



UMCS

WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

**UNIWERSYTET MARII CURIE-
SKŁODOWSKIEJ
W LUBLINIE
Wydział Biologii i Biotechnologii**

Dyscyplina: **Biotechnologia**

mgr Marek Wójcik

nr albumu: 983633

**Zastosowanie ryzobiów do wspomagania
wzrostu roślin bobowatych na glebach
skażonych jonami metali ciężkich**

(The use of rhizobia to support the growth of
leguminous plants in soils contaminated with heavy
metal ions)

ROZPRAWA DOKTORSKA

wykonana w **Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii**

pod kierunkiem

dr hab. Jerzego Wielbo, prof. UMCS

LUBLIN 2019

Składam serdeczne podziękowania:

*Panu dr hab. Jerzemu Wielbo, prof. UMCS –
za bezpośrednią opiekę merytoryczną
nad prowadzonymi przeze mnie badaniami,
cenne uwagi oraz przekazaną wiedzę.*

*Pani dr hab. Małgorzacie Wójcik, prof. UMCS –
za przekazanie materiału biologicznego,
wykorzystanego w prowadzonych badaniach.*

*Pani dr Magdalenie Karaś –
za udzieloną pomoc i cenne wskazówki
przy oznaczeniach chromatograficznych.*

Niniejszą pracę dedykuję mojej Żonie Kasi.

Spis treści

I.	Wstęp	5
1.	Wprowadzenie	5
2.	Symbioza ryzobia – rośliny bobowate.....	6
2.1.	Azot i jego obieg w przyrodzie.....	6
2.2.	Ryzobia i ich symbiotyczna interakcja z roślinami	8
2.3.	Zastosowanie czynników Nod do zwiększenia efektywności symbiozy	15
3.	Metale ciężkie i ich wpływ na organizmy żywe.....	17
3.1.	Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi.....	17
3.2.	Wpływ metali ciężkich na rośliny i mikroorganizmy.....	19
3.3.	Wpływ jonów metali ciężkich na symbiozę ryzobia – rośliny bobowate	22
3.4.	Wykorzystanie układów symbiotycznych <i>Rhizobium</i> – rośliny bobowate w rekultywacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi.....	23
II.	Materiały i metody.....	26
1.	Wykaz zastosowanych materiałów	26
2.	Metody	32
III.	Cel pracy.....	42
IV.	Wyniki	43
1.	Izolacja i wstępna ocena zróżnicowania genetycznego szczepów	43
2.	Badanie wrażliwości wyselekcjonowanych szczepów ryzobiów na sole metali ciężkich.....	49
3.	Badanie zakresu gospodarza roślinnego wyselekcjonowanych szczepów	53
4.	Ustalenie pozycji taksonomicznej wyselekcjonowanych izolatów	55
5.	Badanie zróżnicowania metabolicznego wyselekcjonowanych izolatów	60

6. Badanie wpływu metali ciężkich na metabolizm badanych szczepów	61
7. Wybór najbardziej efektywnego szczepu	62
8. Izolacja preparatu czynników Nod szczepu <i>Rhizobium leguminosarum</i> TR4	64
9. Wpływ jonów metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) na wzrost koniczyny łąkowej.....	66
10.Wpływ jonów metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) i szczepu <i>Rhizobium</i> <i>leguminosarum</i> TR4 na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej	68
11.Wpływ <i>Rhizobium leguminosarum</i> TR4 i jego czynników Nod na wzrost koniczyny łąkowej w obecności jonów metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) ...	70
12.Wpływ preparatu czynników Nod szczepu <i>Rhizobium leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy jednoczesnej obecności jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+}	77
V. Dyskusja	79
VI. Streszczenie	85
VII. Summary.....	87
VIII. Literatura.....	89
Spis ilustracji.....	104
Spis tabel	106

I. Wstęp

1. Wprowadzenie

Rośliny bobowate (*Fabaceae*) odgrywają istotną rolę w rolnictwie, ponieważ stanowią znaczną część produkcji rolnej na świecie, ustępując pod względem zajmowanego areалу jedynie zbożom i roślinom oleistym. Są również uważane za jedno z najważniejszych źródeł białka dla ludzi i zwierząt. Dzięki symbiozie, którą nawiązują z żyjącymi w glebie bakteriami zdolnymi do wiązania azotu atmosferycznego, zwanymi ryzobiami, wnoszą dużą ilość materii organicznej do gleb oraz wzbogacają je w związki azotowe, co korzystnie wpływa na ich strukturę i żyzność. Z uwagi na zdolność do symbiotycznego wiązania azotu rośliny bobowate są także bardzo istotnymi elementami ekosystemów naturalnych – szczególnie takich, w których obserwuje się duże niedobory związków azotowych w glebie.

W ostatnich latach obserwuje się nasilenie zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi, w tym najbardziej szkodliwymi dla środowiska: kadmem, ołowiem, miedzią, cynkiem oraz niklem. Zdegradowane, zanieczyszczone tereny takie jak hałdy czy wyrobiska górnicze są narażone na działanie procesów erozyjnych, powodujących uwalnianie metali ciężkich i ich rozprzestrzenianie się w środowisku. Ponadto takie obszary charakteryzują się niską zawartością podstawowych składników odżywczych (w tym azotu) w glebie oraz zaburzonymi parametrami fizyko - chemicznymi, co pociąga za sobą słaby wzrost roślin i niewielkie zasiedlenie tych środowisk przez mikroorganizmy. Do rekultywacji wspomnianych obszarów można wykorzystać rośliny bobowate, które wzbogacają glebę w azot oraz dostarczają materię organiczną do odbudowy warstwy próchnicznej oraz szczepy ryzobiów odporne na obecność jonów metali ciężkich, które nawiązując symbiozę z roślinami bobowatymi mogą być wykorzystywane w procesach zadarniania

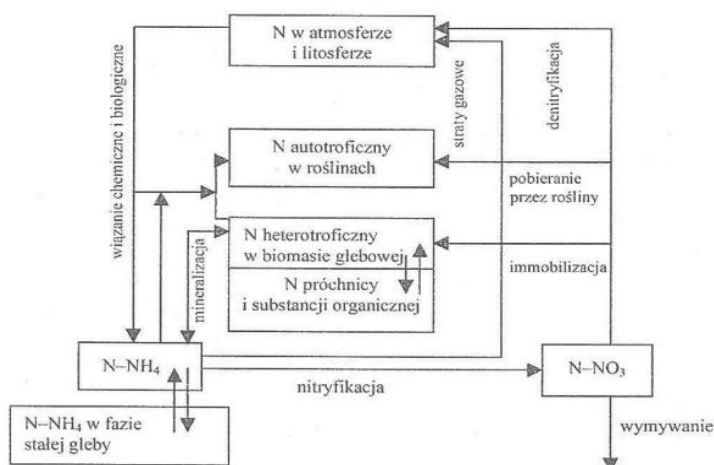
2. Symbioza ryzobia – rośliny bobowate

2.1. Azot i jego obieg w przyrodzie

Azot jest jednym z najważniejszych makroelementów niezbędnych dla roślin – służy jako materiał budulcowy dla białek, chlorofilu, kwasów nukleinowych oraz innych związków, takich jak np.: flawonoidy (Lal A.M., 2018). Ponadto pobudza wzrost części nadziemnych roślin, reguluje zużycie potasu, fosforu oraz innych składników pokarmowych (Staszewski Z., 2011). Azot występuje w przyrodzie głównie w postaci azotu cząsteczkowego obecnego w znacznych ilościach w atmosferze (78% objętości). Ta forma stanowi pierwotne źródło azotu dla biosfery, pomimo jej niedostępności dla większości organizmów żywych (Sergei A.M., 2012).

Azot cząsteczkowy może trafić do biosfery za pośrednictwem naturalnych przemian, takich jak: wiązanie azotu przez bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* wchodzące w symbiozę z roślinami bobowatymi lub wolno żyjące bakterie azotowe, takie jak *Azotobacter* sp. (Sorensen J. i Sessitsch A., 2007) oraz wchłanianie azotynów powstających w wyniku naturalnych procesów atmosferycznych (np. wyładowania atmosferyczne) i geologicznych. Znaczącym źródłem azotu jest również produkcja syntetycznych nawozów azotowych otrzymywanych z amoniaku wytwarzanego w procesie Habera-Boscha (Havlin J.L. i wsp., 2014).

Inne przemiany związków azotowych zaliczane do cyklu azotowego to: amonifikacja, nitryfikacja, denitryfikacja oraz przekształcanie azotu nieorganicznego w organiczny (Kakraliya S.K. i wsp., 2018) (Rys. 1).



Rys. 1. Obieg azotu w przyrodzie (Staszewski Z., 2011)

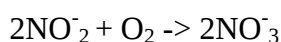
Amonifikacja to proces przeprowadzany przez mikroorganizmy glebowe, zdolne do przekształcania organicznych form azotu zawartych w szczątkach roślinnych i zwierzęcych do amoniaku (NH_3) i jonów amonowych (NH_4^+). Proces zachodzi przy udziale bakterii tlenowych i beztlenowych, grzybów oraz promieniowców (Groffman P., 2012; Paśmionka I., 2017). Proces amonifikacji przeprowadzany przez bakterie z rodzajów *Clostridium*, *Micrococcus*, *Proteus* można przedstawić schematycznie jako:



Nitryfikacja to proces utleniania amoniaku i jonów amonowych do azotynów i azotanów, prowadzony przez bakterie nitryfikacyjne. Proces ten zachodzi dwuetapowo, przy udziale dwóch różnych grup mikroorganizmów (Mancinelli R.L., 1996; Stremińska M.A. i Błaszczak M. 2004). W pierwszym etapie tego procesu główną rolę odgrywają bakterie z rodzaju *Nitrosomonas* oraz w mniejszym stopniu *Micrococcus sp.*, *Nitrospira sp.*, *Nitrosovibrio sp.*, *Nitrocystis sp.*, które są zdolne do przeprowadzenia reakcji:



Drugi etap, polegający na przekształceniu azotynów do postaci azotanów jest prowadzony przez bakterie *Nitrobacter*, niektóre grzyby (*Penicillium*, *Aspergillus*) oraz promieniowce (*Streptomyces*, *Nocardia*) (Schlegel H. G., 2000) i można opisać go równaniem:



Denitryfikacja to proces polegający na redukcji jonów azotanowych i azotynowych przez bakterie beztlenowe z rodzajów *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Spirillum* i *Micrococcus*. Końcowym produktem tego procesu mogą być: tlenek azotu (NO), podtlenek azotu (N_2O) lub azot cząsteczkowy (Piotrowska M. i Kusewicz D., 2007; Seitzinger S. i wsp., 2006; Szarlip P. i wsp., 2010).

Z kolei pobieranie i asymilacja azotu w postaci jonów NO_3^- i NH_4^+ odbywa się głównie poprzez powierzchnię chłonną korzeni roślinnych lub komórek

organizmów planktonu. Pobrany nieorganiczny azot wbudowywany jest w związki organiczne i w tej postaci staje się dostępny dla zwierząt (Staszewski Z., 2011).

2.2. Ryzobia i ich symbiotyczna interakcja z roślinami

2.2.1. Charakterystyka ryzobiów

Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego przeprowadzają mikroorganizmy określane jako diazotrofy, należące do domen *Archaea* i *Bacteria*. Wśród nich są zarówno organizmy wolno żyjące, jak i wchodzące w symbiozę z roślinami (Wielbo J. i Skorupska A., 2003). Azot obecny w atmosferze jest niedostępny dla roślin i zwierząt z powodu jego bardzo małej reaktywności. Biologiczne wiązanie azotu prowadzi do wytworzenia amoniaku, czyli formy dostępnej dla organizmów wyższych i jest możliwe dzięki specyficznemu enzymowi – nitrogezie (Martyniuk S., 2008).

Wyróżnia się trzy typy mikroorganizmów wiążących azot atmosferyczny:

1. symbiotyczne mikroorganizmy (np.: *Rhizobium sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Ensifer sp.*) nawiązujące symbiozę z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*) lub innymi roślinami (np. *Alnus sp.*);
2. asocjacyjne mikroorganizmy, które nie wchodzą w symbiozę z roślinami, ale żyją w ich tkankach (*Azospirillum sp.*);
3. bakterie wolno żyjące, wiążące azot atmosferyczny w warunkach beztlenowych, takie jak: *Azotobacter sp.*, *Thiobacillus sp.*, *Clostridium sp.* (Kakralya S.K i wsp., 2018).

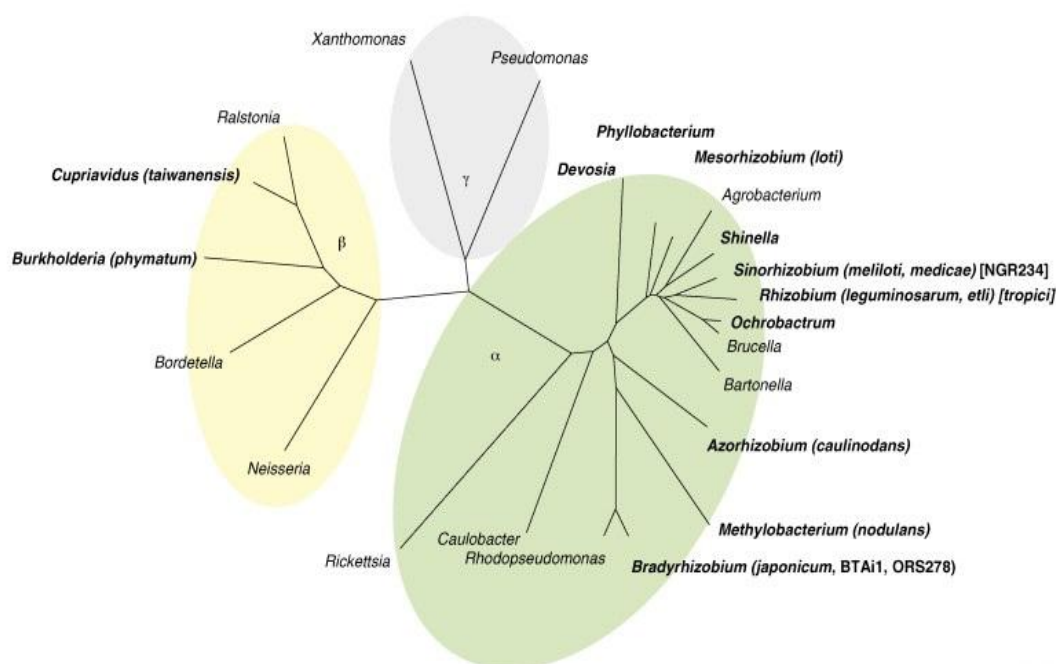
Najważniejszą dla roślin grupą diazotrofów są ryzobia - Gram-ujemne, tlenowe bakterie należące do proteobakterii. Po raz pierwszy zostały wyizolowane z brodawek korzeniowych przez M. Beijerincka, który dodatkowo opisał ich zdolność do nawiązywania symbiozy z roślinami bobowatymi (*Fabaceae*) i wytwarzania brodawek na ich korzeniach (Gonzalez i wsp., 2005).

Z szacunkowej ilości 139-170 mln ton azotu włączanego do globalnego cyklu azotowego w wyniku jego biologicznego wiązania, aż 70-80% pochodzi od ryzobiów symbiotycznych (Martyniuk S., 2012) a symbioza między nimi a roślinami bobowatymi może dostarczać od 100 do 400 kg N/ha/rok (Piotrowska M. i Kusewicz D., 2007). Do innych mikroorganizmów symbiotycznych należą Gram-dodatnie

promieniowce *Frankia sp.*, nawiązujące symbiozę z olchą (*Alnus sp.*). Ilość azotu wiązana przez promieniowce jest podobna do ilości azotu wiązanego przez ryzobia (Paśmionka I., 2017).

Organizmy niesymbiotyczne odpowiadają za biologiczne wiązanie 20-30% azotu (Pisarska K. i Pietr S.J., 2014) i mogą asymilować 10-50 kg N/ha/rok, który jest uwalniany do gleby dopiero po śmierci bakterii (Natywa M. i wsp., 2013).

Podstawowe metody systematyki ryzobiów są oparte na porównywaniu sekwencji genów 16S rRNA oraz 23S rRNA (Willems A., 2006), analizie sekwencji genów metabolizmu podstawowego (*housekeeping genes*) oraz analizie podobieństw całych genomów (Zhang Y.M. i wsp., 2012). Rodzaje, takie jak: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer* (dawniej *Sinorhizobium*) zaliczane są do α -proteobakterii, natomiast do β -proteobakterii należą rodzaje *Burkholderia* i *Cupriavidus* (Lindstrom K. i Young J.P., 2011) (Rys. 2).



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne proteobakterii (Masson-Boivin C. i wsp., 2009). Pogrubioną czcionką oznaczono rodzaje należące do ryzobiów

Badania filogenetyczne pokazują, że bakterie zdolne do wiązania azotu atmosferycznego należą do kilku odległych od siebie linii ewolucyjnych. W związku z tym uważa się, że zdolność do asymilacji azotu nie jest skorelowana z pozycją systematyczną tych taksonów (Eardly B.D. i wsp., 1996). Do ryzobiów należą bakterie, które posiadają geny odpowiedzialne za nawiązywanie symbiozy

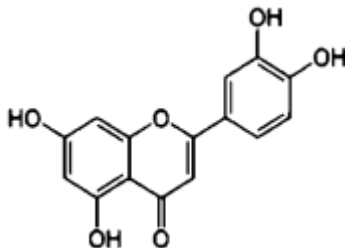
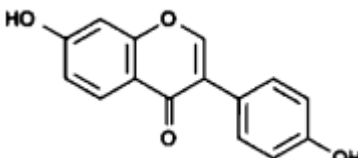
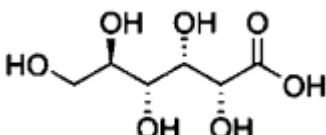
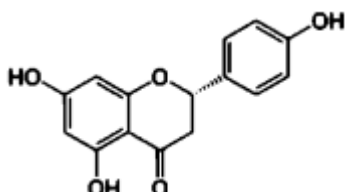
zlokalizowane na megaplazmidach (plazmidy symbiotyczne - pSym) lub wbudowane w genom w postaci wysp symbiotycznych (Finan T.M., 2001; Finan T.M. i wsp., 2002). U bakterii z rodzaju *Rhizobium* większość genów symbiotycznych znajduje się na plazmidach, podczas gdy u *Mesorhizobium loti* geny odpowiedzialne za symbiozę tworzą wyspę symbiotyczną o wielkości ok. 500 kpb na chromosomie (Sullivan J.T. i Ronson C.W., 1998). Przyjmuje się, że geny nadające ryzobiom zdolność do tworzenia symbiozy z roślinami bobowatymi mogą być przekazywane pomiędzy gatunkami na drodze horyzontalnego transferu genów (Stasiak G. i wsp., 2016).

2.2.2. Tworzenie i rozwój brodawek korzeniowych

Brodawki są specyficznymi organami powstającymi na korzeniach roślin bobowatych wskutek działania symbiotycznych ryzobiów. Pierwszym etapem prowadzącym do ich powstania jest adsorpcja bakterii do powierzchni włosników korzeni (Downie J.A., 2010). W ten proces zaangażowane są różne cząsteczki sygnałowe i struktury powierzchniowe np.: rikadhezyna (powierzchniowe białko wiążące jony Ca^{2+}), bakteryjne fimbrie i polisacharydy oraz roślinne lektyny (Skorupska A. i wsp., 2006). Na wczesnych etapach symbiozy dochodzi do wymiany cząstek sygnałowych – flawonoidów i czynników Nod między rośliną a ryzobiami. Po adsorpcji bakterii do powierzchni włosników i działaniu czynników Nod dochodzi do pierwszych zmian w komórkach i tkankach roślin. Wskutek depolaryzacji błony cytoplazmatycznej i fluktuacji poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} dochodzi do charakterystycznego zawijania się końcówki włosnika w kształt tzw. „laski pasterza” (*shepherd's crook*) oraz przebudowy cytoskieletu, a uwięzione w zgięciu włosnika ryzobia intensywnie się namnażają (Oldroyd G.E. i wsp., 2011).

Flawonoidy wydzielane przez rośliny są metabolitami wtórnymi (których synteza jest aktywowana przez czynniki stresowe np.: przez głód azotowy) oraz chemoatraktantami dla ryzobiów. Najwyższe stężenie flawonoidów obserwowane jest w strefie włosników korzeniowych. (Cooper J.E., 2007). Każdy z gatunków roślin bobowatych może syntetyzować inne cząsteczki flawonoidów. Mieszanina flawonoidów wydzielanych przez korzenie roślin bobowatych działa specyficznym na wybrane gatunki mikrosymbiontów (Weston L.A. i Mathesius U., 2013) np.: flawonoidy produkowane przez koniczynę (7,4'-dihydroksyflawon) aktywują specyficzne geny (tzw. geny *nod*) wyłącznie u *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*

(Maj D. i wsp., 2010), a hesperydyna i naringenina produkowane przez groch działają efektywnie na geny *nod* u *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Begum A.A. i wsp., 2001a) (Tab. 1).

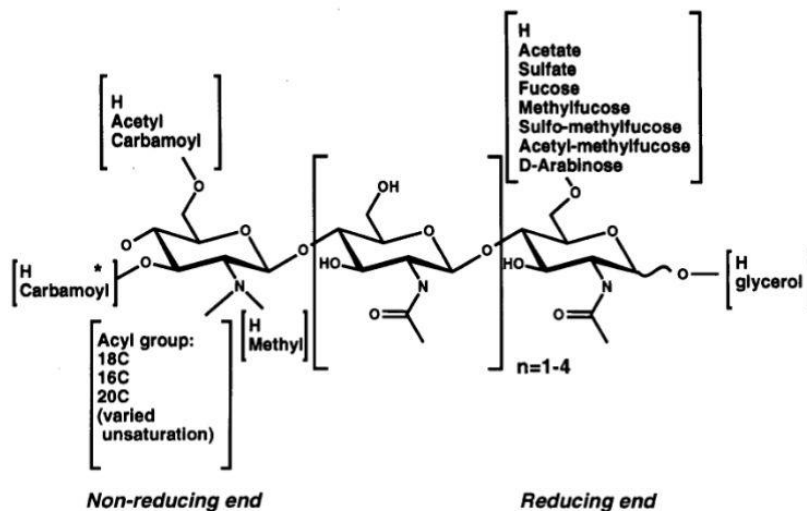
Gospodarz roślinny	Cząsteczka sygnałowa	Mikrosymbiont
<i>Medicago truncatula</i>	Luteolina 	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Glycine max</i> <i>Vigna sp.</i>	Daidzeina 	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
<i>Lotus japonicum</i> <i>Lupinus sp.</i>	Kwas aldonowy 	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>Vicia sp.</i> <i>Pisum sp.</i>	Flawanon 	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>

Tab. 1. Cząsteczki sygnałowe produkowane przez rośliny bobowate (Lal A., 2018)

Oprócz flawonoidów w wymianie sygnałów mogą brać udział inne metabolity roślinne, takie jak: betainy (stachydryna), kwasy aldonowe (erytronowy, tetronowy), ksantony, proste związki fenolowe (wanilina, izowanilina) i kwas jasmonowy (Skorupska A. i wsp., 2010).

Kolejnym istotnym sygnałem symbiotycznym są czynniki Nod - lipochitoooligosacharydy (LCO) wydzielane przez ryzobia w odpowiedzi na roślinne flawonoidy (Pudełko K. i wsp., 2017). Czynniki Nod są zbudowane z rdzenia chitoooligosacharydowego złożonego z 3 do 5 monoacylowanych łańcuchów N-acetyloglukozaminy (chityny) połączonych wiązaniami β -1-4-glikozydowymi. Podstawione do końca nieredukującego kwasy tłuszczowe mogą mieć różną długość

i stopień nasycenia (Maj D. i wsp., 2009). Inne podstawniki kontrolowane przez specyficzne geny *nod* są obecne na obydwu końcach rdzenia i decydują o specyficzności czynników Nod w stosunku do gospodarza roślinnego (Spaink H.P. i wsp., 1994) (Rys. 3).



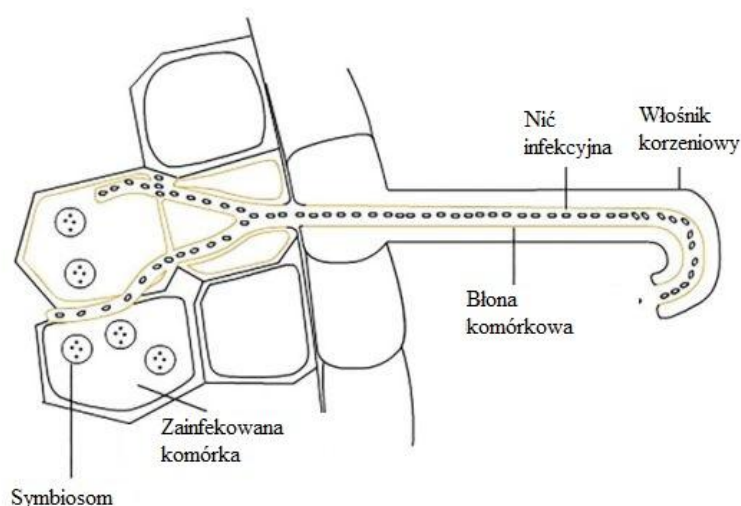
Rys. 3. Struktura czynników Nod (Long S.R., 1996)

Biosynteza czynników Nod jest kontrolowana przez geny *nod*, indukowane obecnością flawonoidów roślinnych. Geny *nod* można podzielić na dwie grupy: geny wspólne *nod* („common *nod genes*” – *nodABC*), pozostające pod kontrolą regulatorowego białka NodD, którego współdziałanie z flawonoidami decyduje o ich aktywności oraz geny specyficzności gospodarza („host-specific *nodulation genes*” – *nodE*, *nodF*, *nodG*, *nodH*) (Schlaman H.R.M. i wsp., 2006; Spaink H.P., 2000). Za syntezę rdzenia czynników Nod odpowiadają wysoce konserwatywne (ich sekwencja nukleotydowa jest niemal identyczna u różnych gatunków ryzobiów) geny: *nodA*, *nodB* oraz *nodC*. Z kolei specyficzne dla gospodarza geny *nod* odpowiadają za syntezę i przyłączanie acylowanych grup tłuszczowych (Janczarek M. i wsp., 2018) a ich białkowe produkty modyfikują szkielet N-acetyloglukozaminy, zarówno z końca nieredukującego jak i redukującego dodatkowymi podstawnikami, takimi jak: grupy metylowe, siarczanowe, octanowe, cukry (mannoza, fukoza, arabinoza) (Haeze W.D. i Holsters M., 2002).

Ryzobia, poza czynnikami Nod wydzielają liczne białka sekrecyjne oraz N-acylowane laktony homoseryny (AHL), które są niezbędne w inicjowaniu procesu *quorum sensing* (Lee A. i Hirsch A.M., 2006). Wytworzenie brodawki korzeniowej,

w której dochodzi do efektywnego wiązania azotu atmosferycznego zależy również od struktur powierzchniowych bakterii, takich jak: zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS), kapsularne polisacharydy (CP) oraz lipopolisacharydy (LPS) (Frayse N. i wsp., 2003).

W wyniku działania bakterii i ich czynników Nod dochodzi do wytworzenia nici infekcyjnej – długiej, rurkowatej struktury wypełnionej dzielącymi się bakteriami (Gage D.J., 2004), która przez włosnik przedostaje się do komórek kory korzenia (Monahan-Giovanelli H. i wsp., 2006). U gospodarza roślinnego dochodzi do zahamowania odpowiedzi obronnej, zaburzenia przepływu auksyn w korzeniach oraz indukcji genów odpowiedzialnych za syntezę specyficznych białek zwanych nodulinami (Fujishige N.A. i wsp., 2008). Kolejnym etapem są intensywne podziały komórek kory korzenia wywołane działaniem czynników Nod, prowadzące do wytworzenia primordium, czyli zawiązka brodawki (Mergaert P. i wsp., 2006). Bakterie są uwalniane z nici infekcyjnej a następnie ulegają endocytozie w komórkach zawiązka brodawki, w których przekształcają się w wiążące azot bakteroidy (Popp C. i Ott T., 2011). Struktury powstałe w tym procesie zawierające jeden lub kilka bakteroidów otoczonych błoną peribakteroidalną pochodzenia roślinnego są nazywane symbiosomami i funkcjonują jako organelle wiążące azot atmosferyczny, zależne od energii i związków węgla dostarczanych przez rośliny (Udvardi M.K. i Day D.A., 1997) (Rys. 4).

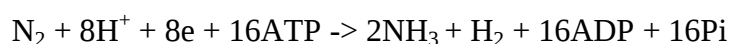


Rys. 4. Rozwój nici infekcyjnej i powstawanie brodawki korzeniowej (Kakralya S. K. i wsp., 2018)

Pod względem morfologicznym i anatomicznym brodawki korzeniowe można podzielić na dwa główne typy – brodawki zdeterminowane i niezeterminowane. Różnią się one głównie charakterem merystemu i rodzajem komórek kory korzenia z których powstają (Timmers A.C., 2008). Brodawki zdeterminowane są okrągłe, powstają z zewnętrznej warstwy komórek korzenia a ich merystem funkcjonuje przez krótki czas. Są charakterystyczne dla soi (*Glycine max*), fasoli (*Phaseolus vulgaris*) i komonicy (*Lotus sp.*). Brodawki niezeterminowane charakteryzują się cylindrycznym kształtem i aktywnym przez cały okres wegetacyjny merystemem. Powstają z wewnętrznej warstwy komórek korzenia u lucerny (*Medicago sp.*), grochu (*Pisum sativum*), koniczyny (*Trifolium sp.*) oraz wyki (*Vicia sp.*) (Sujkowska M., 2009). Osobną klasą są natomiast brodawki kołnierzykowate, które wykazują właściwości obu typów (Haag A.F. i wsp., 2013).

2.2.3. Wiązanie azotu atmosferycznego

Mikroorganizmy zdolne do wiązania azotu atmosferycznego przeprowadzają ten proces przy udziale złożonego układu enzymatycznego, którego najważniejszą częścią jest nitrogenaza - enzym odpowiedzialny za bezpośrednią redukcję azotu (Vance C.P., 1998). Kompleks nitrogenazy składa się z dwóch głównych podjednostek: reduktazy dinitrogenazy NifH (azoferredoksyna) oraz dinitrogenazy NifD/NifH (molibdoferrodoksyna) (Rubio L.M. i Ludden P.W., 2005). Ryzobia do wiązania azotu wykorzystują nitrogenazę molibdenową, która charakteryzuje się bardzo dużą wrażliwością na obecność tlenu oraz wysokimi wymaganiami energetycznymi – zużywa 16 moli ATP na każdą zredukowaną cząsteczkę azotu (Masson-Boivin C. i Sachs J.L., 2017). Wewnątrz brodawek korzeniowych azot cząsteczkowy jest redukowany w wielokrotnych reakcjach transferu elektronów w kompleksie nitrogenazy, w wyniku których powstaje amoniak i jest uwalniany wodór (Weare W.W. i wsp., 2006). Bakteryjny kompleks nitrogenazy katalizuje reakcję:



Produktem metabolicznym reakcji jest amoniak, dostarczany roślinom bezpośrednio przez kanały amonowe w błonie komórkowej lub pośrednio w postaci

aminokwasów (alaniny, glutaminy, glutaminianu) syntetyzowanych przez enzymy bakteryjne (White J. i wsp., 2007).

Symbiotyczne wiązanie azotu jest mutualistycznym związkiem między rośliną a bakteriami, w którym aktywność nitrogenezy jest zapewniana dzięki utrzymaniu odpowiednio niskiego stężenia tlenu oraz dostarczaniu energii w formie kwasów dikarboksylowych pochodzących z fotosyntezy (Prell J. i Poole P., 2006). Do efektywnego działania kompleksu nitrogenazy oraz skutecznego wiązania azotu wewnątrz brodawek korzeniowych niezbędne jest działanie kilku mechanizmów (Jones K.M. i wsp., 2007). Pierwszym z nich jest dwuskładnikowy system białek FixJ-FixL, które odpowiadają za ekspresję białka NifA, będącego głównym regulatorem wiązania azotu (Gibson K.E. i wsp., 2008; Dixon R. i Kahn D., 2004). Ponadto, do prawidłowej aktywności nitrogenazy niezbędna jest obecność kilkunastu białek, kodowanych przez zgrupowane w operony geny *nif* (White J. i wsp., 2007).

Ważnym elementem ochrony kompleksu nitrogenazy przed działaniem tlenu jest leghemoglobina, stanowiąca nawet 25% białek zlokalizowanych wewnątrz brodawki. Jest produktem ekspresji genów roślinnych i utrzymuje stężenie tlenu w strefie wiązania azotu na poziomie od 3 do 22 nM (Ott T. i wsp., 2005). Dużą rolę odgrywa również budowa i struktura brodawki korzeniowej – ciasno ułożone komórki tworzą szczelną barierę dla tlenu i stanowią ochronę dla bakteroidów (Dixon R. i Kahn D., 2004).

2.3. Zastosowanie czynników Nod do zwiększenia efektywności symbiozy

Bakteryjne czynniki Nod są stosowane do stymulowania wzrostu i rozwoju roślin, szczególnie w niekorzystnych warunkach uprawy (Atti S. i wsp., 2005). Lipooligosacharydy w submikromolarnych stężeniach mogą wpływać na rozwój nie tylko roślin strączkowych, ale także innych roślin uprawnych (Miransari M. i Smith D., 2009). Badania wykazały, że zastosowanie preparatów czynników Nod w połączeniu z bakteryjnymi mikrosymbiontami roślin bobowatych lub samych czynników korzystnie wpływało na wzrost i rozwój roślin. Czynniki Nod *Bradyrhizobium japonicum* pozytywnie wpływają na kiełkowanie ważnych roślin, takich jak: soja, kukurydza, groch, wyka, rzepak czy bawełna, zarówno w warunkach

szklarniowych jak i polowych (Souleimanov A. i wsp., 2002; Kidaj D. i wsp., 2012; Schwinghamer T. i wsp., 2015, Smith S. i wsp., 2015). Zaobserwowano również pozytywny wpływ stosowania zapraw lub oprysków czynnikami Nod na proces brodawkowania oraz efektywnego wiązania azotu atmosferycznego w uprawach soi (Almaraz, J.J. i wsp., 2011), grochu (Begum A.A. i wsp., 2001b), wyki (Kidaj D. i wsp., 2012) oraz koniczyny (Maj D. i wsp., 2009).

3. Metale ciężkie i ich wpływ na organizmy żywe

3.1. Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi

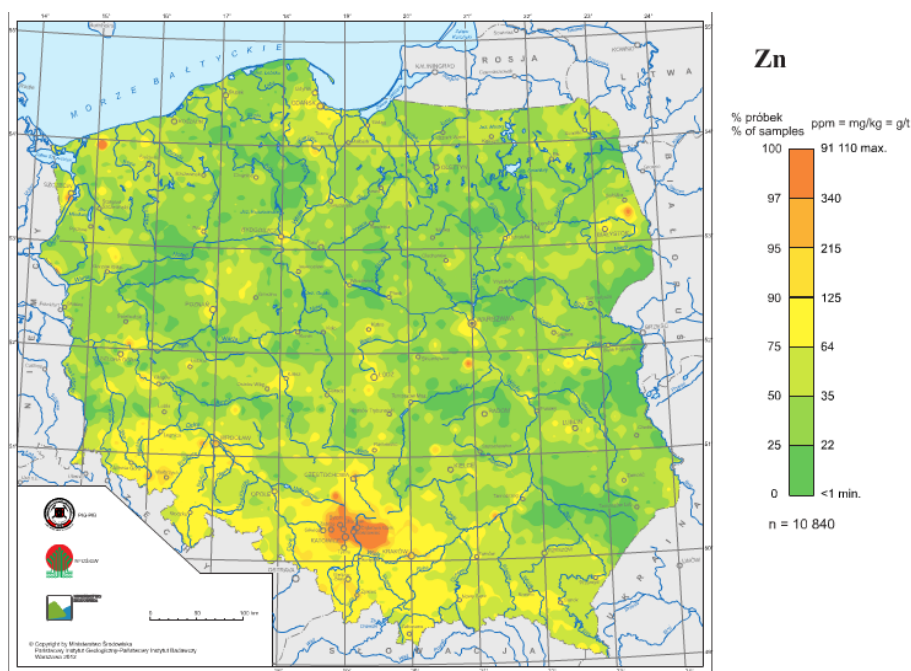
Metale ciężkie to pierwiastki o masie właściwej większej niż $4,5 \text{ g/cm}^3$, które w reakcjach chemicznych charakteryzują się tendencją do oddawania elektronów tworząc proste kationy. W stanach ciekłym i stałym wykazują dobrą przewodność cieplną i elektryczną, posiadają połysk i są nieprzezroczyste. Są kowalne i ciągliwe oraz posiadają wysoką temperaturę wrzenia i topnienia (Ociepa-Kubicka A. i Ociepa E., 2012).

Pierwotnym źródłem zanieczyszczeń gleby metalami ciężkimi są skały macierzyste zawierające duże ilości związków tych pierwiastków (Herawati N. i wsp., 2000). Oprócz tego zanieczyszczenia mogą pochodzić ze źródeł antropogenicznych np.: z przemysłu ciężkiego związanego z hutnictwem i obróbką metali oraz spalania paliw kopalnych (Khan M.S. i wsp., 2009). Kolejnym antropogenicznym źródłem zanieczyszczeń jest rolnictwo i stosowanie pestycydów oraz środków ochrony roślin zawierających metale ciężkie (Singh A. i Prasad S.M., 2015). Pomimo ekonomicznych korzyści stosowania pestycydów i nawozów sztucznych, ich negatywny wpływ na środowisko i zdrowie człowieka jest bardzo poważny (Fantke P. i wsp., 2012; Meena H.R. i wsp., 2017), i dotyczy zwłaszcza metali ciężkich, takich jak: kadm, ołów, rtęć, cynk i miedź (Ez-Zarhouny D. i wsp., 2015). Jony metali ciężkich mogą być również uwalniane w dużej ilości z terenów górniczych (kopalnie, hałdy, wyrobiska) związanych z wydobyciem i przetwarzaniem rud metali oraz składowaniem odpadów (Wang C. i wsp., 2004). Niewłaściwe zagospodarowanie takich terenów może prowadzić do zanieczyszczeń gruntów i wód podziemnych przez metale ciężkie (Williams P.N. i Lei M., 2009). Do zanieczyszczeń przyczynia się również wywiewanie skażonych pyłów i popiołów z hałd i wyrobisk górniczych (Liu X.M. i wsp., 2006).

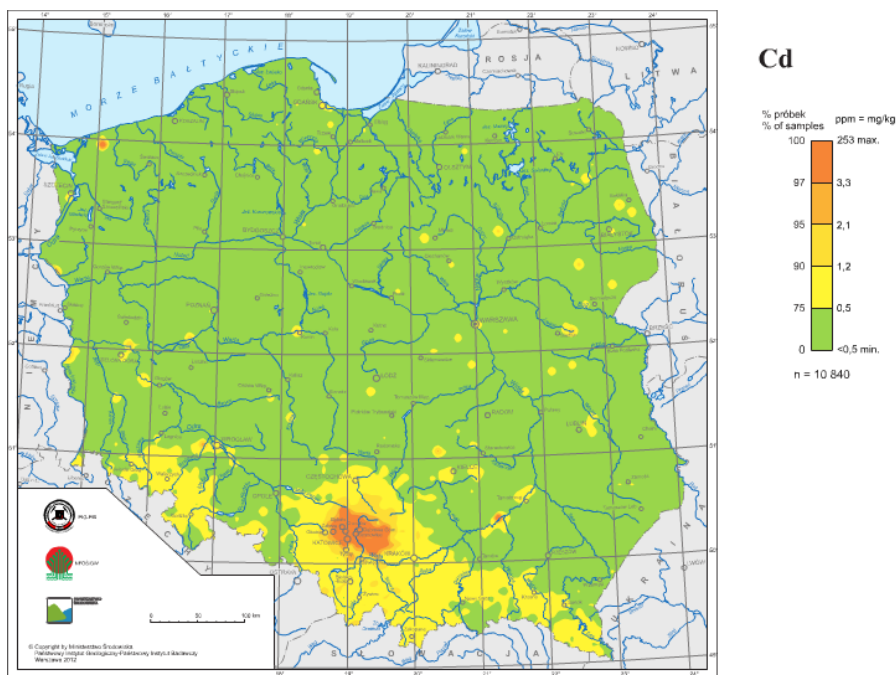
Problem zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi występuje w Polsce lokalnie i dotyczy głównie obszarów uprzemysłowionych (Górny Śląsk, Tarnowskie Góry) lub obszarów związanych z sąsiedztwem dawnych lub obecnych źródeł emisji (bazy wojskowe, fabryki chemiczne). Zanieczyszczenia mogą dotyczyć również punktowych lokalizacji, takich jak: miejsca wypadków, katastrof kolejowych czy wycieków ze zbiorników paliw (Wysokiński L., 2004). Ocena jakości gleb i ich

zanieczyszczenia metalami ciężkimi przeprowadzona przez Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach wykazała, że kilka procent powierzchni polskich gleb należy zakwalifikować do tzw. wyższych stopni zanieczyszczenia - o podwyższonej zawartości m.in.: kadmu, cynku i ołowiu (http://www.gios.gov.pl/chemizm_gleb/).

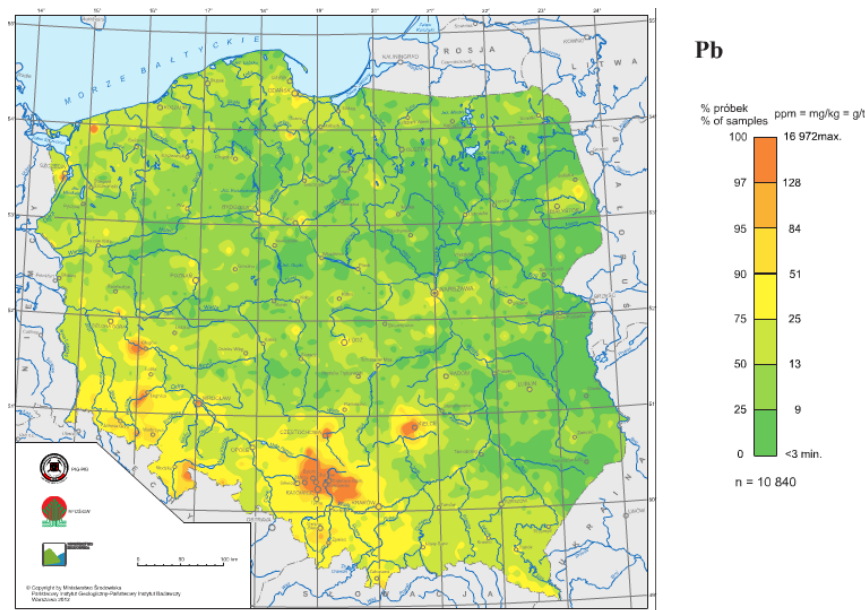
Rozmieszczenie obszarów zawierających podwyższoną zawartość cynku, kadmu i ołowiu na terenie Polski przedstawiono na mapach (Rys. 5, Rys. 6 i Rys. 7). Do najbardziej zanieczyszczonych obszarów należą tereny Śląska i Małopolski, które są związane z największą koncentracją obszarów górniczych oraz przemysłu ciężkiego. Ponadto można wyróżnić tereny zanieczyszczone punktowo, związane z występowaniem większych miast lub lokalnych źródeł emisji metali ciężkich.



Rys. 5. Zawartość cynku w glebach Polski (Lis J. i wsp., 2012)



Rys. 6. Zawartość kadmu w glebach Polski (Lis J. i wsp., 2012)



Rys. 7. Zawartość ołowiu w glebach Polski (Lis J. i wsp., 2012)

3.2. Wpływ metali ciężkich na rośliny i mikroorganizmy

Ze względu na stopień zagrożenia dla organizmów żywych metale ciężkie podzielono na cztery grupy:

1. o bardzo wysokim stopniu potencjalnego zagrożenia (Cd, Pb, Zn, Hg, Cu),
2. o wysokim stopniu potencjalnego zagrożenia (Mo, Mn, Fe),

3. o średnim stopniu potencjalnego zagrożenia (Ni, Co),
4. o niskim stopniu potencjalnego zagrożenia (Sr, Zr) (Walker C.H. i wsp., 2002).

W zależności od rodzaju, stężenia w środowisku oraz form w jakich występują, metale ciężkie mogą oddziaływać na organizmy żywe stymulująco lub toksycznie. Pierwiastki wymagane do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych (np.: Fe, Mn, Cu, Zn, Mo) w nadmiernej ilości są bardziej toksyczne dla roślin, niż dla organizmów zwierzęcych. Inne pierwiastki, takie jak: As, Hg, Pb, Cd już w niewielkich stężeniach wpływają toksycznie na organizmy zwierzęce, natomiast w mniejszym stopniu oddziałują na rośliny (Wang Q. i wsp., 2003; Pueyo M. i wsp., 2004). Przemieszczanie się jonów metali ciężkich z gleby do organizmów zwierząt i ludzi odbywa się za pośrednictwem roślin, które są najważniejszym ogniwem w łańcuchu pokarmowym gleba – roślina – zwierzę – człowiek (Xie Y. i wsp., 2016). Rośliny absorbują metale ciężkie z gleby przez system korzeniowy - najłatwiej pobierane są metale występujące w formie wolnych jonów, natomiast metale tworzące kompleksy z substancjami aktywnymi wydzielanymi do gleby przez rośliny (kwasy organiczne, chelatory) muszą być przez nie wcześniej mobilizowane (Chaney R. i wsp., 1998; Inal A. i wsp., 2007). Zawartość jonów metali akumulowanych w różnych organach roślin jest zmienna, a ich najwyższa koncentracja występuje w korzeniu. Mniejszą koncentrację metali obserwuje się w liściach, łodydze i kwiatach, natomiast najniższe stężenia występują w nasionach. Rośliny są często chronione przez ściany komórkowe tkanek korzeni, które znacząco utrudniają transport szkodliwych jonów metali ciężkich do części nadziemnych rośliny (Kabata-Pendias A. i Mukherjee A.B., 2007).

Nadmierna obecność metali ciężkich w środowisku jest poważnym zagrożeniem dla wszystkich organizmów żywych. Zanieczyszczenia ołowiem, kadmem i cynkiem są przedmiotem licznych badań środowiskowych z powodu wysokiej toksyczności tych jonów oraz ich występowania na niektórych obszarach w wysokich stężeniach.

Ołów w śladowych ilościach występuje naturalnie w organizmach roślinnych, jednak jego biologiczna rola nie została dostatecznie wyjaśniona. W nadmiernej ilości powoduje zaburzenia fotosyntezy, podziałów komórek, metabolizmu azotowego oraz gospodarki wodnej. Negatywny wpływ ołowiu na rośliny widoczny jest jako powstawanie małych, ciemnozielonych lub czerwonych

liści z nekrotycznymi plamami oraz skróconych korzeni o zmniejszonej ilości włóśników, co przekłada się na niskie plonowanie roślin (Kabata-Pendias A. i Mukherjee A.B., 2007). Z powodu niskiej mobilności ołowiu w tkankach roślinnych ponad 90% tego pierwiastka jest akumulowane w korzeniach. Zawartość ołowiu w glebie powyżej 500 mg/kg uznawana jest za ilość toksyczną dla roślin. Biodostępność ołowiu dla roślin zależy od czynników, takich jak: odczyn gleby i zmiany zawartości związków organicznych oraz tlenków żelaza i ilości fosforu. Antagonistyczny wpływ na pobieranie ołowiu mają pierwiastki, takie jak: fosfor, siarka czy wapń, ponieważ powodują wytrącanie go z roztworu glebowego w formach słabo rozpuszczalnych (Kabata-Pendias A. i Pendias H., 2001).

Negatywny wpływ kadmu na rośliny objawia się zaburzeniami procesu fotosyntezy oraz przemian związków azotowych i zmianami przepuszczalności błon komórkowych. Kadm w środowisku występuje najczęściej w postaci jonów Cd^{2+} , które są stosunkowo łatwo pobierane przez rośliny i transportowane przez system korzeniowy do wszystkich organów. Na wzmożone pobieranie i transport jonów kadmu z gleby wpływa jej kwaśny odczyn oraz obecność jonów cynku (Kabata-Pendias A. i Mukherjee A.B., 2007). Toksyczne działanie kadmu widoczne jest u roślin w postaci brunatnienia i skręcenia liści z plamami chlorotycznymi na ich powierzchni oraz skrócenia korzeni. Objawy te występują na ogół przy zawartości Cd^{2+} w glebie w ilości 5-30 mg/kg (Kabata-Pendias A. i Pendias H., 2001).

Cynk zaliczany jest do makroelementów, w związku z czym zarówno nadmiar, jak i jego niedobór wpływają szkodliwie na organizmy roślinne. Za niedobór jonów Zn^{2+} w roślinach uważa się jego zawartość poniżej 20 mg/kg, a za nadmiar przekroczenie 300 mg/kg (Kabata-Pendias A. i Mukherjee A.B., 2007). Nadmiar cynku objawia się u roślin zmianami chlorotycznymi i nekrotycznymi na powierzchni blaszek liściowych oraz zaburzeniami procesu fotosyntezy, czego efektem jest marszczenie liści i ich wolniejszy wzrost (Kabata-Pendias A. i Pendias H., 2001).

Metale ciężkie zanieczyszczające glebę niszczą komórki mikroorganizmów glebowych, co prowadzi do zahamowania aktywności enzymatycznej gleby i zakłócenia procesów przemian materii organicznej (Hander K. i wsp., 2001; Becker J.M. i wsp., 2006). Zanieczyszczenie metalami ciężkimi wpływa negatywnie na rozwój, morfologię i aktywność metaboliczną mikroorganizmów (Lakzian A. i wsp.,

2002) oraz zmniejsza liczebność i bioróżnorodność glebowych populacji bakterii i grzybów (McGrath S.P. i wsp., 1988).

Mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów obronnych umożliwiających przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiskowych wywołanych stresem związanym z obecnością jonów metali ciężkich. Należą do nich wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe wiązanie jonów, zmniejszenie przepuszczalności błon komórkowych dla jonów, transport metali poza komórkę („*efflux system*”) oraz enzymatyczna detoksyfikacja (przekształcenie jonu do mniej toksycznej formy). Mikroorganizmy mogą posiadać jeden z wymienionych mechanizmów lub ich kombinację (Bruins M.R. i wsp., 2000).

3.3. Wpływ jonów metali ciężkich na symbiozę ryzobia – rośliny bobowate

Obecność jonów metali ciężkich w glebie wpływa niekorzystnie na rośliny bobowate powodując opóźnienie procesu brodawkowania, a same rośliny charakteryzują się słabo rozwiniętymi włośnikami oraz niską zawartością suchej masy pędów i korzeni (Reichman S.M.A., 2007). Rośliny bobowate rosnące na glebach zanieczyszczonych jonami metali ciężkich wykazują problemy w pobieraniu wody i składników odżywczych oraz charakteryzują się przedwczesnym starzeniem się, opóźnionym wzrostem oraz niskim plonowaniem (Gramms G. i Voigt K.D., 2015; Karpiscak M.M. i wsp., 2001, Rucińska-Sobkowiak R., 2016). Zaobserwowano również zmiany w morfologii oraz zmniejszenie objętości i masy korzeni (Fahr M. i wsp., 2013). Metale ciężkie, takie jak: kadm i ołów powodują uszkodzenia chlorofilu, co przekłada się na niską aktywność fotosyntetyczną roślin (Parmar P. i wsp., 2013). Synergistyczne działanie kadmu i ołowiu powoduje zwiększenie stresu oksydacyjnego, prowadzącego do wysokiego poziomu H_2O_2 i utleniania lipidów (Garg N. i Aggarwal N., 2011).

Toksyczne działanie jonów metali ciężkich wpływa niekorzystnie na nawiązywanie symbiozy między roślinami bobowatymi a ryzobiami. Kadm, nawet w stosunkowo niskich stężeniach wywołuje szereg negatywnych skutków, takich jak: zahamowanie aktywności nitrogenezy, zmiana struktury brodawek korzeniowych i zmniejszenie ich liczby, ograniczenie produkcji biomasy oraz poważne zaburzenia

procesów metabolicznych (Balestrasse K.B. i wsp., 2004; Mumtaz H. i wsp., 2006; Noriega G.O. i wsp., 2007). Chubukova (2015) wykazała negatywny wpływ kadmu na symbiozę między *Rhizobium leguminosarum* a grochem - obecność jonów metalu znacząco utrudniała efektywne tworzenie brodawek korzeniowych, nawet przy jego niskich stężeniach w glebie. Podobny efekt działania kadmu zaobserwowano również u soi (Balestrasse K.B. i wsp., 2006), lucerny (Shvaleva A. i wsp., 2010), łubinu (Carpena R.O. i wsp., 2003) i fasoli mung (Muneer S. i wsp., 2012). Co więcej, stres oksydacyjny wywołany obecnością kadmu prowadzi do uszkodzenia leghemoglobiny oraz zahamowania aktywności enzymów antyoksydacyjnych (Benavides M.P. i wsp., 2005). Wzrastające stężenia metali ciężkich (kadmu, cynku i ołowiu) znacząco obniżają liczbę brodawek korzeniowych koniczyny białej (*Trifolium repens*), co pozwoliło na wykorzystanie tego gatunku jako bioindykatora dla obecności jonów Cd^{2+} , Zn^{2+} i Pb^{2+} w glebie (Manier N. i wsp., 2009).

3.4. Wykorzystanie układów symbiotycznych *Rhizobium* – rośliny bobowate w rekultywacji terenów zanieczyszczonych metalami ciężkimi

Problem zabezpieczania terenów górniczych, hałd i wyrobisk oraz innych obszarów skażonych metalami ciężkimi można rozwiązać przy pomocy roślin bobowatych, które są wprowadzane na takie tereny jako rośliny pionierskie, czyli gatunki, które łatwo rozwijają się w niekorzystnych warunkach. Rośliny bobowate są zdolne do szybkiego odtwarzania warstwy próchnicznej, wzbogacania gleby w azot i przywracania aktywności biologicznej (Karczewska A., 2012). Dzięki nawiązywaniu symbiozy z bakteriami brodawkowymi nie wymagają dodatkowego nawożenia azotowego, jednocześnie wzbogacając glebę w ten składnik. Ponadto mogą wytwarzać dużą masę pędów, która stanowi istotne źródło materii organicznej dla odnawiającej się warstwy próchnicznej. Rośliny bobowate charakteryzują się rozbudowanym, drenującym systemem korzeniowym ułatwiającym pobieranie wody i składników pokarmowych (Mocek-Płóćiniak A., 2014). W zabezpieczaniu zdegradowanych terenów oprócz roślin bobowatych stosuje się także trawy, które tworzą zwartą darń działającą przeciwerozyjnie (Karczewska A., 2012).

Rośliny samoistnie porastające hałdy i wyrobiska często nie chronią w pełni przed zachodzącymi w jego obrębie procesami erozji wietrznej i wodnej (Fruzińska R., 2010). Do zabezpieczania takich terenów stosowane są mieszanki nasion traw i roślin bobowatych np.: koniczynę białą (*Trifolium repens*) i różne gatunki traw m.in.: kostrzewę (*Festuca sp.*) i wiechlinę łąkową (*Poa pratensis*). W miarę upływu czasu na rekultywowanych terenach mogą pojawiać się nowe gatunki należące do roślin bobowatych np.: komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*), koniczyna łąkowa (*Trifolium pratense*), wyka ptasia (*Vicia craxa*), przelot pospolity (*Anthyllis vulneraria*), lucerna siewna (*Medicago sativa*) oraz rośliny zaliczane do gatunków ruderalnych m.in.: bylica (*Artemisia sp.*), wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare*), perz właściwy (*Agropyron repens*) i mniszek pospolity (*Taraxacum officinale*) (Nowak W., 2006; Klimont K. i Bulińska-Radomska Z., 2010; Majtkowski W. i Majtkowska G., 2012).

Rośliny bobowate stosowane razem z trawami wzbogacają glebę w substancję organiczną, która wpływa na jej strukturę (stan agregatowy i gruzelkowy) oraz właściwości fizykochemiczne (Fabiański J. i wsp., 1989, Gawęł E., 2011). Odpowiednimi gatunkami do mieszanek z roślinami bobowatymi są trawy wykazujące wobec nich niską konkurencyjność. Dla koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*) są to kostrzewa łąkowa (*Festuca pratensis*), tymotka łąkowa (*Phleum pratense*) i życica trwała (*Lolium perenne*) (Bawolski S., 1982; Borowiecki J. i Ścibior H., 1997). Zwiększona produktywność gleby po uprawie takich mieszanek utrzymuje się przeciętnie przez trzy lata, a najbardziej korzystają z niej rośliny uprawiane w pierwszym i drugim roku po zmianie uprawy (Roszak W., 1966). Rośliny bobowate mogą ponadto pełnić rolę okrywową i zabezpieczać przed wymywaniem azotu z gleby - zaobserwowano mniejsze wymywanie azotanów z gleb obsianych mieszkankami bobowato-trawiatymi niż z gleb pozostawionych odłogiem lub obsianych inną roślinnością (Bemtsen J. i wsp., 2006; Mroczkowski W. i wsp., 1997). W innych badaniach potwierdzono mniejsze wymywanie azotu spod mieszanek koniczyny białej (*Trifolium repens*) w porównaniu do innych roślin (Eriksen J. i wsp., 2004; Gąsiorek S. i Kostuch R., 1993).

Na rekultywację terenów pogórnich składa się wiele skomplikowanych przedsięwzięć o charakterze techniczno - organizacyjnym, których wspólnym celem jest przywrócenie tym terenom właściwości użytkowych i przyrodniczych. Aktualnie podejmowane działania w tym zakresie można sprowadzić do trzech podstawowych

rozwiązań: zapobiegania zajmowaniu nowych obszarów na składowiska odpadów pogórnich, odzyskiwania odpadów do dalszego ich wykorzystania dla celów produkcji przemysłowej oraz likwidacja istniejących hałd połączona z procesem przywracania do użytkowania terenów zdegradowanych działalnością górnictw. Szacuje się, że przemysł wydobywczy na terenie Polski ma wpływ na zmianę ok. 1800 km² terenu, z czego do roku 2011 zrehabilitowano i ponownie zagospodarowano jedynie 47 km² obszarów zdegradowanych (Korban Z., 2011). Wiele projektów dotyczących zagospodarowania terenów zdegradowanych i zanieczyszczonych metalami ciężkimi jest realizowanych dzięki dofinansowaniu Narodowego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej lub funduszy europejskich np.: realizowana obecnie rekultywacja biologiczna zwałowiska pogórnich w Bytomiu lub hałdy pocynkowej w Rudzie Śląskiej (<https://sozosfera.pl/odpady/rekultywacja-pocynkowej-haldy/>). Dzięki stosowaniu szczepów ryzobiów odpornych na działanie jonów metali ciężkich oraz gatunków roślin bobowatych tolerujących takie zanieczyszczenia można by zrealizować więcej analogicznych projektów oraz przeprowadzić je szybciej i wydajniej.

II. Materiały i metody

1. Wykaz zastosowanych materiałów

W trakcie przygotowywania tej pracy wykorzystano następujące odczynniki, enzymy, materiały i aparaturę (producent został podany w nawiasie).

1. Szczepy bakteryjne:

Wykorzystane w badaniach szczepy ryzobiów (Tab. 2) pochodziły z brodawek korzeniowych roślin rosnących na hałdzie cynkowo-ołowiowej w Bolesławiu lub kolekcji Zakładu Genetyki i Mikrobiologii UMCS.

Szczep	Gospodarz roślinny	Pochodzenie
KB1, KB2, KB3, KB4, KB5, KB6, KB7, KB8, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12	koniczyna biała (<i>Trifolium repens</i>)	hałda w Bolesławiu
KCz1, KCz2, KCz3, KCz4, KCz5	koniczyna łąkowa (<i>Trifolium pratense</i>)	hałda w Bolesławiu
X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11, X12, X13, X14	koniczyna drobnogłówkowa (<i>Trifolium dubium</i>)	hałda w Bolesławiu
Ko1, Ko2, Kom1, Kom1A, Kom2, Kom4, Kom5, Kom6, Kom7, Kom8, Kom9, Kom10, Kom11, Kom12	komonica zwyczajna (<i>Lotus corniculatus</i>)	hałda w Bolesławiu
P1, P2, P3, P4, P5, Pt1, Pt2, Pt3B, Pt4	przelot zwyczajny (<i>Anthyllis vulneraria</i>)	hałda w Bolesławiu
<i>Rhizobium leguminosarum</i> KO17	koniczyna łąkowa (<i>Trifolium pratense</i>)	kolekcja ZGiM UMCS (Wielbo J. i wsp., 2007)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> TA1	koniczyna łąkowa (<i>Trifolium pratense</i>)	kolekcja ZGiM UMCS (Reeve W. i wsp., 2013)

Tab. 2. Szczepy ryzobiów wykorzystane w badaniach

2. Materiał roślinny:

Nasiona roślin bobowatych (uzyskane dzięki uprzejmości Zakładu Uprawy Roślin Pastewnych IUNG w Puławach):

- koniczyna łąkowa (*Trifolium pratense* cv. Dajana)
- koniczyna biała (*Trifolium repens*)
- komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*)
- przelot zwyczajny (*Anthyllis vulneraria*)
- groch siewny (*Pisum sativum* cv. Ramrod)

- wyka kosmata (*Vicia villosa* cv. Wista)

3. Podłoża hodowlane:

Szczepy ryzobiów hodowano w 28°C, w podłożach:

- **79CA** (1 g/l ekstraktu drożdżowego; 1 g/l hydrolizatu kazeinowego; 10 g/l mannitolu; 0,1 g/l glicerofosforanu wapnia; 0,5 g/l K_2HPO_4 ; 0,1 g/l NaCl; 0,2 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$; pH 7,2) (Vincent J.M., 1970),
- **TY** (5 g/l tryptonu; 3 g/l ekstraktu drożdżowego; 1,3 g/l $CaCl_2 \times 6H_2O$; pH 7,2) (Sambrook J. i wsp., 1989).

W razie konieczności, pH pożywek korygowano 2M HCl lub 2M NaOH.

Podłoża stałe zawierały 1,2–1,5% agaru. Do podłoży stałych do hodowli ryzobiów dodawano środka grzybobójczego Bravo 500SC (0,001%).

Do doświadczeń roślinnych wykorzystano podłoże:

- **podłoże Fahraeusa** (18 g/l K_2HPO_4 ; 7,4 g/l Na_2HPO_4 ; 12 g/l $MgSO_4 \times 7H_2O$; 7,5 g/l $CaCl_2$; 0,01 g/l cytrynianu Fe; 1 ml/l roztworu mikroelementów) (Vincent J.M., 1970),
- **roztwór mikroelementów** (2,86 g/l H_3BO_3 ; 2,03 g/l $MnSO_4 \times 4H_2O$; 0,22 g/l $ZnSO_4 \times 7H_2O$; 0,08 g/l $CuSO_4 \times 5H_2O$; 0,14 g/l $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$).

Podłoża stałe zawierały 0,4–0,8% agaru. Do podłoży stałych do hodowli roślin dodawano środka grzybobójczego Bravo 500SC (0,001%).

4. Odczynniki i inne materiały:

- agar (MP Biomedicals),
- agaroza BASICA LE (Prona),
- azotan kadmu, $Cd(NO_3)_2$ (Aldrich),
- azotan ołowiu (II), $Pb(NO_3)_2$ (Merck),
- bezwodnik octowy, Ac_2O (Fluka),
- biotyna (Sigma-Aldrich),
- borowodorek sodu, $NaBH_4$ (Pol-Aura),
- Bravo 500SC (Agrecol),
- bromek etydyiny (Sigma-Aldrich),
- chlorek potasu, KCl (POCH),
- chlorek rtęci (II), $HgCl_2$ (POCH),

- chlorek sodu, NaCl (POCH),
- chlorek wapnia, dwuwodny, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (POCH),
- chloroform (POCH),
- cytrynian żelaza (Sigma Aldrich),
- dioctan fluoresceiny (Sigma Aldrich),
- diwodorofosforan potasu, KH_2PO_4 (POCH),
- ekstrakt drożdżowy (Sigma-Aldrich),
- etanol (POCH),
- filtry membranowe 0,22 μm , sterylne (Chem-Land),
- glicerofosforan wapnia (Sigma-Aldrich),
- heksan (Merck)
- hydrolizat kazeinowy (Sigma-Aldrich),
- jodek propidyny (Sigma-Aldrich),
- kwas borowy, H_3BO_3 (POCH),
- kwas octowy, CH_3COOH (POCH),
- kwas pantotenowy (Sigma-Aldrich),
- kwas solny, HCl (POCH),
- mannitol (POCH),
- metanol (POCH),
- molibdenian sodu, dwuwodny, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (POCH),
- *n*-butanol (POCH),
- octan etylu, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ (POCH),
- octan sodu, CH_3COONa (POCH),
- perlit,
- piasek kwarcowy o grubości 0,2–0,8 mm,
- pirogronian sodu (Pol-Aura),
- pirydyna (Fluka),
- siarczan cynku, siedmiowodny, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (POCH),
- siarczan magnezu, siedmiowodny, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (POCH),
- siarczan manganu (II), czterowodny, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (POCH),
- siarczan miedzi (II), pięciowodny, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (POCH),
- siarczan sodu, bezwodny, Na_2SO_4 (POCH),
- tiamina, chlorowodorek (Sigma-Aldrich),
- tris(hydroksymetylo)aminometan (POCH),

- trypton (BD Bacto),
- wazony wykonane z polipropylenu (pojemność 500 ml),
- wersenian disodowy, Na₂EDTA (POCH),
- wodorofosforan dipotasu, K₂HPO₄ (POCH),
- wodorofosforan disodu, Na₂HPO₄ (POCH),
- wodorotlenek sodu, NaOH (POCH),

5. Bufory i inne mieszaniny:

- **bufor TBE 10x stężony** (108 g/l Tris; 55 g/l H₃BO₃; 9,3 g/l Na₂EDTA),
- **fosforanowy nawóz dolistny** zawierający mieszaninę (34:66, v/v) 1M r-ru KH₂PO₄ i 1M r-ru Na₂HPO₄, stosowany w rozcieńczeniu 13 ml/1000 ml H₂O,
- **mieszaniny i roztwory do GC-MS** (10% aq. NaOH; 4M HCl; 1M HCl; 33% aq. CH₃COOH; 20% aq. CH₃COOH; 10% CH₃COOH w MeOH; 1M HCl/MeOH),
- **PBS** (80 g/l NaCl; 2 g/l KCl; 11,5 g/l Na₂HPO₄ x 7H₂O; 1,9 g/l KH₂PO₄; pH 7,4),
- **roztwór witaminowy Dilwortha** (1 mg/ml tiamina; 2 mg/ml kwas pantotenowy; 1 µg/ml biotyna – roztwór wodny),
- **wyciąg flawonoidów** z kielkujących nasion koniczyzny łąkowej.

6. Enzymy i zestawy do reakcji enzymatycznych:

- DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific),
- enzymy restrykcyjne FastDigest (1U/µl): *BsuRI*, *PstI*, *TaqI* oraz dedykowane bufor: 10x FastDigest i 10x FastDigest Green (Thermo Scientific),
- ligaza DNA faga T4 (1 Weiss U/µl) (Sigma Aldrich),
- proteinaza K (>0,6 U/µl) (A&A Biotechnology),
- woda do reakcji PCR, wolna od nukleaz (Thermo Scientific).

7. Oligonukleotydy:

Startery do reakcji PCR oraz inne oligonukleotydy wykorzystane w pracy przedstawiono w Tab. 3.

Nazwa	Amplifikowany region	Sekwencja (5'-3')*	Temperatura topnienia	Źródło
16S63f	16S rRNA	CAGGCCTAACACA TGCAAGTC	55°C	Marchesi J.R i wsp., (1998)
16S1387r	16S rRNA	GGGCGGWGTGTAC AAGGC	55°C	Marchesi J.R i wsp., (1998)
nodA1	<i>nodA</i>	AAATCGGGCCCCT GCAGGGC	60°C	Chen H.-C. i wsp., (2005)
nodA2	<i>nodA</i>	ATGGGTTGAATTCC CATTCCATAGATGA T	57,3°C	Chen H.-C. i wsp., (2005)
TSdnaK3	białko chaperonowe	AAGGAGCAGCAGA TCCGCATCCA	58,8°C	Stępkowski T. i wsp., (2003)
TSdnaK2	białko chaperonowe	GTACATGGCCTCGC CGAGCTTCA	60,6°C	Stępkowski T. i wsp., (2003)
gyrB343F	podjednostka B gyrazy	TTCGACCAGAAAT CCTAYAAGG	51,1°C – 54,8°C	Martens M. i wsp., (2008)
gyrB1043R	podjednostka B gyrazy	AGCTTGTCCTTSGT CTGCG	53,2°C	Martens M. i wsp., (2008)
GSI1	syntetaza glutaminy	AAGGGCGGTAYT TCCCGGT	55,9°C – 57,9°C	Turner S.L. i Young P., (2000)
GSI2	syntetaza glutaminy	GTCGAGACCGGCC ATCAGCA	57,9°C	Turner S.L. i Young P., (2000)
recA6F	rekombinaza	CGKCTSGTAGAGG AYAAATCGGTGGA	59,5°C – 62,7°C	Gaunt M.W. i wsp., (2001)
recA555R	rekombinaza	CGRATCTGGTTGAT GAAGATCACCAT	56,4°C – 58,0°C	Gaunt M.W. i wsp., (2001)
atpD273F	podjednostka syntazy DNA	SCTGGGSCGYATC MTGAACGT	56,3°C – 60,2°C	Gaunt M.W. i wsp., (2001)
atpD771R	podjednostka syntazy DNA	GCCGACACTTCCG AACCNGCCTG	62,4°C – 64,2 °C	Gaunt M.W. i wsp., (2001)
TSglnIIf	syntetaza glutaminy	AAGCTCGAGTACA TCTGGCTCGACGG	62,7°C	Stępkowski T. i wsp., (2005)
TSglnIIr	syntetaza glutaminy	SGAGCCGTTCCAGT CGGTGTCG	62,3°C	Stępkowski T. i wsp., (2005)
16S fd1	16S rRNA	AGAGTTTGATCCTG GCTCAG	51,8°C	Weisburg W.G. i wsp., (1991)
16S rd1	16S rRNA	AAGGAGGTGATCC AGCC	49,5°C	Weisburg W.G. i wsp., (1991)
PstI_AR	oligonukleotyd do AFLP	CTCGTAGACTGCGT ACCAATTCGAC	-	Vuylsteke M. i wsp., (2007)
PstI_AF	oligonukleotyd do AFLP	CTCCCTGCATGTAC GCAGTCTAC	-	Vuylsteke M. i wsp., (2007)
PstI-GCG	oligonukleotyd do AFLP	GACTGCGTACATG CAGNNN	55,4°C	Vuylsteke M. i wsp., (2007)

*K = G lub T, N = G lub C lub T lub A, R = A lub G, S = G lub C, W = A lub T, Y = T lub C

Tab. 3. Startery oraz inne oligonukleotydy wykorzystane w reakcjach PCR

8. Zestawy odczynników:

- 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific),
- GeneRuler™, 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific),
- Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology),
- testy metaboliczne BIOLOG: GN2, PM2A, PM3B oraz dedykowane odczynniki: płyn inokulacyjny GN2, bufor IF-0, barwnik BIOLOG Redox Dye Mix A (100 x stężony).

9. Programy komputerowe:

- Chromas (Technelysium) – analiza i edycja odczytów sekwencjonowania DNA,
- Lasergene (DNASTAR) i SnapGene Viewer (GSL Biotech) – edycja, składanie i analiza sekwencji DNA,
- MS Data Analysis – analiza chromatografów,
- Quantum-Capt (Vilber) – oprogramowanie do dokumentacji żeli,
- Quick Photo Camera – analiza zdjęć z mikroskopu (Olympus BX41TX),
- ScanPlus (Biochrom) – oprogramowanie do czytnika mikropłytek,
- STATISTICA (StatSoft Polska) – analiza statystyczna wyników.

10. Aparatura:

- aparaty i akcesoria do elektroforezy horyzontalnej (Bio-Rad),
- czytnik mikropłytek: Asys UVM340 (Biochrom),
- komora laminarna ESCO,
- mieszadło magnetyczne: MS 11 (WIGO),
- mikroskop Olympus BX41TX,
- pH-metr CP505 (Elmetron),
- spektrofotometr: SP-830 (Metertech),
- sterylizatory parowe (autoklawy): MLS-3781L (Panasonic) i 2100 Classic (Prestige Medical),
- system do oczyszczania zapewniający ultraczystą wodę: Milli-Q Integral 3 (Merck),
- system do wizualizacji żeli Quantum ST4 (Vilber),
- termoblok TB2 (Biometra),
- termocyklery: TPersonal (Biometra), TAdvanced (Biometra),

- waga laboratoryjna Precisa 160M (Medicat),
- wirówki: MiniSpin plus (Eppendorf), 3-18K (Sigma),
- wyparka próżniowa Rotavapor-R (Büchi),
- zasilacz do elektroforezy Consort EV243 (BioRad).

2. Metody

1. Izolacja szczepów z brodawek korzeniowych:

Brodawki odcięto od korzeni i poddano powierzchniowemu jałowieniu w sublimacie (0,1% HgCl_2) przez 45 sek., następnie trzykrotnym opłukaniu jałową wodą destylowaną, następnie przez 60 sek. w 75% etanolu oraz pięciokrotnie płukano jałową wodą destylowaną. Wyjałowione brodawki miażdżono w kropli jałowej wody, a uzyskany materiał zawierający ryzobia, posiewano metodą sektorowo-redukcyjną na stałe podłoże 79CA i inkubowano w temp. 28°C.

2. Izolacja szczepów z roztworu glebowego:

W kolbie umieszczono 100 g wilgotnej ziemi pochodzącej z hałdy i dodano 200 ml wody. Wytrząsano (120 rpm/15-20 min), a następnie pozostawiono do sedymentacji na 10 min. 2/3 objętości mieszaniny przelano do następnej kolby, pozostawiono na 20 min a następnie do kilku próbek przelano znad osadu wyciąg glebowy.

Wyjałowione nasiona komonicy i przelotu (nasiona płukano trzykrotnie jałową wodą / 3 min wytrząsania z sublimatem / trzykrotnie płukanie jałową wodą / 3 min wytrząsania w 70% etanolu / trzykrotne płukanie jałową wodą) nanoszono jałowo na skosy z pożywką Fahraeusa. Po 5 dniach odrzucono skosy w których nasiona nie skielkowały, a pozostałe zakażano 200 μl wyciągu glebowego. Zakażone rośliny hodowano 5 tygodni w temperaturze 22 – 25°C, a następnie z korzeni odcięto brodawki, wyjałowiono powierzchniowo i izolowano z nich ryzobia zgodnie z procedurą z pkt. 1.

3. Izolacja całkowitego DNA:

Genomowe DNA badanych szczepów izolowano z 24-godzinnej płynnej hodowli w podłożu TY (28°C / wytrząsanie 120 rpm) przy użyciu zestawu Genomic Mini, zgodnie z instrukcją producenta.

4. Amplifikacja fragmentów DNA w reakcji PCR:

Reakcje PCR, w której matrycą było całkowite DNA wyizolowane z badanych szczepów ryzobiów przeprowadzono w objętości 25 μ l, zgodnie ze schematem:

DreamTaq Green PCR Master Mix	12,5 μ l
H ₂ O destylowana	10,5 μ l
primer 1	0,5 μ l
primer 2	0,5 μ l
matryca DNA	1 μ l

Etapy reakcji PCR przeprowadzano w termocyklerze zgodnie z poniższymi schematami (Tab. 4):

	16S rRNA	<i>nodA</i>	16S rD1	<i>dnaK</i>	<i>gyrB</i>	<i>atpD</i>	<i>GSI</i>	<i>glnII</i>	<i>recA</i>
1	95°C / 3 min	94°C / 3 min	95°C / 3 min	95°C / 3 min	95°C / 3 min	95°C / 3 min	95°C / 3 min	95°C / 3 min	95°C / 3 min
2	94°C / 1 min	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.	94°C / 45 sek.
3	55°C / 1 min	50°C / 30 sek.	50°C / 45 sek.	59°C / 45 sek.	52°C / 45 sek.	63°C / 45 sek.	60°C / 45 sek.	62°C / 45 sek.	57°C / 45 sek.
4	72°C / 2 min	72°C / 1 min	72°C / 90 sek.	72°C / 45 sek.	72°C / 1 min	72°C / 1 min	72°C / 1 min	72°C / 75 sek.	72°C / 1 min
5	72°C / 3 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min	72°C / 5 min
6	35	35	35	35	35	35	35	35	35

Tab. 4. Przebieg reakcji PCR dla wykorzystanych primerów. 1 – wstępna denaturacja, 2 – denaturacja, 3 – annealing, 4 – elongacja, 5 – końcowa elongacja, 6 – liczba cykli

5. Elektroforeza DNA w podłożu agarozowym:

Otrzymane produkty reakcji PCR nanoszono w objętości 5 μ l do studzienek 1% żelu agarozowego. Jako wzorzec stosowano 2 μ l GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus. Elektroforezę prowadzono w 1x buforze TBE przy napięciu 120V, do momentu osiągnięcia przez barwnik końca żelu. Żel barwiono w 0,05% wodnym roztworze bromku etydy, a następnie wizualizowano DNA w świetle UV i dokumentowano stosując oprogramowanie Quantum-Capt.

6. Analiza RFLP badanych szczepów:

Reakcję trawienia restrykcyjnego przeprowadzono w objętości 15 μ l, zgodnie ze schematem:

produkt PCR	5 μ l
H ₂ O destylowana	8 μ l
enzym restrykcyjny	0,5 μ l
bufor dla enzymu restrykcyjnego	1,5 μ l

Reakcję trawienia restrykcyjnego przeprowadzono w termobloku, w temp. odpowiedniej dla użytego enzymu (37°C dla *Bsu*RI oraz 65°C dla *Taq*I) przez 60 min.

Otrzymane produkty reakcji trawienia restrykcyjnego nanoszono w objętości 15 μ l do studzienek w 1% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE przy napięciu 80 mV przez 2 godz. 40 min. Żel barwiono w 0,05% wodnym roztworze bromku etydyny, a następnie wizualizowano DNA w świetle UV i dokumentowano stosując oprogramowanie Quantum-Capt.

7. Analiza AFLP:

Genomowe DNA (17 μ l) trawiono przez 18 godz. w termobloku w temp. 37°C przy pomocy mieszaniny enzymu restrykcyjnego *Pst*I (1 μ l) i odpowiedniego dla niego buforu (2 μ l). Po tym czasie, w celu sprawdzenia rezultatu trawienia DNA próbki (4 μ l mieszaniny po trawieniu enzymem + 1 μ l buforu obciążającego) nanoszono do studzienek w 1,5% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono w 1x stężonym buforze TBE przy napięciu 100 V przez 2,5 godz.

Adaptory *Pst*I_AR i *Pst*I_AF mieszano ze sobą w równych objętościach i denaturowano w termobloku przez 10 min w temp. 95°C. Następnie denaturowaną mieszaninę pozostawiono na 30 min w temp. pokojowej w celu renaturacji.

Reakcję ligacji przeprowadzono w objętości 20 μ l, w termobloku o temp. 37°C przez 4 godz. Skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbkę:

genomowe DNA (po trawieniu enzymem <i>Pst</i> I)	16 μ l
ligaza faga T4	1 μ l
bufor dla ligazy faga T4	2 μ l
renaturowane adaptory	1 μ l

Po ligacji do mieszaniny reakcyjnej dodawano 100 μ l mieszaniny 95% etanol – 3M octan sodu (v/v, 24:1) i umieszczano w temp. -20°C na 30 min.

Następnie próbki wirowano przez 20 min przy 14 000 rpm w temp. 4°C. Otrzymany w ten sposób osad przemywano 200 µl 70% etanolu i wirowano przez 5 min przy 14 000 rpm (powtarzano dwukrotnie). Wytrącone DNA pozostawiono w temp. pokojowej do momentu całkowitego odparowania etanolu, po czym zawieszano w 50 µl jałowej H₂O MilliQ i inkubowano w temp. pokojowej do momentu rozpuszczenia.

Kolejnym etapem była reakcja PCR, w której jako matrycę wykorzystano DNA po ligacji, przeprowadzona w objętości 25 µl zgodnie ze schematem:

DreamTaq Green PCR Master Mix	12,5 µl
H ₂ O (wolna od nukleaz)	6 µl
primer PstI-GCG	1,5 µl
matryca DNA	5 µl

Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze zgodnie z warunkami podanymi w Tab. 5.

Etap	Temperatura	Czas	Uwagi
wstępna denaturacja	95°C	2 min	-
denaturacja	94°C	20 sek.	40 cykli
annealing	50°C	20 sek.	
elongacja	72°C	1 min	
końcowa elongacja	72°C	7 min	-

Tab. 5. Warunki reakcji amplifikacji w analizie AFLP

Po amplifikacji z mieszaniny reakcyjnej pobrano próbkę o objętości 5 µl, dodawano 2 µl buforu obciążającego i nanoszono do studzienek w 3% żelu agarozowym. Jako wzorzec stosowano 2 µl GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1x stężonym buforze TBE przy napięciu 100V przez ok. 3,5 godziny. Żel barwiono w 0,05% wodnym roztworze bromku etyldyny, a następnie wizualizowano DNA w świetle UV i dokumentowano stosując oprogramowanie Quantum-Capt.

8. Badanie wrażliwości badanych szczepów ryzobiów na sole metali ciężkich – testy płytkowe:

Na płytki Petriego z pożywką 79CA wzbogaconą różnymi stężeniami metali ciężkich nakraplano po 10 µl wodnych zawiesin szczepów ryzobiów o OD₅₅₀ = 0,2. W doświadczeniu wykorzystano sole cynku (ZnSO₄ x 7H₂O), kadmu (CdN₂O₆)

i ołowiu ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) w stężeniach: 33 mM, 10 mM, 3,3 mM, 1 mM, 330 μM , 100 μM , 33 μM oraz 10 μM . Płytki inkubowano przez 24 godz. w temp. 28°C, a następnie sprawdzano, które stężenia spowodowały zahamowanie wzrostu badanych szczepów. Doświadczenie przeprowadzono w trzech, niezależnych powtórzeniach.

9. Badanie wrażliwości badanych szczepów ryzobiów na sole metali ciężkich – testy z hodowlą w podłożu płynnym:

Przygotowano probówki zawierające po 5 ml płynnego podłoża TY z dodatkiem jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} w stężeniach 33 mM, 10 mM, 3,3 mM, 1 mM, 330 μM , 100 μM , 33 μM oraz 10 μM . Podłoża zaszczipiano 24-godziną hodowlą badanych szczepów ($\text{OD}_{550} = 0,2$) i umieszczano na wytrząsarce. Hodowlę prowadzono przez 48 godz. w temp. 28°C z ciągłym wytrząsaniem (120 rpm). Po upływie 48 godz. przy pomocy spektrofotometru przy długości fali 550 nm zmierzono gęstość optyczną hodowli i określono stężenia hamujące wzrost badanych szczepów. Doświadczenie przeprowadzono w trzech, niezależnych powtórzeniach.

10. Badanie wrażliwości badanych szczepów ryzobiów na sole metali ciężkich – testy mikroskopowe:

Do przygotowania przyżyciowych preparatów mikroskopowych wykorzystano nocne hodowle badanych szczepów ryzobiów, które odwirowano w probówkach Eppendorf, przepłukano 0,6 mM EDTA a następnie zawieszono w jałowej H_2O zawierającej różne stężenia (3 mM, 1 mM, 330 μM , 100 μM , 33 μM oraz 10 μM) soli cynku, kadmu i ołowiu. Przygotowano również grupę kontrolną zawierającą jałową H_2O bez dodatku jonów metali. Komórki wybarwiano przez 30 min jodkiem propidyny (25 $\mu\text{l/ml}$) oraz fluoresceiną (10 $\mu\text{l/ml}$). Po inkubacji odwirowano próbki, a otrzymany osad bakteryjny zawieszono w 50 μl PBS i wykonano rozmazy, które oglądano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Do oceny stosunku ilości komórek żywych do martwych zastosowano filtr fioletowy WBV (komórki żywe i martwe) oraz filtr Red (komórki martwe). Doświadczenie przeprowadzono w trzech, niezależnych powtórzeniach, a w każdej grupie określono liczbę komórek żywych i martwych w pięciu polach widzenia.

11. Badanie zakresu gospodarza roślinnego wyselekcjonowanych szczepów:

Wyjałowione nasiona kilku gatunków roślin bobowatych (koniczyny łąkowej, koniczyny białej, komonicy, przelotu, grochu i wyki) umieszczano na skosach z podłożem Fahraeusa. Po kilku dniach odrzucono skosy w których nasiona nie wykiełkowały, a pozostałe inokulowano wodnymi zawiesinami ($OD_{550} = 0,2$) badanych szczepów ryzobiów. W przypadku koniczyny łąkowej, koniczyny białej, komonicy, przelotu użyto po 20 roślin, natomiast w przypadku grochu i wyki po 10 roślin. Probówki z roślinami inkubowano w temp. 21°C przy fotoperiodzie 12/12 godz. (światło/ciemność). Po upływie 6 tygodni od inokulacji zliczono brodawki na korzeniach roślin.

12. Badanie zróżnicowania metabolicznego badanych szczepów – testy BIOLOG:

Nocne hodowle bakteryjne w podłożu TY trzykrotnie odwirowano i przepłukano jałową wodą, a następnie zawieszono w wodzie. Gęstość optyczną otrzymanej zawiesiny bakteryjnej ustalono na poziomie $OD_{550} = 0,1$. Do każdej studzienki płytki testu Biolog GN2 dodano 150 μ l zawiesiny bakterii i inkubowano ją przez kolejne 72 godziny temperaturze 28°C. W regularnych odstępach czasu (co 12 godzin) rejestrowano zmiany absorbancji przy długościach fali 590 nm i 750 nm, przy użyciu czytnika płytek Asys UVM 340 firmy Biogenet.

W przypadku płytek BIOLOG PM2A uzyskaną zawiesinę bakteryjną zawieszano w płynie IF-0. Gęstość optyczną otrzymanej zawiesiny ustalono na $OD_{550} = 0,5$. W probówce zmieszano 10 ml przygotowanego płynu IF-0 z barwnikiem, 1 μ l roztworu witamin Dilwortha oraz 2 ml zawiesiny bakteryjnej w IF-0. Do każdej ze studzienek płytki testu Biolog naniesiono po 100 μ l tej zawiesiny i inkubowano ją przez kolejne 72 godziny w temperaturze 28°C. W regularnych odstępach czasu (co 12 godzin) rejestrowano zmiany absorbancji przy długościach fali 590 nm i 750 nm, przy użyciu czytnika płytek Asys UVM 340 firmy Biogenet.

W przypadku płytek BIOLOG PM3B uzyskaną zawiesinę bakteryjną zawieszano w płynie IF-0. Gęstość optyczną otrzymanej zawiesiny ustalono na $OD_{550} = 0,5$. W probówce zmieszano 10 ml przygotowanego płynu IF-0 z barwnikiem, 1 μ l roztworu witamin Dilwortha, 120 μ l jałowego roztworu pirogronianu sodu oraz 2 ml zawiesiny bakteryjnej w IF-0. Do każdej ze studzienek

płytki testu Biolog naniesiono po 100 μ l przygotowanej w ten sposób zawiesiny bakterii i inkubowano ją przez kolejne 72 godziny w temperaturze 28°C. W regularnych odstępach czasu (co 12 godzin) rejestrowano zmiany absorbancji przy długościach fali 590 nm i 750 nm, przy użyciu czytnika płytek Asys UVM 340 firmy Biogenet.

13. Badanie wpływu metali ciężkich na metabolizm – testy BIOLOG:

Aby zbadać wpływ jonów metali ciężkich na metabolizm badanych ryzobiów, bakterie zawieszano w jałowych, wodnych roztworach metali ciężkich (Zn, Pb lub Cd) o stężeniu 330 μ M. Tak przygotowaną zawiesiną bakteryjną o $OD_{550} = 0,5$ zaszczepiano płytki BIOLOG GN2. W przypadku testów PM2A oraz PM3B metale ciężkie dodawano bezpośrednio do studzienek w płytkach, tak, aby końcowe stężenie jonów metali wynosiło 330 μ M.

14. Izolacja wyciągu flawonoidowego z kiełkujących nasion roślin bobowatych:

Wyjałowione nasiona roślin bobowatych umieszczono w kolbie stożkowej, do której wlewano jałową wodę destylowaną tak, aby całkowicie przykryć warstwę nasion. Zawartość kolby wytrząsano w temperaturze 28°C przy 100 rpm przez 3 doby. Po tym czasie skielkowane nasiona oddzielono od płynu na jałowej gazie. Resztki nasion odwirowywano przez 20 min przy 4 tys. rpm, a płyn z mieszaniną flawonoidów przenoszono do nowej kolby. Po zmierzeniu objętości otrzymanego roztworu, flawonoidy ekstrahowano octanem etylu w proporcji 1 ml na 10 ml ekstrahowanego płynu. Uzyskany ekstrakt odparowywano do sucha pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 60°C na wyparce próżniowej. Pozostałą po odparowaniu octanu etylu suchą masę, zawierającą flawonoidy, rozpuszczano w 95% alkoholu etylowym. Tak otrzymany wyciąg flawonoidowy przechowywano w 4°C.

15. Izolacja czynników Nod szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4:

Bakterie *R. leguminosarum* TR4 hodowano w probówkach z 5 ml płynnego podłoża TY przez 24 godz., w 28°C z wytrząsaniem 120 rpm. Przygotowane w ten sposób hodowle wykorzystano do inokulacji kolb z 500 ml podłoża TY. Kolby z zaszczepionym podłożem inkubowano przez 24 godz., w 28°C z wytrząsaniem 120 rpm. Następnie dodawano wyciąg flawonoidowy z nasion koniczyny łąkowej

(stężenie końcowe 2 μM) i kontynuowano hodowlę w nie zmienionych warunkach przez kolejne 48 godz.

Po odwirowaniu komórek bakteryjnych przy 10 tys. rpm płyn pohodowlany przefiltrowano przez sterylne filtry membranowe, a następnie dwukrotnie ekstrahowano czynniki Nod *n*-butanolem (200 ml/1 płynu pohodowlanego). Tak izolowane czynniki Nod były używane w doświadczeniach wazonowych w odpowiednich rozcieńczeniach (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}).

16. Identyfikacja składowych czynników Nod w preparacie:

Biopreparat zawierający czynniki Nod odparowywano pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce próżniowej, do momentu uzyskania 2 mg suchej masy. W celu ułatwienia hydrolizy aminocukrów próbki poddano N-acetylacji ($\text{H}_2\text{O}/\text{Ac}_2\text{O}/10\% \text{ NaOH}$) i inkubowano przez 3 minuty. Następnie dodano bezwodnik octowy oraz NaOH i inkubowano kolejne 3 minuty. Po inkubacji, nadmiarem bezwodnika octowego obniżono pH (≤ 7). Próbkę wysuszone i dwukrotnie destylowano 1M HCl oraz trzykrotnie wodą dejonizowaną. Następnie próbki poddano hydrolizie ($4\text{M HCl}/100^\circ\text{C}/4\text{h}$), a po ostudzeniu usuwano kwasy tłuszczowe stosując ekstrakcję heksanem. Uzyskaną fazę wodną odparowywano na wyparce próżniowej, dwukrotnie przepłukując wodą destylowaną w celu usunięcia resztek kwasu. Po całkowitym wysuszeniu próbek przeprowadzono kolejną N-acetylację (wg powyższego schematu). Następnie próbki poddano redukcji Na_2BH_4 ($45^\circ\text{C}/1\text{h}$) i po inkubacji usuwano borany przez destylację z niżej wymienionymi odczynnikami:

- 33% aq CH_3COOH ,
- 20% aq CH_3COOH ,
- 10% CH_3COOH w CH_3OH ,
- 1M HCl/MeOH (dwukrotnie),
- CH_3OH (dwukrotnie).

Próbki poddano peracetylacji ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{pirydyna}/30 \text{ min}$) a następnie stosowano ekstrakcję chloroformem ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$, 1:1 v/v). Zebraną fazę chloroformową dwukrotnie przeemywano wodą i po odwodnieniu z zastosowaniem kolumnienek wypełnionych Na_2SO_4 , wysuszeniu N_2 , analizowano metodą GC-MS.

Oznaczenia wykonano na chromatografie Agilent Technologies model 7890A sprzężonym z kwadrupolowym spektrometrem masowym 5975C MSD operującym przy potencjale jonizacji 70eV i rejestrowano na komputerze Vectra 386.

Rozdziały prowadzono na kapilarnej kolumnie HP5 (0,25 mm x 25 m) w temperaturze początkowej 150°C przez 5 min, która wzrastała dalej w tempie 5°C/min do temperatury maksymalnej 310°C, stosując jako gaz nośny hel (1ml/min).

17. Badanie aktywności biologicznej preparatu czynników Nod:

Wpływ preparatu na wzrost roślin zbadano w doświadczeniu wazonowym, w którym nasiona koniczyny łąkowej namaczano w wodnych roztworach preparatów czynników Nod o różnych stężeniach (10^{-2} – 10^{-6}), w celu określenia stężenia najlepiej stymulującego brodawkowanie i wzrost roślin. Rośliny hodowano w zautomatyzowanej szklarni, w której panowała stała temperatura 22°C, a wilgotność powietrza wahała się w granicach 25-30% w wazonach o pojemności 500 ml z podłożem piaskowo-perlitowym (1:1, v:v) podlanych podłożem Fahraeusa. Tak przygotowane wazon-y inokulowano wodną zawiesiną szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 (15 ml zawiesiny, OD₅₅₀ = 0,2). Podczas wzrostu roślin przeprowadzano proste czynności, takie jak: redukcja liczby roślin w każdym z wazonów (dążenie do stałej ilości 10 roślin/wazon) oraz uzupełnianie niedoborów wody w podłożu. Aby zapobiec nadmiernej ekspozycji na światło słoneczne, rośliny były zacieniane przez automatyczne rolety. Po upływie 6 tygodni zliczono liczbę brodawek korzeniowych, a także zważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin.

18. Roślinne doświadczenia wazonowe:

W pracy wykonano kilka różnych doświadczeń wazonowych, których celem było sprawdzenie wpływu jonów metali ciężkich na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej oraz zbadanie wyselekcjonowanego szczepu i/lub jego metabolitu do wspomagania wzrostu i brodawkowania tej rośliny w obecności wysokich stężeń jonów metali. Doświadczenia prowadzono w zautomatyzowanej szklarni, w której panowała stała temperatura 22°C, a wilgotność powietrza wahała się w granicach 25-30%. Rośliny hodowano w wazonach polipropylenowych o pojemności 500 ml, wypełnionych mieszaniną piasku i perlitu (1:1, v:v). Na początku każdego eksperymentu wazon-y podlewano płynną pożywką Fahraeusa, wzbogaconą w odpowiednie stężenia jonów metali ciężkich tak, aby stężenie jonów Zn²⁺ w wazonach wynosiło 5, 10 i 20 mM, jonów Cd²⁺ 100, 250 i 500 µM oraz jonów Pb²⁺ 1, 2 i 5 mM. W przypadku doświadczeń z jonami ołowiu, z pożywki Fahraeusa usunięto związki fosforu (obecność tego pierwiastka w podłożu powodowała

wytrącanie się jonów ołowiu i przekształcanie go w formy niedostępne dla roślin), a rośliny opryskiwano fosforowym nawozem dolistnym. Podczas wzrostu roślin przeprowadzano proste czynności, takie jak: redukcja liczby roślin w każdym z wazonów (dążenie do stałej ilości 10 roślin/wazon) oraz uzupełnianie niedoborów wody w podłożu. Aby zapobiec nadmiernej ekspozycji na światło słoneczne, rośliny były zacieniane przez automatyczne rolety. Po upływie 6 tygodni zliczano liczbę brodawek korzeniowych, a także ważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin.

Jeżeli było to wskazane ze względów doświadczalnych, nasiona nawilżano roztworem czynników Nod lub wazonny zaszczepiano wodną zawiesiną szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4. W przypadku preparatu zawierającego czynniki Nod, nasiona koniczyny łąkowej przed wysiewem namaczano przez 30 min w roztworze preparatu o rozcieńczeniu 10^{-2} (najbardziej efektywne stężenie preparatu, wyznaczone w pkt. 17). Do inokulacji szczepem *R. leguminosarum* TR4 wykorzystywano wodną zawiesiną tego szczepu (15 ml zawiesiny, $OD_{550} = 0,2$).

19. Analiza statystyczna:

Statystyczną analizę wyników doświadczeń przeprowadzono za pomocą metody ANOVA i testu Tukeya (oprogramowanie STATISTICA).

III. Cel pracy

Celem pracy doktorskiej było znalezienie i scharakteryzowanie układu symbiotycznego *Rhizobium* - roślina bobowata, przeznaczonego do wykorzystania w procesie rekultywacji terenów skażonych jonami kadmu, cynku i ołowiu. Realizacja problemu badawczego obejmowała:

1. Izolację, selekcję i charakterystykę szczepów ryzobiów charakteryzujących się podwyższoną opornością na jony Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} , zdolnych do efektywnej stymulacji wzrostu roślinnego gospodarza w warunkach laboratoryjnych.
2. Zbadanie wpływu wyselekcjonowanego szczepu i jego metabolitów, takich jak czynniki Nod, na wzrost roślin hodowanych w warunkach imitujących warunki panujące na terenach zdegradowanych (doświadczenia z zastosowaniem podłoży skażonych jonami Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+}).

IV. Wyniki

1. Izolacja i wstępna ocena zróżnicowania genetycznego szczepów

Pierwszym etapem prowadzonych prac było stworzenie kolekcji szczepów ryzobiów pochodzących ze środowiska zanieczyszczonego jonami metali ciężkich. Szczepy izolowano z brodawek korzeniowych roślin bobowatych (*Fabaceae*) rosnących na hałdzie na terenie składowiska odpadów cynkowo - ołowionych w Bolesławiu (50,17°N; 19,29°E) na Górnym Śląsku.

W kolekcji znalazły się szczepy wyizolowane z brodawek korzeniowych:

1. koniczyny białej (*Trifolium repens*): KB1, KB2, KB3, KB4, KB5, KB6, KB7, KB8, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12 (20 szczepów);
2. koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*): KCz1, KCz2, KCz3, KCz4, KCz5 (5 szczepów);
3. komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*): Ko1, Ko2 (2 szczepy);
4. przelotu zwyczajnego (*Anthyllis vulneraria*): P1, P2, P3, P4, P5 (5 szczepów);
5. koniczyny drobnogłówkowej (*Trifolium dubium*): X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11, X12, X13, X14 (14 szczepów).

Ponadto wyizolowano ryzobia z brodawek korzeniowych roślin rosnących *in vitro* w warunkach sterylnych, które zakażono wyciągiem glebowym otrzymanym z gleby pobranej z hałdy. Tą metodą uzyskano izolaty pochodzące z brodawek:

1. komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*): Kom1, Kom1A, Kom2, Kom4, Kom5, Kom6, Kom7, Kom8, Kom9, Kom10, Kom11, Kom12 (12 szczepów)
 2. przelotu zwyczajnego (*Anthyllis vulneraria*): Pt1, Pt2, Pt3B, Pt4 (4 szczepy)
- Łącznie kolekcja liczyła 62 szczepy.

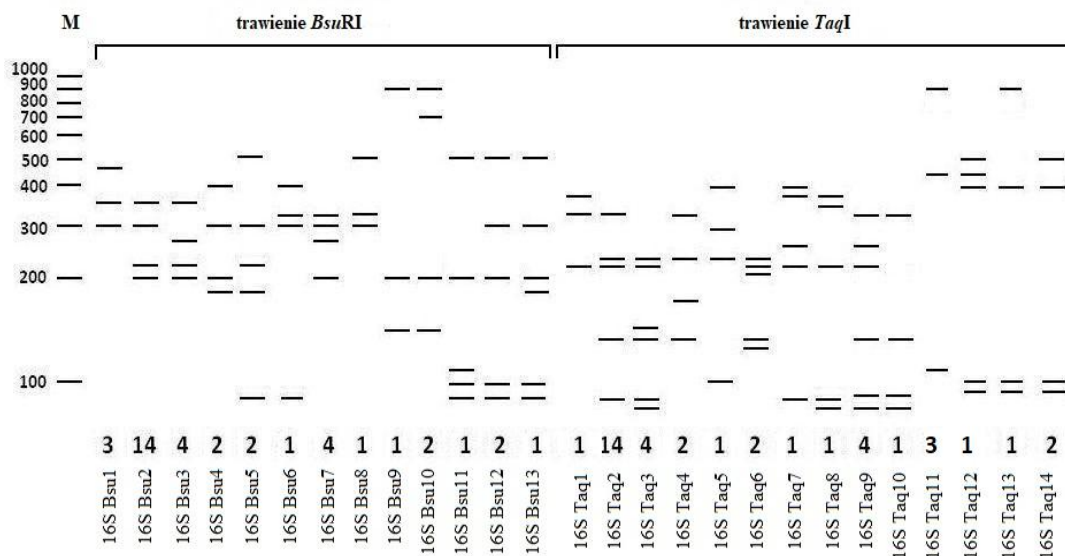
Z komórek wszystkich szczepów ryzobiów wyizolowano całkowite DNA, a następnie przeprowadzono amplifikację fragmentu genu 16S rRNA (region chromosomalny) oraz fragmentu genu *nodA* (region plazmidowy). W przypadku genu 16S otrzymano produkt PCR dla każdego badanego szczepu, natomiast dla

części szczepów nie uzyskano produktu reakcji PCR po zastosowaniu primerów dla genu *nodA*.

Z uwagi na fakt, że szczepy dla których nie uzyskano amplifikacji genu *nodA* (Ko1, Ko2, P1, P2, P3, P4, P5, X1, X2, X3, X4, X7, X9, X11, X13, Pt2, Pt4, Kom4, Kom5, Kom6, Kom7, Kom9, Kom10, Kom11 – łącznie 24 szczepy) mogą nie posiadać plazmidu symbiotycznego, umożliwiającego nawiązanie efektywnej symbiozy z roślinnym gospodarzem, nie korzystano z nich w dalszych badaniach.

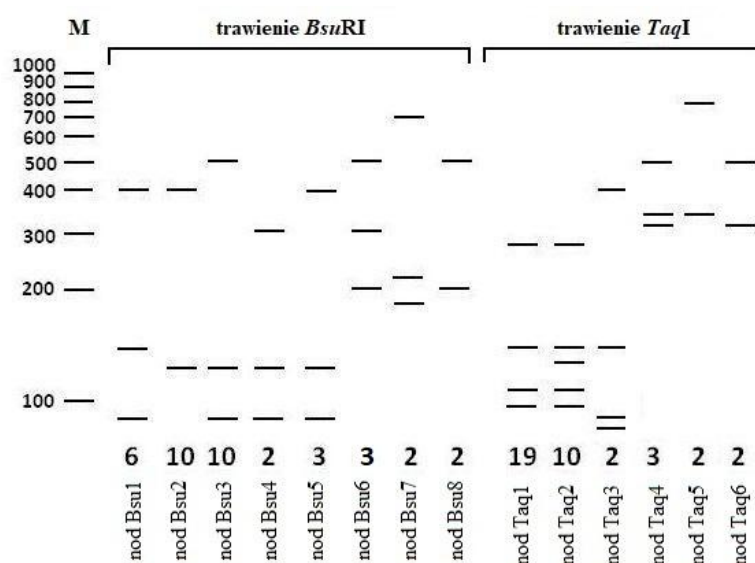
Dla pozostałych 38 szczepów wykonano analizę RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) uzyskanych amplikonów genów 16S rRNA oraz *nodA*, do której wykorzystano dwa enzymy restrykcyjne: *BsuRI* oraz *TaqI*.

Technika RFLP z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych *BsuRI* oraz *TaqI* pozwoliła na zidentyfikowanie 13 unikalnych profili restrykcyjnych przy zastosowaniu enzymu *BsuRI* oraz 14 unikalnych profili przy użyciu enzymu *TaqI* dla fragmentu 16S rDNA. W profilach restrykcyjnych regionu 16S rDNA uzyskanych za pomocą trawienia enzymem *BsuRI* występowało od 3 do 6 fragmentów, analogiczną liczbę fragmentów uzyskano po trawieniu enzymem *TaqI*. Jeden z profili restrykcyjnych występował znacznie częściej niż pozostałe – był charakterystyczny dla 14 szczepów (Rys. 8).



Rys. 8. Profile restrykcyjne fragmentu genu 16S rRNA (schemat). Liczby pod ścieżkami oznaczają liczbę szczepów, charakteryzujących się danym profilem restrykcyjnym. M – marker wielkości

W przypadku regionu genu *nodA* uzyskano 8 profili restrykcyjnych przy zastosowaniu enzymu *BsuRI* oraz 6 profili dla enzymu *TaqI*. W profilach restrykcyjnych genu *nodA* uzyskanych za pomocą trawienia *BsuRI* zidentyfikowano od 2 do 3 fragmentów, natomiast po trawieniu *TaqI* otrzymano od 2 do 5 fragmentów. W porównaniu do regionu 16S rDNA uzyskano mniej zróżnicowane profile restrykcyjne. Część uzyskanych profili restrykcyjnych charakteryzowała się dużą częstością występowania np.: profile *nod Bsu2* i *nod Bsu3* otrzymane po trawieniu *BsuRI* oraz profile *nod Taq1* i *nod Taq2* otrzymane po trawieniu enzymem *TaqI*. (Rys. 9).



Rys. 9. Profile restrykcyjne fragmentu genu *nodA* (schemat). Liczby pod ścieżkami oznaczają liczbę szczepów, charakteryzujących się danym profilem restrykcyjnym. M - marker wielkości

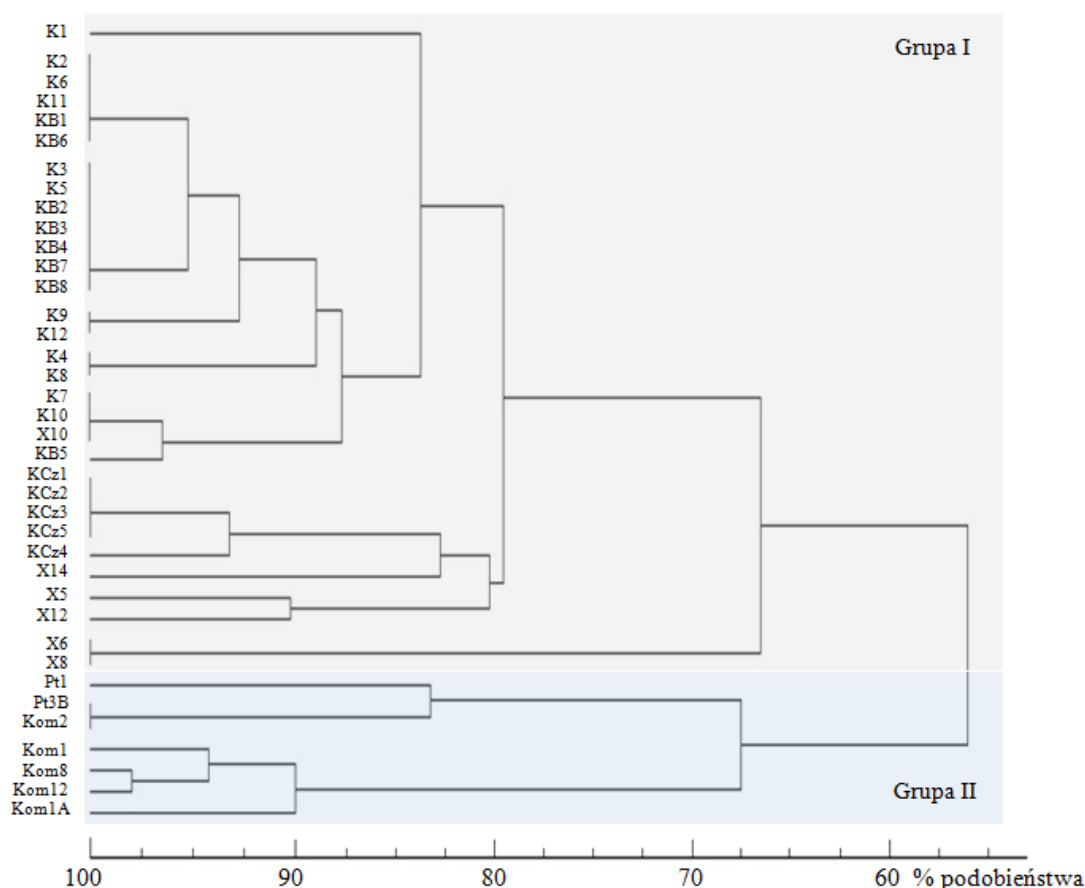
Analiza profili restrykcyjnych regionu 16S rDNA oraz regionu *nodA* pozwoliła na zaklasyfikowanie każdego z 38 szczepów do jednej z 19 grup (genotypów) – Tab. 6.

Szczep	Profile restrykcyjne				Genotyp
	Region 16S rDNA		Region <i>nodA</i>		
	trawienie <i>Bsu</i> RI	trawienie <i>Taq</i> I	trawienie <i>Bsu</i> RI	trawienie <i>Taq</i> I	
K1	16S Bsu1	16S Taq1	nod Bsu2	nod Taq1	1
K2	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu1	nod Taq1	2
K3	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
K4	16S Bsu4	16S Taq4	nod Bsu2	nod Taq1	4
K5	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
K6	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu1	nod Taq1	2
K7	16S Bsu3	16S Taq3	nod Bsu5	nod Taq1	5
K8	16S Bsu4	16S Taq4	nod Bsu2	nod Taq1	4
K9	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu3	nod Taq2	6
K10	16S Bsu3	16S Taq3	nod Bsu5	nod Taq1	5
K11	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu1	nod Taq1	2
K12	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu3	nod Taq2	6
KB1	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu1	nod Taq1	2
KB2	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
KB3	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
KB4	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
KB5	16S Bsu3	16S Taq3	nod Bsu1	nod Taq1	7
KB6	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu1	nod Taq1	2
KB7	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
KB8	16S Bsu2	16S Taq2	nod Bsu2	nod Taq1	3
X5	16S Bsu1	16S Taq5	nod Bsu3	nod Taq2	8
X6	16S Bsu5	16S Taq6	nod Bsu4	nod Taq3	9
X8	16S Bsu5	16S Taq6	nod Bsu4	nod Taq3	9
X10	16S Bsu3	16S Taq3	nod Bsu5	nod Taq1	5
X12	16S Bsu1	16S Taq7	nod Bsu3	nod Taq2	10
X14	16S Bsu6	16S Taq8	nod Bsu3	nod Taq2	11
KCz1	16S Bsu7	16S Taq9	nod Bsu3	nod Taq2	12
KCz2	16S Bsu7	16S Taq9	nod Bsu3	nod Taq2	12
KCz3	16S Bsu7	16S Taq9	nod Bsu3	nod Taq2	12
KCz4	16S Bsu8	16S Taq10	nod Bsu3	nod Taq2	13
KCz5	16S Bsu7	16S Taq9	nod Bsu3	nod Taq2	12
Pt1	16S Bsu9	16S Taq11	nod Bsu6	nod Taq4	14
Pt3B	16S Bsu10	16S Taq11	nod Bsu7	nod Taq5	15
Kom1	16S Bsu13	16S Taq12	nod Bsu6	nod Taq4	16
Kom1A	16S Bsu12	16S Taq13	nod Bsu6	nod Taq4	17
Kom2	16S Bsu10	16S Taq11	nod Bsu7	nod Taq5	15
Kom8	16S Bsu13	16S Taq14	nod Bsu8	nod Taq7	18
Kom12	16S Bsu14	16S Taq14	nod Bsu8	nod Taq7	19

Tab. 6. Genotypy szczepów ryzobiów określone na podstawie analizy RFLP regionów 16S rDNA oraz *nodA*

Zebrana kolekcja szczepów charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem badanych markerów genetycznych (16S rRNA, *nodA*), ponieważ wśród 38 szczepów zidentyfikowano 19 różnych genotypów. Z najwyższą częstością występował genotyp 3 (18% wszystkich profili) oraz genotyp 2 (12% profili), natomiast genotypy 1, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18 oraz 19 były reprezentowane przez pojedyncze szczepy.

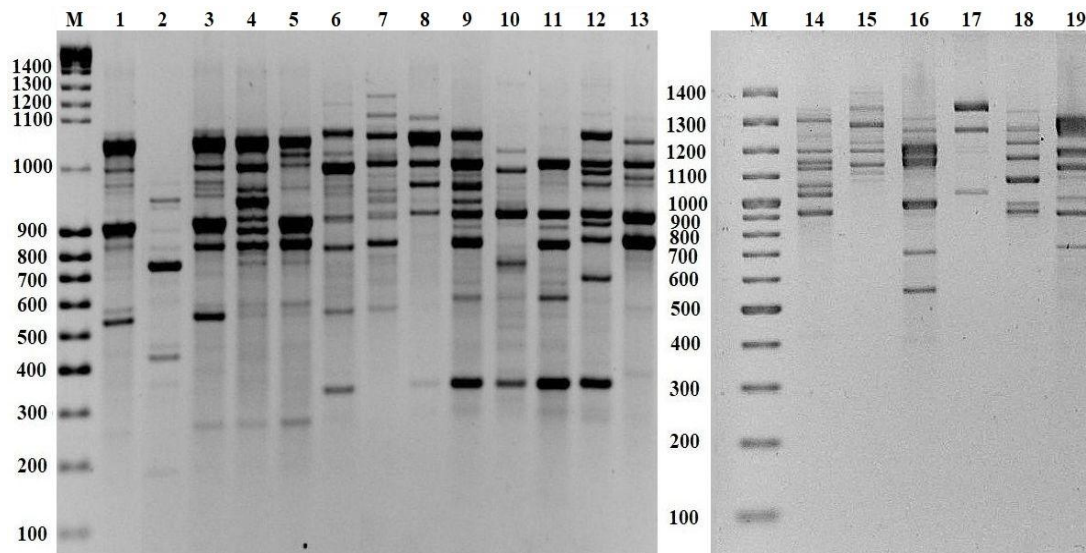
Wykorzystując wyniki analizy RFLP opracowano dendrogram opisujący wzajemne podobieństwo otrzymanych genotypów (Rys. 10). Na podstawie analizy RFLP szczepy można podzielić na dwie duże grupy: (grupa I i grupa II). Do pierwszej należą szczepy wyizolowane z brodawek korzeniowych różnych gatunków koniczyny. W tym zbiorze można wyróżnić dwie podgrupy: (a) złożoną ze szczepów wykazujących >80% podobieństwa, do której należą w większości szczepy z koniczyny białej, oraz (b) grupę wykazującą >70% podobieństwa, obejmującą szczepy pochodzące z koniczyny łąkowej oraz drobnogłówkowej. Z kolei do grupy II należą szczepy wyizolowane z brodawek korzeniowych przelotu oraz komonicy.



Rys. 10. Dendrogram opisujący wzajemne podobieństwo otrzymanych genotypów, wykonany na podstawie analizy RFLP regionów 16S rDNA i *nodA*

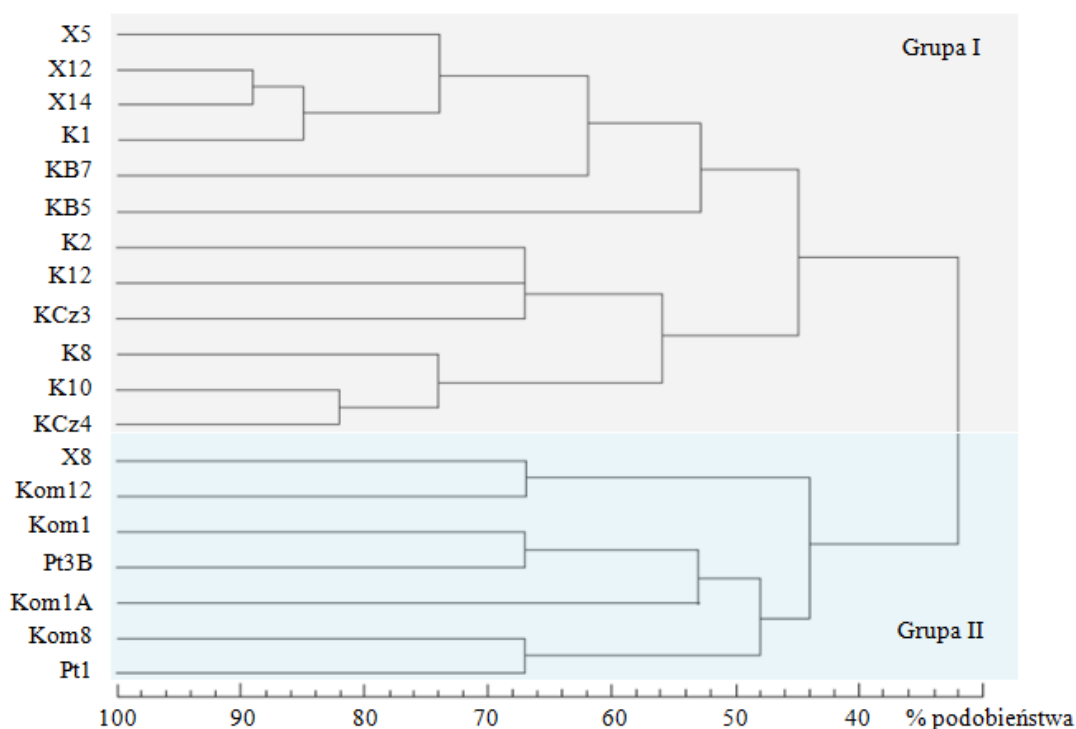
Zróżnicowanie genetyczne szczepów badano także za pomocą analizy AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Do analizy AFLP wybrano 19 szczepów – po jednym dla każdego genotypu wyodrębnionego na podstawie analizy RFLP.

Analiza AFLP wykazała, że każdy z badanych szczepów charakteryzował się unikalnym profilem amplifikacyjnym (Rys. 11), co potwierdza duże zróżnicowanie genetyczne badanej kolekcji.



Rys. 11. Amplikony badanych szczepów ryzobiów uzyskane w analizie AFLP. M – marker wielkości. 1 - X5, 2 - X8, 3 - X12, 4 - X14, 5 - K1, 6 - K2, 7 - K8, 8 - K10, 9 - K12, 10 - KB5, 11 - KB7, 12 - KCz3, 13 - KCz4, 14 - Kom1, 15 - Kom1A, 16 - Kom8, 17 - Kom 12, 18 - Pt1, 19 - Pt3B

Korzystając z profili uzyskanych w analizie AFLP stworzono dendrogram opisujący wzajemne podobieństwo badanych szczepów (Rys. 12). Można wyodrębnić na nim dwie główne gałęzie. Do jednej należą szczepy wyizolowane z brodawek korzeniowych różnych gatunków koniczyny, natomiast do drugiej dwie znacznie różniące się od siebie podgrupy: jedna obejmuje dwa szczepy (X8 oraz Kom12), z kolei druga szczepy pochodzące z tkanek komonicy oraz przelotu (Kom1, Kom1A, Kom8, Pt1, Pt3B).



Rys. 12. Dendrogram opisujący wzajemne podobieństwo badanych szczepów, wykonany na podstawie analizy AFLP

2. Badanie wrażliwości wyselekcjonowanych szczepów ryzobiów na sole metali ciężkich

19 wyselekcjonowanych szczepów ryzobiów, różniących się od siebie profilami RFLP i AFLP zbadano pod kątem oporności na jony metali ciężkich (testy na płytkach Petriego z pożywką 79CA wzbogaconą odpowiednimi jonami). Celem badania było wskazanie szczepów charakteryzujących się najlepszą tolerancją na wysokie stężenia jonów metali ciężkich. Jako szczepów referencyjnych użyto szczepów *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 i KO17 – szczepów laboratoryjnych, nie wykazujących zwiększonej oporności na jony metali ciężkich (Tab. 7).

Szczep	Stężenie jonów hamujące wzrost szczepów		
	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺
X5	10 mM	33 mM	1 mM
X8	1 mM	1 mM	100 µM
X12	10 mM	33 mM	1 mM
X14	1 mM	3,3 mM	100 µM
K1	1 mM	1 mM	100 µM
K2	10 mM	3,3 mM	10 mM
K8	3,3 mM	1 mM	3,3 mM
K10	3,3 mM	1 mM	3,3 mM
K12	3,3 mM	1 mM	3,3 mM
KB5	3,3 mM	3,3 mM	330 µM
KB7	3,3 mM	3,3 mM	3,3 mM
KCz3	10 mM	3,3 mM	10 mM
KCz4	10 mM	1 mM	10 mM
Kom1	10 mM	3,3 mM	1 mM
Kom1A	10 mM	10 mM	10 mM
Kom8	3,3 mM	1 mM	330 µM
Kom12	10 mM	33 mM	10 mM
Pt1	3,3 mM	3,3 mM	33 µM
Pt3B	1 mM	1 mM	10 µM
K017	1 mM	330 µM	33 µM
TA1	1 mM	330 µM	10 µM

Tab. 7. Stężenia jonów Pb²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ hamujące wzrost badanych szczepów na podłożach stałych

Szczepy laboratoryjne tolerowały relatywnie niewielkie stężenia jonów Pb²⁺ (1 mM), Zn²⁺ (330 µM) lub Cd²⁺ (10 lub 33 µM) w pożywce, podczas gdy maksymalne tolerowane stężenie wynosiło 10 mM dla Pb²⁺ (szczepy X5, X12, K2, KCz3, KCz4, Kom1, Kom1A, Kom12), 33 mM dla Zn²⁺ (szczepy X5, X12, Kom12) i 10 mM dla Cd²⁺ (szczepy K2, KCz3, KCz4, Kom1A).

Do dalszych badań wybrano 8 szczepów, wyizolowanych z brodawek korzeniowych różnych roślin bobowatych: X12 (z koniczyny drobnogłówkowej), K2 oraz KB7 (z koniczyny białej), KCz3 (z koniczyny łąkowej), Pt1 oraz Pt3B (z przelotu) i Kom1A oraz Kom12 (z komonicy zwyczajnej) – były to szczepy charakteryzujące się najlepszą tolerancją na jony metali ciężkich, wybrane spośród grupy szczepów izolowanych z brodawek danej rośliny. Dla wspomnianej grupy 8 szczepów przeprowadzono dodatkowe badania dotyczące wpływu metali ciężkich na przeżywalność i wzrost wybranych szczepów ryzobiów. Pierwszym z nich była hodowla szczepów w podłożu płynnym z dodatkiem soli metali ciężkich. W Tab. 8 przedstawiono stężenia Pb²⁺, Zn²⁺ oraz Cd²⁺ hamujące wzrost ryzobiów w hodowlach płynnych (ocenę wzrostu lub jego braku prowadzono po 48 godzinach od zaszczepienia hodowli).

Szczep	Stężenie jonów metalu hamujące wzrost szczepów		
	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺
K2	3,3 mM	100 µM	100 µM
KB7	10 mM	330 µM	100 µM
KCz3	3,3 mM	330 µM	100 µM
X12	33 µM	330 µM	100 µM
Pt1	10 µM	33 µM	33 µM
Pt3B	10 µM	33 µM	33 µM
Kom1A	3,3 mM	1 mM	330 µM
Kom12	10 µM	33 µM	100 µM

Tab. 8. Stężenia Pb²⁺, Zn²⁺ oraz Cd²⁺ w podłożu płynnym hamujące wzrost ryzobiów po 48 godzinach

Otrzymane wyniki pokazują, że wzrost szczepów wyizolowanych z brodawek korzeniowych przelotu (Pt1, Pt3B) był hamowany przy relatywnie niskich (10 µM Pb²⁺, 33 µM Zn²⁺, 33 µM Cd²⁺) stężeniach jonów metali, podczas gdy pozostałe szczepy zazwyczaj były zdolne do wzrostu przy takich stężeniach.

Przeżywalność komórek bakteryjnych w obecności jonów metali ciężkich zbadano także za pomocą obserwacji preparatów mikroskopowych barwionych jodkiem propidyny (barwi DNA martwych komórek na czerwono) i fluoresceiną (wybarwia na zielono żywe komórki). W tym doświadczeniu komórki ryzobiów były inkubowane w roztworze z odpowiednim stężeniem jonów metali ciężkich, wybarwiane, a następnie preparaty oglądano przyżyciowo przy zastosowaniu mikroskopu fluoroscencyjnego i oceniano stosunek ilości komórek żywych do martwych – wyniki zaprezentowano w Tab. 9, Tab. 10 oraz Tab. 11.

Szczep	Stężenie Zn^{2+}						
	0 mM	0,01 mM	0,033 mM	0,1 mM	0,33 mM	1 mM	3 mM
KCz3	0,98 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,03 ^a	0,92 ± 0,04 ^a	0,85 ± 0,06 ^a	0,76 ± 0,04 ^a	0,68 ± 0,03 ^a
K2	0,98 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,03 ^a	0,95 ± 0,03 ^a	0,92 ± 0,03 ^a	0,84 ± 0,04 ^a	0,78 ± 0,05 ^a
KB7	0,98 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,03 ^b	0,80 ± 0,04 ^b	0,72 ± 0,05 ^b	0,69 ± 0,05 ^b	0,65 ± 0,05 ^{ab}	0,63 ± 0,04 ^{ab}
X12	0,98 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,02 ^a	0,95 ± 0,04 ^a	0,92 ± 0,03 ^a	0,92 ± 0,05 ^a	0,82 ± 0,04 ^a	0,70 ± 0,04 ^a
Kom1A	0,98 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,04 ^a	0,93 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,05 ^a	0,74 ± 0,03 ^a
Kom12	0,97 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,06 ^{ab}	0,80 ± 0,05 ^b	0,77 ± 0,05 ^b	0,71 ± 0,04 ^{ab}	0,68 ± 0,05 ^{ab}	0,65 ± 0,04 ^{ab}
Pt1	0,95 ± 0,01 ^a	0,61 ± 0,04 ^c	0,60 ± 0,05 ^c	0,59 ± 0,04 ^b	0,55 ± 0,05 ^b	0,55 ± 0,05 ^b	0,52 ± 0,04 ^b
Pt3B	0,98 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,07 ^b	0,72 ± 0,06 ^b	0,64 ± 0,05 ^b	0,61 ± 0,05 ^b	0,51 ± 0,05 ^b	0,49 ± 0,04 ^b

Tab. 9. Udział komórek żywych w populacji bakterii traktowanych jonami Zn^{2+} (1,00 = 100%). Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się przy $p < 0,01$

Szczep	Stężenie Cd^{2+}						
	0 mM	0,01 mM	0,033 mM	0,1 mM	0,33 mM	1 mM	3 mM
KCz3	0,98 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,96 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,02 ^a	0,92 ± 0,03 ^a	0,88 ± 0,04 ^a	0,82 ± 0,05 ^a
K2	0,98 ± 0,02 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,95 ± 0,03 ^a	0,92 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,05 ^a	0,38 ± 0,03 ^c	0,38 ± 0,06 ^{bc}
KB7	0,98 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,04 ^{ab}	0,76 ± 0,04 ^b	0,75 ± 0,05 ^b	0,75 ± 0,05 ^{ab}	0,72 ± 0,04 ^{ab}	0,67 ± 0,04 ^{ab}
X12	0,98 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,02 ^a	0,96 ± 0,02 ^a	0,91 ± 0,04 ^a	0,84 ± 0,04 ^a	0,80 ± 0,05 ^a
Kom1A	0,98 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,94 ± 0,03 ^a	0,84 ± 0,04 ^{ab}	0,78 ± 0,05 ^a	0,75 ± 0,05 ^a	0,73 ± 0,05 ^a
Kom12	0,97 ± 0,02 ^a	0,80 ± 0,04 ^a	0,79 ± 0,04 ^{ab}	0,75 ± 0,05 ^b	0,71 ± 0,05 ^b	0,66 ± 0,05 ^b	0,60 ± 0,05 ^b
Pt1	0,95 ± 0,01 ^a	0,57 ± 0,04 ^b	0,55 ± 0,04 ^b	0,54 ± 0,04 ^b	0,50 ± 0,04 ^b	0,47 ± 0,04 ^{bc}	0,46 ± 0,04 ^b
Pt3B	0,98 ± 0,01 ^a	0,85 ± 0,04 ^a	0,82 ± 0,04 ^a	0,79 ± 0,06 ^{ab}	0,76 ± 0,05 ^{ab}	0,52 ± 0,07 ^b	0,24 ± 0,03 ^c

Tab. 10. Udział komórek żywych w populacji bakterii traktowanych jonami Cd^{2+} (1,00 = 100%). Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się przy $p < 0,01$

Szczep	Stężenie Pb ²⁺						
	0 mM	0,01 mM	0,033 mM	0,1 mM	0,33 mM	1 mM	3 mM
KCz3	0,98 ± 0,01 ^a	0,91 ± 0,04 ^a	0,89 ± 0,05 ^a	0,77 ± 0,05 ^{ab}	0,70 ± 0,04 ^{ab}	0,62 ± 0,06 ^{ab}	0,56 ± 0,04 ^{ab}
K2	0,98 ± 0,02 ^a	0,91 ± 0,06 ^a	0,90 ± 0,06 ^a	0,88 ± 0,06 ^a	0,77 ± 0,05 ^a	0,67 ± 0,06 ^a	0,62 ± 0,05 ^a
KB7	0,98 ± 0,02 ^a	0,82 ± 0,04 ^{ab}	0,81 ± 0,05 ^a	0,79 ± 0,05 ^{ab}	0,78 ± 0,04 ^a	0,71 ± 0,04 ^a	0,64 ± 0,04 ^a
X12	0,98 ± 0,01 ^a	0,98 ± 0,01 ^a	0,93 ± 0,06 ^a	0,90 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,05 ^a	0,78 ± 0,03 ^a	0,73 ± 0,03 ^a
Kom1A	0,98 ± 0,01 ^a	0,93 ± 0,04 ^a	0,88 ± 0,03 ^a	0,85 ± 0,03 ^a	0,84 ± 0,04 ^a	0,81 ± 0,04 ^a	0,77 ± 0,04 ^a
Kom12	0,97 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,04 ^a	0,89 ± 0,04 ^a	0,83 ± 0,05 ^{ab}	0,82 ± 0,03 ^a	0,82 ± 0,04 ^a	0,77 ± 0,05 ^a
Pt1	0,95 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,05 ^b	0,64 ± 0,04 ^b	0,61 ± 0,05 ^b	0,60 ± 0,05 ^b	0,59 ± 0,04 ^b	0,50 ± 0,04 ^b
Pt3B	0,98 ± 0,01 ^a	0,70 ± 0,05 ^b	0,38 ± 0,05 ^a	0,25 ± 0,03 ^c	0,17 ± 0,02 ^c	0,16 ± 0,02 ^c	0,14 ± 0,01 ^c

Tab. 11. Udział komórek żywych w populacji bakterii traktowanych jonami Pb²⁺ (1,00 = 100%). Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się przy p<0,01

Największą wrażliwość na jony Zn²⁺, Cd²⁺ i Pb²⁺ zaobserwowano u szczepów wyizolowanych z przelotu (Pt1, Pt3B). Przy zastosowaniu najniższego stężenia jonów metali ciężkich (0,01 mM Zn²⁺, Cd²⁺ lub Pb²⁺) udział żywych komórek w populacji szczepu Pt1 spadał odpowiednio do 61%, 57% oraz 68%, podczas gdy pozostałe szczepy charakteryzowały się najczęściej ponad 80% udziałem żywych komórek w badanej populacji. Wyniki uzyskane w tym doświadczeniu są analogiczne do otrzymanych w doświadczeniach płytkowych lub z hodowlą szczepów w podłożach płynnych z dodatkiem jonów metali ciężkich, w których szczepy Pt1 oraz Pt3B wykazywały największą wrażliwość na obecność jonów Zn²⁺, Cd²⁺ i Pb²⁺.

3. Badanie zakresu gospodarza roślinnego wyselekcjonowanych szczepów

Dla wyselekcjonowanych 8 szczepów ryzobiów przeprowadzono doświadczenie sprawdzające zdolność do tworzenia brodawek na korzeniach różnych gatunków roślin bobowatych – zastosowano koniczynę łąkową, koniczynę białą, przelot, komonicę, wykę oraz groch. Po upływie 6 tygodni od inokulacji zliczono brodawki na korzeniach roślin. W tabeli 12 przedstawiono sumaryczną

liczbę brodawek korzeniowych wytworzonych na korzeniach wszystkich roślin danego gatunku użytych w doświadczeniu.

Szczep	Liczba brodawek korzeniowych (łącznie)					
	Koniczyna łąkowa (20 roślin)	Koniczyna biała (20 roślin)	Przelot (20 roślin)	Komonica (20 roślin)	Wyka (10 roślin)	Groch (10 roślin)
K2	226	206	0	0	0	0
KB7	95	192	0	0	0	0
KCz3	233	230	0	0	0	0
X12	77	69	0	0	0	0
Pt1	0	0	10	0	0	0
Pt3B	0	0	3	0	0	0
Kom1A	3	9	0	5	0	0
Kom12	2	6	0	3	0	0

Tab. 12. Sumaryczna liczba brodawek korzeniowych po inokulacji różnych gatunków roślin bobowatych badanymi szczepami

Najbardziej efektywne brodawkowanie zaobserwowano u roślin zakażanych ryzobiami wyizolowanymi z brodawek korzeniowych koniczyny łąkowej (KCz3) oraz koniczyny białej (K2, KB7). Wymienione szczepy wchodziły w symbiozę z roślinami, z których zostały wyizolowane oraz drugim gatunkiem koniczyny. Szczep X12 pochodzący z koniczyny drobnogłówkowej wchodził w symbiozę z koniczyną łąkową oraz białą, jednak była ona znacznie mniej efektywna niż u wcześniej wymienionych szczepów. Szczepy wyizolowane z przelotu (Pt1, Pt3B) tworzyły pojedyncze brodawki wyłącznie na korzeniach swojego gospodarza roślinnego. W przypadku ryzobiów pozyskanych z komonicy (Kom1A, Kom12) obserwowano powstawanie brodawek na korzeniach komonicy oraz koniczyny łąkowej i koniczyny białej. Zarówno szczepy izolowane z brodawek komonicy, jak i szczepy izolowane z brodawek przelotu nie były zdolne do brodawkowania wszystkich roślin, które zakażano danym szczepem – część z nich nie posiadała brodawek mimo inokulacji ryzobiami.

Biorąc pod uwagę poziom oporności na jony metali ciężkich oraz efektywność tworzenia brodawek korzeniowych, na tym etapie badań z dalszych prac wykluczono szczepy Pt1 oraz Pt3B, ponieważ ich oporność na jony metali ciężkich była najniższa, a ponadto brodawkowały one wyłącznie nieliczne rośliny przelotu.

W celu uproszczenia i ujednolicenia nazewnictwa zmieniono nazwy pozostałych 6 szczepów ryzobiów: 4 szczepy pochodzące z brodawek korzeniowych

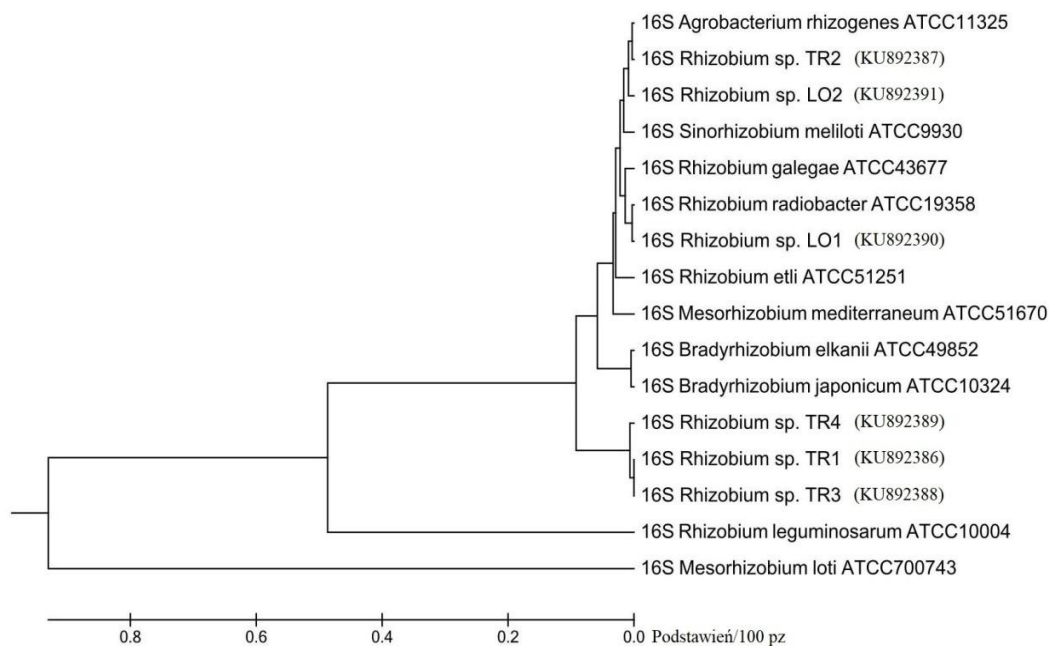
koniczyny otrzymały nazwy TR1, TR2, TR3 i TR4 (TR = „*Trifolium*”), natomiast szczepy pochodzące z komonicy otrzymały nazwy LO1 i LO2 (LO = „*Lotus*”) – Tabela 13.

Nazwa nadana przy izolacji	Nowa nazwa
K2	TR1
KB7	TR2
X12	TR3
KCz3	TR4
Kom1A	LO1
Kom12	LO2

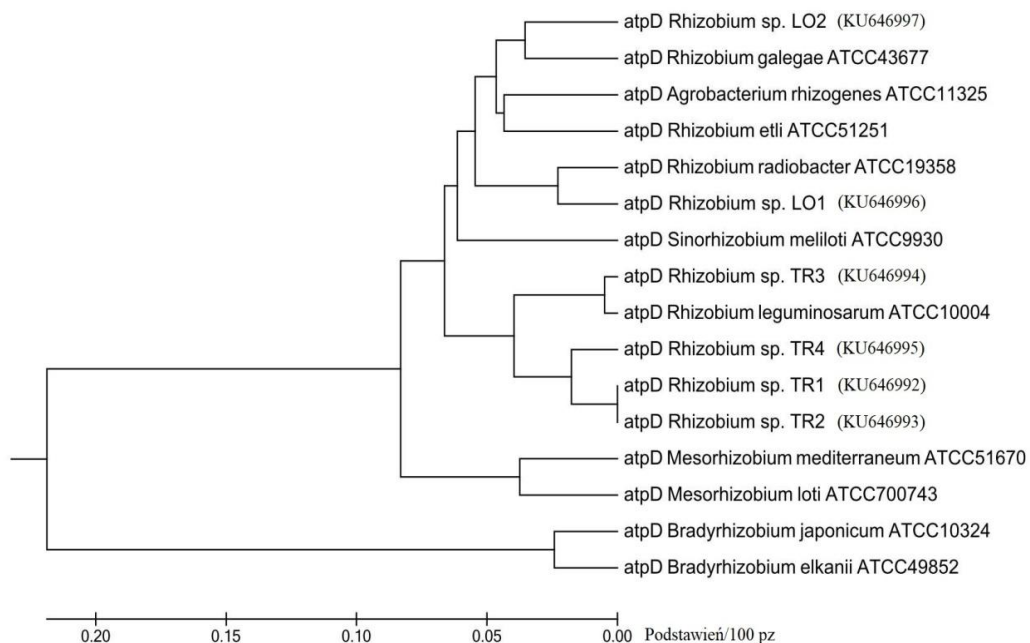
Tab. 13. Nowe nazwy badanych szczepów ryzobiów

4. Ustalenie pozycji taksonomicznej wyselekcjonowanych izolatów

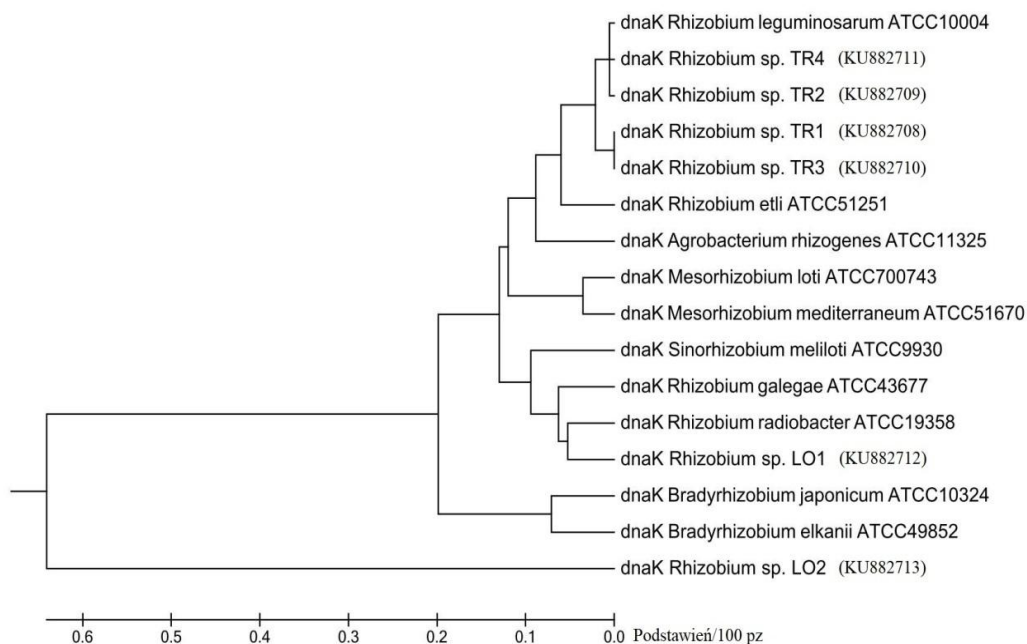
Z materiału genetycznego 6 szczepów (TR1, TR2, TR3, TR4, LO1, LO2) izolowanych z brodawek korzeniowych różnych gospodarzy oraz charakteryzujących się najwyższą opornością na jony metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) amplifikowano fragmenty 7 genów homeostatycznych („*housekeeping genes*”): *dnaK*, *gyrB*, *glnII*, *glnA*, *recA*, *atpD* i 16S rRNA. Porównanie uzyskanych sekwencji z sekwencjami typowych szczepów ryzobiów, takich jak: *Agrobacterium rhizogenes* HAMBI 1816, *Rhizobium radiobacter* LMG 140, *Bradyrhizobium elkanii* ATCC 49852, *B. japonicum* LMG 6138, *Mesorhizobium loti* LMG 6125, *M. mediterraneum* LMG 17148, *R. galegae* ATCC 43677, *R. leguminosarum* LMG 14904, *Sinorhizobium meliloti* LMG 6133 pozwoliło na stworzenie dendrogramów określających pozycję taksonomiczną badanych szczepów (Rys. 13, Rys. 14, Rys. 15, Rys. 16, Rys. 17, Rys. 18, Rys. 19).



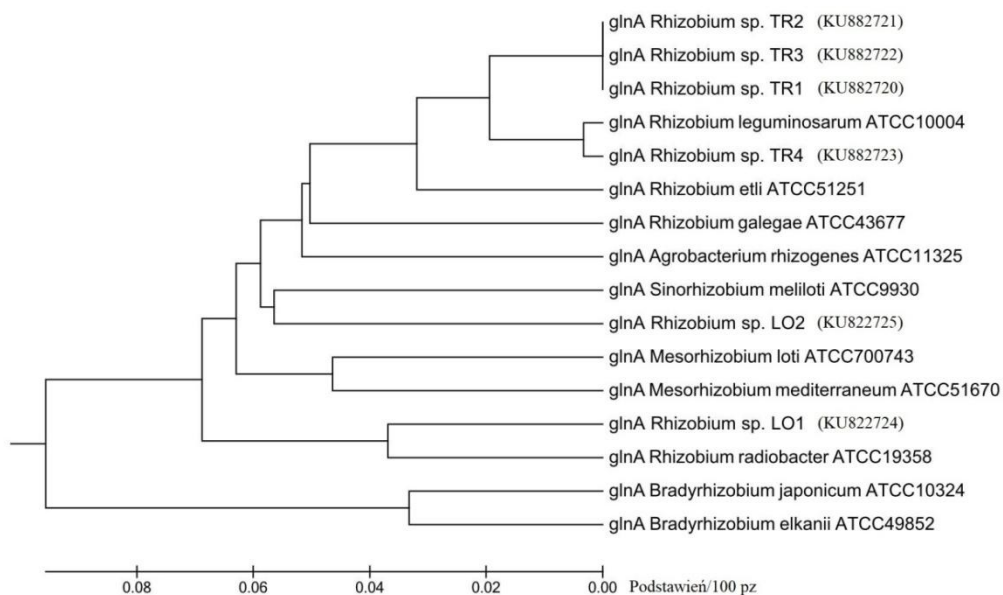
Rys. 13. Dendrogram dla fragmentu genu 16S rRNA (767 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank



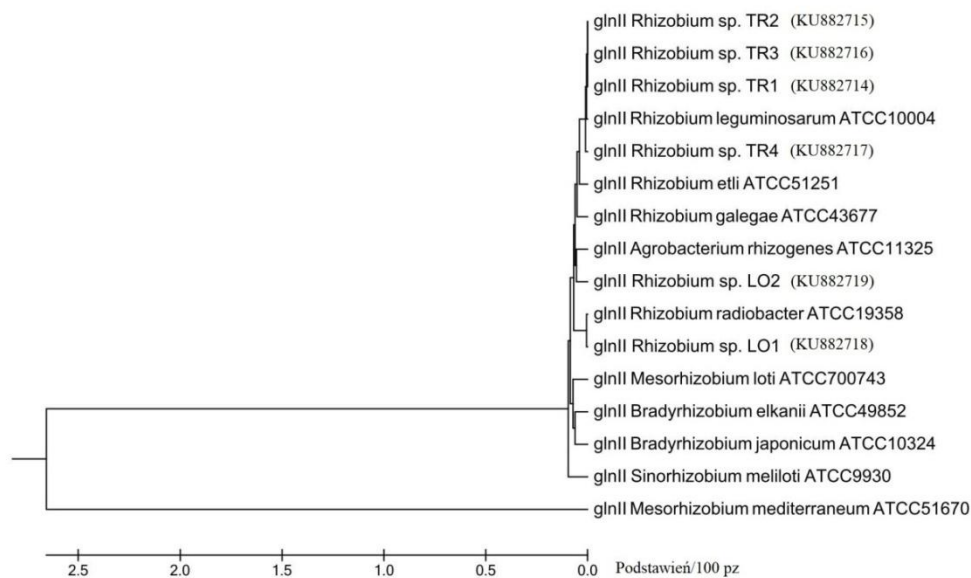
Rys. 14. Dendrogram dla fragmentu genu *atpD* (466 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank



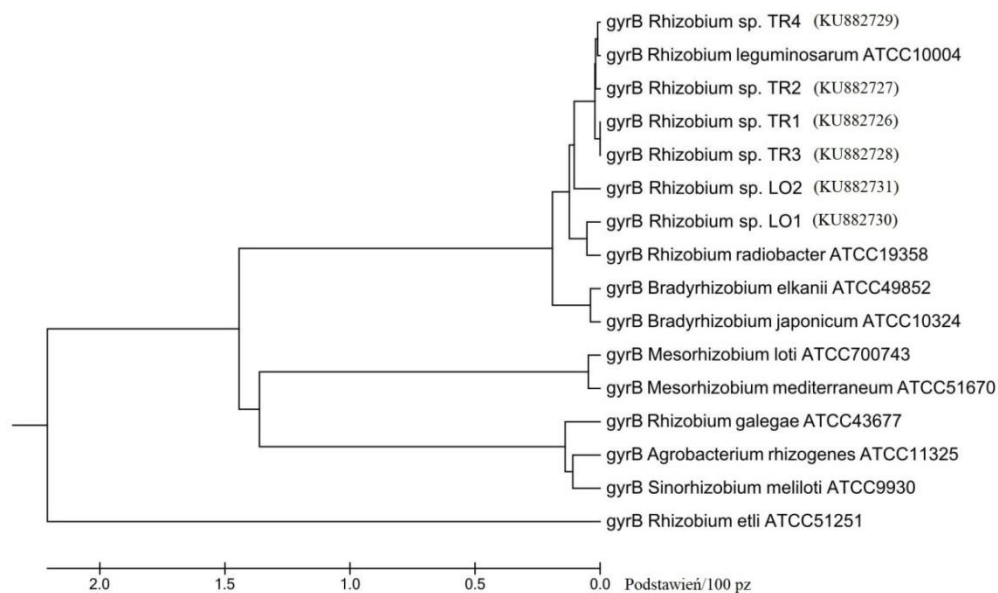
Rys. 15. Dendrogram dla fragmentu genu *dnaK* (275 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank



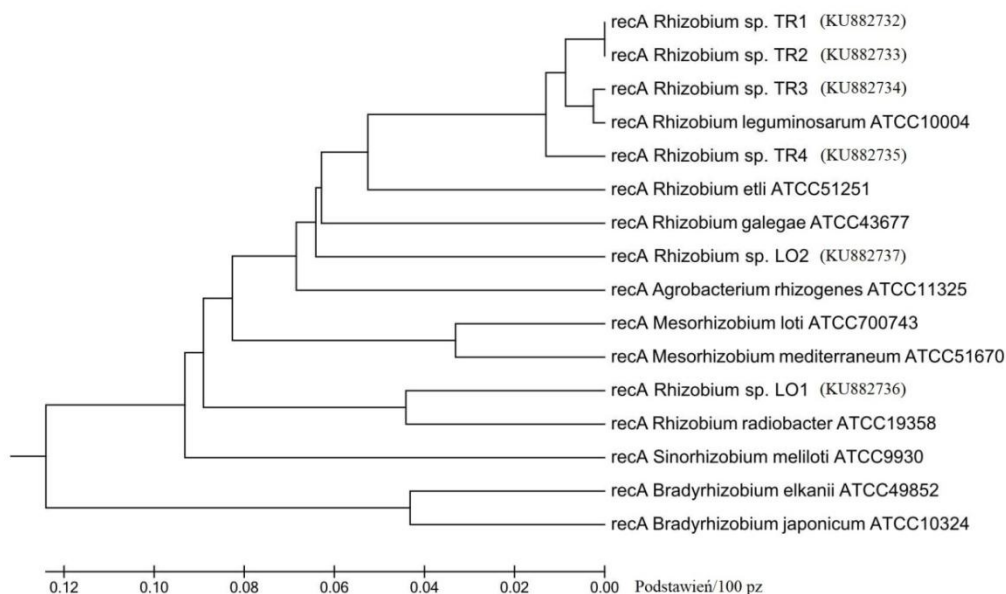
Rys. 16. Dendrogram dla fragmentu genu *glnA* (511 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank



Rys. 17. Dendrogram dla fragmentu genu *glnII* (501 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank

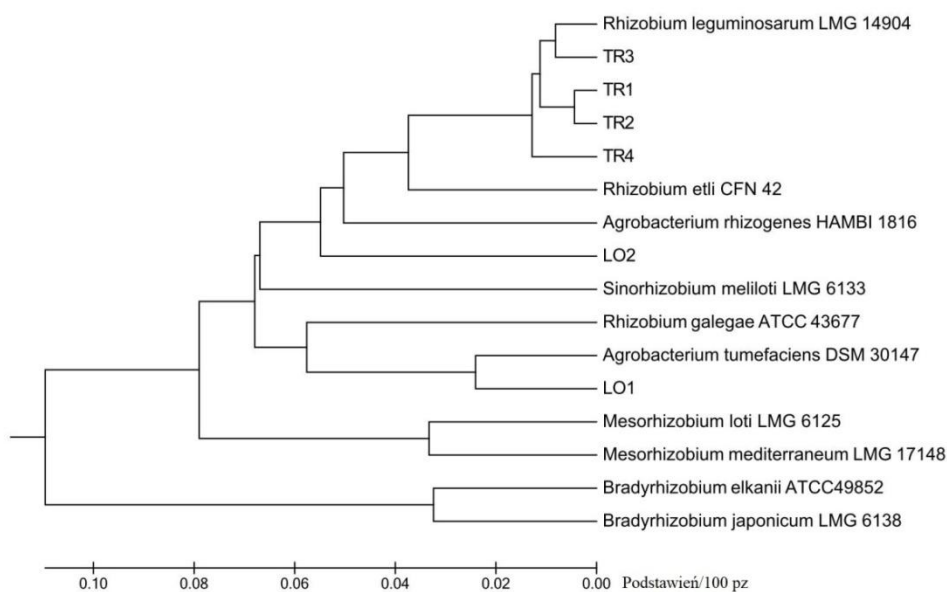


Rys. 18. Dendrogram dla fragmentu genu *gyrB* (636 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank



Rys. 19. Dendrogram dla fragmentu genu *recA* (535 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank

Korzystając z otrzymanych sekwencji wykonano analizę MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) polegającą na jednoczesnej analizie sekwencji kilku genów metabolizmu podstawowego – wyniki przedstawiono w postaci dendrogramu (Rys. 20).



Rys. 20. Dendrogram uzyskany w analizie MLSA dla genów: 16S rRNA, *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *glnII*, *gyrB* i *recA*

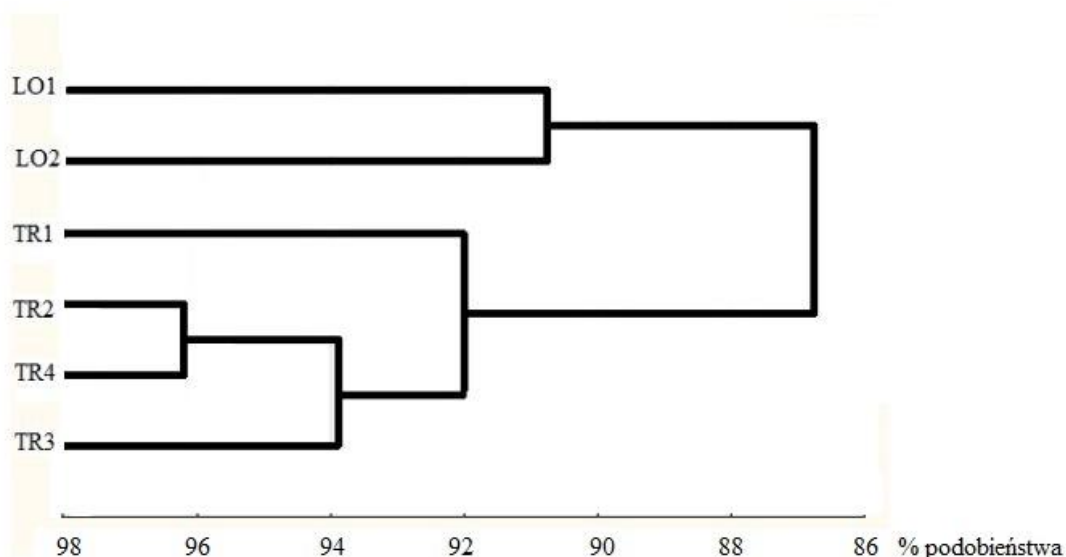
Analiza sekwencji oraz ich porównanie z sekwencjami szczepów referencyjnych ryzobiów wykonane metodą MLSA pozwoliły na stwierdzenie, że szczepy wyizolowane z brodawek koniczyny łąkowej, białej i drobnogłówkowej (TR1, TR2, TR3, TR4) wykazują największe podobieństwo do sekwencji *Rhizobium leguminosarum*, natomiast szczepy izolowane z komonicy zwyczajnej (LO1 oraz LO2) wykazują najwyższe podobieństwo sekwencji odpowiednio do *Agrobacterium tumefaciens* oraz *Agrobacterium rhizogenes*.

5. Badanie zróżnicowania metabolicznego wyselekcjonowanych izolatów

Po określeniu przynależności taksonomicznej wybranych izolatów zbadano ich zróżnicowanie metaboliczne za pomocą płytkowych testów BIOLOG (analiza wykorzystywania różnych substratów pokarmowych). W badaniach wykorzystano płytki GN2, PM2A oraz PM3B przeznaczone dla bakterii Gram-ujemnych, zawierające źródła węgla i azotu – łącznie zbadano 235 substratów.

Najwięcej różnorodnych związków wykorzystywał szczep LO1 (111 substratów), natomiast szczepy TR1 oraz TR3 najmniej (po 93 substraty). Duża część substratów (107) nie była wykorzystywana przez żaden z badanych izolatów. Szczep LO1 wykorzystywał aż dziesięć substratów charakterystycznych wyłącznie dla niego (kwas D-galakturonowy, kwas γ -hydroksymasłowy, kwas α -keto masłowy, kwas propionowy, glukuronid, L-leucyna, ester D-mlekowy kwasu metylowego, L-lizyna, etanolamina, Ala-Leu) TR3 dwa takie substraty (alloksan, kwas parabanowy) a szczepy TR1 oraz LO2 po jednym substracie (odpowiednio α -metylo-D-mannozyd i D-seryna).

Na podstawie profili metabolicznych badanych szczepów ryzobiów wykonano dendrogram określający ich wzajemne podobieństwo (Rys. 21), na którym można zaobserwować duże podobieństwo metaboliczne izolatów (>85%) oraz ich podział na dwie grupy.



Rys. 21. Dendrogram określający podobieństwo metaboliczne badanych szczepów

Do pierwszej grupy należą szczepy LO1 oraz LO2 wyizolowane z brodawek korzeniowych komonicy, natomiast drugą gałąź stanowią szczepy TR1, TR2, TR3 i TR4 pochodzące z różnych gatunków koniczyny. Najwyższe wzajemne podobieństwo można zaobserwować między szczepami TR2 i TR4, których profile metaboliczne różniły się wykorzystaniem dziewięciu substratów. Uzyskany dendrogram wykazuje duże podobieństwo do dendrogramu różnicowania genetycznego wykonanego metodą MLSA, w którym badane szczepy są zgrupowane w analogiczny sposób: osobno izolaty z brodawek koniczyny (prawdopodobnie *Rhizobium leguminosarum*) i osobno izolaty z roślin komonicy (prawdopodobnie *Agrobacterium sp.*).

6. Badanie wpływu metali ciężkich na metabolizm badanych szczepów

Testy BIOLOG należą do czułych badań diagnostycznych pozwalających na obserwację nawet niewielkich zmian w metabolizmie mikroorganizmów, dlatego zostały wykorzystane do sprawdzenia wpływu jonów metali ciężkich na metabolizm badanych szczepów. Jony metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) były obecne w płytkach BIOLOG przez cały czas trwania doświadczenia.

Obecność jonów kadmu nie wpłynęła znacząco na zmianę profili metabolicznych badanych szczepów. W większości przypadków (szczepy TR1, TR2, TR3, LO1, LO2) doszło do zahamowania wykorzystywania od jednego do trzech substratów pokarmowych:

1. TR1: bursztynian monometylowy, kwas *cis*-akonitowy, kwas cytrynowy;
2. TR2: glukozo-1-fosforan;
3. TR3: bursztynian monometylowy, kwas mrówkowy;
4. LO1: kwas D-galakturonowy;
5. LO2: kwas mrówkowy, kwas D-glukuronowy.

Szczep TR3 jako jedyny zaczął wykorzystywać dodatkowe źródło węgla (glukozo-6-fosforan). U szczepu TR4 nie zaobserwowano wpływu jonów kadmu na metabolizm.

W przypadku jonów ołowiu zmiany zaobserwowano u szczepów pochodzących z różnych gatunków koniczyny (TR1, TR2, TR3, TR4). Zaobserwowano wykorzystanie dodatkowych źródeł węgla u szczepów: TR1 (kwas glicylo-L-glutaminowy), TR3 (glukozo-6-fosforan) oraz TR4 (glukozo-1-fosforan). Wskutek inkubacji z jonami Pb^{2+} szczep TR2 przestał wykorzystywać kwas octowy a szczep TR4 kwas octowy i kwas cytrynowy.

Po zastosowaniu jonów cynku w przypadku szczepów TR3, TR4 oraz LO1 nie zaobserwowano zmian w ich profilach metabolicznych. Szczep TR2 przestał wykorzystywać cztery substraty (N-acetylo-D-galaktozamina, N-acetylo-D-glukozamina, laktuloza, kwas D-glukuronowy), a szczepy TR1 i TR2 po jednym substracie (odpowiednio: kwas mrówkowy i glukozo-1-fosforan).

7. Wybór najbardziej efektywnego szczepu

Doświadczenie badające zakres gospodarza roślinnego wykazało, że szczepy o największym potencjale do kolonizacji włóśników korzeni to *Rhizobium leguminosarum*. Wśród nich najmniejszą wrażliwością na obecność jonów metali ciężkich charakteryzowały się izolaty TR1 oraz TR4. Wysoką oporność na jony metali ciężkich wykazywały również szczepy wyizolowane z komonicy, jednak z powodu słabszego brodawkowania roślin bobowatych nie wykorzystywano ich w dalszych badaniach.

W celu wybrania najbardziej efektywnego szczepu *Rhizobium leguminosarum* sprawdzono wydajność symbiotyczną szczepów TR1 i TR4 w warunkach laboratoryjnych, w których zakażano nimi rosące *in vitro* rośliny koniczyny łąkowej oraz koniczyny białej. Po upływie 6 tygodni zliczono brodawki na korzeniach roślin oraz zważono świeżą masę pędu i korzenia roślin. Wyniki przedstawiono w Tab. 14 oraz Tab. 15.

	Grupa kontrolna (rośliny niezakażone)	Rośliny zakażone szczepem TR1	Rośliny zakażone szczepem TR4
Liczba brodawek	0 ± 0^a	11 ± 3^b	12 ± 3^b
Masa pędu (mg)	13 ± 3^a	130 ± 34^b	125 ± 32^b
Masa korzenia (mg)	24 ± 9^a	99 ± 28^b	99 ± 33^b

Tab. 14. Brodawkowanie i wzrost koniczyny białej po inokulacji szczepami TR1 lub TR4. Wartości w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Obydwa badane szczepy nawiązały efektywną symbiozę zarówno z koniczyną białą, jak i z koniczyną łąkową. W przypadku inokulacji roślin koniczyny białej nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy badanymi szczepami.

	Grupa kontrolna (rośliny niezakażone)	Rośliny zakażone szczepem TR1	Rośliny zakażone szczepem TR4
Liczba brodawek	0 ± 0^a	11 ± 3^b	16 ± 4^c
Masa pędu (mg)	25 ± 9^a	122 ± 15^b	139 ± 19^c
Masa korzenia (mg)	84 ± 28^a	89 ± 14^b	106 ± 17^c

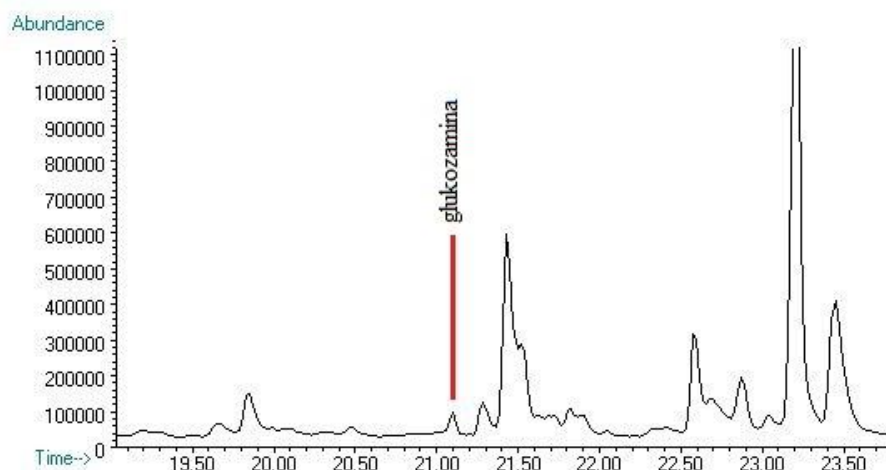
Tab. 15. Brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej po inokulacji szczepami TR1 lub TR4. Wartości w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p < 0,05$

Po zakażeniu koniczyny łąkowej zaobserwowano, że szczep TR4 powodował wytworzenie istotnie większej liczby brodawek korzeniowych oraz świeżej masy pędu i korzenia niż szczep TR1. Otrzymane wyniki wskazują, że najbardziej efektywnym symbiontem roślin bobowatych zdolnych do wzrostu na glebie zanieczyszczonej jonami metali ciężkich może być szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4, dlatego był on stosowany we wszystkich kolejnych doświadczeniach.

8. Izolacja preparatu czynników Nod szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4

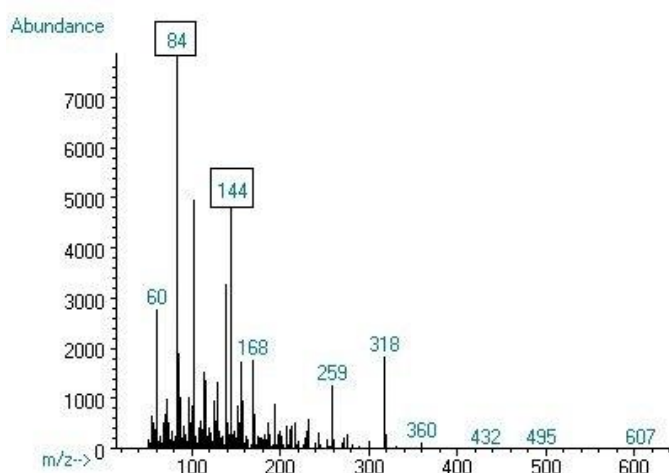
Preparaty czynników Nod mogą być wykorzystywane do zaprawiania nasion roślin bobowatych przed ich wysiewem do gleby. Czynniki Nod indukują powstawanie brodawek korzeniowych oraz powodują przyspieszenie procesu nawiązywania symbiozy, czego bezpośrednim efektem jest zwiększenie liczby brodawek zasiedlanych przez bakterie. Skutkiem końcowym może być zwiększenie ilości zredukowanego azotu, nawet przy niskiej wydajności symbiotycznej szczepów, dlatego przeprowadzono izolację preparatu czynników Nod szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 i badania nad jego wpływem na wzrost koniczyny.

Z przefiltrowanego płynu pochodowlanego szczepu *R. leguminosarum* TR4 indukowanego flawonoidami, ekstrahowano *n*-butanolem mieszaninę związków zawierającą czynniki Nod. Obecność czynników Nod w biopreparacie uzyskanym tą metodą, potwierdzano pośrednio poprzez identyfikację glukozaminy (głównego składnika czynników Nod), z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowo - gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GLC-MS). Uwolnioną na drodze hydrolizy czynników Nod glukozaminę identyfikowano w oparciu o czas retencji w porównaniu do wzorców oraz charakterystyczną fragmentację widma pentaoctanu 2-N-acetamidoglucitolu pochodzącego z tego cukru.



Rys. 22. Fragment chromatogramu cukrów w postaci octanów alditoli, uwolnionych na drodze hydrolizy (4M HCl/100°C/4h) z preparatu czynników Nod szczepu *R. leguminosarum* TR4

W badanej próbce przy czasie retencji 21,10 wykryto glukozaminę, będącą składową czynników Nod (Rys. 22). Obecność grupy acetamidowej miała wpływ na profil jonów otrzymanego spektrum masowego i prowadziła do preferencyjnej fragmentacji przy węglu, z którym była związana. Tak więc, dwa główne jony m/z 144 oraz m/z 84 powstały odpowiednio w wyniku rozerwania wiązania C2-C3 oraz dalszej eliminacji kwasu octowego (60 m/z) (Rys. 23). Z kolei jon m/z 360 powstał w wyniku rozerwania wiązania C1-C2. Przeprowadzone analizy potwierdziły obecność czynników Nod w wyizolowanym, nieoczyszczonym preparacie.



Rys. 23. Spektrogram glukozaminy w postaci octanu alditolu otrzymanej w wyniku hydrolizy (4M HCl/100°C/4h) preparatu czynników Nod szczepu *R. leguminosarum* TR4

Obecność aktywnych czynników Nod w otrzymanym biopreparacie potwierdzono metodą biologiczną, w doświadczeniu, w którym preparat nanoszono na nasiona koniczyny łąkowej. W celu określenia najbardziej efektywnego stężenia czynników Nod zastosowano roztwory o różnych stężeniach. Potraktowane preparatem nasiona wysiano do doniczek zawierających podłoże piaskowo-perlitowe z dodatkiem szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4. Po upływie 6 tygodni zliczono liczbę brodawek korzeniowych, a także zważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin – Tab. 16.

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
Grupa kontrolna	152 ± 35^a	$1,77 \pm 0,3^a$	$1,68 \pm 0,25^a$
Grupa 10^{-2}	218 ± 23^b	$2,33 \pm 0,25^b$	$2,27 \pm 0,19^b$
Grupa 10^{-3}	163 ± 24^a	$1,99 \pm 0,25^a$	$1,91 \pm 0,16^a$
Grupa 10^{-4}	157 ± 26^a	$1,87 \pm 0,25^a$	$1,78 \pm 0,23^a$
Grupa 10^{-5}	157 ± 17^a	$1,85 \pm 0,16^a$	$1,69 \pm 0,15^a$

Tab. 16. Liczba brodawek, masa pędów oraz masa korzeni koniczyny łąkowej traktowanej różnymi stężeniami preparatu czynników Nod szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4. Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p < 0,05$. Grupa kontrolna – nasiona nie zaprawiane preparatem czynników Nod. Grupa 10^{-2} , Grupa 10^{-3} , Grupa 10^{-4} , Grupa 10^{-5} – nasiona zaprawiane preparatem czynników Nod, odpowiednio w rozcieńczeniu 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5}

Zwiększenie ilości brodawek korzeniowych po zastosowaniu preparatu świadczy o tym, że preparat zawierający czynniki Nod *R. leguminosarum* TR4 wykazuje aktywność biologiczną. Zaprawienie nasion koniczyny łąkowej preparatem w rozcieńczeniu 10^{-2} pozwoliło na uzyskanie największej liczby brodawek korzeniowych, co prawdopodobnie pociągnęło za sobą wytworzenie większej masy pędu oraz korzenia w porównaniu do grupy kontrolnej (bez dodatku Nod). W przypadku pozostałych stężeń preparatu nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w porównaniu do grupy kontrolnej, dlatego w kolejnych eksperymentach stosowano rozcieńczenie 10^{-2} .

9. Wpływ jonów metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) na wzrost koniczyny łąkowej

Przed wykonaniem doświadczeń badających wpływ szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 i jego czynników Nod na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej przeprowadzono doświadczenie wazonowe mające na celu wybór takich stężeń jonów metali, które symulowałyby warunki panujące w zanieczyszczonych glebach, to jest niekorzystnie wpływałyby na wzrost roślin, lecz nie powodowały ich zamierania.

Rośliny hodowano w wazonach na podłożu piaskowo-perlitowym z dodatkiem określonego stężenia soli metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}). Grupę kontrolną stanowiły rośliny hodowane na takim samym podłożu, bez dodatku jonów metali. W celu określenia wpływu jonów metali ciężkich na wzrost roślin po upływie 6 tygodni zliczono liczbę brodawek korzeniowych, a także zważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin (Tab. 17, Tab. 18, Tab. 19).

Stężenie Zn^{2+}	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
0 mM (grupa kontrolna)	264 ± 20	2,36 ± 0,14	2,44 ± 0,24
5 mM	174 ± 10****	2,03 ± 0,16***	1,89 ± 0,10****
10 mM	157 ± 14****	1,91 ± 0,15****	1,81 ± 0,16****
20 mM	135 ± 9****	1,70 ± 0,08****	1,68 ± 0,13****

Tab. 17. Wpływ jonów Zn^{2+} na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Zastosowanie jonów Zn^{2+} w rosnących stężeniach spowodowało istotne zmniejszenie liczby brodawek korzeniowych (do 51%), masy pędów (do 72%) i masy korzeni (do 69%) przy 20 mM Zn^{2+} w podłożu.

Stężenie Cd^{2+}	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
0 μM (grupa kontrolna)	182 ± 17	2,66 ± 0,27	2,62 ± 0,31
100 μM	160 ± 13	2,58 ± 0,20	2,66 ± 0,22
250 μM	151 ± 10**	2,25 ± 0,21*	2,13 ± 0,25*
500 μM	140 ± 15****	1,96 ± 0,15****	1,96 ± 0,16****

Tab. 18. Wpływ jonów Cd^{2+} na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Kadm wywierał negatywny wpływ na wzrost koniczyny łąkowej przy znacznie niższych stężeniach niż cynk. Stężenie 100 μM nie wywierało negatywnego wpływu, natomiast zastosowanie stężenia 250 μM pozwoliło zaobserwować statystycznie istotny spadek wszystkich badanych parametrów w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stężenie Pb^{2+}	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
0 mM (grupa kontrolna)	44 ± 6	0,60 ± 0,04	0,69 ± 0,07
1 mM	40 ± 3	0,52 ± 0,05**	0,67 ± 0,03
2 mM	40 ± 3	0,53 ± 0,03*	0,68 ± 0,03
5 mM	39 ± 3	0,49 ± 0,02**	0,65 ± 0,04

Tab. 19. Wpływ jonów Pb^{2+} na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Zastosowanie jonów Pb^{2+} w rosnących stężeniach spowodowało istotne zmniejszenie masy pędów (do 82%) przy 5 mM Pb^{2+} w podłożu. Liczba brodawek oraz masa korzeni nie różniły się istotnie od grupy kontrolnej.

Badane w doświadczeniu stężenia jonów metali ciężkich hamowały wzrost koniczyny łąkowej (zmniejszenie masy pędów i korzeni oraz liczby brodawek korzeniowych), jednocześnie nie powodując jej obumierania. Najmniej toksycznym metalem był cynk, w którym najwyższe stężenie (20 mM) nie powodowało śmierci roślin, z kolei największą toksycznością charakteryzował się kadm – stężenie 500 μM wywołało istotne zmniejszenie liczby brodawek korzeniowych (do 77%), masy pędów (do 74%) i masy korzeni (do 75%).

10. Wpływ jonów metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) i szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej

Wpływ inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na wzrost koniczyny łąkowej badano w doświadczeniu wazonowym, w którym rośliny hodowano na podłożu piaskowo-perlitowym z dodatkiem różnych stężeń soli metali ciężkich. Jako grupę kontrolną zastosowano koniczynę łąkową rosnącą na takich samych podłożach ale bez dodatku bakterii symbiotycznych. Po upływie 6 tygodni zliczono brodawki korzeniowe, a także zważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin (Tab. 20, Tab.21, Tab. 22).

Stężenie jonów Zn^{2+}	Liczba brodawek/wazon		Masa pędów (g)/wazon		Masa korzeni (g)/wazon	
	Grupa N	Grupa R	Grupa N	Grupa R	Grupa N	Grupa R
0 mM	160 $\pm$ 16	228 $\pm$ 18****	2,26 $\pm$ 0,23	2,56 $\pm$ 0,09****	2,24 $\pm$ 0,20	3,23 $\pm$ 0,24****
5 mM	135 $\pm$ 5	230 $\pm$ 21****	1,99 $\pm$ 0,10	2,64 $\pm$ 0,21****	1,93 $\pm$ 0,12	2,91 $\pm$ 0,28****
10 mM	107 $\pm$ 13	155 $\pm$ 13****	1,11 $\pm$ 1,18	1,75 $\pm$ 1,18****	1,05 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,16****
20 mM	75 $\pm$ 9	92 $\pm$ 10*	0,76 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,06*	0,75 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,04****

Tab. 20. Wpływ jonów Zn^{2+} i *R. leguminosarum* TR4 na wzrost koniczyny łąkowej. Wartości oznaczone gwiazdkami (Grupa R) różnią się istotnie od grupy kontrolnej (Grupa N) przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Grupa N – rośliny nie zakażone *R. leguminosarum* TR4; Grupa R – rośliny zakażone *R. leguminosarum* TR4

Podobnie jak w poprzednim doświadczeniu (rozdział 9) stwierdzono, że dodatek jonów metali ciężkich wpływa negatywnie na wzrost roślin, jednak inokulacja szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4 spowodowała zwiększenie brodawkowania koniczyny łąkowej oraz zwiększenie średniej masy pędów i korzeni w porównaniu do grupy kontrolnej. Zastosowanie *Rhizobium leguminosarum* TR4 stymulowało wzrost koniczyny łąkowej nawet przy najwyższym stężeniu jonów Zn^{2+}

w podłożu (20 mM) – inokulacja ryzobiami powodowała wzrost liczby brodawek o 23%, zwiększenie masy pędów o 53% a masy korzeni o 41% w porównaniu do roślin niezakażonych (Tab. 20).

Stężenie jonów Cd^{2+}	Liczba brodawek/wazon		Masa pędów (g)/wazon		Masa korzeni (g)/wazon	
	Grupa N	Grupa R	Grupa N	Grupa R	Grupa N	Grupa R
0 μM	147 $\pm$ 9	200 $\pm$ 7****	2,04 $\pm$ 0,24	2,64 $\pm$ 0,23***	2,17 $\pm$ 0,25	3,30 $\pm$ 0,25****
100 μM	129 $\pm$ 11	204 $\pm$ 6****	1,90 $\pm$ 0,10	2,23 $\pm$ 0,08****	1,96 $\pm$ 0,23	2,78 $\pm$ 0,23****
250 μM	149 $\pm$ 11	209 $\pm$ 16****	1,80 $\pm$ 0,13	2,29 $\pm$ 0,19***	2,11 $\pm$ 0,21	2,80 $\pm$ 0,13****
500 μM	98 $\pm$ 7	167 $\pm$ 6****	1,24 $\pm$ 0,06	1,90 $\pm$ 0,12***	1,48 $\pm$ 0,21	2,09 $\pm$ 0,11****

Tab. 21. Wpływ jonów Cd^{2+} i *R. leguminosarum* TR4 na wzrost koniczyny łąkowej. Wartości oznaczone gwiazdkami (Grupa R) różnią się istotnie od grupy kontrolnej (Grupa N) przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Grupa N – rośliny nie zakażone *R. leguminosarum* TR4; Grupa R – rośliny zakażone *R. leguminosarum* TR4**

Obecność jonów kadmu wpływa negatywnie na wzrost roślin, jednak zaszczepienie podłoża hodowlą *Rhizobium leguminosarum* TR4 spowodowało zwiększenie liczby brodawek korzeniowych oraz zwiększenie średniej masy pędów i korzeni w porównaniu do grupy kontrolnej. Przy najwyższym stężeniu jonów kadmu w podłożu zaobserwowano zwiększenie liczby brodawek korzeniowych o 70%, masy pędów o 53% oraz masy korzeni o 41% w porównaniu do roślin nie zakażonych szczepem *R. leguminosarum* TR4 (Tab. 21).

Stężenie jonów Pb^{2+}	Liczba brodawek/wazon		Masa pędów (g)/wazon		Masa korzeni (g)/wazon	
	Grupa N	Grupa R	Grupa N	Grupa R	Grupa N	Grupa R
0 mM	57 $\pm$ 5	100 $\pm$ 11****	0,65 $\pm$ 0,06	0,91 $\pm$ 0,07****	0,78 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,08****
1 mM	41 $\pm$ 1	81 $\pm$ 9****	0,53 $\pm$ 0,03	0,74 $\pm$ 0,06****	0,64 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,07****
2 mM	44 $\pm$ 1	66 $\pm$ 4****	0,55 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,06**	0,65 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,08****
5 mM	30 $\pm$ 3	45 $\pm$ 3****	0,50 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,02**	0,62 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,07

Tab. 22. Wpływ jonów Pb^{2+} i *R. leguminosarum* TR4 na wzrost koniczyny łąkowej. Wartości oznaczone gwiazdkami (Grupa R) różnią się istotnie od grupy kontrolnej (Grupa N) przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$. Grupa N – rośliny nie zakażone *R. leguminosarum* TR4; Grupa R – rośliny zakażone *R. leguminosarum* TR4**

Podobnie jak we wcześniejszych doświadczeniach stwierdzono, że dodatek jonów ołowiu (Pb^{2+}) wywiera niekorzystny wpływ na wzrost koniczyny łąkowej. Inokulacja szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4 zazwyczaj powodowała zwiększenie brodawkowania oraz zwiększenie średniej masy pędów i korzeni w porównaniu do grupy kontrolnej. Jedynie w przypadku masy korzeni przy 5 mM

stężeniu jonów ołowiu nie zaobserwowano istotnej różnicy pomiędzy roślinami zakażonymi a nie zakażonymi. Przy stężeniu jonów ołowiu w podłożu równym 2mM zaobserwowano zwiększenie liczby brodawek korzeniowych o 50%, masy pędów o 22% oraz masy korzeni o 26% po inokulacji *R. leguminosarum* TR4 (Tab. 22).

Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 jest zdolny do nawiązania efektywnej symbiozy z koniczyną łąkową w obecności jonów metali ciężkich w podłożu, co skutkuje minimalizowaniem negatywnego wpływu metali ciężkich na rozwój koniczyny łąkowej.

11. Wpływ *Rhizobium leguminosarum* TR4 i jego czynników Nod na wzrost koniczyny łąkowej w obecności jonów metali ciężkich (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+})

Preparaty zawierające czynniki Nod wpływają korzystnie na wzrost roślin bobowatych (Maj D. i wsp., 2010; Podleśny J. i wsp., 2013). Ponadto w opisanych wcześniej doświadczeniach (Punkt 10) wykazano, że szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 stymuluje wzrost koniczyny łąkowej rosnącej na podłożach zawierających jony metali ciężkich. W innych eksperymentach wykazano, że szczep *R. leguminosarum* TR4 może produkować czynniki Nod zwiększające brodawkowanie koniczyny (Punkt 8), dlatego przeprowadzono doświadczenia mające na celu określenie czy zastosowanie preparatu Nod produkowanego w hodowli *R. leguminosarum* TR4 dodatkowo zwiększy efekt działania badanego szczepu.

Wykonano trzy doświadczenia – we wszystkich zastosowano podłoża zawierające jony Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} . W każdym doświadczeniu rośliny podzielono na cztery grupy:

1. grupę kontrolną - bez inokulacji szczepem TR4 i bez stosowania czynników Nod (grupa K);
2. grupę roślin inokulowanych szczepem TR4 (grupa TR4);
3. grupę roślin, których nasiona zaprawiano preparatem czynników Nod (grupa Nod);
4. grupę roślin, których nasiona zaprawiano preparatem czynników Nod oraz inokulowanych szczepem TR4 (grupa TR4 + Nod).

Po upływie 6 tygodni zliczono liczbę brodawek korzeniowych, a także zważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin. Wyniki doświadczenia z roślinami hodowanymi na podłożach zanieczyszczonych jonami Zn^{2+} przedstawiono w Tab. 23, Tab. 24, Tab. 25 i Tab. 26.

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	159 ± 12	1,91 ± 0,14	1,93 ± 0,16
TR4	259 ± 18****	2,62 ± 0,16****	2,73 ± 0,28****
Nod	225 ± 17***	2,39 ± 0,20*	2,46 ± 0,27*
TR4 + Nod	327 ± 36****	2,90 ± 0,36****	3,15 ± 0,38****

Tab. 23. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy braku Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	121 ± 9	1,29 ± 0,14	1,24 ± 0,16
TR4	201 ± 28****	1,84 ± 0,09****	1,70 ± 0,16*
Nod	153 ± 6	1,75 ± 0,06***	1,50 ± 0,25
TR4 + Nod	266 ± 23****	2,33 ± 0,24****	2,16 ± 0,24****

Tab. 24. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 5 mM Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	64 ± 12	0,63 ± 0,08	0,54 ± 0,03
TR4	114 ± 18****	1,16 ± 0,09****	1,02 ± 0,11****
Nod	72 ± 8	0,74 ± 0,04	0,59 ± 0,08
TR4 + Nod	158 ± 7****	1,44 ± 0,14****	1,30 ± 0,12****

Tab. 25. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 10 mM Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	45 ± 3	0,44 ± 0,04	0,35 ± 0,02
TR4	70 ± 7****	0,65 ± 0,06****	0,53 ± 0,05****
Nod	49 ± 9	0,53 ± 0,06	0,43 ± 0,05*
TR4 + Nod	77 ± 7****	0,66 ± 0,07****	0,60 ± 0,06****

Tab. 26. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 20 mM Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Niezależnie od zastosowanego stężenia jonów Zn^{2+} obserwowano istotny wzrost liczby brodawek, masy pędów oraz masy korzeni po inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4. Dodatkowo zastosowanie preparatu czynników Nod (w połączeniu z inokulacją szczepem *R. leguminosarum* TR4) powodowało zwiększenie liczby brodawek o 39% (10 mM Zn^{2+}), masy pędów o 27% (5 mM Zn^{2+}) oraz masy korzeni o 27% (5 i 10 mM Zn^{2+}) w porównaniu do roślin inokulowanych *R. leguminosarum* TR4.

Zastosowanie samych czynników Nod nieznacznie zwiększało liczbę brodawek, masę pędów oraz masę korzeni (odpowiednio o 12, 17 i 9% przy stężeniu 10 mM Zn^{2+} , w porównaniu do grupy kontrolnej) jednak efekt był znacznie słabszy niż w przypadku zastosowania szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 bez dodatku czynników Nod.

Po zważeniu świeżej masy pędów i korzeni rośliny wysuszono, zmielono, po czym oznaczono procentową zawartość azotu w suchej masie (Tab. 27).

Stężenie Zn^{2+}	Grupa	Sucha masa (g)	Zawartość azotu (%)
0 mM	K	1,72	2,12
	TR4	2,36	2,21
	Nod	2,15	2,34
	TR4 + Nod	2,60	2,22
5 mM	K	1,16	2,20
	TR4	1,67	2,33
	Nod	1,58	2,18
	TR4 + Nod	2,10	2,30
10 mM	K	0,57	2,09
	TR4	1,05	2,02
	Nod	0,66	2,09
	TR4 + Nod	1,29	1,98
20 mM	K	0,39	1,98
	TR4	0,41	2,11
	Nod	0,48	1,90
	TR4 + Nod	0,59	2,01

Tab. 27. Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych *R. leguminosarum* TR4

Największą suchą masę obserwowano u roślin traktowanych preparatem czynników Nod oraz inokulowanych *Rhizobium leguminosarum* TR4, natomiast procentowa zawartość azotu w suchej masie była porównywalna pomiędzy grupami, niezależnie od stężenia jonów cynku w podłożu oraz obecności szczepu *R. leguminosarum* TR4 i/lub zastosowaniu preparatu czynników Nod.

Wyniki doświadczenia z roślinami hodowanymi na podłożach zanieczyszczonych jonami Cd^{2+} przedstawiono w Tab. 28, Tab. 29, Tab. 30 oraz Tab. 31.

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	216 ± 10	2,47 ± 0,13	2,35 ± 0,17
TR4	304 ± 22****	3,07 ± 0,17*	3,33 ± 0,25****
Nod	250 ± 18	2,90 ± 0,43	2,80 ± 0,30
TR4 + Nod	357 ± 30****	3,49 ± 0,36****	3,17 ± 0,35****

Tab. 28. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy braku Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	175 ± 8	2,07 ± 0,14	1,90 ± 0,18
TR4	255 ± 34****	2,70 ± 0,35***	2,34 ± 0,20*
Nod	240 ± 15***	2,52 ± 0,71*	2,32 ± 0,22*
TR4 + Nod	347 ± 26****	3,36 ± 0,17****	3,27 ± 0,32****

Tab. 29. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 100 μM Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	144 ± 15	1,76 ± 0,20	1,61 ± 0,16
TR4	200 ± 13***	2,17 ± 0,06*	2,13 ± 0,09*
Nod	194 ± 21***	2,17 ± 0,19*	2,07 ± 0,27*
TR4 + Nod	260 ± 26****	2,61 ± 0,27****	2,46 ± 0,32****

Tab. 30. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 250 μM Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	103 ± 4	1,12 ± 0,04	0,98 ± 0,12
TR4	126 ± 12*	1,51 ± 0,16***	1,48 ± 0,16****
Nod	113 ± 8	1,24 ± 0,09	1,12 ± 0,07
TR4 + Nod	169 ± 16****	1,74 ± 0,19****	1,47 ± 0,20****

Tab. 31. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 500 μM Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Przy każdym z badanych stężeń jonów Cd^{2+} obserwowano istotny wzrost liczby brodawek, masy pędów oraz masy korzeni po inokulacji szczepem *Rhizobium*

leguminosarum TR4. Ponadto zastosowanie preparatu czynników Nod razem z produkującym go szczepem powodowało zwiększenie liczby brodawek o 36% ($100 \mu\text{M Cd}^{2+}$), masy pędów o 24% ($100 \mu\text{M Cd}^{2+}$) oraz masy korzeni o 40% ($100 \mu\text{M Cd}^{2+}$) w porównaniu do grupy TR4.

Zastosowanie samych czynników Nod (bez *Rhizobium leguminosarum* TR4) powodowało zwiększenie liczby brodawek, masy pędów oraz masy korzeni (odpowiednio o 35, 23 i 29%) przy stężeniu $250 \mu\text{M Cd}^{2+}$, w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak efekt był znacznie słabszy niż w przypadku zastosowania szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 bez dodatku czynników Nod. W grupie roślin hodowanych na podłożu bez jonów Cd^{2+} oraz przy ich najwyższym stężeniu ($500 \mu\text{M}$) nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy roślinami grupy kontrolnej, a roślinami, których nasiona potraktowano preparatem zawierającym czynniki Nod.

Po zważeniu świeżej masy pędów i korzeni rośliny wysuszono, zmielono, po czym oznaczono procentową zawartość azotu w suchej masie (Tab. 32).

Stężenie Cd^{2+}	Grupa	Sucha masa (g)	Zawartość azotu (%)
0 mM	K	2,23	1,99
	TR4	2,77	2,16
	Nod	2,61	2,15
	TR4 + Nod	3,14	2,18
100 μM	K	1,86	2,07
	TR4	2,42	2,14
	Nod	2,27	2,01
	TR4 + Nod	3,02	2,02
250 μM	K	1,58	1,75
	TR4	1,96	1,99
	Nod	1,95	1,95
	TR4 + Nod	2,35	1,89
500 μM	K	1,01	1,70
	TR4	1,35	1,82
	Nod	1,11	1,70
	TR4 + Nod	1,57	1,78

Tab. 32. Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych *R. leguminosarum* TR4

Sucha masa była najwyższa u roślin traktowanych preparatem czynników Nod oraz inokulowanych *Rhizobium leguminosarum* TR4, natomiast procentowa zawartość azotu w suchej masie była zawsze niższa niż 2% u roślin rosnących na glebie zawierającej 250 lub 500 μM kadmu.

Wyniki doświadczenia z roślinami hodowanymi na podłożach zanieczyszczonych jonami Zn^{2+} przedstawiono w Tab. 33, Tab. 34, Tab. 35 oraz Tab. 36.

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	63 ± 11	0,58 ± 0,03	0,77 ± 0,05
TR4	100 ± 8****	0,88 ± 0,09****	1,29 ± 0,15****
Nod	61 ± 8	0,60 ± 0,07	0,82 ± 0,04
TR4 + Nod	90 ± 4****	0,84 ± 0,06****	1,00 ± 0,08****

Tab. 33. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy braku Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	55 ± 2	0,53 ± 0,03	0,60 ± 0,06
TR4	90 ± 6****	0,75 ± 0,05****	0,97 ± 0,08****
Nod	57 ± 4	0,65 ± 0,05**	0,8 ± 0,05**
TR4 + Nod	93 ± 7****	0,73 ± 0,09***	0,98 ± 0,15****

Tab. 34. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 1 mM Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	50 ± 4	0,52 ± 0,07	0,80 ± 0,09
TR4	73 ± 7****	0,76 ± 0,05****	1,01 ± 0,07****
Nod	51 ± 3	0,54 ± 0,03	0,80 ± 0,06
TR4 + Nod	72 ± 7****	0,70 ± 0,08****	0,97 ± 0,07****

Tab. 35. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 2 mM Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	43 ± 1	0,50 ± 0,03	0,67 ± 0,02
TR4	74 ± 5****	0,68 ± 0,04***	0,96 ± 0,07**
Nod	46 ± 5	0,52 ± 0,05	0,73 ± 0,08
TR4 + Nod	73 ± 8****	0,68 ± 0,07****	0,84 ± 0,1**

Tab. 36. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 5 mM Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,005$; **** $p < 0,001$**

Przy wszystkich zastosowanych poziomach skażenia jonami Pb^{2+} po inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4 obserwowano istotny wzrost

liczby brodawek, masy pędów oraz masy korzeni w stosunku do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowano zwiększenie liczby brodawek o 69% (1 mM Pb²⁺), masy pędów o 38% (1 mM Pb²⁺) oraz masy korzeni o 63% (1 mM Pb²⁺) po użyciu preparatu czynników Nod wspólnie z wyselekcjonowanym szczepem, w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano jedynie nieznaczne różnice między grupami TR4 i TR4 + Nod w przypadku badanych parametrów.

Zastosowanie preparatu czynników Nod bez inokulacji *Rhizobium leguminosarum* TR4 powodowało zwiększenie liczby brodawek, masy pędów oraz masy korzeni (odpowiednio o 4, 23 i 33% przy stężeniu 1 mM Pb²⁺, w porównaniu do grupy kontrolnej) jednak efekt był znacznie słabszy niż w przypadku zastosowania szczepu *R. leguminosarum* TR4 bez dodatku czynników Nod.

Po zważeniu świeżej masy pędów i korzeni rośliny wysuszono, zmielono, po czym oznaczono procentową zawartość azotu w suchej masie (Tab. 37).

Stężenie Pb ²⁺	Grupa	Sucha masa (g)	Zawartość azotu (%)
0 mM	K	0,53	1,71
	TR4	0,79	1,77
	Nod	0,53	1,71
	TR4 + Nod	0,76	1,80
1 mM	K	0,47	1,63
	TR4	0,67	1,74
	Nod	0,58	1,77
	TR4 + Nod	0,65	1,75
2 mM	K	0,47	2,63
	TR4	0,69	4,72
	Nod	0,49	6,13
	TR4 + Nod	0,63	6,51
5 mM	K	0,45	3,38
	TR4	0,61	3,52
	Nod	0,47	7,52
	TR4 + Nod	0,61	8,35

Tab. 37. Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych *R. leguminosarum* TR4

Najwyższą zawartość suchej masy zaobserwowano u roślin traktowanych preparatem czynników Nod oraz inokulowanych *Rhizobium leguminosarum* TR4. Przy stężeniu 5 mM Pb²⁺ sucha masa zwiększyła się o 36% w porównaniu do grupy kontrolnej oraz o 30% w porównaniu do grupy roślin zaprawianych preparatem czynników Nod *R. leguminosarum* TR4 bez inokulacji szczepem.

12. Wpływ preparatu czynników Nod szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy jednoczesnej obecności jonów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+}

W środowisku naturalnym jony metali ciężkich często występują razem, wspólnie zanieczyszczając określone środowiska (Karczewska A. i wsp., 2006; Kaszubkiewicz J. i Kawałko D., 2009), dlatego w kolejnym doświadczeniu sprawdzono wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji szczepem *Rhizobium* TR4 na brodawkowanie i rozwój koniczyny łąkowej przy jednoczesnej obecności jonów Zn^{2+} (10 mM), Cd^{2+} (250 μM) i Pb^{2+} (2 mM). Po upływie 6 tygodni zliczono brodawki korzeniowe, a także zważono świeżą masę pędów oraz korzeni roślin (Tab. 38).

Grupa	Liczba brodawek/wazon	Masa pędów (g)/wazon	Masa korzeni (g)/wazon
K	46 ± 4	0,35 ± 0,01	0,55 ± 0,03
TR4	74 ± 4 ^{****}	0,52 ± 0,02 ^{****}	0,86 ± 0,03 ^{****}
Nod	46 ± 2	0,40 ± 0,02 ^{****}	0,79 ± 0,02 ^{****}
+TR4 + Nod	116 ± 5 ^{****}	0,75 ± 0,01 ^{****}	1,00 ± 0,03 ^{****}

Tab. 38. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji *R. leguminosarum* TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej w obecności mieszaniny jonów metali ciężkich w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$

Po inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby brodawek, masy pędów oraz masy korzeni w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto zaobserwowano zwiększenie liczby brodawek o 57%, masy pędów o 65% oraz masy korzeni o 16% po użyciu preparatu czynników Nod wspólnie z wyselekcjonowanym szczepem w porównaniu do grupy TR4.

Zastosowanie samych czynników Nod spowodowało zwiększenie masy pędów oraz masy korzeni (odpowiednio o 14 i 44%) w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak efekt był znacznie słabszy niż w przypadku zastosowania szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 bez dodatku czynników Nod.

Po zważeniu świeżej masy pędów i korzeni rośliny wysuszono, zmielono, po czym oznaczono procentową zawartość azotu w suchej masie (Tab. 39).

Grupa	Sucha masa (g)	Zawartość azotu (%)
K	3,82	1,63
TR4	5,61	1,78
Nod	4,31	1,62
TR4 + Nod	8,12	2,2

Tab. 39. Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych *R. leguminosarum* TR4

Zastosowanie każdego sposobu wspomagania wzrostu roślin (traktowanie preparatem czynników Nod, inokulacja szczepem *R. leguminosarum* TR4 oraz połączenie obu sposobów) powodowało zwiększenie suchej masy roślin. Najlepszy efekt miało połączenie inokulacji oraz podania preparatu czynników Nod, ponieważ sucha masa roślin w tej grupie była ponad dwukrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Procentowa zawartość azotu w suchej masie roślin była wyższa o 35% w grupie TR4 + Nod oraz o 9% w grupie TR4 w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast nie zaobserwowano wpływu preparatu czynników Nod na zawartość azotu w grupie Nod

V. Dyskusja

Skażenie gleby metalami ciężkimi stanowi poważny problem w wielu uprzemysłowionych krajach na świecie i dotyczy głównie terenów silnie zurbanizowanych. Spośród wszystkich metali ciężkich za najbardziej niebezpieczne uważane są Cd, Cu, Pb, Hg, Ni i Zn, ponieważ pierwiastki te należą do zanieczyszczeń środowiska zagrażających mikroorganizmom glebowym, roślinom i człowiekowi (Mulligan C.N. i wsp., 2001; Gomez-Sagasti M.T. i wsp., 2012). Metale ciężkie zgromadzone w nadmiernych ilościach w glebie, powodują niekorzystne zmiany w składzie ilościowym i jakościowym mikroflory glebowej, powodując eliminowanie gatunków szczególnie wrażliwych, takich jak: bakterie nityfikacyjne oraz symbiotyczne bakterie wiążące azot (Przybulewska K. i wsp., 2003; Wyszowska J. i Kucharski J., 2003). Drobnoustroje posiadają zdolność przystosowania się do niesprzyjających warunków środowiska dzięki mechanizmom, takim jak: specyficzny transport jonów metali przy udziale permeaz zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej, synteza i wydzielanie do środowiska związków chelatujących wiążących i transportujących jony rozpuszczalne w środowisku oraz niespecyficzna akumulacja metali poprzez sorpcję jonów w obrębie śluzów powierzchniowych (Binet M.R.B. i wsp., 2003; Ledin M., 2000; Paul A. i wsp., 2007), dlatego niektóre z nich mogą się przystosować do obecności jonów metali ciężkich i zasiedlać zanieczyszczone środowiska.

Hałda w Bolesławiu skażona jonami Zn^{2+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} uległa naturalnej sukcesji pierwotnej i obecnie pokrywa ją roślinność galmanowa, czyli niskie murawy złożone z gatunków roślin znoszących wysokie stężenie metali ciężkich w glebie (Szarek-Łukaszewska G. i Niklińska N., 2002). Hałdę porastają rośliny bobowate takie jak: koniczyna łąkowa (*Trifolium pratense*), koniczyna biała (*T. repens*), koniczyna drobnogłówkowa (*T. dubium*), przelot zwyczajny (*Anthyllis vulneraria*) oraz komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*), dlatego można było założyć, że w glebie obecne są ich mikrosymbionty. Przypuszczenie to okazało się słuszne, ponieważ na korzeniach roślin pobranych z hałdy znaleziono brodawki korzeniowe, co umożliwiło izolację kolekcji szczepów pochodzących ze wspomnianych brodawek. Obecność jonów metali ciężkich w glebie może niekorzystnie wpływać na zróżnicowanie populacji mikroorganizmów glebowych (Stan V. i wsp., 2011), dlatego przeprowadzono analizę PCR-RFLP genów 16S rRNA oraz *nodA* badanych

szczepów. Pomimo presji wynikającej z obecności metali ciężkich zaobserwowano duże zróżnicowanie badanej kolekcji izolatów – w grupie 38 szczepów, dla których uzyskano produkt reakcji PCR obu genów zidentyfikowano aż 19 różniących się od siebie genotypów. Najwięcej szczepów zaklasyfikowano do genotypu 3 oraz do genotypu 2 - odpowiednio 18% i 13% wszystkich szczepów, natomiast większość genotypów (genotypy: 1, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18 oraz 19) było reprezentowanych przez pojedyncze szczepy. Duże zróżnicowanie genetyczne wyizolowanych szczepów potwierdzono także za pomocą analizy AFLP. Dla części badanych szczepów (38%) nie uzyskano produktu reakcji PCR dla genu *nodA*. Może to świadczyć o niskiej liczebności populacji ryzobiów oraz braku konkurencji – brodawki korzeniowe są zajmowane również przez szczepy niewiążące azotu atmosferycznego, takie jak *Agrobacterium* sp., które mogą zasiedlać dojrzałe brodawki indukowane przez symbiotycznie efektywne ryzobia (Mhamdi R. i wsp., 2005; Mrabet M. i wsp., 2006).

Wiek hałdy odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu jest szacowany na ok. 70 – 100 lat, dzięki czemu mikroorganizmy zasiedlające glebę prawdopodobnie wykształciły mechanizmy odporności na jony metali ciężkich, dlatego są w stanie funkcjonować w środowisku zawierającym ok. 40 000 mg Zn/kg gleby, 3000 mg Pb/kg gleby, 170 mg Cd/kg gleby. Są to wartości wielokrotnie wyższe od poziomu spotykanego w większości gleb: Zn 100 – 3000 mg/kg, Pb 50 – 1000 mg/kg, Cd 1 – 20 mg/kg (Grodzińska K. i Szarek-Łukaszewska G, 2002). Wynikiem presji selekcyjnej ze strony wysokich stężeń jonów metali ciężkich jest prawdopodobnie podwyższenie maksymalnej tolerancji na obecność tych jonów u wszystkich badanych szczepów, w porównaniu do szczepów laboratoryjnych. W przypadku wzrostu na podłożu stałym wzbogaconym odpowiednimi stężeniami jonów metali ciężkich szczepy z hałdy tolerują ok. 10 razy wyższe stężenia jonów Pb^{2+} , ok. 100 razy wyższe stężenia Zn^{2+} oraz ok. 1000 razy wyższe stężenia Cd^{2+} niż szczepy laboratoryjne. Wprawdzie wyniki otrzymane za pomocą każdej z trzech zastosowanych metod w nieco inny sposób szeregowały badane szczepy pod względem oporności na jony metali ciężkich, jak również stężenia uznawane za maksymalne były różne (np.: dla szczepu LO2 stężenie jonów Zn^{2+} hamujące wzrost na podłożu stałym wynosiło 33 mM, natomiast w hodowli płynnej to stężenie wynosiło 33 μ M), jednak można zaobserwować również wiele prawidłowości - np.: szczepy TR1 i TR4 charakteryzują się wysoką tolerancją na obecność jonów Pb^{2+} ,

a szczepy Pt1 oraz Pt3B niską opornością na jony metali ciężkich w każdej z wykorzystywanych metod.

Symbioza między ryzobiami a roślinami bobowatymi jest specyficzna gatunkowo, co oznacza, że określone gatunki bakterii nawiązują symbiozę z jednym, konkretnym gatunkiem lub rodzajem roślin bobowatych np.: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną (*Trifolium* sp.) a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z fasolą (*Phaseolus* sp.) (Wang D. i wsp., 2012), dlatego w celu scharakteryzowania wybranych szczepów przeprowadzono analizy genetyczne oraz badanie zakresu gospodarza.

Analiza podobieństwa sekwencji wybranych genów dawała różne wyniki, w zależności od tego, jakiego genu dotyczyła np.: dendrogram uzyskany dla fragmentu genu *gyrB* wskazuje na duże podobieństwo wszystkich badanych szczepów, podczas gdy dendrogramy stworzone dla fragmentów genów *atpD* lub *dnaK* sugerują istnienie dużych różnic pomiędzy badanymi szczepami. Poszczególne geny mogą ewoluować w różnym tempie akumulując mniejszą lub większą liczbę mutacji, a analiza typu MLSA pozwala na „uśrednienie” takich rozbieżnych wyników. Dendrogram wykonany po analizie MLSA sugeruje, że szczepy wyizolowane z brodawek różnych gatunków koniczyny (TR1, TR2, TR3, TR4) wykazują największe pokrewieństwo do *Rhizobium leguminosarum*, natomiast szczepy izolowane z komonicy zwyczajnej (LO1 oraz LO2) wykazują pokrewieństwo odpowiednio do *Agrobacterium tumefaciens* oraz *Agrobacterium rhizogenes*. Podobne rezultaty uzyskano za pomocą testów metabolicznych BIOLOG - wyniki grupowania MLSA pokrywają się z wynikami grupowania metodą BIOLOG, co jest zgodne z danymi przedstawionymi w literaturze, z których wynika, że pomimo różnic fizjologicznych rodzaje *Rhizobium* i *Agrobacterium* są ze sobą powiązane filogenetycznie (Willems A. i Collins M.D., 1993). Na podstawie otrzymanych wyników można zauważyć, że szczepy TR1, TR2 oraz TR4 charakteryzują się wąskim zakresem gospodarza roślinnego (tzn. wysoką specyficznością nawiązywanej symbiozy), wobec tego można przypuszczać, że należą do gatunku *Rhizobium leguminosarum*. W przypadku ryzobiów pozyskanych z komonicy (LO1, LO2) obserwowano powstawanie pojedynczych brodawek na korzeniach komonicy oraz koniczyny łąkowej i koniczyny białej. Szerszy niż w przypadku szczepów izolowanych z brodawek koniczyny zakres gospodarza roślinnego oraz mała liczba brodawek korzeniowych powstających na korzeniach

niektórych roślin mogą sugerować przynależność szczepów LO1 i LO2 do rodzaju *Agrobacterium* (Murugesan S. i wsp., 2010; Matthysse A.G., 2006).

Jednym ze sposobów stymulacji wzrostu roślin bobowatych jest zwiększenie liczby mikroorganizmów obecnych w glebie, specyficznych dla danego gatunku roślin. Bakterie takie są stosowane w postaci szczepionek do zaprawiania nasion lub w postaci szczepionek doglebowych (Martyniuk S., 2010; Pytlarz-Kozicka M., 2010). Zabieg ten przynosi dobre efekty zwłaszcza w warunkach braku lub niedoboru bakterii autochtonicznych w glebie (Martyniuk S. i wsp., 2008), więc powinien być stosowany także na hałdach i terenach górniczych, dlatego celem pracy było wyselekcjonowanie szczepu ryzobium o wysokiej oporności na obecność jonów metali ciężkich w podłożu oraz nawiązującego efektywną symbiozę z roślinami bobowatymi. Spośród badanych szczepów najlepszą tolerancją na metale ciężkie oraz najbardziej efektywnymi interakcjami symbiotycznymi z koniczyną łąkową i białą w warunkach laboratoryjnych charakteryzował się szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4. W warunkach imitujących środowisko zanieczyszczonych hałd (podłoże piaskowo-perlitowe, z dodatkiem różnych stężeń soli metali ciężkich), inokulacja roślin szczepem *R. leguminosarum* TR4 powodowała zwiększenie brodawkowania koniczyny łąkowej oraz zwiększenie średniej masy pędu i korzenia w porównaniu do grupy kontrolnej, nawet w obecności najwyższych stężeń badanych metali ciężkich (Tab. 40).

Stężenie jonów metalu w podłożu	Wzrost (w stosunku do roślin niezakażonych)		
	liczby brodawek (%)	masy pędów (%)	masy korzeni (%)
Zn ²⁺ 20 mM	55	47	23
Cd ²⁺ 500 µM	22	35	51
Pb ²⁺ 5 mM	72	36	43

Tab. 40. Wzrost liczby brodawek korzeniowych, masy pędów i masy korzeni (%) u koniczyny łąkowej inokulowanej szczepem *R. leguminosarum* TR4 w obecności najwyższych stężeń jonów metali ciężkich, w porównaniu do grupy kontrolnej

W doświadczeniu dotyczącym jednoczesnego wpływu wszystkich badanych jonów (Zn²⁺, Cd²⁺ i Pb²⁺) na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej po inokulacji szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4 zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby brodawek (o 61%), masy pędu (o 49%) oraz masy korzeni (o 56%) w porównaniu do grupy kontrolnej, co świadczy o potencjalnej

wartości szczepu *R. leguminosarum* TR4 w warunkach skażenia jonami metali ciężkich.

Dotychczas opatentowano kilka szczepów ryzobiowych przeznaczonych do produkcji bionawozów i/lub biopreparatów np.: *Rhizobium meliloti* (Kowalski M. i in., PL19970320834) przeznaczony do stosowania w uprawie lucerny lub *Rhizobium leguminosarum* Z25 (Rodales G.B. i Gonzales L.P., ES2099679) stosowany w uprawie wyki, jednak nie są to szczepy przeznaczone do stosowania w zanieczyszczonych glebach, na których prawdopodobnie lepsze efekty można by osiągnąć za pomocą szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4.

Korzystny wpływ ryzobiów na wzrost roślin bobowatych można zwiększyć dzięki zastosowaniu substancji produkowanych przez bakterie na etapie wymiany sygnałów między partnerami symbiotycznymi (Jones K.M. i wsp., 2007). Do związków tego typu należą bakteryjne czynniki Nod (lipochitooligosacharydy) indukujące powstawanie brodawek na korzeniach roślin bobowatych. W roztworze glebowym czynniki Nod mogą ulegać dyfuzji oraz degradowaniu przez enzymy organizmów glebowych, co wydatnie zmniejsza ich stężenie oraz może osłabiać interakcje symbiotyczne (Ovtsyna A.O. i wsp., 2000). Zastosowanie czynników Nod do zaprawiania nasion może temu przeciwdziałać i zwiększyć liczbę powstających brodawek korzeniowych, a przez to poprawić wzrost roślin. Korzystne działanie preparatów z czynnikami Nod zostało zaobserwowane w uprawie grochu siewnego (Podleśny J. i wsp., 2013), koniczyny łąkowej (Maj D. i wsp., 2009) oraz soi (Almaraz i wsp., 2011). W przeprowadzonych doświadczeniach stwierdzono, że także w warunkach skażenia metalami ciężkimi zaprawienie nasion koniczyny łąkowej preparatem Nod pozwoliło na wytworzenie liczby brodawek korzeniowych większej o 42%, co przełożyło się na wzrost masy pędu o 32% i masy korzenia o 35% w porównaniu do grupy kontrolnej, w której nasiona nie były zaprawiane preparatem.

Nawet przy zanieczyszczeniu podłoża trzema różnymi jonami metali ciężkich zastosowanie biopreparatu zawierającego czynniki Nod w połączeniu z inokulacją szczepem *Rhizobium leguminosarum* TR4 powodowało zwiększenie liczby brodawek o 57%, masy pędu o 65% oraz masy korzenia o 16% w porównaniu do grupy inokulowanej jedynie szczepem *R. leguminosarum* TR4. Połączenie inokulacji oraz traktowania nasion preparatem czynników Nod miały korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin, ponieważ sucha masa roślin w tej grupie była

ponad dwukrotnie wyższa niż w grupie kontrolnej a procentowa zawartość azotu w suchej masie roślin wyższa o 35%.

Przedstawione badania miały na celu opracowanie metody zwiększenia efektywności symbiozy nawiązywanej między ryzobiami a roślinami bobowatymi poprzez wykorzystanie i modyfikację naturalnych systemów biotechnologicznych. Omawiany w pracy układ symbiotyczny *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* - koniczyna łąkowa może funkcjonować na terenach zdegradowanych i zanieczyszczonych metalami ciężkimi, a zwiększenie jego wydajności po zastosowaniu wyselekcjonowanego szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 oraz biopreparatu zawierającego czynniki Nod może sprzyjać zwiększaniu efektywności rekultywacji obszarów zdegradowanych (szybsze wzbogacanie gleby w materię organiczną oraz dokładniejsze jej zadarnianie). Skutkiem stosowania naturalnych układów symbiotycznych może być również spadek ilości zużywanych syntetycznych nawozów azotowych, co wpływa korzystnie na zachowanie równowagi biologicznej gleb oraz ograniczenie zanieczyszczenia środowiska. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można zaproponować szczep *R. leguminosarum* TR4 i jego metabolity jako biopreparat przeznaczony do wspomagania wzrostu koniczyny używanej w technikach rekultywacyjnych terenów skażonych jonami kadmu, cynku i ołowiu.

VI. Streszczenie

Symbioza roślin bobowatych (*Fabaceae*) z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny (ryzobiami) zapewnia roślinom obfite źródło azotu, co sprawia, że ich uprawa może być niezależna od nawozów syntetycznych. Rośliny bobowate nie tylko wzbogacają glebę w związki azotowe, lecz także wpływają korzystnie na strukturę i właściwości fitosanitarne gleby, dzięki czemu niektóre ich gatunki znajdują zastosowanie w procesach rekultywacyjnych. Na terenach zdegradowanych wskutek działalności przemysłowej lub wydobywczej często dochodzi do akumulacji jonów metali ciężkich w glebie, co pociąga za sobą negatywne zmiany w składzie ilościowym i jakościowym mikroflory glebowej. Zubożenie lub spadek aktywności mikroflory glebowej zmniejsza skuteczność zabiegów rekultywacyjnych prowadzonych z udziałem roślin, co ma szczególne znaczenie w przypadku roślin bobowatych, w dużym stopniu uzależnionych od symbiozy z ryzobiami. Rozwiązaniem problemu może być używanie technik rekultywacyjnych wykorzystujących rośliny oraz kultury mikroorganizmów wspomagające wzrost roślin, charakteryzujące się podwyższonym poziomem odporności na działanie jonów metali ciężkich. W przypadku roślin bobowatych i ryzobiów uzasadnione jest także stosowanie dodatkowych stymulatorów procesów symbiotycznych, takich jak czynniki Nod, dzięki którym rośliny tworzą większą liczbę brodawek korzeniowych i mogą być zasiedlone przez większą liczbę symbiotycznych bakterii odpowiedzialnych za dostarczanie związków azotowych.

Celem pracy było stworzenie kolekcji szczepów ryzobiowych pochodzących z terenów skażonych jonami kadmu, cynku i ołowiu i wyselekcjonowanie szczepu, który byłby zdolny do efektywnego wspomagania wzrostu roślinnego gospodarza w warunkach skażenia jonami Zn^{2+} , Cd^{2+} i/lub Pb^{2+} .

Stworzono kolekcję zawierającą 62 szczepy bakterii izolowanych z brodawek roślin bobowatych (koniczyna, komonica, przelot) zasiedlających hałdę odpadów cynkowo-ołowiowych w Bolesławiu. Stosując techniki PCR-RFLP i AFLP wykazano duży stopień zróżnicowania genetycznego kolekcji. Badanie poziomu tolerancji szczepów na jony Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} wykonane trzema metodami (testy płytkowe, hodowlane, mikroskopowe) pozwoliło na wyselekcjonowanie 6 szczepów charakteryzujących się najwyższą opornością na badane jony metali ciężkich. Badania genetyczne z wykorzystaniem sekwencjonowania fragmentów 7 genów

metabolizmu podstawowego wykonane dla wybranych szczepów izolowanych z tkanek różnych roślinnych gospodarzy pozwoliły na zaklasyfikowanie tych szczepów jako *Rhizobium leguminosarum* lub *Agrobacterium* sp., a wyniki testów fizjologicznych (testy BIOLOG) były zgodne z wynikami badań genetycznych.

Na podstawie wyników testów laboratoryjnych badających wpływ wybranych szczepów na parametry symbiotyczne (liczba brodawek, masa roślin) wybrano szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 jako model do dalszych badań – był to szczep wykazujący wielokrotnie wyższą tolerancję na jony Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} niż szczepy laboratoryjne, zdolny do efektywnego brodawkowania koniczyny białej i czerwonej skutkującego istotnym zwiększeniem masy zakażonych roślin. Z hodowli szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 wyizolowano preparat zawierający czynniki Nod, a następnie w testach z użyciem roślin określono efektywną dawkę tego biopreparatu, powodującą istotne zwiększenie liczby brodawek na korzeniach traktowanych roślin.

Efekt działania szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 i pochodzącego z niego biopreparatu zbadano w doświadczeniach wazonowych w których zastosowano podłoża skażone różnymi stężeniami Zn^{2+} , Cd^{2+} i/lub Pb^{2+} . Wykazano, że zastosowanie *Rhizobium leguminosarum* TR4 lub *Rhizobium leguminosarum* TR4 i pochodzącego z niego biopreparatu zawierającego czynniki Nod istotnie zwiększa liczbę brodawek oraz świeżą masę korzeni i pędów inokulowanych roślin przy różnych stężeniach Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} , oraz w przypadku zastosowania mieszanego skażenia podłoża za pomocą Zn^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} łącznie. Najlepszy efekt dotyczący brodawkowania i wzrostu roślinnego gospodarza obserwowano po inokulacji roślin szczepem i biopreparatem zawierającym czynniki Nod, zarówno w przypadku zastosowania skażenia podłoża jednym jak i trzema różnymi jonami metali ciężkich.

Zastosowanie szczepu *Rhizobium leguminosarum* TR4 i jego czynników Nod umożliwiło wydatne zmniejszenie niekorzystnego efektu wywieranego na wzrost roślin przez jony Zn^{2+} , Cd^{2+} lub Pb^{2+} , dlatego można zasugerować stosowanie wspomnianego szczepu do produkcji biopreparatu przeznaczonego do inokulacji nasion różnych gatunków koniczyny używanej w praktykach bioremediacyjnych na terenach skażonych kadmem, cynkiem i/lub ołowiem. Z uwagi na możliwość praktycznego wykorzystania opisanych w pracy wyników, szczep *Rhizobium leguminosarum* TR4 i jego zastosowanie stały się przedmiotem zgłoszenia patentowego P.424967 (Urząd Patentowy RP, 20.03.2018).

VII. Summary

The symbiosis with rhizobia provides a rich nitrogen source for leguminous (*Fabaceae*) plants. These are often used in land reclamation practices, because they are also able to modify soil structure and improve its sanitary conditions. Degraded soils, located near industrial or mining areas, often accumulate many heavy metal ions, which negatively affect soil microflora, resulting in lowering the number of bacteria and/or reducing biodiversity. This is especially important for legume-rhizobial symbioses, due to the fact (a) rhizobia are often sensitive to heavy metal ions, and (b) the lack of soil rhizobia considerably limits the growth of their *Fabaceae* hosts. Therefore, if the land reclamation practices using leguminous plants are intended on heavy metal polluted areas, the use of heavy metal resistant strains is recommended. Moreover, biostimulators like rhizobial Nod factors could be used for the better result as they can enhance plant nodulation, and therefore more symbiotically reduced nitrogen can be provided for plants.

The aim of this work was to select the rhizobial strain which could effectively enhance growth of its plant host under Zn^{2+} , Cd^{2+} and/or Pb^{2+} contamination, which can be applied alone or with their metabolites (Nod factors).

The collection of 62 strains derived from nodules of *Trifolium*, *Lotus* and *Anthyllis* grown on Zn-Pb waste tip near Bolesław, Poland. High genetic diversity of collection was proved using PCR-RFLP and AFLP techniques. The level of Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} tolerance was studied using three methods (plate tests, growth tests, live-dead fluorescent microscopy), and 6 strains with relatively high resistance for studied ions were chosen. Sequence analyses of the 7 “housekeeping genes” revealed that four of these strains were *Rhizobium leguminosarum* and two should be classified as *Agrobacterium sp.*, and the relation between these strains were confirmed using Biolog physiological tests.

One strain (*R. leguminosarum* TR4) was selected for the further tests, because it nodulated different species of *Trifolium* (*T. pratense* and *T. repens*) and supported the growth of plant host most efficiently. A preparation of Nod factors-containing the extract was isolated from *R. leguminosarum* TR4 culture, the biological activity of extract was confirmed, and it was used in the further experiments.

The effect of *R. leguminosarum* TR4 and preparation of its Nod factors were studied in pot experiments, with clover cultivated on media contaminated with different levels of zinc, cadmium and lead salts. The application of *R. leguminosarum* TR4 or *R. leguminosarum* TR4 with its Nod factors resulted in a significant increase in nodule number and fresh root and shoot mass at different levels of Zn^{2+} , Cd^{2+} or Pb^{2+} , as well as in presence of these three pollutants together. Best plant-promoting effect was observed for the mixed (*R. leguminosarum* TR4 + Nod factors) treatment of plants. The application of *R. leguminosarum* TR4 with its Nod factors preparation lowered the detrimental effect of heavy metal pollution on plant growth, therefore this strain and its metabolites could be proposed as biofertilizer for clover used in land reclamation practices in the areas polluted with Zn^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} , and some results described in this work were included in the patent application P.424967 (Polish Patent Office, 20.03.2018).

VIII. Literatura

1. Almaraz J.J., Mabood F., Zhou X., Souleimanov A., Smith D.L.: Effect of Nod factor sprays on soybean growth and productivity under field conditions. *Acta Agr Scand B-S P*, **61**, 228-234 (2011)
2. Atti S., Bonnell R., Prasher S., Smith D.L.: Effect of Nod factor sprays on soybean (*Glycine max*) under chronic water deficit to LCO application during flowering and pod filling. *Irrig Drain*, **54**, 15-30 (2005)
3. Balestrasse K.B., Gallego A.M., Tomaro M.L.: Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max*) plants. *Plant Soil*, **262**, 373-381 (2004)
4. Balestrasse K.B., Gallego A.M., Tomaro M.L.: Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation play an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant Soil*, **284**, 187-194 (2006)
5. Bawolski S.: Porównanie plonowania koniczyny czerwonej i jej mieszanek z trawami w zależności od poziomu nawożenia azotem i warunków siedliskowych. *Pam. Puław.*, **78**, 97-109 (1982)
6. Becker J.M., Parkin T., Nakatsu C.H., Wilbur J.D., Konopka A.: Bacterial activity, community structure and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. *Microb Ecol*, **51**, 221-231 (2006)
7. Begum A.A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F.: Inoculation of pea (*Pisum sativum*) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* preincubated with naringenin and hesperitin or application naringenin and hesperitin directly into soil increased pea nodulation under short season conditions. *Plant Soil*, **237**, 71-80 (2001a)
8. Begum A.A., Leibovitch S., Migner P., Zhang F.: Specific flavonoids induced nod gene expression and pre-activated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *J Exp Bot*, **52**, 1537-1543 (2001b)
9. Bemsten J., Grant R., Olesen J.E., Kristensen I.S., Vinther F.P., Molgaard J.P., Petersen B.M.: Nitrogen cycling in organic farming systems with rotational grass-clover and arable crops. *Soil Use Manage*, **22**, 197-208 (2006)

10. Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L.: Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol*, **17**, 21-34 (2005)
11. Binet M.R., Ma R., McLeod C.W., Poole R.K.: Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in *Escherichia coli* by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Biochem*, **318**, 30-38 (2003)
12. Borowiecki J., Ścibior H.: Red clover meadow fescue mixtures in extensive fodder production. Proc. 20 th Meeting of EUCARPIA Fodder Crop and Amenity Grass Section, 71-74, (1997)
13. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotox Environ Saf*, **45**, 198-207 (2000)
14. Carpena R.O., Vazquez S., Esteban E., Fernandez-Pascual M., de Felipe M.R., Zornoza P.: Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiol Biochem*, **41**, 911-919 (2003)
15. Chaney R., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M.: Phytoremediation of soil metals. *Curr Opin Biotech*, **8**, 279-284 (1998)
16. Chen H.-C., Feng J., Hou B.-H., Li F.-Q., Li Q., Hong G.-F.: Modulating DNA bending affects nodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucl Acid Res*, **33**, 2540-2548 (2005)
17. Chubukova O.V., Postrigan B.N., Baimiev A.K., Chemeris A.V.: The effect of cadmium on the efficiency of development of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Biol Bull Russ Acad Sci*, **42**, 458-462 (2015)
18. Cooper J.E.: Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol*, **103**, 1355-1365 (2007)
19. Dixon R., Kahn D.: Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 621-631 (2004)
20. Downie J.A.: The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev*, **34**, 150-170 (2010)
21. Eardly B.D., Wang F.S., van Berkum P.: Corresponding 16S rRNA gene segments in *Rhizobiaceae* and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil*, **186**, 69-74 (1996)

22. Eriksen J., Vinther F.P., Soegaard K.: Nitrate leaching and N₂-fixation in grasslands of different composition, age and management. *J Agric Sci*, **142**, 141-151 (2004)
23. Ez-Zarhouny D., Hbaiz E.M., Lebkiri M., Elanza S., Lebkiri A., Rifi E.H., Habbadi N.: Evaluation of the accumulation of some heavy metals in the red beetroot (*Beta vulgaris*) grown on two different soils and irrigated by wastewater from the SETP Bouznika (Morocco). *Int J Sci Eng Res*, **6**, 674-679 (2015)
24. Fabiański J., Chmielnicki J., Roszak W.: Wpływ członów zmianowania z udziałem roślin motylkowych na niektóre właściwości fizyczne i chemiczne gleby oraz plon rośliny następczej. *Mat Konf XXXV lat AR, Szczecin*, 120-131 (1989)
25. Fahr M., Laplaze L., Bendaou N., Hoher V., El Mzibri M., Bogusz D., Smouni A.: Effect of lead on root growth. *Front Plant Sci*, **4**, 175 (2013)
26. Fantke P., Friedrich R., Jolliet O.: Health impact and damage cost assessment of pesticides in Europe. *Environ Int*, **49**, 9-17 (2012)
27. Finan T.M.: Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J Bacteriol*, **184**, 2855-2856 (2002)
28. Finan T.M., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorholter F.J., Cowie A., Hernandez-Lucas I., Becker A., Gouzy J., Golding B., Puhler A.: The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 9889-9894 (2001)
29. Fraysse N., Couderc F., Poinot V.: Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem*, **270**, 1365-1380 (2003)
30. Fruzińska R.: Właściwości fizyczno-chemiczne gleb terenu przemysłu metalowego. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Zielonogórskiego*, **138**, 146-157 (2010)
31. Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F., Hirsch A.M.: Rhizobium common *nod* genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol*, **67**, 504-515 (2008)

32. Gage D.J.: Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 280-300 (2004)
33. Garg N., Aggarwal N.: Effects of interactions between cadmium and lead on growth, nitrogen fixation, phytochelatin and glutathione production in mycorrhizal *Cajanus cajan*. *J Plant Growth Regul.*, **30**, 286-300 (2011)
34. Gaunt M.W., Turner S.L., Rigottier-Gois L., Lloyd-Macgilp S.A., Young P.W.: Phylogenies of *atpD* and *recA* suport the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 2037-2048 (2001)
35. Gawęł E.: Rola roślin motylkowatych drobnonasiennych w gospodarstwie rolnym. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, **11**, 73-91 (2011)
36. Gąsiorek S., Kostuch R.: Ustalenie najkorzystniejszego stosunku pomiędzy trawami i koniczyną białą w dwugatunkowych mieszkankach trawiasto-koniczynowych. *Zesz Probl Post Nauk Roln*, **408**, 357-363 (1993)
37. Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C.: Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet*, **42**, 413-441 (2008)
38. Gomez-Sagasti M.T., Alkorta I., Becerril J.M., Epelde L., Anza M., Garbisu C.: Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water Air Soil Pollut*, **223**, 3249-3262 (2012)
39. Gonzalez L.J., Rodelas C., Pozo V., Salmeron M.V., Salmeron V.: Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. *Amino Acids*, **28**, 363-367 (2005)
40. Gramss G., Voigt K.D.: Regulation of the mineral concentrations in pea seeds from uranium mine and reference soils diverging extremely in their heavy metal load. *Sci Hortic*, **194**, 255-266 (2015)
41. Grodzińska K. i Szarek-Łukaszewska G.: Hałdy okolic Bolesławia. Instytut Botaniki im. W. Szafera, PAN (2002)
42. Groffman P.: Terrestrial denitrification: challenges and opportunities. *Ecol Process*, 1-11 (2012)
43. Haag A.C., Arnold M.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P.: Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev*, **37**, 364-383 (2013)

44. Haeze W.D., Holsters M.: Nod factor structures, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, **12**, 79-105 (2002)
45. Hander K., Dyckmans J., Joergensen R.G., Meyer B., Raubuch M.: Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. *Biol Fertil Soils* **34**, 241-247 (2001)
46. Havlin J.L., Tisdale S.L., Nelson W.L., Beaton J.D.: Soil fertility and fertilizers; An introduction to nutrient management, 8th edn. ISBN: 978-81-203-4868-4 (2013)
47. Herawati N., Suzuki S., Hayashi K., Rivai I.F., Koyama H.: Cadmium, copper and zinc levels in rice and soils of Japan, Indonesia and China by soil type. *Bull Environ Contam Toxicol*, **64**, 33-39 (2000)
48. Inal A., Gunes A., Zhang F., Cakmak I.: Peanut/maze intercropping induced changes in rhizosphere and nutrient concentrations in shoots. *Plant Phys Biochem*, **45**, 350-356 (2007)
49. Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach: *Monitoring Chemizmu Gleb Ornych Polski*, http://www.gios.gov.pl/chemizm_gleb/ (2017).
50. Janczarek M., Rachwał K., Marzec A., Grządziel J., Palusińska-Szys M.: Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol*, **85**, 94-113 (2018)
51. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C.: How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol*, **5**, 619-633 (2007)
52. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa (2001)
53. Kabata-Pendias A., Mukherjee A.B.: Trace elements from soil to human, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (2007)
54. Kakraliya S.K., Singh U., Bohra A., Choudhary K.K., Kumar S., Meena R.S., Jat M.L.: Nitrogen and legumes: a meta-analysis. *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*, Springer, 277-314 (2018)
55. Karczewska A.: Ochrona gleb i rekultywacja terenów zdegradowanych. Wyd. UP, Wrocław (2012)

56. Karczewska A., Bogda A., Gałka B.: Problem rekultywacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi na terenach dawnego górnictwa rud metali w Sudetach. *Rocz Glebozn*, **57**, 106-116, (2006)
57. Karpiscak M.M., Whiteaker L.R., Artiola J.F., Foster K.E.: Nutrient and heavy metal uptake and storage in constructed wetland systems in Arizona. *Water Sci Technol*, **44**, 455-462 (2001)
58. Kaszubkiewicz J., Kawałko D.: Zawartość wybranych metali ciężkich w glebach i roślinach na terenie powiatu jeleniogórskiego. *Ochr Środ Zas Nat*, **40**, 177-189 (2009)
59. Khan M.S., Zaidi A., Wani P.A., Oves M.: Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett*, **7**, 1-19 (2009)
60. Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A.: Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiol Res*, **167**, 144-150 (2012)
61. Klimont K., Bulińska-Radomska Z.: Sukcesja roślin na terenach poeksploatacyjnych kopalni siarki „Jeziórko”. *Biul Ins Hod Aklim Roślin*, **257/258**, 29-37 (2010)
62. Korban Z.: Problem odpadów wydobywczych i oddziaływania ich na środowisko, na przykładzie zwałowiska nr 5A/W-1 KWK „X”. *Górnictwo i geologia*, **6**, 109-120 (2011)
63. Kowalski M., Dolecka J., Małek W., Myszka A.: Novel bacterial strain of bacterium *Rhizobium meliloti*. PL19970320834
64. Lakzian A., Murphy P., Turner A., Beynon J.L., Giller K.E.: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol Biochem*, **34**, 519-529 (2002)
65. Lal A.M.: Nitrogen Metabolism. *Plant Phys Dev Metabolism*, Springer, **11**, 425-480, (2018)
66. Ledin M.: Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil system. *Earth Sci Rev*, **51**, 1-31 (2000)
67. Lee A., Hirsch A.M.: Signals and responses: choreographing the complex interaction between legumes and α - and β -rhizobia. *Plant Signal Behav*, **1**, 161-168 (2006)

68. Lindstrom K., Young J.P.: International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: minutes of the meeting, 7 September 2010, Geneva, Switzerland. *Int J Syst Evol Microb*, **61**, 3089-3093 (2011)
69. Lis J., Pasieczna A., Mojski J.E., Przeniosło S., Sylwestrzak H., Strzelecki R., Wołkowicz S.: Atlas Geochemiczny Polski (2012)
70. Liu X.M., Wu J.J., Xu J.M.: Characterizing the risk assessment of heavy metals and sampling uncertainly analysis in paddy field by geostatic and GIS. *Environ Pollut*, **141**, 257-264 (2006)
71. Long S.R.: *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant cell*, **8(10)**, 1885–1898 (1996)
72. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Martyniuk S., Skorupska A.: Preatreatment of Clover Seeds with Nod Factors Improves Growth and Nodulation of *Trifolium pratense*. *J Chem Ecol*, **35**, (2009)
73. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A.: Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiol Res*, **165**, 50-60 (2010)
74. Majtkowski W., Majtkowska G.: Fitosanitarna rola szaty roślinnej na zrekultywowanej hałdzie popiołów w Sowlanach k. Białegostoku. *Biul Ins Hod Aklim Roślin*, **263**, 55-63 (2012)
75. Mancinelli R.L.: The nature of nitrogen; an overview. *Life Support Biosph Sci*, **3**, 17-24 (1996)
76. Manier N., Deram A., Broos K., Denayer F.O., Haluwyn C.V.: White clover nodulation index in heavy metal contaminated soils – a potential bioindicator. *J Environ Qual*, **38**, 685-692 (2009)
77. Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin A.T., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G.: Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 795-799 (1998)
78. Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P., Willems A.: Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 200-214 (2008)

79. Martyniuk S.: Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. *J Res Appl Agricult Engin*, **53**, 9-14 (2008)
80. Martyniuk S.: Wytwarzanie preparatów mikrobiologicznych na przykładzie bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych. *J Res Applicat Agricult Engineer*, **55**, 20-23 (2010)
81. Martyniuk S.: Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. *Pol J Agron*, **9**, 17-22 (2012)
82. Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J.: Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol*, **17**, 458-466 (2009)
83. Masson-Boivin C., Sachs J.L.: Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia-the roots of a success story. *Curr Opin Plant Biol*, **44**, 7-15 (2017)
84. Matthyse A.G.: The genus *Agrobacterium*. *Procaryotes*, **5**, 91-114 (2006)
85. McGrath S.P., Brookes P.C., Giller K.E.: Effects of potential toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens*. *Soil Biol Biochem*, **20**, 415-424 (1988)
86. Meena H.R., Gogoi N., Kumar S.: Alarming issues on agricultural crop production and environmental stresses. *J Clean Prod*, **142**, 3357-3359 (2017)
87. Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E.: A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes, coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol*, **132**, 161-173 (2003)
88. Mhamdi R., Mrabet M., Laguerre G., Tivari R., Aouani M.E.: Colonization of *Phaesolus vulgaris* nodules by *Agrobacterium*-like strains. *Canad J Microb*, **51**, 105-111 (2005)
89. Miransari M., Smith D.: Rhizobial lipo-chitooligosaccharides and gibberelins enhance barley (*Hordeum vulgare*) seed germination. *Biotechnology*, **8**, 270-275 (2009)
90. Mocek-Płóćiniak A.: Biologiczna rekultywacja terenów zdegradowanych po eksploatacji węgla brunatnego i rud miedzi. *Nauka Przyr Technol*, **42**, 1-9 (2014)

91. Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J.: Architecture of inection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, **140**, 661-670 (2006)
92. Mrabet M., Mnasri B., Romdhane S.B., Laguerre G., Aouani M.E., Mhamdi R.: *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiol Ecol*, **506**, 304-309 (2006)
93. Mroczkowski W., Ruszkowska M., Kusio M.: Wymywanie azotanów z gleby do wód glebowo-gruntowych w zmianowaniu z udziałem roślin motylkowatych. *Pam. Puław.*, **111**, 89-102 (1997)
94. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F.: Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng Geol*, **60**, 193-207 (2001)
95. Mumtaz H., Sajid M., Ahmad A.: Effect of lead and chromium on growth, photosynthetic pigments and yield components in mash bean (*Vigna mungo*). *Pak J Bot*, **38**, 1389-1396 (2006)
96. Muneer S., Kim T.H., Qureshi M.I.: Fe modulates Cd-induced oxidative stress and the expression of stress responsive proteins in the nodules of *Vigna radiata*. *Plant Growth Regul*, **68**, 421-433 (2012)
97. Murugesan S., Manoharan C., Vijayakumar R., Panneerselvam A.: Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *Int J Micribiol Res*, **1**, 92-96 (2010)
98. Natywa M., Selwet M., Maciejewski T.: Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych. *Fragm Agronom*, **31**, 56-63 (2014)
99. Noriega G.O., Balestrasse K.B., Batlle A., Tomaro M.L.: Cadmium induced oxidative stress in soybean plant also by the accumulation of d-aminolevulinic acid. *Biometals*, **20**, 841-851 (2007)
100. Nowak W.: Rekultywacja biologiczna hałdy fosfogipsu w zakładach chemicznych „Wizów”. *Zesz. Nauk. Uniw. Wroc.*, **545**, 195-203 (2006)
101. Ociepa-Kubicka A., Ociepa E.: Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **2**, 169-180 (2012)

102. Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A.: The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet*, **45**, 119-144 (2011)
103. Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K.: Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol*, **55**, 531-535 (2005)
104. Ovtšina A.O., Schultze M., Tikhonovich I. A., Spaink H.P., Kondorosi E., Kondorosi A., Staehelin C.: Nod factors of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and their fucosylated derivatives stimulate a Nod factor cleaving activity in pea roots and are hydrolyzed *in vitro* by plant chitinases at different rates. *Mol Plant-Microbe Interact*, **13**, 799-807 (2000)
105. Parmar P., Kumari N., Sharma V.: Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot Stud*, **54**, 45 (2013)
106. Paśmionka I.: Mikrobiologiczne przemiany azotu glebowego. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*, **66**, 185-192 (2017)
107. Paul A., Wauters G., Paul A.K.: Nickel tolerance and accumulation by bacteria from rhizosphere of nickel hyperaccumulators in serpentine soil ecosystem of Andaman, India. *Plant Soil*, **293**, 37-48 (2007)
108. Piotrowska M., Kusewicz D.: Mikroflora gleby. [W:] *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. (red.) Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska K., 195-200, Wyd. PWN, Warszawa (2007)
109. Pisarska K., Pietr S.J.: Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. *Post Mikrobiol*, **53**, 141-151 (2001)
110. Podleśny J., Wielbo J., Podleśna A., Kidaj D.: Usefulness of nod preparation (LCOs) use to presowable dressing of pea seeds (*Pisum sativum*). *J Res Appl Agr Eng*, **58**, 124-129 (2013)
111. Popp C., Ott T.: Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr Opin Plant Biol*, **14**, 458-467 (2011)
112. Prell J., Poole P.: Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol*, **14**, 161-168 (2006)

113. Przybulewska K., Nowak A., Stopa K.: Wpływ kadmu na przebieg procesu nityfikacji w glebie w zależności od temperatury i pH oraz wzrost roślin. *Rola drobnoustrojów w kształtowaniu środowiska*, 101-102 (2003)
114. Pudełko K., Narożna D., Króliczak J., Kidaj D., Wielbo J., Skorupska A., Mądrzak C.: Czynniki Nod jako potencjalne stymulatory procesu brodawkowania łubinu. *Zesz. Nauk. UP Wroc., Rol. CXXIII*, **626**, 115-132 (2017)
115. Pueyo M., Lopez-Sanchez J.F., Rauret G.: Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractibility in contaminated soils. *Anal Chim Acta*, **504**, 217-225 (2004)
116. Pytlarz-Kozicka M.: Wpływ ochrony roślin i szczepienia nitraginą na zdrowotność i plonowanie dwóch odmian łubinu żółtego. *Prog Plant Prot*, **50**, 47-51 (2010)
117. Reichman S.M.A.: The potential use of the legume-*Rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biol*, **39**, 2587-2593(2007)
118. Rodales G.B, Gonzales L.P.: *Rhizobium leguminosarum bv viciae* strain Z25 as an inoculating agent for the cultivation of leguminous plants. ES2099670
119. Roszak W.: Badania wpływu roślin wieloletnich na produktyjność gleby na podstawie ich działania na niektóre elementy jej żyzności oraz plony roślin następczych. Cz. II. Wartość resztek poźniwnych roślin wieloletnich a plonowanie roślin następczych. *Roczniki Nauk Rolniczych*, **3**, 571-590 (1966)
120. Rubio L.M., Ludden P.W.: Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J Bacteriol*, **187**, 405-414 (2005)
121. Rucińska-Sobkowiak R.: Water relations in plants subjected to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant*, **38**, 257 (2016)
122. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Nowy Jork (1989)
123. Schlaman H.R.M., Olsthoorn M.M., Harteveld M., Dorner L., Djordjevic M.A., Thomas-Oates J.E., Spaink H.P.: The production of species-specific highly unsaturated fatty acyl-containing LCOs from *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii* is stringently regulated by nodD and involves the nodRL genes. *Mol Plant-microbe Interact*, **19**, 215-226 (2006)

124. Schlegel H. G.: Mikrobiologia ogólna. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa (2000)
125. Schwinghamer T., Souleimanov A., Dutilleul P., Smith D.: The plant growth regulator lipochitooligosaccharide (LCO) enhances the germination of canola (*Brassica napus*). *J Plant Growth Regul*, **34**, 183 (2015)
126. Seitzinger S., Harrison J.A., Bohlke J.K., Bouwman A.F., Lowrance R., Peterson B., Tobias C., Van Drecht G.: Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecol Appl*, **16**, 2064-2090 (2006)
127. Sergei A.M.: Nitrogen cycle. *Earth science, water and atmosphere*, EBSCO, 347-350 (2012)
128. Shvaleva A., de la Pena T.C., Rincon A., Morcillo C.N., de la Torre V.S.G., Lucas M.M., Pueyo J.J.: Flavodoxin over expression reduces cadmium-induced damage in alfalfa root nodules. *Plant Soil*, **326**, 109-121 (2010)
129. Singh A., Prasad S.M.: Remediation of heavy metal contaminated ecosystem: an overview on technology advancement. *Int J Environ Sci Technol*, **12**, 353-366 (2015)
130. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J.: Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact*, **5**, 7 (2006)
131. Skorupska A., Wielbo J., Kidaj D., Marek-Kozaczuk M.: Enhancing Rhizobium-legume symbiosis Using signaling factors [W:] *Microbes for Legume Improvement*, red. Khan M.S., Musarrat J., Zaidi A., Springer-Verlag, Vienna, 27-54 (2010)
132. Smith S., Habib A., Kang Y., Leggett M., Diaz-Zorita M.: LCO applications provide improved responses with legumes and nonlegumes. *Biol Nitrogen Fixat*, 1077-1086 (2015)
133. Sorensen J., Sessitsch A.: Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. *Modern soil microbiology*, CRC Press, 211-236 (2007)
134. Souleimanov A., Prithiviraj B., Smith D.L.: The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *J Exp Bot*, **53**, 1929-1934 (2002)
135. Spaink H.P., Wijfjes A.H, van der Drift M.G.M., Haverkamp J., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg L.J.: Structural identification of metabolites

- produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol*, **13**, 821-831 (1994)
136. Spaink H.P.: Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **54**, 257-288 (2000)
 137. Stan V., Gament E., Cornea C.P., Voaides C., Dusa M., Plopeanu G.: Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, **39**, 88-95 (2011)
 138. Stasiak G., Mazur A., Koper P., Żebracki K., Skorupska A.: Symbioza ryzobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Post Mikrobiol*, **55**, 289-299
 139. Staszewski Z.: Azot w glebie i jego wpływ na środowisko. *Zeszyty naukowe - inżynieria lądowa i wodna w kształtowaniu środowiska*, **4**, 50-58, (2011)
 140. Stępkowski T., Czaplińska M., Miedzińska M., Moulin L.: The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related Alpha Proteobacteria. *System Appl Microbiol*, **26**, 483-494 (2003)
 141. Stępkowski T., Moulin L., Krzyżańska A., McInnes A., Law I.J., Howieson J.: European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of Western Australia and South Africa. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 7041-7052 (2005)
 142. Stremińska M.A., Błaszczuk M.: Cykl biogeochemiczny azotu w glebach ekosystemu borów iglastych. *Post Mikrob*, **43**, 235-250 (2004)
 143. Sujkowska M.: Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate-*Rhizobium*, **53**, 35-53 (2009)
 144. Sullivan J.T., Ronson C.W.: Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe-tRNA* gene. *Proc Natl Acad Sci*, **95**, 5145-5149 (1998)
 145. Szarek-Łukaszewska G., Niklińska N.: Naturalna roślinność w rejonach starych zwałowisk odpadów po górnictwie rud Zn-Pb w okolicy Bolesławia i Bukowna (region śląsko-krakowski; południowa Polska). *Przeg Geol*, **56**, 528-531 (2008)
 146. Szarlip P., Włodarczyk T., Brzezińska M., Gliński J.: Production and uptake of nitrous oxide (N₂O) as affected by soil conditions. *Acta Agrophys*, **187**, 1-66 (2010)

147. Timmers A.C.: The role of plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *J Microsc*, **231**, 247-256 (2008)
148. Turner S.L., Young P.W.: The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol*, **17**, 309-319 (2000)
149. Udvardi M.K., Day D.A.: Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu Rev Plant Physiol*, **48**, 493-523 (1997)
150. Urząd Miasta Ruda Śląska, *Rekultywacja pocynkowej haldy*, <https://sozosfera.pl/odpady/rekultywacja-pocynkowej-haldy/> (2017)
151. Vance C.P.: Legume Symbiotic Nitrogen Fixation: Agronomic Aspects [W:] The Rhizobiaceae, Springer, Dordrecht (1998)
152. Vincent J.M.: A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No.15. Blackwell Scientific Publishers, Oxford (1970)
153. Vuylsteke M., Peleman J.D., van Eijk M.J.T.: AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nat Protoc*, **2**, 1387-1398 (2007)
154. Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B.: Podstawy endotoksykologii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa (2002)
155. Wang C., Shen Z., Li X., Luo C., Chen Y., Yang H.: Heavy metal contamination of agricultural soils and stream sediments near a copper mine in Tongling, People's Republic of China. *Bull Environ Contam Toxicol*, **73**, 862-869 (2004)
156. Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H.: Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cell Microbiol*, **14**, 334-342
157. Wang Q., Cui Y., Liu X., Dong Y., Christie P.: Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *J Environ Sci Health*, **38**, 823-838 (2003)
158. Weare W.W., Dai X., Byrnes M.J., Chin J.M., Schrock R.R., Muller P.: Catalytic reduction of dinitrogen to ammonia at a single molybdenum center. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 17099-17106 (2006)
159. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, **173**, 697-703 (1991)
160. Weston L.A., Mathesius U.: Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol*, **39**, 283-297 (2013)

161. White J., Prell J., James E.K., Poole P.: Nutrient sharing between symbionts. *Plant Psychiol*, **144**, 604-614 (2007)
162. Wielbo J., Skorupska A.: Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowate. *Post Mikrob*, **42**, 263-280 (2003)
163. Willems A.: The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*, **12**, 3-14 (2006)
164. Willems A. i Collins M.D.: Phylogenetic analysis of Rhizobia and Agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, **43**, 305-313 (1993)
165. Williams P.N., Lei M.: Occurrence and partitioning of cadmium, arsenic and lead in mine impacted paddy rice – Hunan, China. *Environ Sci Technol*, **43**, 637-642 (2009)
166. Wysokiński L.: Degradacja i stopień zanieczyszczenia terenów w Polsce. *Geoenvironmental engineering - transfer of knowledge and EU's directives to newly associated states*. Warszawa, 143-150 (2004)
167. Wyszowska J. i Kucharski J.: Liczebność drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi. *Zesz Probl Post Nauk Roln*, **492**, 427-433 (2003)
168. Xie Y., Fan J., Zhu W., Amombo E., Lou Y., Chen L., Fu J.: Effect of heavy metals pollution on soil microbial diversity and Bermudagrass genetic variation. *Front Plant Sci*, 7:775 (2016)
169. Zhang Y.M., Tian C.F., Sui X.H., Chen W.F., Chen W.X.: Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Public Library of Science*, 7(9): e44936 (2012)

Spis ilustracji

Rys. 1.	Obieg azotu w przyrodzie (Staszewski Z., 2011).....	6
Rys. 2.	Drzewo filogenetyczne proteobakterii (Masson-Boivin C. i wsp., 2009). Pogrubioną czcionką oznaczono rodzaje należące do ryzobiów	9
Rys. 3.	Struktura czynników Nod (Long S.R., 1996).....	12
Rys. 4.	Rozwój nici infekcyjnej i powstawanie brodawki korzeniowej (Kakralya S. K. i wsp., 2018)	13
Rys. 5.	Zawartość cynku w glebach Polski (Lis J. i wsp., 2012).....	18
Rys. 6.	Zawartość kadmu w glebach Polski (Lis J. i wsp., 2012).....	19
Rys. 7.	Zawartość ołowiu w glebach Polski (Lis J. i wsp., 2012)	19
Rys. 8.	Profile restrykcyjne fragmentu genu 16S rRNA (schemat). Liczby pod ścieżkami oznaczają liczbę szczepów, charakteryzujących się danym profilem restrykcyjnym. M – marker wielkości.....	44
Rys. 9.	Profile restrykcyjne fragmentu genu <i>nodA</i> (schemat). Liczby pod ścieżkami oznaczają liczbę szczepów, charakteryzujących się danym profilem restrykcyjnym. M - marker wielkości.....	45
Rys. 10.	Dendrogram opisujący wzajemne podobieństwo otrzymanych genotypów, wykonany na podstawie analizy RFLP regionów 16S rDNA i <i>nodA</i>	47
Rys. 11.	Amplikony badanych szczepów ryzobiów uzyskane w analizie AFLP. M – marker wielkości. 1 - X5, 2 - X8, 3 - X12, 4 - X14, 5 - K1, 6 - K2, 7 - K8, 8 - K10, 9 - K12, 10 - KB5, 11 - KB7, 12 - KCz3, 13 - KCz4, 14 - Kom1, 15 - Kom1A, 16 - Kom8, 17 - Kom 12, 18 - Pt1, 19 - Pt3B.....	48
Rys. 12.	Dendrogram opisujący wzajemne podobieństwo badanych szczepów, wykonany na podstawie analizy AFLP	49
Rys. 13.	Dendrogram dla fragmentu genu 16S rRNA (767 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	56
Rys. 14.	Dendrogram dla fragmentu genu <i>atpD</i> (466 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	56
Rys. 15.	Dendrogram dla fragmentu genu <i>dnaK</i> (275 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	57
Rys. 16.	Dendrogram dla fragmentu genu <i>glnA</i> (511 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	57
Rys. 17.	Dendrogram dla fragmentu genu <i>glnII</i> (501 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	58
Rys. 18.	Dendrogram dla fragmentu genu <i>gyrB</i> (636 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	58

Rys. 19. Dendrogram dla fragmentu genu <i>recA</i> (535 bp). Przy nazwach badanych szczepów umieszczono nazwy sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank	59
Rys. 20. Dendrogram uzyskany w analizie MLSA dla genów: 16S rRNA, <i>atpD</i> , <i>dnaK</i> , <i>glnA</i> , <i>glnII</i> , <i>gyrB</i> i <i>recA</i>	59
Rys. 21. Dendrogram określający podobieństwo metaboliczne badanych szczepów	61
Rys. 22. Fragment chromatogramu cukrów w postaci octanów alditoli, uwolnionych na drodze hydrolizy (4M HCl/100°C/4h) z preparatu czynników Nod szczepu <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	64
Rys. 23. Spektrogram glukozaminy w postaci octanu alditolu otrzymanej w wyniku hydrolizy (4M HCl/100°C/4h) preparatu czynników Nod szczepu <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	65

Spis tabel

Tab. 1.	Cząsteczki sygnałowe produkowane przez rośliny bobowate (Lal A., 2018)	11
Tab. 2.	Szczepy ryzobiów wykorzystane w badaniach.....	26
Tab. 3.	Startery oraz inne oligonukleotydy wykorzystane w reakcjach PCR.....	30
Tab. 4.	Przebieg reakcji PCR dla wykorzystanych primerów. 1 – wstępna denaturacja, 2 – denaturacja, 3 – annealing, 4 – elongacja, 5 – końcowa elongacja, 6 – liczba cykli.....	33
Tab. 5.	Warunki reakcji amplifikacji w analizie AFLP	35
Tab. 6.	Genotypy szczepów ryzobiów określone na podstawie analizy RFLP regionów 16S rDNA oraz <i>nodA</i>	46
Tab. 7.	Stężenia jonów Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} hamujące wzrost badanych szczepów na podłożach stałych	50
Tab. 8.	Stężenia Pb^{2+} , Zn^{2+} oraz Cd^{2+} w podłożu płynnym hamujące wzrost ryzobiów po 48 godzinach.....	51
Tab. 9.	Udział komórek żywych w populacji bakterii traktowanych jonami Zn^{2+} (1,00 = 100%). Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się przy $p<0,01$	52
Tab. 10.	Udział komórek żywych w populacji bakterii traktowanych jonami Cd^{2+} (1,00 = 100%). Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się przy $p<0,01$	52
Tab. 11.	Udział komórek żywych w populacji bakterii traktowanych jonami Pb^{2+} (1,00 = 100%). Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się przy $p<0,01$	53
Tab. 12.	Sumaryczna liczba brodawek korzeniowych po inokulacji różnych gatunków roślin bobowatych badanymi szczepami	54
Tab. 13.	Nowe nazwy badanych szczepów ryzobiów	55
Tab. 14.	Brodawkowanie i wzrost koniczyny białej po inokulacji szczepami TR1 lub TR4. Wartości w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p<0,05$	63
Tab. 15.	Brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej po inokulacji szczepami TR1 lub TR4. Wartości w wierszach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p<0,05$	63
Tab. 16.	Liczba brodawek, masa pędów oraz masa korzeni koniczyny łąkowej traktowanej różnymi stężeniami preparatu czynników Nod szczepu <i>Rhizobium leguminosarum</i> TR4. Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p<0,05$. Grupa kontrolna – nasiona nie zaprawiane	

preparatem czynników Nod. Grupa 10^{-2} , Grupa 10^{-3} , Grupa 10^{-4} , Grupa 10^{-5} – nasiona zaprawiane preparatem czynników Nod, odpowiednio w rozcieńczeniu 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5}	66
Tab. 17. Wpływ jonów Zn^{2+} na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$	67
Tab. 18. Wpływ jonów Cd^{2+} na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$	67
Tab. 19. Wpływ jonów Pb^{2+} na wzrost i brodawkowanie koniczyny łąkowej. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$	67
Tab. 20. Wpływ jonów Zn^{2+} i <i>R. leguminosarum</i> TR4 na wzrost koniczyny łąkowej. Wartości oznaczone gwiazdkami (Grupa R) różnią się istotnie od grupy kontrolnej (Grupa N) przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$. Grupa N – rośliny nie zakażone <i>R. leguminosarum</i> TR4; Grupa R – rośliny zakażone <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	68
Tab. 21. Wpływ jonów Cd^{2+} i <i>R. leguminosarum</i> TR4 na wzrost koniczyny łąkowej. Wartości oznaczone gwiazdkami (Grupa R) różnią się istotnie od grupy kontrolnej (Grupa N) przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$. Grupa N – rośliny nie zakażone <i>R. leguminosarum</i> TR4; Grupa R – rośliny zakażone <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	69
Tab. 22. Wpływ jonów Pb^{2+} i <i>R. leguminosarum</i> TR4 na wzrost koniczyny łąkowej. Wartości oznaczone gwiazdkami (Grupa R) różnią się istotnie od grupy kontrolnej (Grupa N) przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$. Grupa N – rośliny nie zakażone <i>R. leguminosarum</i> TR4; Grupa R – rośliny zakażone <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	69
Tab. 23. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy braku Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$	71
Tab. 24. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 5 mM Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,001$	71
Tab. 25. Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 10 mM Zn^{2+} w podłożu.	

	Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$71
Tab. 26.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 20 mM Zn^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$71
Tab. 27.	Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych <i>R. leguminosarum</i> TR4.....72
Tab. 28.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy braku Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$73
Tab. 29.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 100 μM Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$73
Tab. 30.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 250 μM Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$73
Tab. 31.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 500 μM Cd^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$73
Tab. 32.	Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych <i>R. leguminosarum</i> TR4.....74
Tab. 33.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy braku Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$75
Tab. 34.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 1 mM Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$75
Tab. 35.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 2 mM Pb^{2+} w podłożu.

	Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$	75
Tab. 36.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej przy 5 mM Pb^{2+} w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$	75
Tab. 37.	Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	76
Tab. 38.	Wpływ preparatu czynników Nod i/lub inokulacji <i>R. leguminosarum</i> TR4 na brodawkowanie i wzrost koniczyny łąkowej w obecności mieszaniny jonów metali ciężkich w podłożu. Wartości w kolumnach oznaczone gwiazdkami różnią się istotnie od grupy kontrolnej przy: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$	77
Tab. 39.	Sucha masa oraz zawartość azotu w suchej masie (%) roślin traktowanych preparatem czynników Nod i/lub inokulowanych <i>R. leguminosarum</i> TR4.....	78
Tab. 40.	Wzrost liczby brodawek korzeniowych, masy pędów i masy korzeni (%) u koniczyny łąkowej inokulowanej szczepem <i>R. leguminosarum</i> TR4 w obecności najwyższych stężeń jonów metali ciężkich, w porównaniu do grupy kontrolnej.....	82