



Innovative concepts and technologies for ECologically sustainable NUTRient management in agriculture aiming to prevent, mitigate and eliminate pollution in soils, water and air

# IDENTYFIKACJA MIKROORGANIZMÓW JAKO KOMPONENTÓW BIONAWOZÓW OGRANICZAJĄCYCH STRATY SKŁADNIKÓW MINERALNYCH W GLEBIE

Anna Lisek, Paweł Trzcinski, Lidia Sas-Paszt, Sławomir Głuszek  
Instytut Ogronictwa-PIB, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
e-mail: anna.lisek@inhort.pl

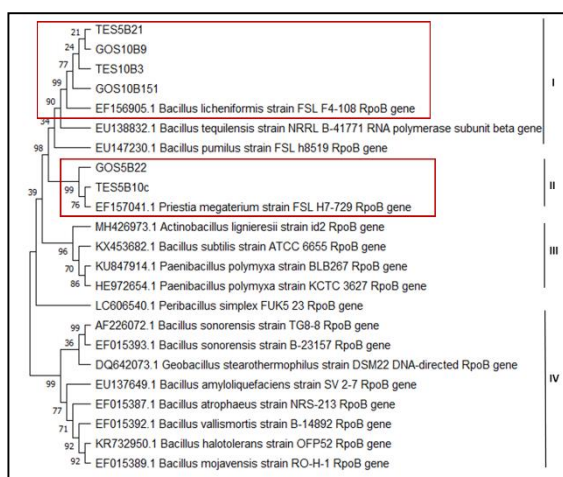
## WSTĘP

Zanieczyszczenia gleby, wód i powietrza wynikają głównie z powszechnie stosowanych praktyk agrotechnicznych, zwłaszcza nadmiernego nawożenia mineralnego i aplikacji chemicznych środków ochrony roślin. Organiczne odpady biomasy pochodzące z rolnictwa mogą zanieczyszczać glebę, wodę i powietrze poprzez wymywanie jonów azotanowych, fosforanowych i innych składników mineralnych do wód powierzchniowych i gruntowych oraz emisję amoniaku i gazów cieplarnianych, głównie tlenku diazotu do atmosfery, co jest niekorzystne dla upraw ogrodniczych i rolniczych, pogarsza jakość gleb oraz przyczynia się do eutrofizacji wód. W unijnym projekcie EcoNutri opracowywane i wdrażane są innowacyjne, mikrobiologiczne technologie uprawy roślin ogrodniczych i rolniczych w celu ograniczenia zanieczyszczeń gleby i wód, wynikających m. in. ze stosowania nadmiernych dawek nawozów mineralnych.

Celem badań była selekcja i identyfikacja szczepów pożytecznych bakterii zwiększających przyswajanie azotu, potasu i fosforu oraz innych makro- i mikroelementów przez rośliny, jako komponentów nawozowych produktów mikrobiologicznych, których stosowanie przyczyni się do ograniczenia strat tych pierwiastków z gleby do wód powierzchniowych i gruntowych oraz do atmosfery. Ponadto, celem badań była selekcja i identyfikacja szczepów bakterii biodegradujących materię organiczną, przyspieszających kompostowanie organicznych odpadów rolniczych, co przyczyni się do ograniczenia zanieczyszczenia gleb, wód i powietrza.

## MATERIAŁY I METODY

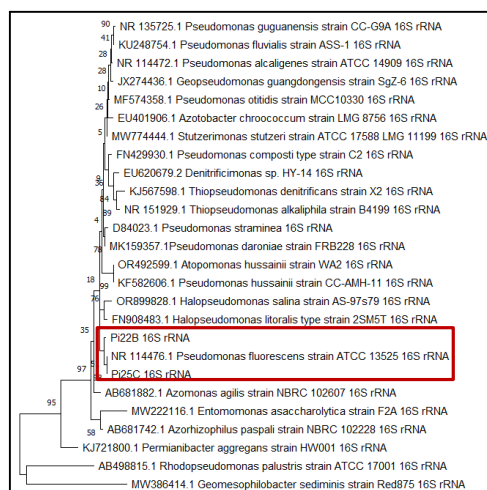
Szczepy bakterii wyizolowano z gleby ryzosferowej roślin ogrodniczych i rolniczych. Określono właściwości szczepów bakterii tj.: biodegradacja materii organicznej, zwiększanie dostępności dla roślin fosforu, azotu, potasu, żelaza i in. W celu identyfikacji wyselekcjonowanych szczepów bakterii uzyskane sekwencje genów 16S rRNA, *rpoB*, *tuf*, *gyrA*, *purH* i *recA* porównano z sekwencjami zgromadzonymi w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) oraz przeprowadzono analizę filogenetyczną, z użyciem programu MEGAX.



Rys. 1. Dendrogram uzyskany na podstawie analizy sekwencji genu *rpoB* (analiza modelu Tamura-Nei z rozkładem Gamma), pokazujący powiązania filogenetyczne pomiędzy sekwencjami testowanych szczepów bakterii i gatunkami bakterii z rodzajów *Bacillus* i *Priestia*. Wartości liczbowe (wyrażone jako procent 1000 powtórzeń) reprezentują procent wygenerowanych dendrogramów, które miały identyczne rozgałęzienia.

## PODSUMOWANIE

- Wyselekcjonowane szczepy pożytecznych bakterii z rodzajów *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia* i *Klebsiella* są komponentami sześciu konsorcjów mikrobiologicznych stymulujących wzrost i plonowanie roślin ogrodniczych, przyswajanie przez rośliny azotu, fosforu i innych składników mineralnych oraz przyspieszających kompostowanie odpadów rolniczych poprzez biodegradację materii organicznej.
- Nowatorskie technologie mikrobiologiczne przyczynią się do ograniczenia zanieczyszczeń gleby, wód i powietrza, poprzez poprawę efektywności wykorzystania składników mineralnych przez rośliny i ograniczenie ich strat, z zastosowaniem kompostów z organicznych odpadów z rolnictwa.



Rys. 2. Dendrogram uzyskany na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA (analiza modelu Kimura 2 z rozkładem Gamma), pokazujący powiązania filogenetyczne pomiędzy sekwencjami szczepów bakterii PI22B, PI25C i rodzajami/gatunkami bakterii należącymi do rodziny *Pseudomonadaceae*. Wartości liczbowe (wyrażone jako procent 1000 powtórzeń) reprezentują procent wygenerowanych dendrogramów, które miały identyczne rozgałęzienia.

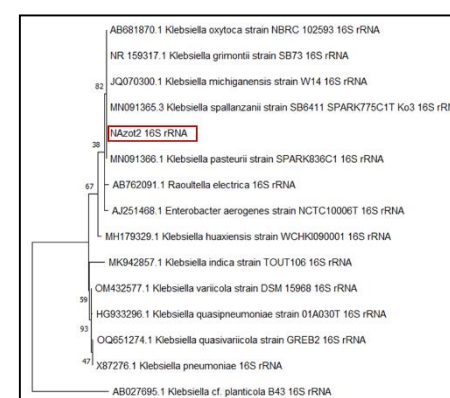
## WYNIKI

W ramach badań wyselekcjonowano 10 szczepów pożytecznych bakterii o właściwościach zwiększania dostępności w glebie i przyswajania przez rośliny azotu, potasu i fosforu oraz biodegradacji materii organicznej. Wyselekcjonowane szczepy bakterii zidentyfikowano na podstawie podobieństwa sekwencji genów 16S rRNA, *tuf*, *rpoB*, *gyrA*, *purH* i *recA* do sekwencji zgromadzonych w bazie NCBI. Stopień podobieństwa sekwencji stanowił 97,7% - 100%. Analiza filogenetyczna wykazała, że 4 szczepy bakterii należą do gatunku *Bacillus licheniformis*, 2 szczepy należą do gatunku *Priestia megaterium*, 2 szczepy należą do gatunku *Pseudomonas fluorescens*. Dwa szczepy bakterii przyporządkowano do rodzajów *Streptomyces* i *Klebsiella* (Rys. 1, 2, 3).

Spśród wyselekcjonowanych bakterii, 7 szczepów wykazało właściwości degradacji materii organicznej, 6 szczepów posiadało cechy udostępniania roślinom fosforu, potasu i żelaza oraz 1 szczep wykazał właściwości wiązania azotu atmosferycznego. Szczepy bakterii o największej przydatności dla ograniczenia strat składników mineralnych z gleby do wód wykazywały 3 cechy: udostępnianie roślinom fosforu, potasu i żelaza oraz biodegradacji materii organicznej: TES5B10C, GOS5B22 *Priestia megaterium*. Szczep NAzot2 *Klebsiella* sp. udostępniał roślinom fosfor i żelazo oraz wiązał azot atmosferyczny.

Tabela 1. Właściwości wyselekcjonowanych szczepów bakterii będących komponentami konsorcjów mikrobiologicznych do ograniczania strat składników mineralnych w glebie

Szczep bakterii	Właściwości szczepów bakterii			
	Biodegradacja materii organicznej	Udostępnianie roślinom fosforu	Wytwarzanie siderofów	Wiązanie azotu
TES10B3 <i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	-
TES5B21 <i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	-
GOS10B9 <i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	-	-
GOS10B151 <i>Bacillus licheniformis</i>	+	+	-	-
GOS5B1 <i>Streptomyces</i> sp.	+	-	-	-
TES5B10C <i>Priestia megaterium</i>	+	+	+	-
GOS5B22 <i>Priestia megaterium</i>	+	+	+	-
PI22B <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	-
PI25C <i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	+	-
NAzot2 <i>Klebsiella</i> sp.	-	+	+	+



Rys. 3. Dendrogram uzyskany na podstawie analizy sekwencji genu 16S rRNA (analiza modelu Kimura 2 z rozkładem Gamma z miejscami niezmiennymi), pokazujący powiązania filogenetyczne pomiędzy sekwencją szczepu bakterii NAzot2 i gatunkami bakterii należącymi do grupy *Klebsiella/Raoutella*. Wartości liczbowe (wyrażone jako procent 1000 powtórzeń) reprezentują procent wygenerowanych dendrogramów, które miały identyczne rozgałęzienia.

Tabela 2. Identyfikacja szczepów bakterii w oparciu o porównanie sekwencji genów z danymi NCBI.

Szczep bakterii	Rodzaj/gatunek bakterii o największym podobieństwie uzyskanych sekwencji do danych NCBI	Podobieństwo (%)			
		16S rRNA	<i>tuf</i>	<i>rpoB</i>	Podobieństwo (%)
GOS5B1	<i>Streptomyces tuius</i>	99,3	97,7	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	100
GOS10B9	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,7	100	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
GOS10B151	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,7	100	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
TES5B21	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,9	99,4	<i>Bacillus licheniformis</i>	100
TES10B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	100	99,3	<i>Bacillus licheniformis</i>	99,7
GOS5B22	<i>Priestia megaterium</i>	99,0	99,7	<i>Priestia megaterium</i>	100
TES5B10C	<i>Priestia megaterium</i>	100	99,7	<i>Priestia megaterium</i>	100
PI22B	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	100	-	-
PI25C	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	100	-	-
NAzot2	<i>Klebsiella sp.</i>	100	100	-	-

