

Zróżnicowanie genetyczne szczepów bakterii z rodzaju *Azotobacter* wyizolowanych z różnych gleb

Monika Koziel, Anna Gałązka

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

WSTĘP

Azotobacter spp. to wolno-żyjące, ściśle aerobowe, heterotroficzne bakterie Gram-ujemne. Należą one do rodziny *Pseudomonadaceae*, zaliczanej do klasy γ -Proteobacteria. Przedstawiciele tego rodzaju bakterii zasiedlają wiele środowisk, takich jak: gleba, woda, osady ściekowe, ryzosfera i fylosfera roślin.

W obrębie rodzaju *Azotobacter* wyróżniono 8 gatunków, a *Azotobacter chroococcum* jest najbardziej rozpowszechniony w glebach całego świata i dominuje on również w glebach Polski.

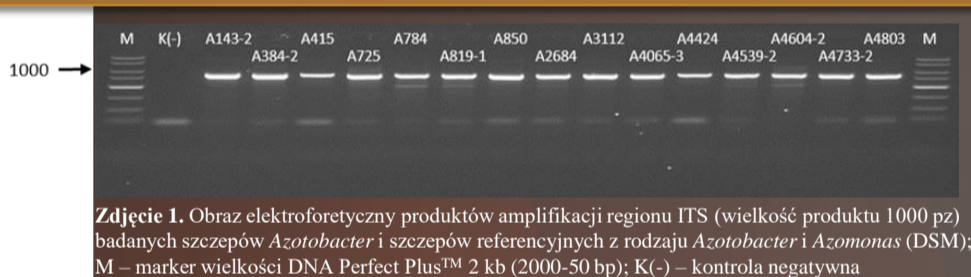
CEL PRACY

- Ocena zróżnicowania genomowego (ITS-PCR/RFLP) wyodrębnionych izolatów *Azotobacter* spp.
- Określenie przynależności gatunkowej szczepów bakterii z rodzaju *Azotobacter* w oparciu o amplifikację i sekwencjonowanie genu 16S rRNA.

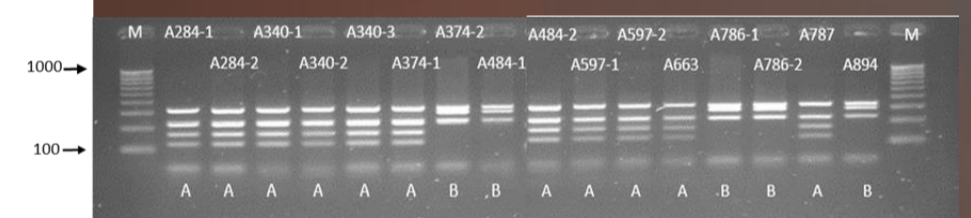
MATERIAŁ I METODY

- ❑ Materiał do badań stanowiły 56 szczepy bakterii z rodzaju *Azotobacter* wyizolowane z różnych gleb z obszarów całej Polski.
- ❑ Z płynnych hodowli bakterii wyizolowano DNA (MasterPure™ Complete DNA & RNA purification Kit).
- ❑ Do oceny zróżnicowania genetycznego badanych izolatów *Azotobacter* spp. zastosowano technikę ITS-PCR z analizą restrykcyjną produktu amplifikacji fragmentu 16S-23S rDNA.
- ❑ Do identyfikacji gatunkowej wybranych izolatów wybrano metodę opartą na amplifikacji i sekwencjonowaniu genu 16S rRNA.

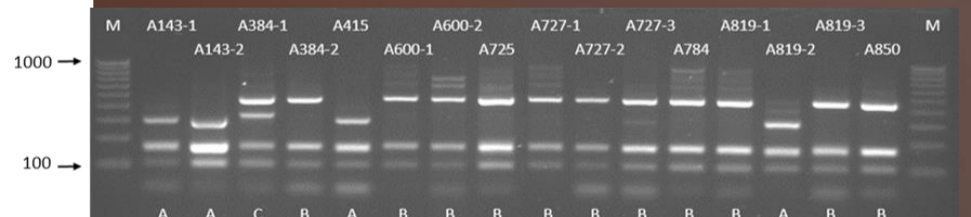
WYNIKI



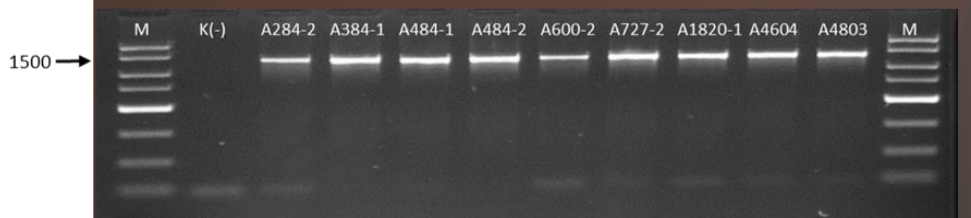
Zdjęcie 1. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji regionu ITS (wielkość produktu 1000 pz) badanych szczepów *Azotobacter* i szczepów referencyjnych z rodzaju *Azotobacter* i *Azomonas* (DSM); M – marker wielkości DNA Perfect Plus™ 2 kb (2000-50 bp); K(-) – kontrola negatywna



Zdjęcie 2. Profile elektroforetyczne RFLP ITS badanych szczepów *Azotobacter* i szczepów referencyjnych z rodzaju *Azotobacter* i *Azomonas* (DSM), uzyskane w wyniku trawienia regionu ITS enzymem restrykcyjnym *HaeIII*; M – marker wielkości DNA M (1000-100 bp); K(-) – kontrola negatywna



Zdjęcie 3. Profile elektroforetyczne RFLP ITS badanych szczepów *Azotobacter* i szczepów referencyjnych z rodzaju *Azotobacter* i *Azomonas* (DSM), uzyskane w wyniku trawienia regionu ITS enzymem restrykcyjnym *MspI*; M – marker wielkości DNA (1000-100 bp); K(-) – kontrola negatywna



Zdjęcie 4. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji genu 16S rRNA (wielkość produktu 1500 pz) wybranych szczepów *Azotobacter* spp.; M – marker wielkości DNA Perfect Plus™ 2 kb (2000-50 bp); K(-) – kontrola negatywna

Tabela 1. Stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA (%) wybranych szczepów *Azotobacter* spp. z sekwencją genu 16S rRNA szczepu *Azotobacter chroococcum* znajdującego się w bazie NCBI

Numer szczepu	Stopień identyczności z gatunkiem <i>Azotobacter chroococcum</i>
A727-1, A3112	100%
A143-1, A284-2, A340-1, A374-1, A384-2, A415, A484-1, A597-1, A663, A725, A819-1, A850, A1940, A2684, A4040, A4065-2, A4165, A4539-2, A4604-1, A4625, A4704, A4733-1, A4761, A4813-1	99%
A600-1, A784, A4424, A4791-1	98%

PODSUMOWANIE

- W wyniku amplifikacji fragmentu 16S-23S rDNA dla 56 badanych szczepów oraz 7 szczepów referencyjnych rodzaju *Azotobacter* i *Azomonas* otrzymano 1 produkt PCR o długości około 1000 pz. Kolejnym krokiem było wykonanie analizy restrykcyjnej uzyskanego produktu PCR przy użyciu dwóch endonukleaz *HaeIII* i *MspI*.
- Łączna analiza profili elektroforetycznych otrzymanych metodą ITS-PCR/RFLP pozwoliła na wyróżnienie w obrębie badanych izolatów *Azotobacter* spp. cztery profile genetyczne.
- Najwięcej analizowanych izolatów *Azotobacter* spp. (30) należało do genotypu IV – BB, 15 szczepów reprezentowało genotyp I – AA, 6 izolatów genotyp III – AC i 5 pozostałych izolatów tworzyło genotyp II – AB.
- Spośród 56 badanych szczepów 36 charakteryzowało się takim samym genotypem w analizach ITS-PCR/RFLP jak szczepy referencyjne *A. chroococcum* DSM 281 i DSM 2286, co wyraźnie wskazywało na ich przynależności do gatunku *Azotobacter chroococcum* i były to profile AC i BB. Pozostałe izolaty o wzorach restrykcyjnych AA i AB nie wykazywały podobieństwa do żadnego z użytych szczepów wzorcowych.
- Do dalszych analiz filogenetycznych opartych na sekwencjonowaniu genu kodującego 16S rRNA wybrano 20 izolatów grupy o wzorach AC i BB oraz 10 izolatów z pozostałych dwóch grup.
- Na podstawie sekwencjonowania genu 16S rRNA badane izolaty zidentyfikowane zostały do gatunku *Azotobacter chroococcum*.
- Stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA badanych izolatów do sekwencji genu szczepu *Azotobacter chroococcum*, znajdującego się w bazie NCBI, wynosił od 98% do 100%
- Najwyższy stopień podobieństwa sekwencji genu 16S rRNA (100%) w stosunku do sekwencji genu 16S rRNA szczepu *Azotobacter chroococcum* (NCBI) wykazały izolaty A727-1 i A3112.