

Streszczenie

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci obserwowany jest ciągły wzrost powierzchni gleb dotkniętych zasoleniem. Geneza tego problemu może być związana zarówno z oddziaływaniem czynników o charakterze naturalnym (np. zmiany hydrologiczne, geologiczne), jak również antropogenicznym (np. niewłaściwe nawożenie i nawadnianie gruntów rolnych). Zasolenie gleb jest jednym z ważniejszych czynników abiotycznych wykazującym negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Uważa się, że halotolerancyjne mikroorganizmy endofityczne i ryzosferowe posiadające specyficzne właściwości metaboliczne mogą bezpośrednio lub pośrednio oddziaływać na rośliny, promując ich wzrost w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Niestety wiedza dotycząca struktury populacji oraz potencjału metabolicznego halotolerancyjnych bakterii towarzyszących słonoroślom jest wciąż niewystarczająca i wymaga uzupełnień.

Przedmiotem badań zaprezentowanych w niniejszej pracy były bakterie kolonizujące korzenie (endofity, E) i ryzosferę (R) halofitów *Salicornia europaea* (*herbacea*) L. (soliród) i *Aster tripolium* L. (aster solny) zasiedlających dwa stanowiska badawcze I (Inowrocław) i C (Ciechocinek) zlokalizowane w centralnej Polsce. Stanowiska badawcze wybrane do badań różniły się poziomem zasolenia: I → 55 dS/m, C → 112 dS/m. Gatunek *S. europaea* występował na obydwu stanowiskach, zaś *A. tripolium* obecny był tylko na stanowisku I.

Celem pracy było: (i) zbadanie bioróżnorodności funkcjonalnej, struktury populacji oraz liczebności bakterii kolonizujących wewnątrz korzeni (E) i ryzosferę (R) *S. europaea* (stanowiska I i C) i *A. tripolium* (stanowisko I), w odniesieniu do bakterii występujących w glebie pozakorzeniowej (G, stanowiska I i C), (ii) oznaczenie różnorodności taksonomicznej endofitów korzeniowych *S. europaea* pochodzących z dwóch stanowisk badawczych, (iii) identyfikacja i ocena potencjału metabolicznego wyizolowanych szczepów endofitycznych i ryzosferowych, jak również (iv) określenie wpływu wyselekcjonowanych endofitów na parametry ekologiczne i biochemiczne dwóch roślin uprawnych: *Brassica napus* i *Beta vulgaris*, rosnących w warunkach stresu solnego.

Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ poziomu zasolenia stanowiska badawczego na bioróżnorodność funkcjonalną (BIOLOG EcoPlate™) badanych

populacji bakterii (R, E, G). Na stanowisku I (niższe zasolenie) bioróżnorodność funkcjonalna wzrastała według schematu: $G < E < R$, natomiast na stanowisku I (wyższe zasolenie): $E < G < R$.

Analiza fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFA) wykazała, że biomasa bakterii zależała od stanowiska badawczego (I < C), gatunku rośliny (*S. europaea* > *A. tripolium*) i strefy izolacji (*S. europaea*: $G < E < R$; *A. tripolium*: E i $G < R$). Przynależność morfologiczna bakterii dokonana na podstawie składu PLFA ujawniła istotny wpływ strefy izolacji. Uzyskane wyniki wykazały, że w ryzosferze *A. tripolium* i *S. europaea* i glebie pozakorzeniowej dominowały bakterie Gram-ujemne, natomiast we wnętrzu korzeni odnotowano więcej bakterii Gram-dodatnich. Wyjątek stanowiły endofity *S. europaea* na stanowisku C, wśród których ilość obydwu form morfologicznych była zbliżona.

Analiza metagenomowa endofitów korzeniowych *S. europaea* pochodzących z obydwu stanowisk badawczych wykazała stosunkowo wysoką liczbę roboczych jednostek taksonomicznych (OTU). Nieznacznie wyższą ich wartość stwierdzono w przypadku endofitów pochodzących ze stanowiska o wyższym poziomie zasolenia (stanowisko I - 2608, C - 3366), zaś liczba OTU wspólnych dla obu badanych stanowisk wynosiła 1479. Endofity dominujące na obu stanowiskach należały do typów: Proteobacteria, Bacterioidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Actinobacteria, Chloroflexi, Acidobacteria, Verrucomicrobia, OD1, Chlamydiae, TM7, Fibrobacteres. Przeprowadzona analiza ordynacyjna niemetrycznego skalowania wielowymiarowego (NMDS) wykazała dodatnią korelację pomiędzy OTU należącymi do endofitów *S. europaea* na stanowisku I a poziomem OC, N_t i Ca^{2+} w glebie ryzosferowej. Endofity korzeniowe *S. europaea* na stanowisku o wyższym poziomie zasolenia były pozytywnie skorelowane z $CaCO_3$, SP, EC_e , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} .

Liczebność bakterii hodowalnych zależała od stanowiska badawczego (E i G: I < C, R: I > C), strefy izolacji ($E < G < R$) oraz stężenia NaCl (najwyższe stężenie NaCl ograniczało liczebność bakterii pochodzących ze stanowiska I, natomiast brak NaCl w podłożu mikrobiologicznym wpływał na obniżenie liczebności bakterii pochodzących ze stanowiska C).

Identyfikacja wyizolowanych bakterii endofitycznych i ryzosferowych (wykonana w oparciu o analizę regionu 16S rDNA) wykazała dominację bakterii Gram-dodatnich zarówno w przypadku *A. tripolium* (E: 72.7%, R: 90.9%), jak i *S. europaea*

(I → E: 77.3%, R: 86.3%; C → E: 59.1%, R: 87.5). Przynależność taksonomiczna bakterii związana była raczej ze stanowiskiem, z którego pochodziły mikroorganizmy niż z gatunkiem rośliny oraz strefą ich izolacji (E, R). Na stanowisku I zidentyfikowano najwięcej szczepów endofitycznych należących do typu Firmicutes, natomiast w przypadku stanowiska C dominowały bakterie reprezentujące typ Proteobacteria. Identyfikacja ryzobakterii *S. europaea* i *A. tripolium* wyizolowanych ze stanowiska I wykazała ich przynależność do typów: Proteobacteria < Firmicutes < Actinobacteria, zaś w przypadku bakterii ryzosferowych *S. europaea* pochodzących ze stanowiska C: Proteobacteria < Actinobacteria < Firmicutes. W obrębie Firmicutes odnotowano dominację szczepów *Bacillus* sp. Obecność szczepów *Streptomyces* sp. i *Microbacterium* sp. zaobserwowano zarówno wśród endofitów i ryzobakterii *S. europaea* (I i C), jak i *A. tripolium* (C).

W pracy zbadano zdolność zidentyfikowanych bakterii do syntezy kwasu indolilo-3-octowego (IAA), sideroforów i celulaz oraz oznaczono obecność genów kodujących: reduktazę nitrogenazy (*nifH*) i deaminazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (*acdS*). Zdolność badanych szczepów do syntezy IAA związana była przede wszystkim z gatunkiem rośliny oraz strefą izolacji (E, R). Endofity i ryzobakterie *A. tripolium* częściej wykazywały zdolność do syntezy IAA, a ponadto charakteryzowały się wyższym średnim poziomem syntezy tego związku aniżeli *S. europaea*. Ponadto, wyższy średni poziom syntezy IAA wśród bakterii pochodzących ze stanowiska I odnotowano w przypadku E, zaś odwrotną tendencję zaobserwowano w przypadku stanowiska C (E<R). Ryzobakterie *S. europaea* ze stanowiska C oraz *A. tripolium* częściej wykazywały zdolność do syntezy sideroforów aniżeli endofity, zaś bakterie towarzyszące (E, R) *S. europaea* na stanowisku I charakteryzowała podobna częstość występowania badanej aktywności. Średni poziom syntezy sideroforów zależał od stanowiska z którego pochodziły badane szczepy (I>C). Endofity pochodzące ze stanowiska I wykazywały wyższy średni poziom tej aktywności aniżeli ryzobakterie (w przypadku E i R *S. europaea* pochodzące ze stanowiska C nie odnotowano istotnej różnicy w średnim poziomie syntezy sideroforów). Analiza aktywności celulolitycznej badanych szczepów wykazała, że endofity *S. europaea* pochodzące ze stanowiska o niższym poziomie zasolenia (I) częściej wykazywały zdolność do syntezy celulaz w porównaniu do ryzobakterii. Odwrotną zależność zaobserwowano na stanowisku bardziej zasolonym (E<R). Na obu stanowiskach badawczych odnotowano wyższy

średni poziom syntezy celulaz wśród endofitów *S. europaea* niż wśród ryzobakterii, zaś odwrotną tendencją charakteryzowały się bakterie towarzyszące *A. tripolium* (R>E). Analiza wyizolowanych szczepów E i R pod kątem obecności genów *nifH* i *acd* wykazała wyższą ich liczbę wśród tych, które pochodziły z *A. tripolium* (I) aniżeli *S. europaea* (I i C).

Inokulacja roślin uprawnych (*B. napus* i *B. vulgaris*) wyselekcjonowanym endofitami korzeniowymi *S. europaea* wpływała na obniżenie skutków stresu solnego jednak w dużym stopniu zależała od dopasowania gatunku rośliny i badanego szczepu. Wzrost i rozwój *B. napus* był istotnie promowany przez szczep *Pseudomonas stutzeri* ISE-12 (jego obecność prowadziła do wzrostu wartości badanych parametrów ekologicznych i obniżenia poziomu parametrów biochemicznych), zaś endofity *Serratia marcescens* CSE-5 oraz *Kuschneria marisflavi* CSE-9 nie wpływały korzystnie na parametry ekologiczne. W przypadku *B. vulgaris* zaobserwowano, że zarówno *P. stutzeri* ISE-12, jak i *K. marisflavi* CSE-9 wpływały na wzrost wartości parametrów ekologicznych (np. siła i energia kiełkowania, liczba liści, długość korzeni oraz świeżość i sucha biomasa) oraz obniżały stres abiotyczny wywołany wysokim zasoleniem, wyrażony spadkiem poziomu proliny oraz nadtlenu w organach roślinnych.

Przeprowadzone badania wykazały istotną rolę poziomu zasolenia gleb, badanej strefy (E, R, G) oraz gatunku rośliny (*S. europaea*, *A. tripolium*) w kształtowaniu bioróżnorodności funkcjonalnej oraz struktury populacji bakterii. Struktura taksonomiczna endofitów korzeniowych *S. europaea* była raczej związana z właściwościami fizyko-chemicznymi gleby ryzosferowej. Analiza właściwości metabolicznych wyizolowanych bakterii pozwoliła na wyselekcjonowanie halotolerancyjnych szczepów wykazujących zdolność do promowania wzrostu roślin uprawnych. Zgodność pomiędzy przynależnością taksonomiczną roślin, z których wyizolowano szczepy bakterii oraz rośliną uprawną, którą wykorzystano do inokulacji, okazała się być czynnikiem determinującym utworzenie korzystnej interakcji w układzie endofit - roślina gospodarz.

28.04.17r.

Jolanta Szymańska