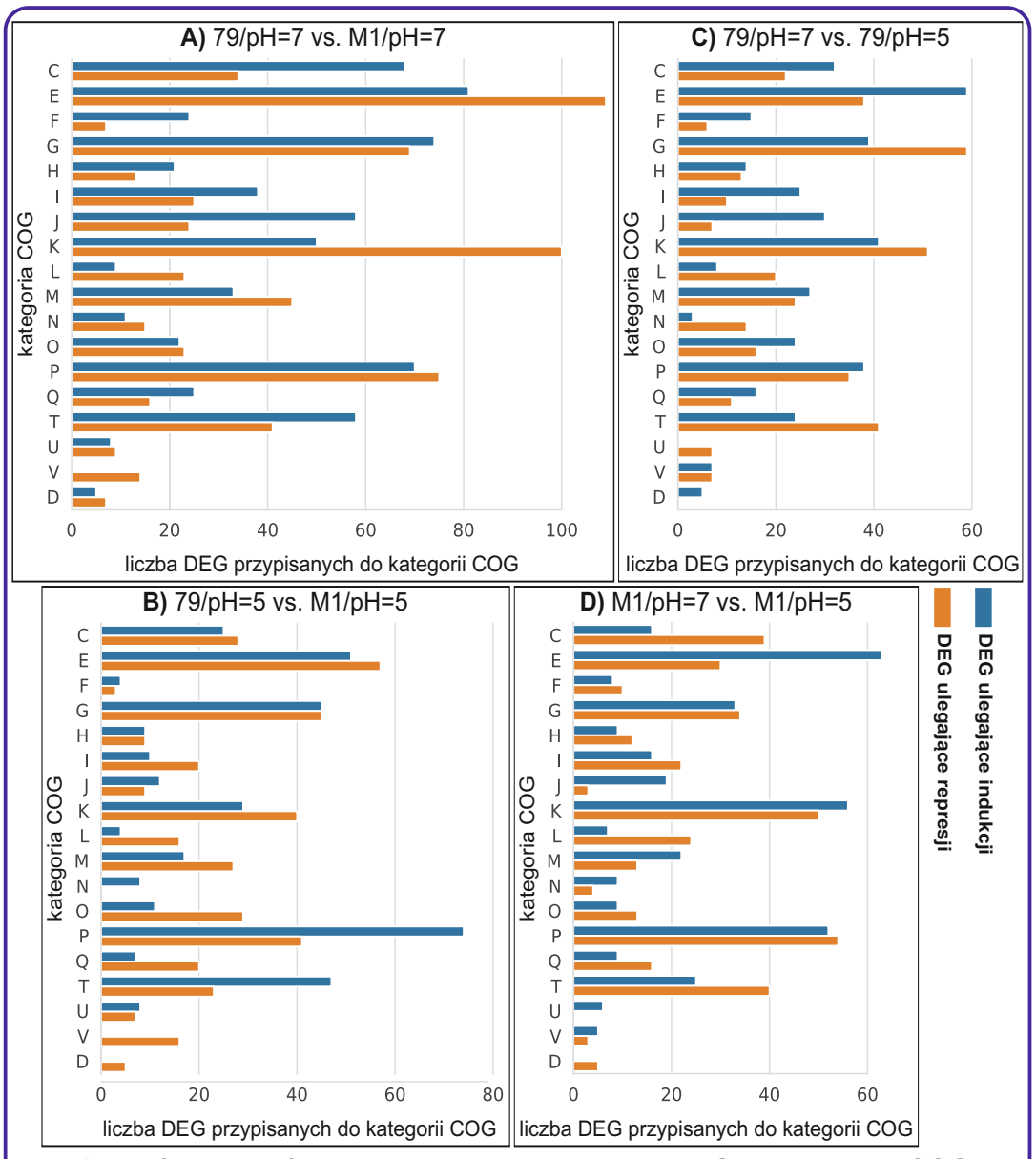
Badania wykonano w ramach projektu finansowanego przez Instytut Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (Nr ZB/2021/2)

Wyniki i wnioski *(kontynuacja)*



Rys. 2. Analiza dystrybucji wytypowanych DEG na poszczególnych replikonach RtTA1. Liczbę DEG znormalizowano do całkowitej liczby genów kodujących białka zlokalizowanych na danym replikonie. Oznaczenia literowe wariantów A), B), C) i D) jak w **Tabeli I**

Adnotacja funkcjonalna wytypowanych DEG w kategoriach COG (ang. *Clusters of Orthologous Groups of proteins*) wykazała, że wśród nadreprezentowanych kategorii COG znajdują się w większości geny związane z transportem i metabolizmem węgla (G), aminokwasów (E), związków nieorganicznych (P), produkcją i konwersją energii (C), transdukcją sygnałów (T) oraz regulacją transkrypcji (K) **(Rys. 3)**. **Oznacza to, że odpowiedź komórek RtTA1 na zastosowane stresowe warunki wzrostu odbywa się na drodze znaczącego przestawienia podstawowego metabolizmu komórkowego i regulacji ekspresji związanych z tym genów na poziomie transkrypcji. Rozkład DEG w prawie wszystkich kategoriach funkcjonalnych COG potwierdza złożony charakter tej odpowiedzi**.



Rys. 3. Profilowanie funkcjonalne wytypowanych DEG do kategorii COG